UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

TAIANE PRISCILA GARDIZANI

**Imunossenescência e *Candida albicans*: avaliação da capacidade
fagocítica e produção intracelular de substâncias microbidas por
monócitos e macrófagos**

BAURU
2014

TAIANE PRISCILA GARDIZANI

Imunossenescência e *Candida albicans*: avaliação da capacidade fagocítica e produção intracelular de substâncias microbidas por monócitos e macrófagos

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Patologia Bucal.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vanessa Soares Lara

Versão corrigida

BAURU
2014

Gardizani, Taiane Priscila
G168i Imunossenescência e *Candida albicans*: avaliação da
capacidade fagocítica e produção intracelular de
substâncias microbidas por monócitos e macrófagos /
Taiane Priscila Gardizani. – Bauru, 2014.
131 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia
de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vanessa Soares Lara

Nota: A versão original desta dissertação encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Nº CAAE: 18418113.5.0000.5417
Data: 14 de Abril de 2014

DEDICATÓRIA

A todos que se empenharam direta ou indiretamente para me ajudar a realizar e finalizar este trabalho. A conquista é nossa!

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, razão da minha existência, por estar sempre presente em minha vida, me dando força, sabedoria e discernimento para superar os mais diversos obstáculos. “...*E ainda se vier, noites traiçoeiras, se a cruz pesada for, Cristo estará contigo, e o mundo pode até fazer você chorar mas Deus te quer sorrindo...*”.

Aos meus pais, **Fátima e Nelson**, por acreditarem e darem apoio ao meu sonho de estudar em uma universidade pública, fora da minha cidade, e, de possibilitar essa vivência por mais dois anos durante o mestrado. Por me proporcionarem conforto e suporte financeiro necessário para eu continuar meus estudos. Pelas horas de desabafo em que vocês tiveram paciência para me escutar e assim, proferir as palavras mais sábias e verdadeiras. Por me abrirem os olhos nos momentos críticos, apontarem os erros e me mostrarem de um jeito ou de outro o melhor caminho, contribuindo para que eu me torne, a cada dia que passe, uma pessoa melhor. Com certeza, sem vocês ao meu lado, tudo o que vivi e conquistei até esse momento não existiria. Obrigada por tudo. Amo muito vocês!

Ao meu irmão, lindeza da minha vida, **Thiego**, que sempre comemorou comigo minhas conquistas, que nunca negou uma boa conversa, que me escutou e me apoiou nos momentos difíceis, estando sempre ao meu lado e tomando para ele as minhas dores. Por estar sempre a postos, pronto para me defender a qualquer momento de qualquer coisa. São poucas as pessoas que tem a felicidade de desfrutar um relacionamento tão intenso e amoroso com um irmão por isso me considero a pessoa mais sortuda e feliz do mundo!

Ao meu amado namorado, **Fernando**, que sempre esteve ao meu lado nas minhas escolhas, conquistas, nos momentos felizes e naqueles momentos nem tão felizes assim. Pelo companheirismo, compreensão e paciência nos dias de experimento que duravam até tarde da noite. Por sempre estar pronto para me ouvir nas horas de tristeza e incerteza e, tentar me ajudar da maneira mais imparcial possível nas questões profissionais. Por ser meu grande amigo e cúmplice de todas as horas, por compartilhar das minhas preocupações e aflições e, por ser sempre uma pessoa otimista. Obrigada por me fazer feliz e ser meu ‘benção’!

À minha grande família, **Tia Mel, Tio Berto, Jac, Thi, Joyce, Fernando Melo, Tia Ana, Tio João Pedro, Jana, Fernando Beretta, Josi, Bru, Rona** obrigada pelos momentos juntos, vocês me trazem alegria e mostram como faz bem ter uma família unida.

À minha orientadora, **Prof.^a Dr.^a Vanessa Soares Lara**, pelos anos de ensinamento desde a iniciação científica até o mestrado, pelas conversas intensas e sinceras que me fizeram crescer ainda mais como pessoa e na vida profissional. Agradeço imensamente a confiança depositada em mim. Obrigada!

Aos professores da disciplina de Patologia da FOB-USP, **Dr. Luís Antônio de Assis Taveira**, obrigada por compartilhar seus ensinamentos e pelos momentos de descontração vividos na Patologia, **Dr.^a Denise Tostes Oliveira** agradeço imensamente os saberes compartilhados e a sua eficiência não somente como professora, mas também como coordenadora da área de Patologia junto ao curso de pós-graduação e, **Dr. Alberto Consolaro** pelas brilhantes aulas que sempre me contagiaram.

Aos funcionários da Patologia, **Marina Corrêa, Maria Cristina Carrara Filippi e Fátima Aparecida Silveira** pela eficiência e dedicação aos alunos da pós-graduação da Patologia.

Ao **Prof. Dr. Heitor Marques Honório** pela colaboração na realização das análises estatísticas.

Aos funcionários do CIP, **Marcelo Milanda** por estar sempre disponível e abdicar algumas horas de suas férias para me ajudar com a cultura de fungos, você foi indispensável, sou muito grata pela sua solicitude. **Rafaela Alves da Silva Alavarce** pela coleta de sangue dos voluntários para minha pesquisa. **Ms. Márcia S. Z. Graeff** pela contribuição com a microscopia confocal. **Renato Pereira Murback** por estar sempre a postos para arrumar qualquer falha mecânica nos equipamentos. **Neusa Caetano Barbosa** pela presença gloriosa e harmoniosa de todos os dias. Obrigada pelo carinho e momentos de alegria.

Às amigas e companheiras de trabalho do CIP **Flávia, Adriana, Priscila e Cíntia**, alunas da pós-graduação da Bioquímica, obrigada pelos momentos de alegria e descontração. Vocês tornaram os dias de experimento muito mais agradáveis.

À **Dr.^a Vânia Nieto Brito** e sua aluna de pós-graduação **Patrícia Gigliotti** por me receberem muitíssimo bem no Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL) e por estarem sempre dispostas a me ajudar com a técnica e com os materiais relacionados à cultura de células.

Às amigas de graduação, **Letícia Baccaro, Rafaela Nunes, Maíra Previero e Karen Pinke**, vocês foram o refúgio e a felicidade durante esses anos de estudo e trabalho. Sem vocês não haveria momentos de intensa alegria.

À querida amiga, **Nathalha Maset**, obrigada por compartilhar comigo os últimos seis anos de moradia em Bauru, os quais foram preenchidos por muitos momentos de alegria, conversas e guloseimas. Agradeço a delicadeza e compreensão nos momentos difíceis. Você vai ficar guardada pra sempre no meu coração.

À **Patrícia Freitas-Faria** que auxiliou na escrita do meu primeiro projeto de pesquisa durante a graduação. Aprendi com você a organizar as ideias e passá-las para o papel. Obrigada pela paciência e prontidão na troca de emails.

A todos os **alunos da pós-graduação da Patologia**, foi um prazer compartilhar esses anos de aprendizado com vocês!

Aos estimados amigos que ficarão guardados no coração, **Heliton Gustavo de Lima**, pelos momentos de descontração, continue sendo essa pessoa alegre e contagiante. **José Burgos Ponce**, pelas conversas e bons momentos compartilhados, espero que a amizade continue daqui pra frente, bons amigos a gente nunca esquece. **Karen Henriette Pinke**, por me ajudar na parte técnica durante o desenvolvimento do projeto de mestrado e por estar sempre presente em minha vida compartilhando momentos de alegria e/ou dificuldades. A convivência durante todos esses anos nunca será esquecida!

As queridas **Agnes Assao, Kellen Tjioe, Ana Paula Madi e Regina Barrach**, por todos os momentos de alegria compartilhados.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia de Bauru – USP na pessoa do ex-diretor **Prof. Dr. José Carlos Pereira** e da atual diretora **Prof.^a Dr.^a Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado**.

À Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru, na pessoa do ex-presidente, **Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti** e do atual presidente **Prof. Dr. Guilherme dos Reis Pereira Janson**.

Ao curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de Concentração em Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP na pessoa de **Prof.^a Dr.^a Denise Tostes Oliveira**.

Ao Centro Integrado de Pesquisa (CIP), na pessoa do ex-coordenador **Prof. Dr. Vinicius Carvalho Porto** e do atual coordenador **Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira**, por permitirem o uso das dependências do laboratório para o desenvolvimento do meu projeto de pesquisa.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da bolsa de estudos durante o mestrado.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, que concedeu auxílio financeiro para a viabilização deste trabalho.

“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos.”

Charles Chaplin

RESUMO

Atualmente, a população mundial está passando por um processo de transição demográfica, relacionado com o aumento considerável do número de idosos em relação aos jovens. O rápido crescimento da população idosa constitui uma das maiores preocupações da sociedade moderna, o que demanda um aumento no estudo da saúde e da melhoria da qualidade de vida dos idosos, incluindo um maior esclarecimento dos aspectos patofisiológicos relacionados com as doenças microbianas. Uma das infecções que afetam os idosos, principalmente os imunocomprometidos, é a candidose, a qual pode ser causada por diferentes espécies de *Candida*, em especial *Candida albicans* (*C. albicans*). Os monócitos e macrófagos exercem funções essenciais no combate a microrganismos através do processo fagocítico que abrange a produção de espécies reativas do nitrogênio e oxigênio que culminam no controle e/ou morte do patógeno. Uma vez esses fatores comprometidos, o combate aos agentes agressores é dificultado e ou ineficaz fazendo com que estas disfunções ocasionem problemas clínicos. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar *in vitro* a capacidade fagocítica, a geração de óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) intracelular, e a habilidade de controlar o crescimento extracelular do fungo *C. albicans* por monócitos e macrófagos humanos de idosos e jovens. Para isso, foram obtidos monócitos do sangue periférico de indivíduos idosos e jovens os quais permaneceram em cultura por 7 dias e se diferenciaram em macrófagos. Ambos os fagócitos foram desafiadas com diferentes proporções de *C. albicans* viáveis (5 células:1 fungo, 1:1 e 1:5) por 30min, 2h e 5h. Após os desafios, os dados foram analisados por meio de ensaio fluorescente de fagocitose e crescimento fúngico extracelular, e pelos kits DAF-FM diacetato (NO) e Cell Rox Deep (H₂O₂). Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (SD) dos valores ou porcentagens obtidos e a análise estatística foi realizada por meio do teste estatístico ANOVA fatorial seguido do teste de Fischer, considerando $p < 0,05$. Nossos resultados revelaram que a idade não afeta a internalização de *C. albicans* por monócitos e macrófagos oriundos de idosos, no entanto, esses indivíduos levaram mais tempo para ativar a produção de NO e H₂O₂ que os jovens. Após 5h de estímulo fúngico, as células dos idosos se igualaram ou superaram a resposta imunológica apresentada pelos jovens, demonstrando maior habilidade em controlar o crescimento fúngico extracelular. Baseados nestes resultados, concluímos que, em comparação aos jovens, os monócitos e macrófagos de idosos têm sua habilidade de internalizar o fungo *C. albicans* preservada; no entanto, os seus sinais de ativação para a produção de substâncias microbicidas, como NO e H₂O₂, estão prejudicados, o

que pode propiciar a instalação local do fungo e/ou disseminação sistêmica nesta população. Além disso, ao longo do tempo, estas células oriundas de idosos conseguiram produzir NO e H₂O₂ como ou mais que os jovens, sugerindo um estado de pré-ativação celular em função de níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias inerentes do estado crônico *inflamm-aging*, o qual os idosos podem estar vivenciando.

Palavras-chave: Monócitos. Macrófagos. *Candida albicans*. Fagocitose. Óxido Nítrico. Peróxido de Hidrogênio. Controle do Crescimento Fúngico Extracelular.

ABSTRACT

Immunosenescence and *Candida albicans*: assessment of the phagocytic capacity and intracellular production of microbicidal substances by monocytes and macrophages

Currently, the world population is undergoing a process of demographic transition, associated with a considerable increase in the number of elderly compared with young subjects. The rapid growth of the elderly population is a major concern of the modern society, which requires an increase in the study of health and improved quality of life for the aged. This includes a greater clarification of the pathophysiological aspects of microbial diseases. One of the infections affecting the elderly, particularly those immunocompromised, is the candidosis that can be caused by various *Candida* species, especially *Candida albicans* (*C. albicans*). Monocytes and macrophages exert essential functions in combating microorganisms by phagocytic process. During this process occur the production of reactive nitrogen species and reactive oxygen species that culminate in the control and/or death of the pathogen. Once these factors are affected, the fight against aggressors is difficult and/or ineffective, and these disorders can cause clinical problems. Thus, the aim of this *in vitro* study was to investigate occurrence of phagocytosis, the intracellular generation of nitric oxide (NO) and hydrogen peroxide (H₂O₂), and the ability of human monocytes and macrophages from young and old in controlling the extracellular growth of the fungus *C. albicans*. Therefore, peripheral blood monocytes from elderly and young subjects were obtained and remained in culture for 7 days until they differentiate into macrophages. Both mononuclear cells were challenged with different proportions of viable *C. albicans* (5 cells:1 fungus, 1:1 and 1:5) for 30min, 2h and 5h. After the challenges, it was possible to evaluate the ability of fungal internalization and the controlling of extracellular fungal growth by a fluorescent assay, and measure the intracellular production of nitric oxide (NO) by DAF-FM Diacetate and hydrogen peroxide (H₂O₂) by Rox Deep Cell Kit. The results were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD) values or percentages obtained and the statistical analysis was performed using factorial ANOVA followed by Fisher test, with $p < 0.05$. Our results showed that age does not affect the internalization of *C. albicans* by monocytes and macrophages derived from older subjects, however, these individuals took more time to activate the production of NO and H₂O₂ than that young. After 5h of fungal stimulation, the cells of the elderly equaled or exceeded the immune response presented by young people, demonstrating greater ability to control the extracellular fungal growth. Thus, we conclude that, compared

with young, monocytes and macrophages from elderly have their ability to internalize the fungus *C. albicans* preserved; however, their activation signals for the production of microbicidal substances, such as NO and H₂O₂ are impaired, which may facilitate the local installation of the fungus and/or systemic dissemination in this population. Furthermore, over time, these cells derived from elderly were able to produce NO and H₂O₂ as or more than the young, suggesting a state of cellular pre-activation. Probably due to high levels of proinflammatory cytokines involved in the chronic state which older people may be experiencing, known as *inflamm-aging*.

Key words: Monocytes. Macrophages. *Candida albicans*. Phagocytosis. Nitric Oxide. Hydrogen Peroxide. Control of Extracellular Fungal Growth.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

- Figura 1** - Caracterização da população celular *in vitro*. Macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico de humanos apresentaram imunomarcação para CD14 (A) e para CD11c (B). O núcleo dos macrófagos foram corados com DAPI (C). Em D, a sobreposição das três imagens (microscópio de varredura confocal a laser)..... 63
- Figura 2** - Morfologia e viabilidade dos macrófagos derivados dos monócitos do sangue periférico. Em cultura, os macrófagos apresentaram-se com citoplasma arredondado ou fusiforme (A). Ao final dos 7 dias de cultura, foi constatada a viabilidade dos macrófagos através da coloração com Vermelho Neutro (B). Imagens obtidas em microscópio invertido, campo claro..... 64

GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Média $\pm$ desvio padrão de fungos *C. albicans* internalizados por monócitos de idosos ou de jovens, após diferentes proporções de células em relação às leveduras (MON:F) e após diferentes períodos de desafio *in vitro*. A interiorização fúngica está expressa em Unidade Arbitrária de Fluorescência (U_{AF}), sendo que símbolos e letras iguais revelam diferença estatística ($p < 0,05$)..... 65
- Gráfico 2** - Média $\pm$ desvio padrão de fungos *C. albicans* internalizados por macrófagos de idosos ou de jovens, após diferentes proporções de células em relação às leveduras (MAC:F) e após diferentes períodos de desafio *in vitro*. A interiorização fúngica está expressa em Unidade Arbitrária de Fluorescência (U_{AF}), sendo que símbolos e letras iguais revelam diferença estatística ($p < 0,05$)..... 66
- Gráfico 3** - Comparação da internalização de *C. albicans* por monócitos (MON) e macrófagos (MAC), oriundos de ambos os grupos, após diferentes proporções de células em relação às leveduras (CEL:F) e diferentes períodos de desafio *in vitro*. A interiorização fúngica está expressa em

Unidade Arbitrária de Fluorescência (U_{AF}), considerando-se a média $\pm$ desvio padrão. Símbolos iguais diferem estatisticamente ($p < 0,05$). Cada letra representa diferença estatisticamente significativa, considerando o mesmo grupo e tempo de desafio, para cada célula individualmente ($p < 0,05$), quando comparada com: 5:1 e 1:1 (**a**); com 5:1 (**b**)..... 68

Gráfico 4 - Produção intracelular média ($\pm$ desvio padrão) de óxido nítrico por monócitos de idosos e jovens, expressa em Unidade Arbitrária de Fluorescência (U_{AF}), após diferentes proporções de células em relação as leveduras (MON:F). Símbolos iguais diferem estatisticamente ($p < 0,05$). Cada letra representa diferença estatisticamente significativa, considerando o mesmo grupo e tempo de desafio ($p < 0,05$), quando comparada com: 5:1, 1:1 e Meio (**a**); 5:1 e Meio (**b**); com o Meio (**c**).... 71

Gráfico 5 - Produção intracelular média ($\pm$ desvio padrão) de óxido nítrico por macrófagos de idosos e jovens, expressa em Unidade Arbitrária de Fluorescência (U_{AF}), após diferentes proporções de células em relação às leveduras (MAC:F). Símbolos iguais diferem estatisticamente ($p < 0,05$). Cada letra representa diferença estatisticamente significativa, considerando o mesmo grupo e tempo de desafio ($p < 0,05$), quando comparada com: 5:1, 1:1 e Meio (**a**); 5:1 e Meio (**b**)..... 73

Gráfico 6 - Comparação da produção de óxido nítrico por monócitos (MON) e macrófagos (MAC) oriundos de ambos os grupos, após diferentes proporções de células em relação às leveduras (CEL:F) e diferentes períodos de desafio *in vitro*. A produção de NO está expressa em Unidade Arbitrária de Fluorescência (U_{AF}), considerando-se a média $\pm$ desvio padrão. Símbolos iguais diferem estatisticamente ($p < 0,05$). Cada letra representa diferença estatisticamente significativa, considerando o mesmo grupo e proporção, para cada célula individualmente ($p < 0,05$), quando comparada com: 30min e 2h (**a**); com 30min (**b**); com 2h (**c**)..... 76

Gráfico 7 - Produção intracelular média ($\pm$ desvio padrão) de peróxido de hidrogênio por monócitos de idosos e jovens, expressa em Unidade Arbitrária de Fluorescência (U_{AF}), após diferentes proporções de

células em relação as leveduras (MON:F). Símbolos iguais diferem estatisticamente ($p<0,05$). Cada letra representa diferença estatisticamente significativa, considerando o mesmo grupo e tempo de desafio ($p<0,05$), quando comparada com: 5:1 e Meio (b); com o Meio (c).....	79
Gráfico 8 - Produção intracelular média ($\pm$ desvio padrão) de peróxido de hidrogênio por macrófagos oriundos de idosos e jovens, expressa em Unidade Arbitrária de Fluorescência ($_{UAF}$), após diferentes proporções de células em relação as leveduras (MAC:F). Símbolos iguais diferem estatisticamente ($p<0,05$). Cada letra representa diferença estatisticamente significativa, considerando o mesmo grupo e tempo de desafio ($p<0,05$), quando comparada com: 5:1, 1:1 e Meio (a); 5:1 e Meio (b); com o Meio (c).....	81
Gráfico 9 - Comparação da produção de peróxido de hidrogênio por monócitos (MON) e macrófagos (MAC) oriundos de ambos os grupos, após diferentes proporções de células em relação às leveduras (CEL:F) e diferentes períodos de desafio <i>in vitro</i> . A produção de H_2O_2 está expressa em Unidade Arbitrária de Fluorescência ($_{UAF}$), considerando-se a média $\pm$ desvio padrão. Símbolos iguais diferem estatisticamente ($p<0,05$). Cada letra representa diferença estatisticamente significativa, considerando o mesmo grupo e proporção, para cada célula individualmente ($p<0,05$), quando comparada com: 30min e 2h (a); com 30min (b); com 2h e 5h (c); com 2h (d).....	84
Gráfico 10 - Média do percentual do crescimento fúngico na presença ou ausência de monócitos (MON) e macrófagos (MAC) oriundos de idosos após 1h 30min e 4h 30min de desafio, nas diferentes proporções CEL:F (5:1, 1:1 e 1:5), expressa em Unidade Arbitrária de Fluorescência ($_{UAF}$). Símbolos iguais diferem estatisticamente ($p<0,05$).....	86
Gráfico 11 - Média do percentual do crescimento fúngico na presença ou ausência de monócitos (MON) e macrófagos (MAC) oriundos de jovens após 1h 30min e 4h 30min de desafio nas diferentes proporções CEL:F (5:1, 1:1 e 1:5), expressa em Unidade Arbitrária de Fluorescência ($_{UAF}$). Símbolos iguais diferem estatisticamente ($p<0,05$).....	87

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Representação dos resultados de internalização, de produção intracelular de óxido nítrico e de peróxido de hidrogênio e de controle do crescimento fúngico extracelular, obtidos por **monócitos** de idosos (vermelho) ou de jovens (azul), após desafio com *C. albicans*, sob diferentes proporções de monócitos por fungo (MON:F) e por diferentes períodos (30min, 2h e 5h). O controle do crescimento fúngico foi avaliado por 1h 30min e por 4h 30min. O símbolo - indica que não houve presença do fenômeno, um símbolo + caracteriza a presença do fenômeno, enquanto dois símbolos ++ representam presença do fenômeno e maior quando comparado com + ($p < 0,05$)..... 88
- Tabela 2** - Representação dos resultados de internalização, de produção intracelular de óxido nítrico e de peróxido de hidrogênio e de controle do crescimento fúngico extracelular, obtidos por **macrófagos** de idosos (vermelho) ou de jovens (azul), após desafio com *C. albicans*, sob diferentes proporções de macrófagos por fungo (MAC:F) e por diferentes períodos (30min, 2h e 5h). O controle do crescimento fúngico foi avaliado por 1h e 30min e por 4h e 30min. O símbolo - indica que não houve presença do fenômeno, um símbolo + caracteriza a presença do fenômeno, enquanto dois símbolos ++ representam presença do fenômeno e maior quando comparado com + ($p < 0,05$)..... 89

LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
ϕ	Phi
*	Asterisco
+	Mais
<	Menor
=	Igual
°C	Graus Celsius
%	Porcento
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida (<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>)
APC	Aloficocianina (allophycocyanin)
AT	Azul de Tripan
ATCC	<i>American type culture collection</i>
BSA	Albumina sérica bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
CD	Agrupamento de diferenciação (<i>Cluster of Differentiation</i>)
CEL	Célula
CFW	<i>Calcofluor White</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
DAF-FM	4-amino-5-metilamino- 2', 7'-difluoresceína
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole
F	Fungo <i>C. albicans</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>)
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (<i>Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating Factor</i>)

HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HOCl	Ácido hipocloroso
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN	Interferon
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LPS	Lipopolissacarídeo
MAC	Macrófago
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1 (<i>Monocyte Chemotactic Protein-1</i>)
M-CSF	Fator estimulador de colônia de monócitos e macrófagos (<i>Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>)
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MINCLE	Lectina do tipo C macrófago induzível (<i>Macrophage-inducible C-type lectin</i>)
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MON	Monócito
MPO	Mieloperoxidase
MR	Receptores de manose (<i>Mannose Receptor</i>)
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OD	Densidade óptica (<i>Optical Density</i>)
•OH	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
p	Valor p estatístico
PAMP	Padrão molecular associado ao patógeno
PBS	Solução salina tamponada em fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
pH	Potencial hidrogeniônico
PHOX	Fagócito oxidase (<i>Phagocyte Oxidase</i>)

PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões (<i>Pattern Recognition Receptors</i>)
RNS	Espécies reativas do nitrogênio (<i>Reactive Nitrogen Species</i>)
ROS	Espécies reativas do oxigênio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
rpm	Rotação por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SD	Desvio padrão (<i>Standard Deviation</i>)
SOD	Superóxido dismutase
TGF- β	Fator transformador de crescimento-beta (<i>Transforming Growth Factor Beta</i>)
TLR	Receptor do tipo Toll (<i>Toll-like Receptor</i>)
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α (<i>Tumor Necrosis Factor-alfa</i>)
TPA	12-O- <i>tetradecanoylphorbol-13-acetate</i>
UAF	Unidades arbitrárias de fluorescência (<i>Arbitrary Units of Fluorescence</i>)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	29
2.	REVISÃO DE LITERATURA	33
2.1.	MONÓCITOS E MACRÓFAGOS: FAGOCITOSE E MECANISMOS MICROBICIDAS	35
2.2.	<i>Candida albicans</i> E MONÓCITOS E MACRÓFAGOS	37
2.3.	IMUNOSSENESCÊNCIA, MONÓCITOS/MACRÓFAGOS E <i>Candida albicans</i>	40
3.	PROPOSIÇÃO	45
4.	MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1.	CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO	51
4.2.	OBTENÇÃO E CULTURA DOS MONÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO E DIFERENCIAÇÃO PARA MACRÓFAGOS	51
4.3.	CARACTERIZAÇÃO DOS MONÓCITOS E MACRÓFAGOS POR IMUNOFLUORESCÊNCIA	52
4.4.	VIABILIDADE DA CULTURA DE MONÓCITOS E MACRÓFAGOS	53
4.5.	PREPARO DA SUSPENSÃO DE <i>Candida albicans</i> ATCC® 90028™ - CRESCIMENTO, LAVAGEM E CONTAGEM	54
4.6.	DESAFIO DE MONÓCITOS E MACRÓFAGOS COM <i>C. albicans</i>	54
4.7.	ENSAIO DE FAGOCITOSE DE <i>C. albicans</i> POR MONÓCITOS E MACRÓFAGOS	55
4.8.	CONTROLE DO CRESCIMENTO EXTRACELULAR DE <i>C. albicans</i> POR MONÓCITOS E MACRÓFAGOS	56
4.9.	PRODUÇÃO INTRACELULAR DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) POR MONÓCITOS E MACRÓFAGOS DESAFIADOS OU NÃO COM <i>C. albicans</i>	58
4.10.	PRODUÇÃO INTRACELULAR DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H ₂ O ₂) POR MONÓCITOS E MACRÓFAGOS DESAFIADOS OU NÃO COM <i>C. albicans</i>	58
4.11.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	59
5.	RESULTADOS	61
5.1.	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E VIABILIDADE DOS	

	MONÓCITOS E MACRÓFAGOS OBTIDOS DE SANGUE HUMANO	63
5.2.	FAGOCITOSE DE <i>C. albicans</i> , <i>IN VITRO</i> , POR MONÓCITOS E MACRÓFAGOS DE IDOSOS E JOVENS	64
5.2.1.	Nos Períodos Iniciais e Sob Maior Carga Fúngica, os Monócitos e Macrófagos dos Idosos Apresentaram Mais Fungos Internalizados Que os Jovens. No Período Mais Tardio e Sob Maior Carga Fúngica, os Macrófagos dos Jovens Apresentaram Mais Fungos Internalizados Que os Idosos	64
5.2.2.	Independente da Idade, Macrófagos Apresentaram Mais <i>C. albicans</i> Internalizadas que os Monócitos, no Período Inicial do Desafio, Principalmente Sob 1:5. Porém, no Período de 5h, Apenas os Macrófagos dos Jovens Mantiveram Esta Maior Internalização Que os Idosos	66
5.3.	PRODUÇÃO INTRACELULAR DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) POR MONÓCITOS E MACRÓFAGOS DE IDOSOS E JOVENS, APÓS DESAFIO COM <i>C. albicans</i>	69
5.3.1.	No Período Mais Tardio e Sob Maior Carga Fúngica Ambos os Tipos Celulares dos Idosos Produziram mais NO em Relação aos Jovens. Independente da Idade, Monócitos e Macrófagos Responderam ao Estímulo Fúngico, Quanto à Produção de NO, Apresentando Valores Mais Altos Que os Níveis Basais	69
5.3.2.	Macrófagos de Jovens Produziram mais NO que os Monócitos, Após 2h e 5h de Desafio com <i>C. albicans</i>. Monócitos e Macrófagos de Idosos e, Principalmente, de Jovens Aumentaram sua Produção de NO Intracelular, ao Longo do Tempo de Desafio Fúngico	74
5.4.	PRODUÇÃO INTRACELULAR DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H_2O_2) POR MONÓCITOS E MACRÓFAGOS DE IDOSOS E JOVENS, APÓS DESAFIO COM <i>C. albicans</i>	77
5.4.1.	Monócitos e Macrófagos de Jovens Responderam Mais Precocemente ao Estímulo Fúngico, Quanto à Produção de H_2O_2, Que os Idosos, Apresentando Valores Mais Altos Que os Níveis Basais, Logo aos 30min de Desafio. No Período Mais Tardio e Sob Maior Carga Fúngica, Apenas os Macrófagos dos Idosos Produziram Mais H_2O_2 em	

	Relação aos Jovens	77
5.4.2.	Macrófagos de Idosos Produziram Mais H₂O₂ Que os Monócitos Principalmente Após 5h de Desafio com <i>C. albicans</i>. Monócitos e Macrófagos de Idosos Aumentaram sua Produção de H₂O₂ Intracelular, ao Longo do Tempo de Desafio Fúngico	82
5.5.	CONTROLE DO CRESCIMENTO FÚNGICO EXTRACELULAR, <i>IN VITRO</i>, POR MONÓCITOS E MACRÓFAGOS DE IDOSOS E JOVENS	85
5.5.1.	Macrófagos de Idosos Foram Mais Eficazes no Controle da Proliferação de <i>C. albicans</i> Que os Jovens	85
5.6.	SÍNTESE DOS RESULTADOS	88
6.	DISCUSSÃO	91
7.	CONCLUSÕES	101
	REFERÊNCIAS	105
	APÊNDICES	117

1 Introdução

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a população mundial está passando por um processo de transição demográfica, relacionado com o declínio das taxas de mortalidade e fecundidade. Essa mudança também faz parte da realidade brasileira e tem proporcionado uma rápida variação na estrutura etária do país, ocasionando uma redução da proporção de crianças e jovens, aumento da população adulta e um crescimento substantivo de idosos, sendo esta uma característica de países desenvolvidos (IBGE, 2011). A população idosa é definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como aquela com idade igual ou superior a 60 anos, para os países em desenvolvimento, como por exemplo o Brasil (BRASIL, DECRETO-LEI, 2003), e 65 anos ou mais, para os países desenvolvidos.

No Brasil, houve um aumento populacional dos idosos ao longo dos anos, sendo que a população com 65 anos ou mais representava, em 1960, 2,7% da população total, chegando a 7,4% em 2010, conforme verificado no último Censo Demográfico de 2010, realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (IBGE, 2011).

Ainda segundo o IBGE, em 2010, a expectativa de vida no Brasil aumentou 25,4 anos quando comparada com os dados da primeira pesquisa realizada em 1960, onde a perspectiva era de que o cidadão vivesse cerca de 48 anos, perfazendo um total de 73,4 anos. Segundo o Instituto, o país continuará a elevar a expectativa de vida da população, podendo atingir em 2050, o patamar de 81,29 anos (IBGE, 2011). Sendo assim, o estudo da saúde e da melhoria da qualidade de vida torna-se fundamental na ciência moderna, incluindo um maior esclarecimento dos aspectos patofisiológicos relacionados com as doenças microbianas, que acometem frequentemente os idosos.

Candida albicans (*C. albicans*) é um microrganismo comensal do trato alimentar e das membranas mucosas de indivíduos saudáveis. Quando as defesas imunológicas são comprometidas ou quando seu equilíbrio é interrompido, as espécies de *Candida* se transformam em um patógeno oportunista (DIMOPOULOS et al., 2007). A candidose sistêmica está associada a altas taxas de morbidade e mortalidade, e o diagnóstico precoce é difícil. Além disso, as terapias antifúngicas atuais são limitadas pela toxicidade e resistência (CALDERONE; FONZI, 2001).

Infecções oportunistas invasivas, como aquelas causadas pelo fungo *C. albicans*, têm se tornado um problema crescente entre os idosos (MURCIANO et. al., 2006) porque eles são mais propensos a receber tratamento quimioterápico para o câncer, fazer uso de drogas imunossupressoras para doenças não malignas ou serem submetidos a algum tipo de

transplante (KAUFFMAN, 2001; GOZALBO et al., 2004). Além disso, o processo de envelhecimento, provavelmente, aumenta o risco e a gravidade de candidose sistêmica em indivíduos com idade avançada (NUCCI et al., 1998).

Considerando a relação entre a idade e a susceptibilidade à candidose, bem como a importância dos monócitos e macrófagos na defesa contra *C. albicans* e as alterações funcionais destas células na senescência, o presente trabalho pretende avaliar aspectos da atividade funcional de monócitos e macrófagos obtidos do sangue periférico de indivíduos idosos e jovens, após desafio com o referido fungo.

2 Revisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. MONÓCITOS E MACRÓFAGOS: FAGOCITOSE E MECANISMOS MICROBICIDAS

As células fagocitárias mononucleares se originam de células progenitoras hematopoiéticas na medula óssea em resposta a fatores de transcrição intrínsecos, que ditam a proliferação e a diferenciação, e de fatores de crescimento presentes no meio extrínseco que promovem a diferenciação, como o fator estimulador de colônia de monócitos/macrófagos (M-CSF), o fator estimulador de colônia de macrófagos/granulócitos (GM-CSF), e a interleucina-3 (IL-3) (METCALF; NICOLA, 1992; METCALF, 2008; MOSSADEGH-KELLER, N. et al., 2013). Essas células entram no sangue periférico, por onde circulam, entre outras, os monócitos. Estes migram da corrente sanguínea para os diferentes tecidos do organismo, onde se estabelecem e amadurecem, originando diferentes subpopulações de macrófagos (VARIN; GORDON, 2009; GEISSMANN et al., 2010). Eles apresentam-se diferenciados morfológica e fenotipicamente em órgãos como, fígado, baço, pulmão, intestino e cérebro, interagindo com a matriz e outros tipos celulares (GORDON; MARTINEZ, 2010).

Macrófagos residentes estão presentes constitutivamente nos órgãos, na ausência de inflamação evidente, e desempenham funções metabólicas bem como homeostáticas na remoção de células apoptóticas, servindo como sentinelas no caso de lesão e infecção (BISWAS; MANTOVANI, 2010; GORDON; MARTINEZ, 2010). Macrófagos teciduais podem se replicar localmente, mas são terminalmente diferenciados, reproduzindo-se em taxas controladas, dependendo do meio ambiente e estímulos do tecido (GORDON; MARTINEZ, 2010). Monócitos e macrófagos migram através de vários compartimentos corporais, incluindo medula óssea, sangue, tecido linfóide e todos os tecidos não hematopoiéticos (VARIN; GORDON, 2009; GORDON; MARTINEZ, 2010).

Monócitos e macrófagos são componentes essenciais da imunidade inata e desempenham papel central na inflamação e defesa do hospedeiro (GORDON; MARTINEZ, 2010) como fagócitos profissionais, por internalizarem e degradarem patógenos (CASTRO et al., 1996; ADEREM; UNDERHILL, 1999).

O processo fagocítico é usualmente definido como a absorção de partículas grandes ($>0,5\mu\text{m}$ de diâmetro) em vacúolos de células, em que a actina apresenta papel vital (RABINOVITCH, 1995; NIEDERGANG; CHAVRIER, 2004). A fagocitose pode ocorrer por

meio de reconhecimento molecular entre receptores existentes na superfície celular do fagócito e do patógeno (DIAKONOVA; BOKOCH; SWANSON, 2002), ou também através do complexo antígeno-anticorpo, em que o fagócito se liga no anticorpo ligado ao antígeno, resultando na ativação dos monócitos/macrófagos e fagocitose da partícula antigênica, processo conhecido como opsonização (ADEREM; UNDERHILL, 1999; SANO et al., 2003). A fagocitose iniciada por anticorpos específicos ilustra a cooperação entre a imunidade inata e a adaptativa.

Após a adesão entre o microrganismo e o fagócito, esse emite pseudópodos que envolvem o agente infeccioso, que é internalizado em uma vesícula ligada à membrana, chamada de fagossomo. O fagossomo se funde com os lisossomos ou com grânulos citoplasmáticos dos fagócitos, transformando-se em fagolisossomos (AGGELER; WERB, 1982; SCOTT; BOTELHO; GRINSTEIN, 2003). É neste local que os microrganismos são destruídos através da liberação de várias enzimas e substâncias tóxicas (ADEREM; UNDERHILL, 1999; LAMBETH, 2004; GORDON; MARTINEZ, 2010).

Quando os monócitos/macrófagos são ativados, posteriormente à aderência do patógeno ao fagócito, uma de suas principais funções microbidas é a explosão respiratória: as fortes induções das vias metabólicas oxidativas levam ao aumento da produção de oxigênio reativo e de intermediários do nitrogênio, que matam ou inibem o crescimento de microrganismos. A explosão respiratória pode ser aumentada por citocinas inflamatórias como interferon- γ (IFN- γ), IL-17, IL-16 e tumor de necrose tumoral-alfa (TNF- α) (BALTCH et al., 2001; BOGDAN, 2001; MILJKOVIC; ROMANI, 2004; TRAJKOVIC, 2004).

Monócitos, macrófagos e neutrófilos humanos e murinos utilizam três sistemas oxidativos de enzimas, para combater os patógenos: 1) fagócito oxidase (PHOX), que diretamente produz o ânion superóxido (O_2^-); 2) mieloperoxidase (MPO), que utiliza o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para produzir o ácido hipocloroso (HOCl) e o radical hidroxila ($\cdot OH$) e 3) óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que catalisa a oxidação da L-arginina produzindo o radical livre óxido nítrico (NO). Nenhum dos produtos finais da explosão respiratória - O_2^- , HOCl, $\cdot OH$ e NO - são imediatamente candidadas *in vitro*; ao invés disso, acredita-se que eles são precursores da reatividade cruzada para a formação de verdadeiros radicais candidadas, com a maioria das evidências apontando para o peroxinitrito (ONOO $^-$) como o principal produto da explosão respiratória (VAZQUEZ-TORRES; JONES-CARSON; BALISH, 1996; VASQUÉZ-TORRES; BALISH, 1997; BALTCH et al., 2001; KOBAYASHI, 2010). O NO facilita a reação cruzada com ambos os sistemas, PHOX e MPO, sendo considerado o componente limitante para matar microrganismos *in vitro* (VAZQUEZ-

TORRES; JONES-CARSON; BALISH, 1996). Como a destruição microbiana ocorre no interior dos fagolisossomos, os mecanismos de eliminação do patógeno, que poderiam potencialmente lesar o fagócito, são isolados do restante da célula.

Contudo, a ação microbicida do NO é regulada por diversas citocinas inflamatórias, entre elas IL-6, IL-12, IL-18 e IFN- γ , bem como pela interação da parede celular do patógeno com o fagócito e pela interação célula-célula (BOGDAN, 2001).

2.2. *Candida albicans* E MONÓCITOS/MACRÓFAGOS

Nas últimas décadas, a incidência de infecções fúngicas por *C. albicans* e outras espécies de fungos oportunistas humanos aumentaram drasticamente devido ao elevado número de pacientes imunocomprometidos (PFALLER; DIEKEMA, 2007; BERZAGHI et al., 2009). Várias espécies de *Candida*, como *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e, especialmente, *C. albicans*, habitam normalmente a pele e as membranas mucosas de hospedeiros saudáveis. Dependendo do grau de debilidade do sistema imunológico, essas espécies podem causar infecções superficiais e até sistêmicas no hospedeiro. Os fatores predisponentes para a candidose incluem terapias imunossupressoras e citotóxicas, tratamento com antibióticos de largo espectro, AIDS, diabetes, abuso de drogas, cateteres e dispositivos de longa permanência (GOZALBO et al., 2004). Portanto, o desenvolvimento da candidose depende de um equilíbrio entre fungos e o estado imunitário do hospedeiro, determinando assim a relação comensal ou parasitária do microrganismo.

As interações entre *C. albicans* e o tecido do hospedeiro são altamente complexas. Primeiramente, é necessária a adesão do fungo a uma superfície epitelial para iniciar a colonização (CALDERONE; FONZI, 2001; SUNDSTROM, 2002; YANG, 2003). A penetração das superfícies epiteliais pelas hifas e leveduras é o limite do processo infeccioso, sendo que na maioria dos casos é o que conduz ao estabelecimento de uma candidose superficial; normalmente os fungos são incapazes de invasão em um hospedeiro imunologicamente intacto. Para causar a infecção invasiva, *C. albicans* deve ser capaz de penetrar as superfícies epiteliais, invadir os tecidos, disseminar pelos vasos sanguíneos do hospedeiro, no caso de candidose sistêmica, driblando as células do sistema de defesa, e finalmente se instalar e colonizar o endotélio (ROMANI; BISTONI; PUC CETTI, 2003). Para isso, os fungos possuem várias características de virulência tais como, a liberação de enzimas hidrolíticas como proteinases (MONOD; VON-BORG, 2002) e fosfolipases (GHANNOUM, 2000), enzimas essas que permitem a invasão dos tecidos (NAGLIK; CHALLACOMBE;

HUBE, 2003), e o pleomorfismo, evento responsável pela transição de levedura para pseudohifa e/ou hifa verdadeira, que por si só é considerado uma importante fase da virulência (BROWN; GOW, 1999; ERNST, 2000). Ainda, os fungos apresentam a capacidade de sofrer mudanças fenotípicas que envolvem a geração espontânea e reversível de diferentes estados morfológicos e fisiológicos, bem como permitem a adaptação seletiva às mudanças ambientais e a evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro (SOLL, 1992, 1997).

A parede celular de *C. albicans* é uma estrutura dinâmica e complexa baseada em uma estrutura oval, onde sua parte interna apresenta moléculas de β -1,3-glucano covalentemente ligadas a β -1,6-glucano e quitina, e uma camada externa, a matriz, composta principalmente de proteínas de manose glicosiladas. A superfície da parede celular fúngica representa a interface entre o hospedeiro e o patógeno infectante (POULAIN; JOUAULT, 2004).

A defesa imunológica do hospedeiro contra as infecções causadas por *C. albicans* baseia-se principalmente na ingestão e eliminação de células fúngicas por células do sistema imune inato, principalmente, neutrófilos e monócitos/macrófagos (KULLBERG et al., 1999; GORDON; MARTINEZ, 2010). A importância desses fagócitos na defesa contra tal microrganismo é demonstrada em estudos que apontam que uma inativação funcional dessas células leva a um aumento significativo no crescimento dos fungos (FARAH et al., 2001).

Monócitos e macrófagos apresentam atividade direta contra *C. albicans* através da liberação de substâncias microbicidas como, espécies reativas do nitrogênio (reactive nitrogen species - RNS) e espécies reativas do oxigênio (reactive oxygen species - ROS) (VASQUÉZ-TORRES; BALISH, 1997; ROMANI, 2004), além de promoverem a apresentação antigênica e a produção de citocinas e quimiocinas (VECCHIARELLI et al., 1994; BALCH et al., 2001). Essas células reconhecem os microrganismos por meio de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), que se ligam aos Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs), provocando uma resposta patógeno-específica. Esse passo inicial é considerado um pré-requisito para instruir a resposta imune adaptativa (NETEA et al., 2002; MEDZHITOV; JANEWAY, 2002). Os PRRs, presentes nos fagócitos e que distinguem os componentes da parede celular de *C. albicans*, incluem o reconhecimento de mananas e manoproteínas por receptores de manose (MR) e Toll-like 4 (TLR4) (NETEA et al., 2002; NETEA et al., 2004; NETEA et al., 2006), de fosfolipomanana por TLR2 (JOUAULT et al., 2003), de β -manosídeos por galectina-3 (JOUAULT et al., 2006) e de β -glucans por um complexo de TLR2/Dectina-1 (BROWN et al., 2003; GANTNER et al., 2003). Outros PRRs adicionais mostram que também contribuem para o reconhecimento de *C. albicans*, incluindo

o receptor scavenger CD36 e SCARF1 (MEANS et al., 2009), o TLR9 no reconhecimento de ácidos nucleicos (MIYAZATO et al., 2009; KASPERKOVITZ et al., 2011), a lectina do tipo C macrófago induzível - MINCLE (WELLS et al., 2008) e o TLR6 (NETEA et al., 2008). Através desses sistemas de reconhecimento, ocorre o início da fagocitose e a ativação de caminhos celulares pró-inflamatórios nas células do sistema imune inato (FERNANDÉZ-ARENA et al., 2008). A importância do reconhecimento por esses receptores na defesa antifúngica do hospedeiro foi demonstrada em diferentes estudos *in vitro*, juntamente com as mutações sofridas por eles. O funcionamento não correto da ligação entre a célula do hospedeiro e a do fungo leva ao aparecimento de infecções em indivíduos imunocomprometidos (FERWERDA et al., 2009; GLOCKER et al., 2009; GASPAROTO et al., 2010).

Após a ingestão de *C. albicans*, opsonizadas ou não (FILLER, 2006), por monócitos e/ou macrófagos, ocorre a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, GM-CSF e INF- γ , caracterizando o primeiro passo para a ativação da resposta imune inata (CASTRO et al., 1996; ROMANI, 2004). O papel crucial dessas citocinas para a defesa do hospedeiro contra *C. albicans* foi demonstrado pelo aumento da susceptibilidade a candidose de camundongos TNF- α , IL-1 β , IL-6 e INF- γ -*knockout* (NETEA et al., 1999; KAPOSZTA et al., 1998). As citocinas pró-inflamatórias, portanto, ativam os fagócitos que internalizam o fungo e causam a liberação de ROS e RNS (DJEU, 1990; KULLBERG et al., 1993), que parecem representar um papel crítico no controle e eliminação da candidose mucosa e sistêmica. Segundo Balish et al. (2005), defeitos na produção de ROS e RNS por fagócitos permitem que *C. albicans* sobreviva e se dissemine para outros locais do organismo, resultando em uma resposta imunológica descontrolada, o que ocasiona uma patologia severa podendo resultar em morte; porém, eles verificaram que a falta dessas substâncias microbicidas era compensada por outros mecanismos como, produção de anticorpos, citocinas e sistema complemento, considerados suficientes para inibir *C. albicans* fagocitadas *in vitro*.

Estudos com camundongos iNOS-*knockout* revelaram que estes não eram mais susceptíveis a candidose oral quando comparados aos camundongos do tipo selvagem (controles); os autores sugeriram que o NO derivado da iNOS não é necessário para a resistência da candidose oral *in vivo*, o que contradiz a literatura. Os macrófagos derivados da medula óssea podem ter meios independentes da iNOS para gerar espécies reativas do nitrogênio (FARAH et al., 2009).

Entretanto, monócitos e macrófagos nem sempre têm a sua capacidade fagocítica associada à sua capacidade de destruir *C. albicans* viáveis (CHINEN et al., 1999; SHILOH et al., 1999; FERNANDÉZ-ARENA et al., 2008). A fagocitose de *C. albicans*, quando não acompanhada da morte do fungo, pode favorecer a disseminação deste patógeno, pois os macrófagos não ativados, além de servir como veículos para a sua disseminação, protegem o fungo de outros mecanismos da resposta imune inata (VASQUÉZ-TORRES; BALISH, 1997). Segundo Frohner et al. (2012), para se evadir da vigilância da resposta imune inata, as leveduras e hifas de *C. albicans*, quando necessário, induzem a superóxido dismutase (SOD), presente na superfície de sua parede celular, a degradar espécies reativas derivadas de oxigênio produzidas pela células do hospedeiro. Outro mecanismo de escape do fungo perante o fagócito é a capacidade da proteína flavo-hemoglobina Yhb1p, presente em *C. albicans*, converter o NO ao inofensivo nitrato (CHIRANAND et al., 2008). Ainda, citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 e o fator de crescimento transformador-beta (TGF- β), produzidas pelos macrófagos ativados, podem resultar na supressão da produção de NO por estas células (CHINEN et al., 1999).

Modelos experimentais de candidose em mucosa oral, vaginal e gastrointestinal foram inestimáveis na avaliação da patogenicidade do fungo e das defesas do hospedeiro. Esses estudos nos informaram que *C. albicans*, *in vivo*, é a espécie mais virulenta de *Candida* e que a resposta imune frente a ela é diferente nas diversas mucosas: oral, vaginal e gastrointestinal (NAGLIK; FIDEL; ODDS, 2008).

2.3. IMUNOSSENESCÊNCIA, MONÓCITOS/MACRÓFAGOS E *Candida albicans*

Imunossenescência refere-se a função diminuída do sistema imunológico com o avanço da idade, o que resulta em um aumento da susceptibilidade dos idosos a infecções (PLOWDEN, 2004) e a cânceres (HAKIM et al., 2004). Essas alterações afetam, em geral, todas as células do sistema imunológico abrangendo tanto a imunidade inata (GOMEZ; BOEHMER; KOVACS, 2005) como a adaptativa (ALLMAN; MILLER, 2005), contribuindo assim para o aumento da morbidade e mortalidade dos indivíduos idosos.

Evidências recentes sugerem que o envelhecimento exerce uma influência significativa sobre a imunidade inata, embora essas alterações não sejam, necessariamente, iguais a imunodeficiência, mas sim com uma desregulação da resposta imunológica. Isso ocorre porque os processos subjacentes são dinâmicos, o que envolve perda e ganho de atividade da resposta imune (FRANCESCHI et al., 2000; GOMEZ et al., 2008).

Quanto aos monócitos e macrófagos, sugere-se a existência de uma relação direta entre a idade e sua ativação, o que parece ser responsável pela presença de um processo inflamatório crônico subclínico nos idosos. Este aumento no estado pró-inflamatório do indivíduo causado pela estimulação crônica relacionada com a idade das células é referido como “*inflamm-aging*” (FRANCESCHI et al., 2000; PINKE et al., 2013). Assim, a maior capacidade dos monócitos e macrófagos para produzir mediadores pró-inflamatórios, tais como IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α e MCP-1, ocorre em idosos saudáveis e pessoas que apresentam envelhecimento patológico. Essa superprodução pode levar a uma incapacidade para controlar infecções em idade avançada. No entanto, esse fenômeno é apenas uma parte de todo o espectro de mudanças que ocorrem na imunossenescência.

Os monócitos e macrófagos de indivíduos senescentes também sofrem alterações em relação à quimiotaxia, à capacidade de fagocitose e de produzir substâncias microbidas como ROS e RNS. No entanto, resultados discrepantes foram frequentemente relatados, o que pode ser devido a diferenças nas condições experimentais e/ou no estado de saúde dos indivíduos (GOMEZ et al., 2008). Resultados variáveis foram obtidos em relação ao impacto do envelhecimento sobre a fagocitose quando camundongos idosos foram comparados a jovens. Esta função mostrou estar regulada negativamente (HOLT; GRAINGER, 2012), positivamente (HILMER; COGGER; LE COUTEUR, 2007) ou até mesmo inalterada (MURCIANO et. al., 2008; LIANG et. al., 2009) com o avanço da idade. Estudos demonstraram que a senescência não exerce efeito significativo sobre a expressão de importantes receptores de monócitos e/ou macrófagos, tais como CD14, CD11b, CD18, CD36, receptor de manose (CD206), dectina-1 e receptor scavenger, o que leva a crer que a fagocitose está bem preservada (LIANG et al., 2009). Outros estudos afirmam que os macrófagos derivados de animais idosos apresentam falhas durante este processo, demonstrando uma diminuição da expressão de receptores TLRs (RENSHAW et al., 2002; MURCIANO et. al., 2008) e de MHC de classe II (STOUT; SUTTLES, 2005). Holt e Grainger, (2012) demonstraram que esses fagócitos derivados de animais senescentes também fracassaram ao fagocitar esferas de poliestireno.

Estudos sobre a produção de RNS e de ROS em idosos oferecem resultados conflitantes. A iNOS, enzima responsável pela produção de NO induzível, está diminuída em camundongos idosos, quando estimulados por uma variedade de agentes (KISSIN et. al., 1997; LU et al., 1999), assim como a produção de nitrito (NO₂⁻) e de outros intermediários. Inversamente, o aumento da produção de iNOS e de nitrito por macrófagos murinos peritoneais de idosos, em comparação com jovens, também foi relatado, após estímulo com

LPS (CHEN et al., 1996; BEHARKA et al., 2002). Estudo realizado com macrófagos alveolares de ratos jovens, adultos e idosos apresenta uma acentuada diferença na produção de ROS e NO. Macrófagos alveolares não estimulados de adultos e idosos apresentam uma produção mais baixa de ROS quando comparados aos dos jovens. Já quando estimulados com *12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate* (TPA), forte substância ativadora de macrófagos, a produção de ROS fica similar em todos os grupos estudados. Quanto ao NO, tanto os macrófagos de ratos jovens como os dos adultos apresentaram um aumento na produção, quando estimulados com LPS. Inversamente, a produção de NO foi diminuída quando os macrófagos alveolares de idosos foram estimulados com LPS. Recentemente, observou-se que essas células estimuladas com LPS precisam de TNF- α para produzir NO. Consequentemente, o TNF- α requerido para a produção do NO pode estar reduzido em macrófagos alveolares de ratos idosos (TASAT et al., 2003).

Em relação a *C. albicans*, de acordo com Murciano et al., 2006, o envelhecimento aumenta significativamente a susceptibilidade geral de camundongos à infecção sistêmica por este fungo. A candidose sistêmica promove uma redução na produção de TNF- α , IL-6 e IL-1 β *in vitro* por macrófagos peritoneais residentes de camundongos idosos, em comparação com jovens, em resposta a leveduras e hifas de *C. albicans*, como também em resposta ao zimozan (carboidrato insolúvel obtido a partir da parede celular de leveduras). Essa secreção defeituosa de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos peritoneais de camundongos idosos está correlacionada com uma menor expressão dos receptores TLRs (RENSHAW et al., 2002), especificamente o TLR2 (MURCIANO et. al., 2006). Contrariamente, estudo realizado com monócitos, linfócitos e granulócitos de idosos humanos, desafiados com *C. albicans*, mostrou que a expressão dos receptores TLR2, TLR4 e TLR6, a produção de citocinas (IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α e IL-12) e de prostaglandina E2 (PGE2) e a atividade fungicida não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados aos jovens. Isso sugere que o aumento da susceptibilidade a infecções de *C. albicans* em idosos não é uma consequência de defeitos na expressão/sinalização de TLRs ou da atividade fungicida das células sanguíneas, mas de mecanismos ainda não identificados (MURCIANO et. al., 2007).

Estudos em que camundongos idosos foram infectados sistemicamente com *C. albicans* mostraram que o número de macrófagos residentes da cavidade peritoneal, assim como a concentração de leucócitos sanguíneos, aumentou com o decorrer da infecção. No entanto, estas células apresentaram menor capacidade fagocítica, deficiência na produção de substâncias microbicidas e capacidade quimiotática diminuída quando comparadas ao controle (animais jovens) (ASHMAN, 1999; MURCIANO et. al., 2008).

Considerando que o envelhecimento afeta as propriedades imunológicas de monócitos e macrófagos e que são poucos os estudos que abrangem a infecção oportunista causada pelo fungo *C. albicans* em idosos, nosso trabalho pretende contribuir para o melhor entendimento dessa patologia na população idosa, analisando a capacidade microbicida, por meio da internalização e controle do crescimento fúngico na presença destas células, e a produção das substâncias microbicidas, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio.

3 Proposição

3. PROPOSIÇÃO

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar mecanismos de defesa de monócitos e macrófagos humanos frente ao desafio *in vitro* com *Candida albicans*, comparando indivíduos idosos e jovens.

Especificamente:

✓ Avaliar a capacidade fagocítica de monócitos e macrófagos derivados de idosos e jovens após estímulo com *Candida albicans*.

✓ Avaliar a produção intracelular de óxido nítrico e de peróxido de hidrogênio por monócitos e macrófagos de idosos e jovens desafiados com *Candida albicans*.

✓ Avaliar a habilidade de monócitos e macrófagos oriundos de idosos e de jovens em controlar a proliferação fúngica extracelular.

4 Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO

Para este trabalho, foram utilizadas amostras de sangue de 30 indivíduos saudáveis, sendo 15 jovens, com idade abaixo de 50 anos e 15 idosos, com idade acima de 60 anos, de acordo com a definição da Organização Mundial da Saúde (OMS). Todos os indivíduos foram informados detalhadamente sobre a pesquisa e seus objetivos, enfatizando que seria necessário realizar a coleta de amostra sanguínea. Os indivíduos que aceitaram participar da pesquisa responderam a uma anamnese direcionada (APÊNDICE A), na qual foram registrados os dados sobre sua história médica. A coleta de sangue somente foi realizada após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB) da Universidade de São Paulo (USP) (processo nº CAAE -18418113.5.0000.5417) e da concordância do voluntário, documentada com a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme prevê a resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (APÊNDICE B).

Durante a seleção dos indivíduos, foram excluídos aqueles com história médica que evidenciassem modificadores do sistema imune, tais como: doença infecciosa sistêmica, de qualquer natureza, aguda ou crônica; doenças hematológicas de qualquer natureza; neoplasias malignas; fumantes; doenças autoimunes; alterações endócrinas (diabetes, gravidez, hipotireoidismo, hipertireoidismo); bem como indivíduos sob tratamento quimioterápico ou radioterápico, com antibióticos, antifúngicos, antipsicóticos, metais pesados, anticonvulsivantes ou cardiotônicos (GASPAROTO, 2009; FARIA, 2011).

4.2. OBTENÇÃO E CULTURA DOS MONÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO E DIFERENCIAÇÃO PARA MACRÓFAGOS

Foram coletados 30 mL de sangue venoso, a partir das veias braquiais dos indivíduos, com auxílio de tubos a vácuo (BD Vacutainer®) contendo heparina sódica como anticoagulante. A coleta foi realizada no Centro Integrado de Pesquisa (CIP) da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, pela funcionária e farmacêutica, especialista em Análises Clínicas, Rafaela Alves da Silva Alavarce.

As amostras de sangue foram diluídas em PBS (solução salina tamponada em fosfato – Phosphate Buffered Solution; pH 7,2) estéril e adicionadas a 4 mL do gradiente

Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich®). Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 28 minutos, a 1500 rpm, em temperatura ambiente (25°C), com zero de aceleração e desaceleração. Após a centrifugação, a interface contendo as células mononucleares foi coletada, colocada em tubo cônico e lavada uma vez em PBS. Na sequência, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em meio RPMI 1640 contendo L-glutamina (300mg/L) (Gibco®, Invitrogen™, Grand Island, New York, USA). Após a centrifugação por 10 minutos, a 1500 rpm, em temperatura ambiente, o precipitado foi ressuspenso em 1 mL de meio RPMI 1640 completo (suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor mais 1% de penicilina e estreptomicina). Os monócitos obtidos foram corados com Vermelho Neutro a 0,02% (Carlo Erba Reagents), na diluição 1:10, e contados em Câmara de Neubauer, ajustando-se a concentração para 5×10^5 monócitos por mL de meio de cultura. Em seguida, foram pipetados 200 µL dessa suspensão de células nos poços de 12 placas de culturas de 96 poços, sendo seis placas destinadas para os ensaios com monócitos e seis para macrófagos.

As placas foram incubadas a 37°C em estufa de 5% de CO₂. Após duas horas de incubação, o meio e as células não aderentes, incluindo os linfócitos, foram desprezados e os poços foram lavados duas vezes com RPMI 1640 simples. Em seguida, foram acrescentados 200 µL de RPMI 1640 completo aos monócitos aderentes nas placas de 96 poços, obtendo-se assim os monócitos aptos para o desafio microbiológico.

Para que houvesse a diferenciação em macrófagos, os monócitos permaneceram em cultura, incubados em estufa de 5% de CO₂ a 37°C, por sete dias. Nesse período, a cada 48 horas, foram retirados 100 µL do sobrenadante celular e adicionados 100 µL de RPMI 1640 completo nos poços das placas de 96 poços.

4.3. CARACTERIZAÇÃO DOS MONÓCITOS E MACRÓFAGOS POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para a caracterização das células, durante a fase de padronização, utilizaram-se placas de cultura de 24 poços contendo em cada orifício uma lamínula de vidro estéril arredondada com 13 mm de diâmetro. Após a obtenção dos monócitos do sangue periférico, como especificado acima, estes foram ajustados para a concentração de 1×10^6 células por mL de meio de cultura completo. Os monócitos foram plaqueados com o intuito de aderir nas lamínulas de vidro, por no mínimo duas horas. Para se obter os macrófagos, a cultura permaneceu sob condições apropriadas por sete dias.

Passados os respectivos períodos, as lamínulas foram lavadas duas vezes com PBS estéril e retiradas cuidadosamente das placas. Monócitos e macrófagos foram fixados com paraformaldeído 2% por 15 minutos, e, posteriormente, as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS. Para minimizar as ligações inespecíficas, foi adicionado PBS suplementado com 1% de solução proteica (leite Molico[®]) por 20 minutos. Após esse período, as lamínulas foram incubadas a 4°C, por 60 minutos, protegidas da luz, com anticorpo monoclonal de camundongo anti-CD14 humano conjugado com o fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) (AbD Serotec[®]), diluído em PBS-BSA (albumina-sérica-bovina) na proporção 1:10. Em seguida, as lamínulas foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas com anticorpo monoclonal de camundongo anti-CD11c humano conjugado com o fluorocromo alofococianina (APC) (BD PharmingenTM – BD Biosciences), diluído em PBS-BSA (1:10), sob a mesma condição e tempo anteriormente citados. A seguir, as lamínulas foram lavadas duas vezes com PBS e montadas com meio de montagem para fluorescência (VECTASHIELD[®]) com DAPI (Vector Laboratories[®]).

As células foram analisadas e quantificadas por meio de microscopia de fluorescência (microscópio de varredura confocal a laser, modelo TCS, SPE, Leica, Mannheim, Alemanha), a partir de 10 campos escolhidos aleatoriamente, utilizando-se objetiva de 63x. Foi calculada a porcentagem de células CD14⁺ (identificadas pela fluorescência verde) e, simultaneamente, CD11c⁺ (identificadas pela fluorescência violeta) em relação ao número total de células evidenciadas pela coloração azulada dos seus núcleos (DAPI⁺).

4.4. VIABILIDADE DA CULTURA DE MONÓCITOS E MACRÓFAGOS

Alguns ensaios foram destinados para a determinação da viabilidade celular. Para tal, após a aderência por no mínimo duas horas na placa de 96 poços, os monócitos foram corados com 60 µL do corante Vermelho Neutro a 0,02% e mantidos por 30 minutos, na estufa de CO₂, a 37°C, protegidos da luz. O ensaio foi realizado em sextuplicata. Em seguida, os poços contendo as células foram lavados duas vezes com 200 µL de PBS estéril e, ao final, foi adicionado o mesmo volume de PBS. Posteriormente, realizou-se a leitura da absorbância (540nm) em espectrofotômetro automático de microplacas (SynergyTM Mx Monochromator-Based Multi-Mode Microplate Reader - Biotek[®] Instruments). Após sete dias de diferenciação, os macrófagos passaram pelas mesmas etapas.

Os valores da densidade óptica (OD) obtidos para os monócitos foram considerados como 100% de viabilidade celular. Os valores de OD obtidos pelos macrófagos foram comparados aos dos monócitos através da regra de três simples.

4.5. PREPARO DA SUSPENSÃO DE *Candida albicans* ATCC® 90028™ - CRESCIMENTO, LAVAGEM E CONTAGEM

Em todos os experimentos realizados, foi utilizado o fungo *Candida albicans* (*C. albicans*) ATCC® 90028™. Um volume de 100 µL da solução estoque (previamente preservada a -80°C) do fungo foi transferido para um tubo cônico contendo 10 mL de caldo Sabouraud Dextrose (BD®), o qual foi mantido em incubadora de agitação a 75 rpm, a 30°C, por 24 horas. Em seguida, para a lavagem da *Candida*, o material foi homogeneizado em vórtex e centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi dispensado e, no precipitado, foram acrescentados 10 mL de PBS estéril. Após a homogeneização da suspensão, esta foi novamente centrifugada por 10 minutos na rotação anteriormente citada. O procedimento de lavagem com PBS foi repetido mais duas vezes. Na última lavagem, o sobrenadante foi desprezado e foi adicionado 1 mL de PBS ao tubo.

Após a homogeneização, foi feita a contagem das leveduras em Câmara de Neubauer. As concentrações de *C. albicans* viáveis foram ajustadas, para a obtenção das diferentes proporções a serem utilizadas no desafio celular: 1×10^5 (para a proporção 5 células:1 levedura), 5×10^5 (para a proporção 1:1) e 25×10^5 (para a proporção 1:5). As diluições do fungo foram feitas em HBSS (Hank's Balanced Salt Solution 1x - Gibco®) completo (suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor e 1% de penicilina e estreptomicina). Este meio de cultura foi utilizado por não possuir vermelho-fenol, evitando assim qualquer tipo de interferência com os corantes fluorescentes utilizados.

4.6. DESAFIO DE MONÓCITOS E MACRÓFAGOS COM *C. albicans*

Monócitos e macrófagos, oriundos de indivíduos idosos ou jovens, foram desafiados com leveduras de *C. albicans*, sob as diferentes proporções de células (CEL) para levedura(s) do fungo (F) *C. albicans*: 5CEL:1F, 1CEL:1F e 1CEL:5F. Como controle negativo, alguns poços com as células aderidas foram mantidos apenas com meio de cultura HBSS completo (MEIO).

Previamente ao desafio, o sobrenadante dos poços foi desprezado e os poços foram lavados uma vez com PBS estéril a 37°C, para remover qualquer vestígio de vermelho-fenol, componente do meio de cultura RPMI 1640. Em seguida, foram adicionados 200µL de leveduras de *C. albicans* previamente diluídas em HBSS completo, nas diferentes proporções (como descrito anteriormente), e coradas ou não com o corante Calcofluor White (CFW) (Fluka Analytical – Sigma-Aldrich®). Para esta coloração, os fungos (após preparo nas suas diferentes proporções e antes de distribuídos nos poços) foram incubados com 5 µg/mL do corante CFW por 1 hora, a 30°C, sob leve agitação, a 75 rpm. Quando o corante CFW é adicionado ao meio de cultura, ele colore continuamente a parede da célula fúngica, mesmo as leveduras recém-formadas e as inviáveis; no entanto, não cora células animais. Os ensaios foram realizados em triplicatas ou em duplicatas quando não havia a quantidade necessária de células.

Quando leveduras coradas com CFW foram utilizadas para o desafio celular, foi possível determinar a quantidade fúngica internalizada pelas células (Ensaio de Fagocitose - item 4.7.) e ainda avaliar a influência dos monócitos e dos macrófagos sobre a proliferação extracelular de *C. albicans* (Controle do Crescimento fúngico - item 4.8.).

Quando leveduras não submetidas à coloração com CFW foram utilizadas para o desafio celular, as placas de cultura foram destinadas para os ensaios de dosagem da produção intracelular de óxido nítrico (item 4.9.) e de peróxido de hidrogênio (item 4.10.) por monócitos e macrófagos. Ao final destes ensaios, os sobrenadantes foram armazenados a -20°C para posterior dosagem de citocinas (não incluídas neste trabalho).

Para todos os ensaios, os desafios foram realizados em três tempos: 30 minutos (30min), 2 horas (2h) e 5 horas (5h), na estufa de CO₂ a 37°C. Todos os procedimentos foram realizados igualmente para as células derivadas dos grupos idoso e jovem.

4.7. ENSAIO DE FAGOCITOSE DE *C. albicans* POR MONÓCITOS E MACRÓFAGOS

Após o tempo de cada desafio, as placas de cultura foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos, em temperatura ambiente (25°C), com nove de aceleração e desaceleração. O sobrenadante dos poços, contendo células fagocitárias desafiadas com os fungos, foi descartado e, subsequentemente, as células foram incubadas com Azul de Tripan (AT) a 1 mg/mL por 30 minutos com o intuito de quelar a fluorescência dos fungos extracelulares corados por CFW, uma vez que o AT não tem a capacidade de atravessar a

membrana citoplasmática; assim, apenas os fungos internalizados pelos fagócitos mantiveram sua fluorescência e foram contabilizados. Para remover o excesso do AT, as placas foram centrifugadas por 10 minutos nas especificações acima, e os sobrenadantes de todos os poços foram descartados. Em seguida, os poços receberam 200 μ L/cada de PBS estéril. Este procedimento foi repetido por duas vezes. Na última lavagem, o sobrenadante foi desprezado e 200 μ L de PBS foram adicionados em cada poço da placa de 96 poços.

Para cada ensaio de fagocitose, poços constituindo controles internos da reação foram obtidos em triplicatas. Estes poços continham:

(1) Fagócitos não infectados, incubados com 5 μ g/mL do corante CFW por diferentes períodos (30min, 2h ou 5h), e posteriormente incubados com AT por 30 min, para se obter a fluorescência residual do corante, não atribuível às leveduras.

(2) Apenas PBS, para que fosse descontada uma possível interferência colorimétrica (branco).

A leitura da fluorescência foi realizada por toda a área do fundo do poço da placa de cultura, em espectrofotômetro automático de microplacas (SynergyTM Mx Monochromator-Based Multi-Mode Microplate Reader - Biotek[®] Instruments), na excitação de 355 nm e emissão de 450 nm com sensibilidade do leitor ajustada em 75. Os resultados foram registrados em unidades arbitrárias de fluorescência (U_{AF}).

Para obter os valores finais apenas dos fungos internalizados, em U_{AF} , as médias das triplicatas referentes à fluorescência residual foram subtraídas das médias das triplicatas ou duplicatas obtidas a partir das células desafiadas (DEMENTHON; EL-KIRAT-CHATEL; NOËL, 2012).

4.8. CONTROLE DO CRESCIMENTO EXTRACELULAR DE *C. albicans* POR MONÓCITOS E MACRÓFAGOS

Os ensaios para análise da influência dos monócitos ou dos macrófagos sobre o crescimento fúngico no sobrenadante (crescimento fúngico extracelular) foram realizados na mesma placa de cultura utilizada para o ensaio de fagocitose (item anterior), para cada indivíduo.

Para tal, em triplicatas, além das células desafiadas, como explicado previamente, poços constituindo controles internos da reação foram obtidos, e continham:

(1) Fagócitos não infectados, incubados com 5 µg/mL do corante CFW por diferentes períodos (30min, 2h ou 5h), para se obter a fluorescência residual do corante, não atribuível às leveduras.

(2) Fungos *C. albicans* (nas três diferentes proporções) corados com CFW, para se obter o potencial de crescimento fúngico livre de células humanas, nos diferentes períodos.

(3) Apenas PBS, para que fosse descontada uma possível interferência colorimétrica (branco).

Após o tempo de cada desafio, a placa foi centrifugada e tratada como descrito no item anterior, e os resultados foram também registrados em unidades arbitrárias de fluorescência ($_{UAF}$).

Para obter os valores finais referentes apenas ao crescimento fúngico extracelular na presença de células humanas, em $_{UAF}$, as médias das triplicatas ou duplicatas referentes à fluorescência residual foram subtraídas das médias das triplicatas ou duplicatas obtidas a partir das células desafiadas. Na sequência, a partir destes valores obtidos, aqueles valores referentes a fluorescência dos fungos internalizados (obtidos a partir do Ensaio de Fagocitose) foram também descontados.

A análise do crescimento fúngico extracelular foi calculada percentualmente para cada indivíduo e proporção na presença ou ausência de células. Para tal, os valores obtidos após 30min de desafio foram considerados como 100%. Dessa maneira, foi possível determinar quanto o fungo cresceu, em porcentagem, após 1h 30min e 4h 30min de desafio. Assim, os valores obtidos no tempo de 30min foram subtraídos daqueles detectados após 2h (resultando em um valor A) e após 5h (resultando em um valor B) de desafio, exceto nos casos onde os valores obtidos em 2h e 5h foram menores que aqueles obtidos aos 30min. Neste caso, consideramos que não houve crescimento fúngico nos tempos avaliados. Dessa forma, o **valor A** correspondeu ao crescimento fúngico extracelular após 1h 30min de desafio, enquanto o **valor B** a 4h 30min. Exemplificando, a porcentagem do crescimento fúngico (CF%) foi determinada da seguinte forma, sendo Y considerado como o valor obtido após 30min de desafio para cada proporção:

$$CF (\%) = \frac{(A \text{ ou } B) \times 100}{Y}$$

Por fim, a análise do crescimento fúngico extracelular, em $_{UAF}$, foi obtida por meio da comparação da proliferação fúngica livre de células humanas com aquela na presença de monócitos e/ou macrófagos. Desse modo, foi possível avaliar quanto tais células conseguiram controlar o crescimento fúngico.

4.9. PRODUÇÃO INTRACELULAR DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) POR MONÓCITOS E MACRÓFAGOS DESAFIADOS OU NÃO COM *C. albicans*

Para a dosagem da produção intracelular de NO foi utilizado o reagente DAF-FM Diacetato (Molecular probes®). Após o tempo de cada desafio, os poços foram lavados duas vezes com 200 µL de PBS estéril. Em seguida, foram adicionados em cada poço, que continha células desafiadas ou não, 196 µL de PBS estéril e 4 µL do reagente fluorescente a 10 µM. O ensaio foi realizado em duplicata. A placa foi mantida em incubadora de agitação a 37°C, sob leve agitação (75 rpm), protegida da luz, por 30 minutos. Posteriormente, os poços foram lavados duas vezes com 200 µL de PBS e, ao final, foi adicionado o mesmo volume de PBS. Na sequência, realizou-se a leitura de fluorescência por toda a área do fundo do poço da placa de cultura, em espectrofotômetro automático de microplacas (Synergy™ Mx Monochromator-Based Multi-Mode Microplate Reader - Biotek® Instruments), na excitação de 495 nm e emissão de 515 nm com sensibilidade do leitor ajustada em 100. Os dados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF).

4.10. PRODUÇÃO INTRACELULAR DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H₂O₂) POR MONÓCITOS E MACRÓFAGOS DESAFIADOS OU NÃO COM *C. albicans*

Para a dosagem intracelular de H₂O₂ utilizou-se o kit CellROX® Deep Red Reagent (Molecular probes®). Após o período de cada desafio, os poços foram lavados duas vezes com 200 µL de PBS estéril. Em seguida, foram adicionados em cada poço, que continha as células desafiadas ou não, 199 µL de PBS estéril e 1 µL do reagente fluorescente a 5 µM. O ensaio foi realizado em duplicata. A placa foi mantida em incubadora de agitação a 37°C, sob leve agitação (75 rpm), protegida da luz, por 30 minutos. Posteriormente, os poços foram lavados duas vezes com 200 µL de PBS e, ao final, foi adicionado o mesmo volume de PBS. Na sequência, realizou-se a leitura de fluorescência por toda a área do fundo do poço da placa de cultura, em espectrofotômetro automático de microplacas (Synergy™ Mx Monochromator-Based Multi-Mode Microplate Reader - Biotek® Instruments), na excitação de 640 nm e emissão de 665 nm, com sensibilidade do leitor ajustada em 150. Os dados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF).

4.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (SD) dos valores ou porcentagens obtidos para cada grupo e estímulo. A análise estatística foi realizada por meio do teste estatístico ANOVA fatorial seguido do teste de Fischer, para todas as análises. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como indicativos de significância estatística.

5 Resultados

5. RESULTADOS

5.1. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E VIABILIDADE DOS MONÓCITOS E MACRÓFAGOS OBTIDOS DE SANGUE HUMANO

Após 2h e 7 dias, para obtenção dos monócitos e macrófagos, respectivamente, foi possível detectar que 100% das células aderidas nas lamínulas eram CD14⁺ e CD11c⁺, comprovando a pureza da população celular obtida (**Figura 1**).

FIGURA 1. Caracterização da população celular *in vitro*. Macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico de humanos apresentaram imunomarcação para CD14 (A) e para CD11c (B). O núcleo dos macrófagos foram corados com DAPI (C). Em D, a sobreposição das três imagens (microscópio de varredura confocal a laser).

Morfológicamente, os monócitos apresentavam-se com citoplasma redondo e núcleo ora arredondado, ora reniforme (dados não mostrados). Já os macrófagos mostravam-se com citoplasma expandido ora arredondado, ora fusiforme e núcleo sempre arredondado (**Figura 2A**). Após coloração com vermelho neutro e posterior leitura em espectrofotômetro, observou-se que 98% dos macrófagos estavam viáveis (**Figura 2B**).

FIGURA 2. Morfologia e viabilidade dos macrófagos derivados dos monócitos do sangue periférico. Em cultura, os macrófagos apresentaram-se com citoplasma arredondado ou fusiforme (A). Ao final dos 7 dias de cultura, foi constatada a viabilidade dos macrófagos através da coloração com Vermelho Neutro (B). Imagens obtidas em microscópio invertido, campo claro.

5.2. FAGOCITOSE DE *C. albicans*, *IN VITRO*, POR MONÓCITOS E MACRÓFAGOS DE IDOSOS E JOVENS

5.2.1. Nos Períodos Iniciais e Sob Maior Carga Fúngica, os Monócitos e Macrófagos dos Idosos Apresentaram Mais Fungos Internalizados Que os Jovens. No Período Mais Tardio e Sob Maior Carga Fúngica, os Macrófagos dos Jovens Apresentaram Mais Fungos Internalizados Que os Idosos

Monócitos (MON) provenientes de idosos exibiram maior quantidade de fungos *C. albicans* internalizados quando comparados aos jovens, nas proporções 1monócito:1levedura do fungo (1MON:1F), no período de 30min ($p=0,008$), e 1MON:5F, após 30min e 2h ($p=0,001$ e $p=0,016$, respectivamente). Após 5h de desafio, os monócitos de ambos os grupos apresentaram valores similares de fungos internalizados (**Gráfico 1 e Apêndice C**).

Na proporção de maior carga fúngica (1MON:5F), os monócitos, oriundos de jovens e idosos, apresentaram maior número de fungos internalizados no tempo de 5h em comparação aos 30min de desafio ($p=0,000$ e $p=0,029$, respectivamente); para o grupo jovem o valor em 5h também foi maior que aquele em relação ao período de 2h ($p=0,000$) (**Gráfico 1**).

GRÁFICO 1. Média $\pm$ desvio padrão de fungos *C. albicans* internalizados por monócitos de idosos ou de jovens, após diferentes proporções de células em relação às leveduras (MON:F) e após diferentes períodos de desafio *in vitro*. A interiorização fúngica está expressa em Unidade Arbitrária de Fluorescência (UAF), sendo que símbolos e letras iguais revelam diferença estatística ($p<0,05$).

Macrófagos (MAC) oriundos de idosos, na proporção em que havia maior número de fungos que células (1MAC:5F), no tempo de 2h, apresentaram mais fungos *C. albicans* em seu interior quando comparados aos jovens, com médias de 404_{UAF} e 257_{UAF}, respectivamente ($p=0,028$). Essa condição se inverteu no período de 5h, ou seja, os macrófagos provenientes dos jovens apresentaram mais fungos internalizados em relação aos macrófagos dos idosos, apresentando médias de 582_{UAF} e 402_{UAF}, respectivamente ($p=0,006$) (**Gráfico 2 e Apêndice D**).

Os macrófagos oriundos de idosos apresentaram, sob a proporção 1:5, mais fungos internalizados (média de 537_{UAF}) no período inicial de desafio (30min) em relação aos outros períodos, 2h e 5h ($p=0,043$ para ambos os períodos). Após 2h, os valores decrescem para 404_{UAF} e se mantêm em 5h (média de 402_{UAF}). Os macrófagos oriundos dos jovens, sob a proporção 1:5, demonstraram uma média de fungos internalizados de 549_{UAF}, em 30min, a qual reduziu no período de 2h para 257_{UAF} ($p=0,000$). Após 5h, estas células apresentaram valores mais elevados de fungos internalizados (média de 582_{UAF}), em relação ao período anterior ($p=0,000$), valores estes similares àqueles obtidos aos 30min (**Gráfico 2 e Apêndice D**).

GRÁFICO 2. Média $\pm$ desvio padrão de fungos *C. albicans* internalizados por macrófagos de idosos ou de jovens, após diferentes proporções de células em relação às leveduras (MAC:F) e após diferentes períodos de desafio *in vitro*. A interiorização fúngica está expressa em Unidade Arbitrária de Fluorescência (_{UAF}), sendo que símbolos e letras iguais revelam diferença estatística ($p < 0,05$).

5.2.2. Independente da Idade, Macrófagos Apresentaram Mais *C. albicans* Internalizadas que os Monócitos, no Período Inicial do Desafio, Principalmente Sob 1:5. Porém, no Período de 5h, Apenas os Macrófagos dos Jovens Mantiveram Esta Maior Internalização Que os Idosos

Ambos os grupos etários apresentaram macrófagos com mais *C. albicans* internalizadas em comparação aos monócitos, no período inicial do desafio, principalmente na proporção 1célula:5leveduras do fungo (1CEL:5F) ($p=0,000$ para todas as comparações). Apenas entre os jovens, foi possível observar que os macrófagos internalizaram mais fungos que os monócitos ($p=0,042$), no tempo de 5h, para a mesma proporção (1CEL:5F) (**Gráfico 3**).

De modo geral, quanto maior a carga fúngica disponibilizada para as células, mais fungos foram detectados no interior tanto dos monócitos quanto dos macrófagos, independente da idade (**Gráfico 3**).

GRÁFICO 3. Comparação da internalização de *C. albicans* por monócitos (MON) e macrófagos (MAC), oriundos de ambos os grupos, após diferentes proporções de células em

relação às leveduras (CEL:F) e diferentes períodos de desafio *in vitro*. A interiorização fúngica está expressa em Unidade Arbitrária de Fluorescência ($_{UAF}$), considerando-se a média $\pm$ desvio padrão. Símbolos iguais diferem estatisticamente ($p < 0,05$). Cada letra representa diferença estatisticamente significativa, considerando o mesmo grupo e tempo de desafio, para cada célula individualmente ($p < 0,05$), quando comparada com: 5:1 e 1:1 (**a**); com 5:1 (**b**).

5.3. PRODUÇÃO INTRACELULAR DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) POR MONÓCITOS E MACRÓFAGOS DE IDOSOS E JOVENS, APÓS DESAFIO COM *C. albicans*

5.3.1. No Período Mais Tardio e Sob Maior Carga Fúngica Ambos os Tipos Celulares dos Idosos Produziram mais NO em Relação aos Jovens. Independente da Idade, Monócitos e Macrófagos Responderam ao Estímulo Fúngico, Quanto à Produção de NO, Apresentando Valores Mais Altos Que os Níveis Basais

De modo geral, quando os monócitos e macrófagos, provenientes tanto de idosos quanto de jovens, foram desafiados com maior quantidade de fungos em relação ao número de células (1:5), a produção de NO intracelular mostrou-se significativamente superior em comparação às células não estimuladas, a partir de 30min. Ainda, geralmente, avaliando cada período separadamente, conforme aumentava a carga fúngica, aumentava a produção de NO por ambos os tipos celulares e independente da idade, exceto sob a maior carga após 5h de desafio (**Gráficos 4 e 5**).

Avaliando a produção de NO por **monócitos** desafiados em relação àqueles não estimulados (meio), em cada período de desafio, observou-se aos **30min**, para o grupo jovem, que monócitos estimulados nas proporções 1:1 e 1:5 demonstraram produção de NO superior àquela das células não estimuladas (ambos com $p = 0,000$). Monócitos, derivados dos idosos, produziram mais NO em relação ao meio, apenas para a proporção 1:5 ($p = 0,002$). Após **2h** de desafio, tanto monócitos provindos de idosos como de jovens produziram níveis mais altos de NO em relação ao meio, para a proporção 1:5 ($p = 0,000$ e $p = 0,037$, respectivamente). Apenas os monócitos do grupo idoso produziram mais NO em relação ao meio, na proporção 1:1 ($p = 0,028$). Aos 30min e 2h de desafio, para ambos os grupos, a proporção 5:1 não ocasionou maior liberação de NO em relação aos níveis basais. Após o desafio de **5h**, monócitos

desafiados em todas as proporções apresentaram produção maior de NO em relação ao meio, para o grupo jovem ($p=0,000$ para todas as proporções). Monócitos oriundos de idosos demonstraram produção maior em relação ao meio, nas proporções 1:1 e 1:5 (para ambas as proporções $p=0,000$) (**Gráfico 4 e Apêndice E**).

Os grupos etários foram ainda comparados, considerando-se cada proporção separadamente. Aos 30min, monócitos oriundos de jovens produziram níveis significativamente maiores de NO quando comparados aos idosos, apenas na proporção 1:5 ($p=0,001$), com médias de 464_{UAF} e 226_{UAF} , respectivamente. De forma diferente, após 5h, monócitos oriundos de idosos produziram níveis mais elevados de NO em relação aos jovens, também na proporção 1:5 ($p=0,011$) (**Gráfico 4 e Apêndice E**).

GRÁFICO 4. Produção intracelular média ($\pm$ desvio padrão) de óxido nítrico por monócitos de idosos e jovens, expressa em Unidade Arbitrária de Fluorescência (UAF), após diferentes

proporções de células em relação as leveduras (MON:F). Símbolos iguais diferem estatisticamente ($p < 0,05$). Cada letra representa diferença estatisticamente significativa, considerando o mesmo grupo e tempo de desafio ($p < 0,05$), quando comparada com: 5:1, 1:1 e Meio (**a**); 5:1 e Meio (**b**); com o Meio (**c**).

Avaliando a produção de NO por **macrófagos** desafiados em relação àqueles não estimulados (meio), em cada período de desafio, observou-se que aos **30min**, macrófagos procedentes de ambos os grupos, estimulados na proporção 1:5, produziram níveis elevados de NO quando comparados às células não estimuladas, bem como às células desafiadas nas proporções 5:1 e 1:1 ($p=0,000$, $p=0,003$ e $p=0,026$, respectivamente para idosos e $p=0,002$, $p=0,006$ e $p=0,043$, respectivamente para jovens). Após **2h** e **5h** de desafio, sob as proporções 1:1 e 1:5, tanto macrófagos oriundos de idosos como de jovens, produziram níveis mais altos de NO em relação às células não estimuladas ($p=0,000$ para todas as condições avaliadas) e às células desafiadas na proporção 5:1 (após 2h para idosos: $p=0,031$ – 1:1 vs 5:1 e $p=0,006$ – 1:5 vs 5:1, e para jovens: $p=0,005$ – 1:1 vs 5:1 e $p=0,000$ – 1:5 vs 5:1; após 5h: $p=0,000$ para todas as condições avaliadas). Para os macrófagos derivados dos jovens, notou-se também produção elevada de NO sob desafio a 1:5 em comparação a 1:1, no período de **2h** ($p=0,014$); após **5h**, a condição inversa foi observada, ou seja, estas células produziram mais NO sob a proporção 1:1 do que a 1:5 ($p=0,019$). Para os macrófagos provenientes dos idosos, a produção de NO foi maior quando o desafio *in vitro* ocorreu na proporção 1:5 em relação a 1:1, apenas no período de 5h ($p=0,000$). Para a proporção em que havia mais células que *C. albicans* (5:1), os macrófagos derivados de idosos e jovens produziram níveis de NO similares àqueles basais, em todos os períodos (**Gráfico 5 e Apêndice F**).

Comparando os grupos etários, considerando-se cada proporção separadamente, notou-se que após 2h de desafio, sob a proporção 1:5, a produção intracelular de NO por macrófagos provenientes de jovens foi maior que a dos idosos, com níveis médios de 554_{UAF} e 337_{UAF} , respectivamente ($p=0,016$). No entanto, essa condição se inverteu no período de 5h, ou seja, os macrófagos oriundos dos idosos demonstraram maior produção de NO em relação aos jovens, com níveis médios de 1000_{UAF} e 480_{UAF} , respectivamente ($p=0,000$) (**Gráfico 5 e Apêndice F**).

GRÁFICO 5. Produção intracelular média ($\pm$ desvio padrão) de óxido nítrico por macrófagos de idosos e jovens, expressa em Unidade Arbitrária de Fluorescência (UAF), após diferentes

proporções de células em relação às leveduras (MAC:F). Símbolos iguais diferem estatisticamente ($p < 0,05$). Cada letra representa diferença estatisticamente significativa, considerando o mesmo grupo e tempo de desafio ($p < 0,05$), quando comparada com: 5:1, 1:1 e Meio (**a**); 5:1 e Meio (**b**).

Em geral, sob desafio com maior disponibilidade fúngica (1:5), foi possível verificar diferenças quanto à produção de NO entre os grupos etários. Nos períodos iniciais de desafio, ora monócitos ora macrófagos, derivados dos jovens, apresentaram produção mais alta de NO que os idosos. Porém, no período mais tardio de desafio fúngico, ambos os tipos celulares, monócitos e macrófagos, provenientes de idosos, produziram mais NO em relação aos jovens (**Gráficos 4 e 5**).

5.3.2. Macrófagos de Jovens Produziram mais NO que os Monócitos, Após 2h e 5h de Desafio com *C. albicans*. Monócitos e Macrófagos de Idosos e, Principalmente, de Jovens Aumentaram sua Produção de NO Intracelular, ao Longo do Tempo de Desafio Fúngico

Comparando os dois tipos celulares, observou-se diferença entre os mesmos, quanto a produção de NO, principalmente entre os jovens. Neste grupo etário, monócitos apresentaram níveis superiores da produção de NO intracelular quando comparados aos macrófagos, nas proporções 1:1 ($p = 0,033$) e 1:5 ($p = 0,003$), aos 30min de desafio. Essa situação se inverte nos períodos mais tardios. Nas mesmas proporções anteriormente citadas, os macrófagos demonstraram maior produção de NO em relação aos monócitos ($p = 0,006$ e $p = 0,015$, respectivamente), após 2h. Após 5h de desafio, apenas sob a proporção 1:1, os macrófagos continuaram a produzir mais NO que os monócitos ($p = 0,002$) (**Gráfico 6 - Jovem**). Diferenças entre os tipos celulares foram observadas, entre os idosos, apenas no período de 5h sob a proporção 1:5, no qual os macrófagos produziram níveis maiores de NO em relação aos monócitos ($p = 0,000$) (**Gráfico 6 - Idoso**).

A Figura 8 permitiu ainda comparar como foi a produção de NO ao longo do tempo, sob cada proporção individualmente e para cada tipo celular. Entre os **jovens**, os macrófagos apresentaram aumento da produção de NO, com o tempo de desafio, observado já com 2h nas proporções 1:1 e 1:5 ($p = 0,000$ para ambas). Em 5h de desafio, sob a proporção 1:1, os valores obtidos a partir dos macrófagos foram maiores que àqueles nos períodos de 30min e de 2h ($p = 0,000$ para ambos); sob a proporção 1:5, a produção de NO pelos

macrófagos foi maior que aquela obtida em 30min de desafio ($p=0,001$). Considerando os monócitos derivados de **jovens**, houve também maior produção de NO com o passar do tempo, porém apenas na comparação do período mais tardio de 5h com os anteriores. Desafiados na proporção 1:1 por 5h, os monócitos elevaram sua produção tanto em relação aos 30min ($p=0,003$), quanto às 2h ($p=0,000$); enquanto que sob a proporção 5:1, a diferença ocorreu apenas em relação às 2h ($p=0,012$) (**Gráfico 6 - Jovem**). Entre os **idosos**, os macrófagos e monócitos apresentaram aumento da produção de NO com o tempo de desafio, entretanto isto apenas foi observado após 5h. Os macrófagos, desafiados nas proporções 1:1 ou 1:5 por 5h, demonstraram maior produção de NO em relação aos períodos iniciais de desafio, 30min e 2h ($p=0,000$ para todos). Os monócitos, sob desafio na proporção 1:1 após 5h, produziram níveis aumentados de NO em comparação aos períodos de 30min e 2h ($p=0,000$ para ambos). Monócitos desafiados na proporção 1:5 por 5h apresentaram maior produção apenas em comparação ao período de 30min ($p=0,000$) (**Gráfico 6 - Idoso**).

GRÁFICO 6. Comparação da produção de óxido nítrico por monócitos (MON) e macrófagos (MAC) oriundos de ambos os grupos, após diferentes proporções de células em relação às leveduras (CEL:F) e diferentes períodos de desafio *in vitro*. A produção de NO está expressa em Unidade Arbitrária de Fluorescência (UAF), considerando-se a média $\pm$ desvio padrão. Símbolos iguais diferem estatisticamente ($p < 0,05$). Cada letra representa diferença estatisticamente significativa, considerando o mesmo grupo e proporção, para cada célula

individualmente ($p<0,05$), quando comparada com: 30min e 2h (**a**); com 30min (**b**); com 2h (**c**).

5.4. PRODUÇÃO INTRACELULAR DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H_2O_2) POR MONÓCITOS E MACRÓFAGOS DE IDOSOS E JOVENS, APÓS DESAFIO COM *C. albicans*

5.4.1. Monócitos e Macrófagos de Jovens Responderam Mais Precocemente ao Estímulo Fúngico, Quanto à Produção de H_2O_2 , Que os Idosos, Apresentando Valores Mais Altos Que os Níveis Basais, Logo aos 30min de Desafio. No Período Mais Tardio e Sob Maior Carga Fúngica, Apenas os Macrófagos dos Idosos Produziram Mais H_2O_2 em Relação aos Jovens

Monócitos e macrófagos, oriundos de jovens, demonstraram produção de H_2O_2 superior àquela das células não estimuladas (Meio), logo aos 30min de desafio com *C. albicans*. Monócitos e macrófagos, oriundos de idosos, apresentaram esta maior produção apenas a partir de 2h de desafio fúngico. Esta maior produção, em relação ao meio, manteve-se nos períodos mais tardios de desafio, principalmente na condição de maior carga fúngica (1:5) (**Gráficos 7 e 8**).

Avaliando a produção de H_2O_2 por **monócitos** desafiados em relação àqueles não estimulados (meio), em cada período de desafio, observou-se que aos **30min**, para o grupo jovem, monócitos estimulados nas proporções 5:1, 1:1 e 1:5 demonstraram maior produção de H_2O_2 em comparação àquela das células não estimuladas (todos com $p=0,000$). Após **2h** de desafio, tanto monócitos derivados de idosos como de jovens produziram níveis mais altos de H_2O_2 intracelular em relação ao meio, sob a proporção 1:5 ($p=0,003$ e $p=0,002$, respectivamente). Apenas os monócitos do grupo idoso produziram mais H_2O_2 em relação ao meio, quando desafiados na proporção 1:1 ($p=0,003$). Decorridas **5h**, monócitos sob as proporções 1:1 e 1:5 apresentaram produção maior de H_2O_2 em relação ao meio, para os grupos idoso ($p=0,007$ e $p=0,000$, respectivamente) e jovem ($p=0,000$ e $p=0,006$, respectivamente). Apenas monócitos oriundos de idosos, desafiados na proporção 1:5, demonstraram produção maior também em relação à proporção 5:1 ($p=0,032$) (**Gráfico 7 e Apêndice G**).

Comparando os grupos etários, aos 30min, monócitos oriundos de jovens produziram níveis significativamente maiores de H_2O_2 quando comparados aos idosos, após o

desafio nas três proporções (5:1, 1:1 e 1:5), com médias respectivas de 545_{UAF} e 143_{UAF} (5:1 - p=0,000), 668_{UAF} e 80_{UAF} (1:1 - p=0,000), e 669_{UAF} e 112_{UAF} (1:5 - p=0,046). No entanto, nos outros períodos, a produção de H₂O₂ pelos monócitos foi similar entre os grupos, assim como entre as diferentes proporções (**Gráfico 7 e Apêndice G**).

GRÁFICO 7. Produção intracelular média ($\pm$ desvio padrão) de peróxido de hidrogênio por monócitos de idosos e jovens, expressa em Unidade Arbitrária de Fluorescência (UAF), após

diferentes proporções de células em relação as leveduras (MON:F). Símbolos iguais diferem estatisticamente ($p < 0,05$). Cada letra representa diferença estatisticamente significativa, considerando o mesmo grupo e tempo de desafio ($p < 0,05$), quando comparada com: 5:1 e Meio (**b**); com o Meio (**c**).

Avaliando a produção de H_2O_2 por **macrófagos** desafiados em relação àqueles não estimulados, em cada período de desafio, observou-se que aos **30min**, para o grupo jovem, macrófagos estimulados nas proporções 1:1 e 1:5 demonstraram produção de H_2O_2 superior àquela das células não estimuladas (todos com $p=0,000$). Apenas sob a proporção 1:5, também foi observada produção elevada de H_2O_2 por macrófagos em relação a 5:1 ($p=0,001$). Após **2h** de desafio, macrófagos oriundos dos idosos, sob a proporção 1:5, produziram níveis mais altos de H_2O_2 em relação às proporções 5:1 e 1:1 e ao meio (para todas as condições $p=0,000$). Os macrófagos derivados do grupo jovem, sob a proporção 1:5, demonstraram produção elevada em relação a proporção 5:1 e ao meio ($p=0,005$ e $p=0,000$, respectivamente). Após o desafio por **5h**, macrófagos desafiados nas três proporções apresentaram produção maior de H_2O_2 em relação ao meio, para os grupos idoso e jovem (5:1 vs Meio, $p=0,000$ e $p=0,001$, respectivamente, 1:1 vs Meio, $p=0,003$ e $p=0,000$, respectivamente, 1:5 vs Meio, $p=0,000$ para ambos os grupos) Macrófagos oriundos de idosos, sob a proporção 1:5, demonstraram produção maior também em relação a 1:1 e 5:1 ($p=0,030$ e $p=0,000$, respectivamente); o mesmo ocorreu quando os macrófagos desafiados na proporção 1:1 foram comparados a 5:1 ($p=0,003$) (**Gráfico 8 e Apêndice H**).

Comparando os grupos etários, aos 30min, macrófagos oriundos de jovens também produziram níveis significativamente maiores de H_2O_2 quando comparados aos idosos, nas três proporções (5:1, 1:1 e 1:5), com médias respectivas de 269_{UAF} e 51_{UAF} (5:1 - $p=0,035$), 468_{UAF} e 23_{UAF} ($p=0,000$) e 681_{UAF} e 116_{UAF} ($p=0,000$). De forma diferente, após 5h, os macrófagos derivados dos idosos demonstraram maior produção de H_2O_2 que os jovens, porém apenas na proporção 1:5 ($p=0,026$) (**Gráfico 8 e Apêndice H**).

GRÁFICO 8. Produção intracelular média ($\pm$ desvio padrão) de peróxido de hidrogênio por macrófagos oriundos de idosos e jovens, expressa em Unidade Arbitrária de Fluorescência

(UAF), após diferentes proporções de células em relação as leveduras (MAC:F). Símbolos iguais diferem estatisticamente ($p < 0,05$). Cada letra representa diferença estatisticamente significativa, considerando o mesmo grupo e tempo de desafio ($p < 0,05$), quando comparada com: 5:1, 1:1 e Meio (*a*); 5:1 e Meio (*b*); com o Meio (*c*).

5.4.2. Macrófagos de Idosos Produziram Mais H_2O_2 Que os Monócitos Principalmente Após 5h de Desafio com *C. albicans*. Monócitos e Macrófagos de Idosos Aumentaram sua Produção de H_2O_2 Intracelular, ao Longo do Tempo de Desafio Fúngico

De forma diferente do observado para o NO, a análise da produção intracelular de H_2O_2 revelou diferenças entre os dois tipos celulares apenas para os idosos, e não entre os jovens. Os macrófagos oriundos dos idosos foram as células que apresentaram níveis superiores de produção de H_2O_2 intracelular quando comparados aos monócitos. Em resumo, esta maior produção por parte dos macrófagos ocorreu nas seguintes condições: no período de 5h sob as proporções 1:1 ($p=0,011$) e 1:5 ($p=0,000$), e no período de 2h sob a proporção 1:5 ($p=0,028$). Apenas no tempo de 2h, para a proporção 1:1 ($p=0,003$), foi observada maior produção de H_2O_2 pelos monócitos quando comparados aos macrófagos (**Gráfico 9 - Idoso**). No grupo jovem, monócitos e macrófagos apresentaram produção similar de H_2O_2 para cada proporção e período analisado (**Gráfico 9 - Jovem**).

Considerando cada proporção individualmente ao longo do tempo de desafio, monócitos e macrófagos oriundos de **idosos**, apresentaram aumento da produção de H_2O_2 . Especificamente com os monócitos, isto foi observado após 2h nas proporções 1:1 e 1:5 ($p=0,002$ e $p=0,006$, respectivamente). Após 5h, nestas mesmas proporções, a produção de H_2O_2 por monócitos derivados de idosos foi mantida em relação ao período anterior, porém foi maior que o período inicial de 30min (1:1 - $p=0,007$ e 1:5 - $p=0,000$). Os macrófagos derivados de idosos demonstraram maior produção de H_2O_2 , com o tempo, apenas no período de 5h, para todas as proporções, sendo que os valores foram mais altos que aqueles obtidos nos períodos anteriores, ou seja, 30min e 2h (5:1 - $p=0,003$ e $p=0,012$, respectivamente; 1:1 - $p=0,000$ para ambos os períodos; 1:5 - $p=0,000$ e $p=0,019$, respectivamente) (**Gráfico 9 - Idoso**).

Ao contrário dos idosos, monócitos oriundos de **jovens** produziram níveis maiores de H_2O_2 aos 30min de desafio fúngico em comparação aos períodos mais tardios de 2h e 5h, sob as proporções 5:1 e 1:5 (5:1 - $p=0,013$ e $p=0,032$, respectivamente; 1:5 - $p=0,048$ e

p=0,043, respectivamente). Sob a proporção 1:1, os monócitos dos jovens produziram inicialmente níveis superiores somente em relação ao período de 2h (p=0,001) (**Gráfico 9 - Jovem**).

GRÁFICO 9. Comparação da produção de peróxido de hidrogênio por monócitos (MON) e macrófagos (MAC) oriundos de ambos os grupos, após diferentes proporções de células em relação às leveduras (CEL:F) e diferentes períodos de desafio *in vitro*. A produção de H_2O_2 está expressa em Unidade Arbitrária de Fluorescência (UAF), considerando-se a média $\pm$ desvio padrão. Símbolos iguais diferem estatisticamente ($p < 0,05$). Cada letra representa diferença estatisticamente significativa, considerando o mesmo grupo e proporção, para cada

célula individualmente ($p < 0,05$), quando comparada com: 30min e 2h (*a*); com 30min (*b*); com 2h e 5h (*c*); com 2h (*d*).

5.5. CONTROLE DO CRESCIMENTO FÚNGICO EXTRACELULAR, *IN VITRO*, POR MONÓCITOS E MACRÓFAGOS DE IDOSOS E JOVENS

5.5.1. Macrófagos de Idosos Foram Mais Eficazes no Controle da Proliferação de *C. albicans* Que os Jovens

No decorrer de 4h 30min de desafio, monócitos e macrófagos, oriundos de **idosos**, conseguiram conter a proliferação fúngica, na proporção em que o número de células era maior que o de leveduras (5CEL:1F). O crescimento fúngico na presença das células foi menor quando comparado à condição em que o fungo foi capaz de crescer livremente (MON - $p=0,000$ e MAC - $p=0,001$). Na proporção 1:1, apenas os macrófagos foram capazes de controlar o crescimento de *C. albicans* ($p=0,002$) (**Gráfico 10 e Apêndices I e J**). Entre os **jovens**, apenas os monócitos foram capazes de inibir o crescimento fúngico em relação ao controle, na proporção 5:1 ($p=0,000$), após 4h 30min (**Gráfico 11 e Apêndices K e L**).

Portanto, considerando os idosos, os macrófagos controlaram significativamente o crescimento de *C. albicans* nas proporções 5:1 e 1:1, após 4h 30min de desafio, enquanto os monócitos apenas na proporção 5:1 (**Gráfico 10**).

Embora o crescimento fúngico na ausência de células tenha sido maior que aquele na presença de monócitos e macrófagos após 1h 30min, não foi possível afirmar que as células controlaram o crescimento fúngico neste período inicial de desafio, independente da idade (**Gráficos 10 e 11**).

Em resumo, os macrófagos derivados apenas dos idosos e não dos jovens demonstraram capacidade de controlar o crescimento de *C. albicans*.

GRÁFICO 10. Média do percentual do crescimento fúngico na presença ou ausência de monócitos (MON) e macrófagos (MAC) oriundos de idosos após 1h 30min e 4h 30min de desafio, nas diferentes proporções CEL:F (5:1, 1:1 e 1:5), expressa em Unidade Arbitrária de Fluorescência (UAF). Símbolos iguais diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

GRÁFICO 11. Média do percentual do crescimento fúngico na presença ou ausência de monócitos (MON) e macrófagos (MAC) oriundos de jovens após 1h 30min e 4h 30min de desafio nas diferentes proporções CEL:F (5:1, 1:1 e 1:5), expressa em Unidade Arbitrária de Fluorescência (UAF). Símbolos iguais diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

5.6. SÍNTESE DOS RESULTADOS

Para um entendimento geral dos resultados obtidos a partir dos ensaios de fagocitose, da dosagem intracelular de óxido nítrico e de peróxido de hidrogênio, e do ensaio do controle do crescimento fúngico extracelular, os mesmos foram resumidos de acordo com o tipo celular (monócitos ou macrófagos), para ambos os grupos (idoso e jovem), e expressos por meio de símbolos, objetivando graduar os diferentes aspectos funcionais (**Tabelas 1 e 2**).

TABELA 1. Representação dos resultados de internalização, de produção intracelular de óxido nítrico e de peróxido de hidrogênio e de controle do crescimento fúngico extracelular, obtidos por **monócitos** de idosos (vermelho) ou de jovens (azul), após desafio com *C. albicans*, sob diferentes proporções de monócitos por fungo (MON:F) e por diferentes períodos (30min, 2h e 5h). O controle do crescimento fúngico foi avaliado por 1h 30min e por 4h 30min. O símbolo - indica que não houve presença do fenômeno, um símbolo + caracteriza a presença do fenômeno, enquanto dois símbolos ++ representam presença do fenômeno e maior quando comparado com + ($p < 0,05$).

TEMPO	PROPORÇÃO MON:F	INTERNALIZAÇÃO	NO	H ₂ O ₂	CONTROLE DO CRESCIMENTO FÚNGICO EXTRACELULAR
30min	5:1	+ +	- -	- +	Não avaliado
	1:1	+ + +	- +	- +	Não avaliado
	1:5	+ + +	+ + +	- +	Não avaliado
2h (1h 30min)	5:1	+ +	- -	- -	- -
	1:1	+ +	+ -	+ -	- -
	1:5	+ + +	+ +	+ +	- -
5h (4h 30min)	5:1	+ +	- +	- -	+ +
	1:1	+ +	+ +	+ +	- -
	1:5	+ +	+ + +	+ +	- -

TABELA 2. Representação dos resultados de internalização, de produção intracelular de óxido nítrico e de peróxido de hidrogênio e de controle do crescimento fúngico extracelular, obtidos por **macrófagos** de idosos (vermelho) ou de jovens (azul), após desafio com *C. albicans*, sob diferentes proporções de macrófagos por fungo (MAC:F) e por diferentes períodos (30min, 2h e 5h). O controle do crescimento fúngico foi avaliado por 1h e 30min e por 4h e 30min. O símbolo - indica que não houve presença do fenômeno, um símbolo + caracteriza a presença do fenômeno, enquanto dois símbolos ++ representam presença do fenômeno e maior quando comparado com + ($p < 0,05$).

TEMPO	PROPORÇÃO MAC:F	INTERNALIZAÇÃO	NO	H ₂ O ₂	CONTROLE DO CRESCIMENTO FÚNGICO EXTRACELULAR
30min	5:1	+ +	- -	- -	Não avaliado
	1:1	+ +	- -	- +	Não avaliado
	1:5	+ +	+ +	- +	Não avaliado
2h (1h 30min)	5:1	+ +	- -	- -	- -
	1:1	+ +	+ +	- -	- -
	1:5	+ +	+ + +	+ +	- -
5h (4h 30min)	5:1	+ +	- -	+ +	+ -
	1:1	+ +	+ +	+ +	+ -
	1:5	+ +	+ + +	+ + +	- -

6 Discussão

6. DISCUSSÃO

Está bem estabelecido que as doenças infecciosas, entre elas a candidose, são responsáveis por uma grande parcela das causas de morbidade e mortalidade entre os idosos. Com o avanço da idade, a resposta imune fica desregulada e/ou comprometida, o que ocasiona maior suscetibilidade a infecções graves (ASHMAN et al., 1999; GINALDI et al., 2001; SOLANA et al., 2012). Dentre os inúmeros fenômenos da resposta imune, o processo fagocítico bem como a produção e/ou liberação de substâncias microbicidas são considerados essenciais no combate a microrganismos (ADEREM; UNDERHILL, 1999; GORDON; MARTINEZ, 2010). Por esta razão, o presente trabalho objetivou avaliar a influência da idade sobre estes mecanismos específicos de defesa, em monócitos e macrófagos, frente a *C. albicans*.

Para analisar a fagocitose após 30min, 2h e 5h de desafio *in vitro*, utilizamos o fungo *C. albicans* viável e previamente corado com CFW, de acordo com o protocolo de Dementhon; El-Kirat-Chatel; Noël (2012). Vale ressaltar que este corante liga-se especificamente a estruturas externas da parede celular dos fungos, não corando células animais. Além disso, o CFW não tem a capacidade de atravessar a parede celular fúngica e a membrana plasmática de células humanas intactas. Deste modo, tal corante não teve acesso ao ambiente intracelular, o que não nos possibilitou avaliar a existência de multiplicação das leveduras que foram internalizadas pelos monócitos e macrófagos. Sendo assim, valores maiores de Unidade Arbitrária de Fluorescência ($_{UAF}$) interna foram considerados como maior frequência de células com fungos internalizados, representando portanto uma maior capacidade fagocítica por tais células mononucleares (DEMENTHON; EL-KIRAT-CHATEL; NOËL, 2012).

De modo geral, nossos resultados revelaram que ambos os fagócitos mononucleares, oriundos de **idosos**, apresentaram capacidade fagocítica frente ao fungo *C. albicans* similar aos jovens. Entretanto, sob algumas proporções CEL:F, nos períodos iniciais de desafio *in vitro*, as células dos **idosos** chegaram a apresentar maior frequência de fungos fluorescentes em seu interior do que os **jovens**. Este resultado é compatível com trabalhos que confirmaram que os principais receptores de superfície dos monócitos e macrófagos, envolvidos ou não diretamente no reconhecimento de microrganismos, como TLR2, TLR4, TLR6, dectina-1 e -2, receptor *scavenger*, receptor de manose, CD14, CD11b, CD18 e CD36, estão bem preservados nos idosos (MURCIANO et al., 2007; LIANG et al., 2009; IFRIM et al., 2014).

Além da capacidade de internalizar *C. albicans*, monócitos e macrófagos de **idosos** também foram capazes de produzir mais NO e H₂O₂ após o desafio fúngico, em comparação às células não estimuladas, demonstrando níveis de produção semelhantes àqueles dos **jovens**, apesar destes achados não terem sido observados em todos os períodos e proporções. Estes resultados contradizem estudos que afirmaram que os intermediários reativos do nitrogênio e oxigênio mostram-se reduzidos em células oriundas de idosos após diferentes estímulos (KISSIN et. al., 1997; LU et al., 1999; TASAT et al., 2003). Embora tenhamos detectado, no presente trabalho, esta capacidade semelhante de produção entre os grupos etários, ambos os fagócitos mononucleares oriundos dos **idosos** levaram mais tempo para produzir tais substâncias microbidas que os **jovens**, principalmente o H₂O₂, respondendo mais tardiamente ao estímulo. De forma semelhante aos nossos achados, Sasada e Jhonston (1980) verificaram que macrófagos murinos oriundos de jovens, desafiados por 60min com duas espécies de *Candida*, *C. albicans* e *C. parapsilosis*, produziram quantidade significativa de espécies reativas do oxigênio logo nos primeiros minutos de interação célula/fungo, ressaltando que esta resposta inicial tem elevada importância na tentativa imediata de combate ao fungo. De fato, neutrófilos e macrófagos estimulados *in vitro* com *C. albicans*, sob a privação de oxigênio, não se apresentam eficientes para matar o fungo quando comparados com células em condições aeróbicas (Thompson & Wilton, 1992), demonstrando que as vias intracelulares dependentes de oxigênio estão envolvidas na morte de *C. albicans*.

Durante o estado de infecção celular por *C. albicans*, no presente estudo, foram observadas diferentes respostas, conforme a disponibilidade de leveduras para as células e o tempo de desafio. De modo geral, quanto maior a carga fúngica, maior foi a produção intracelular de NO pelos fagócitos de ambos os grupos etários. Ainda, nós detectamos aumento da produção intracelular de ambas as substâncias microbidas ao longo do tempo de desafio fúngico, exceto para o H₂O₂ a partir de células oriundas de **jovens**. Como já realçado por Marcil et al. (2002), o controle do crescimento intra e extracelular de *C. albicans* por estes fagócitos parece estar diretamente relacionado com a concentração de fungos disponíveis no meio durante o desafio celular.

As respostas imunes contra *C. albicans*, avaliadas neste estudo, também diferiram de acordo com o subtipo celular estudado, muitas vezes em função da idade. Desafiados nas proporções 1:1 e 1:5, os **monócitos** oriundos de **idosos** apresentaram, aos 30min, maior capacidade fagocítica contra os fungos do que os **jovens**. No entanto, foram os monócitos dos **jovens** que apresentaram níveis significativos de NO e de H₂O₂ intracelular em relação aos níveis basais, sob estas proporções de desafio fúngico. É possível que esta menor quantidade

de células com fungos internalizados, observada nos **jovens**, se deva a sua maior produção de substâncias microbidas, visto que elas desempenham um papel fundamental no controle desses microrganismos (SASADA et al., 1987; KOBAYASHI, 2010), além de apresentarem funções de regulação da resposta inflamatória (WELINGTON; DOLA; KRYSAN, 2009; FERRARI et al., 2011). Assim, estes dados sugerem que apesar dos monócitos dos **idosos** serem eficientes para reconhecer e internalizar *C. albicans*, os seus sinais intracelulares, responsáveis pela ativação e produção de tais substâncias microbidas, parecem estar afetados no início da interação célula/fungo (após 30min). Como consequência, os idosos podem ser mais susceptíveis ao processo infeccioso por *C. albicans*, já que os intermediários reativos do nitrogênio e do oxigênio contribuem para a atividade citotóxica dos fagócitos frente a diferentes tipos de microrganismos, e que uma redução na produção de NO e de H₂O₂ por tais células pode alterar o equilíbrio entre os mecanismos de defesa do hospedeiro e de virulência do patógeno (KISSIN et. al., 1997).

Em 2h, apenas para a proporção 1:5, observamos no presente trabalho que os monócitos dos **idosos** continuaram a apresentar fungos internalizados com mais frequência que os **jovens**, porém a produção de tais substâncias microbidas foi similar entre os grupos etários. Em 5h, a internalização do fungo *C. albicans* por monócitos bem como a produção intracelular de NO e H₂O₂ não diferiram entre **idosos** e **jovens**. Isso sugere que os monócitos de **idosos** necessitam de mais tempo para se ativar e estabelecer uma resposta mais efetiva contra *C. albicans*, quanto à liberação de reativos do nitrogênio e oxigênio, ao contrário dos **jovens** que apresentaram uma ativação mais rápida, logo nos períodos iniciais de contato com o fungo. Esta resposta mais tardia por parte dos monócitos sanguíneos de **idosos** pode estar associada a uma maior suscetibilidade à instalação e à progressão de candidose nesta população. Embora não tenhamos avaliado a produção de citocinas, em nosso estudo, torna-se importante ressaltar que uma resposta efetiva, por parte dos monócitos, é essencial no início da infecção para combater o fungo, visto que, por meio da produção de citocinas pró-inflamatórias, estas células podem impedir a disseminação e o crescimento descontrolado de *C. albicans* em órgãos como rins e cérebro (NGO et al., 2014). Além disso, algumas das citocinas liberadas pelos monócitos são responsáveis pela ativação e recrutamento de neutrófilos para o local da infecção, e pelo início da resposta imune adaptativa anti-*Candida* (VAN DE VEENDONK; KULLBERG; NETEA, 2010).

Considerando as proporções 1:1 e 1:5, houve produção de ambas as substâncias microbidas por monócitos, tanto de **idosos** quanto de **jovens**, porém nenhum dos grupos etários foi capaz de controlar a infecção extracelular após 1h 30min e 4h 30min de desafio

célula/fungo, a partir de nosso modelo *in vitro*. Estes achados corroboram aqueles obtidos por Marcil et al. (2002), que sob as proporções em que o número de célula era igual ou inferior ao de fungos (CEL:F - 1:1 e 1:5, respectivamente), *C. albicans* foi capaz de proliferar na presença de fagócitos de maneira semelhante àquela na ausência de células. Ainda, o fungo pode induzir uma diminuição na resposta imune, aumentando assim a possibilidade de causar uma infecção (DEMENTHON; EL-KIRAT-CHATEL; NOËL, 2012). Resultado similar foi descrito após a interação de células dendríticas com *C. albicans*, em condições em que havia mais fungos disponíveis que células (TOROSANTUCCI et al., 2004).

Quando havia mais células que fungos (proporção 5:1), após 4h 30min de desafio, os resultados foram diferentes do observado nas proporções 1:1 e 1:5. Ambos os grupos etários conseguiram reduzir substancialmente a proliferação de *Candida* extracelular na presença dos monócitos quando comparado ao controle (crescimento fúngico livre de células). Embora apenas os monócitos oriundos de **jovens** tenham apresentado produção intracelular significativa de NO em relação aos níveis basais, substâncias microbidas liberadas no ambiente extracelular pelos monócitos *in vitro* podem ter sido responsáveis pelo controle fúngico. Monócitos ativados por citocinas pró-inflamatórias, incluindo a via autócrina, produzem e liberam, ainda mais, substâncias microbidas no meio extracelular (VAN DE VEENDONK; KULLBERG; NETEA, 2010). Entretanto, através da metodologia utilizada por nós, obtivemos os níveis de produção intracelular de NO e de H₂O₂, e não extracelular. Por fim, não podemos descartar ainda a possibilidade que estes fagócitos possam ter utilizado outras vias, que não os reativos de oxigênio e nitrogênio, na tentativa de eliminar o fungo extracelular, pelo menos nos idosos. Uma das formas, recentemente descrita, seria através da formação de armadilhas extracelulares, a partir da qual a célula expelle filamentos de DNA associados a proteínas antimicrobianas, como histonas e proteínas granulares, que têm a capacidade de matar e/ou conter a proliferação fúngica extracelular local, caracterizando um mecanismo microbicida extracelular independente da fagocitose, observado em células como neutrófilos, macrófagos, mastócitos e eosinófilos (LIU et al., 2014).

Além dos monócitos, nosso trabalho avaliou as mesmas respostas em células diferenciadas para **macrófagos** e posteriormente desafiadas com *C. albicans*. Estas células oriundas de **idosos** apresentaram capacidade fagocítica similar àquela dos **jovens**, para todas as proporções e logo aos 30min de desafio. No entanto, somente os macrófagos oriundos dos **jovens** produziram níveis significativos de ambas as substâncias microbidas, H₂O₂ e NO, após o desafio em relação aos níveis basais, na proporção 1:5. Em nosso estudo, somente para

esta proporção, foram observadas variações entre os grupos etários quanto a internalização fúngica e a produção de NO e H₂O₂.

Assim, após 2h, sob a proporção 1:5, os **idosos** demonstraram maior frequência de internalização fúngica que os **jovens**. Igualmente ao observado para os monócitos, esta menor internalização por parte dos macrófagos oriundos dos **jovens** ocorreu em paralelo a uma maior produção intracelular de H₂O₂ e de NO, em relação aos **idosos**. Esta importante produção de microbicidas pode ter forte associação com a diminuição do fungo internalizado, como já abordado anteriormente para os monócitos.

De forma contrária, em 5h, para a mesma proporção (1:5), os macrófagos oriundos dos **jovens** passaram a apresentar mais fungos internalizados e menor produção de tais substâncias microbicidas, que os **idosos**. Enquanto isso, os **idosos** demonstraram menor frequência de macrófagos com fungos no seu interior associada com um aumento significativo na produção intracelular de NO e H₂O₂, sugerindo a capacidade de eliminar os fungos internalizados. Diferente dos monócitos, com o passar do tempo de desafio, os macrófagos provenientes dos **idosos** conseguiram se ativar e produzir níveis mais elevados de reativos do nitrogênio e de oxigênio que aqueles dos **jovens**. Apesar disso, nenhum dos grupos etários foi capaz de conter o crescimento fúngico extracelular nesta proporção, por meio de macrófagos.

Nas proporções em que o número de células era maior ou igual que o de fungos (5:1 e 1:1, respectivamente), somente macrófagos de **idosos** conseguiram controlar efetivamente o crescimento extracelular de *C. albicans*, após 4h 30min de contato célula/fungo, embora a capacidade fagocítica e a produção intracelular de microbicidas tenham sido similares entre os grupos etários. Deste modo, acreditamos que este controle da proliferação fúngica pelos macrófagos dos idosos esteja relacionado a uma pré-ativação destas células em função do constante estado inflamatório crônico, observado em indivíduos senescentes, mas saudáveis, conhecido como “*inflamm-aging*”. Este processo é caracterizado pela produção de elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias por células mononucleares, entre elas IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α e MCP-1 (FRANCESCHI et al., 2000; PINKE et al., 2013) devido a elevada exposição antigênica a vários tipos de microrganismos e ao estresse celular sofridos ao longo da vida (FRANCESCHI et al., 2000). De acordo com van de Veendonk; Kullberg; Netea (2010), as citocinas IL-1, IL-8 e TNF- α desempenham um papel crítico na defesa do hospedeiro contra a candidose disseminada, sinalizando o recrutamento e a ativação de células envolvidas no combate ao patógeno, incluindo a produção de substâncias microbicidas. Segundo estudos de Baltch, et. al (2001), a atividade microbicida de

macrófagos humanos, no caso de candidose sistêmica, está intimamente associada com a atividade de algumas citocinas como TNF- α , INF- γ , GM-CSF, IL-1 e IL-4. Possivelmente, em nosso estudo, macrófagos pré-ativados, em função do estado “*inflamm-aging*”, tenham produzido e liberado mais substâncias microbidas ao meio extracelular que as células oriundas dos **jovens**, resultando em importante influência sobre o crescimento de *C. albicans* extracelular. Porém, apesar desse estado de inflamação crônica poder ter beneficiado os idosos no combate a *C. albicans*, esse fenômeno é responsável pelo surgimento de outras patologias severas que culminam em grande parcela de morbidade neste grupo etário (KRABBE; PEDERSEN; BRUUNSGAARD, 2004; MICHAUD, et al., 2013).

Tanto para monócitos como para macrófagos, oriundos de idosos e jovens, sob a proporção em que havia menos células que fungos (1:5), não houve controle do crescimento extracelular de *C. albicans* por estes fagócitos. Acreditamos que, além da presença do elevado número de leveduras, substâncias presentes e/ou produzidas e secretadas pelos fungos foram responsáveis pela sua evasão em relação à resposta imune inata, permitindo seu estabelecimento no meio em que se encontravam. As leveduras e hifas de *C. albicans* possuem a proteína flavo-hemoglobina Yhb1p e as enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase, as quais são responsáveis por converter o NO ao inofensivo nitrato, e por degradar espécies reativas de oxigênio produzidas pelas células do hospedeiro, respectivamente (CHIRANAND et al, 2008; WELLINGTON; DOLA; KRYSAN, 2009; FROHNER et al., 2012). De fato, em infecções locais ou sistêmicas já estabelecidas, onde há grande quantidade de fungos, é necessária a cooperação entre os demais tipos celulares do sistema imunológico para conter e eliminar a infecção por espécies de *Candida* (VAN DE VEENDONK; KULLBERG; NETEA, 2010).

Ainda, de acordo com nossos resultados, os macrófagos, de modo geral e independente da idade, foram mais eficientes que os monócitos quanto à internalização fúngica, à produção de substâncias microbidas e ao controle do crescimento fúngico extracelular. Isso corrobora o fato de serem células teciduais especializadas e estarem preparadas para combater qualquer infecção (SICA; MANTOVANI, 2012). Segundo Thompson e Wilton (1992), os monócitos fagocitam tão bem quanto os macrófagos, porém são menos eficientes na produção de reativos do oxigênio e nitrogênio, falhando ao tentar controlar a infecção por *C. albicans*.

Em resumo, no presente trabalho, foi demonstrado que as funções de defesa de monócitos e macrófagos provenientes dos idosos sofreram modificações com o avanço da idade. Os fagócitos dos idosos, apesar de eficientes na captura e internalização de fungos,

apresentaram falhas para ativar a produção imediata de substâncias microbidas após o contato com *C. albicans*, o que pode propiciar a colonização local e/ou desenvolvimento de candidose, incluindo a sistêmica. Acreditamos que tais células dos idosos conseguiram igualar-se a ou, ainda, superar a resposta imune dos jovens, devido ao estado pró-inflamatório crônico a que estes indivíduos estão submetidos.

7 Conclusões

7. CONCLUSÕES

A partir de nossos resultados, em comparação aos jovens, concluimos que monócitos e macrófagos de idosos:

- ✓ Têm sua habilidade de internalizar o fungo *C. albicans* preservada; no entanto, os seus sinais de ativação para a produção de substâncias microbidas, como NO e H₂O₂, estão prejudicados, o que pode propiciar a instalação local do fungo e/ou disseminação sistêmica nesta população.

- ✓ Ao longo do tempo, conseguiram produzir NO e H₂O₂ como ou mais que os jovens, sugerindo um estado de pré-ativação celular em função de níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias inerentes do estado crônico *inflamm-aging*, o qual os idosos podem estar vivenciando.

Referências

REFERÊNCIAS

ADEREM, A.; UNDERHILL, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annu. Rev. Immunol**, n.17, p. 593–623, 1999.

AGGELER, J.; WERB, Z. Initial events during phagocytosis by macrophages viewed from outside and inside the cell: membrane-particle interactions and clathrin. **J. Cell Biol**, v. 94, n. 3, p. 613–623, set. 1982.

ALLMAN, D.; MILLER, J. P. The aging of early B-cell precursors. **Immunol Rev**, n. 205, p. 18–29, jun. 2005.

ASHMAN, R. B.; PAPADIMITRIOU, J. M.; FULURIJA, A. Acute susceptibility of aged mice to infection with *Candida albicans*. **J. Med. Microbiol**, v. 48, n. 12, p. 1095-1 102, 1999.

BALISH, E. et al. Susceptibility of Germfree Phagocyte Oxidase- and Nitric Oxide Synthase 2-Deficient Mice, Defective in the Production of Reactive Metabolites of Both Oxygen and Nitrogen, to Mucosal and Systemic Candidiasis of Endogenous Origin. **Infect Immun**, v. 73, n. 3, p.1313-1320, mar. 2005.

BALTCH, A. L. et. al. Effects of cytokines and fluconazole on the activity of human monocytes against *Candida albicans*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 1, p. 96-104, jan 2001.

BEHARKA, A. A. et al. Mechanism of vitamin E inhibition of cyclooxygenase activity in macrophages from old mice: role of peroxynitrite. **Free Radic. Biol. Med**, v. 32, n.6, p. 503–511, mar. 2002.

BERZAGHI, R. et al. New approach for diagnosis of candidemia based on detection of a 65-kilodalton antigen. **Clin Vaccine Immunol**, v. 16, n. 11, p. 1538–45, nov. 2009.

BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: câncer as a paradigm. **Nat Immunol**, v. 11, n. 10, p. 889–896, set. 2010.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nat Immunol**, v. 2, n. 10, p. 906-916, out. 2001.

BRASIL. Decreto-lei nº 10741, de 1 de outubro de 2003. Dispõe sobre o Estatuto do Idoso e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 3 out. 2003. Seção 1, p. 1-6.

BROWN, A. J.; GOW, N. A. R. Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. **Trends Microbiol**, v. 7, n. 8, p. 333–338, ago. 1999.

BROWN, G. D. et al. 2003. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. **J. Exp. Med**, v. 197, n. 9, p.1119–1124, maio 2003.

CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors in *Candida albicans*. **Trends Microbiol**, v.9, n. 7, p. 327-335, jul. 2001.

- CASTRO, M.; BJORAKER, J. A.; ROHRBACH, M. S.; LIMPER, A. H. *Candida albicans* induces the release of inflammatory mediators from human peripheral blood monocytes. **Inflammation**, v. 20, n.1, p.107-122, fev. 1996.
- CHEN, L. C. et al. Altered regulation of inducible nitric oxide synthase expression in macrophages from senescent mice. **Infect Immun**, v. 64, n. 10, p. 4288-4298, out. 1996.
- CHINEN, T. et al. *Candida albicans* suppresses nitric oxide (NO) production by interferon-gamma (IFN- γ) and lipopolysaccharide (LPS)-stimulated murine peritoneal macrophages. **Clin Exp Immunol**, v. 115, n. 3, p. 491-497, mar. 1999.
- CHIRANAND, W. et al. *CTA4* Transcription Factor Mediates Induction of Nitrosative Stress Response in *Candida albicans*. **Eukaryot Cell**, v. 7, n. 2, p. 268-278, fev. 2008.
- CLAUS, V. et al. Lysosomal Enzyme Trafficking between Phagosomes, Endosomes, and Lysosomes in J774 Macrophages. **J Biol Chem**, v. 273, n. 16, p. 9842-9851, abr. 1998.
- DEMENTHON, K.; EL-KIRAT-CHATEL, S.; NOËL, T. Development of an In Vitro Model for the Multi-Parametric Quantification of the Cellular Interactions between *Candida* Yeasts and Phagocytes. **Plos One**, v. 7, n. 3, e32621, mar. 2012. Disponível em: <http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0032621>. Acesso em: 08 jun. 2013.
- DIAKONOVA, M.; BOKOCH, G.; SWANSON, J. A. Dynamics of cytoskeletal proteins during Fc γ -receptor-mediated phagocytosis in macrophages. **Mol Biol Cell**, v. 13, n. 2, p. 402-411, fev. 2002.
- DIMOPOULOS, G. et al. Candidemia in immunocompromised and immunocompetent critically ill patients: a prospective comparative study. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 26, n. 6, p. 377-84, jun. 2007.
- DJEU, J.Y. Role of tumor necrosis factor and colony-stimulating factors in phagocyte function against *Candida albicans*. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 13, n. 5, p. 383-386, set./out. 1990.
- ERNST, J. Transcription factors in *Candida albicans* – environmental control of morphogenesis. **Microbiol**, v. 146, n. 8, p. 1763-1774, ago. 2000.
- FARAH, C. S. et al. T cells augment monocyte and neutrophil function in host resistance against oropharyngeal candidiasis. **Infect Immun**, v. 69, n. 10, p. 6110-6118, out. 2001.
- FARAH, C. S. et al. Gene targeting demonstrates that inducible nitric oxide synthase is not essential for resistance to oral candidiasis in mice, or for killing of *Candida albicans* by macrophages in vitro. **Oral Microbiol Immunol**, v. 24, n. 1, p. 83-88, fev. 2009.
- FARIA, P. F. **Produção de citocinas pelos monócitos de idosos com estomatite protética associada a *Candida albicans***. 2011. 159 p. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2011.

- FERNANDÉZ-ARENA, E. et al. *Candida albicans* actively modulates intracellular membrane trafficking in mouse macrophage phagosomes. **Cell Microbiol**, v. 11, n. 4, p. 560-589, abr. 2008.
- FERRARI, C. K. B.; SOUTO, P. C. S.; FRANÇA, E. L.; HONORIO-FRANÇA, A. C. Oxidative and Nitrosative Stress on Phagocytes' Function: from Effective Defense to Immunity Evasion Mechanisms. **Arch Immunol Ther Exp**, v. 59, n. 6, p. 41-448, dez. 2011.
- FERWERDA, B. et al. Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections. **N Engl J Med**, v. 361, n.18, p. 1760-1767, out. 2009.
- FILLER, S. G. *Candida*-host cell receptor-ligand interactions. **Curr Opin Microbiol**, v. 9, n. 4, p. 333-339, ago. 2006.
- FRANCESCHI, C. et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. **Ann N Y Acad Sci**, v. 908, p. 244-254, jun. 2000.
- FROHNER, I. E. et al. *Candida albicans* cell surface superoxide dismutases degrade host-derived reactive oxygen species to escape innate immune surveillance. **Mol Microbiol**, v. 71, n. 1, p. 240-252, jan. 2009.
- GANTNER, B. N. et al. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. **J Exp Med**, v. 197, n. 9, p. 1107-1117, abr. 2003.
- GASPAROTO, T. H. **Estudo da função dos neutrófilos nos mecanismos de defesa contra a estomatite por dentadura em indivíduos idosos**. 2009. 187 p. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2009.
- GASPAROTO, T. H. et al. Absence of functional TLR4 impairs response of macrophages after *Candida albicans* infection. **Med Mycol**, v. 48, n. 8, p: 1009-1017, dez. 2010.
- GEISSMANN, F. et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science**, v.327, n. 5966, p. 656-661, fev. 2010.
- GHANNOUM, M. A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clin Microbiol**, v. 13, n. 1, p. 122-143, jan. 2000.
- GLOCKER, E. O. et al. A homozygous CARD9 mutation in a family with susceptibility to fungal infections. **N Engl J Med**, v. 361, n. 18, p. 1727-1735, out. 2009.
- GOMEZ, C. R.; BOEHMER, E. D.; KOVACS, E. J. The aging innate immune system. **Curr Opin Immunol**, v. 17, n. 5, p. 457-462, out. 2005.
- GOMEZ, C. R. et al. Innate immunity and aging. **Exp Gerontol**, v. 43, n. 8, p. 718-728, ago. 2008.
- GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. **Immunity**, v. 32, n. 5, p. 593-604, maio 2010.

- GOZALBO, D. et al. The cell wall as a potential molecular target for antifungal therapy. **Curr Drug Targets Infect Disord**, v. 4, n. 2, p. 117–135, jun. 2004.
- HAKIM, F. T. et al. Aging, immunity and cancer. **Curr Opin Immunol**, v. 16, n. 2, p. 151–156, abr. 2004.
- HILMER, S. N.; COGGER, V. C.; LE COUTEUR, D. G. Basal activity of Kupffer cells increases with old age. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 62, n. 9, p. 973–8, set. 2007.
- HOLT, D. J.; GRAINGER, D. W. Senescence and quiescence induced compromised function in cultured macrophages. **Biomaterials**, v. 33, n. 30, p. 7497-7507, out. 2012.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores Sociais Municipais: Uma Análise dos Resultados do Universo do Censo Demográfico 2010**. Rio de Janeiro: IBGE; 2011. Disponível em http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/indicadores_sociais_municipais/indicadores_sociais_municipais.pdf. Acesso em: 10 out 2012.
- IBRAHIM-GRANET, O. et. al. Phagocytosis and Intracellular Fate of *Aspergillus fumigatus* Conidia in Alveolar Macrophages. **Infect Immun**, v. 71, n. 2, p. 891–903, fev. 2003.
- IFRIM, D. C. et. al. Role of Dectin-2 for Host Defense against Systemic Infection with *Candida glabrata* . **Infect Immun**, v. 82, n. 3, p. 1064–1073. mar. 2014.
- JOUAULT, T. et. al. *Candida albicans* phospholipomannan is sensed through Toll-like receptors. **J Infect Dis**, v. 188, n. 1, p. 165–172, jul. 2003.
- JOUAULT, T. et. al. Specific recognition of *Candida albicans* by macrophages requires galectin-3 to discriminate *Saccharomyces cerevisiae* and needs association with TLR2 for signaling. **J Immunol**, v. 177, n. 7, p. 4679–4687, out. 2006.
- KAPOSZTA, R. et. al. Characteristics of invasive candidiasis in gamma interferon- and interleukin-4-deficient mice: role of macrophages in host defense against *Candida albicans*. **Infect Immun**, v. 66, n. 4, p. 1708–1717, abr. 1998.
- KASPERKOVITZ, P. V. et. al. Toll-like receptor 9 modulates macrophage antifungal effector function during innate recognition of *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Infect Immun**, v. 79, n. 12, p. 4858-4867, dez. 2011.
- KAUFFMAN, C. A. Fungal infections in older adults. *Clin Infect Dis*, v. 33, n. 4, p. 550-555, ago. 2001.
- KISSIN, E. et. al. Age-related decline in murine macrophage production of nitric oxide. **J Infect Dis**, v. 175, n. 4, p.1004-1007, abr. 1997.
- KOBAYASHI, Y. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. **J Leukoc Biol**, v. 88, n. 6, p. 1157-62, dez. 2010.

-
- KRABBE, K. S.; PEDERSEN, M.; BRUUNSGAARD, H. Inflammatory mediators in the elderly. **Exp Gerontol**, v. 39, n. 5, p. 687-99, mai. 2004.
- KULLBERG, B.J. et al. Recombinant interferon- γ enhances resistance to acute disseminated *Candida albicans* infection in mice. **J Infect Dis**, v. 168, n. 2, p. 436-443, ago. 1993.
- KULLBERG, B. J. et al. Modulation of neutrophil function in host defense against disseminated *Candida albicans* infection in mice. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 26, n. 3-4, p. 299-307, dez. 1999.
- LAMBETH, J. D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 3, p. 181-189, mar. 2004.
- LIANG, S. et al. Age-related alterations in innate immune receptor expression and ability of macrophages to respond to pathogen challenge in vitro. **Mech Ageing Dev**, v. 130, n. 8, p. 538-546, ago. 2009.
- LIU, P. et al. *Escherichia coli* and *Candida albicans* induced macrophage extracellular trap-like structures with limited microbicidal activity. **PLoS One**, n. 9, v. 2, e90042, fev. 2014.
- LU, Q. et al. Chronic exercise increases macrophage-mediated tumor cytolysis in young and aged mice. **Am J Physiol**, v. 276, n. 2, p.482-489, fev. 1999.
- MARCIL, A.; HARCUS, D.; THOMAS, D. Y.; WHITEWAY, M. *Candida albicans* Killing by RAW 264.7 Mouse Macrophage Cells: Effects of *Candida* Genotype, Infection Ratios, and Gamma Interferon Treatment. **Infect Immun**, v. 70, n. 11, p. 6319-6329, nov. 2002.
- MEANS, T. K. et al. Evolutionarily conserved recognition and innate immunity to fungal pathogens by the scavenger receptors SCARF1 and CD36. **J Exp Med**, v. 206, n. 3; p. 637-653, mar. 2009.
- MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. JR. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. **Science**, v. 296, n. 5566, p. 298-300, abr. 2002.
- METCALF, D. Hematopoietic cytokines. **Blood**, v. 111, n.2, p. 485-491, jan. 2008.
- METCALF, D.; NICOLA, N. A. The clonal proliferation of normal mouse hematopoietic cells: enhancement and suppression by colony-stimulating factor combinations. **Blood**, v. 79, n. 11, p. 2861-2866, jun.1992.
- MICHAUD, M. et al. Proinflammatory cytokines, aging, and age-related diseases. **J Am Med Dir Assoc**, v. 14, n. 12, p. 877-82, dez. 2013.
- MILJKOVIC, D.; TRAJKOVIC, V. Inducible nitric oxide synthase activation by interleukin-17. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 15, n. 1, p. 21-32, fev. 2004.
- MIYAZATO, A. et al. Toll-like receptor 9-dependent activation of myeloid dendritic cells by deoxynucleic acids from *Candida albicans*. **Infect Immun**, v. 77, n. 7, p. 3056-3064, jul. 2009.

- MONOD, M.; VON-BORG, Z. M. Secreted aspartic proteases as virulence factors of *Candida* species. **Biol Chem**, v. 383, n. 7-8, p. 1087-1093, jul/ago. 2002.
- MOSSADEGH-KELLER, N. et. al. M-CSF instructs myeloid lineage fate in single haematopoietic stem cells. **Nature**, v. 497, p. 239-243, mai. 2013.
- MURCIANO, C. et. al. Impaired immune response to *Candida albicans* in aged mice. **J Med Microbiol**, v. 55, n. 12, p. 1649-1656, dez. 2006.
- MURCIANO, C. et al. In vitro response to *Candida albicans* in cultures of whole human blood from young and aged donors. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 51, n. 2, p. 327-35, ago. 2007.
- MURCIANO, C. et. al. Influence of aging on murine neutrophil and macrophage function against *Candida albicans*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 53, n. 2, p. 214-221, jul. 2008.
- NAGLIK, J. R.; CHALLACOMBE, S. J.; HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 67, n. 3, p. 400-428, set. 2003.
- NAGLIK, J. R.; FIDEL, JR. P.L.; ODDS, F. C. Animal models of mucosal *Candida* infection. **FEMS Microbiol Lett**, v. 283, n. 2, p. 129-139, jun. 2008.
- NETEA, M. G., et al. The increased susceptibility of TNF- α lymphotoxin- α double knockout mice to systemic candidiasis is through impaired recruitment of neutrophils and phagocytosis of *Candida albicans*. **J Immunol**, v. 163, n. 3, p. 1498-1505, ago. 1999.
- NETEA, M. G. et al. The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defence against disseminated candidiasis. **J Infect Dis**, v. 185, n. 10, p. 1483-1489, maio 2002.
- NETEA, M. G. et al. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. **J Immunol**, v. 172, n. 6, p. 3712-3718, mar. 2004.
- NETEA, M. G. et al. Immune sensing of *Candida albicans*: cooperative recognition of mannans and glucan by lectin and Toll-like receptors. **J Clin Invest**, v. 116, n. 6, p. 1642-1650, jun. 2006.
- NETEA, M. G. et al. Role of TLR1 and TLR6 in the host defence against disseminated candidiasis. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 52, n. 1, p. 118-123, jan. 2008.
- NGO, L. Y et al. Inflammatory Monocytes Mediate Early and Organ-Specific Innate Defense During Systemic Candidiasis. **J Infect Dis**, v. 209, n. 1, p. 109-19, jan. 2014.
- NIEDERGANG, F.; CHAVRIER, P. Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to phagos(R)ome. **Curr Opin Cell Biol**, v. 16, n. 4, p. 422-428, ago. 2004.
- NUCCI, M. et al. Risk factors for death in patients with candidemia. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 19, n. 11, p. 846-850, nov. 1998.

PINKE, K. H.; CALZAVARA, B.; FARIA, P. F.; NASCIMENTO, M. P. P.; VENTURINI, J.; LARA, V. S. Proinflammatory profile of in vitro monocytes in the ageing is affected by lymphocytes presence. **Immunity & Ageing**, n.10, v. 22, p. 1-10, jun. 2013.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, n. 1, p. 133–63, jan. 2007.

PLOWDEN, J. Innate immunity in aging: impact on macrophage function. **Aging Cell**, v. 3, n. 4, p. 161-167, ago. 2004.

POULAIN, D.; JOUAULT, T. *Candida albicans* cell wall glycans, host receptors and responses: elements for a decisive crosstalk. **Curr Opin Microbiol**, v. 7, n. 4, p. 342–349, ago. 2004.

RABINOVITCH, M. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. **Trends Cell Biol**, v. 5, n. 3, p. 85-87, mar. 1995.

RENSHAW, M. et al. Cutting edge: impaired Toll-like receptor expression and function in aging. **J Immunol**, v. 169, n. 9, p.4697-4701, nov. 2002.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nat Rev Immunol**, v.11, n. 4, p. 275–288, abr. 2004.

ROMANI, L.; BISTONI, F.; PUC CETTI, P. Adaptation of *Candida albicans* to the host environment: the role of morphogenesis in virulence and survival in mammalian hosts. **Curr Opin Microbiol**, v.6, n. 4, p. 338-343, ago. 2003.

SANO, H. et al. Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages. **J Clin Invest**, v. 112, n. 3, p. 389-397, ago. 2003.

SASADA, M.; JOHNSTON, R. B. JR. MACROPHAGE MICROBICIDAL ACTIVITY Correlation between Phagocytosis-associated Oxidative Metabolism and the Killing of *Candida* by Macrophages. **J Exp Med**, v. 152, p. 85-98, jul. 1980.

SASADA, M. et al. Candidacidal activity of monocyte-derived human macrophages: relationship between *Candida* killing and oxygen radical generation by human macrophages. **J Leukoc Biol**, v. 41, n. 4, p. 289-94, abr. 1987.

SCOTT, C. C., BOTELHO, R. J.; GRINSTEIN, S. Phagosome maturation: a few bugs in the system. **J Membr Biol**, v. 193, n. 3, p. 137-152, jun. 2003.

SHILOH, M. U. et al. Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. **Immunity**, v. 10, n. 1, p. 29-38, jan. 1999.

SICA, A.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **J Clin Invest**, v. 122, n. 3, p. 787–795, mar. 2012.

SOLANA, R.; TARAZONA, R.; GAYOSO, I.; LESUR, O.; DUPUIS, G.; FULOP, T. Innate immunosenescence: Effect of aging on cells and receptors of the innate immune system in humans. **Semin Immunol**, v. 24, n. 5, p. 331-41, out. 2012.

- SOLL, D. R. High-frequency switching in *Candida albicans*. **Clin Microbiol Rev**, v. 5, n. 2, p. 183-203, abr. 1992.
- SOLL, D. R. Gene regulation during high-frequency switching in *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 143, n. 2, p. 279-288, fev. 1997.
- STOUT, R. D.; SUTTLES, J. Immunosenescence and macrophage functional plasticity: dysregulation of macrophage function by age-associated microenvironmental changes. **Immunol Rev**, v. 205, p. 60-71, jun. 2005.
- SUNDSTROM, P. Adhesion in *Candida* spp. **Cell Microbiol**, v. 4, n. 8, p. 461-469, ago. 2002.
- TASAT, D. R. et al. Age-dependent change in reactive oxygen species and nitric oxide generation by rat alveolar macrophages. **Aging Cell**, v. 2, n.3, p.159–164, jun. 2003.
- TOMPSON, H. L.; WILTON, M. A. Interaction and intracellular killing of *Candida albicans* blastospores by human polymorphonuclear leucocytes, monocytes and monocyte-derived macrophages in aerobic and anaerobic conditions. **Clin Exp Immunol**, v. 87, n. 2, p. 316–321, fev. 1992.
- TOROSANTUCCI, A. et al. *Candida albicans* Yeast and Germ Tube Forms Interfere Differently with Human Monocyte Differentiation into Dendritic Cells: a Novel Dimorphism-Dependent Mechanism To Escape the Host's Immune Response. **Infect Immunol**, v. 72, n. 2, p. 833-843, fev. 2004.
- VAN DE VEERDONK, F. L.; KULLBERG, B. J.; NETEA, M. G. Pathogenesis of invasive candidiasis. **Curr Opin Crit Care**, v. 16, n. 5, p. 453–459, out. 2010.
- VARIN, A.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: Immune function and cellular biology. **Immunobiology**, v. 214, n. 7, p. 630-641, jul. 2009.
- VASQUEZ-TORRES, A.; BALISH, E. Macrophages in resistance to candidiasis. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 61, n. 2, p. 170-192, jun. 1997.
- VAZQUEZ-TORRES, A.; JONES-CARSON, J.; BALISH, E. Peroxynitrite contributes to the candidacidal activity of nitric oxide-producing macrophages. **Infect Immun**, v. 64, n. 8, p. 3127-3133, ago. 1996.
- VECCHIARELLI, A. et al. Role of human alveolar macrophages as antigenpresenting cells in *Cryptococcus neoformans* infection. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 11, n. 2, p. 130-137, ago. 1994.
- YANG, Y. L. Virulence factors of *Candida* species. **J Microbiol Immunol Infect**, v. 36, n. 4, p. 223-228, dez. 2003.
- WATANABE, K.; KAGAYA, K.; YAMADA, T.; FUKAZAWA, Y. Mechanism for Candidacidal Activity in Macrophages Activated by Recombinant Gamma Interferon. **Infect Immun**, v. 59, n. 2, p. 521-528, fev. 1991.

WELLINGTON, M.; DOLAN, K.; KRYSAN, D. J. Live *Candida albicans* Suppresses Production of Reactive Oxygen Species in Phagocytes. **Infect Immun**, v. 77, n. 1, p. 405-413, jan. 2009.

WELLS, C. A. et al. The macrophage-inducible C-type lectin, mincle, is an essential component of the innate immune response to *Candida albicans*. **J. Immunol**, v. 180, n. 11, p. 7404-7413, jun. 2008.

Apêndices

APÊNDICES**APÊNDICE A - Formulário Para Coleta de Dados Clínicos dos Voluntários***I. Identificação do indivíduo:*

Nome:

Data de nascimento:

Idade:

Sexo:

Naturalidade:

Estado:

Nacionalidade:

Ocupação:

Estado civil:

Endereço Residencial:

Bairro:

Cidade:

Estado:

Telefone:

Celular:

Telefone de recado:

Falar com:

Endereço profissional:

Telefone:

Bairro:

Cidade:

Estado:

II. Anamnese:

1. Faz uso de algum tipo de medicação? 1. Sim. 2. Não. Qual?
2. Realizou algum tratamento recente? 1. Sim. 2. Não. Qual?
3. Frequência de visitas ao médico:
4. Há alteração endócrina (diabetes, gravidez, hipo/hipertireoidismo)? 1. Sim. 2. Não.
5. Realizou alguma cirurgia? 1. Sim. 2. Não. Qual cirurgia?
6. Apresentou algum sangramento excessivo? 1. Sim. 2. Não.
7. Apresenta algum problema na cicatrização? 1. Sim. 2. Não.
8. Apresenta dor no corpo? 1. Sim. 2. Não.
9. Sente cansaço mesmo sem ter feito exercício físico? 1. Sim. 2. Não.
10. Apresenta náuseas ou vômito com frequência? 1. Sim. 2. Não.
11. Apresenta perda ou redução de apetite? 1. Sim. 2. Não.
12. Houve perda de peso atualmente? 1. Sim. 2. Não.
13. Apresenta inchaço em alguma parte do corpo? 1. Sim. 2. Não.
14. Tabagismo? 1. Sim. 2. Não.
15. Etilismo? 0. Não. 1. + dose. 2. ++. 3. +++. 4. +++. 5. Ex-etilista.
16. Apresentou algum distúrbio gastrointestinal recentemente? 1. Sim. 2. Não.

APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Aprovado Pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo

Caro voluntário, estarei desenvolvendo o projeto “Imunossenescência e macrófagos: avaliação da atividade microbicida em resposta a *Candida albicans*” que tem por objetivo analisar os mecanismos de defesa das células do sangue de idosos saudáveis frente ao fungo *Candida albicans*. Para isso, necessitaremos de amostras de sangue para o grupo alvo (acima de 60 anos de idade) e para o grupo controle (entre 18 e 50 anos de idade) de voluntários saudáveis. Os indivíduos que aceitarem participar da pesquisa responderão a um questionário, no qual serão registrados os dados sobre sua história médica. Este formulário ajudará a identificar voluntários saudáveis para a pesquisa. A coleta de sangue será realizada uma única vez pela farmacêutica, especialista em Análises Clínicas, Rafaela Alves da Silva Alavarce, no Centro Integrado de Pesquisa – CIP – da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. Os riscos e o desconforto da coleta de sangue são mínimos e de total responsabilidade da pesquisadora responsável pelo projeto. O indivíduo poderá sentir uma leve ardência durante a coleta e posteriormente pode ser que apareça um pequeno hematoma (coloração arroxeada) no local onde houve a entrada da agulha. A coleta de sangue é a mesma que se realiza em laboratório de análises clínicas, sendo muito segura. O material colhido e seus derivados serão descartados após o término da pesquisa. O voluntário tem o direito à indenização por danos decorrentes de sua participação na pesquisa. Este trabalho pretende melhorar o entendimento do comportamento das células do sistema imunológico do idoso, neste caso macrófagos, frente ao estímulo nocivo *Candida albicans*, podendo assim contribuir para o melhor tratamento das diferentes doenças associada a este microrganismo. Caso não queira participar da pesquisa, esclareço que o tratamento odontológico oferecido pela faculdade ocorrerá da mesma maneira, sem qualquer prejuízo.

Qualquer dúvida sobre sua participação na pesquisa, procurar a aluna/pesquisadora responsável **Taiane Priscila Gardizani**, no Departamento de Estomatologia, Disciplina de Patologia Bucal, da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB) – Universidade de São Paulo (USP), pelo telefone da Patologia (14) 3235-8251, telefone pessoal (19) 99651-6712 ou email: taigardizani@usp.br. Caso queira apresentar reclamações em relação a sua participação na pesquisa, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, da FOB – USP, pelo endereço Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75, Vila

Universitária, sala no pavimento superior do prédio da pós-graduação, no final do corredor, logo após os anfiteatros, na FOB/USP, pelo telefone (14) 3235-8356 ou email: cep@fob.usp.br.

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr. (a) _____, portador da cédula de identidade _____, após leitura minuciosa das informações constantes neste TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, devidamente explicada pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO concordando em participar da pesquisa proposta. Fica claro que o sujeito da pesquisa pode a qualquer momento retirar seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornar-se-ão confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica).

Por fim, como pesquisadora responsável pela pesquisa, comprometo-me a cumprir todas as exigências contidas no item IV.3 e IV.4 da resolução do CNS/MS n. 466 de dezembro de 2012, publicada em 13 de junho de 2013.

Por estarmos de acordo com o presente termo o firmamos em duas vias (uma via para o sujeito da pesquisa e outra para a pesquisadora) que serão rubricadas em todas as suas páginas e assinadas ao seu término.

Bauru, SP, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Sujeito à Pesquisa

Assinatura do Pesquisador Responsável
Taiane Priscila Gardizani

APÊNDICE C - Média $\pm$ desvio padrão (SD) da internalização de *C. albicans*, expressa em Unidade Arbitrária de Fluorescência (UAF), por monócitos de idosos e jovens nas proporções 5MON:1F (5 monócitos para 1 fungo), 1MON:1F e 1MON:5F, nos tempos de 30min, 2h e 5h.

TEMPO	PROPORÇÃO MON:F	MÉDIA $\pm$ SD da INTERNALIZAÇÃO (UAF)	
		IDOSO	JOVEM
30min	5:1	39 $\pm$ 37	11 $\pm$ 23
	1:1	137 $\pm$ 125*	18 $\pm$ 23*
	1:5	283 $\pm$ 237** ^c	130 $\pm$ 71** ^a
2h	5:1	34 $\pm$ 43	25 $\pm$ 27
	1:1	83 $\pm$ 90	42 $\pm$ 49
	1:5	324 $\pm$ 233***	193 $\pm$ 83*** ^b
5h	5:1	33 $\pm$ 45	32 $\pm$ 30
	1:1	93 $\pm$ 72	101 $\pm$ 117
	1:5	385 $\pm$ 202 ^c	471 $\pm$ 192 ^{a b}

Símbolos e letras iguais diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

APÊNDICE D - Média $\pm$ desvio padrão (SD) da internalização de *C. albicans*, expressa em Unidade Arbitrária de Fluorescência (UAF), por macrófagos de idosos e jovens nas proporções 5MAC:1F (5 macrófagos para 1 fungo), 1MAC:1F e 1MAC:5F, nos tempos de 30min, 2h e 5h.

TEMPO	PROPORÇÃO MAC:F	MÉDIA $\pm$ SD da INTERNALIZAÇÃO (UAF)	
		IDOSO	JOVEM
30min	5:1	52 $\pm$ 59	77 $\pm$ 65
	1:1	120 $\pm$ 54	227 $\pm$ 146
	1:5	537 $\pm$ 275 ^{a b}	549 $\pm$ 359 ^c
2h	5:1	44 $\pm$ 42	33 $\pm$ 33
	1:1	133 $\pm$ 89	141 $\pm$ 157
	1:5	404 $\pm$ 321* ^a	257 $\pm$ 132* ^{c d}
5h	5:1	38 $\pm$ 68	75 $\pm$ 87
	1:1	71 $\pm$ 68	144 $\pm$ 98
	1:5	402 $\pm$ 173** ^b	582 $\pm$ 241** ^d

Símbolos e letras iguais diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

APÊNDICE E - Média $\pm$ desvio padrão (SD) da produção intracelular de óxido nítrico (NO) por monócitos de idosos e jovens desafiados ou não (Meio) com *C. albicans*, expressa em Unidade Arbitrária de Fluorescência (UAF), nas proporções 5MON:1F (5 monócitos para 1 fungo), 1MON:1F e 1MON:5F, nos tempos de 30min, 2h e 5h.

TEMPO	PROPORÇÃO MON:F	MÉDIA $\pm$ SD da INTERNALIZAÇÃO (UAF)	
		IDOSO	JOVEM
30min	5:1	31 $\pm$ 49	137 $\pm$ 111
	1:1	124 $\pm$ 119	237 $\pm$ 217 ^c
	1:5	226 $\pm$ 165* ^b	464 $\pm$ 352* ^a
	MEIO	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
2h	5:1	115 $\pm$ 110	57 $\pm$ 70
	1:1	179 $\pm$ 129 ^c	138 $\pm$ 104
	1:5	356 $\pm$ 272 ^a	372 $\pm$ 309 ^a
	MEIO	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
5h	5:1	138 $\pm$ 165	243 $\pm$ 199 ^c
	1:1	529 $\pm$ 354 ^b	451 $\pm$ 251 ^b
	1:5	605 $\pm$ 321** ^b	425 $\pm$ 177 ** ^b
	MEIO	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0

Símbolos iguais diferem estatisticamente ($p < 0,05$). Cada letra representa diferença estatisticamente significativa, considerando o mesmo grupo e tempo de desafio ($p < 0,05$), quando comparada com: 5:1, 1:1 e Meio (**a**); 5:1 e Meio (**b**); com o Meio (**c**).

APÊNDICE F - Média $\pm$ desvio padrão (SD) da produção intracelular de óxido nítrico (NO) por macrófagos de idosos e jovens desafiados ou não (Meio) com *C. albicans*, expressa em Unidade Arbitrária de Fluorescência (UAF), nas proporções 5MAC:1F (5 macrófagos para 1 fungo), 1MAC:1F e 1 MAC:5F, nos tempos de 30min, 2h e 5h.

TEMPO	PROPORÇÃO MAC:F	MÉDIA $\pm$ SD da INTERNALIZAÇÃO (UAF)	
		IDOSO	JOVEM
30min	5:1	51 $\pm$ 44	11 $\pm$ 14
	1:1	107 $\pm$ 94	80 $\pm$ 151
	1:5	312 $\pm$ 157 ^a	247 $\pm$ 187 ^a
	MEIO	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
2h	5:1	83 $\pm$ 129	105 $\pm$ 114
	1:1	277 $\pm$ 236 ^b	343 $\pm$ 327 ^b
	1:5	337 $\pm$ 268 ^{*b}	554 $\pm$ 284 ^{*a}
	MEIO	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
5h	5:1	139 $\pm$ 173	118 $\pm$ 173
	1:1	598 $\pm$ 460 ^b	675 $\pm$ 525 ^b
	1:5	1000 $\pm$ 550 ^{**a}	480 $\pm$ 325 ^{**a}
	MEIO	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0

Símbolos iguais diferem estatisticamente ($p < 0,05$). Cada letra representa diferença estatisticamente significativa, considerando o mesmo grupo e tempo de desafio ($p < 0,05$), quando comparada com: 5:1, 1:1 e Meio (**a**); 5:1 e Meio (**b**).

APÊNDICE G - Média $\pm$ desvio padrão (SD) da produção intracelular de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por monócitos de idosos e jovens desafiados ou não (Meio) com *C. albicans*, expressa em Unidade Arbitrária de Fluorescência (U_{AF}), nas proporções 5MON:1F (5 monócitos para 1 fungo), 1MON:1F e 1MON:5F, nos tempos de 30min, 2h e 5h.

TEMPO	PROPORÇÃO MON:F	MÉDIA $\pm$ SD da INTERNALIZAÇÃO (U_{AF})	
		IDOSO	JOVEM
30min	5:1	143 $\pm$ 243 [*]	545 $\pm$ 253 ^{*c}
	1:1	80 $\pm$ 152 ^{**}	668 $\pm$ 345 ^{**c}
	1:5	112 $\pm$ 174 ^{***}	669 $\pm$ 356 ^{***c}
	MEIO	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
2h	5:1	225 $\pm$ 295	171 $\pm$ 218
	1:1	339 $\pm$ 238 ^c	169 $\pm$ 270
	1:5	340 $\pm$ 259 ^c	372 $\pm$ 522 ^c
	MEIO	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
5h	5:1	141 $\pm$ 237	237 $\pm$ 331
	1:1	310 $\pm$ 360 ^c	470 $\pm$ 259 ^c
	1:5	397 $\pm$ 222 ^b	354 $\pm$ 211 ^c
	MEIO	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0

Símbolos iguais diferem estatisticamente ($p < 0,05$). Cada letra representa diferença estatisticamente significativa, considerando o mesmo grupo e tempo de desafio ($p < 0,05$), quando comparada com: 5:1 e Meio (**b**); com o Meio (**c**).

APÊNDICE H - Média $\pm$ desvio padrão (SD) da produção intracelular de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por macrófagos de idosos e jovens desafiados ou não (Meio) com *C. albicans*, expressa em Unidade Arbitrária de Fluorescência (UAF), nas proporções 5MAC:1F (5 macrófagos para 1 fungo), 1MAC:1F e 1MAC:5F, nos tempos de 30min, 2h e 5h.

TEMPO	PROPORÇÃO MAC:F	MÉDIA $\pm$ SD da INTERNALIZAÇÃO (UAF)	
		IDOSO	JOVEM
30min	5:1	51 $\pm$ 61 [*]	269 $\pm$ 234 [*]
	1:1	23 $\pm$ 36 ^{**}	468 $\pm$ 568 ^{** c}
	1:5	116 $\pm$ 170 ^{***}	681 $\pm$ 637 ^{*** b}
	MEIO	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0 ^e
2h	5:1	82 $\pm$ 80	80 $\pm$ 76
	1:1	101 $\pm$ 75	272 $\pm$ 263
	1:5	519 $\pm$ 320 ^a	417 $\pm$ 239 ^b
	MEIO	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
5h	5:1	268 $\pm$ 174 ^c	358 $\pm$ 264 ^c
	1:1	514 $\pm$ 213 ^b	439 $\pm$ 133 ^c
	1:5	693 $\pm$ 22 ^{**** a}	463 $\pm$ 313 ^{**** c}
	MEIO	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0

Símbolos iguais diferem estatisticamente ($p < 0,05$). Cada letra representa diferença estatisticamente significativa, considerando o mesmo grupo e tempo de desafio ($p < 0,05$), quando comparada com: 5:1, 1:1 e Meio (**a**); 5:1 e Meio (**b**); com o Meio (**c**).

APÊNDICE I - Média do percentual $\pm$ desvio padrão (SD) do crescimento fúngico extracelular na ausência (apenas *C. albicans* - *Ca*) ou presença de monócitos (MON) e macrófagos (MAC) derivados de idosos após 1h 30min e 4h 30min de desafio nas diferentes proporções CEL:F (5:1, 1:1 e 1:5), expressa em Unidade Arbitrária de Fluorescência (U_{AF}).

TEMPO	PROPORÇÃO CEL:F	MÉDIA (%) $\pm$ SD da INTERNALIZAÇÃO			
		<i>Ca</i>	MON+ <i>Ca</i>	<i>Ca</i>	MAC+ <i>Ca</i>
1h 30min	5:1	89 $\pm$ 106	0 $\pm$ 0	51 $\pm$ 73	0 $\pm$ 0
	1:1	51 $\pm$ 64	37 $\pm$ 62	20 $\pm$ 62	13 $\pm$ 44
	1:5	13 $\pm$ 38	15 $\pm$ 42	24 $\pm$ 55	0 $\pm$ 0
4h 30min	5:1	587 $\pm$ 645 [*]	281 $\pm$ 491 [*]	327 $\pm$ 299 ^{**}	57 $\pm$ 131 ^{**}
	1:1	200 $\pm$ 302	184 $\pm$ 252	267 $\pm$ 237 ^{***}	118 $\pm$ 143 ^{***}
	1:5	29 $\pm$ 77	37 $\pm$ 78	27 $\pm$ 56	23 $\pm$ 50

Símbolos iguais diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

APÊNDICE J - Média $\pm$ desvio padrão (SD) do crescimento fúngico extracelular na ausência (apenas *C. albicans* - *Ca*) ou presença de monócitos (MON) e macrófagos (MAC) derivados de idosos após 1h 30min e 4h 30min de desafio nas diferentes proporções CEL:F (5:1, 1:1 e 1:5), expressa em Unidade Arbitrária de Fluorescência ($_{UAF}$).

TEMPO	PROPORÇÃO CEL:F	MÉDIA $\pm$ SD da INTERNALIZAÇÃO			
		<i>Ca</i>	MON+ <i>Ca</i>	<i>Ca</i>	MAC+ <i>Ca</i>
30min	5:1	912 $\pm$ 849	1005 $\pm$ 1010	1770 $\pm$ 1660	1967 $\pm$ 1572
	1:1	7541 $\pm$ 6879	6720 $\pm$ 6073	7483 $\pm$ 4861	8176 $\pm$ 4902
	1:5	20108 $\pm$ 8982	22372 $\pm$ 10048	23308 $\pm$ 8760	23657 $\pm$ 8786
2h	5:1	1529 $\pm$ 1071	680 $\pm$ 501	2229 $\pm$ 1705	1554 $\pm$ 1368
	1:1	8210 $\pm$ 5424	7072 $\pm$ 4823	8323 $\pm$ 3890	7048 $\pm$ 8323
	1:5	23136 $\pm$ 6252	22281 $\pm$ 6746	23261 $\pm$ 6372	23122 $\pm$ 9352
5h	5:1	4055 $\pm$ 2020	1716 $\pm$ 1517	3799 $\pm$ 2320	941 $\pm$ 748
	1:1	13057 $\pm$ 3602	12096 $\pm$ 7905	14703 $\pm$ 4222	7664 $\pm$ 4626
	1:5	21173 $\pm$ 9558	24790 $\pm$ 5937	25461 $\pm$ 4779	25407 $\pm$ 6569

APÊNDICE K - Média do percentual $\pm$ desvio padrão (SD) do crescimento fúngico extracelular na ausência (apenas *C. albicans* - *Ca*) ou presença de monócitos (MON) e macrófagos (MAC) provenientes de jovens após 1h 30min e 4h 30min de desafio nas diferentes proporções CEL:F (5:1, 1:1 e 1:5), expressa em Unidade Arbitrária de Fluorescência ($_{UAF}$).

TEMPO	PROPORÇÃO CEL:F	MÉDIA (%) $\pm$ SD da INTERNALIZAÇÃO			
		<i>Ca</i>	MON+ <i>Ca</i>	<i>Ca</i>	MAC+ <i>Ca</i>
1h 30min	5:1	104 $\pm$ 104	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
	1:1	136 $\pm$ 93	16 $\pm$ 34	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
	1:5	32 $\pm$ 66	30 $\pm$ 60	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
4h 30min	5:1	794 $\pm$ 855 [¶]	205 $\pm$ 325 [¶]	64 $\pm$ 109	0 $\pm$ 0
	1:1	662 $\pm$ 559	605 $\pm$ 733	82 $\pm$ 113	50 $\pm$ 135
	1:5	66 $\pm$ 89	131 $\pm$ 175	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0

Símbolos iguais diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

APÊNDICE L - Média $\pm$ desvio padrão (SD) do crescimento fúngico extracelular na ausência (apenas *C. albicans* - *Ca*) ou presença de monócitos (MON) e macrófagos (MAC) provenientes de jovens após 1h 30min e 4h 30min de desafio nas diferentes proporções CEL:F (5:1, 1:1 e 1:5), expressa em Unidade Arbitrária de Fluorescência ($_{UAF}$).

TEMPO	PROPORÇÃO CEL:F	MÉDIA $\pm$ SD da INTERNALIZAÇÃO			
		<i>Ca</i>	MON+ <i>Ca</i>	<i>Ca</i>	MAC+ <i>Ca</i>
30min	5:1	471 $\pm$ 289	460 $\pm$ 307	2210 $\pm$ 1673	2263 $\pm$ 1647
	1:1	2781 $\pm$ 1868	2912 $\pm$ 1849	8065 $\pm$ 5334	9269 $\pm$ 6175
	1:5	18270 $\pm$ 3969	20038 $\pm$ 5231	23208 $\pm$ 7377	25469 $\pm$ 8395
2h	5:1	1454 $\pm$ 2130	415 $\pm$ 296	1435 $\pm$ 1297	673 $\pm$ 378
	1:1	8819 $\pm$ 7862	3867 $\pm$ 2428	6893 $\pm$ 4345	6167 $\pm$ 4063
	1:5	22781 $\pm$ 4828	24683 $\pm$ 7323	24182 $\pm$ 5622	24267 $\pm$ 8197
5h	5:1	3462 $\pm$ 2046	1774 $\pm$ 1700	2994 $\pm$ 1312	880 $\pm$ 722
	1:1	15997 $\pm$ 5657	17312 $\pm$ 8497	14240 $\pm$ 1635	9944 $\pm$ 2670
	1:5	23639 $\pm$ 5112	30514 $\pm$ 4751	23625 $\pm$ 6474	25821 $\pm$ 6373