

UNIVERSIDADE PAULISTA
PROGRAMA DE DOUTORADO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E EXPERIMENTAL

**MODELO *IN VITRO* PARA O ESTUDO DA RESPOSTA
DE MACRÓFAGOS DESAFIADOS COM *Malassezia*
furfur OU *Malassezia pachydermatis***

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

ROSSANA TEOTÔNIO DE FARIAS MOREIRA

São Paulo
2016

UNIVERSIDADE PAULISTA
PROGRAMA DE DOUTORADO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E EXPERIMENTAL

**MODELO *IN VITRO* PARA O ESTUDO DA RESPOSTA
DE MACRÓFAGOS DESAFIADOS COM *Malassezia*
furfur OU *Malassezia pachydermatis***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Selene Dall'Acqua Coutinho.

ROSSANA TEOTÔNIO DE FARIAS MOREIRA

São Paulo
2016

Moreira, Rossana Teotônio de Farias.
Modelo *In Vitro* para o estudo da resposta de macrófagos desafiados
com *Malassezia pachydermatis* e *Malassezia furfur* / Rossana
Teotônio de Farias Moreira. - 2016.
47 f. : il. color.

Dissertação de Doutorado Apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade
Paulista, São Paulo, 2016.

Área de Concentração: Patogenia das Doenças Infecciosas e
Parasitárias.

Orientadora: Prof.^a Dra. Selene Dall'Acqua Coutinho.

1. *Malassezia Furfur*. 2. *Malassezia Pachydermatis*. 3. Fagocitose.
4. Óxido nítrico. 5. Citocinas. I. Coutinho, Selene Dall'Acqua
(orientadora). II. Título.

ROSSANA TEOTÔNIO DE FARIAS MOREIRA

**MODELO *IN VITRO* PARA O ESTUDO DA RESPOSTA
DE MACRÓFAGOS DESAFIADOS COM *Malassezia*
furfur OU *Malassezia pachydermatis***

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

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Selene Dall' Acqua Coutinho
Universidade Paulista - UNIP

Prof.^a Dr.^a Elizabeth Cristina Pérez Hurtado
Universidade Paulista - UNIP

Prof.^a Dr.^a Lika Osugui
Idexx Brasil

Prof.^a Dr.^a Márcia de Souza Carvalho Melhem
Instituto Adolfo Lutz

Prof.^a Dr.^a Paula Andrea de Santis Bastos
Faculdades Metropolitanas Unidas - FMU

DEDICATÓRIA

Dedico esta conquista ao meu esposo, Iramirton Figueredo Moreira, grande companheiro e incentivador do meu crescimento pessoal e profissional, aos meus filhos Gabriel, Guilherme e Gustavo que suportaram e compreenderam ao seu modo a importância dos meus estudos e a necessidade das ausências, a minha mãe que abraçou, dentro de suas possibilidades, as responsabilidades assumidas perante minha ausência e aos meus compadres João Godoy e Leonor Almeida, pelo suporte familiar sempre que necessário.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à professora Dr^a Selene, minha orientadora, por seus ensinamentos que foram além dos acadêmicos. Seu compromisso, responsabilidade, atenção, dedicação, disponibilidade e compreensão nunca serão esquecidos.

A Universidade Federal de Alagoas (UFAL) e a Escola de Enfermagem e Farmácia (EENFAR), por minha liberação, essencial ao curso desta pós-graduação;

A Pró-reitoria de pós-graduação e pesquisa da UFAL, pela concessão de bolsa auxílio ao pesquisador;

À professora Dr^a Maria Anete Lallo, por seu empenho no desenvolvimento desta pesquisa, sua disponibilidade e ensinamentos científicos;

À profa Dr^a Elizabeth, pela sua contribuição nos experimentos e compartilhamento de seus saberes sobre a imunologia.

À Dr^a Anuska, por suas orientações e colaboração nos experimentos e testes estatísticos.

À Dr^a Fabiana Toshie de Camargo Konno, pelos ensinamentos nas técnicas de cultivo celular.

À Suzana Bezerra e à Cleide Santana, funcionárias do laboratório de Biologia Celular e Molecular da UNIP, pela organização e atendimento de nossas demandas.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação, em especial à Christina Rodrigues, por seu compromisso e responsabilidade frente às demandas pertinentes ao curso.

À Juan Justino e Lúcia Moura, pela amizade construída nestes últimos três anos e pelo seu auxílio nas atividades pertinentes ao doutorado.

*“Sem ariscar,
não vivemos a esperança.”*

(Dom Helder Câmara)

RESUMO

As leveduras lipofílicas, *Malassezia pachydermatis* e *Malassezia furfur*, fazem parte do microbioma cutâneo, vivendo em uma relação comensal com os hospedeiros; mas diante de fatores predisponentes podem assumir comportamento patogênico e causar graves infecções invasivas no homem, especialmente em neonatos prematuros submetidos à administração de nutrição parenteral suplementada com lipídios. Nas infecções, em particular naquelas invasivas, pouco se sabe a respeito da resposta imunológica inata ou adaptativa desencadeada pelas espécies de *Malassezia*. Sendo a fagocitose um importante mecanismo da resposta imune foi objetivo deste trabalho padronizar modelo de fagocitose *in vitro* por macrófagos da linhagem RAW 264.7 desafiados com *M. furfur* ou *M. pachydermatis*, comparando-se o comportamento das duas espécies e avaliando-se a produção de óxido nítrico e citocinas durante o processo de fagocitose. Macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 foram desafiados com cepas de *M. furfur* CBS-1878 e *M. pachydermatis* CBS-1696, nas razões de 5:1 e 2:1 (razão leveduras:macrófagos) em intervalos de leitura de 6h, 24h e 48h após os desafios, determinando-se os índices fagocíticos. Realizou-se nos mesmos intervalos de tempo, a dosagem de óxido nítrico por método colorimétrico e de citocinas pró- e anti-inflamatórias (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ e TNF- α) por citometria de fluxo. Os resultados mostraram maior índice fagocítico na razão de 5:1, tanto para *M. pachydermatis* quanto para *M. furfur*, no intervalo de 24 h. Foram observadas diferenças entre as espécies, verificando-se índices fagocíticos superiores quando os macrófagos foram desafiados com *M. pachydermatis*. Nas leituras de fagocitose às 48h, houve evasão das leveduras, detectando-se grande proliferação dos microrganismos e morte de macrófagos, particularmente frente à *M. pachydermatis*. Houve grandes variações na produção de óxido nítrico pelos macrófagos, nos diferentes intervalos de tempo, frente às duas espécies e dentre as citocinas pesquisadas nos sobrenadantes das culturas de macrófagos desafiados com *M. pachydermatis* e *M. furfur*, apenas foram detectadas TNF- α e IL-4, em que macrófagos desafiados com *M. furfur* determinaram maior produção da citocina pró-inflamatória TNF- α e com *M. pachydermatis*, aumento da produção da citocina anti-inflamatória IL-4. A ocorrência de fagocitose de *M. furfur* e *M. pachydermatis* por macrófagos *in vitro* e a presença de citocinas pró- e anti-inflamatórias reforçam o caráter dinâmico da relação destas leveduras com o hospedeiro.

Palavras-chave: *Malassezia furfur*. *Malassezia pachydermatis*. Fagocitose. Óxido Nítrico. Citocina.

ABSTRACT

Malassezia pachydermatis and *Malassezia furfur* are lipophilic yeasts of the cutaneous microbiome, living in an interface between pathogenic and commensal organisms. These organisms are occasionally responsible for serious invasive infections in humans, especially in preterm infants undergoing supplemental lipid supplementation. In invasive infections, little is known about the innate or adaptive immune response triggered by the *Malassezia* species. Since phagocytosis is an important mechanism mediating the adaptive immune response, it is important to be better clarified.. Our The aim of this research was to standardize phagocytosis model in vitro by RAW 264.7 lineage murine macrophages challenged by *M. furfur* and *M. pachydermatis*, comparing the behavior of the two species and oxide nitric and cytokine production resulting from the phagocytic process. Murine macrophages were challenged with CBS-1878 *M. furfur* and CBS-1696 *M. pachydermatis* in concentrations of 5:1 and 2:1 (yeasts:macrophages ratio) *M. furfur* in reading intervals of 6h, 24h and 48h following the challenges, to determine the phagocytic indexes. Evaluation of oxide nitric and pro- and anti-inflammatory cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ and TNF- α) concentrations were performed in the same intervals, respectively, by colorimetric method and flow cytometry. Results showed a higher phagocytic index at a 5:1 concentration and 24h interval, both for *M. pachydermatis* and *M. furfur*. Differences were observed between species: *M. pachydermatis*-infected macrophages had superior phagocytic indexes. Phagocytosis evaluation at 48h, showed yeast evasion, significant microorganisms proliferation and macrophage death, particularly by *M. pachydermatis*. Significant variations in the macrophage oxide nitric production were observed at the different time intervals in both species. Only TNF- α and IL-4 cytokines were detected in the supernatant of *M. pachydermatis* and *M. furfur* macrophage-infected cultures. *M. furfur*-inoculated macrophages presented increased TNF- α pro-inflammatory cytokine production, while *M. pachydermatis*-inoculated macrophages had increased IL-4 anti-inflammatory cytokine production. Macrophage phagocytosis of *M. furfur* and *M. pachydermatis* in vitro and the presence of pro- and anti-inflammatory cytokines reinforce the dynamic character of the relationship between these yeasts and the host.

Keywords: *Malassezia furfur*. *Malassezia pachydermatis*. Phagocytosis. Oxide Nitric. Cytokine.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Índice fagocítico de macrófagos RAW 264.7 desafiados com *M. pachydermatis* ou *M. furfur* nas razões 5:1, 2:1 e 0,5:1 (levedura:macrófago), avaliados nos tempos 30min, 2h e 4h (A e B). A análise de variância (ANOVA) de duas vias com pós teste de Bonferroni revelou * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$23
- Figura 2** – Fotomicrografias de macrófagos RAW 264.7. **A**, Macrófagos não desafiados com leveduras (controle negativo); **B**, Macrófagos desafiados com *M. furfur* no intervalo de tempo 24 horas, mostrando multiplicação da levedura no interior dos macrófagos (setas), (Azul de Toluidina: A e B); **C**, Macrófagos desafiados com *M. pachydermatis*, no intervalo de tempo de 48h. Observa-se morte de macrófagos e evasão da levedura (setas), Giemsa 1000x: C).....24
- Figura 3** – Comparação entre os índices fagocíticos de macrófagos RAW 264.7 desafiados com *M. pachydermatis* ou *M. furfur* nas razões 5:1(A) e 2:1(B) (leveduras:macrófagos) nos intervalos de tempo 6h e 24h. A análise de variância (ANOVA) de uma via com pós teste de Tukey revelou * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$25
- Figura 4** – Distribuição da média de *M. pachydermatis* ou *M. furfur* fagocitadas pelos macrófagos nas razões 5:1 e 2:1 (leveduras:macrófagos) nos intervalos de tempo 6h e 24 h. A análise de variância (ANOVA) de uma via com pós teste de Tukey revelou # $p < 0,01$, comparado a todas as outras condições26
- Figura 5** – Produção de óxido nítrico por controle negativo (CTL⁻), controle positivo (CTL⁺) e macrófagos RAW 264.7 desafiados com *M. pachydermatis* ou *M. furfur* nas razões 5:1(A) e 2:1 (B) (leveduras:macrófagos), nos intervalos de tempos 0h, 6h, 24h e 48h. A análise de variância (ANOVA) de duas vias com pós teste de Bonferroni revelou ** $p < 0,01$27
- Figura 6** – Produção de TNF- α por controle negativo (CTL⁻) e por macrófagos RAW 264.7 desafiados com *M. pachydermatis* ou *M. furfur* nas razões 5:1 e 2:1 (leveduras:macrófagos), nos intervalos de tempos 0h, 6h, 24h e 48h. A análise de variância (ANOVA) de duas vias com pós teste de Bonferroni revelou ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ 28
- Figura 7** – Produção de IL-4 por controle negativo (CTL⁻) e por macrófagos RAW 264.7 desafiados com *M. pachydermatis* ou *M. furfur* nas concentrações de 5:1 e 2:1 (leveduras: macrófagos), nos intervalos de tempos 0h, 6h, 24h e 48h. A análise de variância (ANOVA) de duas vias com pós teste de Bonferroni revelou ** $p < 0,01$29

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Razões de <i>Malassezia</i> spp. e de macrófagos murinos RAW 264.7 empregadas nos ensaios | 20 |
|--|----|

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 REVISÃO DE LITERATURA | 11 |
| 2 ARTIGO | 17 |
| 2.1 Introdução..... | 17 |
| 2.2 Material e métodos | 20 |
| 2.2.1 Padronização da técnica | 20 |
| 2.2.2 Preparo da suspensão das leveduras | 20 |
| 2.2.3 Desafio de macrófagos com as leveduras | 21 |
| 2.2.4 Determinação do Índice fagocítico | 21 |
| 2.2.5 Dosagem da produção de Óxido Nítrico | 21 |
| 2.2.6 Determinação de citocinas no sobrenadante de culturas..... | 22 |
| 2.2.7 Análise estatística | 22 |
| 2.3 Resultados..... | 23 |
| 2.3.1 Padronização da técnica | 23 |
| 2.3.2 Índice fagocítico | 23 |
| 2.3.3 Óxido Nítrico | 26 |
| 2.3.4 Produção de Citocinas nos sobrenadantes..... | 27 |
| 2.3.4.1 TNF- α | 27 |
| 2.3.4.2 IL-4 | 29 |
| 2.4 Discussão | 30 |
| 2.5 Conclusões | 36 |
| REFERÊNCIAS..... | 37 |
| APÊNDICE..... | 44 |
| Apêndice A – Distribuição das amostras em placas de 24 poços..... | 44 |
| Apêndice B – Número de macrófagos que fagocitaram, média de leveduras fagocitadas e índice fagocítico nos diferentes intervalos de tempo e espécies de Malassezia..... | 45 |

1 REVISÃO DE LITERATURA

Malassezia pertence ao Reino Fungi, filo Basidiomycota, classe Malasseziomycetes, ordem Malasseziales, família Malasseziaceae, gênero *Malassezia* (WANG et al., 2014). Em vista de análises morfológicas e ultraestruturais das colônias e das células, bem como suas propriedades fisiológicas e estudos de sequências de rRNA/DNA, mudanças taxonômicas ocorreram no gênero *Malassezia* desde sua descoberta (GUÉHO-KELLERMANN; BOEKHOUT; BEGEROW, 2010).

Em 1846, Eichestedt descreveu pela primeira vez este fungo associado à pitíriase versicolor, sendo denominado em 1853 por Robin como *Microsporum furfur*, e desde então, ocorreram diversas alterações na nomenclatura (EICHESTEDT, 1846, apud ASHBEE; EVANS, 2002; ROBIN, 1853, apud ASHBEE; EVANS, 2002), sendo *Pityrosporum* a primeira taxonomia oficial reconhecida, com as espécies *P. ovale*, *P. orbiculare* e *P. pachydermatis* (apud ASHBEE; EVANS, 2002).

Em 1977, a indução da produção *in vitro* de hifas, a partir de leveduras oriundas de paciente acometido por pitíriase versicolor, permitiu a constatação de que as células arredondas e ovais produziam hifas, correspondendo a estágios diferentes de um único fungo (SALKIN; GORDON, 1977 apud ASHBEE; EVANS, 2002). Em 1990, Simmons e Guého classificaram a levedura em três espécies, *Malassezia furfur*, *Malassezia sympodialis* e *Malassezia pachydermatis*. Em 1996, através de características morfológicas, fisiológicas e genéticas o gênero foi dividido em sete espécies: *M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. slooffiae* e *M. restricta* (GUILLOT et al., 1996).

Sequenciamento genético e o estudo de diferentes genes, possibilitaram a atual classificação taxonômica com 14 espécies: *M. furfur* (1889), *M. pachydermatis* (1925), *M. sympodialis* (1990), *M. globosa* (1996), *M. obtusa* (1996), *M. restricta* (1996), *M. slooffiae* (1996), *M. dermatitis* (2002), *M. japonica* (2003), *M. nana* (2004), *M. yamatoensis* (2004), *M. caprae* (2007), *M. equina* (2007) e *M. cuniculi* (2011) (HAY; MIDGLEY, 2010; WANG et al., 2014). Recentemente, três novas espécies foram propostas, porém ainda não foram incluídas na taxonomia atual: *Malassezia brasiliensis* sp. nov. e *Malassezia psittaci* sp. nov., isoladas de psitacídeos (CABAÑES et al., 2016) e *Malassezia arunalokei* sp. nov., isolada do homem (HONNAVAR et al., 2016).

Estes fungos crescem na presença de oxigênio, podendo aderir-se a superfícies de diferentes materiais, inclusive ao plástico de cateteres, formando biofilmes (CANIZZO et al., 2007; FIGUEIREDO et al., 2012; POWELL et al., 1984).

Algumas espécies podem se apresentar tanto na forma miceliana, quanto de levedura (BOEKHOUT et al., 2010). Estruturalmente, possuem parede espessa, comparada a outras leveduras (maior que 0,25 μm) e esta é multilamelar (ASHBEE; EVANS, 2002; CHEN; HILL, 2005). Constitui 26-37% do volume celular e a camada lipídica mais externa varia dependendo das fontes lipídicas disponíveis no meio. Sugere-se que esta camada possa desenvolver papel no processo de adesão às células e bloquear receptores de macrófagos (MITTAG, 1995). Verificou-se que este envoltório externo lipídico modulou a atividade fagocítica de macrófagos mononucleares humanos *in vitro*, limitando a fagocitose e os estímulos para a produção de citocinas (KESAVAN; HOLLAND; INGHAM, 2000). Além disso, produzem enzimas e metabólitos, como o ácido azeláico, o qual diminui a produção de reativos de oxigênio pelos fagócitos (AKAMATSU et al., 1991).

De modo geral, estas leveduras podem ser encontradas na pele e mucosas do homem e de uma grande variedade de animais homeotérmicos, fazendo parte de seu microbioma (CABAÑES, 2014; VELEGRAKI et al., 2015). Temperatura, ácidos graxos e suor influenciam o crescimento de *Malassezia* sp (AKASA et al., 2012), sendo isoladas entre 50% a 100% de indivíduos saudáveis (LEEMING; NOTMAN; HOLLAND, 1989; NAKABAYASHI; SEI; GUILLOT; 2000), normalmente de áreas úmidas da pele, ricas em glândulas sebáceas e lipídeos, tendo em vista sua afinidade a esses compostos (GUÉHO-KELLERMANN; BOEKHOUT; BEGEROW, 2010).

Estas leveduras são lipofílicas e com exceção de *M. pachydermatis*, principal espécie encontrada nos animais, todas são lipodependentes (GUÉHO-KELLERMANN; BOEKHOUT; BEGEROW, 2010). *M. pachydermatis*, *M. nana*, *M. caprae*, *M. equina* e *M. cuniculi* são consideradas zoofílicas e as outras espécies são antropofílicas (CABAÑES, 2014; VELEGRAKI et al., 2015).

No homem, a colonização da pele por leveduras do gênero *Malassezia* ocorre a partir do nascimento, pelas espécies consideradas antropofílicas (ASHBEE et al., 2002; BERNIER et al., 2002; CABANES, 2014; NAGATA et al., 2012;). Embora vivam em comensalismo, podem tornar-se patogênicas, na dependência de fatores predisponentes, como antibioticoterapia prolongada e corticoterapia sistêmica

(ASHBEE; EVANS, 2002; VELEGRAKI et al., 2015), causando, geralmente, infecções superficiais, tais como dermatite seborreica, pitíriase versicolor, dermatite atópica e foliculite (ASHBEE, 2007; ERCHIGA; HAY, 2010; TRAGIANNIDIS et al., 2010a; VELEGRAKI et al., 2015).

A fisiopatologia destas desordens continua desconhecida em função da complexa interação da levedura com a pele. Sabe-se que na pele saudável *Malassezia* sp extrai os nutrientes necessários ao seu crescimento sem causar doença, porém quando esta relação é alterada, ocorre uma modificação na expressão de enzimas envolvidas na aquisição de energia. A produção de proteases, lipases e fosfolipases (ASHBEE, 2007; CHEN; HILL, 2005; COUTINHO; PAULA, 2000), assim como a síntese de diversos componentes bioativos, que atuam via receptores aril-hidrocarbono, expressos em quase todos os tipos de células encontradas na epiderme, estão envolvidos na regulação da resposta imunológica (GAITANNIS et al., 2008; GAITANNIS et al., 2012; SUN et al., 2013; XU et al., 2007).

Embora em menor porcentagem, quando comparadas às frequências de infecções superficiais, *M. pachydermatis* e *M. furfur* são responsáveis por graves infecções invasivas no homem (TRAGIANNIDIS et al., 2010b).

Malassezia pachydermatis é uma levedura zoofílica, não lipodependente, podendo ser cultivada em meios sem adição de lipídeos, como o ágar Sabouraud dextrose (GUÉHO-KELLERMANN; BOEKHOUT; BEGEROW, 2010). É comensal em pele e mucosas de animais, particularmente de cães e gatos (BOND, GUILLOT, CABAÑES, 2010). Embora não seja isolada habitualmente do microbioma humano, pode estar presente nas superfícies cutâneas de pessoas que mantenham animais de estimação (CHANG et al., 1998).

Malassezia furfur é uma levedura lipodependente, que cresce em presença de concentrações variadas de ácidos graxos de cadeias longas, incluindo ácido oléico e seus derivados, necessitando de adição de fontes lipídicas nos meios de cultura para seu isolamento (GUÉHO-KELLERMANN; BOEKHOUT; BEGEROW, 2010). Embora seja microrganismo antropofílico, já foi isolada de forma esporádica de animais (BOND; GUILLOT; CABAÑES, 2010).

O primeiro caso de infecção sistêmica causado por *Malassezia* foi descrito em 1979 em paciente com insuficiência renal crônica submetido à diálise peritoneal, que apresentou peritonite e do qual se isolou *P. ovale* (*M. furfur*) do fluido de diálise

(WALLACE et al., 1979 apud GAITANIS et al., 2012). Em 1981, relatou-se o primeiro caso de infecção invasiva por *M. pachydermatis* em paciente diabético insulino dependente, também submetido à diálise peritoneal (FINE et al., 1983).

As infecções invasivas necessitam de fatores predisponentes que comprometam o sistema imunológico do hospedeiro, como morbididades simultâneas, doenças crônicas e infecciosas, como *diabetes mellitus* e tuberculose, respectivamente, deficiências vitamínicas, desnutrição, corticoterapia prolongada e emprego de antibacterianos de amplo espectro, dentre outros (ASHBEE; EVANS, 2002; CHEN; HILL, 2005; ZAITZ; RUIZ; SOUZA, 2000).

Na população adulta, os casos de fungemia por *Malassezia* são raros; desta forma, a sintomatologia da infecção não se encontra tão bem definida como na população infantil. Entretanto, sabe-se que a população de risco inclui pacientes trombocitopênicos, leucêmicos e pacientes submetidos a transplante de medula óssea, ou seja, indivíduos imunocomprometidos (BROWN et al., 2012). Enquanto as infecções invasivas em adultos ocorrem de forma esporádica, nas duas últimas décadas foram descritos inúmeros surtos de infecção nosocomial em unidades de terapia intensiva neonatal causados por *M. furfur* e *M. pachydermatis* (CHANG et al., 1998; DEVLIN, 2006; IATTA et al., 2013; POWELL et al., 1984; SCHLEMAN; TULLIS; BLUM, 2000; WELBEL et al., 1994). Estes surtos apresentavam como características comuns, neonatos com extrema prematuridade (26/27 semanas de idade gestacional), baixo peso ao nascimento (600/800 gramas), múltiplas comorbidades e infusão de nutrição parenteral com suplementação lipídica, por cateter venoso central (CHANG et al., 1998; CHRYSSANTHOU; BROBERGER, PETRINI, 2001; MORRISON; WEISDORF, 2000; DEVLIN, 2006; SURMONT et al., 1989; WELBEL et al., 1994). Mesmo quando o cateter encontrava-se colonizado, nenhum sinal de eritema, edema ou secreção purulenta foram verificados no sítio de entrada do mesmo (MEYERS, 1990; PIZZO, 1990). Pneumonia intersticial e trombocitopenia foram achados clínicos comuns e os sintomas mais frequentes nos casos de infecções sistêmicas foram febre acompanhada de disfunção respiratória (BARBER et al., 1993; MORRISON; WEISDORF, 2000).

O sistema imunológico tem como principal função prover proteção ao hospedeiro contra a invasão de microrganismos e a barreira física é a primeira linha de defesa contra os invasores. Assim, qualquer microrganismo que ultrapasse esta barreira ativará componentes e mecanismos do sistema imunológico inato (ABBAS,

LICHTMAN; PILLAI, 2015). A condição de prematuridade dos neonatos, relatada nos surtos citados, por si só é um fator de risco, em função da imaturidade do desenvolvimento do sistema imunológico e das funções de barreira de pele e mucosas dos tratos respiratório e gastrointestinal (CARTLIDGE, 2000; ROGNUM et al., 1992). Conquanto, a literatura seja escassa quanto à interação entre os fagócitos e as malassezias, o estudo deste processo poderia auxiliar a compreender melhor a ocorrência destes surtos.

A fagocitose é um importante mecanismo da imunidade inata responsável pela remoção de microrganismos, sendo fundamental na defesa dos diferentes organismos vertebrados. Os macrófagos atuam no processo de fagocitose e na destruição de material exógeno, interligando as respostas imunes inata e adquirida (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). São considerados as principais células fagocitárias, internalizando partículas mais rapidamente que os demais fagócitos e atuando como células apresentadoras de antígenos via complexo maior de histocompatibilidade (MHC-I e II) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Uma vez ativados, os macrófagos são a principal fonte de mediadores como citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e óxido nítrico (NO). Estes mediadores celulares induzem tanto a ativação dos próprios macrófagos, como de outras células para favorecer a destruição, degradação e/ou eliminação de microrganismos invasores ou células alteradas por agentes infecciosos, senescência ou câncer (STUART; EZEKOWITZ, 2005).

A susceptibilidade dos indivíduos às infecções fúngicas se relaciona diretamente à condição de neutropenia, reforçando o papel que os fagócitos representam na prevenção destas doenças. No entanto, pouco se conhece sobre a fagocitose de *Malassezia* spp. e quais as células responsáveis por esta função (AKAZA et al., 2012; SUZUKI et al., 1998).

Experimento realizado por Richardson e Shankland (1991) *in vitro*, demonstrou que os neutrófilos fagocitam a levedura num processo dependente do sistema complemento. Embora estes pesquisadores tenham concluído que a ação dos neutrófilos sobre *Malassezia* sp seja limitada, a interação das leveduras com as células fagocíticas possibilita a ampliação da resposta inflamatória, estimulando o recrutamento de novos fagócitos (ERWIG; GOW, 2016).

De forma semelhante, outros autores também mostraram possível papel imunorregulador da *Malassezia* em diferentes modelos experimentais.

Camundongos previamente inoculados com a levedura, posteriormente desafiados com suspensão de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, apresentaram aumento de resistência à infecção bacteriana, a qual foi associada à maior quantidade de macrófagos e também ao aumento de sua atividade bactericida (TAKAHASHI; USHIJIMA; OZAKI, 1984). Esta proteção foi comparada à induzida por *Propionibacterium acnes*, conhecido estimulador do sistema monocítico-fagocitário. No mesmo modelo experimental, estes pesquisadores avaliaram a capacidade da *Malassezia* sp na proteção de camundongos desafiados com células tumorais. A referida proteção foi evidenciada pela maior sobrevivência dos animais e pelo aumento na produção de intermediários reativos de oxigênio, que favoreceram a eliminação das células tumorais nesse modelo animal (TAKAHASHI; USHIJIMA; OZAKI, 1984).

Em contraste a estes achados, outros autores mostraram que as malassezias podem também deprimir a resposta do sistema imunológico. Várias suspensões de *M. globosa* foram incubadas com queratinócitos ou com células mononucleares de sangue periférico, verificando-se diminuição na expressão de IL-1 β (WALTERS et al., 1995). Este fato levou os pesquisadores a sugerir que a depressão desta citocina contribui para a ausência/diminuição de resposta inflamatória, como o que ocorre na pitíriase versicolor, favorecendo a evasão da resposta imunológica pelas leveduras.

Foram observadas diferenças na expressão de citocinas pró-inflamatórias desencadeadas por *Malassezia* sp em queratinócitos de humanos saudáveis, porém sua causa ainda não está clara. Inicialmente, acreditou-se que a expressão de β -1,3-glucana, principal ligante fúngico reconhecido pela dectina-1 (glicoproteína lecitina tipo-C), modulariam a expressão de citocinas pelos queratinócitos (SUZUKI et al., 1998). Entretanto, pesquisas recentes indicaram que o fator mais importante na expressão de citocinas pró-inflamatórias em queratinócitos foi a hidrofobicidade das células de *Malassezia* sp (AKASA et al., 2012; KESAVAN et al., 2000).

Assim, estes dados mostram que os mecanismos envolvidos na resposta imune contra espécies de *Malassezia* ainda são controversos e não completamente elucidados. Portanto, uma vez que os macrófagos são uma das células fagocíticas responsáveis pela primeira linha de defesa contra infecções, o estudo da função fagocítica e microbicida destas células no modelo de *Malassezia* sp pode contribuir na compreensão dos mecanismos envolvidos na resposta imune contra estes patógenos.

2 ARTIGO

2.1 Introdução

Malassezia é um gênero de leveduras que compreende 14 espécies lipofílicas e lipídeo dependentes, com exceção de *M. pachydermatis* que não necessita de lipídeos para seu crescimento. Nove destas espécies fazem parte do microbioma cutâneo do homem (*M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. dermatis*, *M. japonica* e *M. yamatoensis* (BOEKHOUT et al., 2010; VELEGRAKI et al., 2015).

As principais infecções causadas por esses microrganismos são pitíriase versicolor, dermatite seborreica, dermatite atópica e foliculite (ASHBEE; EVANS, 2002; VELEGRAKI et al., 2015). Muitas infecções fúngicas também podem ser estabelecidas a partir de trauma físico, quando as barreiras naturais são rompidas (DANKER et al., 1987; KIM et al., 1993), desse modo, se estabelece uma interface entre levedura comensal e patogênica (ASHBEE; EVANS, 2002). Embora, sejam responsáveis, na maioria das vezes, por infecções superficiais benignas, podem se constituir em importantes patógenos em pacientes imunocomprometidos (GAITANNIS et al., 2012).

O gênero *Malassezia* é um paradoxo imunológico. Em algumas circunstâncias, age como adjuvante, ativando a cascata do sistema complemento pela via clássica ou alternativa (SUZUKI et al., 1998) e elicitando ambas respostas imunes, celular e humoral em indivíduos saudáveis e com infecção (ASHBEE; EVANS, 2002; BLANCO; GARCIA, 2008). Em contraste, parece ter a habilidade não somente de evadir do sistema imune, mas deprimir a resposta dirigida a estas leveduras (ASHBEE; EVANS, 2002; CHEN; HILL, 2005).

As razões pelas quais alguns indivíduos desenvolvem doença causada por *Malassezia* sp, mas em outros permanecem como comensais são desconhecidas. Até o momento, não se determinou qualquer fator predisponente imunológico para estas doenças (ASHBEE; EVANS, 2002; CHEN; HILL, 2005).

A imunidade celular é reconhecida como de maior importância nas defesas do hospedeiro às infecções fúngicas em geral (BLANCO; GARCIA, 2008; CASADEVALL; PERFECT, 1998); entretanto, estudos prévios focados nas respostas imunes celular e humoral foram incapazes de definir diferenças

imunológicas entre indivíduos saudáveis e pacientes com dermatoses associadas à *Malassezia* sp (ASHBEE; EVANS, 2002).

Sabe-se que a epiderme, composta por queratinócitos, tem função de barreira física, e por meio da produção de citocinas ativa o sistema imune inato, onde os fagócitos assumem o papel fundamental na resposta contra patógenos fúngicos (BLANCO; GARCIA, 2008; CASADEVALL; PERFECT, 1998). No entanto, espécies de *Malassezia* podem controlar este sistema, por estimular a produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias, estabelecendo equilíbrio entre saúde e doença (AKASA et al., 2012; ERWIG; GOW, 2016; KESAVAN et al., 2000). Estas interações multifacetadas necessitam ser melhor compreendidas.

As infecções fúngicas invasivas vêm adquirindo maior importância nas últimas décadas, principalmente pelo aumento da população de indivíduos imunocomprometidos (GAITANNIS et al., 2012), cujo repertório e número de fagócitos podem variar substancialmente, resultando em proliferação acelerada dos fungos nos tecidos e elevada letalidade (QIAN et al., 1994; ROMANI et al., 1997).

A cada três milhões de pessoas infectadas anualmente por fungos, metade irá a óbito (BROWN et al., 2012), o que representa mais mortes do que aquelas causadas por tuberculose ou malária (ARMSTRONG-JAMES; MEINTJES; BROWN, 2014).

Malassezia furfur, que é antropofílica, e *M. pachydermatis*, zoofílica, são espécies envolvidas em casos de micoses invasivas em indivíduos adultos, crianças e neonatos imunocomprometidos (GAITANNIS et al., 2012). Os principais fatores de risco são a administração de nutrição parenteral lipídica, longa hospitalização em unidades de terapia intensiva e o uso de dispositivos intravenosos (ARNOW; KUSHNER, 1991; GROSSMANS; AZIMI, 1995).

Em especial, o risco de desenvolver fungemia e infecção invasiva é muito alto em neonatos prematuros com baixo peso ao nascimento, e a transmissão destas infecções pode ocorrer de forma vertical, em parto vaginal, ou horizontal, pela manipulação de terceiros pós-parto (NAGATA et al., 2012). Após a exposição do hospedeiro à levedura, outras condições como grau de prematuridade, quebra das barreiras cutâneas, presença de dispositivos invasivos e morbidades como doença de Crohn, contribuem para que a colonização se estabeleça (BENJAMIN et al., 2016; GAITANNIS et al., 2012). Já foram descritos inúmeros surtos de infecção causada por *M. furfur* e *M. pachydermatis* em neonatos nas condições acima

descritas, com elevada letalidade (ROSALES; JACKSON; ZWICK, 2004). A colonização e proliferação da *Malassezia* sp pode levar à formação de biofilmes em cateteres para acesso venoso central, que associados a fatores iatrogênicos, que compreendem tratamentos invasivos, uso de antibacterianos de amplo espectro, administração de corticosteroides, favorecem o desenvolvimento do processo infeccioso (SHATTUCK et al., 1996; WELBEL et al., 1994).

Estabelecido o processo infeccioso sistêmico, este precisa ser tratado de imediato. No entanto, alguns eventos como o diagnóstico tardio, a falta da utilização de drogas antifúngicas específicas e a não remoção imediata do cateter venoso central produzem um mau prognóstico. As principais alterações verificadas nestes neonatos são febre, trombocitopenia e vasculite pulmonar, que habitualmente conduzem ao óbito (REDLINE et al., 1995).

A invasão dos vasos sanguíneos por estas leveduras possibilita sua interação com proteínas do soro e células fagocíticas, como neutrófilos e monócitos. Os monócitos liberam citocinas e enzimas que desempenham papel inicial nas defesas contra os fungos. Provavelmente, devido à natureza esporádica das infecções invasivas causadas por *Malassezia* spp., poucos autores estudaram a ativação dos processos de fagocitose, seu papel na indução de resposta inflamatória e, subsequente reação imune a estas leveduras (SUZUKI et al., 1998; RICHARDSON; SHANKLAND, 1991).

Desta forma, elucidar a resposta imune inata para espécies de *Malassezia* pode ser a chave para entender melhor como esses organismos vivem como comensais ou causando doença invasiva.

Em vista do exposto, foi objetivo do presente trabalho padronizar modelo *in vitro* para o estudo da resposta de macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 desafiados com *M. furfur* e *M. pachydermatis* e comparar se ocorriam diferenças nas respostas entre as espécies. Adicionalmente, foi avaliada a capacidade microbicida e imunomoduladora destes macrófagos pela dosagem de óxido nítrico e avaliação da produção de citocinas durante a fagocitose.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Padronização da técnica

Previamente ao experimento, realizou-se teste-piloto com as culturas de *M. furfur* e *M. pachydermatis* em diferentes razões (levedura:macrófago), a saber, 0,5:1, 2:1 e 5:1 em leituras realizadas aos 30min, 2h e 4h, para padronização da técnica. Desta forma, se determinou, para a pesquisa propriamente dita, a concentração de macrófagos a ser plaqueada, a relação entre o número de macrófagos e o número de leveduras das culturas, intervalos de leitura e a análise microscópica para verificação da fagocitose.

2.2.2 Preparo da suspensão das leveduras

Utilizou-se cepas-padrão de *M. furfur* CBS-1878 e *M. pachydermatis* CBS-1696 para os ensaios com macrófagos murinos RAW-264.7. As leveduras foram repicadas e mantidas em tubos com ágar Dixon modificado, incubadas a 32°C por período de 5 a 7 dias (GUÉHO-KELLERMANN; BOEKHOUT; BEGEROW, 2010). Com auxílio de alça de platina as colônias foram suspensas em meio RPMI-1640 (Gibco, USA), checando-se sua viabilidade com azul de Tripán (10 µL de corante + 10 µL da suspensão), considerando as cepas viáveis para utilização quando esse índice de vitalidade foi superior a 95%. Então, 10 µL da suspensão de leveduras foram colocados em câmara de Neubauer e contados em aumento de 400x para ajustar as razões a serem empregadas (5:1 e 2:1) (Tabela 1).

Tabela 1 – Razões de *Malassezia* spp. e de macrófagos murinos RAW 264.7 empregadas nos ensaios

| Razão levedura:macrófago | <i>Malassezia furfur</i> ou <i>M. pachydermatis</i> | Macrófagos murinos RAW 264.7 |
|-----------------------------|--|---------------------------------|
| 5:1 | 15 x 10 ⁵ | 3 x 10 ⁵ |
| 2:1 | 6 x 10 ⁵ | 3 x 10 ⁵ |

2.2.3 Desafio de macrófagos com as leveduras

Macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 (ATCC) foram plaqueados na concentração inicial de 3×10^5 células em lamínulas circulares de vidro de 13 mm (Knittel, Alemanha), previamente esterilizadas, dispostas em placas de 24 poços, sendo cultivados em 300 μ L de meio RPMI-1640 (Gibco, USA) adicionado de 10% de soro fetal bovino (meio R-10) e gentamicina (20 μ g/mL). As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após atingir 95% de confluência, retirou-se o meio, sendo os macrófagos lavados com PBS para remoção das células não aderidas. Em seguida, acrescentou-se 500 μ L de R-10 com as concentrações selecionadas de *M. furfur* e *M. pachydermatis* discriminadas na Tabela 1. As placas foram incubadas por uma hora a 37°C com 5% de CO₂, sendo então lavadas duas vezes com PBS para retirada das leveduras não fagocitadas, completando-se cada um dos poços com 1.000 μ L de R-10. Os poços apenas com macrófagos (3×10^5) ou macrófagos plaqueados com Zymosan (2mg/mL) se constituíram em controles negativos e positivos, respectivamente (Apêndice A). O experimento foi realizado em triplicata e em três placas para leituras às 6h, 24h e 48h. Após os períodos de incubação, as lamínulas foram removidas, lavadas com PBS e coradas com Giemsa. Os sobrenadantes foram colhidos e armazenados a -20° C, para posterior detecção dos níveis de óxido nítrico e citocinas.

2.2.4 Determinação do Índice fagocítico

Foram contados 200 macrófagos em vários campos microscópicos em aumento de 1000x (SUZUKI et al., 1998), para se determinar a porcentagem de macrófagos que internalizaram, pelo menos, uma levedura (P) e a média de leveduras no interior dos macrófagos (F). Calculou-se, então, o índice fagocítico (I), $I = P \times F$ (CAMPOS et al., 2006)

2.2.5 Dosagem da produção de Óxido Nítrico

A produção de óxido nítrico foi quantificada pelo método de Griess, considerando o acúmulo de nitritos no sobrenadante das culturas supracitadas. Uma vez que o óxido nítrico é uma molécula que possui meia-vida de poucos segundos,

usa-se a quantificação indireta desse composto; por meio da detecção de seus produtos, como nitratos e nitritos (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003).

Foram transferidos 100 µL do sobrenadante das culturas para placa de 96 poços, em duplicatas, sendo adicionado igual volume de reagente de GRIESS (NEED 0,1% em ácido acético 60% e sulfanilamida 1% em ácido acético 30%). Após 15 minutos de incubação em temperatura ambiente e ao abrigo de luz, a absorbância foi determinada em espectrofotômetro com filtro de comprimento de onda de 540 nm (Thermo Plate, Brasil). As concentrações de nitritos foram calculadas a partir de curva padrão de nitrito de sódio (NaNO_2), 0,78-100 µm e os resultados foram expressos em µmoles de nitrito para 3×10^5 macrófagos (ZHANG et al., 2011).

2.2.6 Determinação de citocinas no sobrenadante de culturas

Para se determinar a liberação de citocinas, após o descongelamento dos sobrenadantes, os mesmos foram preparados de acordo com as normas técnicas determinadas pelo fabricante do “*CBA Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit*” (BD Biosciences, CA, USA) para detecção de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN-γ e TNF-α. Sete populações de *beads* com intensidades diferentes de fluorescência são conjugadas com um anticorpo de captura específico para cada citocina, misturadas para formar o CBA. Utilizou-se 20 µL de cada amostra que foram incubados juntamente com as *beads* de captura, específicas para cada citocina, conjugadas a APC e com o anticorpo de detecção conjugado a PE, por duas horas em temperatura ambiente protegidas da luz. O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção da curva-padrão, acrescentando-se amostra *Standard*, contida no *kit*. Posteriormente, as amostras foram lavadas com *wash buffer*, centrifugadas e ressuspensas no mesmo tampão para análise de duas cores por citômetro de fluxo BD AccuriTMC6 (BD Biosciences, Mountain View, CA). Os resultados foram analisados em software de *Fcap Array* versão 5.0 e apresentados graficamente.

2.2.7 Análise estatística

As comparações estatísticas foram feitas utilizando-se análise de variância ANOVA de uma ou duas vias com pós-teste de Tukey ou Bonferroni. Todos os

valores foram relatados como média \pm erro padrão da média, com significância de 95%, considerando $p < 0,05$.

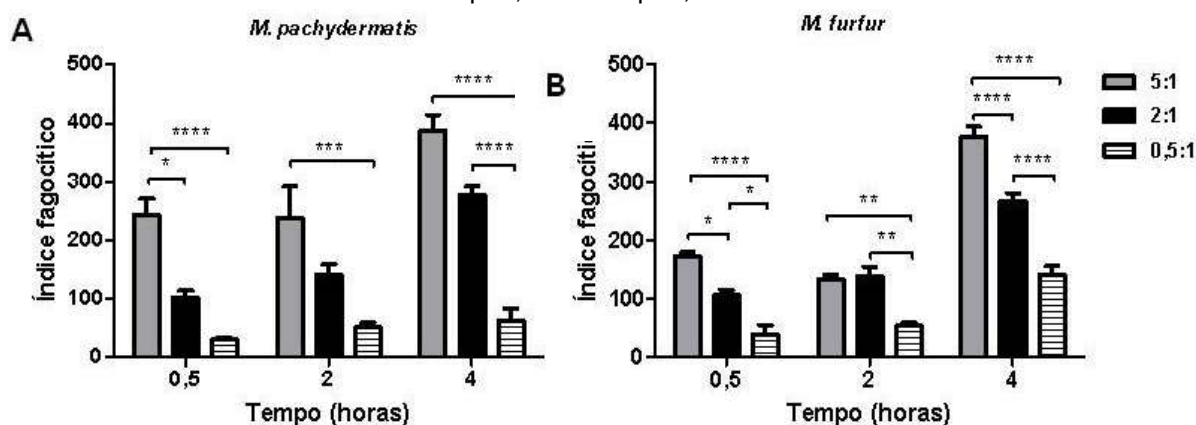
2.3 Resultados

2.3.1 Padronização da técnica

No piloto as culturas de macrófagos foram desafiadas com diferentes concentrações de *Malassezia* spp., 0,5:1, 2:1 e 5:1 (leveduras:macrófago), sendo avaliadas nos tempos 30min, 2h e 4h.

Os maiores índices fagocíticos foram obtidos nas concentrações de 5:1 e 2:1, que se elevaram a partir de 2h de cultura, com níveis de significância na concentração de 5:1 em todos os intervalos de tempo para as duas espécies de leveduras (Figura 1).

Figura 1 – Índice fagocítico de macrófagos RAW 264.7 desafiados com *M. pachydermatis* ou *M. furfur* nas razões 5:1, 2:1 e 0,5:1 (levedura:macrófago), avaliados nos tempos 30min, 2h e 4h (A e B). A análise de variância (ANOVA) de duas vias com pós teste de Bonferroni revelou * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.



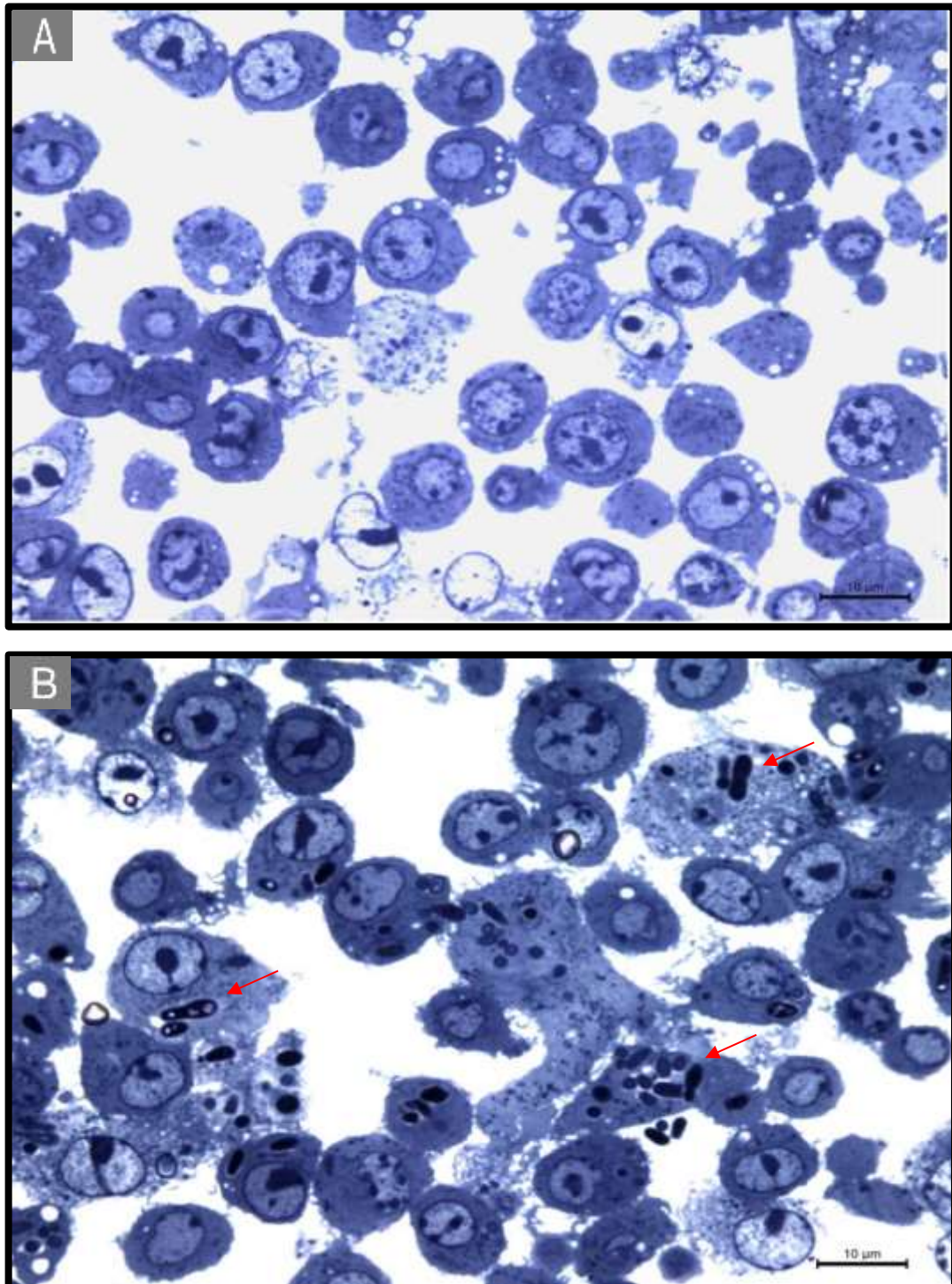
2.3.2 Índice fagocítico

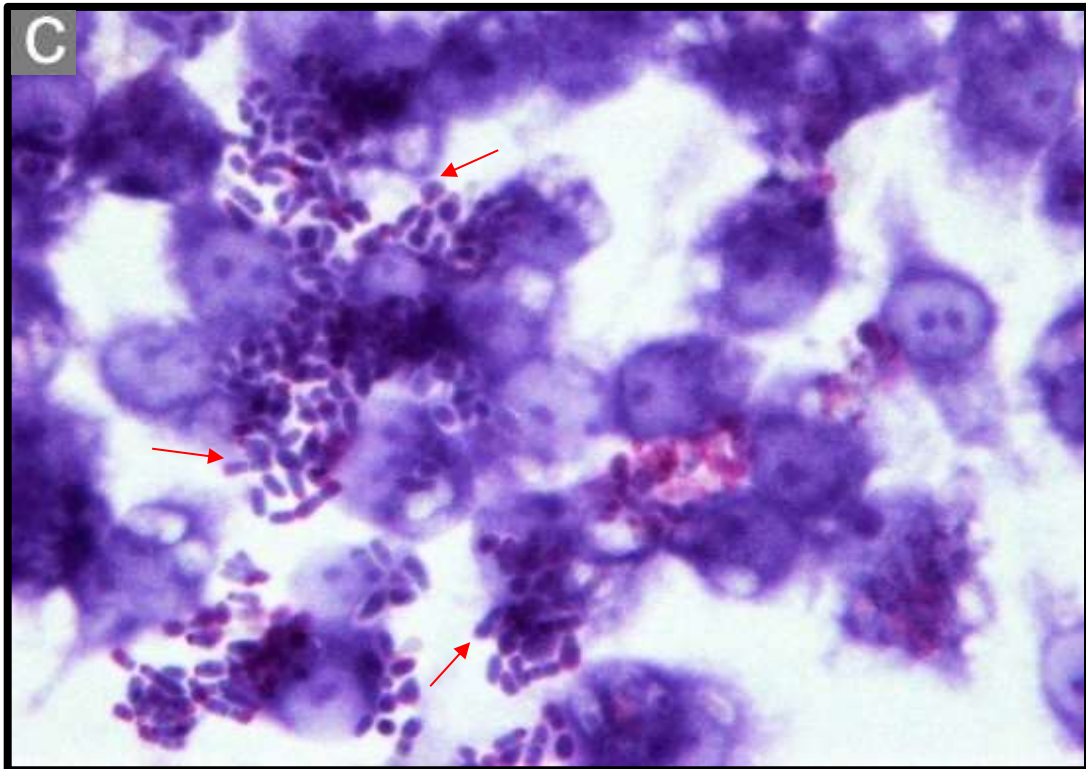
Os valores referentes ao número de macrófagos que fagocitaram, a média de leveduras fagocitadas e o índice fagocítico nos diferentes intervalos de tempo, para as duas espécies de *Malassezia* estão discriminados no Apêndice B.

A fagocitose das leveduras realizada pelos macrófagos (Figuras 2A e 2B) e o respectivo índice fagocítico se elevaram das 6h às 24h para as duas espécies (Figuras 3A e 3B), sendo estatisticamente significativa na relação 5:1 (Figura 3A).

Entretanto, após 48 horas houve considerável morte de macrófagos e exacerbada proliferação de leveduras no espaço extracelular (Figura 2C), o que impediu a obtenção do índice fagocítico nesse período.

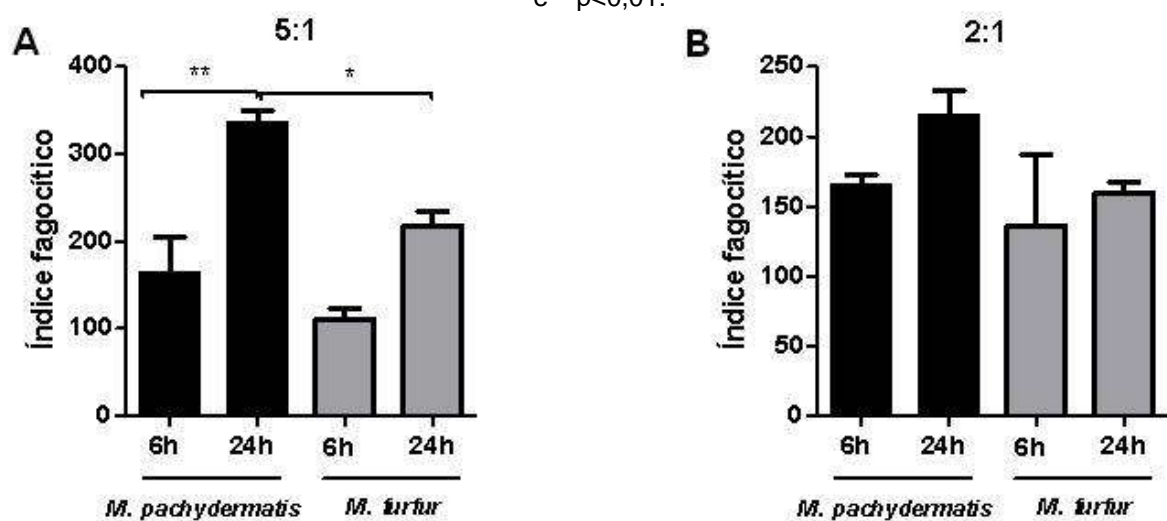
Figura 2 – Fotomicrografias de macrófagos RAW 264.7. **A**, Macrófagos não desafiados com leveduras (controle negativo); **B**, Macrófagos desafiados com *M. furfur* no intervalo de tempo 24 horas, mostrando multiplicação da levedura no interior dos macrófagos (setas), (Azul de Toluidina: A e B); **C**, Macrófagos desafiados com *M. pachydermatis*, no intervalo de tempo de 48h. Observa-se morte de macrófagos e evasão da levedura (setas), Giemsa 1000x: C)





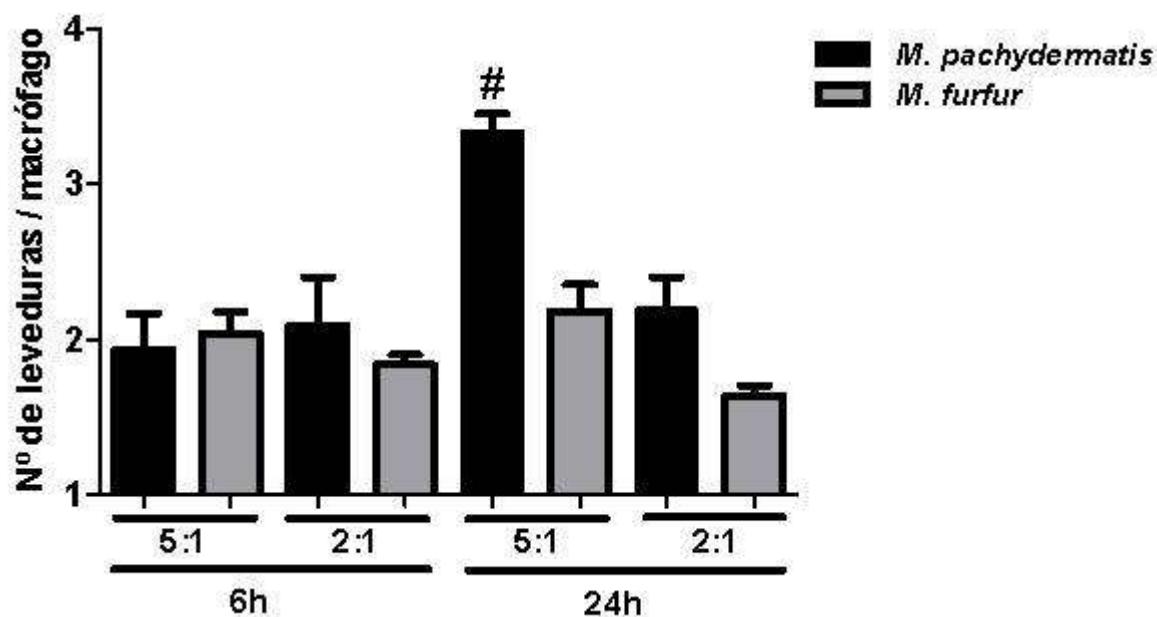
Comparando-se as duas espécies, os índices foram superiores nos macrófagos desafiados com *M. pachydermatis*, sendo significante às 24h na concentração 5:1 (Figuras 3A e 3B).

Figura 3 – Comparação entre os índices fagocíticos de macrófagos RAW 264.7 desafiados com *M. pachydermatis* ou *M. furfur* nas razões 5:1(A) e 2:1(B) (leveduras:macrófagos) nos intervalos de tempo 6h e 24h. A análise de variância (ANOVA) de uma via com pós teste de Tukey revelou * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.



Considerando-se a média de leveduras fagocitadas pelos macrófagos, evidenciou-se que este processo foi superior no desafio com *M. pachydermatis*, especialmente na concentração de 5:1 às 24h (Figura 4).

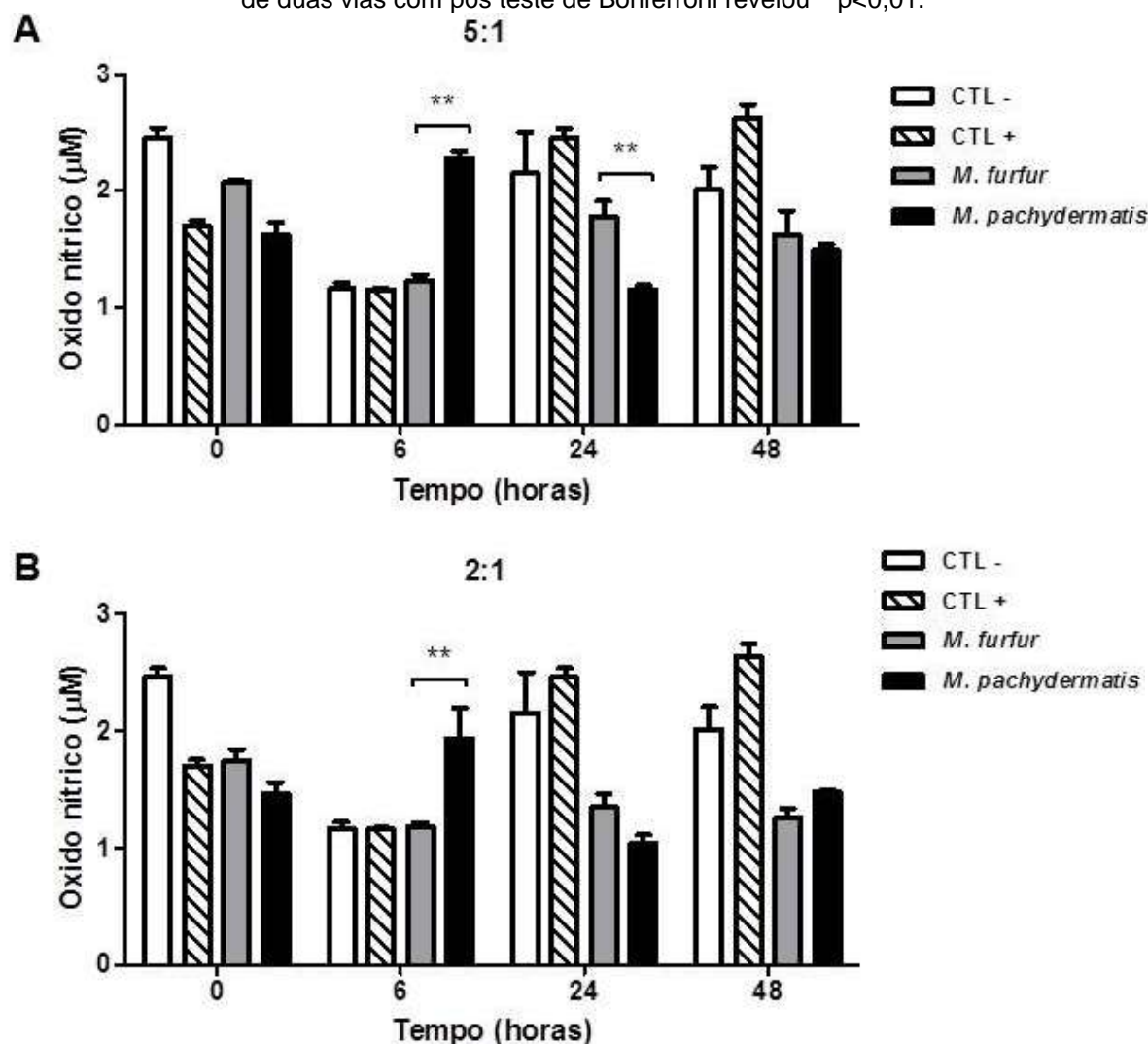
Figura 4 – Distribuição da média de *M. pachydermatis* ou *M. furfur* fagocitadas pelos macrófagos nas razões 5:1 e 2:1 (leveduras:macrófagos) nos intervalos de tempo 6h e 24 h. A análise de variância (ANOVA) de uma via com pós teste de Tukey revelou # $p < 0,01$, comparado a todas as outras condições



2.3.3 Óxido Nítrico

Verificou-se produção maior de óxido nítrico pelos macrófagos desafiados com *M. pachydermatis* às 6h, independentemente da concentração de leveduras utilizada e em 24h pelos macrófagos desafiados com *M. furfur* na concentração de 5:1 (Figuras 5A e 5B). Foram observadas grandes variações na produção de óxido nítrico nos diferentes intervalos de tempo, inclusive frente aos controles empregados (Figuras 5A e 5B).

Figura 5 – Produção de óxido nítrico por controle negativo (CTL⁻), controle positivo (CTL⁺) e macrófagos RAW 264.7 desafiados com *M. pachydermatis* ou *M. furfur* nas razões 5:1(A) e 2:1 (B) (leveduras:macrófagos), nos intervalos de tempos 0h, 6h, 24h e 48h. A análise de variância (ANOVA) de duas vias com pós teste de Bonferroni revelou **p<0,01.



2.3.4 Produção de Citocinas nos sobrenadantes

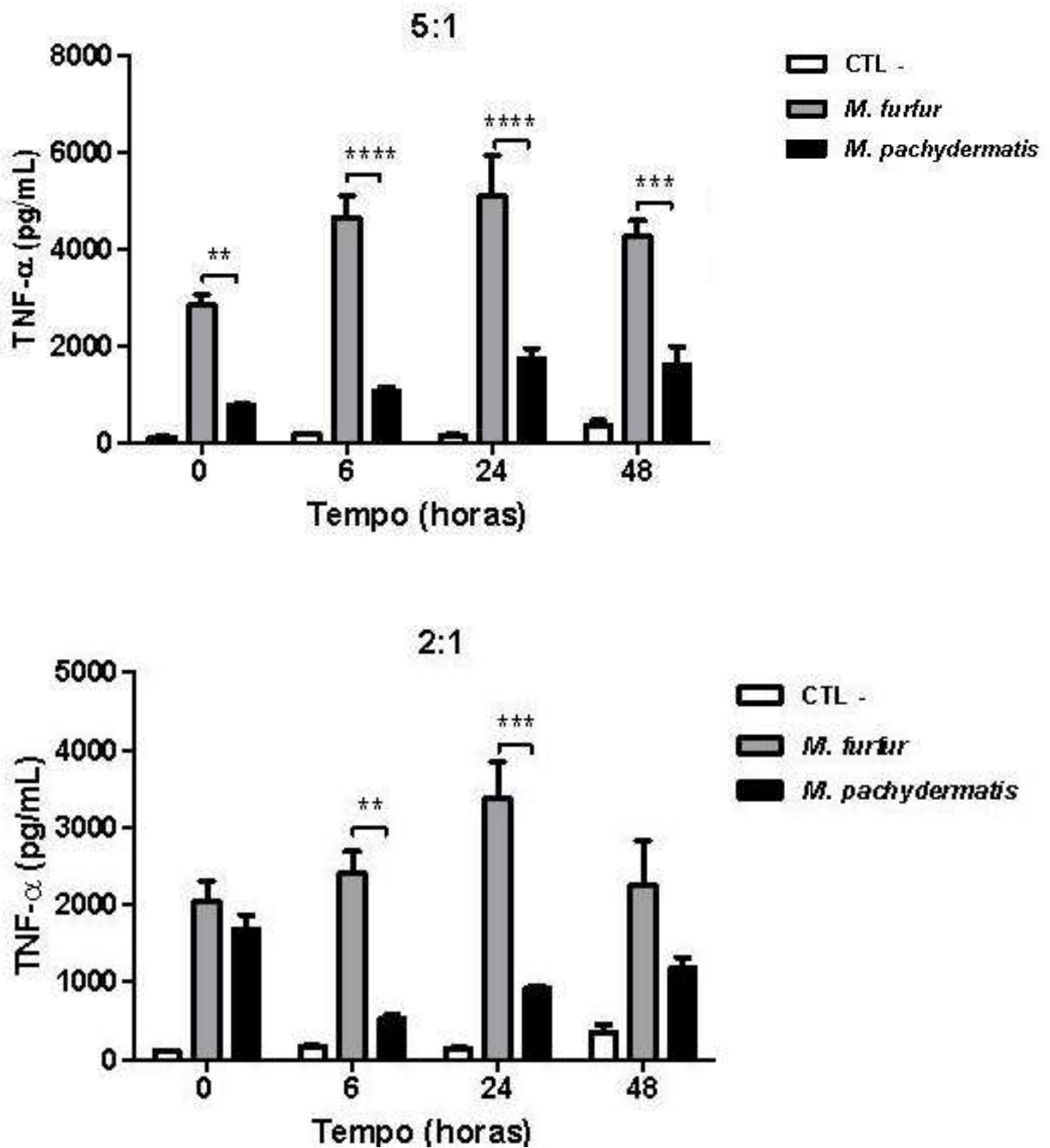
Dentre as citocinas pesquisadas no sobrenadante das culturas de macrófagos desafiados com *M. pachydermatis* ou *M. furfur* foram detectadas TNF- α e IL-4. Para as outras citocinas avaliadas não foram detectadas quantidades significativas nas culturas. No entanto, nos controles positivos, onde macrófagos foram estimulados com Zymosan detectou-se as citocinas IL-10 e IL-6, além de TNF- α e IL-4.

2.3.4.1 TNF- α

Macrófagos desafiados com *M. furfur* induziram produção de TNF- α em maior quantidade que os desafiados com *M. pachydermatis*, em todos os tempos

estudados e nas duas concentrações utilizadas, notando-se significância estatística na concentração 5:1 em todos os intervalos e, às 6h e 24h na concentração de 2:1 (Figura 6).

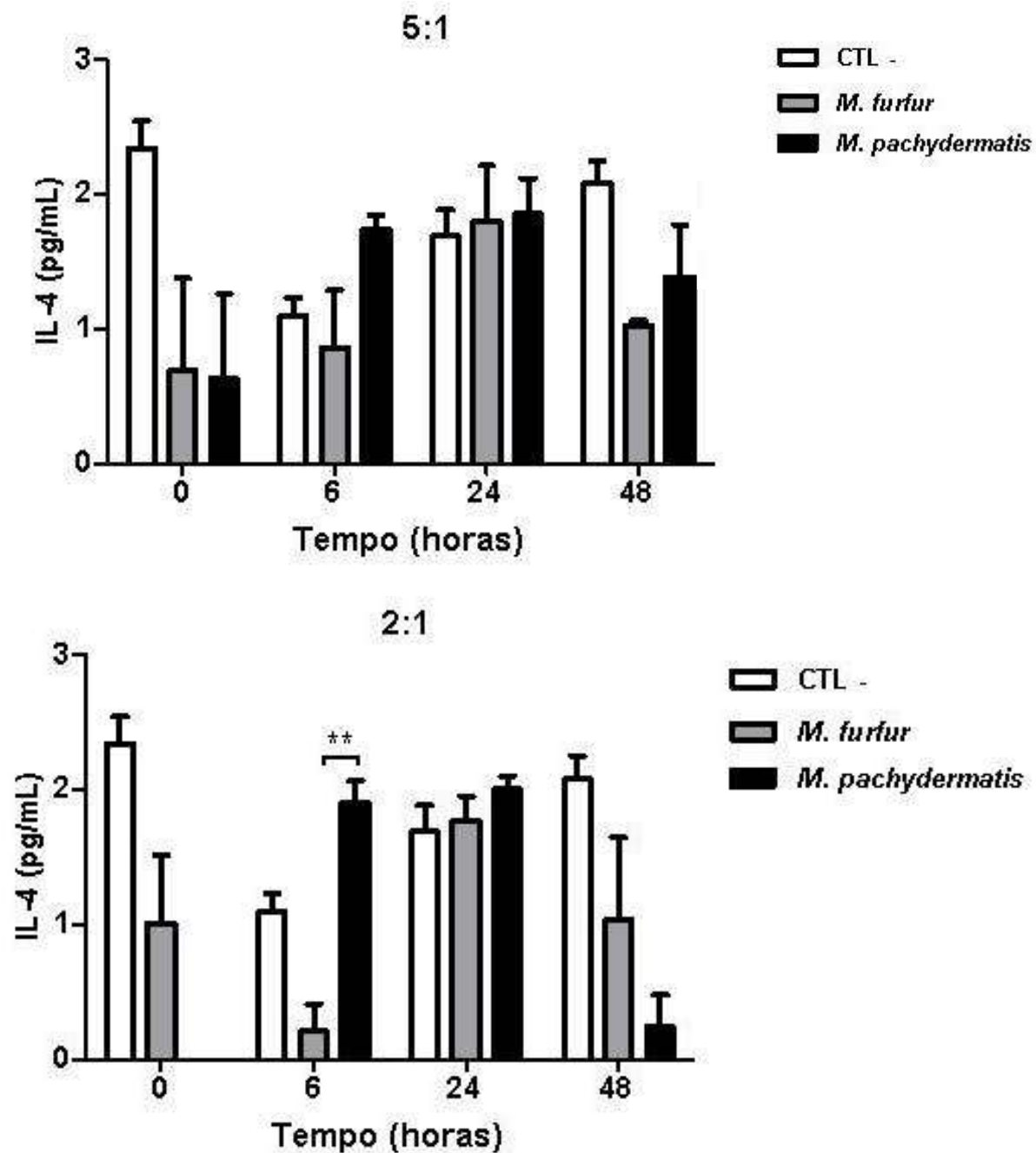
Figura 6 – Produção de TNF- α por controle negativo (CTL) e por macrófagos RAW 264.7 desafiados com *M. pachydermatis* ou *M. furfur* nas razões 5:1 e 2:1 (leveduras:macrófagos), nos intervalos de tempos 0h, 6h, 24h e 48h. A análise de variância (ANOVA) de duas vias com pós teste de Bonferroni revelou **p<0,01, ***p<0,001 e ****p<0,0001



2.3.4.2 IL-4

De forma geral, *M. pachydermatis* estimulou maior produção de IL-4 do que *M. furfur*, observando-se significância estatística na concentração de 2:1 após 6h de cultura.

Figura 7 – Produção de IL-4 por controle negativo (CTL) e por macrófagos RAW 264.7 desafiados com *M. pachydermatis* ou *M. furfur* nas concentrações de 5:1 e 2:1 (leveduras: macrófagos), nos intervalos de tempos 0h, 6h, 24h e 48h. A análise de variância (ANOVA) de duas vias com pós teste de Bonferroni revelou ** $p < 0,01$.



2.4 Discussão

A imunidade inata é instrumento para o desenvolvimento de resposta imune adaptativa mediada por células, controlando infecções fúngicas ou a progressão da doença (BLANCO; GARCIA, 2008). Ela possibilita às células fagocíticas habilidade para fagocitar ou inibir o crescimento de fungos, assim como inicia uma reação inflamatória aguda ou apresenta antígenos fúngicos às células T (ASHBEE; EVANS, 2002). Sabe-se que os macrófagos residentes nos tecidos desempenham papel chave neste processo, os quais podem fagocitar células fúngicas, iniciar a apresentação de antígenos, assim como secretar citocinas e outras moléculas que modulam a reação inflamatória à infecção (ASHBEE; EVANS, 2002; ROMANI, 2004).

A fagocitose pode prevenir a ocorrência de infecções sistêmicas causadas por *M. furfur*, uma vez que as leveduras seriam mortas pela atividade citolítica dos fagócitos (SUZUKI et al., 1998). Entretanto, são poucas as pesquisas que estudaram a fagocitose de *M. furfur* (RICHARDSON; SHANKLAND, 1991; SUZUKI et al., 1998) e, de acordo com a literatura disponível, esses processos não foram pesquisados com *M. pachydermatis*.

Diversos surtos nosocomiais em neonatos internados em unidades de terapia intensiva apresentando fungemia e infecções sistêmicas, foram causados por *M. furfur* e *M. pachydermatis* (BENJAMIN et al., 2016; CHANG et al., 1998; DEVLIN, 2006; SHATTUCK et al., 1996; WELBEL et al., 1994), e justificaram a escolha dos microrganismos e do protocolo experimental empregado neste projeto.

Na padronização da técnica para a determinação da razão *Malassezia*:macrófago adequada para estudos *in vitro*, observou-se fagocitose das leveduras a partir de 30 min, com aumento evidenciado às 4h e os maiores índices fagocíticos ocorreram nas razões de 5:1 e 2:1 (leveduras:macrófagos). Em vista destes resultados, optou-se no experimento propriamente dito, pela utilização das concentrações de 5:1 e 2:1, realizando-se leituras às 6h, 24h e 48h, uma vez que, além do índice fagocítico, seriam também medidas as concentrações de óxido nítrico e citocinas.

Os índices fagocíticos foram superiores para *M. pachydermatis*, em especial na concentração de 5:1 às 24h, o qual foi estatisticamente superior aos índices de *M. furfur*. Porém, as razões para este fenômeno ainda não estão claras, pois poucos

estudos investigaram a fagocitose de *Malassezia* spp. e aqueles que o fizeram, focaram na fagocitose realizada por células desafiadas com *M. furfur* e algumas outras espécies antropofílicas lipodependentes (AKASA et al., 2012; RICHARDSON; SHANKLAND, 1991; SUZUKI et al., 1998; WATANABE et al., 2001).

Além disso, a média de leveduras fagocitadas por macrófago também foi superior quando esses foram desafiados com *M. pachydermatis*. É essencial que as leveduras se adiram às células do hospedeiro antes de se multiplicar e manifestar sua patogenicidade (MASUDA et al., 2001). Sugere-se que na otite externa canina *M. pachydermatis* se liga às células epiteliais cornificadas por meio dos lipídeos presentes na camada mais externa da parede da levedura (MASUDA et al., 2001); talvez haja maior afinidade destes lipídeos de *M. pachydermatis* aos receptores dos macrófagos, o que justificaria maior índice fagocítico para esta espécie. Para espécies de *Candida*, verificou-se haver diferenças nos processos de fagocitose, sobrevivência no interior dos macrófagos e morte destes, indicando maior virulência de *C. albicans* (TÓTH et al., 2014); talvez também ocorram diferenças no comportamento das espécies de *Malassezia*.

Ambas espécies na concentração de 5:1 às 24h ativaram mais macrófagos do que na concentração de 2:1, resultados concordantes com o estudo realizado por Suzuki et al. (1998) que evidenciaram que a fagocitose de *M. furfur* aumentou de forma diretamente proporcional à razão leveduras:monócitos e atingiu um platô na taxa de 5:1, razão indicada pelos autores para ensaios de fagocitose de *M. furfur* e também empregada nesta pesquisa. Uma das explicações seria porque o macrófago, assim como o monócito, ao identificar a *Malassezia* sp e reconhecê-la como microrganismo por meio de ligações aos seus receptores, aumenta sua capacidade secretória (SUZUKI et al., 2000). Sabe-se que a fagocitose de fungos estimula a expressão de dectina-1 em queratinócitos, neutrófilos e macrófagos, que é o principal receptor para as β -1,3-glucanas da parede celular fúngica (AKASA et al., 2012; SUZUKI et al., 1998; WILLMENT et al., 2001). Estes macrófagos ativados aumentam suas atividades fagocíticas, dependendo da dose infectante de microrganismos e do ambiente (AKASA et al., 2012; SUZUKI et al., 1998). Assim, quanto maior a concentração de leveduras, maior a atividade fagocítica.

Neste estudo, após uma hora de contato entre os macrófagos e as malassezias, as culturas foram lavadas com PBS e, então, os períodos de avaliação passaram a ser considerados. Assim, o aumento do índice fagocítico no transcorrer

do tempo também indicou proliferação fúngica, verificando-se multiplicação intracelular das leveduras, como evidenciado na Fig. 2B.

Nas leituras de fagocitose às 48h, houve evasão das leveduras, detectando-se em microscopia óptica, grande multiplicação dos microrganismos e morte de macrófagos (Fig. 2C), quadro mais evidenciado frente à *M. pachydermatis*. A maturação normal do fagossomo culmina em um fagolisossomo ácido, contendo altos níveis de enzimas hidrolíticas. *Cryptococcus neoformans* são capazes de alterar o processo de acidificação dos fagossomos se multiplicando no interior destes (SMITH; DIXON; MAY, 2015), de impedir a fusão fagossomo-lisossomo (VECHIARELLI et al., 1994), mas tb podem ser expulsos dos macrófagos por processos de exocitose, não líticos (SMITH; DIXON; MAY, 2015). Outros fungos oportunistas, como *C. albicans* e *C. glabrata* também desenvolveram mecanismos para evadir da fagocitose, sobrevivendo e se multiplicando após a internalização, através da inibição da maturação dos fagossomos, (BENJAMIN et al., 2004; SEIDER et al., 2011; VYLKOVA, LORENZ, 2014). Em relação às malassezias, embora ocorrendo a fagocitose das leveduras, a morte pode ser ineficiente, com apenas 5% das células internalizadas mortas após 2h de fagocitose (RICHARDSON; SHANKLAND, 1991), como observado em neutrófilos humanos cultivados com *Pityrosporum ovale* (*M. furfur*). Esta levedura foi capaz de causar necrose nos neutrófilos, evidenciando completa degeneração das organelas internas e dissolução da camada mais externa da parede celular (RICHARDSON; SHANKLAND, 1991; TÓTH et al., 2014). No trabalho aqui desenvolvido, a multiplicação das leveduras e a grande quantidade de macrófagos mortos observados às 48h, demonstraram que *M. furfur* e *M. pachydermatis* têm capacidade de evadir, se multiplicar e romper os macrófagos; entretanto, ainda é necessário se determinar quais mecanismos estão envolvidos nestes processos.

Sugere-se que a camada lipídica ao redor da *Malassezia* sp deva interferir no processo de fagocitose e na proteção contra a morte da levedura pelos neutrófilos, provavelmente participando na ausência de inflamação quando a *Malassezia* sp está em seu estado comensal (KESAVAN et al., 2000). Outra razão para a sobrevivência das leveduras poderia ser a habilidade das malassezias de produzir ácido azelaico, que não interfere na quimiotaxia, nem na fagocitose, mas no metabolismo celular, diminuindo a produção de O₂ e OH por neutrófilos e reduzindo a injúria tecidual nos sítios inflamatórios (AKAMATSU et al., 1991).

Além da função de fagocitar, os macrófagos eliminam os microrganismos através da produção enzimática de espécies reativas ao oxigênio e ao nitrogênio, que são tóxicas para o agente invasor (CARLOS et al., 2003). Os compostos intermediários de nitrogênio e de oxigênio representam importantes mediadores da atividade microbicida e antitumoral dos macrófagos (XIE et al., 1997). O óxido nítrico está envolvido na modulação da citotoxicidade por macrófagos ativados, regulação da proliferação, apoptose celular e modulação da produção de citocinas (NATHAN, 1992; MARSHALL; STAMLER, 2000; BOGDAN, 2001). Estes compostos contribuem para a resposta imune inespecífica do hospedeiro nas doenças fúngicas (BALISH et al., 2005).

No experimento, ocorreu produção maior de óxido nítrico pelos macrófagos desafiados com *M. pachydermatis* às 6 h nas concentrações de 5:1 e 2:1 e em macrófagos desafiados com *M. furfur* na concentração de 5:1 às 24 horas. Observou-se que houve grandes variações na produção de óxido nítrico nos diferentes intervalos de tempo frente às duas espécies de *Malassezia* e inclusive em relação aos controles empregados, que de modo geral, produziram mais óxido nítrico que os macrófagos desafiados. Em experimento realizado por Nascimento e colaboradores (2002), avaliando a produção deste composto por macrófagos desafiados com *Paracoccidioides brasiliensis* se observou que os macrófagos de camundongos resistentes à infecção apresentaram menores níveis de produção do que aqueles susceptíveis à doença, sugerindo que nestes últimos a produção de óxido nítrico controlava a multiplicação fúngica. Entretanto, em relação às malassezias, é possível que a produção de óxido nítrico não seja o principal mecanismo pelo qual os macrófagos destruam estes fungos, ou ainda se especula que a produção de óxido nítrico seja inibida por essas leveduras, pois no intervalo de 24 horas, intervalo onde houve maior fagocitose de *M. pachydermatis*, foi também o que menos expressou produção do composto microbicida, sugerindo que quanto maior o número de *M. pachydermatis* internalizadas, maior a inibição da produção de óxido nítrico. Também não se obteve a produção de óxido nítrico em macrófagos infectados por *Trichophyton rubrum*, aventando-se que esta possa ser uma das formas dos fungos evadirem das respostas dos hospedeiros (CAMPOS et al., 2006).

Acredita-se que a *Malassezia* sp na superfície cutânea dos hospedeiros produza antígenos que podem penetrar na pele e serem capturados pelas células de Langerhans e células dendríticas apresentadoras de antígenos. Estas células

migrariam aos linfonodos regionais e apresentariam o antígeno a um linfócito T, via MHC de classe II, que em cooperação com diferentes citocinas estimularia células precursoras de linfócito T auxiliar (Th) a se diferenciar em células Th1 e/ou Th2 (CHEN; HILL, 2005). Um ambiente dominado pela liberação de IL-6, IL-12 e TNF- α favoreceria o desenvolvimento de Th1 e a consequente resposta inflamatória, enquanto IL-4 e IL-3 estimulariam as células Th2, inibindo a inflamação (KESAVAN et al., 2000).

O fator de necrose tumoral é uma das mais importantes citocinas na resposta inflamatória aguda, sendo os macrófagos e os mastócitos seus principais secretores (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). As citocinas pró-inflamatórias induzem quimiotaxia, ativação de macrófagos e indução de inflamação quando os macrófagos interagem com as células fúngicas, como verificado em relação à *M. furfur* (ASHBEE; EVANS, 2002; KESAVAN et al., 2000; SUZUKI et al., 2000) e *T. rubrum* (CAMPOS et al., 2006).

Neste estudo, *M. furfur* induziu produção de TNF- α em maior quantidade que *M. pachydermatis*, em todos os tempos estudados e nas duas concentrações propostas. Esse dado sugere que a interação de *M. furfur* com os macrófagos desencadeou resposta inflamatória, mecanismo que provavelmente ocorre quando estas leveduras se encontram em parasitismo e que poderia favorecer o recrutamento de outras células fagocíticas numa situação *in vivo*.

Já se verificou que há diferenças na produção de citocinas pró-inflamatórias por diferentes espécies de *Malassezia* lipodependentes antropofílicas (AKASA et al., 2012). Estes pesquisadores observaram aumento da produção de IL-1 α , IL-6 e IL-8 (citocinas pró-inflamatórias) em culturas de células epiteliais desafiadas com *M. furfur* e *M. globosa*, mas não com outras espécies, concluindo que cada uma das espécies de *Malassezia* pode induzir resposta inflamatória diversa, dependendo das alterações que ocorram no microambiente cutâneo (AKASA et al., 2012). Também se comprovou aumento da liberação de IL-1 α e IL-8 em monócitos desafiados com *M. furfur* (SUZUKI et al., 2000). Sugere-se que a hidrofobicidade das células de *Malassezia* spp. seja um fator importante na expressão de citocinas pró-inflamatórias, por interferir na habilidade de adesão das leveduras aos queratinócitos (AKASA et al., 2012; KESAVAN et al., 2000).

Além do TNF- α , observou-se a produção de IL-4. De modo geral, esta citocina foi produzida em níveis muito próximos por macrófagos desafiados com *M.*

pachydermatis e *M. furfur* na concentração de 5:1, destacando sua produção por macrófagos desafiados com *M. pachydermatis* no intervalo de 6 h na concentração de 2:1. A produção de IL-4 por linfócitos é essencial para a diferenciação de células Th-2, as quais inibem a reatividade de Th-1 pró-inflamatórias, como determinado em infecções causadas por *C. albicans* (ROMANI, 1999). Estes mecanismos regulatórios resultam em equilíbrio dinâmico entre os dois tipos de reações que podem operar de comensalismo a infecção (ROMANI, 1999).

A habilidade das espécies de *Malassezia* para diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias é um contraste marcante que se verifica com a maioria dos microrganismos. Referindo-se aos estudos até então realizados, parece que este fenótipo anti-inflamatório se deve aos altos níveis de lipídeos na camada externa da parede celular, que inibiriam a inflamação quando as malassezias se encontram em estado comensal (ASHBEE; EVANS, 2002; KESAVAN et al., 2000). A extração dos lipídeos da parede de *Malassezia* lipodependentes reverteu sua capacidade para reduzir a produção de IL-1 β , IL-6 e TNF- α significativamente abaixo dos níveis constituintes, propiciando as respostas inflamatórias (KESAVAN et al., 2000). Portanto, as características imunoevasivas da levedura devem ser dependentes da camada multilamelar de lipídeos ao seu redor (AKASA et al., 2002; KESAVAN et al., 2000; MITTAG, 1995).

Os mecanismos de interação entre macrófagos e fungos comensais podem ser a chave para compreender o que possibilita estes microrganismos causar doenças. A ocorrência de fagocitose de *M. furfur* e *M. pachydermatis* por macrófagos *in vitro* e a presença de citocinas pró- e anti-inflamatórias reforçam o caráter dinâmico da relação destas leveduras com o hospedeiro, atuando de forma comensal no microbioma cutâneo ou causando infecção.

2.5 Conclusões

Os resultados indicaram que *M. furfur* e *M. pachydermatis* estimularam os processos de fagocitose por macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7. O aumento do índice fagocítico ocorreu na relação leveduras:macrófagos de 5:1 e no intervalo de 24h.

Observou-se diferenças entre as espécies, verificando-se índices fagocíticos superiores quando os macrófagos foram desafiados com *M. pachydermatis*.

Macrófagos desafiados com *M. furfur* determinaram maior produção da citocina pró-inflamatória TNF- α e com *M. pachydermatis* ocorreu aumento da produção da citocina anti-inflamatória IL-4. A presença de citocinas pró- e anti-inflamatórias reforça o caráter dinâmico da relação destas leveduras com o hospedeiro.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN; A. H. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 552 p. 2015.
- AKAMATSU, H. et al. Inhibitory effect of azelaic acid on neutrophil functions: a possible cause for its efficacy in treating pathogenetically unrelated diseases. **Archives of Dermatological Research**, v. 283, p. 162-166, 1991.
- AKAZA, N. I. et al. Increased hydrophobicity in *Malassezia* species correlates with increased proinflammatory cytokine expression in human keratinocytes. **Medical Mycology**, v.50, p.802-810, 2012.
- ARMSTRONG-JAMES, D.; MEINTJES, G.; BROWN, G. D. A neglected epidemic fungal infections in HIV/AIDS. **Trends in Microbiology**, v. 22, p. 120-127, 2014.
- ARNOW, P. M.; KUSHNER, R. *Malassezia furfur* catheter infection cured with antibiotic lock therapy. **The American Journal of Medicine**, v. 90, p. 128-130, 1991.
- ASHBEE, H. R.; EVANS, E. G. V. Immunology of diseases associated with *Malassezia* species. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 21-57, 2002.
- ASHBEE, H. R. et al. Skin colonization by *Malassezia* in neonates and infants. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 23, p. 212-216, 2002.
- ASHBEE, H. R. Update on the genus *Malassezia*. **Medical mycology**, v. 45, p. 287-303, 2007.
- BALISH, E. et al. Susceptibility of germfree phagocyte oxidase- and nitric oxide synthase 2-deficient mice, defective in the production of reative metabolites of both oxygen and nitrogen, to mucosal and systemic candidiasis of endogenous origin. **Infection and immunity**, v.73, p. 1313-1320, 2005.
- BARBER, G. R. et al. Catheter-related *Malassezia furfur* fungemia in immunocompromised patients. **The American Journal of Medicine**, v. 95, p. 365-370, 1993.
- BENJAMIN, D. K. et al. Mortality following blood culture in premature infants: increased with Gram-negative bacteremia and candidemia, but not Gram-positive bacteremia. **Journal of Perinatology**, v. 24, p. 175-180, 2004.
- BENJAMIN, M. D. et al. Colonisation à levures chez les prématurés de moins de 1500g hospitalisés en réanimation néonatale. **Archives de Pédiatrie**, v. 23, p. 887-894, 2016.
- BERNIER, V. et al. Skin colonization by *Malassezia* species in neonates: a prospective study and relationship with neonatal cephalic pustulosis. **Archives of Dermatology**, v. 138, p. 215-218, 2002.

BLANCO, J. L.; GARCIA, M. E. Immune response to fungal infections. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 125, p. 47-70, 2008.

BOEKHOUT, T. et al. (Ed). ***Malassezia* and the skin: science and clinical practice**. Berlin: Springer, 2010. 318 p.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature Immunology**, v.2, p. 907-916, 2001.

BOND, R.; GUILLOT, J.; CABAÑES, F. J. *Malassezia* yeasts in animal disease. In: ***Malassezia* and the skin: science and clinical practice**. Berlin: Springer. 2010. p. 271-299.

BROWN, G. D. et al. Hidden killers: human fungal infections. **Science Translation Medicine**, v. 4, doi: 10.1126/scitranslmed.3004404, 2012.

CABAÑES, F. J. *Malassezia* yeasts: how many species infect humans and animals? **PLoS Pathogens**, v. 10, doi: 10.1371/journal.ppat.1003892, 2014.

CABAÑES, F. J. et al. New lipid-dependent *Malassezia* species from parrots. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 33, doi.org/10.1016/j.riam.2016.03.003, 2016.

CAMPOS, M. R. M. et al. Stimulation, inhibition and death of macrophages infected with *Trichophyton rubrum*. **Microbes and infection**, v. 8, p. 372-379, 2006.

CANIZZO, F.T. et al. Biofilm development by clinical isolates of *Malassezia pachydermatis*. **Medical Mycology**, v.45, p.357-361, 2007.

CARLOS, I. Z. et al. *Sporothrix schenckii* lipid inhibits macrophage phagocytosis: involvement of nitric oxide and tumor necrosis factor. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.57, p. 214-220, 2003.

CARTLIDGE, P. The epidermal barrier. In: **Seminars in neonatology**. v:5, p. 273-280. 2000.

CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*. Washigton: American Society for Microbiology Press, 1998. 541p.

CHANG, H. J. et al. An epidemic of *Malassezia pachydermatis* in an intensive care nursery associated with colonization of health care workers' pet dogs. **New England Journal of Medicine**, v. 338, p. 706-711, 1998.

CHEN, T.; HILL, P. B. The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. **Veterinary Dermatology**, v. 16, p. 4-26, 2005.

CHRYSSANTHOU, E.; BROBERGER, U.; PETRINI, B. *Malassezia pachydermatis* fungaemia in a neonatal intensive care unit. **Acta Paediatrica**, v. 90, p. 323-327, 2001.

COUTINHO, S. D.; PAULA, C. R. Proteinase, phospholipase, hyaluronidase and chondroitin-sulphatase production by *Malassezia pachydermatis*. **Medical mycology**, v. 38, p. 73-76, 2000.

DANKNER, W. M. et al. *Malassezia* fungemia in neonates and adults: complication of hyperalimentation. **Review of Infectious Diseases**, v. 9, p. 743-753, 1987.

DEVLIN, R. K. Invasive fungal infections caused by *Candida* and *Malassezia* species in the neonatal intensive care unit. **Advances in Neonatal Care**, v. 6, p. 68-77, 2006.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, p. 435-50, 2003.

EICHESTEDT, E. 1846 apud ASHBEE, H.R., EVANS, E.G.V. Immunology of diseases associated with *Malassezia* species. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 22, 2002.

ERCHIGA, V. C., HAY, R. J. Pityriasis versicolor and other *Malassezia* skin diseases. In: BOEKHOUT, T. et al. (Ed). ***Malassezia* and the skin: science and clinical practice**. Berlin: Springer, 2010. p. 175-200.

ERWIG, L.P.; GOW, N. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. **Nature Reviews**, v. 14, p. 163-176, 2016.

FIGUEREDO, L. A. et al. Biofilm formation of *Malassezia pachydermatis* from dogs. **Veterinary Microbiology**, v. 160, p. 126-131, 2012.

FINE, R. N. et al. Peritonitis in children undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. **Pediatrics**, v. 71, p. 806-809, 1983.

GAITANIS, G. et al. AhR Ligands, Malassezin, and indole [3, 2- β]; carbazole are selectively produced by *Malassezia furfur* strains isolated from seborrheic dermatitis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, p. 1620-1625, 2008.

GAITANIS G et al. The *Malassezia* genus in skin and systemic diseases. **Clinical Microbiology Review**, v. 25, p. 106–141, 2012.

GROSSMANS, M.; AZIMI, P. H. Febrile infant with a percutaneous vascular catheter. **The Pediatric Infectious Diseases Journal**, v. 14, p. 163, 1995.

GUÉHO-KELLERMANN, E.; BOEKHOUT, T.; BEGEROW, D. Biodiversity, phylogeny and ultrastructure. In: BOEKHOUT, T. et al. (Eds). ***Malassezia* and the skin: science and clinical practice**. Berlin Springer, 2010. p. 17-64.

GUILLOT, J. E. et al. Identification of *Malassezia* species: a pratic approach. **Journal du Mycologie Médicale**, v. 6, p. 103-110. 1996.

HAY, R. L., MIDGLEY, G. Introduction: *Malassezia* yeasts from a historical perspectives. In: BOEKHOUT, T. et al. (Eds). ***Malassezia and the skin: science and clinical practice***. Berlin: Springer, 2010. p. 1-16.

HONNAVAR, P. et al. *Malassezia arunalokei* sp. nov., a novel yeast species isolated from seborrhoeic dermatitis patients and healthy individuals from India. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, doi: 10.1128/00683-16, 2016.

KESAVAN, S.; HOLLAND, K. T.; INGHAM, E. The effects of lipid extraction on the immunomodulatory activity of *Malassezia* species in vitro. **Medical Mycology**, v. 38, p. 239-247, 2000.

KIM, E. H. et al. Adhesion of percutaneously inserted silastic central venous lines to the vein associated with *Malassezia furfur* infection. **Journal of Parenteral & Enteral Nutrition**, v. 17, p.458-460. 1993.

IATTA, R. et al. Bloodstream infections by *Malassezia* and *Candida* species in critical care patients. **Medical Mycology**, v.52, doi:10.1093/mmy/myt004, 2013.

LEEMING, J. P.; NOTMAN, F. H.; HOLLAND, K. T. The distribution and ecology of *Malassezia furfur* and cutaneous bacteria on human skin. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 67, p. 47-52, 1989.

MARSHALL, H. E.; STAMLER, J. S. NO waiting to exhale in asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 161, p. 685-687, 2000.

MASUDA, A et al. Attachment of *Malassezia pachydermatis* to the ear dermal cells in canine otitis externa. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 63, p. 667-669, 2001.

MEYERS, J.D. Fungal infections in bone marrow transplant patients. **Seminars in Oncology**, v. 17, p. 10-13, 1990.

MITTAG, H. Fine structural investigation of *Malassezia furfur*. II. The envelope of the yeast cells. **Mycoses**, v. 38, p. 13-21, 1995.

MORRISON, V. A.; WEISDORF, D. J. The spectrum of *Malassezia* infections in the bone marrow transplant population. **Bone Marrow Transplantation**, v. 26, p. 645-648, 2000.

NAGATA, R. et al. Transmission of the major skin microbiota, *Malassezia*, from mother to neonate. **Pediatrics International**, v. 54, p. 350–355, 2012.

NAKABAYASHI, A.; SEI, Y.; GUILLOT, J. Identification of *Malassezia* species isolated from patients with seborrhoeic dermatitis, atopic dermatitis, pityriasis versicolor and normal subjects. **Medical Mycology**, v. 38, p. 337-341, 2000.

NASCIMENTO, F. R. F. et al. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. **The Journal of Immunology**, v. 168, p. 4593-4600, 2002.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB Journal**, v. 6, p. 3051-3064, 1992.

PIZZO, P. A.; WALSH, T. J. Fungal infections in the pediatric cancer patient. **Seminars in Oncology**, v. 17, p. 6-9.1990.

POWELL, M. D. et al. Broviac catheter-related *Malassezia furfur* sepsis in five infants receiving intravenous fat emulsions. **The Journal of Pediatrics**, v. 105, p. 987-990. 1984.

QIAN, Q. et al. Elimination of mouse splenic macrophages correlates with increased susceptibility to experimental disseminated candidiasis. **Journal of Immunology**, v.152, p. 5000–5008, 1994.

REDLINE, R. W. et al. Systemic *Malassezia furfur* infections in patients receiving intralipid therapy. **Human Pathology**, v. 16, p. 815-822, 1995.

RICHARDSON, M. D.; SHANKLAND, G. S. Enhanced phagocytosis and intracellular killing of *Pityrosporum ovale* by human neutrophils after exposure to ketoconazole is correlated to changes of the yeast cell surface. **Mycoses**, v. 34, p. 29-33, 1991.

ROBIN, C., 1853 apud ASHBEE, H.R., EVANS, E. G. V. Immunology of diseases associated with *Malassezia* species. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 22, 2002.

ROGNUM, T. O. et al. Development of intestinal mucosal immunity in fetal life and the first postnatal months. **Pediatric Research**, v. 32, p. 145-149, 1992.

ROMANI, L. et al. An immunoregulatory role for neutrophils in CD4⁺ T helper subset selection in mice with candidiasis. **Journal of Immunology**, v. 158, p. 2356-2362, 1997.

ROMANI, L. Immunity to *Candida albicans*: TH1, TH2 cells and beyond. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 2, p. 363–367, 1999.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews of Immunology**. v.4, p. 1-13. 2004.

ROSALES, C. M.; JACKSON, M. A.; ZWICK, D. *Malassezia furfur* meningitis associated with total parenteral nutrition subdural effusion. **Pediatric and Developmental Pathology**, v. 7, p. 86-90. 2004.

SALKIN, F.; GORDON, M., 1977 apud ASHBEE, H. R.; EVANS, E. G. V. Immunology of diseases associated with *Malassezia* species. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 22, 2002.

SCHLEMAN, K. A.; TULLIS, G.; BLUM, R. Intracardiac mass complicating *Malassezia furfur* fungemia. **Chest Journal**, v. 118, p. 1828-1829, 2000.

SEIDER, K. et al. The facultative intracellular pathogen *Candida glabrata* subverts macrophage cytokine production and phagolysosome maturation. **The Journal of Immunology**, v. 187, p. 3072-3086, 2011.

SHATTUCK, K. E. et al. Colonization and infection associated with *Malassezia* and *Candida* species in a neonatal unit. **Journal of Hospital Infection**, v. 34, p. 123-129, 1996.

SIMMONS, R. B.; GUÉHO, E. A new species of *Malassezia*. **Mycological Research**, v. 94, p. 1146-1149, 1990.

SMITH, L. M.; DIXON, E.F.; MAY, R.C. The fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* manipulates macrophage phagosome maturation. **Cellular Microbiology**, v. 17, p. 702-713, 2015.

STUART, L. M.; EZEKOWITZ, R. A. B. Phagocytosis: elegant complexity. **Immunity**, v. 22, p. 539-550, 2005.

SUN, S. et al. Ecogenomics of human and animal basidiomycetous yeast pathogens. In: MARTIN, F. (Ed.) **The ecological genomics of fungi**, New Jersey: Wiley & Sons. 2013. p. 213-242. Disponível em <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118735893.ch10/summary>

SURMONT, I. et al. *Malassezia furfur* fungaemia in infants receiving intravenous lipid emulsions. A rarity or just underestimated? **European Journal of Pediatrics**, v. 148, p. 435-438, 1989.

SUZUKI, T. et al. Soluble mannan and L-glucan inhibit the uptake of *Malassezia furfur* by human monocytic cell line, THP-1. **FEMS Immunology and Microbiology**, v.21, p. 223-230. 1998.

SUZUKI, T. et al. Enhancement of IL-8 production from human monocytic and granulocytic cell lines, THP-1 and HL-60, stimulated with *Malassezia furfur*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 28, p. 157-162, 2000.

TAKAHASHI, M.; USHIJIMA, T.; OZAKI, Y. Biological activity of *Pityrosporum*. Enhancement of resistance in mice stimulated by *Pityrosporum* against *Salmonella typhimurium*. **Immunology**, v. 51, p. 697-702. 1984.

TÓTH, R. et al. Kinetic studies of *Candida parapsilosis* phagocytosis by macrophages and detection of intracellular survival mechanisms. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 633, 2014.

TRAGIANNIDIS, A. et al. Minireview: *Malassezia* infections in immunocompromised patients. **Mycoses**, v. 53, p. 187-195, 2010a.

TRAGIANNIDIS, A. et al. *Malassezia* fungemia, antifungal susceptibility testing and epidemiology of nosocomial infections. In: BOEKHOUT, T. et al. (Eds). **Malassezia and the skin: science and clinical practice**. Berlin: Springer, p. 229-247. 2010b.

VECHIARELLI, A. et al. Encapsulation of *Cryptococcus neoformans* regulates activity and the antigen presentation process in human alveolar macrophages. **Clinical Experimental Immunology**, v. 98, p. 217-223, 1994.

VELEGRAKI, A. et al. *Malassezia* infections in humans and animals: pathophysiology, detection, and treatment. **PLoS Pathogens** v. 11, p. 229-247, 2015.

VYLKOVA, S.; LORENZ, M. C. Modulation of phagosomal pH by *Candida albicans* promotes hyphal morphogenesis and requires Stp2p, a regulator of amino acid transport. **PLoS Pathogens** v. 10, doi.org/10.1371/journal.ppat.1003995, 2014.

WALLACE, M. et al., 1979 apud GAITANIS G et al. The *Malassezia* genus in skin and systemic diseases. **Clinical Microbiology Review**, v. 25, p. 106–141, 2012.

WALTERS, C. E. et al. In vitro modulation of keratinocyte-derived interleukin-1 alpha (IL-1 alpha) and peripheral blood mononuclear cell-derived IL-1 beta release in response to cutaneous commensal microorganisms. **Infection and Immunity**, v. 63, p. 1223-1228, 1995.

WANG, Q.-M. et al. Moniliellomycetes and Malasseziomycetes, two new classes in Ustilaginomycotina. **Persoonia**, v. 33, p. 41-47, 2014.

WATANABE, S. et al. The effects of *Malassezia* yeasts on cytokine production by human keratinocytes. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 116, p. 769-773, 2001.

WELBEL, S. F. et al. Nosocomial *Malassezia pachydermatis* bloodstream infections in a neonatal intensive care unit. **The Pediatric Infectious Diseases Journal**, v. 13, p. 104-108, 1994.

WILLMENT, J. A. et al. Characterization of the human β -glucan receptor and its alternatively spliced isoforms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 43818-43823, 2001.

XIE, Q. et al. Different susceptibility of three clinically isolated strains of *Cryptococcus neoformans* to the fungicidal effects of reactive nitrogen and oxygen intermediates: possible relationships with virulence. **Microbiology and Immunology**, v.41, p.725-731, 1997.

XU, J. et al. Dandruff-associated *Malassezia* genomes reveal convergent and divergent virulence traits shared with plant and human fungal pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, p. 18730-18735, 2007.

ZAITS, C; RUIZ, L. B.; SOUZA, V M. Dermatoses associadas às leveduras do gênero *Malassezia*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 75, p. 129-142, 2000.

ZHANG M., et al. Reversed flow injection analysis of nitrate in drinking water with UV-induced reduction to nitrite and spectrophotometric detection. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 39, p. 943-944, 2011.

APÊNDICE B – Número de macrófagos que fagocitaram, média de leveduras fagocitadas e índice fagocítico nos diferentes intervalos de tempo e espécies de *Malassezia*.

| FAGOCITOSE 6 HORAS 5:1 <i>Malassezia furfur</i> | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | Média |
| Número de Macrófagos | 97 | 92 | 155 | 114,7 |
| Número de leveduras | 226 | 184 | 280 | 230,0 |
| Média Lev/ macro | 2,3 | 2,0 | 1,8 | 2,0 |
| Índice fagocítico | 111,6 | 92,0 | 139,5 | 114,8 |
| FAGOCITOSE 6 HORAS - 5:1 <i>Malassezia pachydermatis</i> | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | Média |
| Número de Macrófagos | 174 | 151 | 195 | 173,3 |
| Número de leveduras | 411 | 151 | 404 | 322,0 |
| Média Lev/ macro | 2,4 | 1,0 | 2,1 | 1,8 |
| Índice fagocítico | 208,8 | 75,5 | 204,8 | 156,1 |
| FAGOCITOSE 6 HORAS - 2:1 <i>Malassezia furfur</i> | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | Média |
| Número de Macrófagos | 39 | 194 | 189 | 140,7 |
| Número de leveduras | 69 | 361 | 374 | 268,0 |
| Média Lev/ macro | 1,8 | 1,9 | 2,0 | 1,9 |
| Índice fagocítico | 35,1 | 184,3 | 189,0 | 133,7 |
| FAGOCITOSE 6 HORAS - 2:1 <i>Malassezia pachydermatis</i> | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | Média |
| Número de Macrófagos | 177 | 116 | 189 | 160,7 |
| Número de leveduras | 297 | 320 | 359 | 325,3 |
| Média Lev/ macro | 1,7 | 2,8 | 1,9 | 2,0 |
| Índice fagocítico | 150,5 | 162,4 | 179,6 | 160,8 |

| FAGOCITOSE 24 HORAS - 5:1 <i>Malassezia furfur</i> | | | | |
|--|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | Média |
| Número de Macrófagos | 199 | 200 | 200 | 199,7 |
| Número de leveduras | 502 | 404 | 399 | 435,0 |
| Média Lev/ macro | 2,5 | 2,0 | 2,0 | 2,2 |
| Índice fagocítico | 248,8 | 200,0 | 200,0 | 219,8 |
| FAGOCITOSE 24 HORAS - 5:1 <i>Malassezia pachydermatis</i> | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | Média |
| Número de Macrófagos | 196 | 197 | 200 | 197,7 |
| Número de leveduras | 683 | 709 | 616 | 669,3 |
| Média Lev/ macro | 3,5 | 3,6 | 3,1 | 3,4 |
| Índice fagocítico | 343,0 | 354,6 | 310,0 | 336,3 |
| FAGOCITOSE 24 HORAS - 2:1 <i>Malassezia furfur</i> | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | Média |
| Número de Macrófagos | 194 | 196 | 197 | 195,7 |
| Número de leveduras | 294 | 339 | 335 | 322,7 |
| Média Lev/ macro | 1,5 | 1,7 | 1,7 | 1,6 |
| Índice fagocítico | 145,5 | 166,6 | 167,5 | 156,6 |
| FAGOCITOSE 24 HORAS - 2:1 <i>Malassezia pachydermatis</i> | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | Média |
| Número de Macrófagos | 197 | 196 | 192 | 195,0 |
| Número de leveduras | 346 | 473 | 470 | 429,7 |
| Média Lev/ macro | 1,8 | 2,4 | 2,4 | 2,2 |
| Índice fagocítico | 177,3 | 235,2 | 230,4 | 214,5 |

| FAGOCITOSE 48 HORAS - 5:1 <i>Malassezia furfur</i> | | | | |
|---|-------|------|------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | Média |
| Número de Macrófagos | 154 | 39 | 10 | 67,7 |
| Número de leveduras | 274 | 138 | 35 | 149,0 |
| Média Lev/ macro | 1,8 | 3,5 | 3,5 | 2,2 |
| Índice fagocítico | 138,6 | 68,3 | 17,5 | 74,6 |
| FAGOCITOSE 48 HORAS - 5:1 <i>Malassezia pachydermatis</i> | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | Média |
| Número de Macrófagos | - | - | - | - |
| Número de leveduras | - | - | - | - |
| Média Lev/ macro | - | - | - | - |
| Índice fagocítico | - | - | - | - |
| FAGOCITOSE 48 HORAS - 2:1 <i>Malassezia furfur</i> | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | Média |
| Número de Macrófagos | 10 | - | - | - |
| Número de leveduras | 43 | - | - | - |
| Média Lev/ macro | 4,3 | - | - | - |
| Índice fagocítico | 21,5 | - | - | - |
| FAGOCITOSE 48 HORAS - 2:1 <i>Malassezia pachydermatis</i> | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | Média |
| Número de Macrófagos | - | - | - | - |
| Número de leveduras | - | - | - | - |
| Média Lev/ macro | - | - | - | - |
| Índice fagocítico | - | - | - | - |