



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

RAFAELA MACHADO NÓBREGA

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE E DO EFEITO
INFLAMATÓRIO INDUZIDO POR EXTRATO TOTAL DE *Malassezia*
*pachydermatis***

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FORTALEZA-CE
2008



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

RAFAELA MACHADO NÓBREGA

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE E DO EFEITO
INFLAMATÓRIO INDUZIDO POR EXTRATO TOTAL DE *Malassezia*
*pachydermatis***

FORTALEZA-CE
2008

RAFAELA MACHADO NÓBREGA

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE E DO EFEITO
INFLAMATÓRIO INDUZIDO POR EXTRATO TOTAL DE *Malassezia*
*pachydermatis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução e sanidade de carnívoros, onívoros, herbívoros e aves.

Orientadora: Profa. Dra. Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro.

FORTALEZA-CE

2008

N754a Nóbrega, Rafaela Machado

Avaliação da resposta imune e do efeito inflamatório induzido por extrato total de *Malassezia pachydermatis* / Rafaela Machado Nóbrega. __ Fortaleza, 2008. 95p. il.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

1. Malassezia. 2. Inflamação. 3. Resposta imune. 4. Extrato total. I. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

CDD: 636.089

Avaliação da Resposta Imune e do Efeito Inflamatório Induzidos por Extrato Total de
Malassezia pachydermatis.

Rafaela Machado Nóbrega

Dissertação Aprovada em:

Conceito:

Nota:

Banca Examinadora

Profa. Dra. Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro
Orientadora – UECE

Profa. Dra. Érika Freitas Mota
Examinadora - UFC

Profa. Dra. Lúcia de Fátima Lopes dos Santos
Examinadora - UECE

DEDICATÓRIA

Dedico com todo o meu amor à minha mãe e à minha avó, minhas maiores incentivadoras para concluir essa etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, detentor de todo poder que com a Vossa Luz me torna diariamente receptível a inspiração e dedicação para suportar e vencer as adversidades impostas pela vida, sem as quais não adquirimos experiência, sabedoria e discernimento para culminarmos na felicidade plena;

À Profa. Dra. Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro, que com a sua vivência e sabedoria me ensinou os passos iniciais e certamente definitivos na minha carreira profissional, tanto no âmbito da pesquisa, como na minha formação intelectual e pessoal, além de revelar o fascinante mundo dinâmico da imunologia;

À minha avó, Constança Emília de Conceição Machado, que sempre foi e sempre será a minha fortaleza e minha segurança em todos os momentos da minha vida, sempre me apoiando e dedicando o seu imenso amor e orações em prol dos meus objetivos e conquistas, que entristece com as minhas dificuldades, mas que ao mesmo tempo me orienta com sua admirável sabedoria e se alegra imensamente com as minhas vitórias. À você devo todas as minhas vitórias;

À minha mãe, Teresa Beatriz Conceição de Barros Machado e à minha irmã, Márcia Machado Nóbrega, as quais com suas maneiras introvertidas conseguem ainda demonstrar preocupação e amor;

À Maria Helena Guedes Carvalho, Evaldo Guedes Carvalho, Cristiane Guedes Carvalho, Daniele Guedes Carvalho e a Maria da Conceição, por me acolherem com todo carinho como membro da família durante o primeiro ano do mestrado, sem os quais com certeza eu não teria alcançado essa conquista. A vocês meus sinceros agradecimentos por tudo que fizeram por mim;

À Liana Custódio Lima e os seus filhos Clésio Moura de Oliveira Filho e Edílson Leitão Lima Neto, amigos verdadeiros que conquistei nesse período e que compartilhei grandes momentos de alegria e desabafos mútuos que foram fundamentais para superar a distância e saudades;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro para a execução do mestrado;

A todos os membros da Faculdade de Veterinária (FAVET), funcionários e docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) da UECE;

Ao Centro Especializado em Micologia Médica da Universidade Federal do Ceará, na pessoa do Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha, por fornecer a cepa do fungo utilizada no experimento;

A João Jaime Giffoni Leite, que realizou os repiques da cepa fúngica para a realização do cultivo da mesma e pelo auxílio na escrita do artigo e da dissertação;

Ao Laboratório de Microbiologia da UECE, na pessoa da Profa. Dra. Adriana de Queiroz Pinheiro, que possibilitou o cultivo do fungo e a obtenção do extrato total;

À Profa. Dra. Salette Lobão Torres Santiago do Laboratório de Doenças Infecciosas da UECE, por permitir a realização de etapas fundamentais na execução do experimento;

À Profa. Dra. Maria Isabel Florindo Guedes do Laboratório de Bioquímica Humana da UECE, pelas sugestões pertinentes dadas durante a execução do experimento;

Às médicas veterinárias, Ivanilde Andrade Cândido e Rachel Ângela da Silveira Fonseca do Laboratório de Patologia Clínica da UECE, por me auxiliarem na contagem das células;

À Profa. Dra. Dirce F. Melo, Profa. Dra. Érika Freitas Mota e Profa. Dra. Ana Cláudia M. Silva, que me ajudaram com todo empenho nas etapas finais e decisivas do experimento, sem as quais não teria concluído o mestrado;

Ao Médico Patologista, Dr. Geraldo de Sousa Tomé, pela dedicação e empenho na realização do procedimento e laudo histológicos do experimento;

Aos colegas do Laboratório de Imunologia e Bioquímica Animal (LIBA) da UECE, pelo acompanhamento e ajudas durante o mestrado;

LISTA DE ABREVIATURAS

HCl	Ácido clorídrico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
BSA	Albumina sérica bovina
PCA	Anafilaxia cutânea passiva
Ag	Antígeno
APC	Célula apresentadora de antígeno
TH ₁	Célula T auxiliar do tipo 1
TH ₂	Célula T auxiliar do tipo 2
TCD4+	Linfócito T auxiliar
TCD8+	Linfócito T citotóxico
CMSP	Célula mononuclear de sangue periférico
CEMM	Centro especializado em micologia médica
NaCl	Cloreto de sódio
CEUA	Comitê de ética para uso de animais
MHC II	Complexo de histocompatibilidade principal da classe II
DA	Dermatite atópica
SD	Desvio padrão
SDS	Duodecil sulfato de sódio
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
ELISA	Ensaio Imunoabsorvente ligado a enzima
Mal p TE	Extrato total de <i>Malassezia pachydermatis</i>
GM-CSF	Fator estimulador de crescimento de macrófago granulócito
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

g	Grama
°C	Graus centígrados
H&E	Hematoxilina e eosina
Al(OH) ₃	Hidróxido de alumínio
h	Hora
CMI	Imunidade mediada por células
Ig	Imunoglobulina
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
kDa	Kilodaltons
Mal f	<i>Malassezia furfur</i>
μ L	Microlitros
μ m	Micrômetros
μ g	Microgramas
mA	Miliampere
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mm	Milímetros
nm	Nanômetros
NO	Óxido nítrico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
PV	Pitíriase versicolor
pH	Pontes de hidrogênio
%	Porcentagem
DTH	Reação de hipersensibilidade tardia

TCR	Receptor de célula T
TLR	Receptor toll-like
rpm	Rotações por minuto
PBS	Salina tamponada com fosfato
UI	Unidade internacional
V	Volts

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estrutura da <i>Malassezia</i> . Parede celular e a camada capsular	24
Figura 2. Quadros clínicos de otite (a) e dermatite (b) em cães.....	26
Figura 3. Diagrama esquemático da estrutura da pele.....	29
Figura 4. Mecanismos da imunidade inata e adaptativa aos fungos.....	36
Figura 1. Componentes protéicos de ETMalp na eletroforese em SDS-PAGE.....	61
Figura 2. Reação inflamatória induzida por ETMalp.....	64
Figure 1. Protein components of MalpTE by SDS-PAGE.....	73
Figure 2. Negative reaction for anti-MalpTE specific IgE by PCA in rats.....	75
Figure 3. Histological evaluation. Neutrophils, fibroblasts, proteinaceous material and fibrosis, necrosis, neovascularization, normal skin.....	77

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Classificação de <i>Malassezia</i> de acordo com diferentes autores.....	21
Tabela 1. Avaliação da migração celular induzida pelo ETMalp e suspensão de fungos em solução salina fisiológica (NaCl 0,9%), por via intraperitoneal em diferentes grupos.....	62
Tabela 2. Proteínas totais do lavado peritoneal dos animais que receberam ETMalp e suspensão de fungos por via intraperitoneal.....	63
Table 1. Titers IgG MalpTE-specific antibodies in animals immunized for intraperitoneal and subcutaneous route and animals non-immunized.....	74
Table 2. Evaluation of edema induced by MalpTE challenge in the animals immunized by MalpTE.....	76

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar a resposta inflamatória e a resposta imune humoral e celular do extrato total de *Malassezia pachydermatis*. Uma cepa de *M. pachydermatis* foi cultivada e a massa fúngica foi lavada em salina tamponada com fosfato (PBS), macerada em nitrogênio líquido, em seguida diluída em Tris-HCl, 25 mM, pH 7,5, (1:3) agitada durante 3 horas e centrifugada a 4000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi denominado extrato total de *M. pachydermatis* (ETMalp). A concentração de proteínas do ETMalp foi mensurada e a massa molecular aparente determinada por eletroforese. O processo inflamatório foi induzido por via intraperitoneal por ETMalp e pela suspensão fúngica em camundongos. O lavado peritoneal foi coletado com 1, 4, 24 e 48 h após a inoculação no qual foram dosadas as proteínas totais, contagem total e diferencial de células. O processo inflamatório também foi avaliado com ETMalp por via subcutânea em camundongos e a lesão submetida a exame histológico. Para avaliação da resposta imune humoral e celular os animais foram imunizados com ETMalp por via intraperitoneal e subcutânea e desafiados com ETMalp nas patas após a coleta dos sangues. A produção de anticorpos específicos foi analisada por anafilaxia cutânea passiva (PCA) e ensaio imunoenzimático (ELISA). A concentração de proteínas do ETMalp foi de 100 µg/mL e a eletroforese revelou sete bandas, sendo cinco distribuídas entre 14,3-66 kDa. Os tratamentos induziram aumento ($P < 0,05$) na migração celular ao longo do tempo, alcançando pico em 24 h. A suspensão fúngica induziu ($P < 0,05$) uma maior migração celular em 24 e 48 h. ETMalp e a suspensão fúngica provocaram extravasamento protéico e migração neutrofílica, enquanto que a suspensão fúngica também provocou migração de mastócitos. Os animais que receberam ETMalp por via subcutânea apresentaram reação inflamatória inespecífica ao exame histológico. Os níveis de anticorpos IgG específicos contra ETMalp induzidos pela sensibilização por via intraperitoneal e subcutânea aumentou significativamente quando comparado com o soro pré-imune. Anticorpos IgE específicos contra ETMalp não foram revelados por PCA em ratos. As vias intraperitoneal e subcutânea foram estimuladas com ETMalp e em resposta ao desafio produziram edema em 24 e 48 horas quando comparado com o controle. Conclui-se que as diferentes proteínas contidas no ETMalp são pró-inflamatórias e que o ETMalp induz resposta imune específica mediada tanto por linfócitos T quanto B, através das respostas imunes humoral e celular .

Palavras-chave: *Malassezia*, Inflamação, Resposta Imune, Extrato Total.

ABSTRACT

The aim of this study was evaluated the inflammatory and humoral immune response induced by *M. pachydermatis* total extract. A strain of *M. pachydermatis* was cultivated and the fungal mass was washed with phosphate buffered saline (PBS), and macerated in liquid nitrogen, diluted in Tris-HCl, 25 mM, pH 7.5, agitated for three hours and centrifuged at 4,000 rpm/30 min. The supernatant was used as *M. pachydermatis* total extract (MalpTE). The content of proteins of MalpTE was estimated and performed electrophoresis. The inflammatory process was induced by intraperitoneal route by MalpTE and fungal suspension in mice. The peritoneal washing was harvested with 1, 4, 24 e 48 h after inoculation and was estimated the total proteins, total and differential cell count. The inflammatory process also was evaluated with MalpTE by subcutaneous route in mice and the lesion was examination by histological. For evaluation of immune response, the animals were immunized by intraperitoneal and subcutaneous route with MalpTE and challenged with MalpTE in footpad after the last blood collection. The specific antibodies production was analyzed by passive cutaneous anaphylaxis (PCA) and enzyme-linked immunosorbent (ELISA) assay. The content of proteins of the MalpTE was 100 µg/mL and electrophoresis revealed seven bands, where five distributed between 14.3-66 kDa. The treatments induced increase ($P<0.05$) in the cellular migration along the time, with peak at 24 h. The fungal suspension induced increase ($P<0.05$) the cellular migration at 24 and 48 h. MalpTE and fungal suspension promoted outlet of proteins and neutrophils migration and the fugal suspension induced mast cell migration. The animals who received MalpTE by subcutaneous route showed non-specific inflammatory reaction on histological. The levels of MalpTE-specific IgG antibodies induced by intraperitoneal and subcutaneous route sensitization increased significantly ($P<0.05$) when compared with the pre-immune sera. MalpTE-specific IgE antibody was not revealed by PCA in rats. Both intraperitoneal and subcutaneous routes of immunization with MalpTE produced a significant increase ($P<0.05$) in edema at 24 and 48 hours after challenge when compared with the control. In conclusion, the proteins content of the MalpTE were promoted inflammatory response and induced specific immune response mediated by B and T cells.

Key words: *Malassezia*, Inflammation, Immune Response, Total Extract

SUMÁRIO

	Página
Lista de abreviaturas.....	9
Lista de figuras.....	12
Lista de tabelas.....	13
Resumo.....	14
Abstract.....	15
1 Introdução.....	18
2 Revisão de literatura.....	19
2.1 <i>Malassezia</i> sp.....	19
2.1.1 História e taxonomia.....	19
2.1.2 Ecologia das espécies do gênero <i>Malassezia</i>	22
2.1.3 Estrutura, fisiologia e bioquímica do gênero <i>Malassezia</i>	23
2.1.4 Doenças causadas por leveduras do gênero <i>Malassezia</i>	26
2.2 Imunidade aos fungos.....	28
2.2.1 Imunidade inata.....	28
2.2.2 Inunidade adquirida.....	33
2.2.2.1 Componentes antigênicos da <i>Malassezia</i>	36
2.2.2.2 Estudo sorológico das espécies de <i>Malassezia</i>	40
2.2.3 Imunomodulação através da <i>Malassezia</i>	41
2.3 Métodos de diagnósticos da infecção por <i>Malassezia</i>	43
3 Justificativa.....	45
4 Hipótese científica.....	46
5 Objetivos.....	47
5.1 Objetivos gerais.....	47

5.2 Objetivos específicos.....	47
6 Capítulos.....	48
6.1 Capítulo I: Efeito inflamatório induzido por extrato total de <i>Malassezia pachydermatis</i>	49
6.2 Capítulo II: Immune response to <i>Malassezia pachydermatis</i> Extract in Mice.....	65
7 Conclusões gerais.....	78
8 Perspectivas.....	79
9 Referências bibliográficas.....	80
Anexos.....	91

1 INTRODUÇÃO

A levedura lipofílica *Malassezia pachydermatis* é componente da microflora cutânea de muitos animais de sangue quente e apresenta natureza oportunista que é confirmada pela excelente resposta à terapia antifúngica específica, podendo tornar-se patogênica após alterações no microclima do meato acústico externo e pele e nas defesas do hospedeiro (ASHBEE e EVANS, 2002; ASHBEE, 2007). Durante muito tempo as leveduras do gênero *Malassezia* foram consideradas organismos desprovidos de poder patogênico. Sua ação como patógeno cutâneo, tanto no homem como nos animais, só foi reconhecida quando a eficácia dos tratamentos antifúngicos foi demonstrada, e quando as infecções por *Malassezia* foram reproduzidas experimentalmente (MANSFIELD, BOOSINGER e ATTLEBERGER, 1990).

Em medicina veterinária, *M. pachydermatis* é a espécie mais importante do gênero, uma vez que está implicada em doenças de pele e em otite, pois é responsável pelo agravamento do processo patológico, evitando sua cura, mesmo após a remoção do fator primário. As otites e dermatites devidas à *M. pachydermatis* são frequentemente associadas a quadros de hipersensibilidade e alterações seborréicas, e sua ação oportunista depende de fatores predisponentes e perpetuantes do hospedeiro (MACHADO *et al.*, 2003).

Os métodos tradicionais de identificação e detecção de fungos incluem cultivo em vários meios, análise microscópica e análises bioquímicas. A maioria destes métodos apresenta baixa especificidade e reprodutibilidade, além de consumirem tempo e exigirem pessoal técnico qualificado para a execução. Já os métodos imunológicos, apresentam várias vantagens, como rapidez na obtenção de resultados, alta sensibilidade e facilidade na execução.

As leveduras do gênero *Malassezia* são organismos bastante complexos imunologicamente. Portanto, estudos mais detalhados sobre os componentes antigênicos bem como a interação dessa levedura com o sistema imunológico servirão para auxiliar na compreensão da diversidade de mecanismos envolvidos na imunopatogênese das doenças associadas à levedura.

Mediante o exposto, pesquisas adicionais são necessárias para a caracterização dos antígenos protéicos específicos para as diferentes espécies de *Malassezia* para serem utilizados na padronização de testes para o diagnóstico imunológico, bem como para o auxílio de imunoterapias apropriadas em animais afetados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Malassezia* sp

2.1.1 História e Taxonomia

O estudo do gênero *Malassezia* tem sido reportado com bastante controvérsia desde que foi descrito pela primeira vez em 1846 por Eichstedt. Quando o primeiro microrganismo foi cultivado ocorreram várias discordâncias quanto ao meio de cultura ótimo, às relações entre as variantes de morfologia e de colônia do organismo, ao gênero e ao nome, bem como seu papel nas variadas doenças cutâneas (ASHBEE e EVANS, 2002).

Apesar de sua descrição em 1846, o primeiro sucesso de isolamento do organismo foi conseguido por Panja em 1927 (PANJA, 1927), no entanto, vários autores afirmaram ter cultivado previamente o organismo *in vitro* (CASTELLANI, 1925; DOLD, 1910). Tal dificuldade em cultivar o organismo foi explicada por Benham em 1939, quando foi verificada a necessidade de uma “substância oleosa” no meio de cultura. Uma vez que o requerimento de lipídeo foi estabelecido, foram preparados vários meios de cultura que podem servir para a recuperação e manutenção do organismo (FAERGMANN e FREDRIKSSON, 1980; LEEMING e NOTMAN, 1987; MIDGLEY, 1989), permitindo trabalhos relacionados com a taxonomia, fisiologia e bioquímica do gênero (ASHBEE e EVANS, 2002).

Segundo Aspíroz, Moreno e Rubio (1997), o gênero *Malassezia* apresenta a seguinte classificação taxonômica:

- Reino: *Fungi*
- Filo: *Deuteromycotina*
- Classe: *Blastomycetes*
- Ordem: *Cryptococcales*
- Família: *Cryptococcaceae*
- Gênero: *Malassezia*

A taxonomia e a nomenclatura das espécies de *Malassezia* foram bastante confusas e caóticas até muito recentemente. As espécies de *Malassezia* são dimórficas, existindo em ambas as fases leveduriformes e micelial, e isso confundiu muitos trabalhos sobre o organismo, uma vez que muitos pesquisadores acreditavam que as formas leveduriforme e micelial eram organismos distintos, refletindo na sua inclusão em dois gêneros separados: *Pityrosporum* para a forma leveduriforme e *Malassezia* para a forma micelial.

Adicionalmente, a forma das células da levedura é variável e vários grupos consideraram duas formas de células leveduriformes como espécies separadas: *Pityrosporum orbiculare*, possuindo células esféricas, e *Pityrosporum ovale*, possuindo células ovais (ASHBEE e EVANS, 2002).

Desde a sua descoberta, o gênero *Malassezia sp.* passou por várias denominações taxonômicas (SCHLOTTFELDT *et al.*, 2002). Eichstedt, em 1846, foi o primeiro pesquisador a descrever sobre o fungo, como o possível agente da pitiríase versicolor, entretanto, este autor não nomeou o fungo e correlacionou como pertencente ao gênero *Microsporum sp.* (SIDRIM e MOREIRA, 1999), nesta época ainda não se sabia exatamente o papel que tal organismo teria nas afecções cutâneas humanas e veterinárias. O mesmo microrganismo foi chamado mais tarde de *Microsporum furfur*, por Robin, em 1853 (ASHBEE e EVANS, 2002).

A primeira classificação taxonômica oficial empregou o gênero *Pityrosporum* e definiu duas espécies: *P. ovale* e *P. pachydermatis*, associadas com animais. Gordon adicionou outra espécie, *P. orbiculare*, diferenciando-a com base na forma esférica da sua célula (ASHBEE e EVANS, 2002). Posteriormente, foi observado que ambas as formas leveduriformes esféricas e ovais podem produzir hifas e sugeriu-se que as formas leveduriformes e a forma micelial são simplesmente estágios do ciclo de vida de um único organismo (SALKIN e GORDON, 1977).

Em 1899, Baillon discordando da origem em comum dos agentes das dermatofitoses e da pitiríase vesicolor, sugeriu que o gênero fosse chamado de *Malassezia sp.*, em homenagem ao pesquisador de nome Mallassez, que antecedeu com trabalhos na mesma linha de pesquisa (SIDRIM e MOREIRA, 1999).

A habilidade para induzir a levedura a produzir elementos miceliais serviu para abrir caminho para a unificação de dois gêneros em 1986, quando foram aprovadas as espécies nomeadas *Malassezia furfur* (Robin) Baillon (incluindo *P. orbiculare*, *P. ovale* e *M. furfur*) e *Malassezia pachydermatis* (incluindo *P. pachydermatis*) (CANNON, 1986). Apesar disso, muitos trabalhos mantiveram o uso dos nomes *P. ovale* e *P. orbiculare* e continuaram a diferenciar as amostras com base na morfologia da célula e da colônia (FAERGEMANN, 1993).

Em 1990, Simmons e Gueho, definiram outra espécie, *M. sympodialis*, com base em um menor conteúdo de guanina e citosina (54% quando comparado com 66% da *M. furfur*) e a presença de brotamento simpodial.

Por décadas, o gênero *Malassezia* foi limitado a três espécies, sendo uma lipodependente e outra não, representadas pela *M. furfur* e *M. pachydermatis*, respectivamente (GUILLOT e GUÉHO, 1996)

Em 1996, a taxonomia do gênero *Malassezia sp.* foi revisada com base em suas características bioquímicas, morfológicas e moleculares e como resultado o gênero passou a comportar sete espécies: *M. pachydermatis*, levedura lipofílica, geralmente associada a animais, principalmente a carnívoros domésticos ((GUILLOT e GUÉHO, 1996; AIZAWA *et al.*, 1999), podendo ser encontrada em seres humanos (LJUBOJEVIC *et al.*, 2002); e seis espécies lipodependentes associadas geralmente a afecções de pele humanas e ocasionalmente em animais, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. furfur*, *M. restrita*, *M. obtusa* e *M. slooffiae* (GUILLOT, 1996; AIZAWA *et al.*, 1999). Essas espécies aceitas são mostradas na Tabela 1. E ainda recentemente foram identificadas novas espécies, como a *M. dermatis* (SUGITA *et al.*, 2002), *M. folliculitis* (ASHBEE e EVANS, 2002) e *M. nana* (HIRAI *et al.*, 2002).

Tabela 1. Classificação de *Malassezia*, de acordo com diferentes autores.

Classificação Pré-1986	Classificação de acordo com:			
	Midgley, 1989	Simmons e Gueho, 1990	Cunningham <i>et al.</i> , 1990	Gueho <i>et al.</i> , 1996
<i>Pityrosporum orbiculare</i>	<i>P. orbiculare</i>		<i>M. furfur</i> sorovar B <i>M. furfur</i>	<i>M. globosa</i> <i>M. slooffiae</i>
<i>Pityrosporum ovale</i>	<i>P. ovale</i> forma 1 <i>P. ovale</i> forma 2 <i>P. ovale</i> forma 3	<i>M. sympodialis</i>	sorovar A <i>M. furfur</i>	<i>M. obtusa</i> <i>M. sympodialis</i> <i>M. furfur</i>
<i>Malassezia furfur</i>	<i>M. furfur</i>		sorovar C <i>M.</i>	<i>M. restricta</i> <i>M.</i>
<i>Pityrosporum pachydermatis</i> / <i>P. canis</i>	<i>P.</i> <i>pachydermatis</i>		<i>pachydermatis</i>	<i>pachydermatis</i>

Estas mudanças na classificação taxonômica de *Malassezia* levaram a uma reavaliação dos procedimentos laboratoriais que eram utilizados para a identificação do agente etiológico. Entre eles podemos citar o estudo e a caracterização morfológica das espécies, sua tolerância térmica, suas necessidades nutricionais para determinados tipos de

ácidos graxos, bem como a composição e as características do DNA de cada uma delas (SCHLOTTFELDT *et al.*, 2002).

Recentemente novas espécies do gênero *Malassezia* foram identificadas, como a *M. japonica*, em humanos e *M. equi* e *M. caprae* em animais (RAMOS, MELLADO e RAMADAN, 2006; CABAÑES *et al.*, 2007). A *M. japonica* foi inicialmente isolada de mulheres japonesas saudáveis. As análises do DNA ribossomal das amostras isoladas sugerem que essas são novos membros do gênero, uma vez que a *M. japonica* difere das demais espécies lipofílicas conhecidas devido a sua habilidade de assimilar Tween 40 e 60 e não habilidade em assimilar Tween 20 e 80, além de crescer na temperatura de 40°C (SUGITA *et al.*, 2003). A *M. equi* foi inicialmente isolada da pele de equinos saudáveis (SUGITA *et al.*, 2002; NELL *et al.*, 2002).

Sugita *et al.*, (2004) isolaram uma nova espécie de *Malassezia* em pacientes japoneses com dermatite seborréica e foi nomeada como *M. yamatoensis* a qual apresenta características fisiológicas e assimilação de Tween semelhante aos da *M. furfur* e *M. dermatis*.

2.1.2 Ecologia das espécies do gênero *Malassezia*

As leveduras do gênero *Malassezia* fazem parte da microbiota fúngica habitual da superfície da pele da maioria dos vertebrados homeotérmicos (MACHADO *et al.*, 2003; GIRÃO *et al.*, 2004). O seu isolamento no meio ambiente é excepcional (GUILLOT, 1995), pois sua sobrevivência é limitada e condicionada à presença de uma fonte lipídica (GABAL, 1988), à exceção da espécie *M. pachydermatis*, que não necessita de suplementação lipídica para crescer em cultivo (LACAZ *et al.*, 1998).

A *M. pachydermatis*, embora não lipodependente é lipofílica. Por conseguinte, uma vez que esta levedura utiliza lipídios para seu crescimento, possivelmente os fosfolipídios resultantes do processo inflamatório, assim como o acúmulo extra de lipídios nas orelhas pendulares, desempenham um importante papel como fatores predisponentes para a maior prevalência de *M. pachydermatis* associadas a quadros clínicos de otites externas (MIDGLEY, 1997; MASUDA *et al.*, 2000).

M. pachydermatis é considerada uma levedura zoofílica porque é frequentemente isolada de animais domésticos e selvagens, particularmente cães e gatos, apresentando uma natureza oportunista, podendo tornar-se patogênica após alterações no microclima do meato acústico externo e nas defesas do hospedeiro, além de ser considerada um fator perpetuante

da otite, pois é responsável pelo agravamento do processo patológico, evitando sua cura, mesmo após a remoção do fator primário (MACHADO *et al.*, 2003).

M. pachydermatis é a espécie mais adaptada a animais, sendo freqüentemente isolada como microbiota de conduto auditivo e pelame de cães, gatos e outras espécies de animais domésticos e selvagens (GIRÃO *et al.*, 2004). Além da pele, tanto de cães como de gatos, a *M. pachydermatis* pode ser isolada dos pêlos (MACHADO *et al.*, 2003), da cavidade oral (BOND, 1996; SIERRA *et al.*, 2000), do reto e do ânus (HAJSIG, HAJSIG e SVOBODRA-VUKOVIC, 1990; BOND, 1996; SIERRA *et al.*, 2000) e, particularmente nos cães, da mucosa genital (BOND, 1996) e dos sacos anais (MACHADO *et al.*, 2003).

Em gatos, a espécie *M. sympodialis* foi também isolada da mucosa anal (HAJSIG, HAJSIG e SVOBODRA-VUKOVIC, 1990). A mucosa anal pode ser uma zona portadora preferencial, a partir da qual se realiza a dispersão e a colonização do resto do corpo (BOND, 1996), similarmente ao que acontece com *Staphylococcus intermedius*, bactéria residente da pele e presente em algumas mucosas (BOND, 1995). Entretanto, um estudo recente sugere que, em certos casos, a colonização das mucosas pode ser secundária à proliferação de leveduras lipofílicas sobre a pele (BOND e LLOYD, 1997).

2.1.3 Estrutura, Fisiologia e Bioquímica do gênero *Malassezia*

O gênero *Malassezia* pode apresentar ambas as formas leveduriforme e micelial, sendo que a primeira está mais comumente associada com a pele normal, além de ser a forma predominante em culturas, no entanto as hifas podem ser vistas em algumas espécies (GUEHO, MIDGLEY e GUILLOT, 1996). Com base nisso, vários pesquisadores produziram micélios *in vitro* usando vários meios (SALKIN e GORDON, 1977), entretanto nem todos os isolados de *Malassezia* são hábeis para passar por essa transformação.

A reprodução das espécies de *Malassezia* é assexual através de brotamento monopolar e enteroblástico a partir de uma base principal. As células mãe e filha são divididas através de um septo, e a célula filha se separa por fissão, permitindo uma cicatriz do broto ou a formação de um colarete devido a sucessivas células filhas que vão emergindo (ASHBEE e EVANS, 2002).

A parede das células do gênero *Malassezia* é muito espessa (Figura 1) quando comparada com outras leveduras (aproximadamente 0,12 μm) e constitui 26 a 37% do volume celular (KEDDIE e BARAJAS, 1972). Os principais componentes da parede celular são açúcares (aproximadamente 70%), proteínas (aproximadamente 10%) e lipídeos (15 a

20%), com pequenas quantidades de nitrogênio e enxofre (THOMPSON e COLVIN, 1970). Diversos trabalhos sugerem que a parede celular é composta por duas camadas (BREATHNACH, GROSS e MARTIN, 1976), com subdivisões na camada mais íntima, enquanto que outros trabalhos encontraram múltiplas camadas no interior da parede (SIMMONS e AHEARN, 1987), sendo que esse último achado foi confirmado por trabalhos subseqüentes. Entretanto duas camadas principais são notadas, que podem explicar os resultados de trabalhos anteriores.

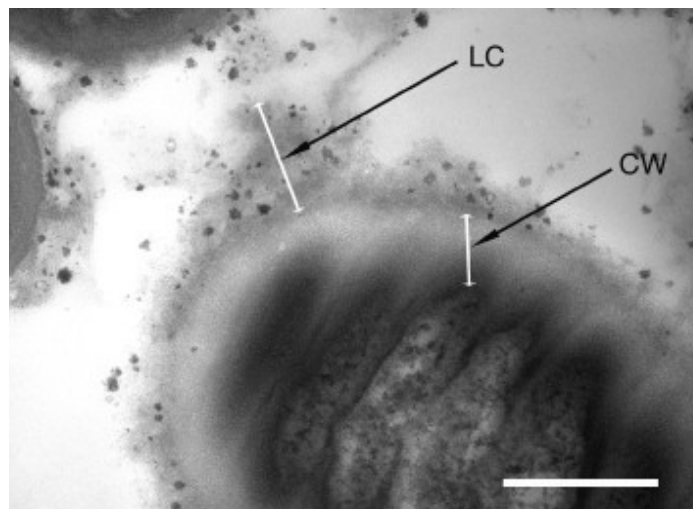


Figura 1. Estrutura da *Malassezia*. Parede celular (CW) e a camada capsular (LC).

Fonte: THOMAS *et al.*, 2008.

A quantidade e o formato das mitocôndrias variam de acordo com cada célula, diferindo entre o formato das células esféricas e ovais. O núcleo pode ser bem definido por uma limitação de uma membrana circundada por um nucleoplasma homogêneo granular. Vacúolos presentes na célula contêm lipídeos e variam em tamanho de acordo com a idade da célula (BARFATANI, MUNN e SCHJEIDE, 1964).

A fisiologia das espécies de *Malassezia* precisa ainda ser mais esclarecida, uma vez que existem lacunas devido a dificuldades encontradas no cultivo e manutenção do organismo, limitando o avanço nessa área. Contudo, sabe-se que *Malassezia* é incapaz de fermentar açúcares, pode utilizar lipídeos como única fonte de carbono, não requer vitaminas ou eletrólitos, e preferencialmente usa metionina como a única fonte de enxofre, mas também pode usar cistina ou cisteína. Elas são hábeis para usar vários aminoácidos, assim como sais de amônio, como fontes de nitrogênio. Entretanto o organismo cresce normalmente *in vitro*

em condições aeróbias, mas também são hábeis para crescer em condições anaeróbias e microaerófilas (ASHBEE e EVANS, 2002).

Com relação ao requerimento de lipídeos para que ocorra o crescimento de *Malassezia*, Shifrine e Marr demonstraram a inabilidade do organismo em formar ácidos graxos de cadeia longa em quantidade suficiente para impedir a síntese de ácido mirístico, requerendo a adição de ácidos graxos pré-formados (SHIFRINE e MARR, 1963). Além disso, a fonte de lipídeo usada durante o crescimento afeta a composição do ácido graxo do organismo, sugerindo que os ácidos graxos não são usados como fonte de energia, mas, de preferência, são incorporados no interior dos lipídeos celulares e ficam fora da metabolização (CAPRILLI *et al.*, 1973).

As espécies de *Malassezia* elaboram enzimas e metabólitos, que possuem atividade lipolítica *in vitro* (NAZZARO-PORRO *et al.*, 1976) e *in vivo*, indicando a produção de uma lipase cuja localização é na parede celular e/ou em áreas na membrana no citoplasma (CATTERALL, WARD e JACOBS, 1978). Em estudos desenvolvidos para determinar o pH ótimo de crescimento das espécies de *Malassezia*, Ran, Yoshike e Ogawa (1993) encontraram pH ótimo de 5,0, enquanto que Plotkin *et al.* (1996) encontraram pH ótimo de 7,5, e que a produção de lipase aumenta mais durante a fase logarítmica do crescimento, demonstrando talvez a importância da hidrólise de lipídeos para o crescimento da célula. Ainda encontraram que existem pelo menos três lipases separadas na *Malassezia* que são essenciais para o crescimento da célula. *In vitro*, as espécies de *Malassezia* também produzem uma fosfolipase (RICIPUTO *et al.*, 1996), cuja atividade está relacionada com a liberação de ácido aracdônico pelas células (PLOTKIN *et al.*, 1998). Uma vez que os metabólitos do ácido aracdônico são envolvidos no processo inflamatório da pele, isso sugere o mecanismo através do qual as espécies de *Malassezia* podem potencializar a inflamação. As espécies de *Malassezia* produzem uma enzima lipoxigenase, como demonstrado através da habilidade para livre oxidação e esterificação de ácidos graxos insaturados, escaleno e colesterol (NAZZARO-PORRO *et al.*, 1986). O resultado da produção de lipoperoxidasas pode causar danos na membrana da célula e conseqüentemente interferir na atividade celular, um mecanismo que pode ser proposto por causar as alterações de pigmentação da pele associado com pitiríase versicolor (PV) (DE LUCA *et al.*, 1996).

2.1.4 Doenças causadas por leveduras do gênero *Malassezia*

As leveduras do gênero *Malassezia* são conhecidas há mais de um século e, desde as primeiras descrições, a sua presença na superfície da pele foi associada, no homem, às enfermidades cutâneas e, nos animais, principalmente, às otites externas e dermatites nos carnívoros domésticos (Figura 2), além de relatos em animais selvagens (MACHADO *et al.*, 2003). A partir dos anos 80, as leveduras do gênero *Malassezia* ganharam especial atenção, principalmente na medicina humana, devido às formas recidivantes de dermatites seborréicas ou de foliculites em indivíduos imunodeprimidos (KWON-CHUNG e BENNETT, 1992; GUÉHO *et al.*, 1998) e às septicemias que causam em neonatos prematuros submetidos à alimentação parenteral (MACHADO *et al.*, 2003).



Figura 2. Quadros clínicos de otite (a) e dermatite (b) em cães.

Fonte: www3.unileon.es/.../dermatopatas/malassezia.htm.

Na medicina veterinária, a espécie *M. pachydermatis* é usualmente apontada como responsável por otites externas nos carnívoros domésticos e por diversas formas de dermatites que acometem cães com doenças de pele localizadas ou generalizadas; também há relatos de isolamento de outras espécies de *Malassezia* na pele de gatos (BOND, 1996; BOND *et al.*, 1997).

O papel da *Malassezia* na otite externa permanece controverso. Entretanto, Masuda *et al.*, (2000) consideraram que, com relação à população fúngica de cães e gatos, a *Malassezia pachydermatis* é o agente de maior importância nas otites externas caninas. Outros organismos como *Aspergillus spp* e *Candida spp* ocorrem com uma menor frequência.

A otite ocorre com uma frequência variável entre caninos e felinos, sendo mais diagnosticada na primeira espécie animal (LEITE, ABREU e COSTA, 2003). Nardoni, Mancianti e Corazza (2005) afirmaram que em cães e gatos pode ser encontrado *Malassezia* lipodependente como *M. globosa* e *M. furfur*. Segundo Carfachia *et al.*, (2005), a maior população de *Malassezia* foi detectada em animais com otite, sugerindo um papel na ocorrência das lesões.

Apesar das espécies de *Malassezia* fazerem parte da microflora cutânea, são associadas com várias doenças de pele, incluindo PV, foliculite, dermatite seborréica, dermatite atópica (DA) (KATO *et al.*, 2006) e infecções sistêmicas. Já na dermatite seborréica, na papilomatose confluyente reticulada de Gougerot e Carteaud e em outros quadros patológicos, o papel patogênico da *Malassezia* spp. não está claramente definido, embora seus quadros clínicos possam ser agravados ou desencadeados por esta levedura (ZAITZ; RUIZ e SOUZA, 2000).

A dermatite atópica é uma doença inflamatória pruriginosa, crônica e recorrente, de alta incidência em cães (HILLIER, 2002). Embora de etiologia multifatorial, sua fisiopatologia está relacionada a mutações genéticas que conduzem a distúrbios da função de barreira tegumentar, a defeitos na resposta imune antimicrobiana e a hiper-reatividade cutânea a aeroalérgenos, antígenos microbianos irritantes e trofo-alérgenos (HOMEY *et al.*, 2006; AKDIS *et al.*, 2006). Estima-se que 10 a 15% da população canina seja afetada pela dermatite atópica, devendo ser suspeita em todos os cães com prurido, piodermites, otites e malasseziose recorrentes (FARIAS, 2007).

A influência das leveduras do gênero *Malassezia* na DA é ainda controversa. Durante as últimas décadas, muitos estudos investigaram a relação entre DA e as espécies de *Malassezia*. Vários autores relatam que pode estar associada à presença de anticorpos séricos do tipo IgE, específico para antígenos dessa levedura (KAWANO e NAKAGAWA, 1995; NORDVALL e JOHANSSON, 1990). O tratamento de pacientes com DA com agentes antifúngicos diminuiu a colonização por *Malassezia* e a severidade das lesões eczematosas, sugerindo que essas espécies desempenham um papel importante na DA (MUKAI *et al.*, 1996). Zargari *et al.* (1995) sugerem que alérgenos de leveduras do gênero *Malassezia* devam ser padronizados para utilização em testes cutâneos em pacientes com dermatite atópica.

Estudos realizados nos últimos 10 anos mostram que 40% a 65% dos pacientes com DA apresentaram alguma relação com leveduras do gênero *Malassezia* em testes cutâneos positivos ou presença de IgE sérica específica (SCHMIDT *et al.*, 1997).

Recentes pesquisas identificaram alguns alelos relacionados às alterações na função de barreira e imunológicas na DA. Há fortes evidências de que defeitos genéticos primários na barreira epidérmica podem ser determinantes no desenvolvimento da DA. Especula-se também que mutações nos genes que codificam proteínas de adesão responsáveis pela preservação da barreira epidérmica possam ocorrer em indivíduos com dermatite atópica (NUTTALL *et al.*, 2005).

Uns dos fatores responsáveis pela intensificação e manutenção da DA são os alérgenos microbianos. O excesso de citocinas T_H2 observado na DA conduz a uma subexpressão de genes responsáveis pela formação de peptídeos antimicrobianos na pele, como as defensinas, fazendo com que pacientes portadores dessa moléstia apresentem uma maior colonização e uma tendência à infecção induzida por bactérias e fungos, sendo grandes responsáveis pela indução, exacerbação e manutenção da dermatite atópica em cães (FARIAS, 2007).

Um aumento da colonização tegumentar pela *M. pachydermatis* tem sido observado em cães com DA, especialmente em áreas seborréicas e eritematosas da pele. Esta é capaz de produzir inúmeras enzimas, como a lipase, a galactosidase, a glucosidase, a hialuronidase, a lecitinase, a peroxidase, a fosfolipase, a protease e a urease, as quais são capazes de induzir a liberação de ácido aracdônico pelos ceracínócitos e a ativação de ciclooxigenase e lipoxigenase na pele, realçando a resposta inflamatória tegumentar. Paralelamente, em cães portadores de DA, tais enzimas promovem a produção de IgE a antígenos de *Malassezia*, o que conduz ao agravamento da resposta inflamatória e do prurido (FARIAS, 2007).

2.2 Imunidade aos Fungos

2.2.1 Imunidade Inata

Os mecanismos de defesa do hospedeiro contra os fungos são numerosos. A resposta imune inata é a primeira linha de defesa contra a maioria dos microorganismos, apresentando como função destruir o patógeno fúngico ou limitar a infecção até que a imunidade adaptativa se desenvolva. Contudo, nem sempre, a resposta inata consegue eliminar o

patógeno. Nesse momento, a resposta imune adquirida entra em ação aumentando a capacidade de proteção do indivíduo. Dessa forma, a imunidade inata é igualmente importante nas infecções fúngicas que requerem uma resposta imune adaptativa para proteção (JANEWAY, 2001).

O primeiro mecanismo inato de defesa é a superfície epitelial, que é protegida por epitélios os quais proporcionam uma barreira física entre o ambiente interno e externo representado pela pele e as mucosas. Sua estrutura e as células que se encontram em cada camada são detalhadas na Figura 1. As infecções ocorrem somente quando o microorganismo coloniza ou atravessa tais barreiras (ROMANI *et al.*, 2004).

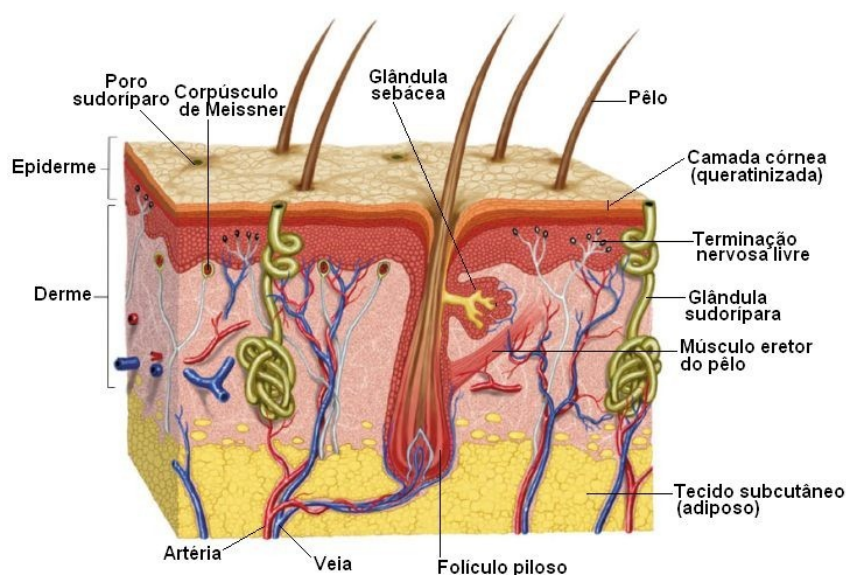


Figura 3. Diagrama esquemático da estrutura da pele.

Fonte: BEAR, CONNORS e PARADISO, 2002.

Quando o fungo atravessa a barreira epitelial e começa a se multiplicar nos tecidos do hospedeiro, ele é, na maioria dos casos, imediatamente reconhecido pelos macrófagos residentes nos tecidos e pelos neutrófilos que são abundantes no sangue e migram para os tecidos infectados. Os macrófagos são os primeiros a encontrar os patógenos nos tecidos, porém, sua ação é rapidamente reforçada pelo recrutamento de grandes quantidades de neutrófilos ao sítio da infecção. A partir daí, se desenvolve uma série de mecanismos inatos de defesa, incluindo ativação da membrana celular, ativação de receptores expressos na membrana celular e fatores humorais presentes nos fluidos e produzidos pelas células ativadas. Nos tecidos, os fagócitos têm um papel essencial na defesa do hospedeiro que

possuem mecanismos que podem se adaptar a diferentes infecções fúngicas (BLANCO e GARCIA, 2008).

Um ponto crítico na defesa é a produção de fatores quimiotáticos no sítio da infecção fúngica para o recrutamento efetivo de leucócitos para o local da infecção. Esses fatores quimiotáticos são muito variados, e incluem peptídeos derivados da ativação do complemento, leucotrienos e produtos sintetizados pelo fungo. Um outro grupo importante são as quimiocinas, uma família de peptídeos com potente atividade quimiotática para subpopulações de leucócitos. Essas quimiocinas são produzidas por uma variedade de células, incluindo leucócitos, células epiteliais, fibroblastos e células musculares por estímulo de citocinas e produtos microbianos. As quimiocinas regulam a atividade biológica para quimiotaxia, bem como a hematopoiese, angiogênese, indução de citocinas, apresentação de antígeno e diferenciação das células Th. Todas essas atividades são importantes nas infecções fúngicas agudas e crônicas (BLANCO e GARCIA, 2008).

Existem limitadas informações acerca da compreensão da fagocitose e morte da *Malassezia*. *In vitro*, os neutrófilos consomem a *Malassezia* em um processo complemento-dependente, que atinge o platô após 40 minutos (RICHARDSON e SHANKLAND, 1991). Após 2 horas de internalização, somente 5% das células são mortas, mas este valor aumenta para 23% se as leveduras forem pré-tratadas com cetoconazol. A habilidade dos neutrófilos para matar *Malassezia* parece ser limitada (ASHBEE e EVANS, 2002).

Os neutrófilos e macrófagos exercem sua ação microbicida de forma mais ampla contra vários tipos de agentes e são células importantes para a defesa do hospedeiro. A documentação de que células fagocíticas expressam em sua membrana receptores como o *toll-like* receptor (TLR), que se ligam especificamente a padrões moleculares existentes em diversos agentes infectantes, torna impróprio denominar inespecífica a resposta imune inata (PASARE e MEDZHITOV, 2004).

O reconhecimento e/ou opsonização de fungos através de células dendríticas e de outros fagócitos pode ser mediada através do complemento, receptores do complemento, proteínas ligadoras de manose, receptores de manose, proteínas surfactantes, receptores para porção Fc das imunoglobulinas, CD18, VLA-5, pentraxinas, e receptores toll-like (TLR) (GARLANDA *et al.*, 2002). TLR₂ e TLR₄ podem ser implicados na imunidade antifúngica (SIELING e MODLIN, 2002).

A síntese dos fatores quimiotáticos é ativada por estruturas moleculares compartilhadas por um grande grupo de patógenos, também conhecidas como padrões

moleculares associados com o patógeno (PAMPs) que são reconhecidas através de receptores de reconhecimento padrão (PRRs), presentes em diferentes células do organismo, principalmente monócitos, macrófagos, células dendríticas, células B, células T e células endoteliais. Os PRRs incluem receptores toll-like (TLR), um receptor celular protéico que media o reconhecimento de patógenos microbianos e subsequente resposta inflamatória nos vertebrados. Os TLRs e outros PRRs conferem reconhecimento dos PAMPs e sua sinalização seguida de liberação de citocinas pró-inflamatórias, e indução da expressão de moléculas co-estimulatórias para promover a ativação da imunidade adaptativa durante a apresentação do antígeno. A ativação simultânea de múltiplos PRRs por um patógeno fúngico possibilita uma resposta imune específica efetiva pelo sistema imune (ROEDER *et al.*, 2004).

Os macrófagos e os neutrófilos reconhecem os patógenos por meio de receptores presentes em suas membranas (receptores de superfície). A ligação aos receptores de superfície desencadeia o processo de fagocitose do patógeno, levando a sua morte dentro da célula fagocítica. Além da fagocitose, os macrófagos e neutrófilos produzem várias substâncias tóxicas que ajudam na destruição do microorganismo englobado (ex.: peróxido de hidrogênio e óxido nítrico).

Os receptores manose, β -glucana, complemento do tipo 3 da via alternativa estão envolvidos na fagocitose de células leveduriformes e foram caracterizados em uma linhagem celular monocítica humana. As células leveduriformes de *Malassezia* mortas pelo calor são mais eficientes do que as células leveduriformes de *Malassezia* vivas em estimular a fagocitose, embora a razão para isso seja desconhecida (SUZUKI *et al.*, 1998). Isto pode ser justificado pela habilidade limitada dos neutrófilos em destruir a *Malassezia*. Uma possível razão para isso pode ser a produção de ácido azelaico pela *Malassezia*. Akamatsu *et al.* (1991) examinaram os efeitos do ácido azelaico na quimiotaxia, fagocitose e na produção de espécies reativas de oxigênio pelos neutrófilos e observaram que a quimiotaxia e a fagocitose não são afetadas por esse ácido, mas a produção de O_2^- e OH^- sofrem uma diminuição dose-dependente e a produção de H_2O_2 também é reduzida. Os efeitos são devido à inibição do metabolismo celular. O ácido azelaico também mostra uma tendência para limpar os radicais de oxigênio (FITTON e GOA, 1991). Não é conhecido se o ácido azelaico é produzido *in vivo*, mas é interessante especular que se isso ocorrer, pode estar envolvido na proteção do organismo dos mecanismos de morte oxidativos utilizados pelos fagócitos (ASHBEE e EVANS, 2002). Além disso, os lipídeos associados com a parede celular da *Malassezia* podem ser antifagocíticos e estarem

envolvidos na proteção contra a destruição pelos neutrófilos (BLANCO e GARCIA, 2008).

Suzuki *et al.* (2000) observaram que quando uma linhagem celular monocítica, é estimulada com *Malassezia* morta pelo calor ou viva, a produção de interleucina-8 (IL-8) é aumentada, enquanto a estimulação de linhagem celular granulocítica resulta no aumento dos níveis de ambas IL-8 e IL-1 α . As células da levedura *Malassezia* opsonizadas e as vivas são mais estimulatórias do que as células não opsonizadas e as células mortas pelo calor. Os efeitos de IL-1 α incluem a ativação de linfócitos, quimiotaxia e ativação de neutrófilos e indução da inflamação. IL-8 também induz quimiotaxia e ativação de neutrófilos e células T. Por essa razão, a interação de *Malassezia* com células fagocíticas pode servir para amplificar a resposta inflamatória e estimular o recrutamento adicional de células fagocíticas (ASHBEE e EVANS, 2002).

A interação de *Malassezia* com os queratinócitos induz a levedura a produzir diferentes citocinas, mas evidente em *M. pachydermatis* do que nas outras espécies de *Malassezia*, especialmente IL-6. A IL-6 é uma molécula de sinalização intercelular tradicionalmente associada com o controle e a coordenação de respostas imunes, sendo primeiramente secretada pelos macrófagos e linfócitos em resposta a lesão ou infecção (PRESTES *et al.*, 2006). Para que ocorra essa estimulação é necessário o contato da levedura com a célula. Este alto nível de indução de citocinas pela *M. pachydermatis* pode explicar a severidade das doenças associadas com esta espécie (ASHBEE, 2006).

A ativação do complemento é responsável pela inflamação associada com quadros de doenças por *Malassezia*. Alguns trabalhos demonstraram a habilidade da *Malassezia* em ativar o sistema complemento, via caminho alternativo ou via caminho clássico. A ativação pelo caminho alternativo depende da concentração celular e do período, alcançando um platô após 30 minutos. A molécula responsável para desencadear o caminho alternativo não foi determinada, mas β -glucana presente na parede celular pode estar envolvida nesse processo. As proteínas envolvidas nas etapas iniciais do caminho alternativo do complemento estão presentes na pele, portanto a inflamação mediada pelo complemento é associada com muitas dermatoses. Em estudos imunohistoquímicos de pacientes com dermatite seborréica foram encontrados depósitos de C3 nas lesões localizadas ao redor das células de *Malassezia*, enquanto na pele não envolvida estavam ausentes. Por essa razão, o sistema complemento pode estar envolvido na inflamação associada com dermatite seborréica, mas não é documentada em lesões de pitíriase versicolor (ASHBEE e EVANS, 2002).

As células do sistema imune inato providenciam as principais funções imunoregulatórias que unem a imunidade inata e a adaptativa. O caminho entre a imunidade inata e a adaptativa são as células dendríticas. Essas células são altamente eficientes como células apresentadoras de antígenos (APC) e são derivadas de linhagens linfóides e mielóides. Células dendríticas imaturas expressam baixos níveis de complexo de histocompatibilidade principal de classe II (MHC II), são altamente fagocíticas, e chegam nos tecidos via circulação. Devido à estimulação por produtos microbianos ou citocinas/eicosanoides inflamatórios, as células dendríticas regulam positivamente a expressão de MHC II, do receptor de quimiocina CCR7 e as moléculas co-estimulatórias e regulam negativamente a fagocitose. As células dendríticas têm sido focos de recentes estudos na imunidade inata aos fungos (HUFFNAGLE e DEEPE, 2003).

Os fatores de virulência fúngicos e os produtos fúngicos que são secretados podem interferir na maturação das células dendríticas, resultando na interação dinâmica entre o microrganismo e o hospedeiro e tendo como resultado final a localização da infecção fúngica (HUFFNAGLE e DEEPE, 2003).

2.2.2 Imunidade Adquirida

A ativação da resposta imune adaptativa é um passo crucial para o controle de infecções no hospedeiro com importantes medicamentos antifúngicos. A arma que o sistema imune utiliza são linfócitos que possuem notável flexibilidade em sua capacidade para responder a antígenos estranhos. As células B e T rearranjam a variação, diversidade e elementos de junção de seus respectivos receptores e como consequência cria um vasto número de populações clonais, cada uma programada para reagir a diferentes epítomos antigênicos (HUFFNAGLE e DEEPE, 2003).

O principal mecanismo responsável pela imunidade adquirida contra as infecções fúngicas é a imunidade mediada por células. Os fungos muitas vezes provocam respostas específicas de anticorpo que são úteis para o diagnóstico sorológico. Entretanto, a eficácia protetora da imunidade humoral não está estabelecida (ABBAS, LICHTMAN e POBER, 2008).

As células dendríticas se tornam ativadas e maduras e migram via linfática para o linfonodo de drenagem onde estimulam a resposta das células T (TRAYNOR *et al.*, 2002), através da apresentação de antígenos e produção de citocinas. As células dendríticas têm habilidade para distinguir entre as diferentes formas das espécies fúngicas e direcionar a

resposta de Th1 versus Th2 (ROMANI *et al.*, 2002). A maturação das células dendríticas durante a resposta imune também influencia o desenvolvimento de células T regulatórias (Treg) e tem uma importante implicação nas infecções fúngicas crônicas. As células T efetoras são CD25(-) CD4(+), considerando que as células Treg têm CD25(+) CD4(+) (McGUIRK e MILLS, 2002).

As células de Langerhans localizadas na pele processam os antígenos e os apresentam para as células T, providenciando uma ligação entre as respostas imunes não específica e específica. Buentke *et al.* (2000) usando células dendríticas derivadas de monócitos, demonstraram que as células dendríticas imaturas são mais eficientes do que as células maduras em processar as células de *Malassezia*, mananas, e alérgenos extraídos da *M. furfur* (r Mal f 5).

As células T podem exercer sua função através da citotoxicidade mediada por células CD8+ ou através da secreção de citocinas que vão ativar macrófagos para destruir os agentes intracelulares (MACHADO *et al.*, 2004).

A ativação das células T CD4+ ou CD8+ ou ambas é a chave no aperfeiçoamento de infecções com muitos fungos. Para muitos fungos, a geração da resposta de Th1 dominante, que é caracterizada através da produção de IL-12, IFN- γ , TNF- α e/ou fator estimulante de colônia de macrófagos granulócitos (GM-CSF), essenciais na expressão da resposta imune. Alternativamente, a resposta de Th2, caracterizada pela produção de IL-4, IL-5 e IL-13 é associada com a exacerbação da doença e modulação da severidade da infecção. Evidências adicionais têm sugerido que a potente resposta de Th2 é importante no desenvolvimento e/ou manutenção da imunidade mediada por Th1 (HUFFNAGLE e DEEPE, 2003). Vale salientar que a resposta de Th2 está associada a produção de IgE. Dermatite e otite por *Malassezia* são consideradas frequentemente como fatores agravantes que complicam a dermatite atópica. Cães atópicos têm altos níveis de anticorpos IgG e IgE específicos contra *Malassezia* quando comparados com cães saudáveis, e esse fato não depende da presença de elevados números de leveduras (NUTTALL e HALLIWELL, 2001).

Os estudos que examinam as respostas imunes celulares e humoral específicas à espécie de *Malassezia* nos pacientes com doenças *Malassezia*-associadas e controles saudáveis foram geralmente incapazes de definir diferenças significativas em sua resposta imune. O uso de preparações antigênicas variadas das diferentes espécies de *Malassezia* pode em parte ser responsável para este, embora estes problemas possam agora ser superados

usando as técnicas baseadas em trabalhos recentes que definem alguns antígenos importantes (ASHBEE e EVANS, 2002).

O gênero *Malassezia* é imunomodulatório e esse fato é importante para compreender a habilidade de causar a doença. Definir a resposta imune à espécie de *Malassezia* e a maneira com que os organismos as modulam pode ser a chave para compreender como as espécies de *Malassezia* podem existir como comensais e patogênicas (ASHBEE e EVANS, 2002).

A habilidade de *Malassezia* em estimular o sistema imune é bem documentada (ASHBEE e EVANS, 2002), mas a antigenicidade é baixa em comparação com outros organismos.

Foi demonstrado que *M. furfur* induz à formação de anticorpos IgA, IgG e IgM, e que estes ativam os fatores de complemento por meio das vias alternativa e clássica. Nos pacientes crônicos de pitíriase versicolor, um defeito na produção de linfocinas tem sido demonstrado, mas seu papel, bem como o de outros fatores imunológicos, no processo patológico é desconhecido. Com isso, a Malasseziose está relacionada a uma alteração de resposta imune humoral e a fatores de complemento, não parecendo sofrer influência da resposta imune celular (ROZA *et al.*, 2003).

Bond *et al.* (1998), estudando a resposta imune celular e humoral para *M. pachydermatis* em cães saudáveis e cães com dermatite por *Malassezia*, observaram que os títulos de anticorpos IgG e IgA específicos para *M. pachydermatis* no soro de 21 Basset Hounds e 11 cães afetados de várias raças excederam os títulos dos Basset Hounds e Beagles saudáveis ($P < 0.01$ para IgG, $P < 0.05$ para IgA).

Mediante o exposto, verifica-se que uma análise crítica e delineamento da complexa interação entre a resposta imune inata e adaptativa a infecções fúngicas servem como uma fundamentação para o entendimento da imunopatogênese desses organismos (HUFFNAGLE e DEEPE, 2003).

A figura 4 mostra as etapas e moléculas envolvidas nas imunidades inata e adaptativa.

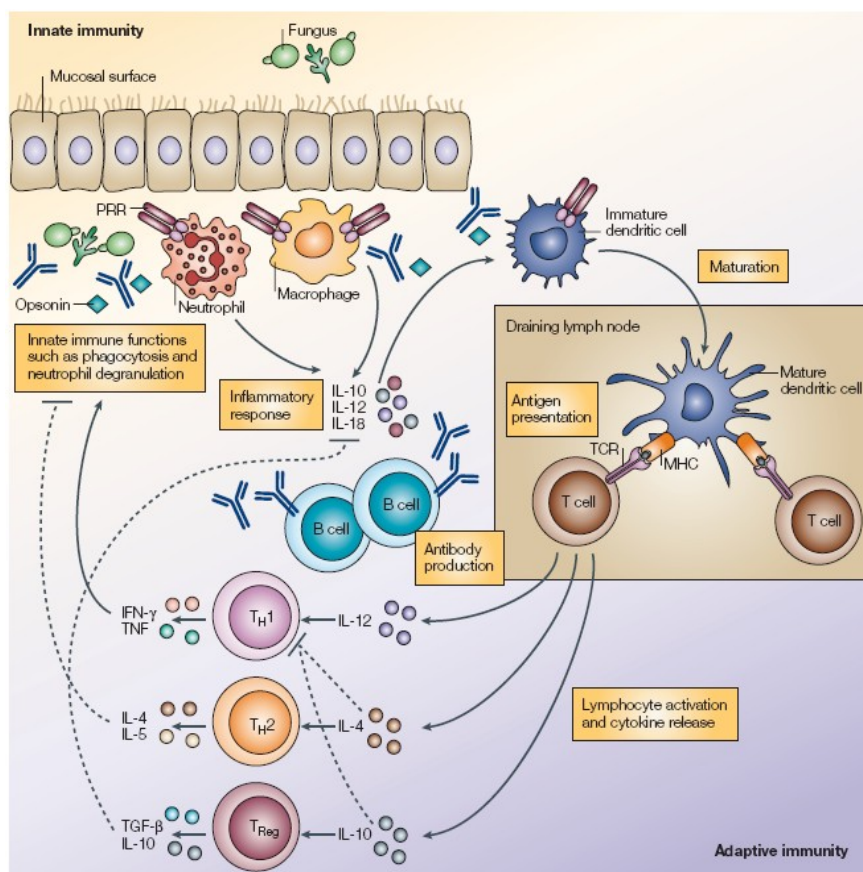


Figura 4. Mecanismos da imunidade inata e adaptativa aos fungos.

Fonte: ABBAS, LICHTMAN e POBER, 2008.

2.2.2.1 Componentes antigênicos da *Malassezia*

Os antígenos de fungos podem ser preparados a partir de células totais, ou partes das células, esporos, produtos metabólicos, ou sobrenadante de cultura de fungos. A maioria dos antígenos de fungos tem sido obtida de componentes solúveis das células, ou do meio no qual eles se desenvolveram (MEIRELLES *et al.*, 2006).

Exoantígenos são moléculas imunogênicas solúveis, secretadas por fungos no meio de cultura. Muitos fungos produzem antígenos que são específicos para um gênero e/ou espécie, portanto podem ser utilizados para identificação, apresentando grande aplicabilidade na imunoidentificação de fungos patogênicos e na resolução de problemas taxonômicos (MEIRELLES *et al.*, 2006).

Existem vários métodos que podem ser empregados na obtenção e purificação de exoantígenos. O meio utilizado, a temperatura, o tempo de incubação e a condição de cultivo variam conforme o fungo considerado. A principal preocupação consiste em produzir uma cultura com ampla variedade de antígenos. Para a produção de exoantígenos ou antígenos

miceliais é necessário utilizar um meio que seja desprovido de antígenos que possam apresentar reação cruzada no ensaio (NOTERMANS *et al.*, 1998).

Embora pesquisas anteriores tenham sido desenvolvidas com o intuito de avaliar as relações sorológicas de *Malassezia*, apenas estudos mais recentes determinaram a composição antigênica e as massas moleculares de cerca de 80 antígenos (NISSEN *et al.*, 1998). Dos antígenos descritos, apenas um número limitado foi estudado e caracterizado.

Silva, Fischman e Camargo, em 1997, demonstraram que soros de pacientes com pitiríase versicolor relativa à exoantígeno de forma leveduriforme de *M. furfur* apresentaram 12 diferentes componentes de peso molecular entre 25 e 94 kDa, porém nesses soros havia predominantemente a proteína de 70 kDa, considerada marcador da infecção.

Koyama *et al.*, (2001) pesquisando anticorpos IgE contra os componentes antigênicos da *M. furfur*, *M. globosa*, *M. restricta*, *M. slooffiae* e *M. sympodialis* no soro de pacientes com dermatite atópica, observaram que os componentes dos anticorpos IgE mais freqüentemente classificados mostraram peso molecular de 43-46 kDa para *M. slooffiae*, 12-22 kDa para *M. sympodialis*, 35-40 kDa para *M. restricta*, 45-50 kDa para *M. globosa*, e 67-72 kDa para *M. furfur*. Os resultados indicaram que as espécies de *Malassezia* contêm componentes antigênicos em comum.

Através de eletroforese, os pesos moleculares dos antígenos das leveduras do gênero *Malassezia* foram determinados. Em 1997, o primeiro antígeno de *Malassezia*, denominado Mal f 1, foi seqüenciado e expressado, sendo composto por um cDNA de 1176 pares de base, que codifica uma proteína cuja massa molecular é de 36 kDa. A seqüência de DNA não mostrou similaridade com outras seqüências conhecidas. Contudo, a presença de uma região hidrofóbica na terminação N pode indicar que a proteína é de membrana ou uma proteína secretada pela parede celular (SCHMIDT *et al.*, 1997).

Os antígenos caracterizados posteriormente, Mal f 2 e Mal f 3, foram encontrados com massa molecular de 21 e 20 kDa, respectivamente, em subcondições (YASUEDA *et al.*, 1998). Em melhores condições, as massas moleculares foram de 42 e 40 kDa, respectivamente, sugerindo que os antígenos são dímeros de uma única proteína, ligados através de pontes dissulfídicas. Existe 51% de homologia entre Mal f 2 e Mal f 3, e eles têm homologia com proteínas da membrana peroxissomal de *Candida boidinii* e com alérgenos de *Aspergillus fumigatus*. Não existe seqüências homólogas com Mal f 1 (ASHBEE e EVANS, 2002).

O antígeno Mal f 4, identificado através de eletroforese em gel de poliacrilamida

(PAGE) e immunoblotting, foi clonado e seqüenciado (ONISHI *et al.*, 1999), cuja proteína tem massa molecular de 35 kDa e mostra 57% de seqüências homólogas com *Saccharomyces cerevisiae*. O Mal f 4 foi considerado o principal antígeno, uma vez que em um estudo utilizando pacientes com DA, houve reação com Mal f 4 em 83% dos casos.

Mal f 5 tem uma massa molecular de 18,2 kDa e 57 e 58% de homologia com Mal f 2 e Mal f 3, respectivamente (LINDBORG *et al.*, 1999). Mal f 6, com uma massa molecular de 17,2 kDa, tem 82% de seqüências homólogas com ciclofilina de *Schizosaccharomyces pombe*. Ambas as proteínas recombinantes são hábeis para se ligarem com soro de pacientes com DA. Três outras proteínas, com massas de 21,3; 14,4; e 9,7 kDa, foram também clonadas e expressas. Elas não têm seqüências homólogas com nenhuma das proteínas conhecidas e podem ser clones incompletos de cDNA, embora as proteínas recombinantes reagem em immunoblots. Trabalhos subseqüentes, usando clones de cDNA de tamanho padrão, resultou na descrição de três antígenos extras, Mal f 7, Mal f 8 e Mal f 9 (RASOOL *et al.*, 2000). Mal f 7 codifica uma proteína de 141 aminoácidos (16,2 kDa), Mal f 8 codifica uma proteína de 179 aminoácidos (19,2 kDa), e Mal f 9 codifica uma proteína de 126 aminoácidos (14,0 kDa). Nenhuma das proteínas tem seqüências homólogas com quaisquer das proteínas conhecidas e as proteínas recombinantes reagiram com o soro de pacientes com DA em immunoblots.

Em um estudo desenvolvido por Koyama *et al.* (2000), foi caracterizado um antígeno de *M. globosa* com uma massa molecular de 46 kDa, o qual foi encontrado sendo o principal antígeno, reagindo com 69% do soro de pacientes com DA. O antígeno reagiu com concavalina A, indicando que é uma glicoproteína. Posteriormente, também foi identificado um antígeno protéico de 67 kDa.

Apesar das pesquisas realizadas com o objetivo de identificar os antígenos presentes na *Malassezia* e suas respectivas massas moleculares, muito ainda se deve estudar para esclarecer conclusões incertas. Isso se deve ao fato de que, diversos pesquisadores definiram uma variedade de antígenos, classificados como proteínas de baixa a alta massa molecular e também carboidratos de alta massa molecular. Além disso, muitos dos antígenos têm massas similares e podem ser idênticos, diferindo simplesmente na acurácia com que as massas podem ser identificadas. Enquanto alguns pesquisadores têm encontrado faixa de certas massas difíceis de distinguir (JOHANSSON e KARLSTROM, 1991), outros têm relatado que as faixas podem ser distinguidas em intervalos de 1 kDa, especialmente em antígenos com peso molecular inferior a 50 kDa (LINTU, SAVOLAINEN e KALIMO, 1997).

Adicionalmente, muitos pesquisadores têm usado immunoblotting para definir antígenos. Entretanto, esta técnica geralmente é efetiva para demonstrar a presença de proteínas, mas pode ser falha na demonstração de carboidratos, devido ao fato de que os carboidratos não penetram no gel do sulfato duodecil de sódio (SDS) ou porque eles produzem faixas coradas irradiadamente. Conseqüentemente, muitos antígenos protéicos têm sido descritos, com conseqüente suposição de que essas proteínas são os antígenos mais importantes (JENSEN-JAROLIM *et al.*, 1992).

Zargari *et al.* (1995), estudando a relação entre antígenos protéicos e carboidratos de *Malassezia*, usando diferentes meios de culturas, amostras, temperatura de incubação e procedimento de extração, obtiveram um anticorpo específico para um antígeno de 37 kDa e um outro específico para um antígeno de 67 kDa de *Malassezia*. Estes autores concluíram que a variável mais importante é a duração da cultura. O número de antígenos protéicos diminui com o aumento do tempo de cultivo, enquanto antígenos de carboidratos foram encontrados permanecendo em níveis relativamente constantes durante um período de 21 dias de cultura. Por conseguinte, a duração da cultura pode ter um efeito significativo na presença de antígenos de *Malassezia* e pode variar a importância aparente dos antígenos protéicos e carboidratos encontrados em vários estudos.

As leveduras do gênero *Malassezia* são organismos antigenicamente complexos, uma vez que ocorre alteração na expressão dos antígenos por toda parte do ciclo de crescimento. Em adição, diferentes amostras possuem diversos antígenos e diferentes métodos de extração liberam diferentes antígenos (JENSEN-JAROLIM *et al.*, 1992). Portanto, ambos os antígenos protéicos e carboidratos são provavelmente importantes em *Malassezia*, embora a proporção de cada um possa variar durante o ciclo de crescimento. Os antígenos protéicos são provavelmente da parede da célula ou componentes citoplasmáticos que podem ser facilmente detectados em immunoblotting e são presentes na fase precoce do crescimento. Os antígenos carboidratos, provavelmente mananas e manoproteínas, são mais difíceis de serem detectados em immunoblotting e são mantidos por toda a parte do ciclo de crescimento. A identificação e caracterização de 9 antígenos definidos de *Malassezia* são importantes passos para se compreender a composição antigênica dessa levedura (ASHBEE e EVANS, 2002).

2.2.2.2 Estudo sorológico das espécies de *Malassezia*

Em razão da confusão taxonômica que existiu com o organismo durante muitos anos, diversos pesquisadores usaram métodos sorológicos para determinar as relações antigênicas entre as fases miceliais e leveduriformes da *Malassezia*. Sternberg e Keddie (1961) usaram soro de pacientes com PV para avaliar a reação-cruzada entre *M. furfur* e *P. orbiculare*, e concluíram que as formas leveduriforme e micelial têm antígenos em comum. Em 1979, foi descartada comparação antigênica de *P. ovale* e *P. orbiculare* (TANAKA e IMAMURA, 1979). Em estudos subsequentes, foram testados antisoros de coelhos para *P. orbiculare* contra extratos antigênicos solúveis preparados de ambos *P. ovale* e *P. orbiculare* no teste de difusão de Ouchterlony. As reações entre os antisoros e os antígenos produziram três bandas para *P. orbiculare* e duas bandas para *P. ovale*, que se identificaram com as anteriores, sugerindo que eles têm antígenos em comum. Os anti-soros anti-*P. orbiculare* foram marcados com isotiocianeto de fluoresceína e usados em estudos de imunofluorescência contra *P. ovale* e *P. orbiculare*, onde foram observadas reações idênticas. Adicionalmente, quando lesões de *M. furfur* foram testadas, foram também observadas as reações as quais podiam ser removidas através da absorção de anti-soros com células de *P. ovale* ou *P. orbiculare*. Dessa forma, foi sugerida identidade antigênica entre *P. ovale*, *P. orbiculare* e *M. furfur* (WEBSTER e MCGINLEY, 1980).

Bruneau e Guinet (1984) revelaram através de técnicas imunoeletróforéticas quantitativas 63 componentes antigênicos na *Malassezia*, mas não revelaram qualquer diferença antigênica significativa entre *P. ovale* e *P. orbiculare*. Dessa forma, desde 1984, diversos estudos confirmaram a identidade antigênica de *P. ovale*, *P. orbiculare* e *M. furfur*, sugerindo que todos são estágios do ciclo de vida de um mesmo organismo. Além disso, Midgley (1989, 1993) utilizou imunoeletróforese e ELISA para estudar as variantes antigênicas e encontraram alguns antígenos específicos para as diferentes espécies e formas que são definidas por elas. Takahashi, Ushijima e Ozaki (1981) encontraram três grupos específicos de antígenos solúveis, usando dupla difusão, em três variantes de *Malassezia* que foram diferenciadas com base no formato da célula e diferenças metabólicas.

Em 1986, houve a unificação de diferentes formas morfológicas dentro da espécie de *M. furfur* (CANNON, 1986). Além disso, Cunningham *et al.* (1990) identificaram três sorovares de *M. furfur*, designados A, B e C, os quais foram distinguidos com base nas características de crescimento, morfologia da colônia, e antígenos de superfície específicos. A produção de anti-soros de três formas de colônias e a absorção com amostras homólogas e

heterólogas indicou a presença de ambos sorovares específicos e antígenos de superfície comum. Trabalhos moleculares subsequentes que descreveram uma sexta espécie lipofílica de *Malassezia* confirmaram que existem variantes dentro do gênero e que são suficientemente diferentes para classificar como uma espécie em separado. Por conseguinte, a descoberta dos três sorovares de *Malassezia* e as variantes definidas por Midgley (1989, 1993) representa espécies distintas, confirmando a validade de sua diferenciação.

Sohnle e Collins-Lech (1980) examinaram quatro extratos antigênicos de *Malassezia* e *Candida albicans* e compararam a habilidade desses organismos em estimular o sistema imune através de um ensaio de transformação de linfócitos ou testes da pele. Eles encontraram que 20 a 100 vezes mais proteínas extraídas de *Malassezia* do que *C. albicans* são requeridas para estimular a resposta imune celular nos ensaios. A quantidade de proteínas nas preparações foi similar nos dois organismos, e eles sugeriram que *Malassezia* é menos antigênica do que *C. albicans*. Esta antigenicidade limitada foi proposta como uma reação para a ausência de inflamação em casos de PV.

Trabalhos têm sido realizados para analisar a presença de antígenos na fase micelial de *Malassezia* (SAADATZADEH, 1998). As fases miceliais de duas amostras foram produzidas, e os antisoros foram produzidos para misturas de leveduras-micélio. Antígenos em comum para ambos levedura e micélio foram demonstrados e todos os antígenos do micélio estavam presentes nas leveduras. Dessa forma, antígenos micélio-específicos não foram encontrados, sugerindo que não tem antígenos fase-específicos, pelos menos nas superfícies das células.

2.2.3 Imunomodulação através da *Malassezia*

Alguns estudos foram realizados para verificar a modulação da resposta imune por *Malassezia*. Takahashi, Ushijima e Ozaki (1984) utilizando suspensões de *Malassezia* mortas pelo calor injetadas por via intraperitoneal em camundongos como pré-tratamento, desafiaram intraperitonealmente os animais com *Typhimurium*, observaram resistência para infecção em todos os animais pré-tratados. Isso sugere que a injeção de *Malassezia* resultou no aumento do número e da atividade bactericida dos macrófagos intraperitoneais, indicando que a regulação positiva dos macrófagos é um mecanismo protetor contra desafios bacterianos subsequentes. Posteriormente, os mesmos autores realizaram uma pesquisa para observar a habilidade da *Malassezia* em proteger camundongos contra desafio com linhagem de células tumorais, e observaram que o pré-tratamento com *Malassezia* aumentou

significativamente a sobrevivência dos camundongos quando esses eram desafiados com células tumorais. Foi sugerido que a proteção era devida a estimulação de macrófagos em produzir radicais livres. Por essa razão, esses estudos demonstraram que a *Malassezia* é hábil em regular positivamente as células fagocíticas e, dessa forma, estimular um aumento na proteção contra desafios por bactérias e células tumorais em animais (ASHBEE e EVANS, 2002).

Em contraste, Walters *et al.* (1995) demonstraram que a *Malassezia* regula negativamente a resposta imune. Esses autores usaram preparações (células totais formalizadas, sobrenadante de cultura e fração celular) de *Malassezia globosa*, as quais foram co-incubadas com queratinócitos ou células mononucleares de sangue periférico (PBMC), e a liberação de IL-1 foi determinada em vários períodos de tempo. Os níveis de IL-1 β liberados por PBMC co-incubados com células totais formalizadas foi significativamente mais baixo do que o controle negativo. Dessa forma, os autores sugeriram que a depressão da liberação de IL-1 β pode contribuir para a ausência da inflamação vista em doenças como PV e para um mecanismo de escape da *Malassezia* para se evadir da detecção pelo sistema imune.

Kesavan *et al.* (1998) examinaram o efeito de três sorovares de *Malassezia* na produção de IL-1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral α (TNF- α) através de PBMC. Em geral, a fase exponencial de células de *Malassezia* formalizadas de algumas proporções de levedura-PBMC estimulou o aumento na produção de citocinas, enquanto as células da fase estacionária não causaram mudanças ou deprimiram significativamente a produção de citocina em todas as proporções testadas. As células de levedura viáveis de *Malassezia* também deprimiram significativamente a produção de IL-1 β , IL-6 e TNF- α .

Os mecanismos através dos quais a depressão da produção de citocinas por PBMC pode ser mediada foram estudados. As células de *Malassezia* da fase estacionária foram tratadas com solventes para remover alguns dos lipídeos presentes na parede da célula e a camada capsular. As células não tratadas e as tratadas com solvente foram então co-cultivadas com PBMC na proporção de 20 leveduras para 1 PBMC, e os níveis de citocina no sobrenadante da cultura foram determinados após 24 horas. PBMC co-cultivado com *Malassezia* tratada com solvente produziram quantidades de IL-1 β , IL-6 e TNF- α foram similares ou significativamente mais altos do que os níveis constituintes. Por essa razão, a remoção do lipídeo da *Malassezia* abala a habilidade para suprimir a produção de citocinas pelo PBMC, e dessa forma o lipídeo da parede celular e a camada capsular podem ser

responsáveis pela ausência da inflamação associada com a *Malassezia* em estados comensais (ASHBEE e EVANS, 2002).

A aparente contradição da habilidade da *Malassezia* em regular positivamente ou suprimir a resposta imune direta contra isso, foi apenas estudado em detalhes recentemente. A compreensão de que modo esta imunomodulação ocorre pode ser a chave para entender de que modo as espécies de *Malassezia* ocorrem em ambas formas comensais e patogênicas (ASHBEE e EVANS, 2002).

2.3 Métodos de diagnóstico da Infecção por *Malassezia*

O diagnóstico preciso de um processo infeccioso é a demonstração do patógeno ou de seus produtos nos tecidos ou fluidos biológicos do hospedeiro. Porém nem sempre isso é possível, quer pela ausência do agente infeccioso, quer pela falta de sensibilidade dos métodos utilizados, ou por falhas técnicas ou pelos longos períodos exigidos para uma resposta do laboratório. Os métodos imunológicos diretos ou indiretos têm sido amplamente utilizados para suprir as deficiências dos métodos microbiológicos na pesquisa de antígenos, anticorpos ou imunocomplexos, pela rapidez, simplicidade de execução, possibilidade de automação e baixo custo operacional. O conhecimento da aplicação dos testes sorológicos e a interpretação correta dos resultados obtidos são fundamentais para clínicos, patologistas e laboratoristas orientarem seu trabalho visando o diagnóstico correto, associando sempre os resultados obtidos às investigações clínicas e epidemiológicas (FERREIRA, WATTER e AVILA, 1996).

Os métodos tradicionais de identificação e detecção de fungos incluem cultivo em vários meios, análise microscópica e análises bioquímicas (análise de quitina, ergosterol ou metabólitos secundários). Esses métodos, exceto a identificação de micotoxinas geralmente consomem muito tempo, apresentam baixa especificidade e exigem pessoal com experiência (GAN *et al.*, 1997; MEIRELLES *et al.*, 2006). A maioria destes métodos apresenta baixa especificidade e reprodutibilidade, além de consumirem tempo e exigirem pessoal técnico qualificado para a execução (LI; MARQUARDT; ABRAMSON, 2000).

Por meio dos métodos tradicionais de cultivo, fungos danificados ou inativados pelo calor dificilmente são detectados e a detecção de micélio por microscopia não é precisa, enquanto os métodos químicos são particularmente laboriosos. Os métodos microbiológicos podem demorar em torno de 6-7 dias e necessitam de pessoal com experiência (MEIRELLES *et al.*, 2006)

Durante as últimas décadas, novos métodos que permitem uma rápida identificação têm sido estudados, sendo alguns destes baseados em ensaios imunológicos (LI; MARQUARDT; ABRAMSON, 2000). A especificidade das reações antígeno-anticorpo faz dos métodos imunológicos ferramentas eficientes no diagnóstico de doenças causadas por fungos, protozoários, bactérias e vírus (MARINHO, 2001).

Os métodos imunológicos apresentam várias vantagens, como rapidez na obtenção de resultados, alta sensibilidade e facilidade na execução. Dentre os ensaios imunoenzimáticos, os que utilizam exoantígenos são os mais empregados na resolução de problemas taxonômicos, detecção e identificação de fungos toxigênicos (MEIRELLES *et al.*, 2006).

Recentemente, estudos de sistemática molecular têm sido realizados na tentativa de facilitar a diferenciação de espécies fúngicas, mas embora possuam boa especificidade, essas metodologias apresentam custo elevado e exigem pessoal técnico qualificado (KERÉNYI *et al.*, 1999; STEENKAMP *et al.*, 2000; MEIRELLES *et al.*, 2006).

A técnica de imunohistoquímica é usada na rotina diagnóstica e na pesquisa em patologia humana desde 1970, porém seu uso na patologia veterinária é relativamente recente, principalmente com objetivo diagnóstico. A maioria dos imunomarcadores usados freqüentemente para animais na rotina diagnóstica é anticorpo policlonal, aumentando a sensibilidade do teste (RUIIZ *et al.*, 2000).

3 JUSTIFICATIVA

Em medicina veterinária, *M. pachydermatis* é a espécie mais importante do gênero, por ser mais frequentemente isolada da pele, mucosa e canais auditivos de cães e gatos saudáveis e está associada com doenças no canal auditivo e na pele. Apesar de possuir natureza oportunista, os fatores que favorecem a sua proliferação e a transição do estado comensal para patogênico bem como sua interação com o sistema imune são pouco conhecidos. Além disso, alguns trabalhos demonstraram a produção de anticorpos específicos contra antígenos de *M. pachydermatis* em animais saudáveis e com dermatite atópica associada com essa levedura, sugerindo seu potencial antigênico. Esse fato torna-se importante para utilização desse recurso como diagnóstico imunológico.

Sendo assim, esse trabalho visa isolar e caracterizar parcialmente proteínas oriundas de *M. pachydermatis* e avaliar o seu potencial antigênico através das respostas inflamatória e imunológica. Com isso, espera-se contribuir para futuros testes de diagnóstico imunológico contra essa levedura.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

H 1 - O extrato total de *Malassezia pachydermatis* induz resposta inflamatória;

H 2 - O extrato total de *Malassezia pachydermatis* induz a produção de anticorpos específicos e ativa a resposta imune celular.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

O objetivo desse trabalho foi avaliar a resposta inflamatória e a resposta imune humoral e celular do extrato total de *Malassezia pachydermatis*.

5.2 Objetivos Específicos

- 1 - Obter extrato total de *M. pachydermatis*;
- 2 - Caracterizar as proteínas do extrato total de *M. pachydermatis*;
- 3 – Induzir o processo inflamatório com o extrato total de *M. pachydermatis*;
- 4 - Avaliar a resposta imune humoral e celular do extrato total de *M. pachydermatis*.

6 CAPÍTULOS

6.1 Capítulo I: **Efeito inflamatório induzido por extrato total de *Malassezia pachydermatis***

6.2 Capítulo II: **Immune response to *Malassezia pachydermatis* extract in mice**

6.1 Capítulo I

Efeito Inflamatório Induzido por Extrato Total de *Malassezia pachydermatis* (Inflammatory Effect Induced by *Malassezia pachydermatis* Total Extract)

NÓBREGA, RAFAELA MACHADO¹; NUNES-PINHEIRO, DIANA CÉLIA SOUSA^{1,2*}; SANTOS, LÚCIA DE FÁTIMA LOPES²; PINHEIRO, ADRIANA DE QUEIROZ²; CAMPELLO, CLÁUDIO CABRAL²; AGOSTINHO, MICHELLE SOUSA².

1 Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará

2 Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará

* Autor para correspondência:

e-mail: csnpdiana@hotmail.com

Faculdade de Veterinária – Universidade Estadual do Ceará

Avenida Paranjana, 1700, Cep.: 60740-000

Serrinha - Fortaleza/CE

Resumo

O objetivo desse trabalho foi avaliar a resposta inflamatória induzida pelo extrato total de *M. pachydermatis*. Uma cepa de *M. pachydermatis* foi cultivada e a massa fúngica foi lavada em salina tamponada com fosfato (PBS), e macerada em nitrogênio líquido, diluída em Tris-HCl, 25 mM, pH 7,5, agitada durante 3 horas e centrifugada a 4000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi denominado extrato total de *M. pachydermatis* (ETMalp). A concentração de proteínas do ETMalp foi mensurada e realizada eletroforese. O processo inflamatório foi induzido por ETMalp e pela suspensão fúngica administrado via intraperitoneal em camundongos. O lavado peritoneal foi coletado com 1, 4, 24 e 48 h após a inoculação no qual foram dosadas as proteínas totais, contagem total e diferencial de células. O processo inflamatório também foi avaliado com ETMalp por via subcutânea em camundongos e a lesão submetida a exame histológico. A concentração de proteínas do ETMalp foi de 100 µg/mL e a eletroforese revelou sete bandas, sendo cinco distribuídas entre 14,3-66 kDa. Os tratamentos induziram aumento ($P<0,05$) na migração celular ao longo do tempo, alcançando pico em 24 h. A suspensão fúngica induziu ($P<0,05$) uma maior migração celular em 24 e 48 h. ETMalp e a suspensão fúngica provocaram extravasamento protéico e migração neutrofílica, enquanto que a suspensão fúngica também provocou migração de mastócitos. Os animais que receberam ETMalp por via subcutânea apresentaram reação inflamatória inespecífica ao exame histológico. Conclui-se que as proteínas contidas no ETMalp são pró-inflamatórias.

Palavras-chave: *Malassezia pachydermatis*, Inflamação, Extrato Total.

Abstract

The aim of this study was evaluated the inflammatory response induced by *M. pachydermatis* total extract. A strain of *M. pachydermatis* was cultivated and the fungal cells was washed with phosphate buffered saline (PBS), and macerated in liquid nitrogen, diluted in Tris-HCl, 25 mM, pH 7.5, agitated for two h and centrifuged at 4,000rpm/30min. The supernatant was used as *M. pachydermatis* Total Extract (MalpTE). The content of proteins of MalpTE was estimated and performed electrophoresis. The inflammatory response was induced by intraperitoneal route by Mal p TE and fungal suspension in mice. The peritoneal washing was harvested with 1, 4, 24 e 48 h after inoculation and was estimated the total

proteins and total and differential cell count. The inflammatory process also was evaluated with Mal p TE by subcutaneous route in mice and the lesion was examination by histological. The content of proteins of the Mal p TE was 100 µg/mL and electrophoresis revealed seven bands, where five distributed between 14.3-66 kDa. The treatments induced increase (P<0.05) in the cellular migration along the time, with peak at 24 h. The fungal suspension induced increase (P<0.05) the cellular migration at 24 and 48 h. Mal p TE and fungal suspension promoted outlet of proteins and neutrophils migration and the fugal suspension induced mast cell migration. The animals who received Mal p TE by subcutaneous route showed non-specific inflammatory reaction on histological. In conclusion, the proteins content of the Mal p TE were promoted inflammatory response.

Key words: *Malassezia pachydermatis*, Inflammation, Total Extract.

Introdução

O gênero *Malassezia* consiste de leveduras lipofílicas que são componentes da microflora cutânea de muitos animais de sangue quente, incluindo o homem (Ordeix et al., 2007). Apesar das espécies de *Malassezia* fazerem parte da microflora cutânea, são associadas com várias doenças de pele, incluindo pitíriase versicolor, foliculite, dermatite seborréica e dermatite atópica (Kato et al., 2006). O gênero *Malassezia* passou por diversas revisões taxonômicas. Até 1996 o gênero *Malassezia* compreendia apenas três espécies: *M. furfur*, *M. pachydermatis* e *M. sympodialis*, segundo as características dos ácidos nucleicos (Vargas et al., 2004). Gueho et al. (1996) baseados em critérios morfológicos, fisiológicos e moleculares, revisaram a taxonomia do gênero que passou a compreender mais quatro espécies nomeadas *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta* e *M. slooffiae*. A partir de estudos moleculares, quatro novas espécies foram incluídas como *M. dermatis*, *M. japonica*, *M. yamatoensis* e *M. nana* (Sugita et al., 2002, 2003, 2004; Hirai et al., 2002). Mais recentemente, duas novas espécies lipodependentes foram identificadas: *M. equina* e *M. caprae* (Cabañes et al., 2007). A *M. pachydermatis*, levedura não lipodependente, é considerada como zoofílica, uma vez que é frequentemente isolada em animais domésticos e selvagens, particularmente cães e gatos.

Malassezia é um organismo comensal cutâneo, e, dessa forma, o primeiro ponto de contato com o indivíduo é via sistema imune da pele a qual desempenha papel em ambas as

respostas imunes específica e não específica. Sendo assim, a barreira da pele, a flora comensal e as células fagocíticas são importantes na resposta imune cutânea não-específica. Nas doenças de pele, inflamações significantes acontecem e os neutrófilos migram para o interior das lesões e juntamente com os macrófagos atacam os agentes invasores através dos mecanismos oxidativo ou não oxidativo, conduzindo a remoção de patógenos (Ashbee & Evans, 2002).

A levedura *M. pachydermatis* tem ainda a habilidade para estimular o sistema imune via sistema complemento por ambos os caminhos clássico e alternativo e induzindo as respostas imunes celular e humoral em indivíduos saudáveis e com condições associadas com *Malassezia* spp. A ativação do complemento é responsável pela inflamação associada com essa levedura. Em contraste, esse organismo também é hábil em resistir à morte pela fagocitose por neutrófilos. Essa aparente contradição pode estar relacionada com a camada capsular rica em lipídeos encontrada ao redor das células leveduriformes (Blanco & Garcia, 2008).

Na tentativa de conhecer os mecanismos associados ao processo inflamatório induzido por *Malassezia*, objetivou-se avaliar a resposta inflamatória induzida pelo extrato total de *M. pachydermatis* em camundongos.

Material e Métodos

Preparo do Extrato Total de *M. pachydermatis*

Uma cepa (CEMM 1-5-173) de *M. pachydermatis* doada pelo Centro Especializado em Micologia Médica da Universidade Federal do Ceará foi cultivada em ágar dextrose batata e incubada à 37°C por cinco dias. A cepa utilizada apresenta as seguintes características microbiológicas: positividade para os testes de urease, beta-glicosidase, catalase, apresenta assimilação positiva ao Chemophor EL, Tweens 20, 40, 60 e 80, cresce em ágar Sabouraud sem suplementação lipídica e a 40°C.

As culturas fúngicas foram coletadas e lavadas duas vezes com tampão fosfato salina (PBS), pH 7,2, e centrifugada a 4000 rpm por 30 minutos. Posteriormente, foi adicionado nitrogênio líquido na massa fúngica para a maceração manual por 30 minutos. Após a maceração, foi colocado tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,5, na proporção de 1:3 (p/v). A suspensão foi deixada sob agitação por três horas, sendo, em seguida centrifugada a 4000 rpm por 30 minutos e o sobrenadante obtido foi denominado extrato total de *M. pachydermatis* (ETMalp).

Dosagem de proteínas

A dosagem de proteína foi realizada pelo método de Bradford (1976). A 100 µL de amostra foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford. A mistura foi agitada e após 10 minutos foram feitas as leituras das absorvâncias a 595 nm. A concentração de proteínas foi estimada usando-se o fator de calibração obtido através de uma curva padrão constituída com concentrações conhecidas de albumina sérica bovina.

Determinação da massa molecular por PAGE-SDS

A massa molecular das proteínas foi estimada por eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de duodecil-sulfato de sódio (SDS), seguindo a metodologia descrita por Laemmli (1970), adaptada para o uso em placas de vidro. Para a montagem das placas foram usados géis de 8,0 cm de largura, 6,0 cm de altura e 1 mm de espessura, sendo compostos de gel principal (12%) e gel de concentração (4%). A amostra de ETMalp contendo 2 µg de proteína foi homogeneizada em 20% de tampão da amostra, contendo 1% de SDS e 1% de β-mercaptoetanol, aquecida a 95°C durante cinco minutos. Em seguida, foram aplicadas alíquotas de 24 µL por poço. A eletroforese desenvolveu-se à temperatura de 25°C com corrente constante de 40 mA por aproximadamente 120 minutos, em um aparelho de eletroforese Mini Protean II Bio Rad, utilizando uma fonte regulável de corrente contínua Bio Rad (Power – pac 300). As bandas das proteínas foram visualizadas corando-se o gel com uma solução de Coomassie Brilliant Blue R-250 a 0,25% em metanol:ácido acético:água. A massa molecular aparente foi estimada a partir de marcadores molecular.

Animais

Camundongos Swiss albinos, machos, entre dois e quatro meses, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, foram mantidos na sala de experimentação do Laboratório de Imunologia e Bioquímica Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará. Os animais tiveram livre acesso a água e ração comercial peletizada e foram mantidos em condições adequadas de luminosidade, temperatura, umidade e higiene de acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

O protocolo experimental número 08185816-7 foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE).

Avaliação da Resposta Inflamatória

Migração Celular Intraperitoneal Induzido por ETMalp em camundongos

Camundongos (n=64) foram divididos em dois grupos de 32 animais cada: Grupo I – animais que receberam 0,5 mL de ETMalp por via intraperitoneal e Grupo II – animais que receberam 0,5 mL de uma suspensão de fungos em solução salina fisiológica (NaCl 0,9%) numa concentração equivalente ao grau 0,5 da escala McFarland por via intraperitoneal. Cada grupo foi dividido em quatro subgrupos de oito animais cada de acordo com o tempo de colheita do lavado peritoneal: 1, 4, 24 e 48 horas. Decorrido o tempo de experimento de cada subgrupo, os animais foram eutanaziados por deslocamento cervical e a pele da região abdominal ventral foi divulsionada. Para a recuperação do lavado peritoneal, foi administrado 2 mL de solução de salina fisiológica (NaCl 0,9%) apirogênica heparinizada (10 UI/mL), seguido de uma leve massagem do abdômen por cerca de 20 segundos para homogeneizar o lavado. Em seguida foi feita uma incisão do peritônio e colheu-se o lavado peritoneal com auxílio de uma pipeta Pasteur. A contagem total das células foi feita em hemocítmetro, utilizando-se uma alíquota de 10 µL do lavado em 0,2 mL de Turk. O restante do lavado foi centrifugado por três minutos a 620 x g para obtenção do sobrenadante utilizado para a dosagem de proteínas totais em um espectofotômetro (280 nm) baseado em uma curva padrão usando albumina sérica bovina como referência. O sedimento foi utilizado para avaliar o infiltrado inflamatório corado pelo Giemsa e observado por microscopia óptica, cujos resultados foram descritivos (Carregaro et al., 2005).

Resposta Inflamatória Induzida por ETMalp por via Subcutânea

Para avaliação da resposta inflamatória por via subcutânea, 20 camundongos foram divididos em dois grupos de 10 animais cada, onde o grupo tratado recebeu por via subcutânea na região dorsal 1 mL de ETMalp em 1 mg de hidróxido de alumínio e o grupo controle recebeu por via subcutânea na região dorsal 1 mL de tampão Tris-HCl em 1 mg de hidróxido de alumínio. As lesões foram medidas com um paquímetro digital seguida de uma biópsia de pele 30 dias após a administração dos tratamentos. Para a análise histopatológica, as amostras foram submetidas às técnicas histológicas de fixação em formalina (10%),

desidratação, diafanização, impregnação e inclusão em parafina, corte, coloração em Hematoxilina-Eosina (H&E) e confecção das lâminas as quais foram observadas em microscopia óptica por um médico patologista experiente.

Análise Estatística

Os dados foram inicialmente submetidos aos testes de Kolmogorov-Smirnov e Bartlett para confirmação da distribuição normal e homogeneidade de variâncias, respectivamente. Confirmados as exigências para realização da ANOVA, esta foi executada com auxílio do procedimento GLM do programa SAS (1999) e as médias foram comparadas pelo teste t-Student. Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão e o nível de significância utilizado foi de 5%.

Resultados

Caracterização das proteínas do ETMalp

A concentração de proteínas do ETMalp foi de 100 μ g/mL. A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE), revelou sete diferentes bandas de proteínas, sendo cinco distribuídas entre 14,3 e 66 kDa e duas acima de 66 kDa (Figura 1).

Resposta Inflamatória

A migração celular induzida pelo ETMalp e pela suspensão de células fúngicas é mostrada na Tab. 1. Os tratamentos induziram aumento ($P < 0,05$) na migração de células observada pela contagem total das células do lavado peritoneal ao longo do tempo, alcançando pico máximo em 24 h, mantendo-se em 48 h. Comparando-se os grupos, verificou-se que a suspensão fúngica induziu significativamente ($P < 0,05$) uma maior migração celular em 24 e 48 h com relação ao ETMalp. A migração celular induzida pelo ETMalp foi predominantemente neutrofílica, enquanto que a induzida pela suspensão fúngica foi predominantemente mastocítica (dados não mostrados).

A dosagem de proteínas totais do lavado peritoneal é mostrada na Tab. 2. Pode-se observar que o ETMalp provocou aumento significativo ($P < 0,05$) no extravasamento protéico em 4 h, enquanto que a suspensão de fungo não provocou aumento do teor de proteínas totais do lavado peritoneal.

Os animais que receberam ETMalp por via subcutânea apresentaram no local da aplicação uma lesão com diâmetro médio de 0,375 mm. A análise histopatológica (Figura 2a)

revelou lesão bem localizada e circunscrita, caracterizada por reação inflamatória inespecífica aguda predominantemente granulocitária, porém tendendo para cronicidade. Foi ainda observado início de fibrose caracterizada pela presença de fibroblastos com nucléolo evidente. Em determinadas áreas percebeu-se a presença de necrose, tecido de granulação, exsudação, edema e neovasos capilares. Em torno do nódulo evidenciou-se a formação de uma pseudocápsula caracterizada pela presença de fibroblastos e fibras colágenas. Nos animais do grupo controle não foi evidenciado a presença de nódulos e as peles mantiveram-se íntegras, mostrando que não houve maiores comprometimentos da pele dos mesmos (Figura 2b).

Discussão

A maioria das proteínas encontradas no ETMalp apresentou peso molecular entre 14,3 e 66 kDa, enquanto que duas proteínas apresentaram peso molecular acima de 66 kDa. Esses achados estão de acordo com os encontrados por Habibah et al. (2005), que estudando a antigenicidade dos extratos preparados de *M. pachydermatis* após diferentes tempos de incubação, detectaram bandas protéicas que correspondem aos pesos moleculares de 49, 62, 68 e 98 kDa. Chen et al. (2002) estudando os antígenos de *M. pachydermatis* em cães atópicos e normais, observaram proteínas com pesos moleculares de 42, 45, 61 e 82 kDa, confirmando também os dados encontrados nesse estudo.

Ashbee & Evans (2002) sugerem que os antígenos de diferentes pesos moleculares determinados por diferentes pesquisadores podem ser os mesmos, diferindo apenas na acurácia do peso molecular citado. Outros fatores que podem influenciar os resultados são a variabilidade da cepa utilizada para o preparo do extrato, diferentes métodos de extração do antígeno e período de incubação. A *Malassezia* por essa razão surge como sendo um organismo complexo antigenicamente que altera a expressão dos antígenos durante seu ciclo de crescimento. Os antígenos protéicos são provavelmente encontrados na parede da célula que podem ser facilmente detectados em immunoblotting e são presentes na face precoce de crescimento da levedura.

A inflamação é uma manifestação fisiológica que se manifesta através de sinais característicos: eritema, calor, edema, dor, infiltrado celular e acometimento da função tecidual. Diversas vias estão envolvidas na resposta inflamatória, muitas das quais são controladas por citocinas e outros mediadores solúveis produzidos e liberados pelas células envolvidas (ABBAS et al., 2008).

A migração celular e o extravasamento de proteínas induzidos por ETMalp e a suspensão fúngica caracterizam uma resposta inflamatória aguda deflagrada pelas proteínas obtidas da *M. pachydermatis* e pela própria célula fúngica. No entanto, as proteínas do ETMalp induziram extravasamento protéico e aumento da migração celular, com predominância de neutrófilos, enquanto a suspensão fúngica induziu extravasamento protéico e migração mastocítica. Isso sugere que as proteínas solúveis do ETMalp ativam as células residentes da cavidade peritoneal induzindo a liberação de mediadores que provocam o extravasamento protéico e a migração de neutrófilos, enquanto que o fungo na sua forma íntegra deflagra a ativação da cascata de complemento cujos mediadores liberados provocam ativação e degranulação dos mastócitos e conseqüente liberação de mediadores que desencadeiam o processo inflamatório e ativação de macrófagos residentes.

Os neutrófilos têm uma habilidade limitada em destruir a *Malassezia*. Uma possível razão para isso pode ser a produção de ácido azeláico pela *Malassezia*. Além disso, os lipídeos associados à parede celular da *Malassezia* podem ser antifagocíticos e protegem contra a destruição pelos neutrófilos (Blanco & Garcia, 2008). Suzuki et al. (2000) relataram que as células leveduriformes de *Malassezia* mortas pelo calor são mais eficientes em estimular a fagocitose do que as células leveduriformes vivas. Contudo, ambas as formas induzem a produção de IL-8 por linhagem monocítica. As células da levedura de *Malassezia* vivas e opsonizadas são mais estimulatórias do que as não opsonizadas e mortas (Ashbee e Evans, 2002).

Um efeito importante da interação do patógeno com macrófagos nos locais de infecção é a ativação dos macrófagos para liberar citocinas e outros mediadores que geram um estado de inflamação no tecido e atraem neutrófilos e proteínas do plasma ao local infectado, como observado nesse trabalho. Quando estimulados pelo contato com o microrganismo, os macrófagos tornam-se secretores de interleucinas e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). O TNF- α estimula o endotélio vascular a expressar moléculas de adesão, que interagem com os leucócitos circulantes, permitindo a diapedese e conseqüente migração do neutrófilo (Abbas et al., 2008).

O ETMalp quando associado ao hidróxido de alumínio (adjuvante) e injetado por via subcutânea, promoveu uma intensa reação inflamatória local granulocitária enquanto o tampão Tris-HCl associado com hidróxido de alumínio não provocou alterações histológicas. Esse fato pode estar associado ao recrutamento de células fagocíticas (neutrófilos e

macrófagos) para o local, exacerbada pela presença do hidróxido de alumínio que é um adjuvante que retém o antígeno no local, proporcionando um processo inflamatório.

Conclusão

Diante desses resultados, conclui-se que ETMalp possui sete bandas protéicas e possui atividade pró-inflamatória, induzindo a migração celular e extravasamento protéico por via intraperitoneal e provocando reação inflamatória inespecífica quando administrada por via subcutânea em associação com adjuvante.

Agradecimentos

Ao Centro Especializado em Micologia Médica da Universidade Federal do Ceará, na pessoa do Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha, que forneceu a cepa de *M. pachydermatis* utilizada nesse estudo. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Referências Bibliográficas

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6 ed. Editora Revinter: Rio de Janeiro, 2008. 544 p.

ASHBEE, H. R.; EVANS, E. G. Immunology of diseases associated with *Malassezia* species. **Clinical Microbiology**, v.15, n.1, p.21-57, 2002.

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

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

CARREGARO, A. B.; CASTRO, M. B.; MARTINS, F. S. Estudo da ação inflamatória aguda do tiopental intraperitoneal em ratos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.2, p.191-195, 2005.

CHEN, T. A.; HALLIWELL, R. E.; PEMBERTON, A. D.; HILL, P. B. Identification of major allergens of *Malassezia pachydermatis* in dogs with atopic dermatitis and *Malassezia* overgrowth. **Veterinary Dermatology**, v. 13, n. 3, p.141-150, 2002.

GUÉHO, E.; MIDGLEY, G.; GUILLOT, J. The genus *Malassezia* with description of four new species. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.69, n.4, p.337-355, 1996.

HABIBAH, A.; CATCHPOLE, B.; BOND, R. Canine serum immunoreactivity to *M. pachydermatis* in vitro is influenced by the phase of yeast growth. **Veterinary Dermatology**, v. 16, p.147-152, 2005.

HIRAI, A., KANO, R., MAKIMURA, K., YASUDA, K., KONISHI, K., YAMAGUCHI, H.; HASEGAWA, A. A unique isolate of *Malassezia* from a cat. **Journal Veterinary Medical Science**, v.64, p.957-959, 2002.

KATO, H.; SUGITA, T.; ISHIBASHI, Y.; NISHIKAWA, A. Detection and quantification of specific IgE antibodies against eight *Malassezia* species sera of patients with atopic dermatitis by ELISA. **Microbiology and Immunology**, v.50, n.11, p.851-856, 2006.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

ORDEIX, L.; GALEOTTI, F.; SCARAMPELLA, F.; DEDOLA, C.; BARDAGÍ, M.; ROMANO, E.; FONDATI, A. *Malassezia* spp. overgrowth in allergic cats. **Journal compilation**, v.18, p.316-323, 2007.

SUGITA, T., TAKASHIMA, M.; SHINODA, T.; SUTO, H.; UNNO, T.; TSUBOI, R.; OGAWA, H.; NISHIKAWA, A. New yeast species. *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. **Journal Clinical Microbiology**, v.40, p.363-1367, 2002.

SUGITA, T.; TAKASHIMA, M.; KODAMA, M.; TSUBOI, R.; NISHIKAWA, A. Description of a New Yeast Species, *Malassezia japonica*, and Its Detection in Patients with

Atopic Dermatitis and Healthy Subjects. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.10, p.4695–4699, 2003.

SUGITA, T.; TAJIMA, M.; TAKASHIMA, M.; AMAYA, M.; SAITO, M.; TSUBOI, R.; NISHIKAWA, A. A new yeast, *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. **Microbiology and Immunology**, v.48, n.8, p.579-583, 2004.

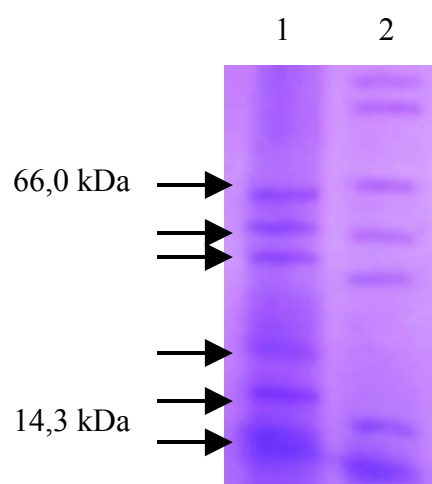


Figura 1. Componentes protéicos de ETMalp na eletroforese em SDS-PAGE.

Linha 1: Marcador molecular; Linha 2: ETMalp.

Tabela 1. Avaliação da migração celular induzida pelo ETMalp e suspensão de fungos em solução salina fisiológica (NaCl 0,9%), por via intraperitoneal, em diferentes tempos.

Grupos	Contagem Total de Células do Peritônio (células/ mL)			
	T 1	T 4	T 24	T 48
ETMalp	691,6±385,2 ^{Ca}	1250,0±471,7 ^{BCa}	1483,3±699,7 ^{ABb}	1991,6±554,4 ^{Ab}
Suspensão fúngica	1014,3±581,4 ^{Ca}	1875,0±431,0 ^{Ba}	2883,3±983,7 ^{Aa}	2808,3±495,4 ^{Aa}

Letras minúsculas representam diferença significativa ($P < 0,05$) entre tratamentos no mesmo tempo. Letras maiúsculas representam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tempos dentro do mesmo tratamento.

Tabela 2. Proteínas totais no lavado peritoneal dos animais que receberam ETMalp e suspensão de fungo por via intraperitoneal.

Tratamentos	Dosagem de Proteínas Totais			
	(mg/mL)			
	T 1	T 4	T 24	T 48
ETMalp	3,85±1,49 ^{Aa}	3,81±0,51 ^{Aa}	2,67±0,56 ^{Ba}	2,31±0,53 ^{Bab}
Suspensão	2,72±0,87 ^{Aa}	2,26±0,24 ^{ABb}	2,81±0,84 ^{Aa}	2,03±0,27 ^{Bb}

Fúngica

Letras maiúsculas representam diferença significativa ($P < 0,05$) entre tratamentos no mesmo tempo. Letras maiúsculas representam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tempos dentro do mesmo tratamento. █

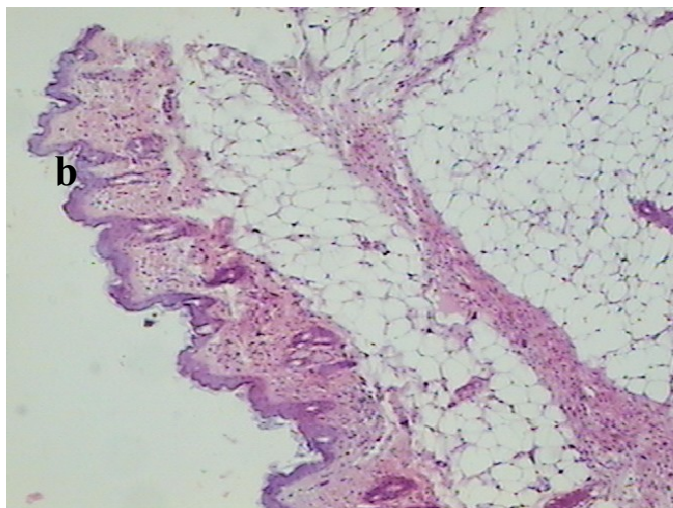
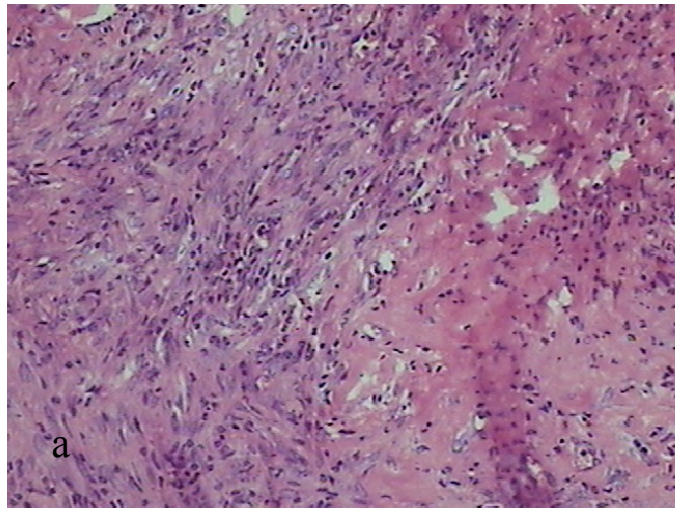


Figura 2. Reação inflamatória induzida por ETMalp (a) pele normal (b).

6.2 Capítulo II

Immune response to *Malassezia pachydermatis* extract in mice

**NÓBREGA, R.M.¹; NUNES-PINHEIRO, D.C.S.^{1*}; MOTA, E.F.²; MELO, D.F.²;
SILVA, A.C.M.³; CASTELO-BRANCO, D.**

1 Faculty of Veterinary Medicine, Post-Graduation Program in Veterinary Science, State University of Ceará. Av. Paranjana 1700, Campus do Itaperi, Cep 60740-000, Fortaleza, Ceará, Brazil.

2 Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará. Campus do Pici, Cep 60455-900, Fortaleza, Ceará, Brazil.

3 Catholic Faculty of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

*Correspondence: D. C. S. Nunes-Pinheiro
Faculty of Veterinary Medicine, Post-Graduation Program in Veterinary Science, State University of Ceará.
Av. Paranjana 1700, Campus do Itaperi
Cep 60740-000
Fortaleza, Ceará, Brazil
E-mail: csnpdiana@hotmail.com

Abstract

The aim of this work was to evaluate the immune response in mice against *M. pachydermatis* total extract. A strain of *M. pachydermatis* was cultivated and the fungal cells was washed, macerated with liquid nitrogen, diluted in Tris-HCl, agitated, centrifuged and the supernatant was used as *M. pachydermatis* Total Extract (MalpTE). The content of proteins of MalpTE was estimated and performed electrophoresis. The animals were immunized by intraperitoneal and subcutaneous route with MalpTE and challenged with MalpTE in footpad after the last blood collection. The specific antibodies production was analyzed by passive cutaneous anaphylaxis (PCA) and enzyme-linked immunosorbent (ELISA) assay. The protein content of MalpTE was 100 µg/mL and SDS-PAGE to MalpTE showed seven different protein bands, five distributed between 14.3-66 kDa and two up to 66 kDa. The levels of MalpTE-specific IgG antibodies induced by intraperitoneal and subcutaneous route sensitization increased significantly ($P < 0.05$) when compared with the pre-immune sera. MalpTE-specific IgE antibody was not revealed by PCA in rats. Both intraperitoneal and subcutaneous routes of immunization with MalpTE produced a significant increase ($P < 0.05$) in edema at 24 and 48 hours after challenge when compared with the control. All animals that was immunized with MalpTE associated with $Al(OH)_3$ by subcutaneous route was observed macroscopic lesions of skin in the local injection and histopathological analyze revealed a nonspecific inflammatory reaction. In conclusion, MalpTE induced specific immune response mediated by B and T cells.

Key-words: *Malassezia pachydermatis*, immune response, total extract.

Introduction

Malassezia pachydermatis, lipophilic yeast, is part of the normal cutaneous microflora of most warm-blooded vertebrates. The normally commensal yeast may become a pathogen whenever alternation of the skin surface microclimate or host defense occurs by opportunistic nature¹. *M. pachydermatis* is the most important species in the genus, although another species has been implicated in skin disorders. *M. pachydermatis* is the species most frequently isolated from the skin, mucosa or ear canal of healthy dogs and cats².

Immune response plays a vital role in protecting against infectious agents. The immune mechanisms of defense against fungal infections are numerous, and range from protective mechanisms through the innate and adaptive immunity³. The first-line innate mechanism is the presence of physical barriers in the form of skin and mucous membranes, which are complemented by cell membranes, cellular receptors and humoral factors². There has been a debate about the relative contribution of humoral and cellular immunity to host defense against fungal infections.

Chen *et al.*⁴ demonstrated that the majority of atopic dogs with *Malassezia* dermatitis have a greater IgE response than normal dogs. Immediate hypersensitivity responses to intradermal injections of *M. pachydermatis* extracts have been demonstrated in atopic dogs with *Malassezia* overgrowth⁵. Nuttall and Halliwell⁶ also show that atopic dogs have elevated levels of *Malassezia*-specific IgG and IgE in their serum. These data suggesting an IgE-mediated immune response may be clinically important in the pathogenesis of atopic dermatitis, induced by allergens from the organism. Bond and Lloyd⁷ detected IgG responses to *M. pachydermatis* in healthy and diseased dogs.

The aim of this work was to evaluate the immune response in mice against *M. pachydermatis* total extract.

Materials and methods

Culture of *M. pachydermatis*

A strain of *M. pachydermatis* (CEMM 1-5-173) from Medical Mycology Specialized Center at the Faculty of Medicine at Federal University of Ceará, Brazil was cultivated on potato-dextrose agar medium and incubated at 37°C for 5 days.

***M. pachydermatis* total extract (MalpTE) preparation**

The cultures were harvested and washed twice with sterile phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2. The liquid nitrogen was added in the fungal mass followed by manual maceration during 30 min which was resuspended with Tris-HCl 25 mM, pH 7.5 (ratio 1:3 w/v) under agitation during three hours. The suspension was centrifuged at 4,000 rpm for 30 minutes, and the supernatant was used as source of total extract (MalpTE). The protein concentration in MalpTE was determined by the method of Bradford⁸ using bovine serum albumin as reference.

Electrophoresis of proteins

The MalpTE (2 µg) was denatured by boiling in 1% (w/v) sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE) and β-mercaptoethanol at 100 °C for 4 min, and then separated by SDS-PAGE on 12% polyacrylamide in the main gel and 4% in the stacking gel performed according to Laemmli (1970). The protein bands were visualized by staining the gel with Coomassie Brilliant Blue R-250 (BDH, UK).

Sensitization procedure

Animals

Animals were obtained from the Central Animal House of the Federal University of Ceará, Brazil where they were produced. Twenty-one-day-old Swiss mice were maintained in laboratory cages with free access to water and commercial food until reached 25–30 g under light periods of 12 h and 27 °C±2 in appropriate sanitary conditions before using in experiments of sensitization. To develop PCA reactions, 6-month-old rats weighting 500–600 g and 6-month-old mice weighting 35–40 g.

The experimental protocol was approved by the Committee of Animal Ethics of the State University of Ceará, Brazil (CEUA-UECE).

Immunization with MalpTE

Swiss mice, 2-month-old male, weighing 25–30 g, were divided in Groups: Group I received subcutaneous injection of 100 µg of MalpTE containing 1 mg of aluminum hydroxide as adjuvant; and Group II received intraperitoneal injection of 100 µg of MalpTE. Booster injections were carried out on the 7st day after the primary doses. Mice were bled from the retro-orbital plexus just before first immunization (day 0) and at 7, 21 and 35 days for group I and 15, 21 and 28 days for group II after first injection. After collecting, sera were allowed to repose for 1 h at 37°C and thus slightly centrifuged at 6,000 rpm during 10 min and the clean material stored at –20°C until use.

The animals of the both groups were challenged after 35st day with 20 µL MalpTE solution (2 µg) in the right footpad. Control group was used and that received 20 µL of saline in the right footpad. The edema was measurement before and 24, 48 and 72 hours after the MalpTE challenge.

Passive cutaneous anaphylaxis (PCA) assay for IgG and IgE detection

The IgG and IgE antibodies were detected in pools of sera of immunized mice by PCA in 6-month-old Swiss mice using a 4 h latent period and Wistar rats using an 18 h latent period for skin sensitization, respectively. The PCA reactions were elicited by intravenous injections of the MalpTE containing 0.5% Evans blue *via* retro-orbital plexus in mice and *via* penis vein in rats (Mota and Wong, 1969). Control groups were formed by or non-immune sera (day 0).

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for IgG detection

Total extract-specific IgG antibodies were detected using ELISA. Plastic microtitre plates (Nunc, Copenhagen, Denmark) were coated with 10 µg/well of protein by overnight incubation at 4°C. The plates were blocked by incubation for a further 1h at 37°C with 100µL/well of PBS-Molico. Doubling dilutions of mouse serum samples (derived from individual animals; starting dilution 1:20) diluted in saline 0.9% were added to consecutive wells and incubated for 24h at 4°C. There follows a further incubation for 2 h at 37°C with peroxidase-labelled goat anti-mouse IgG (Sigma, Missouri, USA) diluted 1:1000 in PBS-Molico. Enzyme substrate (*o*-phenylenediamine and urea hydrogen peroxide) was added. The plates were washed after incubation with PBS containing 0.05% Tween 20. Substrate conversion was measured as optical density at 492 nm using an automated reader (Biotrak II Reader, Amersham Biosciences). Data were expressed as absorbances.

Statistical analysis

The results were expressed as means±SD. All data were analysed using Student's *t*-test, with statistical significance set at $P < 0.05$.

Results

Characterization of proteins from MalpTE

The protein content of MalpTE was 100 µg/mL. SDS-PAGE to MalpTE showed a total of seven different protein bands, five distributed between 14.3-66 kDa and two up to 66 kDa (Figure 1).

Immune response to MalpTE in mice

It was investigated the ability of MalpTE to induce the production of IgG and IgE antibodies. The antibodies levels produced in the primary and secondary immune response was evaluated by PCA and ELISA. The levels of MalpTE-specific IgG antibodies induced by intraperitoneal and subcutaneous route sensitization increased significantly ($P < 0.05$) when compared with the pre-immune sera, revealed by PCA (data not showed) and detected by ELISA (Table 1). The antibodies levels increased belong the time. MalpTE-specific IgE antibodies was not revealed by PCA in rats, independently of the immunization route (Figure 2).

The cell-mediated immune response was verified by edema, i.e. footpad reaction. Both intraperitoneal and subcutaneous routes of immunization with MalpTE produced a significant increase ($P < 0.05$) in edema at 24 and 48 hours after challenge when compared with the control (Table 2). In these animals did not observed reactions that neither characterized anaphylaxis nor death along the time.

Inflammatory reaction

All the animals that was immunized with MalpTE associated with $\text{Al}(\text{OH})_3$ by subcutaneous route was observed macroscopic lesions of skin in the local injection with diameter of 0.375 ± 0.164 mm. A total of 10 skin biopsy specimens were obtained from all animals which were submitted to histopatological analyze. It was revealed a nonspecific inflammatory reaction characterized for presence of the neutrophils, fibroblasts, necrosis, protein deposit, edema and neovascularization (Figure 3). For comproved the cause of the lesions, a group of 10 animals received for subcutaneous route Tris-HCl with $\text{Al}(\text{OH})_3$ and did not were observed reactions in the local injection after 14 days and at histological exam the skin was preserved (Figure 3).

Discussion

Most of the proteins found in MalpTE presented molecular weight ranging from 14.3 to 66 kDa, while two proteins had molecular weights above 66 kDa. These findings are in accordance with the ones found by Habibah *et al.*¹⁰ who, by studying the antigenicity of *M. pachydermatis* extracts, prepared after different incubation periods, detected proteins

bands that corresponded to the following molecular weights: 49, 62, 68 and 98 kDa. Chen *et al.*⁴ by studying the antigens of *M. pachydermatis* in atopic and in normal dogs, obtained proteins with molecular weights of 42, 45, 61 e 82 kDa, also confirming the data found in the present study. These data suggest that antigens presenting different molecular weights, determined by different researchers, may be the same, demonstrating divergences in the accuracy of the measurement technique employed. Other factors that may influence the results are the variability of the strain used in order to prepare the extract, different methods of antigen extraction and incubation period¹¹. For these reasons, *Malassezia* spp. is considered an antigenically complex genus that alters the antigen expression, during its life cycle. The proteins antigens, which can be easily detected by immunoblotting techniques, are probably found in the cell wall and they are present in the early stages of yeast development¹¹.

In this work, the antigenicity of MalpTE proteins was evaluated by intraperitoneal and subcutaneous immunization of mice to detection of specific antibodies. MalpTE-specific IgG antibodies were detected by ELISA and PCA. However, IgE specific antibody was not detected in rats by PCA. These two tests demonstrate that the different proteins bands of the MalpTE induce the production of specific antibodies detected not only *in vitro*, but also *in vivo*. Considering that IgE was not revealed by PCA in rats, it is suggested that MalpTE proteins activate the immune response through the activation of Th1 lymphocytes. This fact is supported by the absence of anaphylactic reaction in sensitization animals, after being challenged with MalpTE.

The activation of T cells CD4⁺ or CD8⁺ or both is the key to the improvement of fungal infection. The dendritic cells have the ability to distinguish the different forms of fungal species and direct the Th1 versus Th2 response³. For many fungi the generation of Th1 dominant response, which is characterized by the production of IL-2, IFN- γ , TNF- α and/or granulocyte- macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), is essential for the expression of the immune response. Alternatively, the Th2 response, characterized by the production of IL-4, IL-5 and IL-13, is associated with the disease exacerbation and the infection severity modulation. Additional evidences have suggested that the potent Th2 response is important in the development and/or maintenance of the Th1 mediated immunity¹². The Th2 response is associated to the production of IgE. Therefore, in the present study MalpTE activates the immune response towards Th1, which is demonstrated by the absence of IgE.

Nuttall *et al.*⁶ observed that atopic dogs have significantly higher titers of IgG and IgE than healthy and non-atopic dogs, with clinical evidences of dermatitis and/or otitis caused by *Malassezia* spp. Arzumanyan *et al.*¹³, by studying IgG and IgE antibodies against *Malassezia* spp. extract in patients with atopic dermatitis and healthy individuals, observed that all the patients and five healthy individuals produced IgG against the preparation. Bond *et al.*¹⁴ observed that the IgG and IgA specific antibody titers to *M. pachydermatis* in the sera of 12 basset hounds and 11 affected dogs of several breeds exceeded the titers from healthy basset hounds and beagles.

To evaluate the cell mediated immune response, all the animals immunized by intraperitoneally and subcutaneously route were challenged, in the subplantar region, with MalpTE for the observation of the delayed hypersensitivity response. The results demonstrated a significant increase of the edema within 24 to 48 hours, which suggested that the proteins from MalpTE activate T cell mediated immune response.

The delayed hypersensitivity response (DTH) is challenged in a sensitized animal by the second contact with the antigen. During this phase, the DTH is developed, where the dendrite cell, conjugated with the antigen, releases IL-1 and TNF, which recruit Th1 lymphocytes and memory T lymphocytes and cytokines secreted by activated cells, IL-2, IFN- γ and TNF that characterized the inflammatory process¹⁵. The cellular immunity is known for being the most important host's defense against fungal infections¹⁶. The higher incidence of *Malassezia* spp. dermatosis in patients with cellular immunodeficiency suggests that the cellular immunity is also important to maintain the organism in a commensal state¹¹. The response mediated by T cell is extremely effective in the defense mechanism against intracellular agents, like fungi. The T cells can exert their function through the CD8+ cell mediated cytotoxicity or through the secretion of cytokines that will activate macrophages to destroy the intracellular agents¹⁷.

The MalpTE when associated with aluminum hydroxide, used as an adjuvant, and injected subcutaneously, promoted an intense local granulocitary inflammatory reaction, while the buffer Tris-HCl associated with the aluminum hydroxide did not provoke histological alterations in the skin. The inflammatory reaction is characterized by the presence of the neutrophils, fibroblasts, protein deposit, necrosis, edema and neovascularization (Figure 3). This fact may be associated with the recruitment of phagocytic cells to the site, exacerbated by the presence of the aluminum hydroxide, which is an adjuvant that retains the antigen within the site of injection, providing an

inflammatory process. These findings demonstrated that the inflammatory reactions in these animals can be related with MalpTE proteins.

Considering these facts, it is suggested that the MalpTE induced specific immune response mediated by B and T cells through the antibody synthesis and delayed hypersensitivity response.

Acknowledgements

We thank Dr. Geraldo de Sousa Tomé for his contribution on the histological report; the Medical Mycology Specialized Center at the Faculty of Medicine at Federal University of Ceará, Brazil for providing the fungi; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the financial support.

References

1. Ashbee HR. Recent developments in the immunology and biology of *Malassezia* species. Federation of European Microbiological Societies 2006; 47: 14-23.
2. Blanco JL, Garcia, ME. Immune response to fungal infections. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2008; 125: 47-70.
3. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4: 1-23.
4. Chen T, Halliwell REW, Pemberton AD, Hill PB. Identification of major allergens of *Malassezia pachydermatis* in dogs with atopic dermatitis and *Malassezia* overgrowth. *Veterinary Dermatology* 2002; 13: 141-50.
5. Morris DO, Olivier NB, Rosser EJ. Type-1 hypersensitivity reactions to *Malassezia pachydermatis* extracts in atopic dogs. *American Journal of Veterinary Research* 1998; 59: 836-41.
6. Nuttall TJ, Halliwell REW. Serum antibodies to *Malassezia* yeasts in canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology* 2001; 12: 327-32.
7. Bond R, Lloyd DH. Immunoglobulin G responses to *Malassezia pachydermatis* in healthy dogs and dogs with *Malassezia* dermatitis. *Veterinary Record* 2002; 150: 509-12.
8. Bradford M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 1976; 72: 248-54.

9. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680–5.
10. Habibah A, Catchpole B, Bond R. Canine serum immunoreactivity to *M. pachydermatis* in vitro is influenced by the phase of yeast growth. *Veterinary Dermatology* 2005; 16: 147-152.
11. Ashbee HR, Evans EGV. Immunology of diseases associated with *Malassezia* species. *Clinical Microbiology* 2002; 15: 21-57.
12. Huffnagle GB, Deepe GS. Innate and adaptative determinants of host susceptibility to medically important fungi. *Current Opinion in Microbiology* 2003; 6: 344-50.
13. Arzumanyan VG, Serdyuk OA, Kozlova NN, Basnak'yan IA, Fedoseeva VN. IgE and IgG antibodies to *Malassezia* spp. yeast extract in patients with atopic dermatitis. *Bull Exp Biol Med* 2003; 135:460-3.
14. Bond R, Elwood CM, Littler RM et al. Humoral and cell-mediated immune responses to *Malassezia pachydermatis* in healthy dogs and dogs with *Malassezia* dermatitis. *Veterinary Record* 1998; 143: 381-4.
15. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Imunologia Celular e Molecular*. 6 ed. Editora Revinter: Rio de Janeiro, 2008. 544 p.
16. Casadevall A, Cassone A, Bistoni F, Cutler JE, Magliani W, Murphy JW, Polonelli L, Romani L. Antibody and/or cell mediated immunity, protective mechanisms in fungal disease-an ongoing dilemma or an unnecessary dispute? *Medical Micology* 1998; 36: 95-105.
17. Machado PRL, Araújo MIA, Carvalho L, Carvalho EM. Mecanismos de resposta imune às infecções. *Anais Brasileiro de Dermatologia* 2004; 79: 647-662.

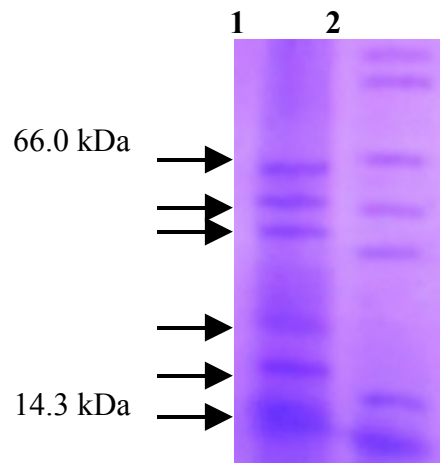


Figure 1. Protein components of MalpTE by sodium dodecylsulphate-polyacrilamide gel electrophoresis. Lane 1: molecular weight markers; lane 2: MalpTE.

Table 1. Titers IgG MalpTE-specific antibodies in animals immunized for intraperitoneal and subcutaneous route and animals pre-immunes.

Treatment	Antibodies Titers (OD)		
	(mean±SEM)		
	1	2	3
Pre-immune sera		0.0095 ± 0.0089	
MalpTE IP	0.3099 ± 0.0970* ^{aB}	0.4012 ± 0.1077* ^{aB}	0.5327 ± 0.0877* ^{aA}
MalpTE SC	0.2580 ± 0.0952* ^{aB}	0.3416 ± 0.0960* ^{aA}	0.3326 ± 0.0803* ^{bAB}

MalpTE: *Malassezia pachydermatis* Total Extract IP: intraperitoneal route; SC: subcutaneous route. * represents significant differences (P<0.05) among the treated groups and the control group. Small letters represent significant differences (P<0.05) between treatments at the same time. Capital letters represent significant differences (P<0.05) among time within the same treatment.



Figure 2. Negative reaction for anti-MalpTE specific IgE by PCA in rats.

Table 2. Evaluation of edema induced by MalpTE challenge in the animals immunized by MalpTE.

Treatment	Edema (mm)			
	(mean±SEM)			
	0 h	24 h	48 h	72 h
Control	-0.0100±0.0224 ^{Ca}	0.0800±0.0274 ^{Ab}	0.0300±0.274 ^{Bb}	0.0100±0.0224 ^{BCb}
MalpTE IP	0.0044±0.0581 ^{Ca}	0.2256±0.0770 ^{Aa}	0.1844±0.0705 ^{Aa}	0.1022±0.0367 ^{Ba}
MalpTE SC	-0.0150±0.0626 ^{Ca}	0.2200±0.0753 ^{Aa}	0.1700±0.0537 ^{Aa}	0.1050±0.0369 ^{Ba}

MalpTE: *Malassezia pachydermatis* Total Extract IP: intraperitoneal route; SC: subcutaneous route.

Small letters represent significant differences (P<0.05) between treatments at the same time.

Capital letters represent significant differences (P<0.05) among time within the same treatment.

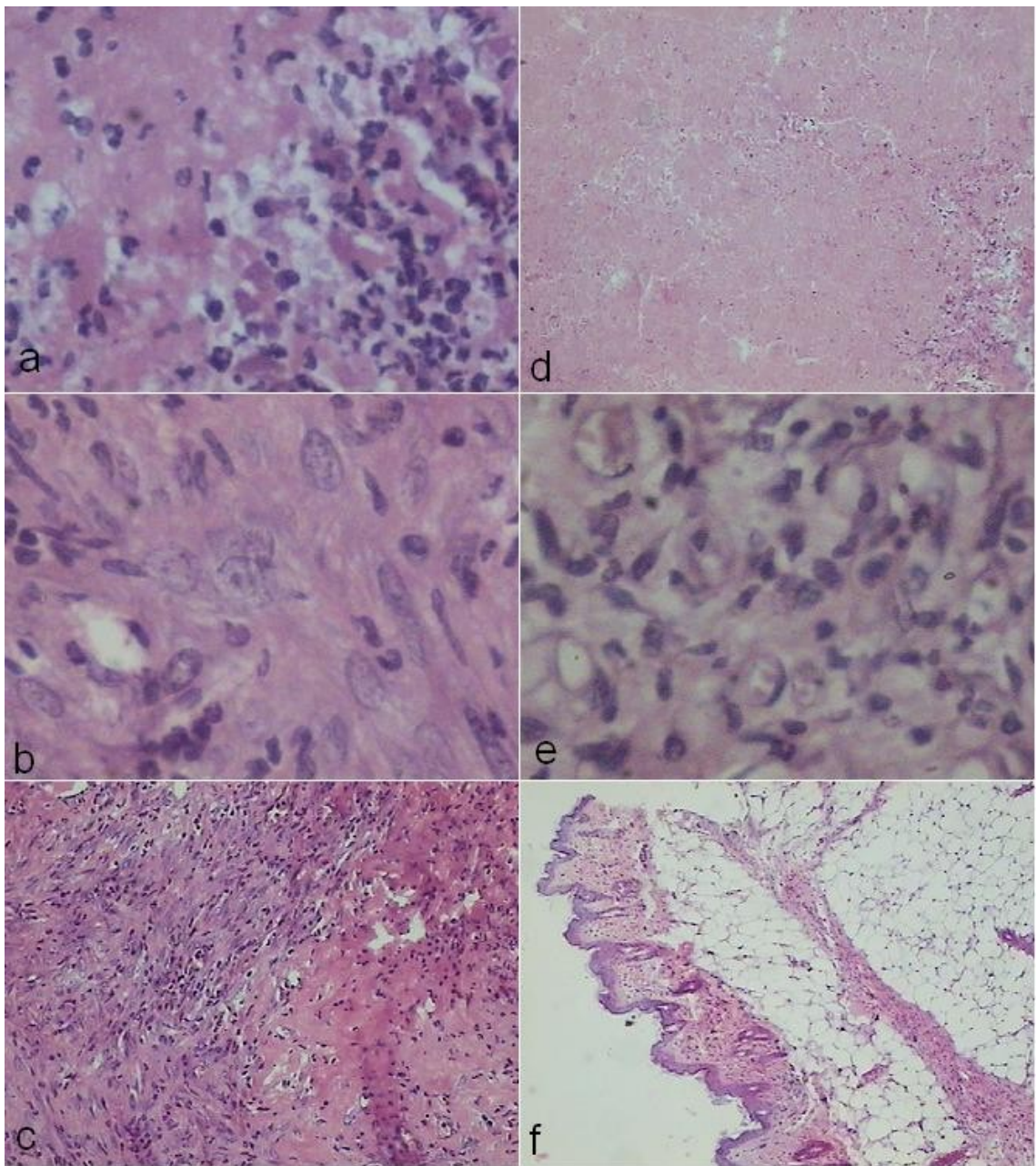


Figure 3. Histological evaluation. Neutrophils (a), fibroblasts (b), proteinaceous material and fibrosis (c), necrosis (d), neovascularization (e), normal skin (f).

7 CONCLUSÕES GERAIS

1 - O extrato total de *M. pachydermatis* tem concentração de proteínas totais de 100 µg/mL e possui sete bandas de proteínas distintas, cinco com peso molecular entre 14,3 e 66 kDa e duas com peso molecular acima de 66 kDa.

2 - As proteínas contidas no extrato total de *M. pachydermatis* são pró-inflamatórias, induzindo a migração celular e extravasamento protéico por via intraperitoneal e provocando reação inflamatória inespecífica quando administrada por via subcutânea em associação com adjuvante.

3 - As proteínas contidas no extrato total de *M. pachydermatis* induzem resposta imune específica mediada por células B e T através da síntese de anticorpos e resposta de hipersensibilidade tardia, respectivamente.

8 PERSPECTIVAS

Esse trabalho fornece subsídios para futuros estudos mais aprofundados com a finalidade de isolar cada antígeno protéico da *M. pachydermatis*, com o intuito de atribuir a atividade imunológica específica relacionada com cada proteína e, conseqüentemente, utilização em testes diagnósticos imunológicos mais específicos e sensíveis para esclarecer as patologias associadas com esse fungo.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6 ed. Editora Elsevier: Rio de Janeiro, 2008. 544 p.

AIZAWA, T.; KANO, R.; NAKAMURA, Y.; WATANABE, S.; HASEGAWA, A. Molecular heterogeneity in clinical isolates of *Malassezia pachydermatis* from dog. **Veterinary Microbiology**, v.70, p.67-75, 1999.

AKAMATSU, H.; KAMURA, J.; ASADA, Y.; MIYACHI, Y.; NIWA, Y. inhibitory effect of azelaic acid on neutrophil fractions: a possible cause for its efficacy in treating pathogenetically unrelated diseases. **Archive Dermatology**, v.283, p.162-166, 1991.

AKDIS, C.A.; AKDIS, M.; BIEBER, T.; BINDSLEV-JENSEN, C.; BOGUNIEWICZ, M.; EIGENMANN, P.; HAMID, Q.; KAPP, A.; LEUNG, D.Y.M.; LIPOZENCIC, J.; LUGER, T.A.; MURARO, A.; NOVAK, N.; PLATTS-MILLS, E.; ROSENWASSER, L.; SCHEYNIUS, A.; SIMONS, E.R.; SPERGEL, J.; TURJAMAN, K.; WAHN, U.; WEIDINGER, S.; WERFEL, T.; ZUBERBIER, T. Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children and adults. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.118, n.1, p.152-169, 2006.

ARZUMANYAN, V.G.; SERDYUK, O.A.; KOZLOVA, N.N.; BASNAK'YAN, I.A.; FEDOSEEVA, V.N. IgE and IgG antibodies to *Malassezia* spp. yeast extract in patients with atopic dermatitis. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v.135, p.460-3, 2003.

ASHBEE, H.R.; EVANS, E.G. Immunology of diseases associated with *Malassezia* species. **Clinical microbiology**, v.15, n.1, p. 21-57. 2002.

ASHBEE, H.R. Recent developments in the immunology and biology of *Malassezia* species. **Federation of European Microbiological Societies**. v.47, p.14-23, 2006.

ASHBEE, H.R. Update on the genus *Malassezia*. **Medical Micology**, v.45, p.287-303, 2007.

ASPÍROZ, M.C.; MORENO, L.A.; RUBIO, M.C. Taxonomy of *Malassezia furfur*: state of art. **Review Iberoamerican Micology**, v. 14, n. 4, p. 147-149, 1997.

BARFATANI, M.; MUNN, R.J.; SCHJEIDE, D.A. An ultrastructural study of *Pityrosporum orbiculare*. **Journal of Investigative Dermatology**. v.43, p.231-233, 1964.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed editora, 2002.

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

BOND, R. Population sizes and frequency of *Malassezia pachydermatis* at skin and mucosal sites on healthy dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v.36, p.147-150, 1995.

- BOND, R. Factors associated with elevated cutaneous *Malassezia pachydermatis* population in dogs with pruritic skin disease. **Journal of Small Animal Practice**, v.37, n.3, p.103-107, 1996.
- BOND, R.; LLOYD, D.H. Skin and mucosal populations of *Malassezia pachydermatis* in healthy and seborrhoeic Basset Hounds. **Veterinary Dermatology**, v.8, n.2, p.101-106, 1997.
- BOND, R.; LLOYD, D.H. Immunoglobulin G responses to *Malassezia pachydermatis* in healthy dogs and dogs with Malassezia dermatitis. **Veterinary Record**, v.150, p.509-12, 2002.
- BOND, R.; HOWELL, S.A.; HAYWOOD, P.J.; LLOYD, D.H. Isolation of Malassezia sympodialis and *Malassezia globosa* from healthy pets cats. **Veterinary Record**, v.141, n.8, p.200-201, 1997.
- BOND, R.; ELWOOD, C.M.; LITTLER, R.M.; L, PINTER; D., LLOYD. Humoral and cell-mediated immune responses to *Malassezia pachydermatis* in healthy dogs and dogs with *Malassezia* dermatitis. **Veterinary Record**, v.143, p.381-4, 1998.
- BRADFORD, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.
- BREATHNACH, A.S.; GROSS, B.; MARTIN, M. Freeze fracture replication of cultured *Pityrosporum orbiculare*. **Sabouraudia**, v.14, p.105–113, 1976.
- BRUNEAU, S. M., e GUINET, R. M. F. Quantitative immunoelectrophoretic study of genus *Pityrosporum* sabouraud. **Mykosen**, v.27, p.123–136, 1984.
- BUENTKE, E.; ZARGARI, A.; HEFFLER, C.; AVILA-CARINO, J.; SAVOLAINEN, J.; SCHEYNIUS, A. Uptake of the yeast *Malassezia furfur* and its allergenic components by human immature CD1a_ dendritic cells. **Clinical and Experimental Allergy**, v.30, p.1759–1770, 2000.
- CABAÑES, F.J.; THEELEN, B.; CASTELLÁ, G.; BOEKHOUT, T. Two new lipid-dependent *Malassezia* species from domestic animals. **FEMS Yeast Research**, v.7, p.1064-1076, 2007.
- CAFARCHIA, C; GALLO, S; CAPELLI, G; OTRANTO, D. Occurrence and population size of *Malassezia* spp. in the external ear canal of dogs and cats both healthy and with otitis. **Mycopathologia**, v. 160, n. 2, p. 143-149, 2005.
- CANNON, P. F. International Commission on the taxonomy of fungi (ICTF): name changes in fungi of microbiological, industrial and medical importance. **Microbiology Science**, v.3, p.285–287, 1986.

CAPRILLI, F.; MERCANTINI, R.; NAZZARO-PORRO, M.; PASSI, S.; TONOLO, A. Studies of the genus *Pityrosporum* in submerged culture. **Mycopathologia et Mycologia Applicata**. v.51, p.171–189, 1973.

CARREGARO, A.B.; CASTRO, M.B.; MARTINS, F.S. Estudo da ação inflamatória aguda do tiopental intraperitoneal em ratos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.2, p.191-95, 2005.

CASADEVALL, A.; CASSONE, A.; BISTONI, F.; CUTLER, J.E.; MAGLIANI, W.; MURPHY, J.W.; POLONELLI, L.; ROMANI, L. Antibody and/or cell mediated immunity, protective mechanisms in fungal disease-an ongoing dilemma or an unnecessary dispute? **Medical Micology**, v.36, p.95-105, 1998.

CASTELLANI, A. Notes on three new yeast-like organisms and a new bacillus, with remarks on the clinical conditions from which they have been isolated: furunculosis blastomycetia, macroglossia blastomycetia, stomatitis cryptobacillus. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.28, p.217–223, 1925.

CATTERALL, M.D.; WARD, M.E.; JACOBS, P. A reappraisal of the role of *Pityrosporum orbiculare* in pityriasis versicolor and the significance of extracellular lipase. **Journal of Investigative Dermatology**. v.71, p.398–401, 1978.

CHEN, T. A.; HALLIWELL, R. E.; PEMBERTON, A. D.; HILL, P. B. Identification of major allergens of *Malassezia pachydermatis* in dogs with atopic dermatitis and *Malassezia* overgrowth. **Veterinary Dermatology**, v. 13, n. 3, p.141-150, 2002.

CUNNINGHAM, A.C., LEEMING, J.P., INGHAM, E., e GOWLAND, G. Differentiation of three serovars of *Malassezia furfur*. **The Journal of Applied Bacteriology**, v.68, p.439–446, 1990.

DE LUCA, C.; PICARDO, M.; BREATHNACH, A.; PASSI, S. Lipoperoxidase activity of *Pityrosporum*: characterization of by-products and possible role in pityriasis versicolor. **Experimental Dermatology**. v.5, p.49–56, 1996.

DOLD, H. On the so called Bottle Bacillus (*Dermatophyton Malassez*). **Parasitology**, v.3. p.279–287, 1910.

EICHSTEDT, E. Pilzbildung in der *Pityriasis versicolor*. **Frörig Neue Notizen aus dem Gebeite der Naturkunde Heilkinde**, v.39, p.270, 1846.

FAERGEMANN, J., e FREDRIKSSON, T. Age incidence of *Pityrosporum orbiculare* on human skin. **Acta Dermato-Venereol**. v.60, p.531–533, 1980.

FAERGEMANN, J. *Pityrosporum ovale* and skin diseases. **Keio Journal Medicine**. v.42, p.91-94, 1993.

FARIAS, M.R. Dermatite atópica canina: da fisiopatologia ao tratamento. **Clínica Veterinária**, n.69, p.48-62, 2007.

FERREIRA, A.; WATTER; AVILA, S.L.M. **Diagnóstico Laboratorial**. Editora Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1996.

FITTON, A.; GOA, K.L. Azelaic acid. A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in acne and hyperpigmentary skin disorders. **Drugs**, v.41, p.780–798, 1991.

GABAL, M.A. Preliminary studies on the mechanism of infection and characterization of *Malassezia pachydermatis* in association with canine otitis externa. **Mycopathologia**, v.104, n.2, p.93-98. 1988.

GAN, Z.; MARQUARDT, R.R.; ABRAMSON, D.; CLEAR, R.M. The characterization of chicken antibodies raised against *Fusarium* spp. by enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting. **International Journal of Food Microbiology**, v.38, n.2-3, p.191-200, 1997.

GARLANDA, C.; HIRSCH, E.; BOZZA, S.; SALUSTRI, A.; DE ACETIS, M.; NOTA, R. MACCAGNO, A.; RIVA, F.; BOTTAZI, B.; PERI, G. Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. **Nature**, v.420, p.182-186, 2002.

GIRAO, M.D.; PRADO, M.R.; BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO, R.A.; MONTEIRO, A.J.; SIDRIM, J.J.C. Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.37, n.3, p.229-233, 2004.

GUÉHO, E.; MIDGLEY, G.; GUILLOT, J. The genus *Malassezia* with description of four new species. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.69, n.4, p.337-355, 1996.

GUÉHO, E.; BOEKHOUT, T.; ASHBEE, H. R.; GUILLOT, J.; VAN BELKUN, A.; FAERGEMANN, J. The role *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogens. **Medical Mycology**, v. 36, p. 220-229, 1998.

GUILLOT, J. **Taxonomie et phylogénie des levures du genre *Malassezia***. Créteil, 1995, 224f. Thèse (Doctorat de l'Université)- Faculté de Médecine de Créteil. Université Paris XII, Créteil, 1995.

GUILLOT, J. Identification of *Malassezia* species: a practical approach. **Journal Mycologie Médicale**, v 6, n. 2, p. 103-110, 1996.

GUILLOT, J.; GUEHO, E. **Taxonomie et phylogénie des levures du genre *Malassezia***. These (Doctorat de L'Université)-Faculté de Medicine de Crê teil, p. 222, 1996.

HABIBAH, A.; CATCHPOLE, B.; BOND, R. Canine serum immunoreactivity to *M. pachydermatis* in vitro is influenced by the phase of yeast growth. **Veterinary Dermatology**, v.16, p.147-52, 2005.

HAJSIG, D.; HAJSIG, M.; SVOBODRA-VUKOVIC, D. *Malassezia pachydermatis* in healthy cats. **Veterinarski Arhiv**, v.60, p.69-73, 1990.

HILLIER, A. Definitively diagnosing atopic dermatitis in dogs. **Veterinary Medicine**, v.97, n.3, p.198-208, 2002.

HIRAI, A., KANO, R., MAKIMURA, K., YASUDA, K., KONISHI, K., YAMAGUCHI, H.; HASEGAWA, A. A unique isolate of *Malassezia* from a cat. **Journal Veterinary Medical Science**, v.64, p.957-959, 2002.

HOMEY, B.; STEINHOFF, M.; RUZICKA, T.; LEUNG, D.Y.M. Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.118, n.1, p.178-189, 2006.

HUFFNAGLE, G.B, DEEPE, G.S. Innate and adaptative determinants of host susceptibility to medically important fungi. **Current Opinion in Microbiology**. v. 6, p. 344-350, 2003.

JANEWAY, C.A. Jr. How the immune system protects the host from infection. **Microbes and Infection**, v.3, p.1167-1171, 2001.

JENSEN-JAROLIM, E.; POULSEN, L.K.; WITH, H.; KIEFFER, M.; OTTEVANGER, V.; SKOV, P.S. Atopic dermatitis of the face, scalp and neck: type I reaction to the yeast *Pityrosporum ovale*? **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v.89, p.44-51, 1992.

JOHANSSON, S.; KARLSTROM, K. IgE binding components in *Pityrosporum orbiculare* identified by an immunoblotting technique. **Acta Dermato-Venereol**. v.71, p.11-16, 1991.

KATO, H.; SUGITA, T.; ISHIBASHI, Y.; NISHIKAWA, A. Detection and quantification of specific IgE antibodies against eight *Malassezia* species sera of patients with atopic dermatitis by ELISA. **Microbiology and Immunology**, v.50, n.11, p.851-856, 2006.

KAWANO, S.; e NAKAGAWA, H. The correlation between the levels of anti-*Malassezia furfur* IgE antibodies and severities of face and neck dermatitis of patients with atopic dermatitis. **Journal Allergology**, v.44, p.128-133, 1995.

KEDDIE, F.M.; BARAJAS, L. Quantitative ultrastructural variations between *P. ovale* and *P. orbiculare* based on serial section electron microscopy. **International Journal Dermatology**. v.11, p.40-48, 1972.

KERÉNYI, Z.; ZELLER, K.; HORNOK, L.; LESLIE, J. F. Molecular standardization of ating type terminology in the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.9, p.4071-4076, 1999.

KESAVAN, S.; WALTERS, C.E.; HOLLAND, K.T.; INGHAM, E. The effects of *Malassezia* on pro-inflammatory cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells *in vitro*. **Medical Mycology**. v.36, p.97-106, 1998.

KOYAMA, T.; KANBE, T.; ISHIGURO, A.; KIKUCHI, A.; TOMITA, Y. Isolation and characterisation of a major antigenic component of *Malassezia globosa* to IgE antibodies in sera of patients with atopic dermatitis. **Microbiology and Immunol**. v.44, p.373-379, 2000.

KOYAMA, T.; KANBE, T.; ISHIGURO, A.; KIKUCHI, A.; TOMITA, Y. Antigenic components of *Malassezia* species for immunoglobulin E antibodies in sera of patients with atopic dermatitis. **Journal of Dermatological Science**, v.26, n.3, p.201-208, 2001.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. Infections caused by *Malassezia* species. In: **Medical Mycology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. p. 170-182.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. **Guia de identificação – Fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. São Paulo: Sarvier, 1998. p. 86-130.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LEEMING, J. P., e NOTMAN, F. H. Improved methods for isolation and enumeration of *Malassezia furfur* from human skin. **Journal of Clinical Microbiology**. v.25, p.2017–2019, 1987.

LEITE, C.A.L.; ABREU, V.L.V.; COSTA, G.M. Frequência de *Malassezia pachydermatis* em otite externa de cães, **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.1, p.102-104, 2003.

LI, S.; MARQUARDT, R.R.; ABRAMSON, D. Immunochemical detection of molds: a review. **Journal of Food Protection**, v.63, n.2, p.281-291, 2000.

LINDBORG, M.; MAGNUSSON C. G. M.; ZARGARI, A.; SCHMIDT, M.; SCHEYNIUS, A.; CRAMERI, R.; e WHITLEY, P. Selective cloning of allergens from the skin colonizing yeast *Malassezia furfur* by phage surface display. **Journal of Investigative Dermatology**. v.113, p.56–161, 1999.

LINTU, P.; SAVOLAINEN, J.; KALIMO, K. IgE antibodies to protein and mannan antigens of *Pityrosporum ovale* in atopic dermatitis. **Clinical of Experimental Allergy**. v.27, p.87–95, 1997.

LJUBOJEVIC, S.; SKERLEV, M.; LIPOZENCIC, J.; BASTA-JUZBASIC, A. The role of *Malassezia furfur* in dermatology, **Clinics in Dermatology**, v.20, p.179-182. 2002.

MACHADO. M.L.S.; APPELT, C.E.; FERREIRO, L.; GUILLOT, J. Otites e dermatites por *Malassezia spp.* em cães e gatos, **Clínica Veterinária**, v.44, p.27-34, 2003.

MACHADO, P.R.L.; ARAÚJO, M.I.A.S.; CARVALHO, L.; CARVALHO, E.M. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v.79, n.6, p.647-662, 2004.

MANSFIELD, P.D.; BOOSINGER, T.R.; ATTLEBERGER, M.H. Infectivity of *Malassezia pachydermatis* in the external ear canal of dogs, **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.26, p.97-100, 1990.

MARINHO, V.L.A. Técnicas imunológicas e moleculares no diagnóstico de vírus de plantas. In: FERNANDES, J. M.; PRESTES, A. M.; PICININI, E. C. (Ed.) **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, RS: RAPP, 2001. v.9, p.383-402.

MASUDA, A.; SUKEGAWA, T.; MIZUMOTO, N.; TANI, H.; MIYAMOTO, T.; SASAI, K.; BABA, E. Study of lipid in the ear canal in canine otitis externa with *Malassezia pachydermatis*. **Journal Veterinary Medical Science**, v.62, n.11, p.1177-1182. 2000.

McGUIRK, P.; MILLS, K.H. Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. **Trends Immunology**, v.23, p.450-455, 2002.

MEIRELLES, P.G.; BIAZON, L.; ONO, M.A.; HIROOKA, E.Y.; ONO, E. Immunoassays: an alternative for toxigenic fungi detection in foods. **Ciências Agrárias**, v.27, n.4, p.617-628, 2006.

MIDGLEY, G. The diversity of *Pityrosporum (Malassezia)* yeasts *in vivo* and *in vitro*. **Mycopathologia**, v.106, p.143-155, 1989.

MIDGLEY, G. 1993. Morphological variation in *Malassezia* and its significance in pityriasis versicolor, p 267-277. In H. Vanden Bossche (ed.), *Dimorphic fungi in biology and medicine*, Plenum Press, New York, N.Y.

MIDGLEY, G. Diagnóstico em cores. **Micologia médica**, São Paulo: Manole, 1997.

MORRIS, D.O.; OLIVIER, N.B.; ROSSER, E.J. Type-1 hypersensitivity reactions to *Malassezia pachydermatis* extracts in atopic dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.59, p.836-41, 1998.

MUKAI, H.; KANEKO, S.; SAITO, N.; NAGASE, A.; ARAI, S.; HIRAMATSU, M.; KATO, H.; Clinical significance of *Malassezia furfur* specific IgE antibody in atopic dermatitis. **Journal Allergology**, v.46, p.26-33, 1996.

NARDONI, S.; MANCIANTI, F.; CORAZZA, M. Isolation of *Malassezia* species from healthy cats and cats with otitis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.7, n.3, p.141-145, 2005.

NAZZARO-PORRO, M.; CAPRILLI, F.; NAZZARO, P.; MORPURGO, G. Growth requirements and lipid metabolism of *Pityrosporum orbiculare*. **Journal of Investigative Dermatology**. v.66, p.178-182, 1976.

NAZZARO-PORRO, M.; PASSI, S.; PICARDO, M.; MERCANTINI, R.; BREATHNACH, A.S. Lipoxygenase activity of *Pityrosporum in vitro* and *in vivo*. **Journal of Investigative Dermatology**. v.87, p.108-112, 1986.

NELL, A., *et al.* Identification and distribution of a novel *Malassezia* species yeast on normal equine skin. **Veterinary Research**, v.150, p. 395-398, 2002.

NISSEN, D.; PETERSEN, L.J.; ESCH, R.; SVEJGAARD, E.; SKOV, P.S.; POULSEN, L.K.; NOLTE, H. IgE sensitization to cellular and culture filtrates of fungal extracts in patients with atopic dermatitis. **Allergy Asthma Immunology**, v.81, p.247–255, 1998.

NORDVAL, S.L.; JOHANSSON, S. IgE antibodies to *Pityrosporum orbiculare* in children with atopic diseases. **Acta Paediatric Scand**, v.79, p.343-348, 1990.

NOTERMANS, S. H. W.; COUSIN, M. A.; DE RUITER, G. A.; ROMBOUTS, F. M. Fungal immunotaxonomy. In: FRISVAD, J. C.; BRIDGE, P. D.; ARORA, D. K. (Ed.). **Chemical Fungal Taxonomy**. New York: Marcel Dekker Inc., 1998. p.121-149.

NUTTALL, T.J.; HALLIWELL, R.E.W. Serum antibodies to *Malassezia* yeasts in canine atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v.12, p.327-32, 2001.

NUTTALL, T.J.; KNIGHT, P.A.; MACALEESE, S.M.; BROWN, J.; LAMB, J.R.; HILL, P.B. Expression of Th1-cytokine mRNA in canine atopic dermatitis correlates with severity of clinical lesions. **Advances in Veterinary Dermatology**, v.5, p.17-27, 2005.

ONISHI, Y.; KURODA, M.; YASUEDA, H.; SAITO, A.; SONO-KOYAMA, E.; TUNASAWA, S.; HASHIDA-OKADO, T.; YAGIHARA, T.; UCHIDA, K.; YAMAGUCHI, H.; AKIYAMA, K.; KATO, I.; TAKESAKO, K. Two-dimensional electrophoresis of *Malassezia* allergens for atopic dermatitis and isolation of Mal f4 homologs with mitochondrial malate dehydrogenase. **European Journal Biochemic**, v.261, p.148–154, 1999.

ORDEIX, L.; GALEOTTI, F.; SCARAMPELLA, F.; DEDOLA, C.; BARDAGÍ, M.; ROMANO, E.; FONDATI, A. *Malassezia* spp. overgrowth in allergic cats. **Journal compilation**, v.18, p.316–323, 2007.

PANJA, G. The *Malassezia* of the skin, their cultivation, morphology and species. **Trans. 7th Congr. Far East. Assoc. Trop. Med.** V.2, p.442–456, 1927.

PASARE, C.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and acquired immunity. **Semin Immunology**, v.16, p.23-26, 2004.

PLOTKIN, L.I.; SQUIQUERA, L.; MATHOV, I.; GALIMBERTI, R.; LEONI, J. Characterization of the lipase activity of *Malassezia furfur*. **Journal of Medicine Veterinary and Mycology**, v.34, p.43–48, 1996.

PLOTKIN, L.I.; MATHOV, I.; SQUIQUERA, L.; LEONI, J. Arachidonic acid released from epithelial cells by *Malassezia furfur* phospholipase A(2): a potential pathophysiologic mechanism. **Mycologia**, v.90, p.163–169, 1998.

PRESTES, J.; DONATTO, F.F.; DIAS, R.; FROLLINI, A.B.; CAVAGLIERI, C.R. Papel da interleucina-6 como um sinalizador em diferentes tecidos durante o exercício físico. **Fitness & Performance Journal**, v.5, nº 6, p. 348-353, 2006.

RAMOS, L., MELLADO, S., RAMADAN, S. Empleo de blanco de calcoflúor para el estudio de las especies de *Malassezia* por microscopía directa. **Revista Argentina de Microbiología**, v.38, n.1, p.4-8, 2006.

RAN, Y.; YOSHIKE, T.; OGAWA, H. Lipase of *M. furfur*: some properties and their relationship to cell growth. **Journal of Medicine Veterinary and Mycology**. v.31, p.77-85, 1993.

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.

RICIPIUTO, R.M.; OLIVERI, S.; MICALI, G.; SAPUPPO, A. Phospholipase activity in *Malassezia furfur* pathogenic strains. **Mycoses**. v.39, p.233-235, 1996.

ROEDER, A.; KIRSCHNING, C.J.; RUPEC, R.A.; SCHALLER, M.; KORTING, H.C. Toll-like receptors and innate antifungal responses. **Trends Microbiology**, v.12, p.44-49.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature Revision Immunology**, v.4, p.1-23, 2004

ROZA, Marlon Soares *et al* . Pityriasis versicolor and AIDS. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v.78, n.5, 2003.

SAADATZADEH, M. R. 1998. The immunology of the mycelial phase of *Malassezia*. Ph.D. thesis. University of Leeds, Leeds, United Kingdom.

SALKIN, F.; GORDON, M.A. Polymorphism of *Malassezia furfur*. **Journal of Microbiology**, v.23, p.471-475, 1977.

SCHLOTTFELDT, F.S.; TRAMONTIN, S.W.; NAPPI, B.P.; SANTOS, J.I. Reclassificação taxonômica de espécies do gênero *Malassezia*: revisão da literatura sobre as implicações clínico laboratoriais, **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.38, n.3, p.199-204, 2002.

SCHMIDT, M.; ZARGARI, A.; HOLT, P.; LINDBOM, L.; HELMANN, U.; WHITLEY, P.; VAN DER PLOEG, I.; HÄRFÄST, B.; SCHEYNIUS, A. The complete cDNA sequence and expression of the first major allergenic protein of *Malassezia furfur*. **European Journal Biochemic**, v.246, p.181-185, 1997.

SHIFRINE, M.; MARR, A.G. The requirement of fatty acids by *P. ovale*. **J. Gen. Microbiology**. v.32, p.263-270, 1963.

SIDRIM, J.J.C.; MOREIRA, J.L.B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 284p.

SIELING, P.A.; MODLIN, R.L. Toll-like receptors: mammalian 'taste receptors' for a smorgasbord of microbial invaders. **Current Opinion Microbiology**, v.5, p.70-75, 2002.

SIERRA, P.; GUILLOT, J.; JACOB, H.; BUSSIÉRAS, S.; CHERMETTE, R. Fungal flora on cutaneous and mucosal surfaces of cats infected with feline immunodeficiency virus ou feline leukemia virus. **American Journal Veterinary Research**, v.61, p.158-161, 2000.

SILVA, V.; FISCHMAN, O.; CAMARGO, Z.P. Humoral immune response to *Malassezia furfur* in patients with pityriasis versicolor and seborrheic dermatitis. **Mycopathologia**, v.139, p.70-85, 1997.

SIMMONS, R.B.; AHEARN, D.G. Cell wall ultrastructure and diazonium blue B reactions of *Speropachydermia quercuum*, *Bulleo tsugae* and *Malassezia* spp. **Mycologia**, v.79, p.38-43, 1987.

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

SOHNLE, P.G., e COLLINS-LECH, C. Relative antigenicity of *P. orbiculare* and *C. albicans*. **Journal of Investigative Dermatology**, v.75, p.279-283, 1980.

STEENKAMP, E.T.; WINGFIELD, B.D.; COUTINHO, T.A.; ZELLER, K.A.; WINGFIELD, M.J.; MARASAS, W.F.O.; LESLIE, J.F. PCR-based identification of MAT-1 and MAT-2 in the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.10, p.4378-4382, 2000.

STERNBERG, T. H., e KEDDIE, F. M. Immunofluorescence studies in tinea versicolor. **Archive Dermatology**, v.84, p.161-165, 1961.

SUGITA, T., *et al.* New yeast species. *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. **Journal Clinical Microbiology**, v.40, p.363-1367, 2002.

SUGITA, T.; TAKASHIMA, M.; KODAMA, M.; TSUBOI, R.; NISHIKAWA, A. Description of a New Yeast Species, *Malassezia japonica*, and Its Detection in Patients with Atopic Dermatitis and Healthy Subjects. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.10, p.4695-4699, 2003.

SUGITA, T.; TAJIMA, M.; TAKASHIMA, M.; AMAYA, M.; SAITO, M.; TSUBOI, R.; NISHIKAWA, A. A new yeast, *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. **Microbiology and Immunology**, v.48, n.8, p.579-583, 2004.

SUZUKI, T.; OHNO, N.; OHSHIMA, Y.; YADOMAE, T. Soluble mannan and beta-glucan inhibit the uptake of *Malassezia furfur* by human monocytic cell line, THP-1. **FEMS Immunology Medical Microbiology**, v.21, p.223-230, 1998.

SUZUKI, T.; TSUZUKI, A.; OHNO, N.; OHSHIMA, Y.; YADOMAE, T. 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., e OZAKI, Y. Comparative studies of biological and serological characteristics of each species of *Pityrosporum*. **Journal of Medical Mycology**, v.22, p.314–321, 1981.

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

TAKAHASHI, M.; USHIJIMA, T.; OZAKI, Y. Biological activity of *Pityrosporum*. II. Antitumour and immune stimulating effect of *Pityrosporum* in mice. **JNCI**, v.771, p.1093–1097, 1986.

TANAKA, M., e IMAMURA, S. Immunological studies on *Pityrosporum* genus and *Malassezia furfur*. **Journal of Investigative Dermatology**, v.73, p.321–324, 1979.

THOMAS, D.S.; INGHAM, E.; BOJAR, R.A.; HOLLAND, K.T. In vitro modulation of human keratinocyte pro-and anti-inflammatory cytokine production by the capsule of *Malassezia* species. **FEMS Immunology Medical Microbiology**, v.54, p.203-214, 2008.

THOMPSON, E.; COLVIN, J.R. Composition of the cell wall of *Pityrosporum ovale* (Bizzozero) Castellani and Chalmers. **Journal of Microbiology**, v.16, p.263–265, 1970.

TRAYNOR, T.R.; HERRING, A.C.; DORF, M.E.; KUZIEL, W.A.; TOEWS, G.B.; HUFFNAGLE, G.B. Differential roles of CC chemokine ligand-2/monocyte chemoattractant protein-1 and CCR2 in the development of T1 immunity. **Journal of Immunology**, v.168, p.4659-4666, 2002.

WALTERS, C. E.; INGHAM, E.; EADY, E.A.; COVE, J.H.; KEARNEY, J.N.; CUNLIFFE, W.J. In vitro modulation of keratinocyte-derived interleukin 1_α (IL-1_α) and peripheral blood mononuclear cell-derived IL-1_α release in response to cutaneous commensal microorganisms. **Infection Immunology**, v.63, p.1223–1228, 1995.

WEBSTER, G. F., e MCGINLEY, K. J. Serologic analysis of the extractable carbohydrate antigens of *Pityrosporum ovale*. **Microbios**, v.28, p.41–45, 1980.

YASUEDA, H.; HASHIDA-OKADO, T.; SAITO, A.; UCHIDA, K.; KURODA, M.; ONISHI, Y.; TAKAHASHI, K.; YAMAGUCHI, H.; TAKESAKO, K.; AKIYAMA, K. Identification and cloning of two novel allergens from the lipophilic yeast, *Malassezia furfur*. **Biochem Biophys Res Commun**, v.248, p.240–244, 1998.

ZAITS, C.; RUIZ, L.R.B. e SOUZA, V.M. Dermatoses associadas às leveduras do gênero *Malassezia*. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v.75, n.2, p.129-42, 2000.

ZARGARI, A.; DOEKES, G.; VAN IEPEREN-VAN DIJK, A.G.; LANDBERG, E.; HÄRFÄST, B.; SCHEYNIUS, A. Influence of culture period on the allergenic composition of *Pityrosporum obiculare* extracts. **Clinical Experimental Allergy**, v.25, p.1235-1245, 1995.

ANEXO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
Comitê de Ética para o Uso de Animais
Av. Paranjana, 1700 - Itaperi
CEP 60740-000 - fone: 3101-9890
ceua_uece@yahoo.com.br



PARECER CONSUBSTANCIADO

1) Identificação

Processo nº: 08185816-7

Título: Caracterização de antígenos protéicos e produção de anticorpos policlonais anti-*Malassezia* para a identificação de *Malassezia* sp. através da imunohistoquímica.

Pesquisadora responsável: Profa. Dra. Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro (orientadora).

2) Objetivo Geral

- Produzir Anticorpos Policlonais Anti-*Malassezia pachydermatis* para diagnóstico da levedura na dermatite atópica em cães.

3) Sumário do projeto

a. Animais a serem utilizados

- Camundongos Swiss Albino: 50
- Coelhos Nova Zelândia: 5
- Cães: 25

b. Protocolos experimentais

Os protocolos experimentais foram descritos de maneira objetiva e clara.

c. Adequação da metodologia

A metodologia responde aos objetivos propostos.

4) Aspectos éticos da experimentação animal

a. Estrutura do projeto de pesquisa.

O projeto apresenta os seguintes itens: Introdução, Revisão de Literatura, Justificativa, Hipóteses Científicas, Objetivos Gerais e Específicos, Metodologia, Análise Estatística, Cronograma de Atividades, Orçamento e Referências Bibliográficas. Além disto,

no processo foram anexados os seguintes documentos: Ofício de Encaminhamento, Termo de Compromisso e Currículo Lattes da solicitante (aluna de mestrado) e da orientadora.

Salientamos que foi colocada no projeto uma lista da equipe técnica envolvida em seu desenvolvimento.

b. Manejo animal

Os animais a serem utilizados nos experimentos serão mantidos em condições apropriadas, ressaltando que cuidados médicos estarão disponíveis para os animais por profissional habilitado.

c. Destino dos animais experimentais

Os camundongos serão eutanaziados por deslocamento cervical. Os coelhos serão mantidos no biotério para futuros experimentos. Já os cães ficarão mantidos no Centro de Controle de Zoonoses sob a responsabilidade de médicos veterinários.

5) Parecer

O projeto em pauta tem relevância científica, está adequadamente redigido e o aspecto ético está devidamente contemplado. Desta maneira, o CEUA entende que o projeto deve ser enquadrado na categoria de aprovado.

Fortaleza, 07 de julho de 2008.


José Mário Girão Alencar
CEUA-UECE

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)