

Avaliação do efeito protetor de Frutose-1,6-bisfosfato na sepse induzida por *Candida* sp. em camundongos

Gabriela Acevedo Ferreira¹, Roberto Christ Vianna Santos^{1,2,3}, Rafael Noal Moresco⁴, Miguel Angel Peña Rico³, Jose Luis Rosa³, Ramon Bartrons³, Francesc Ventura Pujol³, Débora Nunes Mário⁵, Sydney Hartz Alves⁵, Etiane Tatsch⁴, Helena Kober⁴, Ricardo Obalski de Mello², Jarbas Rodrigues de Oliveira¹ (orientador)

¹Laboratório de Biofísica e Inflamação, PUCRS, ² Laboratório de Microbiologia Clínica, UNIFRA, ³ Unitat Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de Barcelona, ⁴ Laboratório de Bioquímica Clínica, UFSM, ⁵ Laboratório de Pesquisas Micológicas, UFSM.

Introdução

A ampla utilização de terapia antifúngica profilática e empírica, especialmente com derivados azólicos, como o Fluconazol, seleciona cepas de *Candida* sp. com elevados perfis de resistência, influenciando diretamente na mortalidade de pacientes com candidemia (Messer, 1996). *Candida* sp. corresponde a 70-90% de todas as micoses invasivas, representando a causa mais comum de infecções fúngicas deste tipo (Lamagni, 2001). O termo sepse é definido como síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS), decorrente de infecção por microrganismos. Define-se um quadro de SRIS, quando o paciente manifesta duas ou mais das seguintes condições: hipertermia ou hipotermia, taquicardia, taquipnéia e contagem de leucócitos totais sangüíneos maiores que 12.000/mm³ ou menor que 4.000/mm³ ou com mais de 10% de formas imaturas (Dinarello, 1997). O quadro sistêmico caracteriza-se pela presença de citocinas pró-inflamatórias na circulação e ativação das células circulantes, podendo, também, haver a presença do microrganismo.

A Frutose-1,6-bisfosfato (FBP) é um intermediário de alta energia da glicólise e tem sido estudado por sua capacidade de proteger o tecido isquêmico ou hipóxica e facilitar a recuperação de tecidos (Marangos, 1998). Em alguns estudos de nosso grupo (Lopes, 2006; Nunes, 2002), demonstramos que FBP reduziu o volume de exsudato, concentração de proteínas, neutrófilos totais, e suprimiu a proliferação de células T na cavidade pleural em um modelo de inflamação em ratos (Lopes, 2006). A FBP também inibe a proliferação celular e, assim, reduz os níveis do fator de necrose tumoral, através do receptor de bloqueio dos canais

de potássio, agindo como um poderoso agente imunomodulador (Nunes, 2004). Em outro modelo de inflamação, a FBP (500mg/kg) atenuou o volume de exsudato, leucócitos totais e o número de leucócitos polimorfonucleares (Alves Filho, 2004). Em um modelo de sepse bacteriana a FBP reduziu a taxa de mortalidade causada por *Escherichia coli* e melhorou alterações hematológicas e histológicas (Nunes, 2003; Nunes, 2002). Assim, o objetivo deste estudo é determinar o papel da FBP na modulação da inflamação, em sepse experimental induzida por *Candida albicans*, a expressão gênica da COX-2, IL-6 e NF-Kappa B e a produção de NOx e expressão de iNOS em macrófagos.

Metodologia

Foram utilizados camundongos machos da linhagem CF1, macrófagos RAW 264,7 e macrófagos alveolares.

O modelo de sepse intratraqueal foi realizado em camundongos, usando cepas de *C. albicans* resistentes e sensíveis ao fluconazol. Para o tratamento foi utilizado FBP (500mg/Kg). Cinco a seis animais de cada grupo foram mortos em 24 horas, 5 dias, e 10 dias após a indução da sepse. O sangue foi levado para avaliação do perfil hematológico completo e dosagem de citocinas (IL-6 e MCP-1). Nos outros camundongos foi observada a mortalidade. A fim de determinar o possível mecanismo anti-inflamatório da FBP, uma série de transfecções em macrófagos RAW usando promotores de COX-2, IL-6 e NF-Kappa B foram conduzidos. A produção de Nox por macrófagos e a expressão da iNOS em RAW foi determinada.

Resultados e Discussão

A mortalidade diminuiu significativamente nos grupos com *C. albicans* sensíveis ao fluconazol tratados com FBP. As citocinas e os índices hematológicos do grupo que recebeu FBP foram semelhantes aos do grupo séptico, com exceção da contagem das plaquetas, mostrando que a FBP preveniu significativamente a diminuição das plaquetas. A FBP não parece agir na transcrição de COX-2, IL-6 e NF-Kappa B, mas reduz os níveis de NOx no lavado broncoalveolar através da inibição da expressão do iNOS.

Conclusão

A FBP reduz a mortalidade dos animais com *C. albicans* sensível ao fluconazol, prevenindo a diminuição do número de plaquetas. Também diminui o nível de NOx pela inibição de iNOS.

Referências

ALLEENDOERFER, R., MAGEE, D. M., SMITH, J. G., BONEWALD, L., GRAYBILL, J. R., Induction of tumor necrosis factor-alpha in murine *Candida albicans* infection. **J. Infect. Dis.** (1993), pp.1167 - 1168.

DINARELLO, C.A., Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. **Chest.** Vol. 112, (1997), pp. 321-329.

LAMAGNI, T.L., EVANS, B.G., SHIGEMATSU, M., JOHNSON, E.M., Emerging trends in the epidemiology of invasive mycosis in England and Wales (1990-9). **Epidemiol Infect.** Vol. 126, (2001), pp. 397 - 414.

MESSER, J., EYER, D., LIONEL, D., GALLATI, H., MATIS, J., SIMEONE, U., Evaluation of interleukin-6 soluble receptor of tumor necrosis factor for early diagnosis of neonatal infection. **J Pediatr.** Vol. 129, (1996), pp. 574 - 580.

NUNES, F.B., PIRES, M.G.S., ALVES-FILHO, J.C.F., . Physiopathological studies in septic rats and the use of fructose-1,6-bisphosphate as cellular protection. **Crit Care Med.** Vol. 30. (2002), pp. 2069-2074.

NUNES, F.B., ALVES-FILHO, J.C., BASTOS, C.M.A., Effect of the chlorpropamide and fructose-1,6-bisphosphate of soluble TNF receptor II levels. **Pharmacol Res.** Vol. 49, (2004), pp. 449 - 453.

NUNES, F.B., GRAZIOTTIN, C.M., ALVES-FILHO, J.C., An assessment of fructose-1,6-bisphosphate as an antimicrobial and anti-inflammatory agent in sepsis. **Pharmacol Res.** Vol. 47 (2003), pp. 34 - 35.

WALLEY, K.R., LUKACS, N.W., STANDIFORD, T.J., STRIETER, R.M., KUNKEL, S.L., Balanced of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. **Infect Immun.** Vol. 64, (1996), pp. 4733 - 4738.

WOLKOW, P.P., Involvement and dual effects of nitric oxide in septic shock. **Inflamm Res.** Vol. 47, (1998), pp. 152 - 166.