

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA

Simone Merkel

**MOSCA-DAS-FRUTAS COMO MODELO PARA ESTUDO DE PATOGENICIDADE
E DE PROSPECÇÃO DE FÁRMACOS FRENTE A
*Malassezia pachydermatis***

Porto Alegre

2018

Simone Merkel

**MOSCA-DAS-FRUTAS COMO MODELO PARA ESTUDO DE PATOGENICIDADE
E DE PROSPECÇÃO DE FÁRMACOS FRENTE A
*Malassezia pachydermatis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia e Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Régis Adriel Zanette

Porto Alegre

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Merkel, Simone

Mosca-das-frutas como modelo para estudo de patogenicidade e de prospecção de fármacos frente a *Malassezia pachydermatis* / Simone Merkel. -- 2018. 57 f.

Orientador: Régis Adriel Zanette.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. *Drosophila melanogaster*. 2. *Malassezia pachydermatis*. 3. Infecção sistêmica. 4. Moscas Toll-deficientes. I. Zanette, Régis Adriel, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por guiar e iluminar os caminhos percorridos e transmitir a serenidade em todos os momentos.

Ao meu mestre, professor Dr. Régis Adriel Zanette, o meu sincero agradecimento pela confiança, pelos ensinamentos, pela paciência e pelo acolhimento no seu grupo de pesquisa, ainda mais sendo a primeira aluna deste grupo. Serei eternamente grata por ter me proporcionado ingressar no meio da pesquisa, pois quando aqui cheguei não conhecia ninguém e você me deu a honra de poder trabalhar contigo. Espero ter atingido suas expectativas. E que venha o doutorado.

Aos meus pais pela educação, pela disciplina, pelos valores, pela confiança, pelo apoio, pelo amor e pelo carinho que levo sempre comigo.

Ao meu irmão Simão e minha cunhada Delsi que mesmo morando longe sempre me apoiaram e incentivaram, com longas conversas, dividindo alegrias e angústias.

As minhas amigas Deborah, Siméia, Daniele, Cláudia, Lisandra, Carolina, Mônica, Simone, Vanessa, Anne Rose, gratidão pela cumplicidade, pelas confidências, pelos desabafos, pelos incentivos, chamas e belíssimos momentos.

Ao meu amigo Idamir pelo incentivo e pela confiança depositados em mim para que eu ingressasse no mestrado e hoje eu pudesse estar aqui.

Aos colegas de laboratório Paula, Marina, Karina, Lara, Pâmela e Arthur pela amizade, carinho e pelo precioso auxílio nas atividades experimentais e troca de experiências.

Aos professores do PPG Farmacologia e Terapêutica pelos conhecimentos transmitidos, aos funcionários pela dedicação, em especial à secretária Ieda e às técnicas de laboratório Chris e Alessandra, por todo ensinamento e dedicação.

Aos colegas do PPGFT em especial a Solange, Gabriela, Priscila e Letícia pelas angústias, crescimento e amizade.

Ao laboratório de Micologia da professora Maria Lúcia Scroferneker, as suas alunas Daiane, Amanda, Letícia, Alessandra, Priscila, Anita, Betina, Helenita e Eduarda pelo acolhimento, parceria, ensinamentos, troca de experiências, conversas, os inúmeros cafés e festas. Também à professora Patrícia Valente, que divide o laboratório de Micologia, seus alunos, Danielle, Carine, Fernanda, Carina, Gabriela,

Maurício, Gabriele, Priscila, Audren, Renata, Yasmin por todas as conversas e momentos que passamos juntos.

Ao laboratório de Microbiologia Agrícola e do Ambiente do professor Alexandre Meneghello Fuentefria pela parceria e ensinamentos, por ter me apresentado pessoas muito especiais como a Bruna, Daiane e a Gabriela que inclusive se tornaram amigas da UFRGS para a vida, parceiras de festas, cervejadas, almoços, cafés e muitas conversas, e as demais pessoas do grupo que sempre me acolheram muito bem.

Ao pessoal da Histologia, em especial ao Maikel e a Cláudia e ao pessoal da Fisiologia e da Parasitologia por toda ajuda dispensada.

Ao departamento de Farmacologia e Terapêutica, ao ICBS e à UFRGS por disponibilizar a infraestrutura e seus funcionários.

À CAPES, pela bolsa concedida.

Gratidão a todos que acreditaram no meu crescimento e auxiliaram nesta caminhada para que ela se tornasse mais leve.

RESUMO

O fungo leveduriforme *Malassezia pachydermatis* está presente na microbiota da pele dos animais. Alterações na imunidade da pele do hospedeiro fazem com que a levedura sofra adaptações modificando a expressão de fatores de virulência, causando otite, dermatite e até mesmo infecção sistêmica em animais e humanos. O tratamento de *M. pachydermatis* é relativamente simples, à base de antifúngicos azólicos. No entanto, o aparecimento de cepas resistentes e de infecções recorrentes tem gerado preocupação recentemente. *Drosophila melanogaster* tem sido um modelo promissor no estudo de microrganismos, apresentando duas vias de sinalização da resposta imune, a via *Imd* contra bactérias gram-negativas e a via *Toll* contra bactérias gram-positivas e fungos, as quais desencadeiam a produção dos peptídeos antimicrobianos locais e sistêmicos. A virulência de *M. pachydermatis* em moscas *D. melanogaster wild-type* e *Toll*-deficientes foi testada com inóculos nas concentrações entre 10^3 e 10^7 unidades formadoras de colônia (UFC)/ml e a infecção ocorreu pela punção com agulha no tórax das moscas, que foram colocadas em frascos com alimento e incubados à 29 °C por sete dias, com contagem diária da sobrevivência. Ainda foram realizados a contagem de UFC/ml/mosca e a histopatologia após os sete dias de observação. As moscas *wild-type* se mostraram resistentes à infecção. Curvas de mortalidade de moscas *Toll*-deficientes, em concentrações a partir de 10^4 leveduras/ml, diferiram estatisticamente do grupo controle. Após o sétimo dia de infecção, moscas *wild-type* inoculadas com 1×10^7 UFC/ml tinham carga fúngica variando entre 0,33 a 1×10^2 UFC/mosca, enquanto em moscas *Toll*-deficientes carga fúngica variou de $2,3 \times 10^3$ a $1,3 \times 10^4$ UFC/mosca. Portanto, *D. melanogaster Toll*-deficientes são suscetíveis à infecção por *M. pachydermatis* devido à falta do sistema imune para o reconhecimento e montagem da resposta imune frente ao fungo, semelhante ao que ocorre em pacientes imunocomprometidos, dado o sistema imune conservado entre os mamíferos e a mosca-das-frutas. Deste modo, *D. melanogaster* é um modelo promissor e inovador para estudos de patogenicidade e de prospecção de fármacos frente a *M. pachydermatis*.

Palavras-chave: *Drosophila melanogaster*, *Malassezia pachydermatis*, infecção sistêmica, moscas *Toll*-deficientes.

ABSTRACT

The yeast *Malassezia pachydermatis* is present in the normal microbiota of the skin of animals. Changes in the host's immunity cause the yeast to undergo adaptations modifying the expression of virulence factors, causing otitis, dermatitis and even systemic infection in animals and humans. The treatment of *M. pachydermatis* is relatively simple, based on the use of azole antifungals. However, the emergence of resistant strains and recurrent infections has generated concern recently. *Drosophila melanogaster* has been a promising model in the study of microorganisms, presenting two pathways of immune response signaling, the *Imd* pathway against gram-negative bacteria and the *Toll* pathway against gram-positive bacteria and fungi, which trigger the production of local and systemic antimicrobial peptides. The virulence of *M. pachydermatis* in wild-type and *Toll*-deficient *D. melanogaster* flies was tested with inoculum concentrations ranging between 10^3 and 10^7 colony forming units (CFU)/ml and the infection occurred by needle puncture in the thorax of the flies, which were placed in vials with food and incubated at 29 °C for seven days, with daily survival counts. Fungal burden counts and the histopathology were also performed after seven days of observation. Wild-type flies were resistant to infection. Mortality curves of *Toll*-deficient flies, at concentrations superior of 10^4 yeasts/ml, differed statistically from the control group. After the seventh day of infection, wild-type flies inoculated with 1×10^7 CFU/ml had fungal load ranging from 0.33 to 1×10^2 CFU/fly, while in *Toll*-deficient flies the fungal load ranged from 2.3×10^3 to 1.3×10^4 CFU/fly. We concluded that *Toll*-deficient *D. melanogaster* flies are susceptible to infection by *M. pachydermatis* due to lack of immune system for the recognition and assembly of immune response to the fungus, similar to that occurring in immunocompromised patients, given the conserved immune system among mammals and fruit flies. Therefore, *D. melanogaster* is a promising and innovative model for pathogenicity studies and prospection of drugs against *M. pachydermatis*.

Keywords: *Drosophila melanogaster*, *Malassezia pachydermatis*, systemic infection, *Toll*-deficient flies.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Leveduras de <i>M. pachydermatis</i> : estrutura e brotação unipolar.....	18
Figura 2 - Formação de biofilme de <i>M. pachydermatis</i> na superfície de CVC.....	22
Figura 3 - <i>Drosophila melanogaster</i> . A) Estrutura do corpo da mosca dividido em três partes principais, cabeça, tórax e abdômen. B) Diferenças morfológicas entre machos e fêmeas.....	24
Figura 4 - Imunidade epitelial e sistêmica.	26
Figura 5 - Ativação da via <i>Toll</i> e <i>Imd</i> em moscas <i>D. melanogaster</i>	28
Figura 6 - Inoculação sistêmica em <i>D. melanogaster</i> por punção torácica.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies atuais de *Malassezia* confirmadas por análise de sequenciamento de DNAr, autoridades, ano da descrição e seus principais hospedeiros..... 14

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AhR - Receptor de hidrocarbonetos arílicos
- AMPs - Peptídeos antimicrobianos
- AVC - Acidente vascular cerebral
- CrEL - Cremophor EL
- CVC - Cateter venoso central
- DNAr - Ácido desoxirribonucleico ribossomal
- GNBPs - Proteínas de ligação Gram-negativas
- ICSRC - Infecções da corrente sanguínea relacionadas a cateteres
- ICZ - Indolo[3,2-b]carbazol
- Imd* - Imunodeficiência
- I3C - Indol-3-carbinol
- KOH - Hidróxido de potássio
- MALDI-TOF - Dessorção por laser assistida por matriz de tempo de ionização de espectrometria de massa de voo
- Nf- $\kappa\beta$ - Fator nuclear kappa B
- NPT - Nutrição parenteral total
- PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos
- PAS - Ácido Periódico-Schiff
- PGN – Peptidoglicano
- PGRPs - Proteínas de reconhecimento de peptidoglicanos
- PRRs - Receptores de reconhecimento de padrões
- RNAi - Ácido ribonucleico de interferência
- SDA - Ágar Sabouraud dextrose
- SEIMC - Spanish Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases SEMICYUC
- Spanish Society of Intensive Care Medicine and coronary Units
- UFC - Unidades formadoras de colônias
- UTI - Unidade de terapia intensiva
- UV – Ultravioleta
- WT* – *Wild-type*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 <i>Malassezia</i> spp.	12
1.1.1 Histórico e taxonomia.....	12
1.1.2 Estrutura celular e reprodução	14
1.1.3 Hábitat.....	15
1.1.4 Diagnóstico.....	16
1.1.5 Malasseziose.....	16
1.2 <i>Malassezia pachydermatis</i>	17
1.2.1 Patologia	18
1.2.2 Tratamento	22
1.3 <i>Drosophila melanogaster</i>	23
1.3.1 Resposta imune inata.....	25
1.3.2 Defesa celular epitelial	26
1.3.3 Defesa celular sistêmica.....	26
1.3.4 Peptídeos antimicrobianos	27
1.3.5 Sinalização da resposta imune.....	27
1.3.6 Modelos de infecção fúngica em <i>D. melanogaster</i>	29
1.3.7 Inoculação de <i>D. melanogaster</i>	29
1.3.8 Administração de fármacos.....	31
2 OBJETIVOS.....	33
2.1 Objetivo Geral.....	33
2.2 Objetivos Específicos	33
3 ARTIGO CIENTÍFICO	34
4 DISCUSSÃO	46
5 CONCLUSÃO	48
6 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	49
7 REFERÊNCIAS.....	50
8 ANEXOS	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Malassezia* spp.

1.1.1 Histórico e taxonomia

O gênero *Malassezia* spp. foi descrito pela primeira vez por Baillon em 1889. Atualmente o gênero pertence ao reino Fungi, filo Basidiomycota, subfilo Ustilagomycotina, classe Exobasidiomycetes, ordem Malasseziales e família *Malasseziaceae* (SCHLOTTFELDT et al., 2002; BATRA et al., 2005; GAITANIS et al., 2012).

Eichstedt, 1846, estudando a pitiríase versicolor, descreveu o primeiro fungo associado com esta lesão de pele, que em 1853 foi designado por Robin como *Microsporon furfur*, onde as leveduras foram denominadas de *Pityrosporum*, e foram divididas em três espécies, *P. orbiculare*, *P. ovale* e *P. pachydermatis*, enquanto as formas miceliais foram chamadas de *Malassezia furfur* (CHEN e HILL, 2005; ASHBEE, 2007). No decorrer do tempo, foram observadas cepas de *Pityrosporum* que não foram capazes de crescer em meios sem adição de lípidos e Slooff as incluiu em uma única espécie, *P. pachydermatis*. Em 1986, os gêneros *Pityrosporum* e *Malassezia* foram unificados e passaram a ser chamados de *Malassezia pachydermatis* (CHEN e HILL, 2005).

Em 1990 Simmons & Guého, descreveram uma nova espécie, *M. sympodialis*. Observando variações na morfologia das colônias e entre as características dos isolados de *M. furfur*, Simmons & Guého (1996) através das sequências 28S-DNAr descreveram e nomearam sete espécies de *Malassezia*: *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. obtusa*, *M. globosa*, *M. restricta*, *M. slooffiae* e *M. pachydermatis* (BATRA et al. 2005; CHEN e HILL, 2005; ASHBEE, 2007).

Esta classificação foi revisada anos mais tarde e foram incorporadas mais sete espécies ao gênero *Malassezia* spp., incluindo *M. dermatis*, *M. japonica*, *M. nana*, *M. yamotoensis*, *M. equi* (BATRA et al. 2005; ASHBEE, 2007), *M. caprae* e *M. cuniculi* (CASTELLÁ et al., 2014).

Já em 2016 foram descobertas e incorporadas mais três espécies ao gênero, sendo elas *M. arunaloeki* (HONNAVAR et al., 2016), *M. brasiliensis* e *M. psittaci* (CABAÑES e al., 2016).

O gênero *Malassezia* é composto por 17 espécies de fungos leveduriformes lipofílicos e lipodependentes, das quais 16 espécies são lipodependentes, acometendo principalmente humanos (PUIG et al., 2017), enquanto *M. pachydermatis* é a única não lipodependente, fazendo parte da microbiota de cães, gatos e outros animais domésticos e selvagens (JESUS et al., 2011; PUIG et al., 2017). Todas as 17 espécies foram classificadas com base em sequências de ácido desoxirribonucleico ribossomal (DNAr) na região 26S (YAMAMOTO et al., 2014; CABAÑES e al., 2016; HONNAVAR et al., 2016).

Na pele de humanos podem ser encontradas 11 espécies de *Malassezia*, delas também sete fazem parte da microbiota de animais: *M. caprae*, *M. cuniculi*, *M. equina*, *M. nana* e *M. pachydermatis*, *M. brasiliensis*, *M. psittaci* (KOLECKA et al., 2014; CABAÑES e al., 2016; HONNAVAR et al., 2016).

Na Tabela 1 estão relacionadas todas as espécies atuais de *Malassezia* spp., confirmadas por análise de sequenciamento de DNAr, os autores responsáveis pela descoberta de cada espécie, o ano da descrição da espécie e seus principais hospedeiros.

Tabela 1 – Descrição das espécies de *Malassezia* confirmadas por análise de sequenciamento de DNAr, autor(es) e ano da descrição e seus principais hospedeiros.

Espécies de <i>Malassezia</i>	Hospedeiros
<i>M. furfur</i> (Robin) (Baillon, 1889)	Homem / vaca, elefante, porco, macaco, avestruz, pelicano
<i>M. pachydermatis</i> (Weidman) (Dodge, 1935)	Cão, gato / carnívoros, pássaros
<i>M. sympodialis</i> (Simmons e Guého, 1990)	Homem / cavalo, porco, ovelha
<i>M. globosa</i> (Midgley et al., 1996)	Homem / chita, vaca
<i>M. obtusa</i> (Midgley et al., 1996)	Homem
<i>M. restricta</i> (Guého et al., 1996)	Homem
<i>M. slooffiae</i> (Guého et al., 1996)	Homem, porco / cabra, ovelha
<i>M. dermatis</i> (Sugita et al., 2002)	Homem
<i>M. equi</i> (Nell, 2002)	Cavalo / vaca
<i>M. japonica</i> (Sugita et al., 2003)	Homem
<i>M. nana</i> (Hirai et al., 2004)	Gato, vaca / cão
<i>M. yamatoensis</i> (Sugita et al., 2004)	Homem
<i>M. caprae</i> (Cabañes e Boekhout, 2007)	Cabra / cavalo
<i>M. cuniculi</i> (Cabañes e Castellá, 2010)	Coelho
<i>M. arunalokei</i> (Honnavar et al., 2016)	Homem
<i>M. brasiliensis</i> (Cabañes e Castellá, 2016)	Pássaros
<i>M. psittaci</i> (Cabañes e Castellá, 2016)	Pássaros

Fonte: Adaptado de Cabañes (2014).

1.1.2 Estrutura celular e reprodução

Malassezia é um organismo eucariótico unicelular que possui uma parede celular espessa, maior que 0,25 µm, quando comparada a outras leveduras, e com múltiplas camadas. A parede celular é envolta por uma camada laminar externa contendo lipídios, enquanto a superfície interna ondulada é composta por organelas citoplasmáticas que incluem o núcleo e os vacúolos contendo lipídeos e mitocôndrias. A parede celular ocupa entre 26-37% do volume celular (CHEN e HILL, 2005; GAITANIS et al., 2012).

A reprodução de *Malassezia* spp. pode ser unipolar/simpodial (*M. sympodialis*) ou por brotamento (*P. ovale*, *P. orbiculare* e *M. pachydermatis*). Na reprodução simpodial ocorre a paralisação do crescimento lateral e aumento do crescimento no seu comprimento ou dilatação. Já o brotamento desenvolve uma estrutura para fora da parede celular formando a célula filha, e quando esta atinge o comprimento da célula mãe, ocorre sua fissão (LACAZ et al., 2002; CHEN e HILL, 2005).

Velegraki et al. (2015) sugerem que *Malassezia* spp. pode apresentar uma fase reprodutiva sexual ou parassexual, devido aos seus diferentes genótipos e subtipos

de leveduras que são encontrados em diferentes sítios de pele. Esta fase reprodutiva levaria ao aumento de sua virulência que estaria associada à genética das leveduras com a doença.

1.1.3 Hábitat

Malassezia spp. faz parte da microbiota normal da pele de animais e humanos, vivendo em comensalismo na pele saudável, sendo este seu principal habitat, além das mucosas dos mamíferos e das aves, onde exploram nutrientes essenciais ao crescimento. Quando este processo é alterado, sofre adaptação modificando a expressão de enzimas, como lipases, fosfolipases e proteases que contribuem para a inflamação cutânea, as alterações no pH, a liberação de eucosanoides e a ativação do complemento (LAUTERT et al., 2011; BUOMMINO et al., 2013; VELEGRAKI et al., 2015).

Estas interações entre as leveduras e a pele humana durante a saúde e a doença ainda não estão completamente explicitadas, como o comensalismo na pele saudável, as alterações nos melanócitos cutâneos que levam à hiperpigmentação com ausência de inflamação, a inflamação sem a imunidade mediada por anticorpos, a indução de imunidade específica e a invasão com inflamação do folículo piloso (CHEN e HILL, 2005; VELEGRAKI et al., 2015).

A epiderme é a primeira linha de defesa da pele protegendo o corpo da perda de água, raios ultravioletas (UV), lesões mecânicas, invasão microbiana e problemas imunológicos. A queratinização das células epidérmicas renova o extrato córneo e proporciona defesa contra microrganismos, incluindo fungos superficiais (CHEN e HILL, 2005; BRAND, 2012).

Quando ocorre a lesão da pele, o sistema imunológico aumenta sua espessura, levando à inflamação cutânea, hiperplasia epidérmica, hiperqueratose e liquenificação. Alterações nos processos físicos, químicos ou imunológicos da pele podem aumentar ou diminuir a patogenicidade das leveduras assim como, os fatores de virulência da própria levedura (CHEN e HILL, 2005; VELEGRAKI et al., 2015).

Foram associadas duas vias metabólicas da levedura com as cepas isoladas de humanos e animais doentes, a produção de fosfolipases e a síntese do pigmento indol que através do gene AhR (receptor de hidrocarbonetos arílicos), como indirubina e indolo[3,2-b]carbazol (ICZ), modificam potencialmente a função da maioria das células

da epiderme onde expressam AhR, o qual participa na carcinogênese, na regulação imune e na mediação dos danos UV (GAITANIS et al., 2012; VELEGRAKI et al., 2015). ICZ é um produto da condensação de indol-3-carbinol (I3C), um agonista ativo de AhR, enquanto a indirubina apresenta atividade inibitória contra a proliferação celular e a citotoxicidade, aumentando as interações da levedura com a pele (GAITANIS et al., 2012).

1.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico de *Malassezia spp.* na pele é feito através de técnicas de citologia, cultura e histopatologia (CHEN e HILL, 2005; NEGRE et al., 2009). Os métodos citológicos são os mais utilizados para leveduras, e são feitos principalmente por meio da pressão de um pedaço de fita de acetato clara sobre a pele lesionada por várias vezes, esfregando um cotonete na superfície da pele, ou pela raspagem superficial da pele. O material coletado é colocado sobre uma lâmina onde pode ser corado com hidróxido de potássio (KOH) 10-40%, KOH + tinta Parker 3:1, azul de metileno, Giemsa, ácido periódico de Schiff (PAS), ou calcoflúor. No microscópio as lâminas são observadas em aumento de 400x ou com lente de imersão em óleo (aumento de 1000x), sendo esta a mais indicada, onde revelam-se as estruturas com formato de leveduras arredondadas a ovais podendo estar isoladas ou agrupadas (CHEN e HILL, 2005; MEZZARI e FUENTEFRÍA, 2012).

Já a caracterização fisiológica de *M. pachydermatis* é feita pela avaliação de crescimento em ágar Sabouraud dextrose (SDA), e do uso de Tween 20, 40, 60 e 80, que são ésteres do polioxietileno sorbitano e Cremophor EL (CrEL) como fonte lipídica. A utilização de ésteres e de CrEL produz uma tensão e diferenças de reatividade em todos os genótipos de DNAr, expressando diferenças na produção de catalase e β -glicosidase (BATRA et al., 2005; PUIG et al., 2017).

1.1.5 Malasseziose

Em humanos as doenças de pele compõem a maior parte das patologias provocadas pelas espécies de *Malassezia*, como pitíriase versicolor, foliculite, dermatite seborreica, dermatite atópica, psoríase, blefarite seborreica, papilomatose confluyente e reticulada de Gougerot-Carteaud, além de infecções invasivas e

sistêmicas associadas a pneumonia, fungemia de cateter e peritonite em pacientes dialisados (MARASCHIN et al., 2008; CARRILLO-MUNOZ et al., 2013; KOLECKA et al., 2014).

Fatores predisponentes do hospedeiro levam a quadros patológicos de *Malassezia* spp. em humanos, como deficiências vitamínicas, desnutrição, doenças crônicas infecciosas como tuberculose, diabetes melito, corticoterapia sistêmica, gravidez, imunossupressão, trombocitopenia e taxas elevadas de cortisol no plasma (CHRYSSANTHOU et al., 2001; MARASCHIN et al., 2008).

Nos animais, como cães, gatos, pássaros, cavalos e coelhos, *Malassezia* provoca principalmente otite externa, dermatite e doença sistêmica (GIRÃO et al., 2004; WEILER et al., 2013).

1.2 *Malassezia pachydermatis*

M. pachydermatis foi identificada em 1925 por Weidman e descrita pela primeira vez por Dodge em 1935, a partir de escamas de um rinoceronte indiano com dermatite esfoliativa (CHRYSSANTHOU et al., 2001; CHEN e HILL, 2005). Mais tarde a levedura foi isolada de um cavalo com um eritema de alopecia no rosto e também foi encontrada no mar. Em cães a dermatite foi descrita pela primeira vez em 1983 por Dufait. A otite externa vem sendo descrita principalmente em cães e gatos, além de furões, raposas, porcos e dromedários (CHEN e HILL, 2005).

É uma levedura oval pequena em formato de amendoim medindo 2-3 µm de largura e 4-5 µm de comprimento (CHEN e HILL, 2005), com brotação unipolar (CAFARCHIA et al., 2012b; MASON et al., 2013). Suas colônias apresentam coloração fosca, com aspecto cremoso, além da textura macia, chegando a ser friável (Figura 1) (MARASCHIN et al., 2008; ROMAN et al., 2016).

É uma levedura lipofílica, mas é a única do seu gênero que não é lipodependente (JESUS et al., 2011), podendo ser cultivada em meio de SDA, além do meio de Dixon. A temperatura ideal para seu desenvolvimento é de 37 °C, não podendo ultrapassar 41 °C (LACAZ et al., 2002; CHEN e HILL, 2005; MARASCHIN et al., 2008).

Apesar de não ser lipodependente, *M. pachydermatis* deve ser cultivada *in vitro* com adição de lipídios (GIRÃO et al., 2004). Em 2017, Puig e colaboradores avaliaram

a lipodependência de *M. pachydermatis* e verificaram que existe sim uma variabilidade entre a espécie, que envolve cepas atípicas raras, que necessitam da presença de lipídios para o seu desenvolvimento.

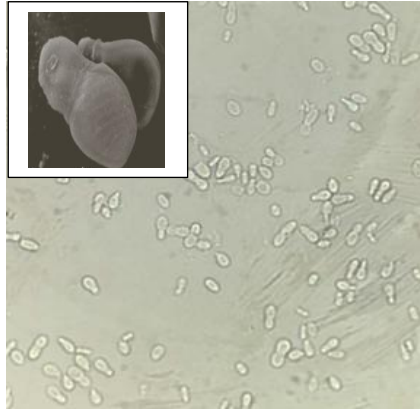


Figura 1 - Leveduras de *M. pachydermatis*: estrutura e brotação unipolar.

Fonte: Adaptado de Roman et al. (2016).

É uma espécie de levedura principalmente zoofílica, que infecta primeiramente animais (ILAHI et al., 2017). Coloniza a pele e os sítios das mucosas de cães saudáveis, com uma prevalência entre 50 e 100% (MARASCHIN et al., 2008), e canal auditivo, pele dos lábios, axilas, espaços interdigitais, sacos anais, reto, nariz, pregas de garras de cães, gatos e de outros animais, provocando otite externa, dermatite e doença sistêmica (NEGRE et al., 2009).

1.2.1 Patologia

M. pachydermatis é um microrganismo saprofítico que se alimenta de matéria orgânica em decomposição, onde fatores como aumento da temperatura e umidade, alterações de pH, corticoterapia e alterações no sistema imune influenciam o desenvolvimento da patogenicidade da levedura, causando eritema, prurido leve a grave, alopecia, exsudação gordurosa e descamação, além de lesões secundárias como escoriações, liquenificação, hiperpigmentação e exsudação (NEGRE et al., 2009; VELEGRAKI et al., 2015). Estes fatores na maioria das vezes causam otite e dermatite crônica, muitas vezes recorrentes, além de atuarem como um patógeno emergente em recém-nascidos, neonatos, crianças e adultos que fazem uso de

nutrição parenteral com lipídios por meio de cateter, onde se tornam um fator de risco para infecções sistêmicas (FIGUEREDO et al., 2013; SARDI et al., 2014).

As estações com climas quentes e úmidos, como o verão e a primavera, são mais propícias para o desenvolvimento de dermatite por *Malassezia* em animais, ocorrendo principalmente em dobras cutâneas, onde a umidade pode favorecer o seu desenvolvimento e as alterações lipídicas na superfície da pele favorecem a disponibilidade de nutrientes para a levedura (CHEN e HILL, 2005).

Alterações na produção de sebo estão associadas à presença de dermatite que ocorre pela presença de doenças endócrinas, bacterianas da pele, desordens de queratinização. Cães de qualquer idade, sexo e raça podem ser diagnosticados com dermatite por *Malassezia*, mas cães entre 1 e 3 anos de idade são os mais afetados, com lesões localizadas ou generalizadas ocorrendo na face, no pescoço, na virilha, na pele interdigital ou intertriginosa. Além disso, há predisposição genética de raças caninas como west highland white terrier, basset hound, dachshund, cocker spaniel, shih-tzu e england setter (CHEN e HILL, 2005; ILAHI et al., 2017).

A dermatite ocorre em animais com doenças inflamatórias apresentando lesões eritematosas ou gordurosas, alopecia, hipersensibilidade, presença de ectoparasitas, infecção bacteriana, endocrinopatias, escamações, além de hiperpigmentação e liquenificação em casos crônicos, com odor fétido e rançoso (CHEN e HILL, 2005; JERZSELE et al., 2014). Um fator condicionante para o desenvolvimento da dermatite é o desequilíbrio na imunidade do hospedeiro (SANTIN et al., 2014; ROMAN et al., 2016).

O desenvolvimento de otite externa em cães e gatos aumenta pela presença de fatores predisponentes como as anormalidades conformacionais, maceração e umidade do epitélio, iatrogenia e traumas causados pela limpeza do ouvido (MASON et al., 2013). É uma inflamação do canal auditivo que ocorre devido à presença de ectoparasitas, corpos estranhos, hipersensibilidade, desordens de queratinização e neoplasia (MASON et al., 2013; PEANO et al., 2017). Como descrito anteriormente, o aumento da temperatura, da umidade e do substrato aceleram o desenvolvimento e a colonização da levedura, passando da forma comensal para a patogênica, com aparecimento de prurido no local (MARASCHIN et al., 2008; SANTIN et al., 2014).

Em animais a doença sistêmica não é comumente descrita, mas pode se desenvolver pela presença de dermatite atópica ou seborreica, infecção parasitária,

diabetes mellitus canino, infecção pelo vírus da imunodeficiência felina ou pelo vírus da leucemia felina e uso prolongado de antibióticos associados a glicocorticoides (CHEN e HILL, 2005; VELEGRAKI et al., 2015).

A primeira infecção sistêmica de *M. pachydermatis* em humanos foi descrita em 1979 por Wallace e colaboradores, em um paciente de unidade de terapia intensiva (UTI). Fine et al. (1983) descreveram pela primeira vez a infecção em um paciente diabético insulino dependente com diálise peritoneal ambulatorial contínua, evidenciando a relação entre infecção com a levedura e o diabetes (GAITANIS et al., 2012). Além disso, *M. pachydermatis* em humanos foi isolada de amostras de escarro, lavagem brônquica, fluidos peritoneais e outros, além de causar infecção sanguínea. A colonização da pele em humanos é eventual (ILAHI et al., 2017).

As infecções invasivas comumente se desenvolvem em dois grupos de pacientes, os que recebem nutrição parenteral total (NPT) por meio de cateter venoso central (CVC) com suplementação lipídica, como recém-nascidos, bebês com baixo peso ao nascer (<1500 g) e prematuros (23 a 27 semanas) (CHANG et al., 1998; CHRYSSANTHOU et al., 2001; AL-SWEIH et al., 2014; ILAHI et al., 2017), e um segundo grupo formado por crianças até 12 meses de idade e adultos imunossuprimidos ou imunocomprometidos, como pacientes trombocitopênicos, leucêmicos e pacientes submetidos à transplante de medula óssea (VELEGRAKI et al., 2015; ROMAN et al., 2016). A suspensão de NPT com lipídios é composta por ácidos linoleicos, oleicos ou palmíticos, que são potentes estimulantes do crescimento de *Malassezia* (GAITANIS et al., 2012).

O CVC é utilizado para a monitorização e o tratamento de pacientes que se encontram em estado crítico, sendo essenciais para a administração de fluidos intravenosos, medicação, produtos sanguíneos, nutrição parenteral, monitoramento hemodinâmico e hemodiálise (PARRA-FLORES et al., 2017; CHAVES et al., 2018). Os locais mais utilizados para a inserção dos CVC são as veias subclávia, jugular e femoral (PARRA-FLORES et al., 2017).

Atualmente nos hospitais, as infecções da corrente sanguínea relacionadas a cateteres (ICSRC) estão entre as infecções mais frequentes ficando entre 15 e 30% de todas as bacteremias nosocomiais, associadas à morbimortalidade e ao aumento dos custos hospitalares (CHAVES et al., 2018).

As ICSRC ocorrem no momento em que a levedura consegue entrar em contato com os fluidos humanos através do cateter, levando a infecções locais e sistêmicas, onde o paciente com uso de CVC sem outro foco infeccioso aparente apresenta febre e/ou calafrios, e outros sinais de sepse, podendo levar a sérios problemas de morbimortalidade (DAS NEVES JUNIOR et al., 2010; CHAVES et al., 2018). Essa contaminação pode ocorrer desde o momento da inserção, da manipulação ou manutenção do cateter, por meio das mãos da equipe de saúde ou do cuidador, pela própria microbiota da pele do paciente, pelo uso de solução contaminada, pela colonização do conector e pela permanência do cateter por mais de sete dias (CHANG et al., 1998; LONA-REYES et al., 2016; CHAVES et al., 2018). A contaminação de cateter ocorrida pelas mãos da equipe de saúde em contato com o paciente, com mãos colonizadas por *M. pachydermatis* obtida através dos cães de estimação, tem sido um dos agravantes mais descritos (CHANG et al., 1998; CHRYSSANTHOU et al., 2001; GAITANIS et al., 2012).

A rápida identificação microbiana da hemocultura através da dessorção por laser assistida por matriz de tempo de ionização de espectrometria de massa de voo (MALDI-TOF) é imprescindível, pois reduz o tempo de identificação dos microrganismos e agiliza o atendimento do paciente com suspeita de infecção da corrente sanguínea (ILAHI et al., 2017; CHAVES et al., 2018).

Os casos de sepse por *Malassezia* spp. em UTIs adultas e pediátricas estão sendo bastante relatados e a remoção do cateter na maioria dos casos leva à resolução da infecção. Como prevenção contra a propagação da infecção sistêmica nestes ambientes é indispensável a adesão da equipe de saúde a medidas de higiene padrão, como a lavagem correta e assepsia das mãos (CHANG et al., 1998; GAITANIS et al., 2012).

A aderência da levedura à superfície do cateter produz uma película de proteção de polímeros extracelulares, uma cápsula, que favorece a colonização e proliferação pela presença de nutrientes, formando biofilmes (Figura 2) (JERZSELE et al., 2014; LONA-REYES et al., 2016). Biofilmes surgem de comunidades complexas de microrganismos multicelulares diferenciados, e a presença de fatores iatrogênicos como tratamentos invasivos, uso de antibióticos de amplo espectro, nutrição parenteral, administração pós-natal de esteroides e inibidores de ácido gástrico,

contribui para o desenvolvimento da infecção aguda ou sistêmica (VELEGRAKI et al., 2015).

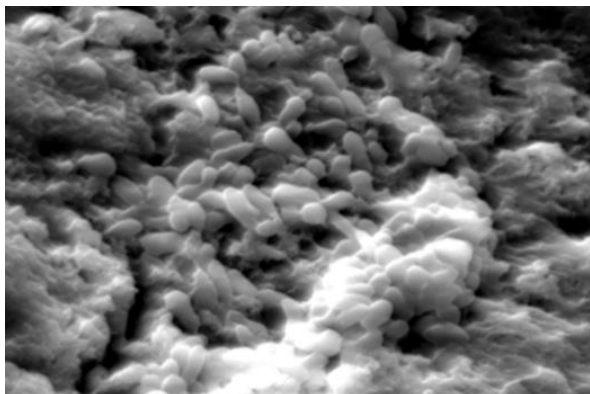


Figura 2 - Formação de biofilme de *M. pachydermatis* na superfície de CVC.

Fonte: Jerzsele et al. (2014).

A formação de biofilme faz com que as leveduras se tornem resistentes ao tratamento antimicrobiano, levando à formação de células sésseis entre 1000 e 2000 vezes mais resistentes que em células planctônicas. Mecanismos de resistência das leveduras ao biofilme ocorrem pela presença de matiz extracelular, sobre-expressão de bombas de efluxo, persistência, densidade celular, sobre-expressão de alvos de fármacos, estresse às respostas e pela fisiologia da célula (FIGUEREDO et al., 2013).

A resistência ao tratamento que ocorre pela recorrência dos sintomas leva ao desenvolvimento da doença crônica, o que torna a terapia convencional ineficaz, exigindo fármacos cada vez mais potentes ou uso de doses próximas a concentrações tóxicas dos antimicrobianos. Nesse caso se faz necessária a remoção do dispositivo contaminado (FIGUEREDO et al., 2013; SARDI et al., 2014).

1.2.2 Tratamento

O grande número de micoses oportunistas em humanos e animais demonstra a necessidade emergencial de compreensão da patogênese dessas doenças, do hospedeiro e de novos alvos terapêuticos (LIONAKIS, 2011). Pacientes imunocomprometidos são frequentemente diagnosticados com infecções fúngicas invasivas oportunistas que levam a morbimortalidade, apesar da administração de terapia antifúngica agressiva (DAS NEVES JUNIOR et al., 2010; LIONAKIS, 2011). O

uso de antifúngicos modernos tem demonstrado uma eficácia subótima e altas taxas de resistência a estes fármacos, o que demonstra a necessidade urgente de descobrir novos alvos e estratégias terapêuticas, como a associação entre os diferentes tipos de antifúngicos (LIONAKIS, 2011; SARDI, et al., 2014).

Schlemmer e colaboradores (2014) descrevem a falta de avaliação sobre o potencial sinergismo ou antagonismo entre os antifúngicos azólicos contra *M. pachydermatis in vitro* e ressaltam que a resistência a estes fármacos pode ocorrer pela presença de diferentes mecanismos, como a mutação e sobre-expressão de genes da própria *M. pachydermatis in vitro* e, *in vivo* a resistência ocorra após a exposição a estes antifúngicos.

Quanto ao tratamento da malasseziose, o tópico é indicado em casos de poucas lesões locais e na profilaxia das recidivas, enquanto o tratamento sistêmico é eficaz nas formas clínicas amplas, infecções recorrentes ou quando há falha da terapêutica tópica (MARASCHIN et al., 2008). Em terapias de longo prazo, acima de quatro semanas, o menor risco de toxicidade faz com que os tratamentos tópicos sejam preferenciais aos sistêmicos, pois disponibilizam uma alta concentração do fármaco para a área desejada e efeitos limitados. Independentemente do tipo de tratamento, estes resultam em taxas de cura elevadas, mas não evitam a recidiva. Portanto, o tratamento de *Malassezia* spp. pode ser tópico, sistêmico ou associação entre ambos, e a escolha do fármaco é feita de acordo com a gravidade da lesão e a sua viabilidade (NEGRE et al., 2009; GAITANIS et al., 2012).

A terapia antifúngica para *Malassezia* spp. deve ser escolhida com muito rigor, principalmente quando ocorrer casos de falha de tratamento antifúngico ou infecções recorrentes, pois tratamentos de infecções crônicas e recorrentes exigem altas doses de antifúngicos, e que na maioria dos casos não apresentam eficácia (CAFARCHIA et al., 2012; IATTA et al., 2017).

1.3 *Drosophila melanogaster*

D. melanogaster conhecida como mosca-das-frutas possui um ciclo de vida muito rápido, entre 8 a 12 dias, para obtenção de uma nova mosca adulta. Ocorre a uma temperatura de 25 °C, apresentando um único par de acoplamento fértil responsável por produzir centenas de descendentes geneticamente idênticos. Devido

as suas fases de desenvolvimento, a mosca pode ser considerada um organismo com múltiplos modelos, como embrião (~24 horas), larva (L1, L2 e L3, ~3 dias), pupa (4 dias) e mosca adulta que atinge a maturidade sexual após 2-4 dias, quando a fêmea começa a colocar os ovos (LIONAKIS e KONTOYIANNIS, 2012; CHYB e GOMPEL, 2013).

O corpo da mosca adulta é dividido em três partes principais, cabeça, tórax e abdômen, sendo o tórax dividido em três segmentos: T1 ou protórax, T2 ou hemotórax e T3 metatórax, e estes segmentos apresentam apêndices como T1: um par de pernas, T2: um par de pernas e um par de asas e T3: um par de pernas e um par de halteres, asas modificadas (Figura 3A) (CHYB e GOMPEL, 2013).

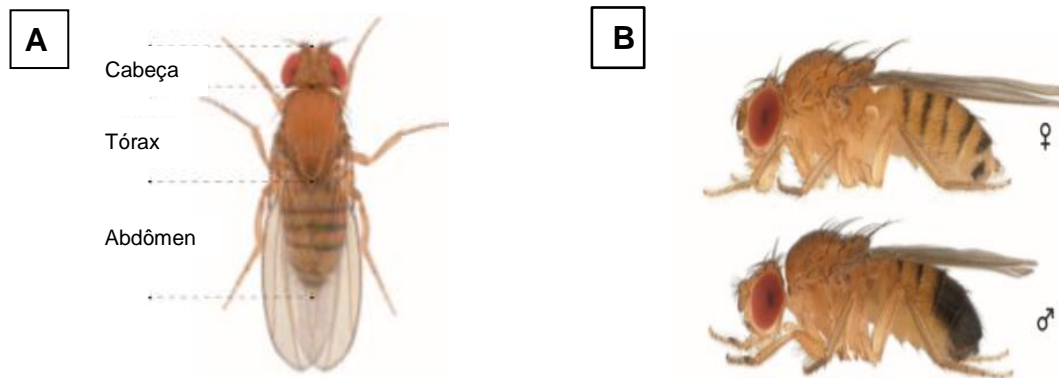


Figura 3 – *Drosophila melanogaster*. **A)** Estrutura do corpo da mosca dividido em três partes principais, cabeça, tórax e abdômen. **B)** Diferenças morfológicas entre machos e fêmeas.

Fonte: Adaptado de Chyb e Gompel (2013).

D. melanogaster é uma espécie dimórfica, onde machos e fêmeas são distinguidos com base em características morfológicas. As fêmeas são geralmente maiores que os machos. Nos machos os segmentos finais do abdômen são inteiramente escuros, a genitália do macho, conhecida como *epandrium*, é maior, mais complexa e mais escura do que a da fêmea e em ambos os sexos possuem listras transversais no lado dorsal de cada segmento abdominal. Já as fêmeas apresentam um abdômen pontiagudo enquanto que o abdômen do macho é arredondado. (Figura 3B) (CHYB e GOMPEL, 2013).

O cérebro da mosca adulta possui mais de 100.000 neurônios que formam circuitos discretos responsáveis por comportamentos complexos como ritmos

circadianos, sono, aprendizagem e memória, acasalamento, alimentação, agressão, adestramento e a navegação de voo (PANDEY e NICHOLS, 2011).

Em 1994, Ed Lewis recebeu o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina, pela pesquisa pioneira em moscas *D. melanogaster* definindo sua estrutura gênica (PANDEY e NICHOLS, 2011). A partir do ano de 2000, aumentaram consideravelmente as análises do sistema imune de *Drosophila*, foi concluída a sequência genômica da mosca, além do surgimento de novas tecnologias na área de proteômica e ácido ribonucleico de interferência (RNAi), sendo o primeiro grande organismo complexo a ter seu genoma sequenciado (LEMAITRE e HOFFMANN, 2007; PANDEY e NICHOLS, 2011).

Em 2007, Lemaitre e Hoffmann, ao analisarem os genes antibacterianos em moscas mutantes, descobriram que a mutação recessiva e a imunodeficiência (*Imd*), descritas por eles em 1995, são os responsáveis por prejudicar a produção de peptídeos antimicrobianos em *D. melanogaster*.

Em 2011, Jules Hoffmann recebeu o prêmio Nobel por descobrir que a via de sinalização *Toll* em moscas *D. melanogaster* é indispensável para a defesa antifúngica, levando este modelo a ser um dos mais explorados (LIONAKIS, 2011).

1.3.1 Resposta imune inata

D. melanogaster, como a maioria dos invertebrados, não possui resposta imune adaptativa, apenas a resposta imune inata totalmente desenvolvida. A resposta imune inata é responsável por limitar a infecção nas primeiras horas após a exposição microbiana, onde padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), fundamentais para o desenvolvimento da imunidade inata (HOFFMANN et al., 1999; PARSONS e FOLEY, 2016).

A resposta imune inata ocorre nas superfícies epiteliais das células dos tratos digestivos e genital, da traqueia e dos túbulos de Malpighi, onde são produzidos os peptídeos responsáveis por inibir o crescimento microbiano. Quando um microrganismo ultrapassa a cavidade geral do corpo da mosca entram em ação as defesas celulares epitelial e sistêmica que são os principais mecanismos de defesa antimicrobiana, agindo como um mecanismo de alarme para o hospedeiro (HOFFMANN e REICHHART, 2002).

1.3.2 Defesa celular epitelial

O corpo da mosca *Drosophila* é formado por uma cavidade que é preenchida pela hemolinfa, que contém células hemorrágicas e hemócitos. Os hemócitos agem na defesa celular por meio da fagocitose, que ocorre através dos plasmócitos, enquanto as células de cristal são responsáveis pela melanização do local do ferimento e o encapsulamento dos microrganismos é feito por células achatadas conhecidas como lamelócitos, estando envolvidos no desenvolvimento e defesa imunológica (Figura 4) (LEMAITRE e HOFFMANN, 2007; PARSONS e FOLEY, 2016).

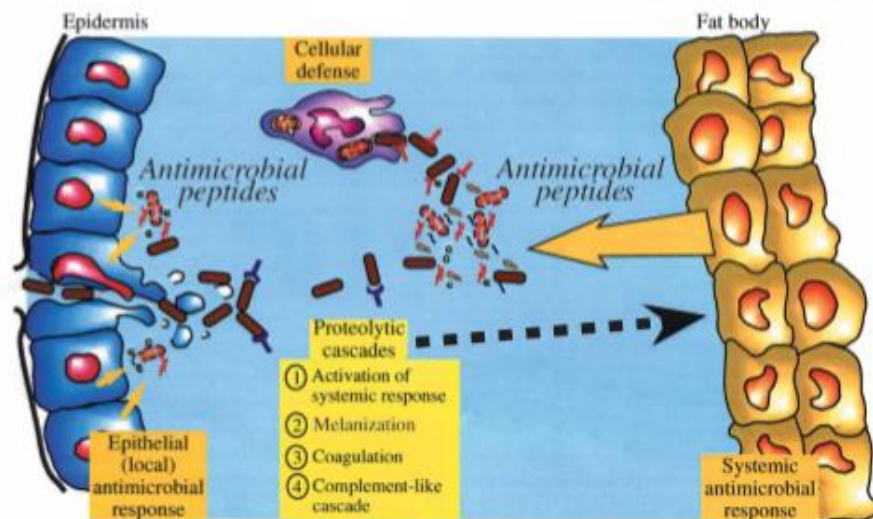


Figura 4 - Imunidade epitelial e sistêmica.

Fonte: Hoffmann e Reichhar (2002).

1.3.3 Defesa celular sistêmica

No momento em que ocorre uma lesão, o corpo de gordura da mosca que é equivalente ao fígado de mamíferos, induz a secreção de peptídeos antimicrobianos (AMPs) catiônicos na hemolinfa, onde agem prejudicando as membranas das células microbianas (Figura 4). Além disso, os adipócitos, produzidos pelo corpo de gordura da mosca, são responsáveis pelo armazenamento de energia, crescimento, imunidade, isolamento térmico, cicatrização de feridas (HOFFMANN e REICHHART, 2002; FRANZ et al., 2018) e induzem ainda a resposta antimicrobiana sistêmica que

apresenta uma enorme variedade e quantidade de peptídeos em resposta à infecção, além dos peptídeos antimicrobianos locais na barreira epitelial de *D. melanogaster* (LEMAITRE e HOFFMANN, 2007).

1.3.4 Peptídeos antimicrobianos

D. melanogaster consegue diferenciar entre as classes de microrganismos invasores, como bactérias e fungos, produzindo o peptídeo ideal para a destruição dos patógenos (HOFFMANN et al., 1999).

São conhecidos sete AMPs, drosomicina e metchnikowin com ação antifúngica, cecropina, dipterocina, drosocina e attacina com ação bacteriana Gram-negativa e a defensina com ação contra bactérias Gram-positivas (LEMAITRE et al., 1997).

A drosomicina é o principal peptídeo antifúngico controlado por *Spätzle*, polipeptídeo responsável por ativar a via *Toll*, sendo muito semelhante à cascata de ativação induzida por citocinas do fator nuclear kappa B (NF- κ B) durante a resposta inflamatória em mamíferos, estando esta antiga via, portanto, presente na defesa de insetos e mamíferos (HOFFMANN et al., 1999). Drosomicina é um peptídeo catiônico composto por 44 resíduos com quatro pontes de dissulfeto intramolecular. A morfologia normal dos fungos é alterada de acordo com as concentrações de drosomicina, pois altas concentrações inibem a germinação dos esporos e baixas concentrações atrasam o crescimento das hifas (ZHANG e ZHU, 2009).

1.3.5 Sinalização da resposta imune

D. melanogaster tem sido utilizada com sucesso para estudos de resposta imune do hospedeiro, de fatores de virulência de patógenos e de eficácia de compostos antimicrobianos frente a bactérias e fungos. Este díptero apresenta duas principais vias de sinalização da resposta imune para resistência microbiana, a via *Imd* e a via *Toll*. O gene da imunodeficiência (*Imd*) parece ser mais importante contra bactérias Gram-negativas, enquanto as vias *Imd* e *Toll* agem contra bactérias Gram positivas. Já os fungos são induzidos pelos componentes da via *Toll* (LEMAITRE et al., 1995; HOFFMANN e REICHHART, 2002).

A via *Imd* é controlada por genes com perfil de fase aguda e a via *Toll* se manifesta de maneira tardia e sustentada. A detecção microbiana nas duas vias

1.3.6 Modelos de infecção fúngica em *D. melanogaster*

Infecções fúngicas estão entre as causas mais comuns de morbidade e mortalidade, e o crescente número de pacientes imunocomprometidos e imunodeficientes, faz com que os casos de mortalidade cheguem a ultrapassar os 50% (LIONAKIS, 2011). As infecções fúngicas invasivas oportunistas apresentam uma alta frequência, espectro e custo, o que faz necessário um melhor entendimento da patogênese dessas infecções para que possam ser identificados novos alvos e estratégias terapêuticas (LIONAKIS, 2011; BOURGEOIS e KUCHLER, 2012).

A semelhança do sistema imune inato de humanos com o de *D. melanogaster*, demonstra a importância deste modelo para o estudo das interações entre o hospedeiro e o patógeno, pois a cada dia aumenta o número de pacientes acometidos por infecções fúngicas (APIDIANAKIS et al., 2004; LIONAKIS, 2011).

D. melanogaster é um modelo promissor e inovador na pesquisa, sendo utilizada em amplas aplicações, como no estudo de doenças infecciosas bacterianas e fúngicas, tais como as envolvendo *Aspergillus* (LIONAKIS et al., 2005), *Candida* spp. (CHAMILOS et al., 2006), *Pseudomonas aeruginosa* (LAU et al., 2003), *Cryptococcus neoformans* (APIDIANAKIS et al., 2004), *Staphylococcus aureus* (BEM-AMI et al., 2013), *Pythium insidiosum* (ZANETTE et al., 2013), *Mycobacterium abscessos* (OH et al., 2013), *Fusarium* spp. e *Scedosporium* (LAMARIS et al., 2007) e Mucorales (CHAMILOS et al., 2008), porém não foi utilizado em estudos com *Malassezia* spp. Além de estudos com doenças infecciosas, também vem sendo usado na avaliação da atividade de fármacos antifúngicos, em doenças não infecciosas como demência, acidente vascular cerebral (AVC), câncer e diabetes, por permitir a realização de testes de alto rendimento e genética direta e reversa em grande escala (LIONAKIS, 2011; PANDEY e NICHOLS, 2011).

1.3.7 Inoculação de *D. melanogaster*

A seleção do método de inoculação das moscas depende dos riscos no tratamento, de certos patógenos e de sua padronização, o que amplia o uso destes protocolos para um amplo espectro de patógenos microbianos (APIDIANAKIS e RAHME, 2009).

A inoculação pode ser realizada por diversos métodos como agulha torácica ou abdominal, injetor de bombeamento, ensaio de alimentação e rolamento (APIDIANAKIS e RAHME, 2009; LIONAKIS, 2011).

O método de agulha torácica ou abdominal é realizado através da inoculação de uma suspensão de microrganismos no epitélio cutâneo do tórax ou abdômen das moscas por meio de punção com uma agulha estéril. Este método permite uma administração local de microrganismos com uma resposta rápida local ou sistêmica (Figura 6) (APIDIANAKIS e RAHME, 2009).



Figura 6 - Inoculação sistêmica em *D. melanogaster* por punção torácica.

Fonte: Apidianakis e Rahme (2009).

Para o método de injetor de bombeamento é utilizado um injetor com um capilar de vidro para a inoculação dos microrganismos. Esta inoculação é sistêmica, pois permite a distribuição de microrganismos pelo corpo da mosca com uma inoculação precisa de doses de microrganismos (APIDIANAKIS e RAHME, 2009).

No método de ensaio de alimentação, a suspensão de conídios é colocada sobre o alimento que é incubado por 72 horas a 37 °C. Após este período, as moscas são colocadas em contato com o alimento contendo os conídios e ficam se alimentando por um período de 6 a 8 horas (APIDIANAKIS e RAHME, 2009; LIONAKIS e KONTOYIANNIS, 2010).

No método de rolamento as moscas anestesiadas são colocadas numa placa contendo ágar com uma camada de conídios onde são roladas sobre os mesmos durante 2 minutos até cobrir as moscas uniformemente (LIONAKIS e KONTOYIANNIS, 2010).

O tempo estimado para o início de ação dos microrganismos após a inoculação pelos métodos de agulha torácica ou abdominal, ou pelo método de injetor de bombeamento é de 3 a 6 horas após a inoculação e o teste de injeção torácica ou

abdominal nos permite quantificar os inóculos e estudar seus efeitos (APIDIANAKIS e RAHME, 2009).

As diferentes formas de infecção de *D. melanogaster* são utilizadas para análises comparativas entre a virulência dos microrganismos inoculados e a suscetibilidade da mosca aos microrganismos entre uma infecção aguda local e infecções sistêmicas (APIDIANAKIS e RAHME, 2009; LIONAKIS, 2011).

A resistência de *D. melanogaster* a infecções microbianas está relacionada com três mecanismos: fagocitose, cascatas proteolíticas envolvidas na coagulação sanguínea e síntese de peptídeos antimicrobianos (HOFFMANN et al., 1999).

A idade das moscas interfere na susceptibilidade da infecção e, portanto, é recomendado utilizá-las entre 2 a 4 dias de idade (LIONAKIS e KONTOYIANNIS, 2012). Outro ponto importante é utilizar somente moscas do mesmo sexo em cada experimento, sendo que as fêmeas tem a vantagem de serem maiores o que facilita a avaliação anatômica e uma resposta humoral melhor desenvolvida da infecção, enquanto o sexo masculino são moscas domésticas e com ausência de fertilização (APIDIANAKIS e RAHME, 2009; LIONAKIS e KONTOYIANNIS, 2012).

1.3.8 Administração de fármacos

A administração de fármacos em *D. melanogaster* é realizada, principalmente, adicionando fármacos com o alimento das moscas. Outras vias, como a exposição da mosca a produtos químicos vaporizados, a administração do fármaco através de injeção ou no pescoço de uma mosca decapitada são menos utilizadas (MANEV et al., 2003; PANDEY E NICHOLS, 2011).

A escolha da concentração ideal de um fármaco deve ser testada a partir de diferentes concentrações de um fármaco efetivo conhecido, diretamente no alimento das moscas. Para que ocorra a alimentação das moscas com a comida contendo o fármaco, são utilizados alguns métodos, como o método de jejum, onde a mosca fica por um período de 6 a 8 horas sem se alimentar e, ao ser colocada em contato com a comida contendo o fármaco, esta se alimenta com uma grande quantidade de alimento. O segundo método é deixar a mosca em contato com a comida contendo o fármaco por um período de 24 horas (LIONAKIS et al., 2005; PANDEY E NICHOLS, 2011).

A administração de fármacos à comida das moscas vem sendo realizada com sucesso. Lionakis et al. (2005), obtiveram redução gradativa entre a mortalidade de moscas *Toll*-deficientes infectadas com *Aspergillus* e as infectadas e tratadas com voriconazol e terbinafina, bem como a redução da carga fúngica das moscas infectadas. Chamilos et al. (2006) trataram moscas *Toll*-deficientes infectadas com *Candida albicans* e *C. krusei* com fluconazol e obtiveram resultados de proteção das moscas infectadas com *C. albicans*, enquanto as moscas infectadas com *C. krusei* foram resistentes ao tratamento. Chamilos e colaboradores (2008) estudaram o metabolismo do ferro entre o hospedeiro e Mucorales, sendo que a presença de ferro no metabolismo do hospedeiro é crucial para o desenvolvimento de desse grupo de fungos filamentosos, e verificaram que a administração de ferro aumenta a susceptibilidade da mosca *WT* aos fungos; a administração de deferoxamina, que forma complexos com ferro, produz uma infecção rápida e disseminada; e quando administrado deferasirox, um quelante de ferro, este melhora significativamente a sobrevivência das moscas *WT* frente aos patógenos.

Tanto em *D. melanogaster* quanto nos demais insetos os parâmetros farmacocinéticos são desafiadores e imprecisos, pois a absorção, a distribuição, o metabolismo, a excreção, a toxicidade e as interações entre os fármacos são muito difíceis de serem analisados e não são confiáveis, pois os insetos em geral são filogeneticamente mais distantes dos humanos (LIONAKIS, 2011).

O uso de *D. melanogaster* como modelo experimental ressalta a importância da utilização de modelos alternativos, bem como para o *screening* de novos fármacos antifúngicos, frente ao aumento de infecções fúngicas em animais e humanos e o potencial problema de resistência aos antifúngicos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estabelecer um modelo de infecção em moscas *D. melanogaster* frente a *M. pachydermatis* para estudos de virulência e de prospecção de fármacos antifúngicos.

2.2 Objetivos Específicos

Verificar a patogenicidade de *M. pachydermatis* em moscas *D. melanogaster* *wild-type* e *Toll*-deficientes;

Avaliar qual a concentração mais eficaz do inóculo de *M. pachydermatis* capaz de provocar maior mortalidade em moscas *D. melanogaster*;

Confirmar a infecção de *M. pachydermatis* em moscas *D. melanogaster* *wild-type* e *Toll*-deficientes através da análise da contagem de colônias fúngicas e histopatologia.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

***Drosophila melanogaster* como um modelo para o estudo da infecção de
*Malassezia pachydermatis***

Artigo submetido ao periódico *Veterinary Microbiology*

O comprovante de submissão do artigo encontra-se no anexo A.

***Drosophila melanogaster* as a model for the study of *Malassezia*
pachydermatis infections**

Simone Merkel^a, Daiane Heidrich^b, Chris Krebs Danilevicz^a, Maria Lúcia Scroferneker^b, Régis A. Zanette^{a,*}

^aPostgraduation Program in Biological Sciences: Pharmacology and Therapeutics, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

^bPostgraduation Program in Medicine: Medical Sciences, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

*Corresponding author at: Laboratory of Experimentation in *Drosophila* (Drosolab), Department of Pharmacology, ICBS/UFRGS, Rua Sarmiento Leite, 500, CEP 90150-070, Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail address: regnitro@yahoo.com.br

Abstract

Malassezia pachydermatis is a lipophilic but not lipid-dependent yeast commonly found in the skin of most animals. Changes in the physical, chemical or immunological processes of the skin may render the host more susceptible to the yeast, which then may cause otitis, dermatitis or, less often, systemic infection. We tested the pathogenicity of *M. pachydermatis* in *wild-type* (WT) and *Toll*-deficient *Drosophila melanogaster*. Flies were inoculated in the thorax with a needle previously dipped in inoculum concentrations ranging from 10^3 and 10^7 yeast cells/ml. After infection, flies were housed at 29 °C and mortality was evaluated daily until day seven. WT flies were resistant to the infection, whereas *Toll*-deficient flies showed inoculum density-dependent mortality rates. Fungal burden, assessed by histopathological analysis and by counting the number of colony-forming units of dead flies, corroborated the results. The *D. melanogaster* model is a promising minihost model for future large-scale studies of virulence mechanisms and antifungal drug activity in malasseziosis.

Keywords: malasseziosis; systemic infection; *Toll*-deficient fruit flies

1. Introduction

The genus *Malassezia* comprises 17 species of lipid-dependent yeast fungi, except by the species *M. pachydermatis*, which is lipophilic but not lipid-dependent. This species is part of the skin microbiota of most animals (Puig et al., 2017). Nonetheless, changes in the physical, chemical or immunological processes of the skin may favor the pathogenicity of the yeast, which then may cause otitis, dermatitis or, less often, systemic infection (Velegriaki et al., 2015). In humans, *M. pachydermatis* infections are of concern in preterm newborns or in individuals with immunodeficiency disorders (Chang et al., 1998; Velegriaki et al., 2015; Lona-Reyes et al., 2016; Roman

et al., 2016). In these patients, the systemic infection has been reported to occur by contamination of intensive care devices by health care workers' hands after being colonized from pet dogs (Chang et al., 1998).

Studies on the pathogenesis, virulence and treatment of *M. pachydermatis* are impaired by the lack of experimental *in vivo* models of the disease. Moreover, there has been an increasing concern on the rise of strains with decreased susceptibility or resistance to azole drugs (Jesus et al., 2011; Schlemmer et al., 2014), as well as an increasing number of therapeutic failures in animals (Cafarchia et al., 2012). To aid filling these gaps, minihost models with well-characterized genetics and simple immunity against pathogens have been effectively used with other microorganisms. In particular, the fruit fly *D. melanogaster* has been successfully used to study host-pathogen response and virulence factors of microorganisms. *D. melanogaster* can also be employed as a model for high-throughput screening of antimicrobial agents (Lionakis et al., 2005; Chamilos et al., 2006; Lamaris et al., 2007; Zanette et al., 2013). Therefore, the aim of this study was to evaluate the pathogenicity of *M. pachydermatis* in wild-type (*WT*) and *Toll*-deficient *D. melanogaster* flies.

2. Materials and methods

2.1. Fungal strain and inoculum preparation

A strain of *M. pachydermatis* isolated from a dog with otitis was used for the experiment (Jesus et al., 2011; Schlemmer et al., 2014). The strain was grown in Sabouraud dextrose agar (SDA) with 1% olive oil for seven days at 37 °C. Inoculum was prepared with phosphate buffered saline (PBS) plus 0.05% Tween 80 (pH 7.4). Yeasts were counted using a Neubauer chamber to reach the desired inoculum concentrations.

2.2. *D. melanogaster* stocks

We used Oregon-R flies as *WT* flies. *Toll*-deficient mutant flies were generated by crossing flies carrying a thermosensitive allele of *Toll* (*Tl*⁶³²) with flies carrying a null allele of *Toll* (*Tl*^{RXA}) (Lionakis et al., 2005; Lemaitre and Hoffmann, 2007). All strains were a gift from Dr. Dimitrios Kontoyiannis from University of Texas MD Anderson Cancer Center. Flies were kept in standard *Drosophila* vials with food containing 1% agar, 1% baker's yeast, 2% sugar, 1% powdered milk and 0.1% methylparaben diluted in distilled water.

2.3. Establishment of a reproducible model of systemic *M. pachydermatis* infection in *D. melanogaster*

Two to four day-old *WT* and *Toll*-deficient flies were punctured in the dorsal side of the thorax with a thin sterile needle that had been dipped in different inoculum solutions of *M. pachydermatis* (range, 1×10^3 to 1×10^7 colony forming units (CFU)/mL), using a procedure described elsewhere (Chamilos et al., 2006). Flies that died within 3 h of the injection were not included in the survival analysis. Control flies were inoculated with PBS. Thereafter, flies were housed at 29 °C, temperature at which *Toll* susceptibility to microbial challenge is maximal. Survival was assessed daily until day 7 after infection. Each group consisted of approximately 30 flies, and the experiment was repeated on three different days.

2.4. Fungal burden

Groups of five flies inoculated with the highest inoculum concentration tested (1×10^7 CFU/mL) that died throughout the experiment were collected at day 7, placed in

plastic tubes and ground in 1 mL of sterile saline. Serial dilutions (10 μ l) were plated onto SDA agar plates containing chloramphenicol and the number of CFU was counted after 72 h of incubation at 30 °C.

2.5. Histopathological analysis

On day 7 of experiment, dead flies were collected and fixed with 10% formaldehyde, processed and embedded in paraffin wax. Tissue sections were stained with hematoxylin-eosin (H&E) and Grocott-Gomori methenamine-silver nitrate (GMS), and representative sections were examined for visible fungal burden by light microscopy.

2.6. Statistical analysis

Survival curves were plotted using the Kaplan-Meier analysis, and differences in survival were assessed using the logrank test. Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism software program (version 6.01). P values less than 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

WT D. melanogaster flies were resistant to the infection. The analysis of survival curves showed that none of the inoculum concentrations differed from the control group ($P = 0.34$), with mortality rates reaching a maximum of 25% at the inoculum concentration of 1×10^7 (Fig. 1A). Contradictory, survival curves of *Toll*-deficient flies infected with inoculum concentrations containing 1×10^4 , 1×10^6 and 1×10^7 CFU/mL significantly differed from the control group (Fig. 1B). Mortality rates of *Toll*-deficient flies inoculated with the highest inoculum concentration reached approximately 70%.

Estimated total fungal burden counts of this group at day 7 of infection ranged from 2.3×10^3 to 1.3×10^4 CFU/fly, whereas *WT* flies inoculated with 1×10^7 CFU/mL had fungal burdens ranging from 0.33 to 1×10^2 . Nonetheless, histopathological analysis using GMS staining failed to reveal *in vivo* propagation of the pathogen in *WT* flies (Fig 1A), whereas yeast cells were observed in histological sections of *Toll*-deficient flies (Fig. 2B).

4. Discussion

We have developed a reproducible model of acute systemic malasseziosis induced through injection of *M. pachydermatis* yeast cells in the hemolymph of *Toll*-deficient flies. As far as we know, there is only one report of successfully experimentally reproduced malasseziosis, using the nematode *Caenorhabditis elegans* (Brilhante et al., 2018). In our study, *WT* flies were resistant to the infection, whereas *Toll*-deficient flies showed inoculum-dependent survival curves. *D. melanogaster* defense against fungal pathogens is mediated by the induction of the evolutionarily conserved *Toll* pathway (Lemaitre and Hoffmann, 2007). Hence, upon challenge by fungi, *Toll*-pathway activation leads to rapid and selective induction of antifungal peptides into the fly hemolymph. Therefore, *Toll*-deficient flies quickly succumb not only to pathogenic but also to opportunistic fungal species.

The pivotal role played by immunity in *M. pachydermatis* pathogenicity has been widely recognized. *M. pachydermatis* is a commensal organism found in the skin of animals, mainly dogs. Under certain circumstances, such as the presence of parasites or other diseases that affect immunity, *M. pachydermatis* becomes pathogenic, being a common cause of ear and skin infection in dogs (Chen and Hill, 2005; Velegraki et al., 2015). The response triggered by this fungal species in the host includes cell-

mediated, humoral and mast cell immune responses (Chen and Hill, 2005). This is in line with the results of our study, given the high degree of molecular and mechanistic conservation between the *D. melanogaster* and mammal's innate immune systems (Lemaitre and Hoffmann, 2007).

Malassezia organisms may be demonstrated by microscopic examination of skin biopsy specimens. Yeasts are typically located in the stratum corneum and are occasionally seen in the follicular infundibulum (Chen and Hill, 2005). Nonetheless, positive blood and urine cultures have been reported in infants with intravascular catheters. One of these patients also showed a positive cerebrospinal fluid culture and a negative Gram's stain, showing the superiority of fungal culture in relation to histology. In our study, yeast cells were not observed in GMS staining of *WT* flies, which also showed decreased fungal burden in relation to *Toll*-deficient flies. Other authors have also demonstrated the robustness of the *Drosophila* model for evaluating opportunistic pathogens. Survival curves of *WT* flies statistically differed from *Toll*-deficient flies when they were infected with *Candida albicans* (Chamilos et al., 2006), *Fusarium moniliforme*, *Scedosporium* spp. (Lamaris et al., 2007), *Aspergillus fumigatus* (Lionakis et al., 2005) and *Pythium insidiosum* (Zanette et al., 2013), corroborating the results of our study.

Previous attempts have failed to induce malasseziosis in healthy dogs, whose skin is relatively resistant to the inoculation of *M. pachydermatis* yeasts due to local delayed hypersensitivity responses and, or innate epidermal immune mechanisms (Bond et al., 2004). Our results showed that *Toll*-deficient flies are susceptible to *M. pachydermatis* infection, highlighting the importance of the innate immunity against this yeast pathogen. Therefore, *D. melanogaster* flies can be a reliable model for large-

scale studies of pathogenesis, virulence mechanisms and antifungal drug activity in malasseziosis.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

Funding

This study was supported in part by the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq-Brazil). S. M. thanks Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the fellowship.

References

- Bond, R., Patterson-Kane, J.C., Lloyd, D.H., 2004. Clinical, histopathological and immunological effects of exposure of canine skin to *Malassezia pachydermatis*. *Med. Mycol.* 42, 165-175.
- Brilhante, R.S.N., Rocha, M.G.D., Guedes, G.M.M., Oliveira, J.S., Araújo, G.D.S., España, J.D.A., Sales, J.A., Aguiar, L., Paiva, M.A.N., Cordeiro, R.A., Pereira-Neto, W.A., Pinheiro, A.Q., Sidrim, J.J.C., Castelo-Branco, D.S.C.M., Rocha, M.F.G., 2018. *Malassezia pachydermatis* from animals: Planktonic and biofilm antifungal susceptibility and its virulence arsenal. *Vet. Microbiol.* 220, 47-52.
- Cafarchia, C., Figueredo, L.A., Iatta, R., Montagna, M.T., Otranto, D., 2012. *In vitro* antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* from dogs with and without skin lesions. *Vet. Microbiol.* 155, 395-398.
- Chamilos, G., Lionakis, M.S., Lewis, R.E., Lopez-Ribot, J.L., Saville, S.P., Albert, N.D., Halder, G., Kontoyiannis, D.P., 2006. *Drosophila melanogaster* as a facile model

for large-scale studies of virulence mechanisms and antifungal drug efficacy in *Candida* species. *J. Infect. Dis.* 193, 1014-1022.

Chang, H.J., Miller, H.L., Watkins, N., Arduino, M.J., Ashford D.A., Midgley, G., Agüero, S.M., Pinto-Powell, R., von Reyn, C.F., Edwards, W., McNeil, M.M., Jarvis, W.R., 1998. An epidemic of *Malassezia pachydermatis* in an intensive care nursery associated with colonization of health care workers' pet dogs. *N. Engl. J. Med.* 338, 706-711.

Chen, T.A., Hill, P.B., 2005. The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. *Vet. Dermatol.* 16, 4-26.

Jesus, F.P.K, Lautert, C., Zanette, R.A., Mahl, D.L., Azevedo, M.I., Machado, M.L.S., Dutra, V., Botton, S.A., Alves, S.H., Santurio, J.M., 2011. *In vitro* susceptibility of fluconazole-susceptible and -resistant isolates of *Malassezia pachydermatis* against azoles. *Vet. Microbiol.* 152, 161-164.

Lamaris, G.A., Chamilos, G., Lewis, R.E., Kontoyiannis, D.P., 2007. Virulence studies of *Scedosporium* and *Fusarium* species in *Drosophila melanogaster*. *J. Infect. Dis.* 196, 1860-1864.

Lionakis, M.S., Lewis, R.E., May, G.S., Wiederhold, N.P., Albert, N.D., Halder, G., Kontoyiannis, D.P., 2005. *Toll*-deficient *Drosophila* flies as a fast, high-throughput model for the study of antifungal drug efficacy against invasive aspergillosis and *Aspergillus* virulence. *J. Infect. Dis.* 191, 1188-1195.

Lemaitre, B., Hoffmann, J., 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 697-743.

Lona-Reyes, J.C., López-Barragán, B., de la Rosa, A.J.C., Pérez-Molina, J.J., Ascencio-Esparza, E.P., 2016. Bacteriemia relacionada con catéter venoso

central: incidencia y factores de riesgo en un hospital del occidente de México.

Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 73, 105-110.

Puig, L., Bragulat, M.R., Castellá, G., Cabañes, F.J., 2017. Characterization of the species *Malassezia pachydermatis* and re-evaluation of its lipid dependence using a synthetic agar medium. PLoS One. 12, 1-12.

Roman, J., Bagla, P., Ren, P., Blanton, L.S., Berman, M.A., 2016. *Malassezia pachydermatis* fungemia in an adult with multibacillary leprosy. Med. Mycol. Case Rep. 12, 1-3.

Schlemmer, K.B., Jesus, F.P.K., Zanette, R.A., Lautert, C., Alves, S.H., Santurio, J.M., 2014. Sequential exposure of *Malassezia pachydermatis* to azoles: Enhanced or decreased activity? Vet. Microbiol. 171, 255-256.

Veleglaki, A., Cafarchia, C., Gaitanis, G., Iatta, R., Boekhout, T., 2015. *Malassezia* infections in humans and animals: pathophysiology, detection, and treatment. PLoS Pathog. 11, e1004523.

Zanette, R.A., Santurio, J.M., Loreto, É.S., Alves, S.H., Kontoyiannis, D.P., 2013. Toll-deficient *Drosophila* is susceptible to *Pythium insidiosum* infection. Microbiol. Immunol. 57: 732-735.

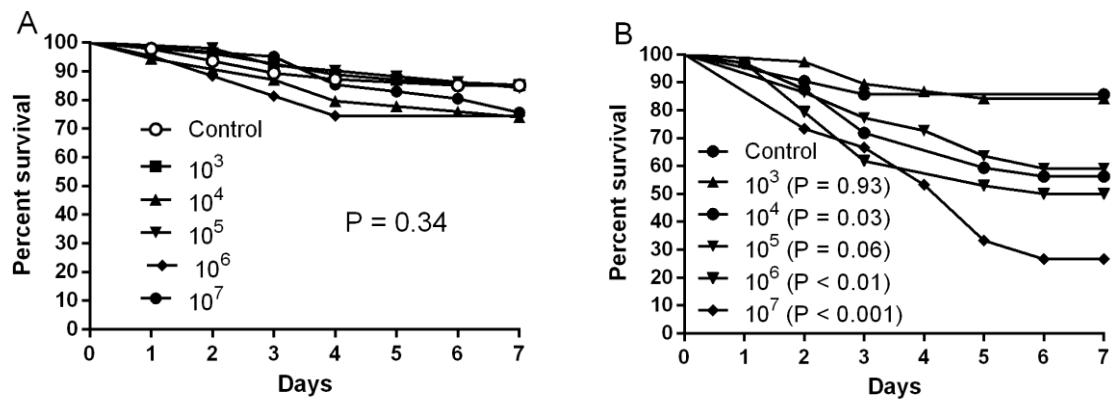


Fig. 1. Survival curves of *WT* (A) and *Toll*-deficient flies (B) infected with different *M. pachydermatis* inoculum concentrations. Curves were compared to flies inoculated with sterile PBS (control). Data shown are the means of three independent experiments ($n= 30$ flies/group).

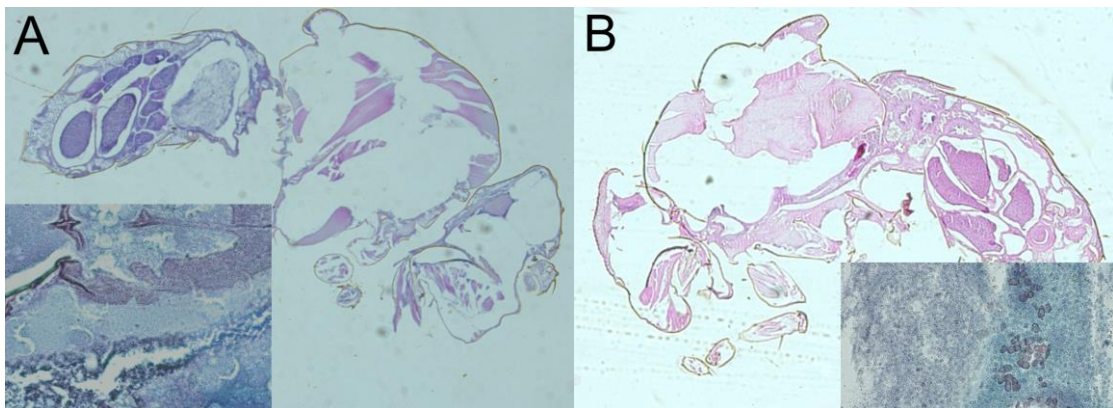


Fig. 2. Histological examination of *D. melanogaster* flies. GMS staining of *WT* flies did not reveal microorganisms (A), whereas GMS staining of *Toll*-deficient flies revealed the presence of *M. pachydermatis* yeasts [H&E (original magnification x100)-insert GMS (original magnification x1000)].

4 DISCUSSÃO

M. pachydermatis é uma levedura presente principalmente na microbiota da pele de cães e gatos, onde se torna patogênica a partir de alterações da imunidade como pH, umidade e temperatura, levando ao desenvolvimento de dermatite, otite externa e infecção sistêmica em animais e ocasionalmente em humanos.

A patogenicidade de *M. pachydermatis* em moscas *D. melanogaster* *WT* e *Toll*-deficientes foi testada a partir da inoculação sistêmica de leveduras por meio de punção com agulha no tórax das moscas. Resultados demonstram que moscas *D. melanogaster* *WT* são resistentes à infecção por *M. pachydermatis*, pois a presença do sistema imune às defende contra a infecção por patógenos fúngicos, enquanto que moscas *Toll*-deficientes foram susceptíveis à infecção por não possuírem o sistema imune responsável por montar a defesa contra os patógenos. A sinalização *Toll* em *D. melanogaster* é a responsável por ativar os peptídeos antimicrobianos que agem na sua defesa e, portanto, na falta desta via a defesa de *D. melanogaster* contra os patógenos não é acionada (LEMAITRE e HOFFMANN, 2007).

A suscetibilidade de moscas *D. melanogaster* *Toll*-deficientes a *M. pachydermatis* é semelhante ao que acontece em pacientes imunossuprimidos ou imunocomprometidos, que desenvolvem infecção sistêmica pelo uso de CVC. A presença das leveduras no ambiente hospitalar pode ser decorrente das mãos da equipe de saúde, familiares e cuidadores, as quais podem ser colonizadas por leveduras provindas de seus animais domésticos, principalmente o cão (CHANG et al., 1998; ROMAN et al., 2016).

Cortes histológicos corados com Grocott-Gomori confirmam a presença da infecção por *M. pachydermatis* nas moscas *D. melanogaster* *Toll*-deficientes. Os resultados da virulência de fungos em moscas *D. melanogaster* *WT* e *Toll*-deficientes foram semelhantes aos obtidos por outros autores, que testaram a virulência de *Aspergillus* (Lionakis et al. 2005), espécies de *Candida* (Chamilos et al. 2006), Mucorales (Chamilos et al. 2008), *Fusarium* spp. e *Scedosporium* (Lamaris et al. 2007) e *P. insidiosum* (Zanette et al. 2013).

Existe apenas um relato de modelo experimental na literatura reproduzindo malasseziose, na qual se utilizou o nematódeo *Caenorhabditis elegans*, onde os autores encontraram altas taxas de mortalidade de *C. elegans* 96 horas após a

infecção com *M. pachydermatis*, o que deixa claro o potencial patogênico da levedura nas larvas deixando a sua importância clínica como patógeno (BRILHANTE et al., 2018).

Uma segunda tentativa de infecção por malasseziose foi testada em cães da raça beagle saudáveis, com aplicação diária e repetida de *M. pachydermatis*, mas sem êxito. Nestes cães, a pele é relativamente resistente à inoculação de leveduras, o que ocorre pela presença de respostas de hipersensibilidade local tardias e/ou mecanismos imunológicos epidérmicos. Tanto cães saudáveis como cães afetados por *M. pachydermatis*, produzem anticorpos, mas em cães infectados por *M. pachydermatis* os anticorpos IgG e os anticorpos IgE encontram-se elevados no soro demonstrando a presença de reatividade com a levedura (BOND et al., 2004).

Algumas limitações devem ser observadas quanto ao uso de *D. melanogaster*, como o tamanho da mosca, sexo, idade, estudos farmacodinâmicos e farmacocinéticos. (APIDIANAKIS e RAHME, 2009; LIONAKIS e KONTOYIANNIS, 2012), bem como a diferença na temperatura corporal entre moscas, à 29 °C e, a temperatura corporal dos mamíferos, que é de aproximadamente 37 °C, o que pode alterar a expressão de alguns fatores de virulência das leveduras (LIONAKIS et al., 2005; CHAMILOS et al., 2006).

Moscas *D. melanogaster* vêm sendo amplamente utilizadas para estudos de patogenicidade de fungos oportunistas, pois apresentam um sistema imune inato semelhante ao dos humanos. Além disso, esse modelo possui um curto ciclo de vida, entre 8 e 12 dias, para obtenção de uma nova mosca adulta, o que faz com que seja um modelo rápido para obtenção de resultados, de baixo custo, fácil de usar, disponibiliza grandes quantidades de moscas para utilização nos experimentos e não apresenta restrições éticas na sua utilização.

5 CONCLUSÃO

A inoculação de *M. pachydermatis* em moscas *D. melanogaster Toll*-deficientes demonstrou resultados promissores, de acordo com as baixas porcentagens de sobrevivência obtidas durante os sete dias de observação, enquanto que as moscas *WT* foram resistentes à infecção. A falta do sistema imune em moscas *Toll*-deficientes deixa as mesmas suscetíveis à infecção, pois não conseguem desenvolver uma resposta imune para se defender de patógenos oportunistas, como a levedura *M. pachydermatis*.

Portanto, moscas *D. melanogaster Toll*-deficientes têm potencial para ser um bom modelo para estudo da virulência de *M. pachydermatis*, bem como na busca por novos fármacos para o tratamento.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Testar diferentes classes de antifúngicos, como azóis e triazóis, que são amplamente utilizados na terapia da malasseziose, em moscas *D. melanogaster* infectadas com *M. pachydermatis*;

Combinar antifúngicos a fim de obter melhores resultados terapêuticos do que com a utilização de fármacos sozinhos;

Correlacionar a atividade antifúngica dos fármacos *in vitro* e em moscas infectadas com *M. pachydermatis*;

Identificar novas estratégias terapêuticas.

7 REFERÊNCIAS

AL-SWEIH, N., et al. *Malassezia pachydermatis* fungemia in a preterm neonate resistant to fluconazole and flucytosine. **Medical Mycology Case Reports**. v. 5, p. 9-11, 2014.

APIDIANAKIS, Y., et al. Challenge of *Drosophila melanogaster* with *Cryptococcus neoformans* and role of the innate immune response. **Eukaryotic Cell**. v. 3, n. 2, p. 413-419, 2004.

APIDIANAKIS, Y.; RAHME, L. G. *Drosophila melanogaster* as a model host for studying *Pseudomonas aeruginosa* infection. **Nature Protocols**. v. 4, n. 9, p. 1285-1294, 2009.

ARVANITIS, M.; GLAVIS-BLOOM, J.; MYLONAKIS, E. Invertebrate models of fungal infection. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1832, n. 9, p. 1378-1383, 2013.

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

BATRA, R., et al. *Malassezia* Baillon, emerging clinical yeasts. **Federation of European Microbiological Societies**. v. 5, p. 1101-1113, 2005.

BEM-AMI, R., et al. *Drosophila melanogaster* as a model to explore the effects of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain type on virulence and response to linezolid treatment. **Microbial Pathogenesis**. v. 55, p. 16-20, 2013.

BOND, R.; PATTERSON-KANE, J.C.; LLOYD, D.H. Clinical, histopathological and immunological effects of exposure of canine skin to *Malassezia pachydermatis*. **Medical Mycology**. v. 42, p. 165-175, 2004.

BOURGEOIS, C.; KUCHLER, K. Fungal pathogens – a sweet and sour treat for *toll*-like receptors. **Cellular and infection microbiology**. v. 2, n. 142, p. 1-11, 2012.

BRAND, A. Hyphal growth in human fungal pathogens and its role in virulence. **International Journal of Microbiology**. p. 1-11, 2012.

BRILHANTE, R.S.N., et al. *Malassezia pachydermatis* from animals: Planktonic and biofilm antifungal susceptibility and its virulence arsenal. **Veterinary Microbiology**. v. 220; p. 47-52, 2018.

BUOMMINO, E., et al. Innate immune response in human keratinocytes infected by a feline isolate of *Malassezia pachydermatis*. **Veterinary Microbiology**. v. 163, p. 90-96, 2013.

CABAÑES, F.J. *Malassezia* yeasts how many species infect humans and animals? **PLOS Pathogens**. v. 10, n. 2, p. 1-4, 2014.

CABAÑES, F.J. N, et al. New lipid-dependent *Malassezia* species from parrots. **Revista Iberoamericana de Micología**. v. 33, n. 2, p. 92-99, 2016.

CAFARCHIA, C., et al. *In vitro* antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* from dogs with and without skin lesions. **Veterinary Microbiology**. v. 155, n. 2-4, p. 395-398, 2012.

CAFARCHIA, C., et al. *In vitro* evaluation of *Malassezia pachydermatis* susceptibility to azole compounds using E-test and CLSI microdilution methods. **Medical Mycology**. v. 50, n. 8, p. 795-801, 2012b.

CARRILHO-MUNOZ, A.J., et al. *In vitro* antifungal activity of topical and systemic antifungal drugs against *Malassezia* species. **Mycoses**. v. 56, n. 5, p. 571-575, 2013.

CASTELLÁ, G., et al. Phylogenetic relationships of *Malassezia* species based on multilocus sequence analysis. **Medical Microbiology**. v. 52, p. 99-105, 2014.

CHAMILOS, G. et al. *Drosophila melanogaster* as a facile model for large-scale studies of virulence mechanisms and antifungal drug efficacy in *Candida* species. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 193, n. 7, p. 1014-1022, 2006.

CHAMILOS, G., et al. *Drosophila melanogaster* as a model host to dissect the immune pathogenesis of zygomycosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 105, n. 27, p. 9367-72, 2008.

CHANG, H. J., et al. An epidemic of *Malassezia pachydermatis* in an intensive care nursery associated with colonization of health care workers' pet dogs. **The New England Journal of Medicine**. v. 338, n. 11, p. 706-711, 1998.

CHAVES, F., et al. Executive summary: Diagnosis and treatment of catheter-related bloodstream infection: Clinical guidelines of Spanish Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (SEIMC) and the Spanish Society of Intensive Care Medicine and coronary Units (SEMICYUC). **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**. v. 36, n. 2, p. 112-119, 2018.

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

CHRYSSANTHOU, E.; BROBERGER, U.; PETRINI, B. *Malassezia pachydermatis* fungaemia in a neonatal intensive care unit. **Acta Paediatrica**. v. 90, n. 3, p. 323-327, 2001.

CHYB, S.; GOMPEL, N. **Atlas of *Drosophila* Morphology: Wild-type and classical mutants**. Oxford, UK: Academic Press, 2013.

DAS NEVES JUNIOR, M. A., et al. Infecções em cateteres venosos centrais de longa permanência: revisão da literatura. **Jornal Vascular Brasileiro**. v. 9, n. 1, p. 46-50, 2010.

FIGUEREDO, L. A.; CAFARCHIA, C.; OTRANTO, D. Antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* biofilm. **Medical Mycology**. v. 51, n. 8, p. 863-867, 2013.

FRANZ, A.; WOOD, W.; MARTIN, P. Fat body cells are motile and actively migrate to wounds to drive repair and prevent infection. **Developmental Cell**. v. 44, p. 460-470, 2018.

GAITANIS, G., et al. The *Malassezia* genus in skin and systemic diseases. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 25, n. 1, p. 106-141, 2012.

GIRÃO, M.D., et al. 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.

GLITTENBERG, M.T., et al. Wild-type *Drosophila melanogaster* as alternative model system for investigating the pathogenicity of *Candida albicans*. **Disease Models & Mechanisms**. v. 4, p. 504-514, 2011.

HOFFMANN, J.A., et al. Phylogenetic perspectives in innate immunity. **Science**. v. 284, n. 5418, p. 1313-1318, 1999.

HOFFMANN, J.A.; REICHHART, J-M. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. **Nature Immunology**. v. 3, n. 2, p. 121-126, 2002.

HONNAVAR. P., et al. *Malassezia arunalokei* sp. Nov., a novel yeast species isolated from seborrheic dermatitis patients and healthy individuals from India. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 54, n. 7, p. 1826-1834, 2016.

IATTA, R., et al. The role of drug efflux pumps in *Malassezia pachydermatis* and *Malassezia furfur* defense against azoles. *Mycoses*. v. 60, n. 3, p. 178-182, 2017.

ILAHI, A., e al. Molecular epidemiology of a *Malassezia pachydermatis* neonatal unit outbreak. **Medical Mycology**. v. 00, n. 00, p. 1-9, 2017.

JERZSELE, A., et al. Biofilm formation in *Malassezia pachydermatis* strains isolated from dogs decreases susceptibility to ketoconazole and itraconazole. **Acta Veterinaria Hungarica**. v. 62, n. 4, p. 473-480, 2014.

JESUS, F.P.K., et al. *In vitro* susceptibility of fluconazole-susceptible and-resistant isolates of *Malassezia pachydermatis* against azoles. **Veterinary Microbiology**. v. 152, n. 1-2, p. 161-164, 2011.

KOLECKA, A., et al. Efficient identification of *Malassezia* yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization-time off light mass spectrometry (MALDI-TOF MS). **British Journal of Dermatology**. v. 170, n. 2, p. 332-341, 2014.

LACAZ, C. S., et al. **Tratado de Micologia Médica**. São Paulo: SARVIER, 2002.

LAMARIS, G. A., et al. Virulence studies of *Scedosporium* and *Fusarium* species in *Drosophila melanogaster*. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 196, n. 12, p. 1860-1864, 2007.

LAU, G. W.; GOUMNEROV, B. C.; WALENDZIEWICZ, C. L. et al. The *Drosophila melanogaster* Toll pathway participates in resistance to infection by the Gram-negative human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and Immunity**. v 71, n. 7, p. 4059-4066, 2003.

LAUTERT, C., et al. Enzymatic characterization of *Malassezia pachydermatis* isolates from dogs. **African Journal of Microbiology Research**. v. 5, n. 21, p. 3532-3536, 2011.

LEMAITRE, B., et al. A recessive mutation, immune deficiency (*Imd*), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. **Genetics**. v. 92, p. 9465-9469, 1995.

LEMAITRE, B.; REICHHART, J.; HOFFMANN, J. *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 94, n. 26, p. 14614-14619, 1997.

LEMAITRE, B.; HOFFMANN, J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. **Annual Review of Immunology**. v. 25, p. 697-743, 2007.

LIONAKIS, M. S., et al. *Toll*-deficient *Drosophila* flies as a fast, high-through put model for the study of antifungal drug efficacy against invasive aspergillosis and *Aspergillus* Virulence. **The Journal of Infectious Diseases**. v, 191, n. 7, p. 1188-1195, 2005.

LIONAKIS, M. S.; KONTOYIANNIS, D. P. The growing promise of *Toll*-deficient *Drosophila melanogaster* as a model for studying *Aspergillus* pathogenesis and treatment. **Virulence**. v. 1, n. 6, p. 488-499, 2010.

LIONAKIS, M. S. *Drosophila* and *Galleria* insect model hosts: New tools for the study of fungal virulence, pharmacology and immunology.. **Virulence**. v. 2, n. 6, p. 521-527, 2011.

LIONAKIS, M. S.; KONTOYIANNIS, D. P. *Drosophila melanogaster* as a model organism for invasive Aspergillosis. In: BRAND, A. C.; MACCALLUM, D. M. (Ed.). Host-fungus interactions: Methods and protocols, methods in molecular biology. New York: **Humana press**. v 845, cap. 32, p. 455-468, 2012.

LONA-REYES, J. C., et al. Bacteriemia relacionada con catéter venoso central: incidencia y factores de riesgo en um hospital del occidente de México. **Boletín Médico del Hospital Infantil de México**. v. 73, n, 2, p. 105-110, 2016.

MANEV, H.; DIMITRIJEVIC, N.; DZITOYEVA, S. Techniques: Fruit flies as models for neuropharmacological research. Elsevier Science Ltd. **TRENDS in Pharmacological Science**. v.24, n. 1, p. 41-43, 2003.

MARASCHIN, M. M., et al. Infecções causadas por *Malassezia*: novas abordagens. **Saúde, Santa Maria**. v. 34, n. 1-2, p. 4-8, 2008.

MASON, C.L., et al. Study to assess in vitro antimicrobial activity of nine ear cleaners against 50 *Malassezia pachydermatis* isolates. **Veterinary Dermatology**. v. 24, p. 362-381, 2013.

MEZZARI, A.; FUENTEFRIA, A. M. Micologia no laboratório clínico. 1. ed. Barueri, SP: Manole; 2012.

NEGRE, A.; BENSIGNORT, E.; GUILLOT, J. Evidence-based veterinary dermatology: a systematic review of interventions for *Malassezia dermatitis* in dogs. **Veterinary Dermatology**. v. 20, n. 1, p. 1-12, 2009.

OH, C-T., et al. *Drosophila melanogaster* model of *Mycobacterium abscessus* infection. **Microbes and Infection**. v. 15, p. 788-795, 2013.

PANDEY, U.B.; NICHOLS, C.D. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. **Pharmacological Reviews**. v. 63, n. 411, p. 411-436, 2011.

PARRA-FLORES, M., et al. Incidencia de infección asociada a catéter venoso central y factores de riesgo relacionados en pacientes con nutrición parenteral total em um hospital de tercer nivel. **Cirugía y Cirujanos**. v. 85, n. 2, p. 104-108, 2017.

PARSONS, B.; FOLEY, E. Cellular immune defenses of *Drosophila melanogaster*. **Developmental and Comparative Immunology**. v 58, p. 95-101, 2016.

PEANO, A., et al. Methodological issues and antifungal susceptibility testing of *Malassezia pachydermatis*. **Journal of Fungi**. v. 3, n. 3, p. 1-15, 2017.

PUIG, L., et al. Characterization of the species *Malassezia pachydermatis* and re-evaluation of its lipid dependence using a synthetic agar medium. **PLOS One**. v. 12, p. 1-12, 2017.

ROMAN, J., et al. *Malassezia pachydermatis* fungemia in an adult with multibacillary leprosy. **Medical Mycology Case Reports**. v. 12, p. 1-3, 2016.

SANTIN, R., et al. Atividade antifúngica de óleo essencial de *Origanum vulgare* frente a *Malassezia pachydermatis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 66, n. 2, p. 367-373, 2014.

SARDI, J. C. O., et al. Highlights in pathogenic fungal biofilms. **Revista Iberoamericana de Micologia**. v. 31, n. 1, p. 22-29, 2014.

SCHLEMMER, K. B., et al. Sequential exposure of *Malassezia pachydermatis* to azoles: Enhanced or decreased activity? **Veterinary Microbiology**. v. 171, p. 255-256, 2014.

SCHLOTTFELDT, F. S., et al. 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.

VELEGRAKI, A., et al. *Malassezia* infections in humans and animals: pathophysiology, detection, and treatment. **PLOS Pathogens**. v. 11, n. 1, p. 1-6, 2015.

WEILER, C.B., et al. Susceptibility variation of *Malassezia pachydermatis* to antifungal agents according to isolate source. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 44, n. 1, p. 174-178, 2013.

YAMAMOTO, M., et al. Utilization of matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry for identification of infantile seborrheic dermatitis-causing *Malassezia* microbiota of 1-month-old infants. **The Journal of Dermatology**. v. 41, p. 117-123, 2014.

ZANETTE, R. A., et al. *Toll*-deficient *Drosophila* is susceptible to *Pythium insidiosum* infection. **Microbiology and Immunology**. v. 57, p. 732-735, 2013.

ZHANG, Z.; ZHU, S. Drosomycin, an essential component of antifungal defence in *Drosophila*. **Insect Molecular Biology**. v. 18, n. 5, p. 549-556, 2009.

8 ANEXOS

Anexo A - Comprovante de submissão do artigo

ELSEVIER

Simone Merkel  [Sign out](#) [Help](#)

My Co-authored Submissions

[< Overview](#)



Veterinary Microbiology


Short Communication | VETMIC_2018_691

Drosophila melanogaster as a model for the study of *Malassezia pachydermatis* infections

Regis Zanette, Chris Krebs Danilevicz, Daiane Heidrich, Maria Lúcia Scroferneker, Simone Merkel
Submitted 22 Jun 2018

With Editor 23 Jun 2018 

[View PDF >](#)

 Alert: keep me informed about the submission status for this manuscript