

# **Efeito do tratamento com ivermectina em camundongos utilizados para infecção experimental com *Candida albicans***

## **Effect of treatment with ivermectin in mice used for experimental infection with *Candida albicans***

*Ivete Conchon Costa<sup>1</sup>, Ana Carolina Andrade<sup>1</sup>, Wagner Loyola<sup>1</sup>, Eliana De Vito<sup>1</sup>, Jean Alcantara Freitas<sup>1</sup>, Luis Carlos Jabur Gaziri<sup>2</sup>, Ionice Felipe<sup>1</sup>*

---

### **Resumo**

A ivermectina é amplamente utilizada no controle de vermes, assim como, parasitos de pele; interfere na transmissão de impulsos nervosos de parasitas, causando a sua paralisia e morte. Neste trabalho, investigamos o efeito do tratamento com ivermectina sobre as atividades de fagócitos. Foram utilizados camundongos swiss machos, com 30 dias, tratados 2 vezes com ivermectina 1% diluída 1: 20 com um intervalo de uma semana. Um grupo de animais foi infectado com *Candida albicans* depois de uma semana e o outro após 15 dias e sacrificados após 1/2, 2, 6, 24 e 72h. As células do exudato peritoneal foram coletadas e 0,2 ml adicionadas em lâminulas de vidro e incubadas por 30 minutos a 37°C. Após, foram fixadas em metanol e coradas por May-Grunwald-Giemsa, sendo analisadas em microscópio óptico, contando-se 10 campos em imersão. Avaliou-se o número de células fagocíticas e a porcentagem de células fagocitando. A população de macrófagos e neutrófilos, assim como, a porcentagem de células fagocitantes foi superior quando a infecção foi feita uma semana após dois tratamentos com ivermectina comparado com aqueles que aguardaram 15 dias após estes procedimentos. Os resultados sugerem que a ivermectina agiu alterando a resposta imune.

**Palavras-chave:** ivermectina, fagocitose, *Candida albicans*, resposta imunológica

---

<sup>1</sup> Departamento de Ciências Patológicas/CCB/UEL/Londrina-PR.

<sup>2</sup> Departamento de Ciências Fisiológicas/CCB/UEL/Londrina-PR.

## Abstract

Ivermectin is widely used on control of worm, as well as, parasite of skin; and interfere in the transmission of nerve impulse of parasites, causing its paralysis and death. In this work, we investigate the effect of treatment with ivermectin on the activities of phagocytes. Swiss male with 30 days old were used, which received twice ivermectin 1% diluted 1:20, with 1 week of pause between the treatments. One group of animals was infected after 1 week and the second group, 15 days after ivermectin and sacrificed after 1/2, 2, 6, 24, and 72 hours. The peritoneal exudate cells were collected and 0, 2 ml added on coverslips for adherence at 37°C for 30 min. The cells were fixed in methanol, stained in May-Grumwald-Giemsa and analysed on optic microscope, by counting 10 fields. It was analysed the number of phagocytic cells and percentage of phagocytosing cells. The population of macrophages and neutrophils, as well as, the percentage of phagocytosing cells was higher in animals que received ivermectin one week before infection compared to animals with pause of two weeks after ivermectin. These results suggest that ivermectin acted directly increasing the immune response.

**Key words:** ivermectin, phagocytose, *Candida albicans*, immune response

---

## INTRODUÇÃO

*C. albicans* comumente vive em balanço com outros membros da microbiota normal de indivíduos saudáveis. Vários tipos de imunossupressão, provocadas por infecções por HIV ou terapia imunossupressiva em transplantados, ou ainda o uso de quimioterápicos em pacientes com câncer, podem predispor as manifestações de fatores de virulência por este patógeno iniciando uma candidíase local ou sistêmica <sup>(1-3)</sup>.

O primeiro mecanismo de resistência a candidíase do hospedeiro está centrado na imunidade celular, e as células fagocíticas constituem a primeira linha de defesa. Macrófagos ativados ingerem e matam blastoconídios, secretando espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, enquanto os neutrófilos atacam as pseudo-hifas pela liberação de enzimas hidrolíticas, produção de HClO, NH<sub>2</sub>Cl e proteínas tóxicas <sup>(4-7)</sup>. Préviamente demonstrou-se que concanavalina-A (Con-A) induz maior

expressão de receptores de manose e receptores para c3b e ic3b em macrófagos peritoneais com conseqüente aumento da atividade fagocítica e candidacida <sup>(8-10)</sup> para o isolado 577. Os animais pré-tratados com Con-A superaram uma infecção com inóculo letal de *C. albicans*, enquanto 80% dos animais tratados com PBS morreram <sup>(9,10)</sup>.

Para o estudo de infecção com *C. albicans*, os camundongos devem ser livres de vermes, desde que a presença deles interfere com a resposta imunológica. A ivermectina vem sendo utilizada como droga de escolha na oncocercose desde 1987, e no controle contra nematóides gastrointestinais e pulmonares, assim como parasitos externos; tem como característica principal interferir na transmissão de impulsos nervosos de parasitas, causando a sua paralisia e morte <sup>(11)</sup>. Neste trabalho, investigamos: o efeito do tratamento com ivermectina sobre a eliminação de vermes e o período de espera necessário após tratamento com ivermectina para que a resposta imunológica retorne aos padrões basais e não haja interferência no estudo da infecção por *C. albicans*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### **Cultivo de *Candida albicans***

A amostra de *C. albicans* (CR15), isolada de paciente com infecção oral, HIV+, internado no (Hospital Universitário Regional Norte do Paraná) foi mantida em ágar Sabouraud dextrose. Para os experimentos, alçadas do estoque foram transferidas para o Caldo Sabouraud e incubadas a 28°C. As células obtidas após 48 horas de crescimento foram lavadas três vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS), com pH 7,0 e inoculadas nos animais 10<sup>7</sup>/ml.

### **Tratamento dos animais**

Foram utilizados (4 grupos) de camundongos Swiss machos com 30 dias. Estes animais foram pulverizados duas vezes com ivermectina 1% (Supramec, Indústria Química e Farmacêutica Schering-Plough Veterinária, Rio de Janeiro) diluída 1: 20 com intervalo nos tratamentos de uma semana. Para verificar o efeito do tratamento com ivermectina as células fagocíticas de dois grupos de animais foram analisadas após 1 semana e outro após 2 semanas de tratamento. Estes dois grupos não tiveram infecção com *C. albicans*. Um terceiro grupo de animais foi infectado com *C. albicans* depois de 1 semana, e o quarto grupo 15 dias pós tratamento com ivermectina. Os camundongos foram mantidos com água, ração, e sepilho autoclavados, e as gaiolas foram lavadas a cada troca do sepilho (3 vezes por semana).

Após 15 dias do tratamento com ivermectina analisamos, pelos métodos de Hoffman e de Faust e cols., a presença de vermes nas fezes desses animais.

### **Ensaio fagocítico ex-vivo**

Após os tratamentos com ivermectina, os animais foram infectados com  $10^7$  de *C. albicans* (CR15) e sacrificados após 1/2, 2, 6, 24 e 72 h. As células do exudato peritoneal foram obtidas pela lavagem com meio RPMI contendo 1% de albumina. Foram incubadas em lamínulas de vidro por 30 minutos a 37°C em placa de cultura de células. As células foram coradas por May-Grunwald-Giemsa e analisadas em microscópio óptico, contando-se 10 campos em imersão por lamínula. Avaliou-se o número médio e erro padrão de células fagocíticas e a porcentagem de células fagocitando a partir de 4 experimentos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tratamento com ivermectina por 2 vezes foi satisfatório na eliminação de vermes. Entretanto, observamos que após 7 dias de tratamento com ivermectina os animais, sem infecção com *C. albicans*, mostraram macrófagos grandes e espriados, com aspecto similar aos fagócitos ativados com concanavalina-A. Analisamos então, as células fagocíticas após 7 e 15 dias de tratamento com ivermectina e como podemos observar na Tabela 1, a porcentagem de macrófagos grandes é muito alta, em torno de 36,6% que foi reduzido para 5,6% entre 7 e 15 dias respectivamente. Com relação aos neutrófilos, não houve diferença entre os 2 grupos estudados, sendo de baixa frequência indicando ausência de infecção (Tabela 1).

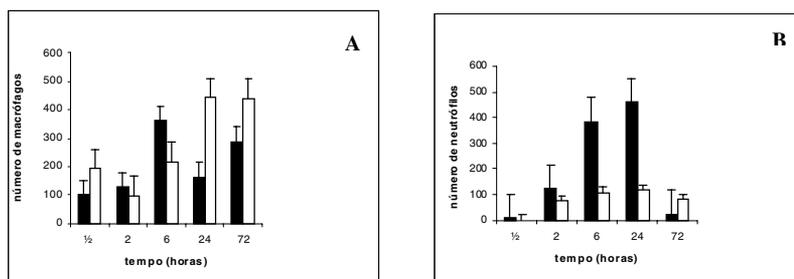
**Tabela 1.** Populações de células fagocíticas peritoneais após tratamento com ivermectina

Tratamento	% de células fagocíticas		
	Macrófagos pequenos	Macrófagos grandes	Neutrófilos
7	61,93 ± 20,24	36,61 ± 20,33	1,46 ± 0,44
15	94,13 ± 2,83	5,64 ± 2,84	0,23 ± 0,32

Camundongos machos Swiss foram tratados 2 vezes com ivermectina diluída 1:20 e com intervalo de 1 semana. Após 7 e 15 dias, foram avaliadas as populações de células fagocíticas na cavidade peritoneal. Os resultados correspondem à média e erro padrão de 4 experimentos.

A Figura 1 A mostra que o número de macrófagos aumentou com o decorrer da infecção com *C. albicans* nos animais com ivermectina 15 dias antes da infecção. Este perfil foi reproduzido em muitos experimentos e apresentados em encontros científicos <sup>(12,13)</sup>. O tratamento com ivermectina uma

única vez e a espera de 15 dias para uso dos animais mostrou resultados similares (dados não mostrados). Em adição, o número de macrófagos em animais que receberam ivermectina e foram infectados 7 dias depois com *C. albicans* apresentaram uma grande flutuação de macrófagos durante a infecção, sendo que este fato está sendo estudado. A população máxima de neutrófilos foi observada após 24 h de infecção nos animais infectados 1 semana após tratamento com ivermectina (Figura 1B).

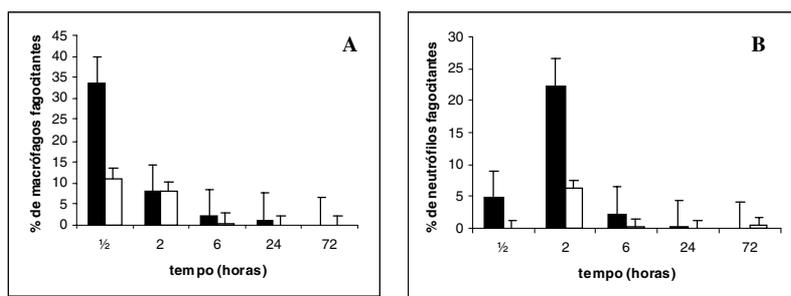


**Figura 1.** População de células fagocíticas pós-infecção com *Candida albicans*.

As células fagocíticas peritoneais (A) macrófagos e (B) neutrófilos foram avaliadas entre 1/2 e 72 h de infecção com *C. albicans* 10<sup>7</sup>/ml. Coluna fechada após 7 dias e coluna aberta após 15 dias de ivermectina.

Na infecção com *C. albicans*, após 1 semana ao tratamento com ivermectina a fagocitose aos 30 minutos por macrófagos foi superior quando comparado aos fagócitos de animais que aguardaram 15 dias para serem infectados (Figura 2A). Este dado está de acordo com os resultados apresentados na Tabela 1, após uma semana de tratamento com ivermectina 36,6% dos macrófagos eram grandes e, portanto, com maior potencial para fagocitar. Investigações de nosso laboratório mostram que a concanavalina-A induz ativação de macrófagos por aumento de expressão de receptores de manose e

consequentemente maior fagocitose <sup>(9,13)</sup>. Em contraste após passar o efeito da ivermectina os macrófagos tornaram-se pequenos e com baixo potencial para fagocitar<sup>(12)</sup>. Com relação aos neutrófilos verificou-se uma alta taxa de fagocitose 2 h pós-infecção que foi também superior depois de uma semana do tratamento com ivermectina com relação aos animais tratados com ivermectina e que aguardaram 15 para infecção (Figura 2B).



**Figura 2.** Potencial de fagocitose para *C. albicans* após tratamento com ivermectina

A porcentagem de fagócitos (A) macrófagos e (B) neutrófilos com pelo menos 1 *Candida* interiorizada foram analisadas; coluna fechada após 7 dias e coluna aberta, após 15 dias de ivermectina.

O efeito de ivermectina na melhora da resposta imunológica foi descrito anteriormente e verificou-se que a produção de anticorpos contra hemácias de carneiro, uma resposta dependente de macrófagos e linfócitos T foi aumentada pelo tratamento com ivermectina<sup>(14)</sup>. Pacientes com oncodermatites e que receberam tratamento com ivermectina tiveram um significativo aumento na resposta imune celular (proliferação celular) e foi sugerido que o grau de efeito dermatológico está relacionado com a resposta imune do hospedeiro contra microfilaria e que a ivermectina aumenta

tal resposta <sup>(15)</sup>. Nossos resultados estão de acordo com os dados da literatura e sugerimos que para estudo de ação de fagócitos a um determinado patógeno, deve-se aguardar 15 dias pós-tratamento com ivermectina para que restaure os padrões basais de resposta imune.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jarvis WR. 1995. Epidemiology of nosocomial fungal infection, with emphasis on *Candida* species. *Clin. Infect. Dis.*, 20: 1526-1530.
2. Senet JM. 1997. Risk factors and physiopathology of candidiasis. *Rev. Iberoam. Micol.*, 14: 6-13.
3. Wingard JR. 1994. Infections due to resistant *Candida* species in patients with who are receiving chemotherapy. *Clin. Infect. Dis.*, 19: S49-S53.
4. Rolides E, Holmes A, Blake C, Pizzo PA, Walsh TJ. 1995. Effects of granulocyte Colony-stimulating factor and interferon- $\gamma$  on antifungal activity of human polymorphonuclear neutrophils against pseudohyphae of different medically important *Candida* species. *J. Leukoc. Biol.*, 57:651-656.
5. Vasquez-Torres A, Balish E. 1997. Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiol Mol. Biol. Rev.*, 61: 170-192.
6. D Ostiani CF, Del Sero C, Bacci A, Montagnoli C, Spreca A, Mencacci A, Ricciardi-Castagnoli P, Romani L. 2000. Dendritic cells discriminate between yeast and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.*, 191: 1661-1674.
7. Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM. 2003. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J. Exp. Med.*, 197: 1107-1117.
8. Gaziri G, Gaziri LCJ, Kikuchi R, Scanavacca J, Felipe I. 1999. phagocytosis of *Candida albicans* by concanavalin-A activated peritoneal macrophages. *Med. Micol.*, 37: 195-200.

9. MorescoTR, Gaziri LCJ, YasumotoY, Felipe I. 2002. Phagocytic and candidacidal activities of macrophages from suckling and adult mice pretreated with concanavalin-A. 2002. *Med, Micol.*, 40 : 393-397.
10. Loyola W, Gaziri DA, Gaziri LCJ, Felipe I. 2002. Concanavalin-A enhances phagocytosis and killing of *Candida albicans* by mice peritoneal neutrophils and macrophages. *FEMS Immunol. Méd. Microbiol.*, 33: 201-208.
11. Da Silva LHP. 2003. Desafios científicos e ambiguidades administrativa. *Ciência e Cultura* 55: 1.
12. Andrade AC, Freitas JA, Conchon-Costa I, Gaziri LCJ, Felipe I. 2005. Alteração da fagocitose pela ivermectina. V Encontro anual de iniciação Científica. Guarapuava. PR, VI p32.
13. Felipe I, Conchon-Costa I, Loyola W, Gaziri LCJ, Felipe I. 2006. Low dose of concanavalin-A enhances innate immune response and prevents liver injury in mice infected with *Candida albicans*. *Toll: Recent advances in pattern recognition*. Salvador, Ba. Soc. Bras. Immunol. P37
14. Blakley BR, Rousseaux CG. 1991. Effect of ivermectin on the immune response in mice. *Am. J. Vet Res.*, 52:593-595.
15. Ali M M, Baraka, OZ, AbdelRahman SI et al., 2003. immune response directed against microfilariae correlate with severity of clinical onchodermatitis and treatment history. *J. Infect. Dis.*, 187: 714-717.