

**UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP**

**Jéssica Feliciano Codeceira**

**Extrato de *Malassezia pachydermatis* modula a atividade de  
macrófagos infectados com *Encephalitozoon cuniculi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Orientadora: **Profa. Dra. Maria Anete Lallo**

**SÃO PAULO**

**2017**

**Extrato de *Malassezia pachydermatis* modula a atividade de  
macrófagos infectados com *Encephalitozoon cuniculi***

Jéssica Feliciano Codeceira<sup>1</sup>, Anuska Marcelino Alvares-Saraiva<sup>1</sup>, Fabiana Toshie de Camargo Konno<sup>1</sup>, Elizabeth Cristina Perez Hurtado<sup>1</sup>, Diva Denelle Spadacci-Morena<sup>2</sup>, Selene Dall'Acqua Coutinho<sup>1</sup>, Maria Anete Lallo<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental, Universidade Paulista (UNIP), São Paulo, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Fisiopatologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

## Resumo

*Malassezia* (*M.*) sp. é um gênero amplo de fungos que faz parte da microbiota da pele em muitos animais, incluindo o homem. Estudos têm demonstrado que *Malassezia* são capazes de modular a produção de citocinas pro e anti-inflamatória por queratinócitos e monócitos humanos. *Encephalitozoon* (*E.*) *cuniculi*, são fungos intracelulares obrigatórios que determinam doenças emergentes em humanos e outros animais, com relevância econômica. Frente a essa capacidade imunomoduladora, foi objetivo deste estudo avaliar a atividade do extrato de *M. pachydermatis* na resposta de macrófagos frente à infecção pelo *E. cuniculi*. Para tanto, uma suspensão de *M. pachydermatis* foi submetida à fervura por 30 minutos, filtrada e utilizada como extrato para estimular macrófagos da linhagem Raw 264.7. Posteriormente, os macrófagos foram infectados com esporos de *E. cuniculi* (2:1) e avaliados aos 15, 30, 60 minutos e 48 horas. Foi dosado nas culturas de macrófagos a quantidade de peróxido de hidrogênio. O sobrenadante foi submetido à análise de óxido nítrico. Com a coloração de Calcoflúor foi realizada a contagem de esporos de *E. cuniculi* fagocitados e determinados o índice fagocítico (IF) e capacidade fagocítica (CF). Foi avaliada a atividade microbica e fagocítica pela microscopia eletrônica de transmissão (MET). Os macrófagos não tratados tiveram CF, IF e quantidades de esporos fagocitados maiores que os tratados, porém pela MET observou-se que nos macrófagos tratados a atividade microbica foi mais rápida, já que nos vacúolos fagocíticos havia poucos esporos em diferentes graus de degeneração e pouca quantidade de material amorfo. Os macrófagos tratados tiveram maior produção de peróxido de hidrogênio e apresentaram aumento na secreção das citocinas, excetuando-se o TNF- $\alpha$  que teve diminuição em 15 minutos. Em conjunto, esses resultados demonstraram que o tratamento com o extrato de *M. pachydermatis* foi capaz de aumentar a atividade microbica e fagocítica de macrófagos infectados com *E. cuniculi*.

**Palavras-Chave:** *Encephalitozoon cuniculi*, extrato de *Malassezia*, macrófagos, fagocitose, citocinas.

## Abstract

*Malassezia* (*M.*) sp. is a broad genus of fungi that is part of the skin's microbiota in many animals, including man. Studies have shown that *Malassezia* are able to modulate the production of pro and anti-inflammatory cytokines by keratinocytes and human monocytes. *Encephalitozoon* (*E.*) *cuniculi*, are obligate intracellular fungi that determine emerging diseases in humans and other animals, with economic relevance. Faced with this immunomodulatory capacity, the objective of this study was to evaluate the activity of *M. pachydermatis* extract in the response of macrophages to infection by *E. cuniculi*. To this end, a suspension of *M. pachydermatis* was boiled for 30 minutes, filtered and used as an extract to stimulate macrophage of the Raw 264.7 lineage. Subsequently, macrophages were infected with spores of *E. cuniculi* (2: 1) and evaluated at 15, 30, 60 minutes and 48 hours. The amount of hydrogen peroxide was measured in macrophages cultures. The supernatant was subjected to nitric oxide analysis. Calcofluor was stained with phagocytic *E. cuniculi* spores and the phagocytic index (IF) and phagocytic capacity (CF) were determined. Microbicidal and phagocytic activity was evaluated by transmission electron microscopy (MET). The untreated macrophages had CF, IF, and larger amounts of phagocytosed spores than those treated, but by MET it was observed that in macrophages treated the microbicidal activity was faster, since in the phagocytic vacuoles there were few spores in different degrees of degeneration and few amount of amorphous material. The treated macrophages had higher production of hydrogen peroxide and increased cytokine secretion, with the exception of TNF- $\alpha$ , which decreased in 15 minutes. Taken together, these results demonstrated that treatment with the extract of *M. pachydermatis* was able to increase the microbicidal and phagocytic activity of macrophages infected with *E. cuniculi*.

**Keywords:** *Encephalitozoon cuniculi*, *Malassezia* extract, macrophages, phagocytosis, cytokines.

## Introdução

Os microsporídios compõem um grupo amplo de fungos pertencentes ao Filo Microsporidia [1]. Esses seres unicelulares possuem desenvolvimento intracelular obrigatório. Existem atualmente mais de 1200 espécies classificadas e distribuídas em mais de 140 gêneros [2,3], sendo descritos em hospedeiros invertebrados e vertebrados [4].

Segundo Stentiford *et al.* [5], os microsporídios são considerados agentes infecciosos de doença emergente que acometem hospedeiros dos principais biomas do mundo, desde terrestres à aquáticos, atingindo assim setores de produção de alimentos, dos quais são consumidos também por seres humanos. O hospedeiro após contrair a doença, que na maioria das vezes se origina no epitélio intestinal ou respiratório, pode se disseminar para outras partes do corpo, *E. cuniculi* demonstrou causar ceratoconjutivite, sendo também capaz de infectar outros órgãos. Essa disseminação pode ocorrer devido a capacidade do patógeno de infectar macrófagos [6]. Macrófagos infectados por microsporídios, muitas vezes, ao invés de eliminar o patógeno, podem se tornar “cavalos de troia”, no qual servem de reservatórios, transportando os esporos e disseminando a doença [7]. Porém, há poucos estudos que determinam as fontes de infecção e os modos de transmissão e tratamento [8].

A imunidade inata é a primeira resposta contra patógenos, agindo imediatamente após primeiro contato com o agente invasor, garantindo a sobrevivência do hospedeiro até que o sistema imune adaptativo seja acionado. As células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos) fazem parte desse mecanismo de defesa do organismo.

A fagocitose é uma forma específica de endocitose, na qual grandes partículas são ingeridas por meio de vastas vesículas endocíticas, que formam os fagossomos [9]. Esse é um mecanismo evolutivo de sobrevivência de muitos organismos unicelulares, que proporciona um meio de capturar nutrientes do ambiente. Com o decorrer de milhares de anos foi se tornando mais sofisticado, assumindo funções mais especializadas como nos macrófagos, chamados de fagócitos profissionais, que por meio da fagocitose, possuem a capacidade de detectar e responder aos nutrientes adquiridos no engolfamento [10].

Os macrófagos são um elo intrínseco entre a imunidade inata e a adquirida e fazem parte da resposta inicial contra os agentes patogênicos. Possuem moléculas presentes em

sua superfície que reconhecem invasores através de muitos receptores, como os Receptores de reconhecimento de padrão (PRR) e receptores para citocinas (principalmente IFN- $\gamma$ ), que atuam em conjunto para ativar os fagócitos a eliminar o patógeno ingerido. A partir da fusão dos vacúolos fagocíticos (fagossomos) com os lisossomos, se formam os fagolisossomos, que são compostos de substâncias oxidantes e microbicidas: as espécies reativas de oxigênio (ROS), principalmente espécie reativa do nitrogênio, o óxido nítrico (NO) por meio da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), peróxido de hidrogênio entre outras ROS – citocinas e quimiocinas. Essa resposta se dá a partir de INF- $\gamma$  secretado por células T ativadas para eliminar patógenos intracelulares fagocitados e iniciar a queima respiratória (processo do qual ROS são produzidas) [11,12].

Em vista que não há tratamento eficaz contra as microsporidioses, surge a necessidade de investigar novos meios de combate às infecções. Estudos demonstraram que a camada rica em lipídios reveste as leveduras de *Malassezia* sp, modulam a produção de citocinas evitando a indução de uma resposta inflamatória inespecífica no hospedeiro, permitindo assim, o relacionamento comensal com a pele do mesmo [13]. Tais estudos também mostraram a capacidade que *Malassezia* tem de estimular a atividade de células fagocíticas contra infecções e células tumorais em animais [14,15].

O gênero *Malassezia* inclui leveduras lipofílicas e zoofílicas, que fazem parte da microbiota da pele de vários animais, incluindo o homem. Atualmente, 17 espécies compõem o gênero. Diferente das outras espécies do gênero, leveduras de *Malassezia pachydermatis* (*M. pachydermatis*) não são lipodependentes [16,17]. *M. pachydermatis* são leveduras zoofílicas, isoladas frequentemente da microbiota do meato acústico externo de cães e gatos. Mas a partir dos anos 80, ganhou destaque na medicina humana, por ser diagnosticada em dermatites seborreicas e foliculites em pacientes imunodeprimidos [18]. Essas doenças estão associadas com a composição lipídica da pele e alterações no sistema imune do hospedeiro [19]. Há relação entre o aumento da produção de cera presente no canal auditivo externo e otites externas/ dermatites causadas por *M. pachydermatis*. Essas leveduras podem passar de comensais da pele à patogênicas [20] e quando isoladas da pele humana reduzem a produção de citocinas pro-inflamatórias de sangue periférico humano. A modulação da produção de citocinas está relacionada com a composição lipídica presente na parede celular das leveduras [21].

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a modulação da resposta de macrófagos tratados com extrato de *M. pachydermatis* frente à infecção por *E. cuniculi*.

## **Métodos**

### **Extrato de *M. pachydermatis***

Para a realização deste trabalho, utilizou-se leveduras de *Malassezia pachydermatis* obtidas de cepa padrão CBS-1696, isoladas de cão. Estas foram repicadas em meio Sabouraud, incubadas a 32°C por período de 5 a 7 dias, no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Paulista. Uma suspensão contendo 5 malassezias para cada macrófago (5:1) diluída em PBS, foi morta por calor, 30 minutos a 120°C, e posteriormente filtrada com filtro de 0,20 µm para remoção de quaisquer detritos. Desse modo, obtivemos um extrato do fungo para a realização dos experimentos.

### **Esporos de *E. cuniculi***

Os esporos de *E. cuniculi*, genótipo I, obtidos do Waterborne® Inc., foram cultivados em células de rim de coelho (RK 13 – Rabbit Kidney) no Laboratório de Culturas Celulares da Universidade Paulista. Para o desenvolvimento do patógeno, as células RK foram mantidas em meio de cultura Eagle (DMEN) suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10 % e antibiótico gentamicina (20 mg/mL) em frascos com capacidade de 75 cm<sup>3</sup>. As culturas foram infectadas com  $1 \times 10^7$  esporos de *E. cuniculi* e incubadas com 5 % de CO<sub>2</sub> à temperatura de 37°C. Em intervalos de 7 dias, o meio de cultura foi removido e substituído por novo. Para obtenção dos esporos, foi realizada centrifugação por 20 minutos a 1500 x g e armazenados a 4°C. A contagem dos esporos de *E. cuniculi* foi realizada em câmara de Neubauer [22].

### **Culturas de macrófagos RAW**

Macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram cultivados em RPMI suplementado com 10% SFB - (R10) - e conservados à 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. A manutenção das culturas para obtenção dos macrófagos foi feita com trocas periódicas do meio R10, respeitando a necessidade da cultura.

### **Delineamento experimental**

Os macrófagos foram soltos da placa de cultura com o auxílio de *cell scraper* e centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas, para então serem distribuídas em placas de 24 poços. A viabilidade foi testada com Azul de Tripan. A concentração macrófagos/poço foi de  $3 \times 10^5$  células em 300  $\mu$ L de R10. Incubou-se as placas em estufa à 37°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> *overnight*.

O meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas com PBS para a remoção de células não aderidas. Posteriormente, foram acrescidos meio R10 com extrato de *M. pachydermatis* respeitando o volume que correspondia a concentração inicial de 5 malassezias por macrófago e nos demais somente foi colocado R10, sendo mantidos incubados por 1 hora. Após a incubação, o meio de cultura foi retirado e os poços novamente lavados com PBS. Em seguida, meio de cultura R10 com esporos de *E. cuniculi*, na concentração de 2:1 (2 esporos para cada macrófago), foi acrescido nas culturas, que foram incubadas por 15, 30, 60 minutos e 48 horas. Os experimentos foram feitos em triplicatas.

Após os períodos estabelecidos, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi mensurado nas culturas e os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80°C para análise da produção de óxido nítrico, e citocinas, descritos a seguir. As lamínulas foram lavadas com PBS duas vezes para remoção de detritos e coradas com corante fluorescente Calcoflúor, para identificação e contagem dos microsporídios em microscópio de fluorescência e posterior análise fagocítica (Capacidade fagocítica – CF e Índice fagocítico – IF).

Para determinar a CF, consideramos a quantidade de macrófagos fagocitando no total de 100 células e para o IF consideramos o número total de esporos de *E. cuniculi* fagocitados e dividimos pela quantidade de macrófagos fagocitando.

### **Mensuração de nitritos e nitratos**

A produção de óxido nítrico foi dosada a partir da quantidade de nitritos e nitratos presentes no sobrenadante das culturas celulares pelo método colorimétrico baseado na reação de Griess. Em uma placa de 96 poços acrescentou-se 100  $\mu$ L de reagente de Griess (0,2% N-1 naftiletilenediamina, 2% sulfanilamida em 5% de ácido acético) e mesmo volume de sobrenadante proveniente das culturas. Posterior à incubação por 10 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz, a absorbância foi estabelecida em



espectrofotômetro com filtro de ~540 nm. As concentrações de NO foram calculadas a partir de curva padrão utilizando nitrito de sódio (0,078-100uM) e os resultados foram expressos em  $\mu\text{mols}$  de nitrito para  $3 \times 10^5$  macrófagos.

### **Dosagem de citocinas**

Para a dosagem de citocinas foi utilizado o Mouse Th1, Th2, Th17 CBA Kit, sendo observadas as instruções do fabricante. Brevemente, utilizou-se 50  $\mu\text{L}$  de um composto de *beads* contendo os anticorpos de captura, 50  $\mu\text{L}$  de anticorpos de detecção conjugado ao fluoróculo PE (*Phycoerythrin*) adjunto de 50  $\mu\text{L}$  do sobrenadante das culturas. Incubou-se as amostras por período de 2 horas, no escuro e à temperatura ambiente. Após lavagem, as populações de *beads* foram visualizadas com suas respectivas intensidades de fluorescência no citômetro Accuri (BD Bioscience). Um total de 2100 eventos foi adquirido (correspondendo a 300 *beads* por amostra). A análise dos dados foi realizada utilizando o *software* de análise para CBA (FCAP *array software* versão 3.0 – BD Bioscience).

### **Mensuração de peróxido de hidrogênio**

A produção de peróxido de hidrogênio foi quantificada pelo método colorimétrico baseado na oxidação do vermelho de fenol, dependente de peroxidase. As culturas de macrófagos tratados ou não com extrato de *M. pachydermatis* e infectados por *E. Cuniculi* em placa de 96 poços, previamente incubadas por 24 horas a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub>, foram lavadas e acrescentado tampão contendo vermelho de fenol e peroxidase. Posterior à incubação por 60 minutos, a absorbância foi estabelecida em espectrofotômetro com filtro de ~620 nm. As concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram calculadas a partir de curva padrão (0,5 -8nmol) e os resultados foram expressos em nmols de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **Microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

Para a MET, as culturas de macrófagos foram desenvolvidas em garrafas de 25 cm<sup>3</sup> sendo realizadas culturas infectadas não tratadas, uma garrafa para cada tempo – 15, 30, 60 minutos e 48 horas – e uma garrafa nos mesmos períodos com o tratamento prévio por 1 hora com extrato de *M. pachydermatis*. Os procedimentos de infecção e tratamento foram seguidos de acordo com o protocolo acima mencionado. Todos os grupos testados em placa foram contemplados com 1 garrafa de cultura para MET. O pellet foi fixado em glutaraldeído a 2% em tampão cacodilato 0,2 M (pH 7,2) a 4°C durante 10 h, pós-fixados

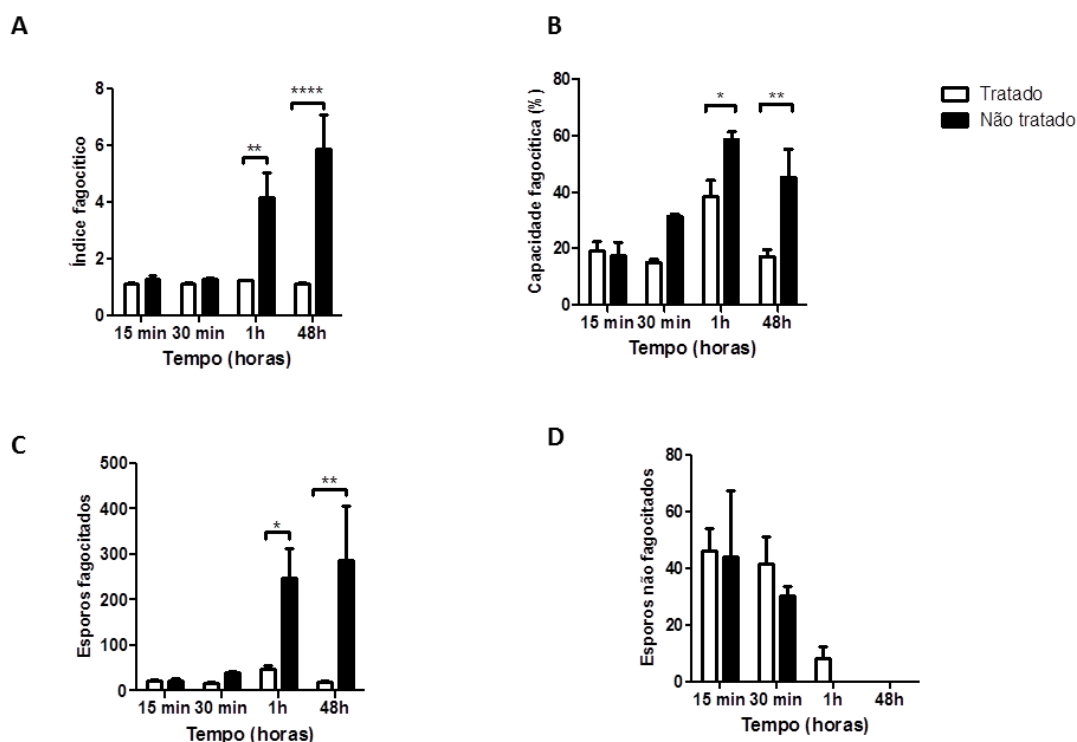
em OsO<sub>4</sub> a 1% tamponado durante 2h a 4°C. As culturas foram desidratadas em uma série crescente de etanol e embebidas em óxido de propileno. Foram realizados cortes semifinos, corados com Azul de Toluidina e fotografados em microscópio de luz. Os cortes ultrafinos foram duplamente corados com acetato de uranila aquoso e citrato de chumbo e, em seguida, observado sob um microscópio eletrônico de transmissão LEO EM 906E.

### **Análise estatística**

Foi realizada Análise de Variância (ANOVA) de uma via, com pós-teste de Bonferroni. Em todos os casos, o nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ . Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa “GraphPad Prism” versão 5.0 para Windows ® (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, EUA).

### **Resultados**

Com o propósito de verificar a atividade fagocítica dos macrófagos frente à infecção experimental por *E. cuniculi* e a respectiva eficácia do tratamento com extrato de *M. pachydermatis*, inicialmente foi realizada a contagem dos esporos fagocitados ou não sob o microscópio de fluorescência, para se obter a análise da capacidade fagocítica e índice fagocítico nos tempos 15, 30, 60 minutos e 48 horas após o tratamento. Os macrófagos não tratados tiveram CF, IF e quantidades de esporos fagocitados maiores que os tratados (Fig. 1).

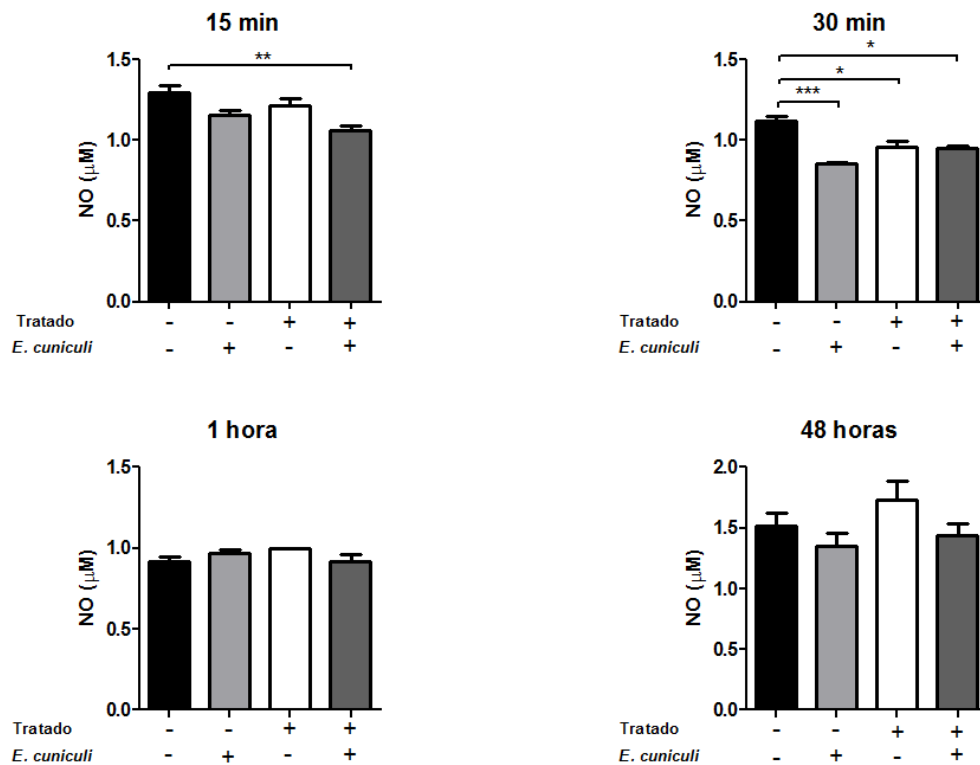


**Figura 1.** Análise da fagocitose. A) Índices fagocíticos de macrófagos tratados ou não com extrato de *Malassezia pachydermatis* e infectados com *Encephalitozoon cuniculi* aos 15, 30, 60 minutos e 48 horas. B) Capacidade fagocítica de macrófagos tratados ou não com extrato de *M. pachydermatis* e infectados com *E. cuniculi* aos 15, 30, 60 minutos e 48 horas. C) Número de esporos de *E. cuniculi* fagocitados por macrófagos tratados ou não com extrato de *M. pachydermatis* aos 15, 30, 60 minutos e 48 horas. D) Número de esporos de *E. cuniculi* não fagocitados por macrófagos tratados ou não com extrato de *M. pachydermatis* aos 15, 30, 60 minutos e 48 horas. A análise de variância de uma via ANOVA com pós teste Bonferroni  $<0,05^*$ .

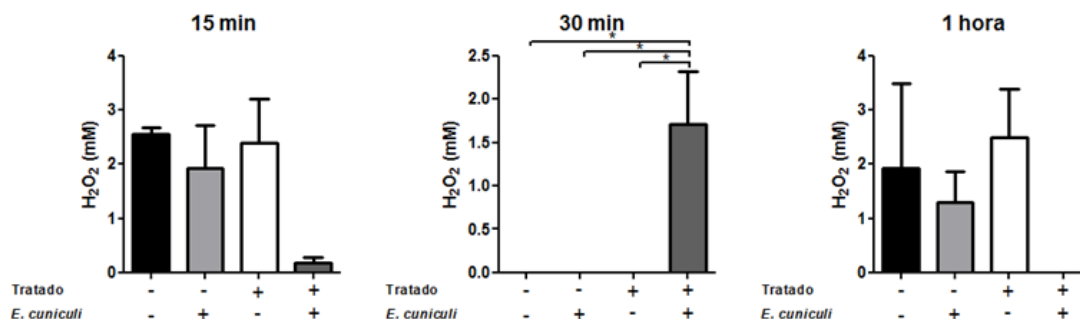
Houve redução na produção de óxido nítrico (NO) nas culturas tratadas e infectadas com *E. cuniculi* com 15 minutos. Esta mesma redução foi vista com 30 minutos nas células tratadas e infectadas ou não com *E. cuniculi*, evidenciando que tanto a presença do agente quanto a do extrato modulou negativamente a produção de NO (Fig. 2).

Aos 30 minutos houve um aumento significativo na produção de  $H_2O_2$ , com aproximadamente 1.7 mM, sugerindo a atividade deste metabólito do oxigênio como

parte do mecanismo de toxicidade do macrófago contra o patógeno (Fig. 3). Esse dado coincidiu com o início do aumento do IF, reforçando que 30 minutos após o desafio com *E. cuniculi*, os macrófagos tratados atingiram maior atividade microbicida e fagocítica.



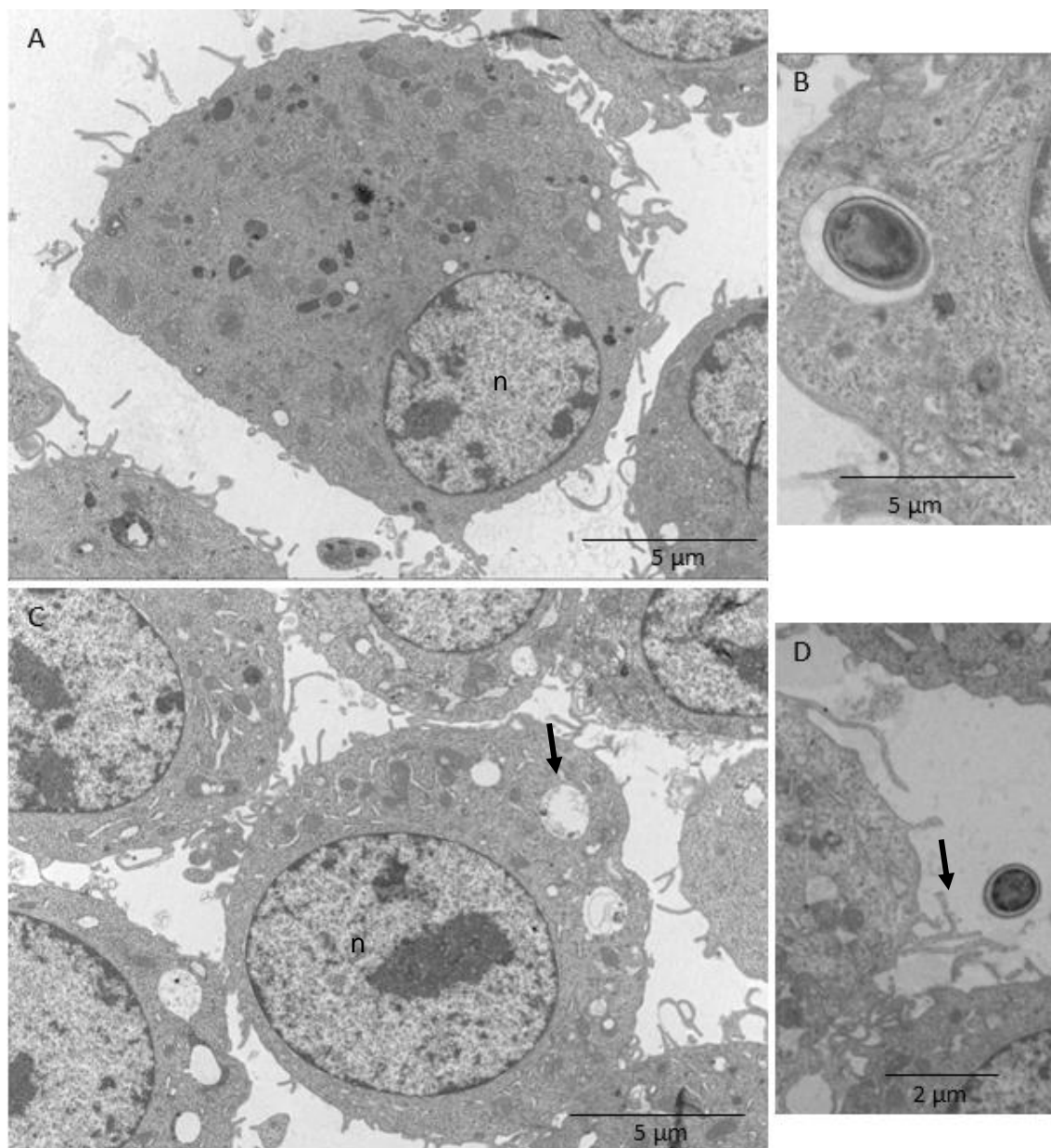
**Figura 2.** Produção de óxido nítrico em macrófagos tratados ou não com extrato de *M. pachydermatis* e infectados ou não com *E. cuniculi* em 15, 30, 60 minutos e 48 horas após a infecção. A análise de variância de uma via ANOVA com pós teste Bonferroni revelou  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,005^{**}$ ,  $p < 0,0005^{***}$



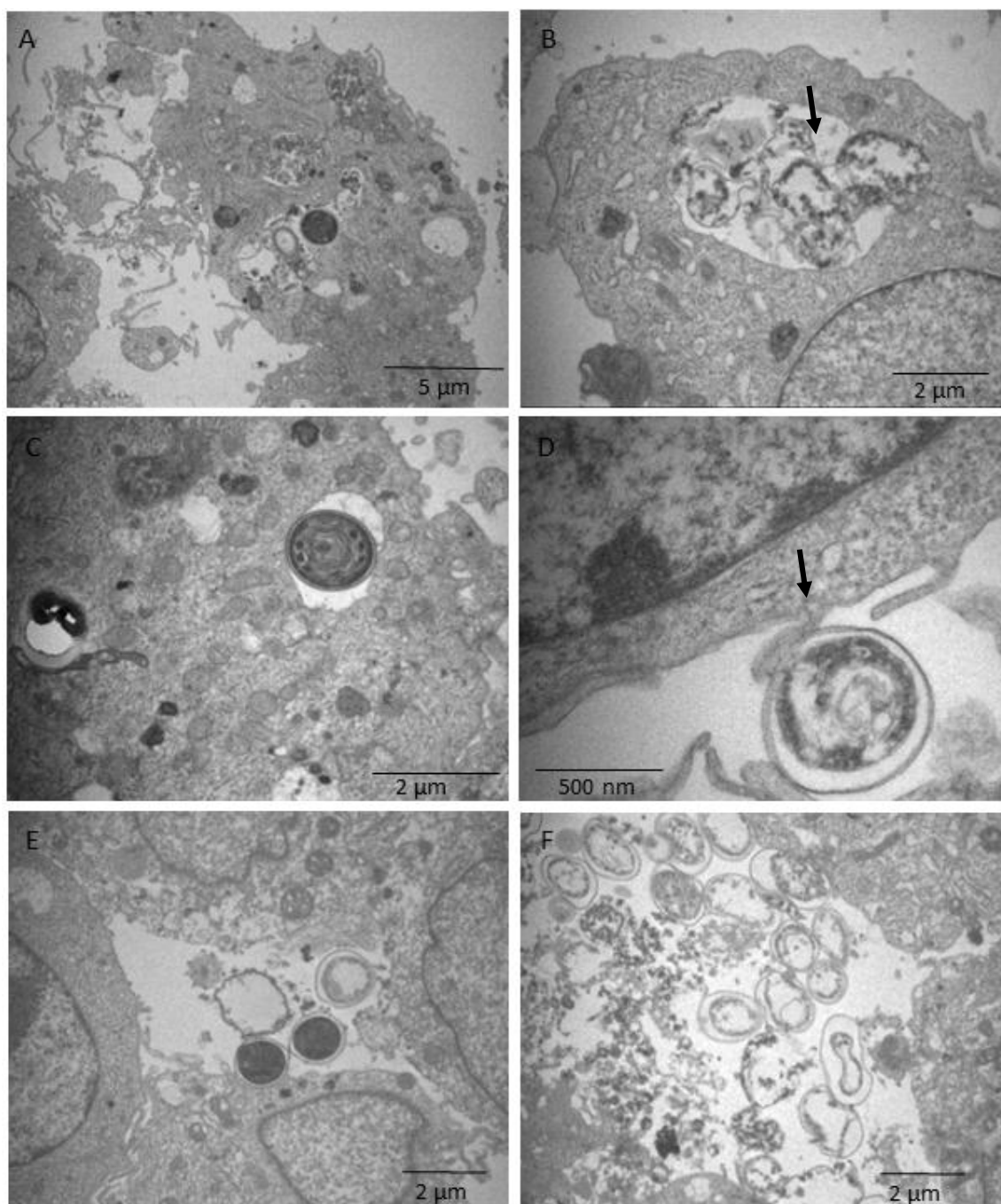
**Figura 3 -** Produção de peróxido de hidrogênio nas culturas de macrófagos tratados ou não com extrato de *M. pachydermatis* e infectados ou não com *E. cuniculi* aos 15, 30, 60 minutos e 48

horas após a infecção. A análise de variância de uma via ANOVA com pós teste Bonferroni mostrou  $<0,05^*$ .

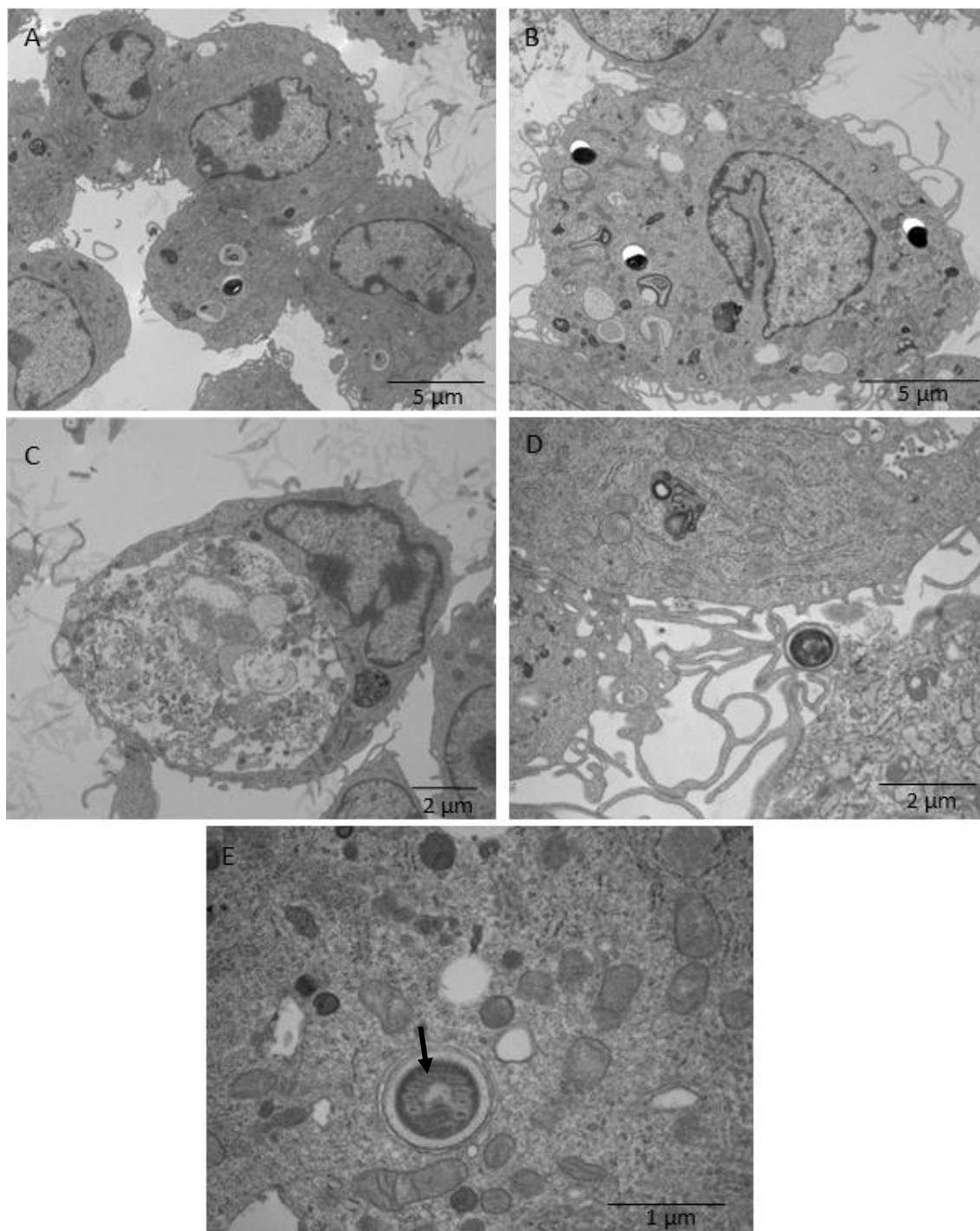
Nos macrófagos não tratados observou-se que em 15 e 30 minutos de infecção havia pequena quantidade de esporos fagocitados, revelando baixa atividade fagocítica nestes períodos (Figs. 4 A, B). Porém aos 60 minutos, no interior dos vacúolos fagocíticos havia grande quantidade de esporos em diferentes graus de degeneração e alguns íntegros, assim como muito material amorfo (Fig. 5), indicativo de atividade fagocítica intensa. A exocitose deste material também estava presente e também se notou macrófagos degenerados. Com 48 horas os achados foram semelhantes àqueles encontrados com 60 minutos, porém no interior dos macrófagos havia poucos esporos íntegros e muito material amorfo dentro de vacúolos fagossômicos (Fig. 6), indicando maior atividade microbicida dos macrófagos. Não foram visualizados estágios de multiplicação de *E. cuniculi* no interior de macrófagos.



**Figura 4.** Eletromicrografias de macrófagos tratados ou não com extrato de *M. pachydermatis* e infectados com *E. cuniculi* após 15 minutos do desafio, n= núcleo. A) Em macrófagos não tratados sem esporos ou vacúolos fagocíticos intracelulares. B) Esporo dentro da célula com sua estrutura preservada em macrófago não tratado. C) Nos macrófagos tratados há presença de muitos vacúolos fagossomais, indicativo de fagocitose (seta). D) Projeções de membrana citoplasmática de macrófagos tratados em direção ao espora extracelular (seta).



**Figura 5.** Eletromicrografias de macrófagos não tratados com extrato de *M. pachydermatis* e infectados com *E. cuniculi* após 60 minutos do desafio apresentando esporos íntegros e outros em fases de degeneração. A) Vacúolo fagocítico com espora íntegro e material amorfo. B) Vacúolo fagocítico com material amorfo (seta). C) Esporo íntegro com presença de túbulo polar no interior de macrófago. D) Projeção de pseudópodes em direção ao espora localizado fora da célula (seta). E) Esporos no espaço extracelular livres e envolvidos por projeção da membrana do macrófago. F) Esporos extracelulares.

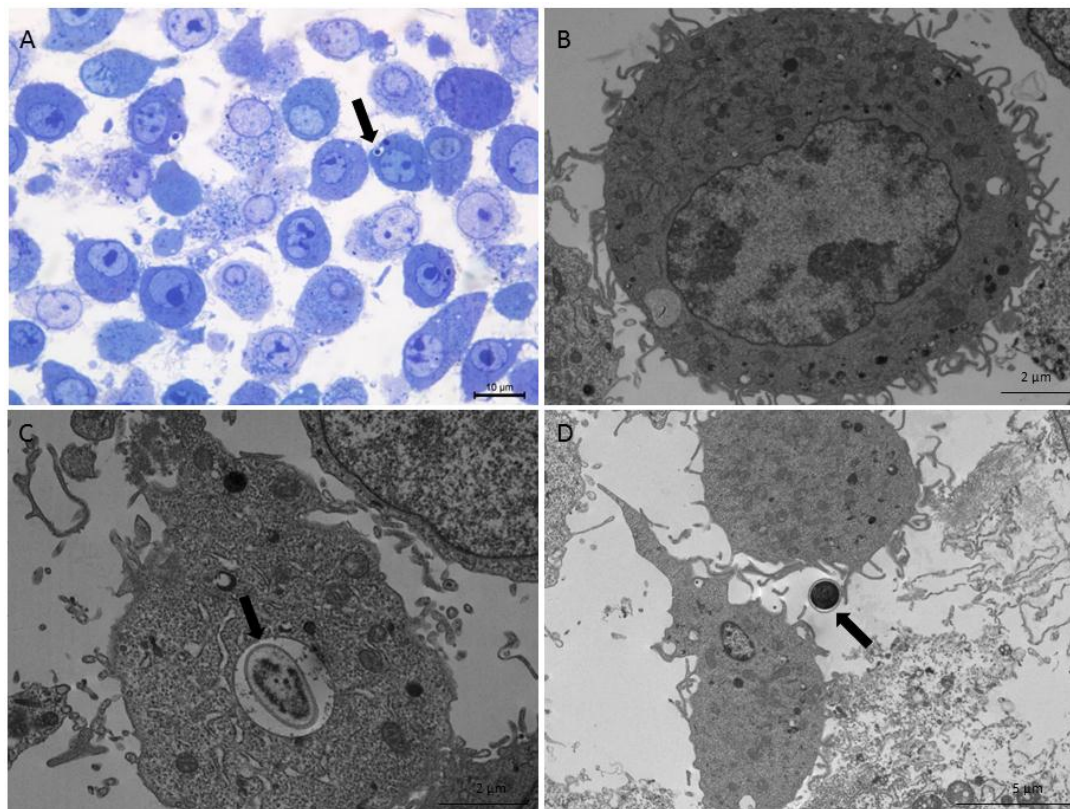


**Figura 6.** Eletromicrografias de macrófagos não tratados com extrato de *M. pachydermatis* e infectados com *E. cuniculi* após 48 horas do desafio. A, B) Macrófagos com esporos íntegro e em diferentes fases de degeneração em seu interior. Presença também de esporos eletrodensos. C) Vacúolo fagocítico com material amorfo. D) Projeção da membrana do macrófago junto a espora. E) Esporo íntegro com presença de túbulo polar no interior de macrófago (seta).

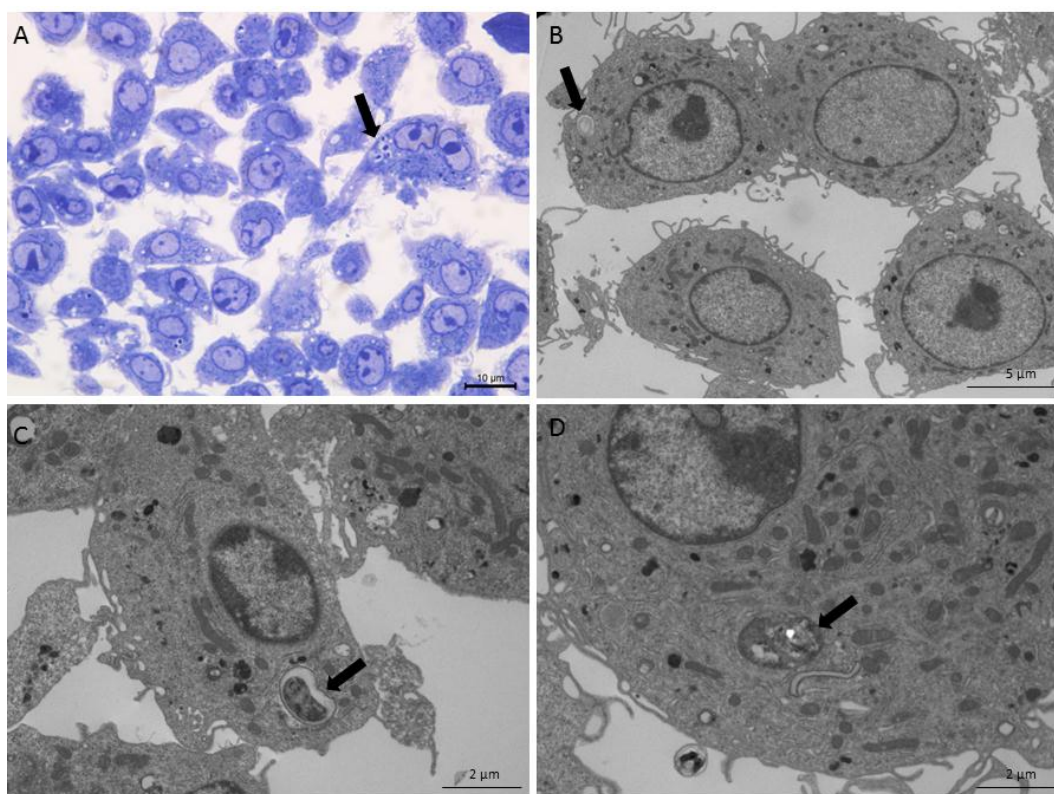
Em macrófagos tratados com extrato de *M. pachydermatis* após 15, 30 e 60 minutos de infecção foi observado poucos esporos fagocitados (Figs. 4, 7). No interior



dos vacúolos fagocíticos havia poucos esporos em degeneração e pouca quantidade de material amorfo (Fig. 7). Poucos esporos íntegros foram visualizados fora de macrófagos e não foram vistos esporos íntegros dentro dos mesmos. Com 48 horas os achados descritos com 60 minutos estavam presentes de forma mais generalizada, assim a presença de vacúolos fagocíticos com esporos em fases de degeneração ou material amorfo foi mais escassa, indicando que a atividade microbicida foi acelerada pela atividade moduladora do extrato de *M. pachydermatis*. Também não foram visualizados estágios de multiplicação de *E. cuniculi* no interior de macrófagos (Figuras 4,5,6,7).

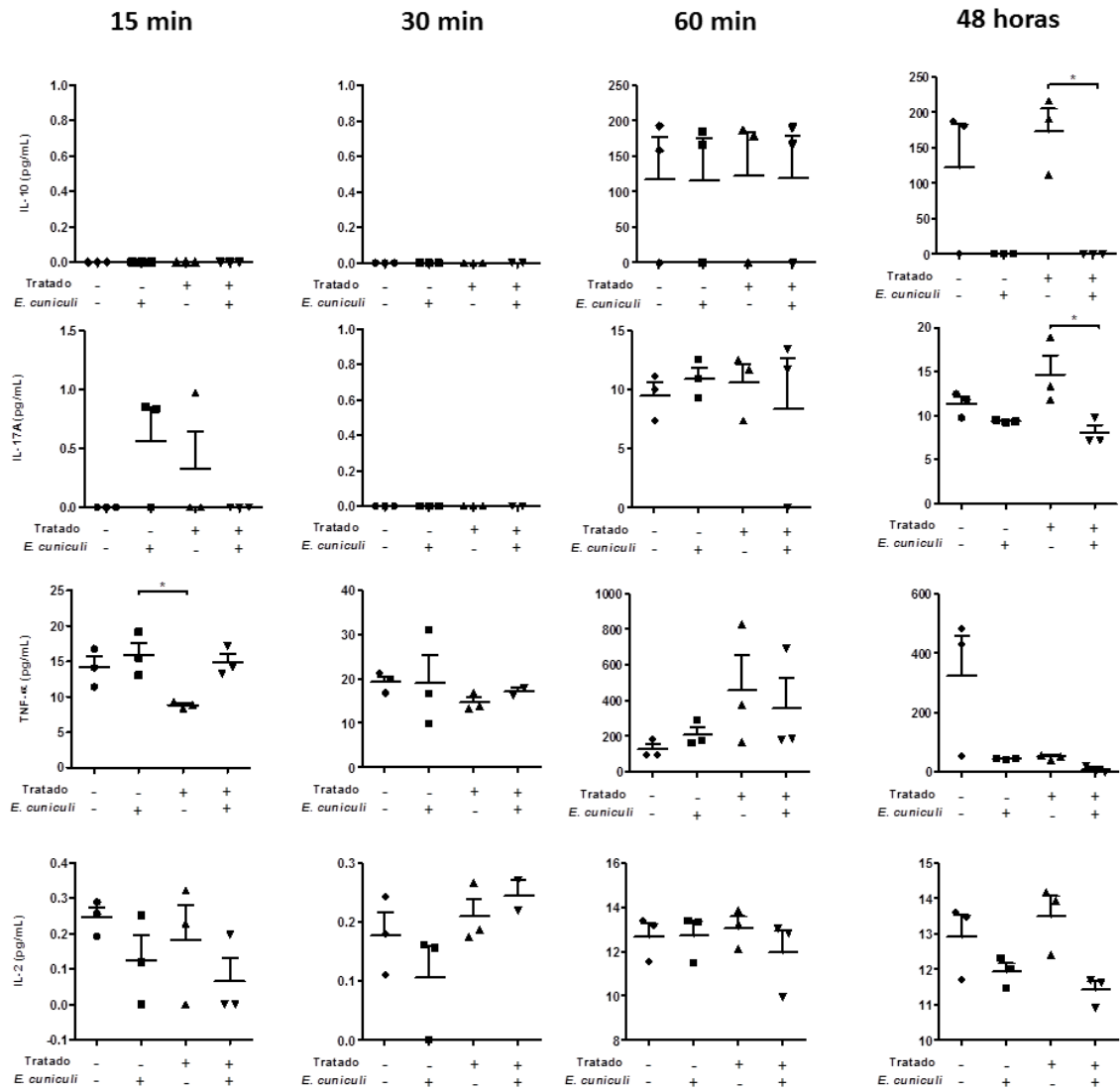


**Figura 7.** Macrófagos tratados com *M. pachydermatis* e infectados com *E. cuniculi* após 60 minutos do desafio. A) Fotomicrografia mostrando esporos fagocitados (seta) (Azul de Toluidina). B) Eletromicrografia de macrófagos tratados sem estruturas parasitárias no seu interior apenas um vacúolo fagocítico. C) Macrófagos com esporo líticos em seu interior. D) Projeção da membrana do macrófago junto à esporo extracelular.

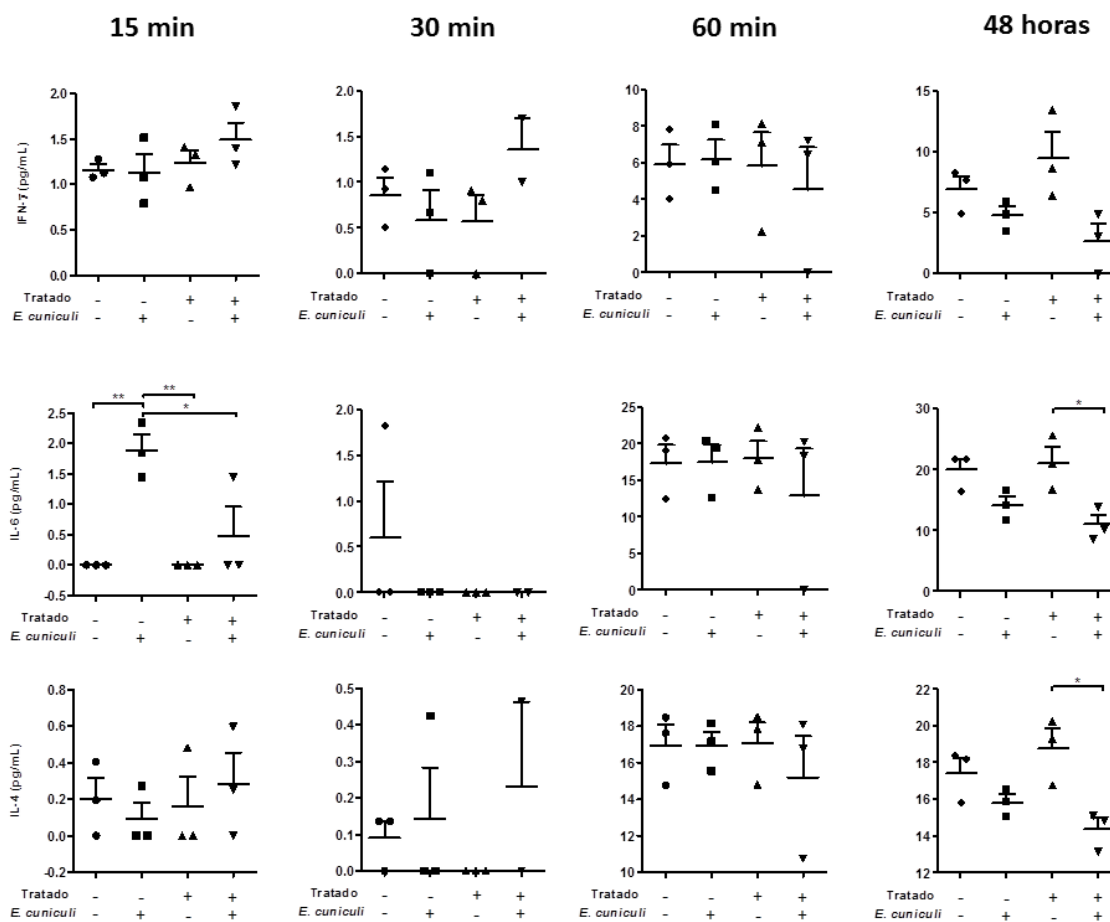


**Figura 8.** Macrófagos tratados com *M. pachydermatis* e infectados com *E. cuniculi* após 48 horas do desafio. A) Fotomicrografia mostrando esporos fagocitados (seta) (Azul de Toluidina). B) Eletromicrografia de macrófagos tratados sem estruturas parasitárias no seu interior apenas um vacúolo fagocítico (seta). C, D) Macrófagos com esporo em lise em seu interior de vacúolo fagocítico (setas).

Mensurou-se a produção de citocinas com 15, 30, 60 minutos e 48 horas após o desafio com *E. cuniculi* nos macrófagos que receberam ou não o extrato de *M. pachydermatis* (Figs. 9, 10). Aos 15, 30 e 60 minutos, não foram observadas diferenças na produção das citocinas avaliadas. Já em 48 horas, observamos nos macrófagos infectados com *E. cuniculi* diminuição na secreção de todas as citocinas avaliadas, com evidência estatística para IL-10, IL-17A, IL-6 e IL-4 (Figs. 9, 10). Nos macrófagos tratados com extrato de *M. pachydermatis* notou-se aumento na secreção das citocinas, excetuando-se o TNF- $\alpha$  que teve a secreção diminuída nos macrófagos que foram tratados com extrato ou infectados pelo *E. cuniculi* (Fig. 9). Esses dados sugerem que o tratamento com extrato de *M. pachydermatis* é capaz de modular a produção de citocinas pelos macrófagos, mas não foi suficiente para evitar a diminuição de secreção dessas após a infecção pelo *E. cuniculi*.



**Figura 9.** Níveis de citocinas IL-10, IL-17A , TNF- $\alpha$  e IL-2 detectados no sobrenadante nas culturas de macrófagos tratados ou não com extrato de *M. pachydermatis* (tratados) e infectados (+) ou não (-) com *E. cuniculi* aos 15, 30, 60 minutos e 48 horas após o desafio. Análise de variância de uma via ANOVA com pós teste Bonferroni  $<0,05^*$  .



**Figura 10.** Níveis de citocinas IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-4 detectados no sobrenadante nas culturas de macrófagos tratados ou não com extrato de *M. pachydermatis* (tratados) e infectados (+) ou não (-) com *E. cuniculi* aos 15, 30, 60 minutos e 48 horas após o desafio. Análise de variância de uma via ANOVA com pós teste Bonferroni  $<0,05^*$ .

## Discussão

A fagocitose é um mecanismo eficiente na degradação de microrganismos e reduz significativamente o número destes no hospedeiro, embora esta via possa ser uma rota de fuga para sobrevivência e replicação de *E. cuniculi*. Embora diversos estudos demonstrem a aplicação de variadas linhagens de células hospedeiras para microsporídios, muitas delas favorecendo a sua replicação, ainda há poucas descrições do papel exercido pelos macrófagos nas microsporidioses [23].

Nesse estudo, analisamos a capacidade fagocítica e o índice fagocítico de macrófagos após o tratamento ou não com o extrato de *M. pachydermatis*, nossos dados indicam que após o tratamento houve uma redução significativa tanto no IF quanto na CF em 60 minutos e 48 horas, indicando que aparentemente houve ineficiência do tratamento. Porém, a análise ultraestrutural demonstrou que nestes macrófagos não havia esporos íntegros no seu interior e tampouco fora das células, indicando atividade microbicida foi aumentada. O tratamento de camundongos com extrato de *Malassezia* sp. conferiu resistência à infecção por *Salmonella typhimurium* [14], assim como foi demonstrado que o tratamento de camundongos com extrato de *Malassezia* determinou resistência a tumores transplantáveis [15]. Desta forma, os resultados aqui observados corroboram a existência de um efeito modulador da resposta macrofágica pelo extrato de *M. pachydermatis*, como havia sido demonstrado *in vivo*.

A análise ultraestrutural do fenômeno de fagocitose pela MET permitiu mostrar que a diminuição do IF e da CF em macrófagos tratados foi resultado da maior atividade fagocítica e microbicida dos mesmos, uma vez que a coloração de Calcoflúor utilizada para contabilizar estes índices permite apenas identificar esporos íntegros. Portanto, a análise ultraestrutural foi fundamental para a identificação da atividade moduladora do extrato de *M. pachydermatis* na função macrofágica neste experimento.

Weidner [24] demonstrou que a replicação de *E. cuniculi* é possível em macrófagos peritoneais e que o desenvolvimento do patógeno se dá em vacúolos parasitóforos (VP). Estas estruturas foram assim denominadas, pois o autor observou que não havia fusão entre os lisossomos da célula hospedeira e o vacúolo onde os esporos estavam se desenvolvendo. Porém, quando macrófago é ativado por esporos opsonizados por anticorpos específicos, ocorre a fusão de lisossomos e VP e os esporos foram facilmente destruídos [25,26]. No entanto, Couzinet *et al.* [27], demonstraram que os esporos de *E. cuniculi* ao serem endocitados por fagócitos não profissionais por meio da fagocitose e se compartmentam em fagolisossomos tardios.

Após 72 horas, os esporos fagocitados nessas estruturas são digeridos e mortos. A forma de sobrevivência que o esporo utiliza, é infectar o citoplasma da célula hospedeira injetando o esporoplasma por meio do tubo polar e assim estabelece um novo ciclo de desenvolvimento. Há evidências que a membrana que circunda o esporoplasma formando o VP tem origem da membrana do fagolisossomo [28,29]. A merogonia ocorrerá dentro

dos VP que não possuem marcadores de diferenciação lisossômica ou endossomal tardia. Desse modo, é importante destacar que os fagolisossomos e os VP embora compartimentalizem os esporos, são estruturas distintas. O desenvolvimento de microsporídios não ocorre somente em VP, há espécies que se replicam no citoplasma das células hospedeiras [28].

Neste estudo, foram identificados no interior de macrófagos tratado ou não com extrato de *M. pachydermatis* vacúolos fagocíticos com esporos em estágios de degeneração e íntegros, portanto reforçando que a endocitose/fagocitose foi evidentemente a forma de entrada preferencial dos esporos de *E. cuniculi* nos macrófagos, corroborando os dados da literatura. Adicionalmente, deve-se salientar que não foram observadas formas em desenvolvimento do fungo, indicando que a endocitose estava associada à atividade microbicida dos macrófagos. Para reforçar tais achados, acrescenta-se a observação de grandes quantidades de material amorfo nos vacúolos fagocíticos, representando a degeneração destas estruturas.

Ao analisar o óxido nítrico (NO) observamos que também houve redução na sua produção pelos macrófagos tratados com extrato de *M. pachydermatis*. Didier [30] avaliou que INF- $\gamma$  em conjunto com LPS ativam macrófagos para destruir *E. cuniculi* *in vitro* por via ROS, principalmente NO. Khan e Moretto [31] mostraram que camundongos sem a enzima óxido nítrico sintase (NOS) foram resistentes à infecção pelo *E. cuniculi*. Os autores descreveram a importância de IFN- $\gamma$  no combate à infecção que é independente da produção de NO. Segundo Jelínek *et al.* [32], *E. cuniculi* utiliza a fagocitose para replicação e infectar células hospedeiras e quando há destruição do patógeno, esta não depende da produção de NO, contribuindo com os achados de Khan e Moretto [31]. Mesmo assim, ainda é obscuro determinar como macrófagos impedem a replicação de *E. cuniculi* [23,32]. Esses dados contribuem para reforçar os achados nesse trabalho, pois observamos que a morte de *E. cuniculi* ocorreu nos macrófagos tratados, independentemente da produção de NO. Adicionalmente, atividade microbicida induz ao “respiratory burst” com a produção de espécies reativas de oxigênio, como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que reagem com ferro ou cobre determinando efeitos lesivos na membrana de bactérias [33]. A produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em macrófagos tratados e infectados por *E. cuniculi* aumentou de forma significativa e coincidiu com o aumento do índice fagocítico, reforçando que a atividade fagocítica aumentou nesses macrófagos.

A parede celular da *Malassezia* contém altos níveis de lipídios, os quais são importantes para a adesão e colonização de queratinócitos. Estudos prévios demonstraram que as espécies mais comuns de *Malassezia* isoladas da pele de humanos reduzem significativamente *in vitro* os níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  pelos monócitos do sangue periférico humano [20], sendo postulado que os lipídios da parede celular conferem propriedades imunoevasivas. Thomas *et al.* [13], demonstraram que ao remover a camada lipídica que envolve a levedura de *Malassezia*, causa aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e níveis diminuídos de IL-10, sugerindo que a camada lipídica confere a evasão da resposta inflamatória por queratinócitos. A hipótese, é que quando há o esgotamento da camada lipídica das leveduras, expõem-se à superfície Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs), desse modo estimulam a resposta imune inata e passam de comensais à patogênicas.

Entretanto, os resultados aqui observados demonstram o contrário, macrófagos tratados com extrato de *M. pachydermatis* apresentaram aumento na secreção das citocinas, excetuando-se o TNF- $\alpha$  que teve diminuição em 15 minutos, o que pode explicar a atividade microbicida acentuada de macrófagos tratados, modulando positivamente a resposta fagocítica.

Por outro lado, a presença de *E. cuniculi*, determinou a redução da produção de citocinas IL-10, IL-17A, IL-6 e IL-4, indicando que a presença do patógeno também determina modulação da secreção de citocinas. A IL-6 é produzida no local onde há inflamação, é transportada e distribuída pelo sangue para a medula óssea aumentando a produção de neutrófilos e recrutamento de células para o local da infecção [11]. Logo, o aumento desta citocina influencia na resposta inflamatória modulando a fase aguda da inflamação. Desta forma especula-se que a diminuição destas citocinas favorece o patógeno.

Os resultados obtidos neste estudo permitem sugerir que o extrato de *M. pachydermatis* aumentou a atividade microbicida e fagocítica de macrófagos infectados pelo *E. cuniculi*, devendo ser considerado aprofundar os estudos relativos ao extrato como substância moduladora da imunidade e possível agente terapêutico para a encefalitozoonose.



## Referências

1. Vávra J, Ronny Larsson J.I. Structure of microsporidia. In: Weiss LM, Becnel JJ. (Eds) *Microsporidia – Pathogens of opportunity*. Wiley Blackwell: Oxford. 2014: 1-70.
2. Cali A, Weiss LM, Takvorian PM. A review of the development of two types of human skeletal muscle infections from microsporidia associated with pathology in invertebrates and cold-blooded vertebrates. *Folia Parasitol*. 2005; 52(1-2): 51–61.
3. Fayer R, Santin-Duran M. Structure of microsporidia. In: Weiss LM, Becnel JJ. (Eds) *Microsporidia – Pathogens of opportunity*. Wiley Blackwell: Oxford. 2014: 1-70.
4. Anane S, Attouchi H. Microsporidiosis: epidemiology, clinical data and therapy. *Gastroenterol Clin Biol*. 2010; 34:450-464.
5. Stentiford GD, Becnel JJ, Weiss LM, et al. Microsporidia - Emergent Pathogens in the Global Food Chain. *Trends Parasitol*. 2016; 32(4): 336–348.
6. Mathews A, Hotard A, Hale-Donze H. Innate immune responses to *Encephalitozoon* species infections. *Microbes and Infection*. 2009;11: 905-911.
7. Fischer J., West J, Agochukwu N, Suire C, Hale-Donze H. Induction of host chemotactic response by *Encephalitozoon* spp. *Infect and Immun*, 2007; 75: 1619–1625.
8. Didier ES, Stovall ME, Green LC, et al. Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Vet Parasitol*. 2004; 126: 145-166.
9. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Biologia Molecular da Célula*. 5ª ed, Porto Alegre: Artmed, 2010.
10. Zent CS, Elliott MR. Maxed out macs: physiologic cell clearance as a function of macrophage phagocytic capacity. *FEBS J*, 2017; 284: 1021–1039.
11. Valencakova A, Halanova M. Immune response to *Encephalitozoon* infection review. *Microbiol and Infect Dis*. 2012; 35: 1– 7.
12. Abbas AK, Lichtman AH, Pilai S. *Imunologia Celular e Molecular*. 8ª ed, Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
13. Thomas DS, Ingham E, Bojar RA, et al. *In vitro* modulation of human keratinocyte pro-and anti-inflammatory cytokine production by the capsule of *Malassezia* species. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008; 54:203–214.



14. Takahashi M, Ushijima T, Ozaki Y. Studies on the biological activity of *Pityrosporum*. I. Activation of complement and generation of macrophage chemotactic factors in normal human serum by *Pityrosporum*. *J Med Mycol*, 1984; 24: 241-244.
15. Takahashi M, Ushijima T, Ozaki Y. Biological activity of *Pityrosporum*. II. Antitumor and immune stimulating effect of *Pityrosporum* in mice. *J Nat Cancer Inst*, 1986;77:1093-1097.
16. Guého E, Midgley G, Guillot J. The genus *Mallassezia* with description of four new species. *Antoine van Lewwenhoek*. 1996; 69: 337-335.
17. Puig L, Bragulat MR, Castellá G, Cabañes JF. Characterization of the species *Malassezia pachydermatis* and re-evaluation of its lipid dependence using a synthetic agar medium. *Plos One*. 2017;12: 1-6.
18. Guého E, Boekhout T, Ashbee HR, et al. The role of *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogens. *Medical Mycology*. 1998; 36: 220 – 229.
19. Shibata N, Okanuma N, Hirai K. Isolation, characterization and molecular cloning of a lipolytic enzyme secreted from *Malassezia pachydermatis*. *FEMS Microbiol Lett*, 2006; 256: 137–44.
20. Czyżewska U, Siemieniuk M, Pyrkowska A, et al. Comparison of lipid profiles of *Malassezia pachydermatis* strains isolated from dogs with otitis externa and without clinical symptoms of disease. *Mycoses*, 2016; 59: 20–27.
21. Kesavan S, Holland KT, Ingham E. The effects of lipid extraction on the immunomodulatory activity of *Malassezia* species in vitro. *Med Mycol*, 2000; 38: 239–247.
22. Hornitzky M. Nosema Disease – Literature review and three surveys of beekeepers – Part 2. Rural Industries Research and Development Corporation. Pub. No. 08/006. 2008.
23. Fischer J, Tran D, Juneau R, Hale-Donze H. Kinetics of *Encephalitozoon* Spp. Infection of Human Macrophages. *J Parasitol.*, 2008; 94:169–175.
24. Weidner E. Interactions between *Encephalitozoon cuniculi* and macrophages. *Zentralblatt für bakteriell Parasit*, 1975; 49: 1–9.
25. Niederkorn JY, Shadduck JA. Role of antibody and complement in the control of *Encephalitozoon cuniculi* infection by rabbit macrophages. *Infect Immun*, 1980; 17: 995-1002.

26. Schmidt EC, Shadduck J.A. Mechanisms of resistance to the intracellular protozoan *Encephalitozoon cuniculi* in mice. *J Immun*, 1984; 133: 2712-2719.
27. Couzinet S, Cejas E, Schittny J. Phagocytic uptake of *Encephalitozoon cuniculi* by nonprofessional phagocytes. *Infect Immun*, 2000; 68: 6939–6945.
28. Franzen C. Microsporidia: how can they invade other cells. *Trends Parasitol* 2004; 20: 275–279.
29. Bohne W, Bottcher K, Gross U. The parasitophorous vacuole of *Encephalitozoon cuniculi*: biogenesis and characteristics of the host cell pathogen interface. *Int J Med Microbiol*, 2011; 301: 395–399.
30. Didier ES. Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Trop*, 2005; 94: 61–76.
31. Khan IA, Moretto M. Role of gamma interferon in cellular immune response against murine *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Infect Immun*, 1999; 67: 1887–1893.
32. Jelinek J, Salat J, Sak B, Kopecky J. Effects of interferon gamma and specific polyclonal antibody on the infection of murine peritoneal macrophages and murine macrophage cell line PMJ2-R with *Encephalitozoon cuniculi*. *Folia Parasitol*, 2007; 54: 172–176.
33. Srinivasa Rao PS, Yamada Y, Leung KY. A major catalase (KatB) that is required for resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and phagocyte-mediated killing in *Edwardsiella tarda*. *Microbiol*, 2003; 149: 2635–2644.