

**UNIVERSIDADE PAULISTA**  
**PROGRAMA DE MESTRADO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E EXPERIMENTAL**

**ANFOTERICINA B OU ITRACONAZOL ALTERAM  
A RESPOSTA DE MACRÓFAGOS DESAFIADOS  
COM *Malassezia pachydermatis***

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.

**SUÊNIA FÉLIX RODRIGUES MANZON**

SÃO PAULO  
2019

**UNIVERSIDADE PAULISTA**  
**PROGRAMA DE MESTRADO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E EXPERIMENTAL**

**ANFOTERICINA B OU ITRACONAZOL ALTERAM  
A RESPOSTA DE MACRÓFAGOS DESAFIADOS  
COM *Malassezia pachydermatis***

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, sob orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Selene Dall'Acqua Coutinho.

**SUÊNIA FÉLIX RODRIGUES MANZON**

SÃO PAULO  
2019

Manzon, Suênia Félix Rodrigues.

Anfotericina B ou Itraconazol alteram a resposta de macrófagos desafiados com *Malassezia pachydermatis* / Suênia Félix Rodrigues Manzon. - 2019.

40 f. : il. + CD-ROM.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2019.

Área de concentração: Patogenia das Enfermidades Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Selene Dall'Acqua Coutinho.

1. Macrófagos RAW-264.7. 2. Fagocitose. 3. *Malassezia pachydermatis*. 4. Antifúngicos. 5. Citocinas. I. Coutinho, Selene Dall'Acqua (orientadora). II. Título.

**SUÊNIA FÉLIX RODRIGUES MANZON**

**ANFOTERICINA B OU ITRACONAZOL ALTERAM  
A RESPOSTA DE MACRÓFAGOS DESAFIADOS  
COM *Malassezia pachydermatis***

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.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Selene Dall'Acqua Coutinho  
Universidade Paulista - UNIP

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elizabeth Cristina Pérez Hurtado  
Universidade Paulista - UNIP

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Paula Andrea de Santis Bastos  
Universidade Metropolitana de Santos - UNIMES

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho ao meu esposo João Paulo Rodrigues Manzon, grande companheiro e apoiador, que sempre me motivou nessa trajetória acadêmica tornando as dificuldades mais leves e com quem sempre compartilharei minhas conquistas. À Suely Félix Rodrigues e Maria de Lourdes Félix, minha mãe e avó, grandes mulheres, que me guiaram pelos caminhos corretos, me ensinaram a fazer as melhores escolhas, e o dever de lutar pelo que queremos. A elas devo a pessoa que me tornei e serei sempre grata por isso.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ter me dado forças, me abençoando e guiando no caminho para que eu pudesse concluir mais uma etapa da vida.

À Universidade Paulista pela concessão de bolsa para realização dessa pesquisa.

A presente dissertação de mestrado não poderia chegar a bom porto sem o precioso apoio de várias pessoas.

À minha mãe Suely Félix Rodrigues, avó Maria de Lourdes Félix e família, minha base, meu refúgio, minha fortaleza sem as quais não seria possível tal realização.

Ao meu marido João Paulo Manzon, pelo carinho, amor, e compreensão nos momentos de extrema ansiedade, em que a dedicação aos estudos foi exclusiva.

Não posso deixar de agradecer à minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Selene, por toda a paciência, empenho, competência e sentido prático com que sempre me orientou e por abrir esse mundo da pesquisa experimental para mim. Muito obrigada por ter me corrigido quando necessário e todo respaldo dado desde sempre.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Anete Lallo, por seu empenho, envolvimento e disponibilidade para o desenvolvimento dessa pesquisa.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Anuska Marcelino, por compartilhar conhecimento e suas orientações para o aprimoramento dessa pesquisa.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elizabeth Perez, pela sua contribuição nos experimentos e compartilhamento de seus saberes.

À Dr.<sup>a</sup> Fabiana Toshie, pelos ensinamentos das técnicas de cultivo celular e rotinas do laboratório.

Agradeço às funcionárias do laboratório de Biologia Celular e Molecular da UNIP, Suzana Bezerra e Cleide Santana, por serem sempre prestativas, solícitas e organizadas, atendendo nossas demandas.

Aos doutorandos, Juan, Jéssica e Luciane, que compartilharam conhecimentos e por toda disponibilidade de sempre.

Desejo igualmente agradecer a todos os meus amigos, especialmente a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Juliana Amaral, Ms. Cristina Gabriela e Ms. Eluane de Lucas, cujo apoio, motivação e incentivo foram essenciais para o meu ingresso no Mestrado.

*“A vida é assim: esquenta e esfria,  
aperta e daí afrouxa,  
sossega e depois desinquieta.  
O que ela quer da gente é coragem”  
(Guimarães Rosa)*

## RESUMO

*Malassezia* sp é o residente eucariótico predominante do microbioma cutâneo do homem e animais homeotermos. Entretanto, *M. pachydermatis*, que é zoofílica, tem sido implicada em surtos de infecção invasiva, com alta taxa de mortalidade em neonatos em unidades de terapia intensiva, evidenciando a necessidade de estudos mais aprofundados com esta espécie em sua relação com o hospedeiro. Pesquisadores também observaram que a capacidade fagocítica e a produção de citocinas podem ser alteradas pelo uso de antimicóticos habitualmente empregados na clínica. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do itraconazol ou anfotericina B na atividade de macrófagos desafiados com *M. pachydermatis*. Macrófagos murinos da linhagem RAW-264.7 foram previamente tratados com anfotericina B (4 µg/ml) ou itraconazol (2 µg/ml) e então infectados com *M. pachydermatis* na concentração de 5:1 (leveduras:macrófagos), calculando-se os índices fagocíticos 1h e 24h após os desafios. Avaliação dos níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN-γ e TNF-α) e a viabilidade celular foram determinados por citometria de fluxo. Os resultados indicaram que em 1h o índice fagocítico foi menor para o grupo infectado tratado com o itraconazol e às 24h as células foram mais suscetíveis à proliferação de *M. pachydermatis*; o índice fagocítico não foi influenciado pelo tratamento com a anfotericina B. A viabilidade celular foi menor nos grupos infectados às 24h e a morte dos macrófagos ocorreu principalmente por necrose, quando se empregou o itraconazol. A anfotericina B induziu maior número de mortes por apoptose. O itraconazol induziu nos macrófagos produção menor de TNF-α do que a anfotericina B. O itraconazol atuou interferindo com a capacidade fagocítica e a viabilidade celular, e a anfotericina B estimulou a resposta inflamatória dos macrófagos, não interferindo na capacidade fagocítica. Os resultados obtidos indicam que a ação dos antifúngicos pode interferir na capacidade fagocítica e inflamatória, tendo impacto na função dos macrófagos murinos.

**Palavras-chave:** Macrófagos RAW-264.7; fagocitose; *Malassezia pachydermatis*; antifúngicos; citocinas.

## ABSTRACT

*Malassezia* sp is the predominant eukaryotic resident in the cutaneous microbiome of humans and other homeotherms. However, zoophilic *M. pachydermatis* has been implicated in outbreaks of invasive infection, with high mortality rates in neonates in intensive care units, highlighting the need for further studies with the relation of this species with the host. Researchers also noted that phagocytic capacity and cytokine production may be altered by the use of antimycotics commonly employed in the clinic. Therefore, the objective of this work was to evaluate the influence of itraconazole or amphotericin B on the activity of macrophages challenged with *M. pachydermatis*. Murine macrophages RAW-264.7 were previously treated with amphotericin B (4 µg/ml) or itraconazole (2 µg/ml) and then infected with *M. pachydermatis* at a 5:1 concentration (yeasts:macrophages), phagocytic indexes were calculated at 1h and 24h after the challenges. Evaluation of pro-and anti-inflammatory cytokines levels (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN-γ and TNF-α) and cell viability were determined by flow cytometry. The results indicated that at 1h the phagocytic index was lower for the infected group treated with itraconazole and at 24h the cells were more susceptible to *M. pachydermatis* proliferation; phagocytic index was not influenced by amphotericin B treatment. Cell viability was lower in the infected groups at 24h and macrophage death occurred mainly by necrosis when itraconazole was used. Amphotericin B induced a higher number of apoptosis. Itraconazole induced lower TNF-α production in macrophages than amphotericin B. Itraconazole interfered with phagocytic activity and cell viability, and amphotericin B stimulated inflammatory response, not interfering with phagocytic capacity. The results indicate that the action of antifungals may interfere with phagocytic and inflammatory capacity, impacting the function of murine macrophages.

**Keywords:** RAW-264.7 macrophages; phagocytosis; *Malassezia pachydermatis*; antifungals; cytokines.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Porcentagem de macrófagos RAW-264.7 não tratados e tratados com itraconazol ou anfotericina B que fagocitaram *M. pachydermatis* nos intervalos de 1h e 24h .....20
- Figura 2** - Distribuição do número de *M. pachydermatis* fagocitadas pelos macrófagos RAW-264.7 não tratados e tratados com itraconazol ou anfotericina B nos intervalos de 1h e 24h .....21
- Figura 3** - Índices fagocíticos de macrófagos RAW-264.7 infectados com *M. pachydermatis* não tratados e tratados com itraconazol ou anfotericina B, nos intervalos 1h e 24h .....21
- Figura 4** - Viabilidade celular de macrófagos RAW-264.7 tratados e não tratados com itraconazol ou anfotericina B, infectados e não infectados com *M. pachydermatis* nos intervalos de 1h e 24h .....22
- Figura 5** - Porcentagem de apoptose em macrófagos RAW-264.7 tratados e não tratados com itraconazol ou anfotericina B, infectados e não infectados com *M. pachydermatis* nos intervalos de 1h e 24h .....23
- Figura 6** - Porcentagem de necrose em macrófagos RAW-264.7 tratados e não tratados com itraconazol ou anfotericina B, infectados e não infectados com *M. pachydermatis* nos intervalos de 1h e 24h .....23
- Figura 7** - Produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos RAW-264.7 tratados e não tratados com itraconazol ou anfotericina B, infectados e não infectados com *M. pachydermatis* nos intervalos de 1h e 24h .....24
- Figura 8** - Produção de IL-4 por macrófagos RAW-264.7 tratados e não tratados com itraconazol ou anfotericina B, infectados e não infectados com *M. pachydermatis* nos intervalos de 1h e 24h .....25

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2. OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>16</b>
2.1 Objetivos Específicos .....	16
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
3.1 Preparo da suspensão das leveduras .....	17
3.2 Cultura de macrófagos com os antifúngicos e desafio com as leveduras .....	17
3.3 Determinação do Índice fagocítico.....	18
3.4 Avaliação da viabilidade celular .....	18
3.5 Determinação da produção de citocinas no sobrenadante de culturas .....	18
3.6 Análise estatística.....	19
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>20</b>
4.1 Capacidade fagocítica .....	20
4.2 Viabilidade celular .....	21
4.3 Produção de citocinas .....	23
4.3.1 TNF- $\alpha$ .....	24
4.3.2 IL-4.....	24
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>26</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>30</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>31</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>37</b>

## 1. INTRODUÇÃO

*Malassezia* sp é uma levedura lipídio-dependente do filo Basidiomycota que habita a pele e mucosas de humanos e animais (CELIS et al., 2017; THEELEN et al., 2018). É o residente eucariótico predominante da pele humana, mas também está associada a distúrbios comuns da pele (CELIS et al., 2017; THEELEN et al., 2018).

*Malassezia* sp é constituída por uma parede espessa e multilamelar, que varia de acordo com a fonte lipídica disponível no meio. A superfície interna da parede celular é enrugada, correspondendo a invaginações da membrana plasmática (GUÉHO-KELLERMANN; BOEKHOUT; BEGEROW, 2010; CELIS et al., 2017).

Todas as espécies de *Malassezia* são lipofílicas e lipodependentes, utilizando lipídios para o seu crescimento, com exceção de *M. pachydermatis*, que não apresenta lipodependência (THEELEN et al., 2018). As espécies de *Malassezia* produzem lipoxigenase, ácido azeláico, gama-lactona, lipase, fosfolipase e hidrolase (CELIS et al., 2017; PATIÑO-UZCÁTEGUI et al., 2011). A lipase é extremamente importante para sobrevivência das espécies lipídio-dependentes, pois essa enzima atua na produção de ácidos graxos livres que são absorvidos pela levedura (CELIS et al., 2017; MAYSER; GAITANIS, 2010).

Nos últimos anos, emergiu uma variedade de ferramentas para identificação e biodescrição de *Malassezia* sp, e os métodos moleculares são os mais precisos para avaliar a diversidade dessas leveduras (SUGITA et al., 2010). Por muitas décadas, o gênero consistia de apenas duas espécies, *M. furfur* e *M. pachydermatis*, identificadas respectivamente por sua lipodependência ou não (THEELEN et al., 2018). Em 2015, foram sequenciados os genomas das 14 espécies conhecidas sendo elas: *M. japonica*, *M. yamatoensis*, *M. obtusa*, *M. furfur*, *M. dermatis*, *M. globosa*, *M. restricta* e *M. sympodialis*, que residem principalmente no microbioma cutâneo humano. As espécies *M. pachydermatis*, *M. nana*, *M. equina*, *M. caprae*, *M. slooffiae* e *M. cuniculi* são encontradas preferencialmente em animais (THEELEN et al., 2018; WU et al., 2015). No entanto, nos últimos anos, quatro novas espécies foram descritas, *M. brasiliensis* e *M. psittaci* isoladas de psitacídeos (CABAÑES et al., 2016), *M. arunalokei* presente na pele humana (HONNAVAR et al., 2016) e *M. vespertilionis*, que faz parte do microbioma de morcegos (LORCH et al., 2018).

Em mamíferos, *M. pachydermatis*, que é zoofílica, está presente no microbioma da pele e do conduto auditivo, particularmente de cães e gatos. Entretanto, a anatomia

das pinas, excesso de umidade e outros fatores podem tornar esses microrganismos patogênicos, ocasionando dermatites e otites (BOND; GUILLOT; CABAÑES, 2010). Em humanos, as espécies de *Malassezia* são comumente encontradas nas áreas do corpo ricas em glândulas sebáceas, incluindo o tronco e a região da cabeça (CELIS et al., 2017; THEELEN et al., 2018). Verificou-se que os neonatos no primeiro dia de vida já estão colonizados com espécies de *Malassezia* de genótipo similar ao das mães (NAGATA et al., 2012). Entretanto, a densidade populacional varia com a idade. A colonização permanece relativamente baixa na infância, aumentando na puberdade e vida adulta, quando a ativação das glândulas sebáceas propicia um habitat ótimo para *Malassezia* sp (CELIS et al., 2017; THEELEN et al., 2018).

Estas leveduras relacionam-se a uma diversidade de distúrbios dermatológicos superficiais (GAITANIS et al., 2012). Aceita-se que a *pityriasis versicolor* e outras dermatoses, como foliculite, dermatite seborreica, dermatite atópica e psoríase, sejam causadas diretamente por esses fungos, ou possam ocorrer de forma secundária a outros distúrbios/doenças primários (VELEGRAKI et al., 2015).

Considera-se que a ocorrência de lesões se relacione com o comprometimento do sistema imune do hospedeiro, a virulência da levedura, o emprego de antibacterianos e glicocorticoides, estilo de vida e variações ambientais, os quais favorecem o desenvolvimento de *Malassezia* sp (CELIS et al., 2017; THEELEN et al., 2018; VELEGRAKI et al., 2015).

O papel de *Malassezia* sp na homeostase e sua transição causando doenças, ainda precisa ser melhor esclarecido (ASHBEE; BOND, 2010). Demonstrou-se que *M. furfur* tem capacidade para a produção de biofilmes e apresenta hidrofobicidade, relacionada à aderência aos queratinócitos. Esses fatores de virulência podem participar na mudança do estado comensal ao patogênico (ANGIOLELLA et al., 2017).

Embora as doenças causadas por *Malassezia* spp. sejam predominantemente superficiais, existem relatos de infecções sistêmicas, causando fungemias no homem, em especial em pacientes imunocomprometidos (TRAGIANNIDIS et al., 2010a; 2010b).

Em 1981 foi descrito o primeiro caso de infecção invasiva em um neonato prematuro recebendo nutrição parenteral, o qual apresentou pneumonia resistente à antibioticoterapia e vasculite pulmonar, causadas por *M. furfur* (REDLINE; DAHMS, 1981). Após este relato, foram descritos surtos de fungemias causados por duas

espécies, *M. pachydermatis* e *M. furfur*, em unidades de terapia intensiva (UTI) de neonatos recebendo nutrição parenteral lipídica (AL-SWEIH et al., 2014; CHANG et al., 1998; CHRYSANTHOU; BROBERGER; PETRINI, 2001; ILAHI et al., 2017; SURMONT et al., 1989; WELBEL et al., 1994). Os fatores de risco nestes surtos foram baixo peso ao nascimento, ventilação mecânica, longo tempo de internação hospitalar, cateterização venosa central e alimentação parenteral lipídica (GAITANIS et al., 2012).

Foram avaliados 50 recém-nascidos internados em UTI neonatal, os quais não estavam colonizados por *Malassezia* sp no momento da entrada na unidade. Durante sua internação isolou-se *Malassezia* de 26 deles, sendo *M. furfur* a espécie predominante. Concluiu-se que a colonização por *M. furfur* poderia ser uma fonte potencial de infecção hospitalar para estes neonatos (GUPTA et al., 2014).

Apesar de predominantemente zoofílica, *M. pachydermatis* também tem sido implicada nestes surtos de infecção invasiva (AL-SWEIH et al., 2014; CHANG et al., 1998; CHRYSANTHOU; BROBERGER; PETRINI, 2001; ILAHI et al., 2017; WELBEL et al., 1994). Os cães são hospedeiros naturais de *M. pachydermatis* e aventa-se que estas leveduras tenham sido introduzidas em UTIs neonatais pelas mãos dos profissionais de saúde, após serem colonizados por seus cães de estimação e que tenha ocorrido a transmissão de *M. pachydermatis* de paciente a paciente por esses profissionais (CHANG et al., 1998). Dada a importância clínica e o impacto na saúde dos indivíduos imunocomprometidos, faz-se necessário o desenvolvimento de pesquisas que busquem elucidar aspectos da relação de *M. pachydermatis* com os seres humanos.

No que se refere ao tratamento de *Malassezia* sp, antifúngicos tópicos da classe dos azólicos podem ser indicados para as doenças cutâneas (GAITANIS et al., 2012; HALD et al., 2015; KAFFENBERGER; MATHIS; ZIRWAS, 2014; VELEGRAKI et al., 2015). As infecções sistêmicas devem ser diagnosticadas rapidamente, assim como a adoção de medidas como a retirada de cateter venoso central, a interrupção da suplementação lipídica e início imediato do tratamento. As drogas de escolha são a anfotericina B lipossomal e os derivados azólicos (LEONG et al., 2017; LORTHOLARY et al., 2013; THEELEN et al., 2018; VELEGRAKI et al., 2015).

O itraconazol é um antifúngico triazólico, assim como o fluconazol, e o voriconazol, possui amplo espectro de atividade, é bem tolerado e altamente eficaz (DE BEULE; VAN GESTEL, 2001). Age interferindo na síntese do ergosterol, que é o

principal lipídio da membrana citoplasmática dos fungos. Ele inibe a ação da enzima 14 $\alpha$ -lanosterol dimetilase, responsável pela biossíntese de ergosterol, resultando na depleção deste lipídio e ocorrendo acúmulo de lanosterol e outros esteróis metilados, levando a alterações na permeabilidade e funções da membrana fúngica (DE BEULE; VAN GESTEL, 2001).

A anfotericina B é um poliênico, produto da bactéria Gram positiva *Streptomyces nodosus* (TREJO; BENNETT, 1963). Seu efeito fungicida se dá através de sua ligação ao ergosterol da membrana fúngica, levando à desorganização desta e ocorrendo a formação de poros permeáveis à saída de água, íons e moléculas essenciais para a sobrevivência do microrganismo, como potássio, cálcio e magnésio (FILIPPIN; SOUZA, 2006; MESA-ARANGO; SCORZONI; ZARAGOZA, 2012). A anfotericina B possui o espectro mais amplo dentre os agentes antifúngicos disponíveis; porém, seu uso é limitado devido à sua nefrotoxicidade (MESA-ARANGO; SCORZONI; ZARAGOZA, 2012; VARLAM et al., 2001).

A pele é o maior órgão do corpo, desempenhando a função de barreira física, microbiana e química; além disso, o pH ácido do suor e a presença de ácidos graxos auxiliam na defesa contra os microrganismos (ASHBEE; BOND, 2010).

A imunidade inata é a primeira linha de defesa do hospedeiro contra microrganismos e os componentes desse sistema incluem as barreiras epiteliais e os leucócitos (neutrófilos, macrófagos, células NK, linfócitos e mastócitos). Deve-se ressaltar o papel dos fagócitos, principalmente os macrófagos que atuam no processo de fagocitose, apresentação de antígenos e liberação de diferentes citocinas, interligando as respostas imune inata e adquirida (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). A interação dos macrófagos com o fungo pode resultar na morte do patógeno ou sobrevivência do mesmo, através de diversos mecanismos. A princípio, o macrófago migra para o fungo por quimiotaxia, devido um microambiente propício para a movimentação dessa célula, possibilitando a interação dos padrões moleculares associados a patógenos da superfície celular do fungo (PAMP's) com receptores de reconhecimento de patógenos (PRR's) dos macrófagos, resultando na fagocitose do microrganismo (ERWIG; GOW, 2016).

Os fungos do gênero *Malassezia* têm capacidade de interagir com queratinócitos, células dendríticas, macrófagos, eosinófilos e neutrófilos (ASHBEE, 2007; CHEN; HILL, 2005). *Malassezia* sp pode liberar antígenos na superfície da pele

que são capturados por uma célula apresentadora de antígeno e apresentados a um linfócito T. Posteriormente, as citocinas presentes no ambiente determinam qual subtipo de células T será produzido: Th1, Th2 ou Th17. Um ambiente dominado pela liberação de IL-12 favorece o desenvolvimento de Th1 e a consequente resposta inflamatória, enquanto IL-4 estimula a diferenciação de células Th2, inibindo a inflamação; IL-6 e IL-23 induzem o perfil Th17, com produção de IL-17, favorecendo a inflamação e injúria tecidual (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; TRISTÃO et al., 2017).

Este comportamento paradoxal permite que essas leveduras possam causar infecções em situações de imunocomprometimento do hospedeiro, sendo consideradas organismos oportunistas (CELIS et al., 2017; THEELEN et al., 2018). Acredita-se que os lipídios de sua parede sejam um importante fator de virulência dessa levedura, pois, aparentemente, proporcionam proteção contra a fagocitose e consequentemente a diminuição da resposta inflamatória (KESAVAN; HOLLAND; INGHAM, 2000). Além disso, a adesão às células hospedeiras pode ser mediada pela hidrofobicidade da parede celular lipofílica (AKAZA et al., 2012).

Alguns autores estudaram a resposta imune à *Malassezia* spp., verificando que *M. pachydermatis* é capaz de estimular a resposta imune inata em queratinócitos humanos, reforçando seu papel como patógeno oportunista (BUOMMINO et al., 2013). Linhagens celulares de monócitos e granulócitos aumentaram a produção de IL-8, quando estimuladas com *M. furfur*, constatando que a levedura poderia ativar fagócitos e induzir resposta inflamatória (SUZUKI et al., 2000). Em pesquisa com macrófagos desafiados com *M. furfur* e *M. pachydermatis* observou-se altos índices fagocíticos; entretanto, baixa atividade microbida (MOREIRA et al., 2019; RICHARDSON; SHANKLAND, 1991).

Pesquisadores observaram que os antimicóticos anfotericina B lipossomal, itraconazol e anidulafungina estimularam a produção de citocinas pró-inflamatórias e a atividade fagocítica de monócitos humanos em um modelo *in vitro* de sépsis por *Escherichia coli* (MUENSTER et al., 2015). Em experimento da interação entre biofilmes de *Candida albicans*, fagócitos humanos e anidulafungina, observou-se que este antifúngico estimulou a liberação das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-8 (KATRAGKOU et al., 2010). Entretanto, o oposto se verificou em neutrófilos infectados com *Aspergillus fumigatus*, em que a anfotericina B e o voriconazol promoveram a

diminuição da formação de *Neutrophil Extracellular Traps* (NET's), os quais participam da morte de organismos extracelulares (DECKER et al., 2018). E outro estudo indicou que o tratamento com itraconazol tem efeito negativo nas funções dos macrófagos, o que resultaria na diminuição da resposta imune aos patógenos (NIÑO; CAUVI; DE MAIO, 2014).

Em 1991, Richardson e Shankland demonstraram que a fagocitose de *Pityrosporum ovale* por neutrófilos humanos, assim como a morte intracelular, aumentavam significativamente se o organismo era previamente exposto ao cetoconazol. Contudo, fibroblastos tiveram redução em sua capacidade fagocítica quando *M. furfur* foi pré-tratada com cetoconazol antes do desafio (BARONI et al., 2001). Não foram realizados estudos desta natureza com *M. pachydermatis*, de acordo com a bibliografia consultada.

Nota-se que o tema é controverso e necessita ser melhor estudado, uma vez que a fagocitose e a morte são etapas críticas na eliminação final dos microrganismos e a interferência nesses mecanismos deve ser considerada na avaliação da eficácia terapêutica dos agentes antifúngicos.

## **2. OBJETIVO GERAL**

Avaliar a influência do itraconazol ou anfotericina B na atividade de macrófagos desafiados com *M. pachydermatis*.

### **2.1 Objetivos Específicos**

Avaliar a capacidade fagocítica dos macrófagos;

Avaliar a viabilidade celular;

Verificar a produção de citocinas.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Preparo da suspensão das leveduras

Foi empregada a cepa-padrão de *M. pachydermatis* CBS-1696 para os ensaios com os macrófagos murinos. As leveduras foram repicadas e mantidas em tubos de ágar Sabouraud dextrose, incubadas a 32° C por período de 5 a 7 dias (GUÉHO-KELLERMANN; BOEKHOUT; BEGEROW, 2010). As colônias foram suspensas em meio RPMI-1640 (Gibco, Waltham, USA), checando-se sua viabilidade com azul de Tripán (10 µl de corante + 10 µl da suspensão), considerando as cepas viáveis para utilização quando o 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 ajuste da razão de 5:1 (leveduras:macrófagos) (MOREIRA et al., 2019).

#### 3.2 Cultura de macrófagos com os antifúngicos e desafio com as leveduras

Macrófagos murinos da linhagem RAW-264.7 (ATCC, Manassas, USA) foram plaqueados na concentração de 10<sup>5</sup> células sobre lamínulas de vidro circulares de 13 mm (Knittel, Braunschweig, Germany), previamente esterilizadas, dispostas em duas placas de 24 poços, sendo cultivados em 300 µl de meio RPMI-1640 (Gibco, Waltham, USA) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Gibco, New York, USA) (meio R-10) e gentamicina (20 µg/ml) (Hipolabor, Sabará, Brasil). As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% com CO<sub>2</sub> para adesão dos macrófagos às lamínulas. Após as células atingirem 95% de confluência, o meio foi retirado e os poços lavados com *Phosphate Buffered Saline* (PBS) para remoção das células não aderidas. Em seguida, células de poços definidos foram tratadas com itraconazol (2 µg/ml) (CEPAV, São Paulo, Brasil) ou anfotericina B (4 µg/ml) (Cristália, Itapira, Brasil) e as placas incubadas nas condições já descritas por uma noite. No dia seguinte, os poços tiveram seus sobrenadantes desprezados, sendo lavados com PBS para remoção das células não aderidas; a seguir, os macrófagos foram desafiados com *M. pachydermatis* na proporção de 5:1 (leveduras:macrófagos) e as placas incubadas por 1h a 37°C com 5% com CO<sub>2</sub>. Monoculturas de macrófagos (10<sup>5</sup>) e macrófagos tratados com os antifúngicos e não desafiados com *M. pachydermatis* constituíram-se em controles negativos; macrófagos plaqueados com *Zymosan* (2mg/ml) (Sigma-Aldrich, St..Louis,

USA) foram o controle positivo (Apêndice A). Após os intervalos de 1h e 24h, o sobrenadante foi colhido, as placas lavadas duas vezes com PBS para remoção das leveduras não fagocitadas, as lamínulas foram retiradas das placas e coradas com Giemsa para verificação da fagocitose (MOREIRA et al., 2019). Placas tratadas da mesma forma descrita, mas sem lamínulas foram utilizadas para avaliar a viabilidade celular e os sobrenadantes foram colhidos e armazenados a -20° C para posterior determinação da produção de citocinas. O experimento foi realizado em triplicata e em duas placas para leituras nos intervalos de 1h e 24h.

### **3.3 Determinação do Índice fagocítico**

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

### **3.4 Avaliação da viabilidade celular**

Após 1h e 24h do desafio com as leveduras, o sobrenadante e os macrófagos foram desaderidos com *cell scraper*, centrifugados e lavados com PBS. Em seguida, acrescentou-se 100 µl de tampão contido no *Kit 7AAD/Anexina* (BD Pharmingen™, San Diego, EUA), 1 µl de 7AAD e 1 µl de Anexina em cada amostra. Seguindo-se as recomendações do fabricante, incubou-se por 15 min protegido da luz à temperatura ambiente, acrescentando-se, a seguir, 100 µl do tampão do *kit* em cada poço e realizando-se as leituras em citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 (BD Biosciences, Mountain View, EUA). Os resultados foram analisados e apresentados graficamente.

### **3.5 Determinação da produção de citocinas no sobrenadante de culturas**

O desafio de macrófagos com leveduras e o tratamento com os antifúngicos foram realizados conforme descrito no item 3.2. Após os períodos de incubação, foi realizada a coleta e congelamento dos sobrenadantes para detecção da produção de citocinas. Após o descongelamento dos sobrenadantes, os mesmos foram preparados de acordo com as orientações do “*CBA Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit*” (BD Biosciences, Mountain View, USA) para detecção de citocinas pró e anti-inflamatórias:

IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Sete populações de *beads* com intensidades de fluorescência APC diferentes são conjugadas com um anticorpo de captura específico para cada citocina e misturadas para formar o CBA. Utilizou-se 20  $\mu$ l de cada amostra que foram incubados juntamente com as *beads* de captura específicas para cada citocina e com o anticorpo de detecção conjugado a PE, por duas horas em temperatura ambiente protegidos 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, tiveram o sobrenadante removido e foram ressuspensas no mesmo tampão para análise de duas cores por citômetro de fluxo BD Accuri™C6 (BD Biosciences, Mountain View, USA). Os resultados foram analisados em software de *Fcap Array* versão 3.0 e apresentados graficamente.

### **3.6 Análise estatística**

As comparações estatísticas foram realizadas 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  $p < 0,05$ . Os gráficos foram feitos no programa “*Graph Pad Prism*” versão 8.0 Windows® (GraphPad Software Inc, Los Angeles, EUA).

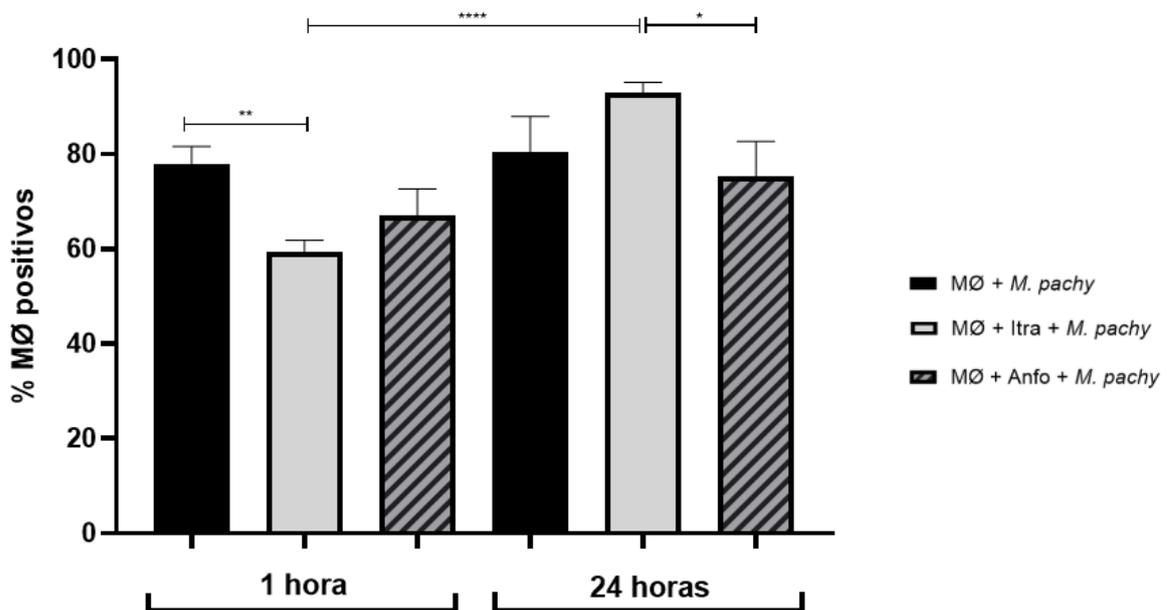
## 4. RESULTADOS

### 4.1 Capacidade fagocítica

Os valores referentes ao número de macrófagos que fagocitaram, a média de leveduras fagocitadas e o índice fagocítico nos dois intervalos para os grupos infectados com *M. pachydermatis* estão discriminados no Apêndice B.

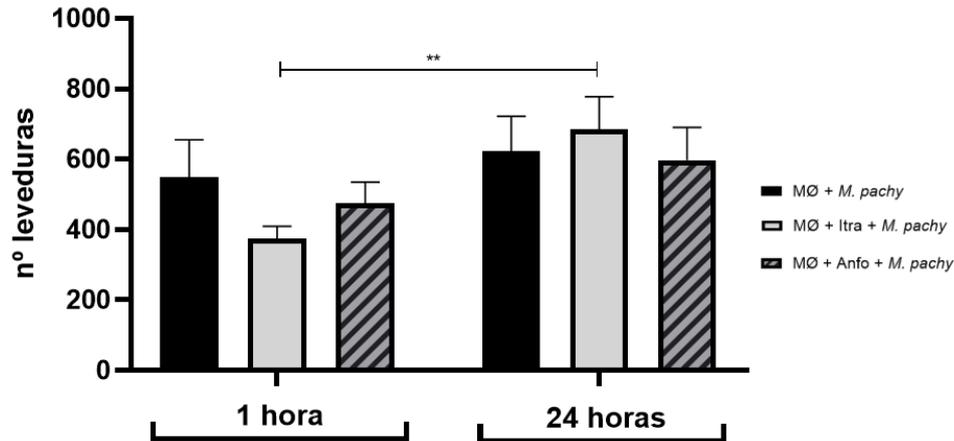
Os macrófagos que apresentaram maior atividade fagocítica, no intervalo de 1h foram aqueles não tratados com os antifúngicos (Figura 1). Macrófagos tratados com itraconazol apresentaram menor capacidade fagocítica em 1h, mas no intervalo de 24h verificou-se que maior porcentagem de macrófagos fagocitou as leveduras no grupo tratado com este fármaco, apresentando diferença significativa em relação ao tratado com anfotericina B (Figura 1).

**Figura 1** – Porcentagem de macrófagos RAW-264.7 não tratados e tratados com itraconazol ou anfotericina B que fagocitaram *M. pachydermatis* nos intervalos de 1h e 24h. Sendo, macrófagos (**MØ**) e *Malassezia pachydermatis* (**M. pachy**). Análise de variância (ANOVA) de duas vias com pós-teste de Tukey. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .



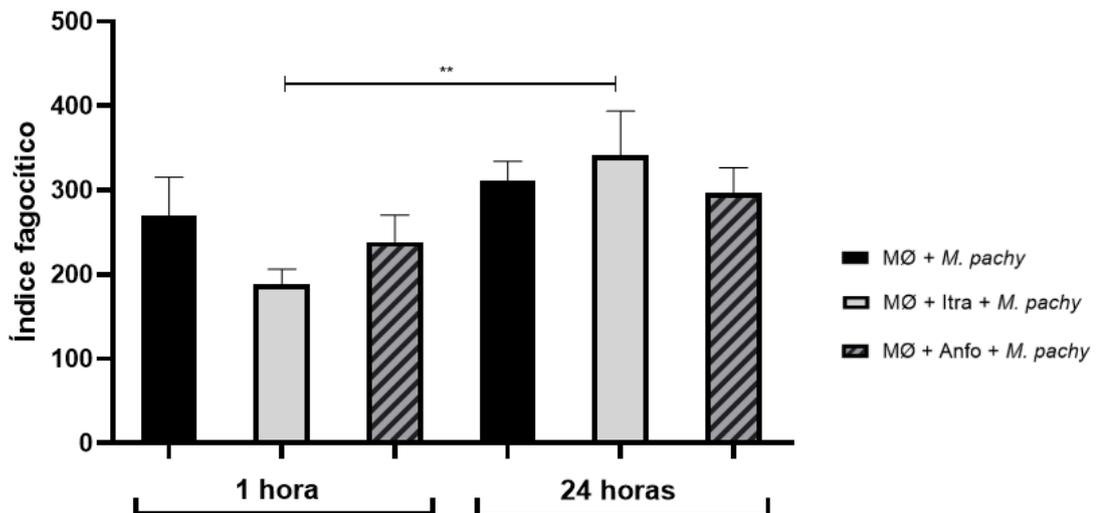
Em relação ao número de leveduras fagocitadas pelos macrófagos, verificou-se números superiores às 24h, particularmente com itraconazol (Figura 2). Quanto à média, identificou-se números similares, variando de 3,1 a 3,9 leveduras fagocitadas por macrófago, nos três grupos e intervalos (Apêndice B).

**Figura 2** – Distribuição do número de *M. pachydermatis* fagocitadas pelos macrófagos RAW-264.7 não tratados e tratados com itraconazol ou anfotericina B nos intervalos de 1h e 24h. Sendo, macrófagos (MØ) e *Malassezia pachydermatis* (*M. pachy*). Análise de variância (ANOVA) de duas vias com pós-teste de Tukey. \*\*p<0,01.



No geral, se verificou índices fagocíticos superiores às 24h, mas só foi observada diferença estatística nos macrófagos tratados com itraconazol, que apresentaram o menor índice fagocítico à 1h (Figura 3 e Apêndice B).

**Figura 3** – Índices fagocíticos de macrófagos RAW-264.7 infectados com *M. pachydermatis* não tratados e tratados com itraconazol ou anfotericina B, nos intervalos de 1h e 24h. Sendo, macrófagos (MØ) e *Malassezia pachydermatis* (*M. pachy*). Análise de variância (ANOVA) de duas vias com pós-teste de Tukey. \*\*p<0,01.

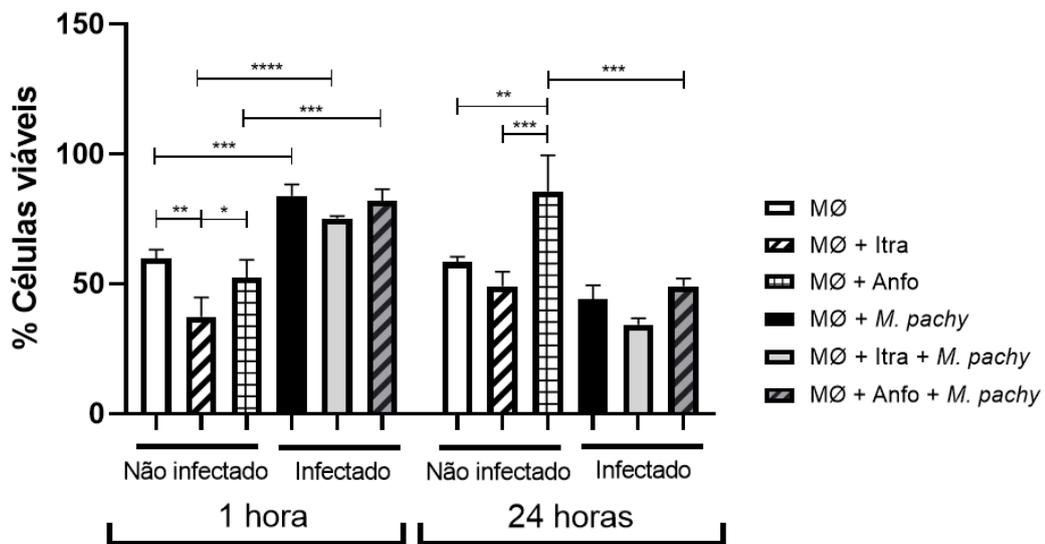


#### 4.2 Viabilidade celular

No intervalo de 1h, a viabilidade dos macrófagos foi menor nos grupos não infectados, especialmente em macrófagos tratados com itraconazol (p<0,05) (Figura 4). Às 24h, nos macrófagos infectados a viabilidade foi similar nos três grupos e os macrófagos estimulados com anfotericina B e não desafiados com *M. pachydermatis*

apresentaram maior porcentagem de células vivas ( $p < 0,05$ ) (Figura 4 e APÊNDICE C).

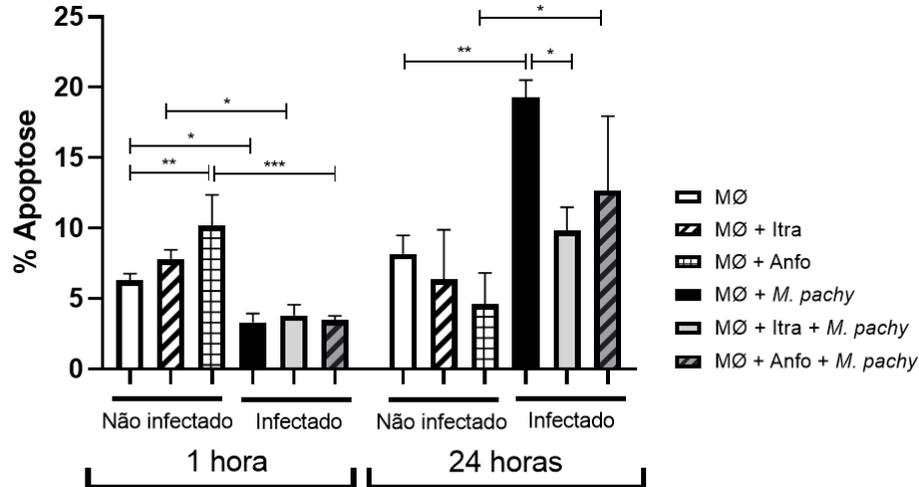
**Figura 4** – Viabilidade celular de macrófagos RAW-264.7 tratados e não tratados com itraconazol ou anfotericina B, infectados e não infectados com *M. pachydermatis* nos intervalos de 1h e 24h. Sendo, Macrófagos (**MØ**); itraconazol (**Itra**); anfotericina B (**Anfo**) e *Malassezia pachydermatis* (**M. pachy**). Análise de variância (ANOVA) de duas vias com pós-teste de Tukey. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .



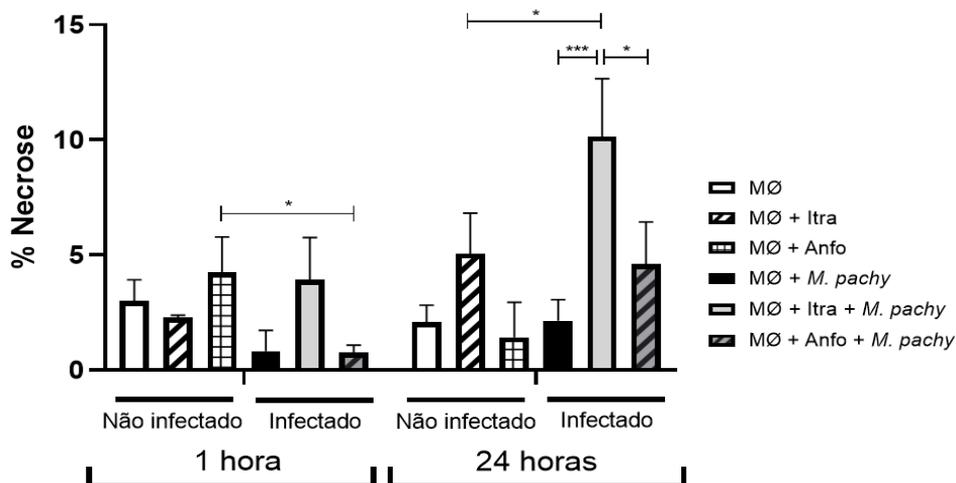
Observou-se a ocorrência de morte por apoptose em macrófagos não infectados com *M. pachydermatis* superior à verificada em macrófagos desafiados, no intervalo de 1h e com os macrófagos tratados com a anfotericina B induzindo a maior porcentagem de apoptose ( $p < 0,05$ ) (Figura 5). No intervalo de 24h, macrófagos infectados com *M. pachydermatis* mostraram maiores porcentagens de apoptose do que os não desafiados, tanto para os tratados com anfotericina B, como os sem tratamento antifúngico ( $p < 0,05$ ) (Figura 5). Os macrófagos tratados com itraconazol e infectados com a levedura, apresentaram menor índice de apoptose dentre os infectados ( $p < 0,05$ ) (Figuras 5).

No intervalo de 1h, se observou a maior porcentagem de morte por necrose em macrófagos não infectados e tratados com a anfotericina B, a qual caiu quando os macrófagos assim tratados foram infectados com *M. pachydermatis*. O oposto foi detectado em relação ao itraconazol. Às 24h, as taxas de necrose de macrófagos desafiados com *M. pachydermatis* e tratados com itraconazol e anfotericina B aumentaram (Figura 6) e a maior porcentagem de necrose ocorreu no grupo tratado com o itraconazol ( $p < 0,05$ ) (Figura 6).

**Figura 5** – Porcentagem de apoptose em macrófagos RAW-264.7 tratados e não tratados com itraconazol ou anfotericina B, infectados e não infectados com *M. pachydermatis* nos intervalos de 1h e 24h. Sendo, Macrófagos (**MØ**); itraconazol (**Itra**); anfotericina B (**Anfo**) e *Malassezia pachydermatis* (**M. pachy**). Análise de variância (ANOVA) de duas vias com pós-teste de Tukey. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .



**Figura 6** – Porcentagem de necrose em macrófagos RAW-264.7 tratados e não tratados com itraconazol ou anfotericina B, infectados e não infectados com *M. pachydermatis* nos intervalos de 1h e 24h. Sendo, Macrófagos (**MØ**); itraconazol (**Itra**); anfotericina B (**Anfo**) e *Malassezia pachydermatis* (**M. pachy**). Análise de variância (ANOVA) de duas vias com pós-teste de Tukey. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ .



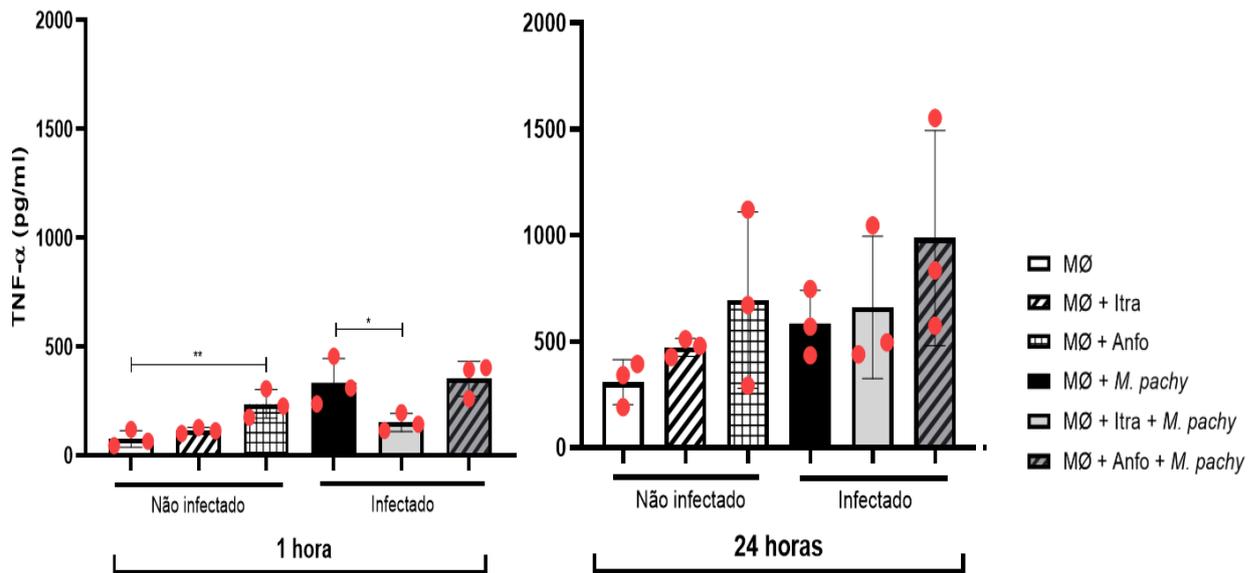
### 4.3 Produção de citocinas

Dentre as citocinas pesquisadas no sobrenadante das culturas de macrófagos não infectados e infectados com *M. pachydermatis* não tratados e tratados com antifúngicos, foram detectadas TNF- $\alpha$  e IL-4. Não foram verificadas quantidades significativas das outras citocinas avaliadas.

### 4.3.1 TNF- $\alpha$

A produção de TNF- $\alpha$  aumentou no transcorrer do tempo, apresentando maior intensidade nos grupos de macrófagos desafiados com *M. pachydermatis* (Figura 7). A anfotericina B induziu maior produção desta citocina em macrófagos infectados (Figura 7). TNF- $\alpha$  foi produzida em menor quantidade por macrófagos tratados com itraconazol e desafiados com *M. pachydermatis* no intervalo de 1h ( $p < 0,05$ ) (Figura 7).

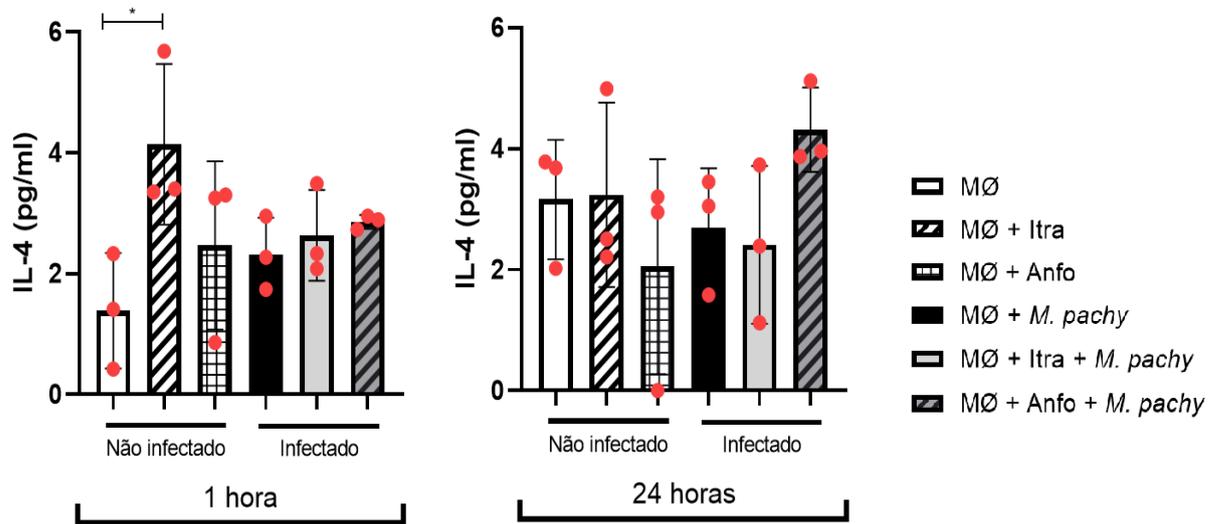
**Figura 7** – Produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos RAW-264.7, não tratados e tratados com itraconazol ou anfotericina B, não infectados e infectados com *M. pachydermatis* nos intervalos de 1h e 24h. Sendo, Macrófagos (**MØ**); itraconazol (**Itra**); anfotericina B (**Anfo**) e *Malassezia pachydermatis* (**M. pachy**). Análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste de Tukey. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .



### 4.3.2 IL-4

De modo geral, IL-4 foi detectada em pequenas quantidades, em macrófagos infectados e não com *M. pachydermatis* (Figura 8). No intervalo de 1h os macrófagos infectados apresentaram valores semelhantes na produção de IL-4, entretanto nos não infectados houve maior produção de IL-4 naqueles tratados com itraconazol ( $p < 0,05$ ) (Figura 8). Em 24h, os macrófagos tratados com anfotericina B e infectados apresentaram produção superior de IL-4 (Figura 8).

**Figura 8** – Produção de IL-4 por macrófagos RAW-264.7, não tratados e tratados com itraconazol ou anfotericina B, não infectados e infectados com *M. pachydermatis* nos intervalos de 1h e 24h. Sendo, Macrófagos (**MØ**); itraconazol (**Itra**); anfotericina B (**Anfo**) e *Malassezia pachydermatis* (**M. pachy**). Análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste de Tukey. \* $p < 0,05$ .



## 5. DISCUSSÃO

Pacientes com diminuição das funções imunológicas sucumbem mais a infecções fúngicas severas do que aqueles que são, pelo menos, parcialmente competentes (MARMER et al., 1981). Portanto, parece imperativo que os fármacos antifúngicos não interfiram na resposta imune do hospedeiro. Desse modo, o presente estudo testou dois antifúngicos que desempenham papel fungicida e/ou fungistático contra *Malassezia* sp, o itraconazol, um dos mais frequentes utilizados em infecções superficiais e a anfotericina B, o fármaco de primeira escolha em casos de infecções sistêmicas graves (CAFARCHIA et al., 2015).

Na análise da porcentagem de macrófagos que fagocitaram, o número de leveduras fagocitadas e o índice fagocítico propriamente dito, esses valores aumentaram às 24h. Uma vez que as placas foram lavadas após 1h de infecção para retirada das leveduras não fagocitadas, este aumento pode ser devido à sobrevivência das leveduras fagocitadas e sua multiplicação no interior dos macrófagos, ou à liberação de *M. pachydermatis* de macrófagos rompidos serem fagocitadas por outros viáveis.

Em 1h a porcentagem de macrófagos que fagocitou e a atividade fagocítica foram menores nos macrófagos tratados com itraconazol e essas células foram mais suscetíveis à proliferação da levedura, pois no intervalo de 24h apresentaram o maior índice fagocítico entre os grupos. Este retardo nas funções fagocíticas influenciado pelo itraconazol pode resultar em graves consequências para pacientes imunocomprometidos.

Em um experimento com macrófagos murinos tratados com itraconazol ocorreu decréscimo na fagocitose mediada por receptores FcγR de partículas opsonizadas de *E. coli* (NIÑO; CAUVI; DE MAIO, 2014). E em um modelo de sépsis utilizando alguns antifúngicos, dentre eles o itraconazol, concluíram que este fármaco diminuiu a atividade fagocítica de monócitos humanos estimulados com LPS (MUENSTER et al., 2015). Esses relatos estão em acordo com o verificado nesta pesquisa.

Não se verificou alteração na capacidade fagocítica quando os macrófagos foram tratados com anfotericina B. Decker e colaboradores, 2018, também não observaram alterações na atividade de neutrófilos contra *Aspergillus fumigatus* na presença de anfotericina B (DECKER et al., 2017). Constatou-se que macrófagos tratados com anfotericina B foram ativados, apresentando capacidade para produção

de ânion superóxido e aumento da expressão de antígeno Ia (WILSON; THORSON; SPEERT, 1991). Entretanto, diferentes pesquisadores apontaram tanto para aumento, quanto diminuição da fagocitose, quando as células foram tratadas com esse fármaco (DOTIS et al., 2006; IRENA; SONJA; MAJA, 2015; MARMER et al., 1981; MUENSTER et al., 2015).

Em relação à viabilidade celular, no intervalo de 1h, os macrófagos desafiados com *M. pachydermatis* apresentaram mais células vivas, provavelmente devido ao estímulo da presença da levedura nessas células. Às 24h a diminuição da viabilidade em macrófagos infectados se relacionou principalmente com apoptose. Sabe-se que *Malassezia* sp produz derivados de indóis bioativos, como malassezina e indol-carbazol, que podem promover alterações celulares semelhantes à apoptose, com decréscimo da vitalidade, detecção de caspase 9, fragmentação de DNA e diminuição da filimentação de actina no citoesqueleto das células (KRÄMER et al., 2005).

Verificou-se que o grupo tratado com itraconazol apresentou o menor número de células viáveis e este fármaco induziu maior número de mortes por necrose, quando desafiados com *M. pachydermatis*. Outros pesquisadores também constataram diminuição da viabilidade de macrófagos tratados com itraconazol. Em macrófagos murinos submetidos a diferentes doses de itraconazol se evidenciou que, altas concentrações resultavam em toxicidade e promoviam o decréscimo da viabilidade celular (NIÑO; CAUVI; DE MAIO, 2014). Observou-se alteração nas proteínas de superfície em macrófagos tratados com itraconazol, resultando em maior participação de manose nas glicoproteínas. Estas alterações no padrão da superfície das células podem afetar a função celular, a homeostase e a resposta imune (FREY; DE MAIO, 2009). Com relação ao posaconazol, houve diminuição na quantidade total de espécies reativas de oxigênio liberadas por neutrófilos humanos e esse efeito pode ser atribuído à atividade metabólica reduzida dos macrófagos em resposta aos azóis e à continuidade da proliferação da levedura (FAROWSKI; CORNELLY; HARTMANN, 2016).

As células infectadas às 24h apresentaram número maior de mortes por apoptose, em relação às células infectadas e tratadas com antifúngicos. A célula infectada apresenta resposta natural através de apoptose, com a finalidade de prevenir a proliferação do patógeno e a infecção sistêmica (PIPKIN; LIEBERMAN, 2007). A remoção das células apoptóticas é realizada por um processo de fagocitose

especializado denominado eferocitose, que é fundamental para a recuperação da homeostasia (KORNS et al., 2011). Embora seja fisiológico, o excesso de apoptose contribui com a nefrotoxicidade induzida pela anfotericina B. Os pesquisadores demonstraram que a anfotericina B induziu apoptose em rins de ratos com as respectivas injúrias nas células epiteliais dos túbulos renais e o tratamento com agente antiapoptótico (rhIGF-1) preveniu os efeitos clínicos colaterais (VARLAM et al., 2001). O fenômeno detectado nesta pesquisa de macrófagos estimulados com anfotericina B e não desafiados apresentarem maior porcentagem de células vivas, aparentemente contraditório com a toxicidade deste antifúngico, pode evidenciar desvio na técnica utilizada, pois nela são marcadas as células mortas, mas não os debrís celulares resultantes da morte celular.

Proteção contra infecções fúngicas requer o recrutamento e a ativação de macrófagos, que são mediados pela produção e liberação de citocinas inflamatórias e quimiocinas (BROWN, 2011). O fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) é uma das principais citocinas relacionada à infecção fúngica, desempenhando papel na resposta inflamatória do sistema imune inato (FILLER; YEAMAN; SHEPPARD, 2005). Neste estudo, a infecção dos macrófagos estimulou a produção de TNF- $\alpha$ , o qual foi produzido em maiores quantidades por macrófagos desafiados com *M. pachydermatis* do que naqueles não infectados.

Nesta pesquisa, a anfotericina B induziu maior produção de TNF- $\alpha$ , particularmente no intervalo de 24h em macrófagos infectados. Este fármaco estimula a produção de citocinas inflamatórias por células do sistema imune inato via uma interação que requer moléculas da família TLR (*Toll-Like Receptor*) e a expressão da proteína CD14 (*Cluster of Differentiation 14*). As respostas dependentes de TLR e CD14 apresentaram-se diminuídas quando o tratamento foi realizado com formulações lipídicas da anfotericina B o que se correlaciona com a menor toxicidade das formulações lipídicas. Portanto, o uso de inibidores da expressão de TLR ou CD14, poderia minimizar os efeitos colaterais inflamatórios associados à infusão de anfotericina B (SAU et al., 2003)

Vários autores referem que a anfotericina B exerce efeito imunoestimulador, aumentando não só a produção de TNF- $\alpha$ , como sua capacidade fagocítica e de adesão, e o aumento da reatividade oxidativa (IRENA; SONJA; MAJA, 2015; MESA-ARANGO; SCORZONI; ZARAGOZA, 2012; SAU et al., 2003).

Observou-se a produção de IL-4, em níveis mais baixos do que de TNF- $\alpha$ , mas semelhante ao verificado no estudo de Moreira e colaboradores (MOREIRA, et al., 2019). Os macrófagos não desafiados com *M. pachydermatis*, mas tratados com itraconazol apresentaram maior produção de IL-4 do que o observado com os macrófagos tratados com a anfotericina B, tanto no intervalo de 1h como de 24h, predominando um perfil anti-inflamatório. Devido à sua capacidade de redução da inflamação eosinofílica das vias aéreas e diminuição da ativação imune sistêmica, um estudo demonstrou que o itraconazol pode ser uma escolha potencial para o tratamento adjuvante de aspergilose broncopulmonar alérgica, levando a considerar os efeitos anti-inflamatórios exercidos por esse antifúngico (WARK et al., 2003).

Macrófagos tratados com a anfotericina B e infectados com *M. pachydermatis* apresentaram os níveis mais altos na produção de IL-4 e também de TNF- $\alpha$ . Este comportamento paradoxal tem sido verificado em relação à *Malassezia* sp (MOREIRA et al., 2019), com super-regulação e supressão da resposta imune, um equilíbrio dinâmico entre os dois tipos de reações que podem operar do comensalismo até a infecção (ASHBEE, 2007; ASHBEE; EVANS, 2002). A remoção da camada fibrilar lipídica da parede celular da *Malassezia* sp reverte a capacidade da levedura para reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, ou seja, acredita-se que os lipídios da parede previnam as células de induzir inflamação, mantendo o estado comensal do microrganismo na pele humana (KESAVAN; HOLLAND; INGHAM, 2000). Os indóis produzidos por *Malassezia* spp. a partir do triptofano da pele, como malassezina, indirubina e indol-carbazol, diminuem a produção de IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$ , também auxiliando na manutenção da homeostase da pele (VLACHOS et al., 2012).

Diante dos resultados encontrados acredita-se que novas pesquisas devam ser realizadas com o intuito de delimitar critérios para a escolha da terapêutica mais adequada para casos de infecções fúngicas, evitando comprometimento exacerbado nas funções do sistema imune

## **6. CONCLUSÕES**

Os resultados obtidos indicaram que a ação dos antifúngicos pode interferir na capacidade fagocítica e inflamatória, tendo impacto na função dos macrófagos murinos. Não fossem os efeitos adversos conhecidos, devido à toxicidade da anfotericina B, ela deveria ser sempre o fármaco de escolha nas infecções fúngicas sistêmicas, pois além de não interferir com a fagocitose, promoveu resposta pró-inflamatória e as mortes celulares ocorreram em maior porcentagem por apoptose.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. 536 p.
- 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.
- AL-SWEIH, N. et al. *Malassezia pachydermatis* fungemia in a preterm neonate resistant to fluconazole and flucytosine. **Medical Mycology Case Reports**, v. 5, p. 9-11, 2014.
- ANGIOLELLA, L. et al. Biofilm, adherence, and hydrophobicity as virulence factors in *Malassezia furfur*. **Medical Mycology**, v. 56, p. 110-116, 2017.
- ASHBEE, H. R.; BOND, R. *Malassezia* species and immunity: host-pathogen interactions. In: BOEKHOUT, T. et al. **Malassezia and the skin. Science and clinical practice**. Berlin: Springer, 2010. p. 139-173.
- 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. Update on the genus *Malassezia*. **Medical Mycology**, v. 45, p. 287-303, 2007.
- BARONI, A. et al. Uptake of *Malassezia furfur* by human dermal fibroblasts: effect of ketoconazole and cytoskeleton inhibitors. **Archives of Dermatological Research**, v. 293, p. 407-413, 2001.
- BOND, R.; GUILLOT, J.; CABAÑES, F. J. *Malassezia* yeasts in animal disease. In: BOEKHOUT, T. et al. **Malassezia and the skin. Science and clinical practice**. Berlin: Springer, 2010. p. 271-299.
- BROWN, G. D. Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. **Annual Review of Immunology**, v. 29, p. 1-21, 2011.
- BUOMMINO, E. et al. Innate immune response in human keratinocytes infected by a feline isolate of *Malassezia pachydermatis*. **Veterinary Microbiology**, v. 163, p. 90-96, 2013.
- CABAÑES, F. J. et al. New lipid-dependent *Malassezia* species from parrots. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 33, p. 92-99, 2016.
- CAFARCHIA, C. et al. Azole susceptibility of *Malassezia pachydermatis* and *Malassezia furfur* and tentative epidemiological cut-off values. **Medical Mycology**, v. 53, p. 743-748, 2015.
- 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.

CELIS, A. M. et al. *Malassezia* spp. beyond the mycobiota. **SM Dermatology Journal**, v. 3, p. 1019, 2017.

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. N. 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.

DE BEULE, K.; VAN GESTEL, J. Pharmacology of itraconazole. **Drugs**, v. 61, p. 27-37, 2001.

DECKER, C. et al. Analysis of the *in vitro* activity of human neutrophils against *Aspergillus fumigatus* in presence of antifungal and immunosuppressive agents. **Medical Mycology**, v. 56, p. 514-519, 2018.

DOTIS, J. et al. Effects of lipid formulations of amphotericin B on activity of human monocytes against *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 868-873, 2006.

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

FAROWSKI, F.; CORNELLY, O. A.; HARTMANN, P. High intracellular concentrations of posaconazole do not impact on functional capacities of human polymorphonuclear neutrophils and monocyte-derived macrophages *in vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, p. 3533-3539, 2016.

FILLER, S. G.; YEAMAN, M. R.; SHEPPARD, D. C. Tumor necrosis factor inhibition and invasive fungal infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, p. S208-S212, 2005.

FILLIPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Therapeutic efficacy of amphotericin B lipid formulations. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 167-194, 2006.

FREY, T.; DE MAIO, A. The antifungal agent itraconazole induces the accumulation of high mannose glycoproteins in macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 16882-16890, 2009.

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

GUÉHO-KELLERMANN, E.; BOEKHOUT, T.; BEGEROW, D. Biodiversity, phylogeny and ultrastructure. In: BOEKHOUT, T. et al. **Malassezia and the skin. Science and clinical practice**. Berlin: Springer, 2010. p. 17-63.

- GUPTA, P. et al. Skin colonization by *Malassezia* spp. in hospitalized neonates and infants in a tertiary care centre in North India. **Mycopathologia**, v. 178, p. 267-272, 2014.
- HALD, M. et al. Evidence-based Danish guidelines for the treatment of *Malassezia*-related skin diseases. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 95, p. 12-19, 2015.
- 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, p. 1826-1834, 2016.
- ILAHI, A. et al. Molecular epidemiology of a *Malassezia pachydermatis* neonatal unit outbreak. **Medical Mycology**, v. 56, p. 69-77, 2017.
- IRENA, G.; SONJA, P. R.; MAJA, A. The effect of fluconazole and amphotericin B on macrophage functions. **Sanamed**, v. 10, p. 173-177, 2015.
- KAFFENBERGER, B. H.; MATHIS, J.; ZIRWAS, M. J. A retrospective descriptive study of oral azole antifungal agents in patients with patch test-negative head and neck predominant atopic dermatitis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 71, p. 480-483, 2014.
- KATRAGKOU, A. et al. Interactions between human phagocytes and *Candida albicans* biofilms alone and in combination with antifungal agents. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 201, p. 1941-1949, 2010.
- 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.
- KORNS, D. et al. Modulation of macrophage efferocytosis in inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 2, 2011. doi: 10.3389/fimmu.2011.00057.
- KRÄMER, HANS-JOACHIM et al. Malassezin, a novel agonist of the aryl hydrocarbon receptor from the yeast *Malassezia furfur* induces apoptosis in primary human melanocytes. **Chembiochem**, v. 6, p. 860-865, 2005.
- LEONG, C. et al. Antifungal susceptibility testing of *Malassezia* spp. with an optimized colorimetric broth microdilution method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, p. 1883-1893, 2017.
- LORCH, J. M. et al. *Malassezia vespertilionis* sp. nov.: a new cold-tolerant species of yeast isolated from bats. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 41, p. 56-70, 2018.
- LORTHOLARY, O. et al. ESCMID/ECMM joint clinical guideline for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections: W14. 2. **Mycoses**, v. 56, p. 35-36, 2013.

MARMER, D. J. et al. Ketoconazole, amphotericin B, and amphotericin B methyl ester: comparative *in vitro* and *in vivo* toxicological effects on neutrophil function. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 20, p. 660-665, 1981.

MAYSER, P.; GAITANIS, G. Physiology and biochemistry. In: BOEKHOUT, T. et al. ***Malassezia* and the skin. Science and clinical practice**. Berlin: Springer, 2010. p. 121-137.

MESA-ARANGO, A. C.; SCORZONI, L.; ZARAGOZA, O. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, 2012. doi: 10.3389/fmicb.2012.00286.

MOREIRA, R. T. F. et al. Dichotomous response of *Malassezia*-infected macrophages to *Malassezia pachydermatis* and *Malassezia furfur*. **Medical Mycology**, v. 57, p. 628-635, 2019.

MUENSTER, S. et al. Antifungal antibiotics modulate the pro-inflammatory cytokine production and phagocytic activity of human monocytes in an *in vitro* sepsis model. **Life Sciences**, v. 141, p. 128-136, 2015.

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

NIÑO, D. F.; CAUVI, D. M.; DE MAIO, A. Itraconazole, a commonly used antifungal, inhibits Fcγ receptor-mediated phagocytosis: alteration of Fcγ receptor glycosylation and gene expression. **Shock**, v. 42, p. 52-59, 2014.

PATINO-UZCÁTEGUI, A. et al. Virulence gene expression in *Malassezia* spp from individuals with seborrheic dermatitis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, p. 2134-2136, 2011.

PIPKIN, M. E.; LIEBERMAN, J. Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. **Current Opinion Immunology**, v. 19, p. 301-308, 2007.

REDLINE, R. W.; DAHMS, B. B. *Malassezia* pulmonary vasculitis in an infant on long-term intralipid therapy. **New England Journal of Medicine**, v. 305, p. 1395-1398, 1981.

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.

SAU, K. et al. The antifungal drug amphotericin B promotes inflammatory cytokine release by a toll-like receptor and CD14-dependent mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 37561-37568, 2003.

SUGITA, T. et al. Epidemiology of *Malassezia*-related skin diseases. In: BOEKHOUT, T. et al. ***Malassezia* and the skin. Science and clinical practice**. Berlin: Springer, 2010. p. 65-119.

SURMONT, I. et al. *Malassezia furfur* fungemia 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.

THEELEN, B. et al. *Malassezia* ecology, pathophysiology, and treatment. **Medical Mycology**, v. 56, suppl. 1, p. S10-S25, 2018.

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. **Malassezia and the skin. Science and clinical practice**. Berlin: Springer, 2010b. p. 229-251.

TREJO, W. H.; BENNETT, R. E. *Streptomyces nodosus* sp. n., the amphotericin-producing organism. **Journal of Bacteriology**, v. 85, p. 436-439, 1963.

TRISTÃO, F. S. et al. Th17-inducing cytokines IL-6 and IL-23 are crucial for granuloma formation during experimental paracoccidioidomycosis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1-13, 2017.

VARLAM, D. E. et al. Apoptosis contribute to amphotericin B-induced nephrotoxicity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 679-685, 2001.

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

VLACHOS, C. et al. *Malassezia*-derived indoles activate the aryl hydrocarbon receptor and inhibit Toll-like receptor-induced maturation in monocyte-derived dendritic cell. **British Journal of Dermatology**, v. 167, p. 496-505, 2012.

WARK, P. A. B. et al. Anti-inflammatory effect of itraconazole in stable allergic bronchopulmonary aspergillosis: A randomized controlled trial. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, p. 952-957, 2003.

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.

WILSON, E.; THORSON, L.; SPEERT, D. P. Enhancement of macrophage superoxide anion production by amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, p. 796-800, 1991.

WU, G. et al. Genus-wide comparative genomics of *Malassezia* delineates its phylogeny, physiology, and niche adaptation on human skin. **PLoS Genetics**, v. 11, 2015. doi: 10.1371/journal.pgen.1005614.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A. Distribuição das amostras em placas de 24 poços.

Período de leitura						
<i>Malassezia pachydermatis</i>						
Macrófagos	10 <sup>5</sup> (controle negativo)	10 <sup>5</sup> (controle negativo)	10 <sup>5</sup> (controle negativo)	10 <sup>5+</sup> Zymosan 2mg/ml (controle positivo)	10 <sup>5+</sup> Zymosan 2mg/ml (controle positivo)	10 <sup>5+</sup> Zymosan 2mg/ml (controle positivo)
Macrófagos/ Antifúngicos	10 <sup>5+</sup> Itra 2 µg/ml	10 <sup>5+</sup> Itra 2 µg/ml	10 <sup>5+</sup> Itra 2 µg/ml	10 <sup>5+</sup> Anfo B 4 µg/ml	10 <sup>5+</sup> Anfo B 4 µg/ml	10 <sup>5+</sup> Anfo B 4 µg/ml
Macrófagos/ Antifúngicos/ Leveduras	10 <sup>5+</sup> Itra 2 µg/ml+ <i>M. pachy</i> 5:1	10 <sup>5+</sup> Itra 2 µg/ml+ <i>M. pachy</i> 5:1	10 <sup>5+</sup> Itra 2 µg/ml+ <i>M. pachy</i> 5:1	10 <sup>5+</sup> AnfoB 4 µg/ml+ <i>M. pachy</i> 5:1	10 <sup>5+</sup> AnfoB 4 µg/ml+ <i>M. pachy</i> 5:1	10 <sup>5+</sup> AnfoB 4 µg/ml+ <i>M. pachy</i> 5:1
Macrófagos/ Leveduras	10 <sup>5+</sup> <i>M. pachy</i> 5:1	10 <sup>5+</sup> <i>M. pachy</i> 5:1	10 <sup>5+</sup> <i>M. pachy</i> 5:1			

**APÊNDICE B.** Número de macrófagos que fagocitaram, média das leveduras fagocitadas e índice fagocítico nos intervalos de tempo de 1h e 24h.

<b>FAGOCITOSE 1 HORA</b>				
itraconazol				
Poços	13	14	15	Média
Número de MØ positivos	120	114	123	119
<b>Porcentagem de MØ</b>				<b>59,5%</b>
Número de leveduras	365	345	413	209,6
Média Lev/MØ	3,1	2,9	3,5	3,1
Índice fagocítico	184,4	172,5	208,2	188,4
<b>FAGOCITOSE 1 HORA</b>				
anfotericina B				
Poços	16	17	18	Média
Número de MØ positivos	127	147	128	134
<b>Porcentagem de MØ</b>				<b>67%</b>
Número de leveduras	407	494	524	475
Média Lev/MØ	3,2	3,4	4,1	3,6
Índice fagocítico	214,4	227,8	274,7	239
<b>FAGOCITOSE 1 HORA</b>				
<i>Malassezia pachydermatis</i>				
Poços	19	20	21	Média
Número de MØ positivos	154	164	150	156
<b>Porcentagem de MØ</b>				<b>78%</b>
Número de leveduras	589	630	430	549,7
Média Lev/MØ	3,8	3,8	2,8	3,5
Índice fagocítico	296,4	296,4	218,4	270,4

<b>FAGOCITOSE 24 HORAS</b>				
itraconazol				
Poços	13	14	15	Média
Número de MØ positivos	181	188	189	186
<b>Porcentagem de MØ</b>				<b>93%</b>
Número de leveduras	789	611	657	685,7
Média Lev/MØ	4,3	3,2	3,5	3,7
Índice fagocítico	399,9	297,6	325,5	341
<b>FAGOCITOSE 24 HORAS</b>				
anfotericina B				
Poços	16	17	18	Média
Número de MØ positivos	134	162	156	150,7
<b>Porcentagem de MØ</b>				<b>75,3%</b>
Número de leveduras	538	704	552	598
Média Lev/MØ	4	4,3	3,5	3,9
Índice fagocítico	301,4	324	263,7	293,4
<b>FAGOCITOSE 24 HORAS</b>				
<i>Malassezia pachydermatis</i>				
Poços	19	20	21	Média
Número de MØ positivos	174	144	164	160,7
<b>Porcentagem de MØ</b>				<b>80,4%</b>
Número de leveduras	731	538	601	623,3
Média Lev/MØ	4,2	3,7	3,7	3,9
Índice fagocítico	337,7	297,5	297,5	310,9

**APÊNDICE C.** População de macrófagos tratados com anfotericina B não infectados.

