GIOVANA LETICIA HERNANDEZ ARRIAGADA

COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS OBTIDOS COM
TÉCNICAS MICROMORFOLÓGICAS E MOLECULARES
NA PESQUISA E IDENTIFICAÇÃO DE *MALASSEZIA* SPP.
EM ESCAMAS OBTIDAS DE INDIVÍDUOS
APARENTEMENTE SADIOS E PACIENTES
COM DIFERENTES DERMATOSES

Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo, para obtenção do título
de Doutor em Ciências (Microbiologia).

São Paulo
2008

GIOVANA LETICIA HERNANDEZ ARRIAGADA

COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS OBTIDOS COM
TÉCNICAS MICROMORFOLÓGICAS E MOLECULARES
NA PESQUISA E IDENTIFICAÇÃO DE *MALASSEZIA* SPP.
EM ESCAMAS OBTIDAS DE INDIVÍDUOS
APARENTEMENTE SADIOS E PACIENTES
COM DIFERENTES DERMATOSES

Tese (Doutorado) apresentada ao
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
Obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração:
Microbiologia

Orientador:
Profa. Dra. Clarisse Zaitz

São Paulo
2008

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Hernandez Arriagada, Giovana Letícia.

Comparação entre resultados obtidos com técnicas micromorfológicas e moleculares na pesquisa e identificação de *Malassezia* spp. Em escamas obtidas de indivíduos aparentemente saudáveis e pacientes com diferentes dermatoses / Giovana Letícia Hernández Arriagada. -- São Paulo, 2008.

Orientador: Clarisse Zaitz.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Micologia.

Versão do título para o inglês: Comparison between results gotten with micromorphologic and molecular techniques in the research and identification of *Malassezia* spp. In gotten scales of healthy and apparently patient individuals with different dermatosis.

Descritores: 1. Genotipagem de *Malassezia* 2. Métodos moleculares 3. Espécies de *Malassezia* 4. Leveduras lipofílicas 5. Micoses superficiais 6. Método de PCR e RFLP I. Zaitz, Clarisse II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB183/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Giovana Letícia Hernandez Arriagada.

Título da Tese: Comparação entre resultados obtidos com técnicas micromorfológicas e moleculares na pesquisa e identificação de *malassezia* spp. Em escamas obtidas de indivíduos aparentemente saudáveis e pacientes com diferentes dermatoses.

Orientador(a): Clarice Zaitz.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2416 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefons : (55) (11) 38130900 - telefax : (55) (11) 3818-7438
e-mail: icbseidir@icb.usp.br

São Paulo, 05 de fevereiro de 2004

PARECER 546/CEP

Prezada Senhora,

Atendendo sua solicitação, a Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB, em sua quadragésima segunda reunião, realizada no dia 04 de fevereiro p.p. analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "Comparação das técnicas moleculares de Pulsed-Field gel Electrophoresis e PCR na pesquisa e identificação de *Malassezia spp* em pacientes com Dermatite Seborreica, Pitíriase versicolor e pele normal". Informo que, após análise do projeto, esta comissão resolveu **acatar o parecer favorável da Comissão de Ética e Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical.**

Esclareço a V.Sa. que dentro de 12 meses, relatório do referido projeto deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo

Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

Ilma. Sra.
GIOVANNA LETÍCIA HERNÁNDEZ ARRIAGADA
Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biomédicas da USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470

CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil

Telefone: (55-11) 3066-7066 e 3064-5132 FAX: (55-11) 3064-5132 e 3062-2174

São Paulo, 13 de novembro de 2003.

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Clarisse Zaitz

Prezada Senhora:

Em reunião realizada na presente data o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical, após receber a documentação solicitada, apreciou e **aprovou**, no que diz respeito aos aspectos de natureza ética, o projeto intitulado **"Comparação das técnicas moleculares de pulsed field gel-electrophoresis e PCR na pesquisa e identificação de Malassezia spp em casos de pitíriase versicolor, dermatite seborréica e pele normal"**, a ser executado pela pós-graduanda Giovana Letícia Hernández Ariagada, sob orientação de Vossa Senhoria.

Prof. Dr. Pedro Paulo Chieffi

Coordenador do CEP-IMT

Agradeço a Deus por ser a luz que guia meus caminhos nos momentos de alegria, escuridão e incertezas, mas, sempre de vitórias.

A Cleiton, luz da minha vida, pessoa muito especial que Deus colocou no meu caminho, incentivando-me sempre a alcançar meus objetivos, dando-me força nos momentos em que mais precisei.

Só tenho a te agradecer e te dizer que te amo muito hoje e sempre.

Aos meus amados pais Raimundo e Leticia, pelo apoio, incentivo e paciência na chegada até a realização desta tese. Por sempre acreditarem em mim nos momentos mais difíceis desta minha caminhada científica na busca da realização de meus sonhos. Minha eterna gratidão.

A minha irmã Ana, pelo carinho, apoio e conselhos recebidos. Meu eterno amor e gratidão.

“São nos momentos e nos pequenos gestos do nosso cotidiano que devemos proporcionar o mínimo de alegria e compreensão a todos que nos cercam, procurando com isso demonstrar porque estamos neste caminho”

(E.G.).

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Quero agradecer de todo coração ao mestre que me fez gostar ainda mais da Micologia Médica, o querido e sempre lembrado Professor Doutor Carlos da Silva Lacaz (*In memoriam*): tive a honra de ter trabalhado com ele durante 6 anos no Laboratório de Micologia Médica do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo; pessoa maravilhosa, humana e dedicada ao próximo como foi o Professor são qualidades difíceis de se encontrar; seus ensinamentos serão sempre lembrados e passados para os futuros micologistas.

A minha grande e verdadeira amiga, Simone Miwa Corim, por todo apoio, carinho e atenção prestada.

A querida Dona Antônio, não só uma amiga do Laboratório, mas sim, minha segunda mãe da qual tenho um grande carinho e respeito, sempre me apoiando e incentivando nas horas em que mais precisei. A amizade recebida da parte da família, dos filhos principalmente do Roberto e da Rose, dos seus netos e de todos que sempre demonstraram muita consideração e carinho por mim.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos nunca serão suficientes para contemplar todos que das mais diversas formas colaboraram para a realização desta tese.

À Profa. Dra. Clarisse Zaitz, por ser minha Orientadora, pela amizade durante estes anos e confiança depositada.

À Profa. Dra. Vera Lucia Pereira Chiocolla, pessoa que admiro pela sua competência e trabalho no Setor de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz. Por me orientar, acreditar em mim e me aceitar em seu laboratório, ensinando-me sobre as técnicas moleculares para os fungos. Obrigada Vera de coração, sem você eu não teria conseguido terminar esta tese.

À Márcia de Souza Melhem, do Laboratório de Micologia do Instituto Adolfo Lutz, pelo carinho, incentivo e amizade recebida.

À Marilena dos Anjos Martins, do Laboratório de Micologia do Instituto Adolfo Lutz, pela amizade, carinho e dedicação e valiosa ajuda recebida, muito obrigada, de coração.

Ao Dr. José Eduardo Costa Martins, do Laboratório de Micologia Médica do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - LIM 53, por permitir que eu terminasse a parte micológica desta tese.

Aos professores do Departamento de Microbiologia e aos colegas do laboratório de Micologia da USP, pela amizade e incentivo.

À Secretária da Pós Graduação do Departamento de Microbiologia, Alice, mais do que o apoio recebido, à amizade e o carinho.

À querida Rosa Gambale, Técnica do Departamento de Microbiologia Ambiental, pelos ensinamentos, apoio e amizade.

À Elizabeth Maria Heins e Natalina Takahashi de Melo, pela amizade, ensinamentos e carinho recebidos ao longo dos anos em que fiz parte do Laboratório de Micologia Médica.

Aos queridos amigos: Roseli, Cecília, Sônia, Creusa (*In memoriam*), Judith, Márcia Andréia, Sônia, Marcelo, Claudinha, Vera, Célia e Paulinha, pela amizade compartilhada durante todos estes anos.

Aos pacientes meu muito obrigado sem eles nada disto teria sido possível.

A todos que direta ou indiretamente ajudaram para que este trabalho após algumas dificuldades fosse finalmente concluído.

**Esta tese é o resultado de quatro anos e meio de trabalho
árido, muitas vezes sem ferramentas e em outras
trabalhando como se fosse a golpes de marreta em blocos
de concreto.**

**Durante este tempo, muitas pessoas me apoiaram dentro e
fora do laboratório e a todas elas quero demonstrar a
minha gratidão.**

RESUMO

Resumo

HERNANDEZ ARRIAGADA, G.L. **Comparação entre resultados obtidos com as técnicas micromorfológicas e moleculares na pesquisa e identificação de *Malassezia* spp. em escamas obtidas de indivíduos aparentemente saudáveis e pacientes com diferentes dermatoses.** [Doutorado em Microbiologia]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Espécies de *Malassezia* fazem parte da microbiota de humanos e de outros animais. Essas leveduras lipofílicas são microrganismos oportunistas que estão associados com algumas dermatoses incluindo a pitíriase versicolor, dermatite seborréica, foliculite pirotórica, dermatite atópica, algumas infecções sistêmicas entre outras. As espécies de *Malassezia* têm sido identificadas por características morfológicas e bioquímicas e atualmente com técnicas moleculares. Realizamos a identificação das espécies de *Malassezia* obtidas de 55 amostras clínicas e 15 amostras que constituíram o grupo controle, pelas técnicas convencionais utilizando um meio de cultura não descrito na literatura, a mistura dos meios Dixon e Kimming, que se mostrou superior a cada um deles quando utilizados separadamente. Utilizamos o método molecular de PCR-RFLP para genotipar 23 das 55 amostras clínicas de *Malassezia* spp. provenientes de pacientes com dermatite seborréica, pitíriase versicolor e Síndrome de Gourgerot- Carteaud. Foi possível o isolamento de quatro espécies: *M. furfur*, *M. globosa*, *M. sympodialis* e *M. slooffiae*. A identificação fisiológica obtida com o PCR-RFLP foi compatível em 83% das amostras. *M. furfur* esteve presente em 52% dos casos, o que sugere que é o principal agente causador da pitíriase versicolor e talvez, o agente mais encontrado na dermatite seborréica. Os resultados sugerem que a utilização do PCR-RFLP em amostras clínicas é método de grande utilidade para a identificação de espécies de *Malassezia* associadas às doenças em humanos.

Palavras-chaves: Isolamento de leveduras do gênero *Malassezia*; Aspectos morfológicos; Técnicas bioquímicas; Genotipagem de *Malassezia* spp.; PCR/RFLP.

ABSTRACT

Abstract

HERNANDEZ ARRIAGADA, G.L. **Comparison between results gotten with micromorphologic and molecular techniques in the research and identification of *Malassezia* spp. in gotten scales of healthy and apparently patient individuals with different dermatosis.** [Doutorado em Microbiologia]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Malassezia species are part of the microbiota of humans and other animals. These lipophilic yeasts are opportunistic microorganisms that are associated with some dermatoses including pityriasis versicolor, seborrheic dermatitis, folliculitis pitiríase, atopic dermatitis, some systemic infections among others. The species of *Malassezia* have been identified by morphological and biochemical and molecular techniques currently. We identify the species of *Malassezia* obtained from 55 clinical samples and 15 samples that formed the control group, by conventional techniques using a medium with not described in the literature, the mixture of media and Dixon Kimming, which was higher than each when used separately. Used the molecular method of PCR-RFLP to genotype 23 of the 55 clinical samples of *Malassezia* spp. from patients with seborrheic dermatitis, pityriasis versicolor and Gourgerot - Carteaud syndrome. Could the isolation of four species: *M. furfur*, *M. globosa*, *M. sympodialis* and *M. slooffiae*. The physiological identification obtained with the PCR-RFLP was consistent in 83% of the samples. *M. furfur* was present in 52% of cases, suggesting that is the main causative agent of pityriasis versicolor and perhaps the agent most frequently found in seborrheic dermatitis. The results suggest that the use of PCR-RFLP method in clinical samples is of great use for the identification of *Malassezia* species associated with diseases in humans.

Keywords: Isolation of yeasts of the genus *Malassezia*; Aspects Morphological, Biochemical techniques; Genotyping of *Malassezia* spp.; PCR / RFLP.

LISTA DE ABREVIATURAS

Bp – Parede de base

°C – Graus Celsius

D.A. – Dermatite Atópica

DNA – Ácido Desoxiribonucleico

DO – Densidade Óptica

D.S. – Dermatite Seborréica

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

Kda – Kilo Dawtons

M.. furfur – *Malassezia furfur*

M.. slooffiae – *Malassezia slooffiae*

M.. pachydermatis – *Malassezia pachydermatis*

M.. restricta – *Malassezia restricta*

M.. obtusa – *Malassezia obtusa*

M.. sympodialis – *Malassezia sympodialis*

M.. globosa – *Malassezia globosa*

µL – Microlitro

µL / mL – Micrograma por mililitro

mM – Milimolar

Pb – Pares de base

PCR – Reação da Cadeia de Polimerase (Polimerase Chain Reaction)

pH – Concentração hidrogênio iônica

PM – Padrão de peso molecular

P.V. – Pitíriase versicolor

RFLP – Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição (Restriction
Fragment Length Polymorphism)

RPM – Rotações por minuto

SDS – Sódio Dodecil Sulfato

TBE – Triziborato EDTA

U.V. – Luz Ultravioleta

V/v – Volume/ volume

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Microfotografias eletrônicas de varredura de várias espécies de <i>Malassezia</i> (GUILLOT et al. 1996)	38
Figura 2 - Região das costas evidenciando lesões típicas de Pitíriase Versicolor	39
Figura 3 - Lesões Hipocrômicas de Pitíriase Versicolor	39
Figura 4 - Pitíriase Versicolor, lesões na face	39
Figura 5 - Couro cabeludo com descamação típica de Dermatite Seborréica	40
Figura 6 - Placas hiperpigmentadas e hiperqueratóticas de Gougerot – Carteaud	40
Figura 7 - Exame direto de raspado de pele. KOH 20% positivo para <i>Malassezia</i> spp	53
Figura 8 - Exame direto de raspado de pele, coloração lactofenol azul de algodão. Presença de leveduras em cachos e hifas curtas e grossas.....	53
Figura 9 - Colônias de <i>Malassezia</i> spp após cinco dias de crescimento em ágar Dixon/Kimming incubados a 37 °C	57
Figura 10 - Colônia de <i>Malassezia furfur</i> em ágar Dixon/ Kimming.....	57
Figura 11 - Teste do Tween para <i>Malassezia furfur</i> (crescimento em todas as fontes de lipídeos)	58
Figura 12 - <i>Malassezia globosa</i>	58
Figura 13 - <i>Malassezia sympodialis</i>	59
Figura 14 - <i>Malassezia obtusa</i>	59
Figura 15 - Identificação das amostras de <i>Malassezia</i> spp através de PCR/RFLP	63

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Distribuição das espécies isoladas de leveduras do gênero *Malassezia* das 55 amostras identificadas, com método bioquímico, nas diferentes dermatoses estudadas e das oito amostras obtidas a partir de indivíduos aparentemente saudáveis 60
- Tabela 2** - Comparação entre as temperaturas de incubação das amostras de leveduras do gênero *Malassezia* nos quatro meios utilizados. Avaliação do crescimento nas diferentes dermatoses e nos indivíduos aparentemente saudáveis 61
- Tabela 3** - Distribuição das leveduras do gênero *Malassezia* nas diferentes dermatoses de acordo com a genotipagem realizada através de PCR/RFLP nas 23 amostras selecionadas 62
- Tabela 4** - Concordâncias e discordâncias observadas através da comparação do método bioquímico com PCR e PCR/RFLP das 23 amostras clínicas de *Malassezia* spp. 62

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Considerações Gerais	2
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Leveduras do gênero Malassezia	5
2.2 Posição sistemática das leveduras do gênero Malassezia	9
2.3 Identificação das leveduras do gênero Malassezia	9
2.3.1 Métodos convencionais	10
2.3.1.1 Exame direto	10
2.3.1.2 Cultivo	10
2.3.1.3 Provas Bioquímicas e Enzimáticas	12
2.4. Métodos Moleculares	13
2.5 Aspectos Imunológicos das leveduras do gênero Malassezia	20
2.6 Epidemiologia das Dermatoses atribuídas às leveduras do gênero Malassezia	22
2.6.1 Idade	22
2.7 Ecologia das leveduras do gênero Malassezia nas diferentes Dermatoses a elas associadas	26
2.7.1 No Brasil	26
2.7.2 No Mundo	26
2.8. Atividades dos antifúngicos contra as leveduras do gênero Malassezia	28
2.9 Dermatoses associadas às leveduras do gênero Malassezia	29
2.9.1 Infecção pele levedura	29
2.9.1.1 Pitiríase Versicolor	29
2.9.1.2 Onicomicose	32
2.9.1.3 Malasseziose	33
2.10 Outras Dermatoses associadas às leveduras do gênero Malassezia sem infecção	34
2.10.1 Dermatite Seborreica	34
2.10.2 Papilomatoses confluyente e reticulada de Gougerot-Carteaud	36
2.10.3 Dermatite Atópica	37
3 OBJETIVOS	41
3.1 Objetivo Geral	42
3.2 Objetivos Específicos	42
4 MATERIAL E MÉTODO	43
4.1 Esquema Metodológico	44
4.2 Material	45
4.3 Metodos Convencionais	45
4.3.1 Coleta	45
4.3.2 Identificação das leveduras	45
4.3.2.1 Identificação Micro e Macromorfológica	45
4.3.2.2 Provas Bioquímicas	46
4.3.2.2.1 Teste de Catalase	46
4.3.2.2.2 Hidrólise da Esculina	46
4.3.2.2.3 Teste de Tween	46

4.4 Identificação Molecular	47
4.4.1 Preparação das leveduras	47
4.4.2 Purificação do DNA	48
4.4.3 PCR – RFLP	48
4.4.4 Eletroforese em Gel de Agarose	49
5 RESULTADOS	51
5.1 Identificação Morfológica das amostras de <i>Malassezia SSP</i>	52
5.1.1 Exame direto	52
5.1.2 Cultura	54
5.1.2.1 Em agar Sabouraud/Dextrose acrescido de 1% de óleo de oliva e bile de boi	54
5.1.2.2 Em agar Dixon modificado	54
5.1.2.3 Em agar Kimming	54
5.1.2.4 Em agar Dixon/Kimming (associação de dois meios de cultura)	54
5.2. Identificação Bioquímica das amostras de <i>Malassezia ssp</i>	55
5.3 Identificação através das Técnicas de PCR e FFLP	56
5.3.1 Comparações entre as amostras pelos Métodos Convencionais e Moleculares	56
6 DISCUSSÃO	64
7 CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS	74
ANEXOS	89

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

Leveduras do gênero *Malassezia* são lipofílicas, lipodepedentes e fazem parte da microbiota de humanos e de animais. Estão associadas com uma variedade de doenças em humanos como: a Pitiríase versicolor (P.V.), Dermatite seborréica (D.S.), Foliculite pitirospórica, algumas formas de Dermatite atópica e Papilomatose Confluyente e Reticular de Gorgerout – Carteaud entre outras.

Desde que o gênero *Malassezia* foi criado por Baillon, em 1889, têm sido motivo de grande controvérsia entre os taxonomistas. O gênero foi revisto baseado em estudos morfológicos, ultraestruturais, fisiológicos, e mais recentemente em estudos genéticos, definindo sete espécies para o gênero *Malassezia*: *M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. globosa*, *M. restricta*, *M. sympodialis*, *M. obtusa* e *M. slooffiae* (GUÉHO et al., 1996).

M. pachydermatis é a única espécie que cresce em meios micológicos de rotina sem suplementação lipídica (CRESPO et al., 2002). Recentemente, foram descritas quatro novas espécies: *M. dermatis*, *M. nana*, *M. yamatoensis*, *M. japonica* e *M. baillon* através de técnicas moleculares (SUGITA et al., 2002 e 2004; HIRAI et al., 2004; BATRA et al., 2005).

Em geral, espécies de leveduras do gênero *Malassezia* são identificadas através de sua morfologia e aspectos bioquímicos. No entanto, estes métodos não são fáceis de interpretar e nem sempre é possível chegar à identificação de espécies (GUÉHO et al., 1996).

Métodos moleculares tais como: cariotipagem (PFGE) (GUÉHO et al., 1996; SUGITA et al., 2001), análise do polimorfismo de DNA ao acaso (RAPD) (BOEKHOUT et al., 1998), são técnicas eficientes para determinação das espécies, porém, bastante trabalhosas na sua execução.

Outra técnica molecular é a análise do Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos da Restrição (PCR-RFLP) que tem sido considerado método simples e

rápido para a identificação de espécies ou amostras de diferentes microorganismos, entre elas das leveduras do gênero *Malassezia* (GUPTA et al., 2000; GUILLOT et al., 2000; MAKIMURA et al., 2000; GAITANIS et al., 2002; MIRHENDI et al., 2005).

Outro ponto a ser considerado é a semelhança entre algumas espécies como entre a *M. furfur*, a *M. sympodialis* e a *M. slooffiae*. Também existem semelhanças entre as espécies *M. globosa* e *M. restricta*. Entretanto, essas espécies apresentam diferenças em algumas regiões do genoma. Estas pequenas diferenças em regiões genômicas podem ser evidenciadas através do PCR-RFLP (GUPTA et al., 2000; MIRHENDI et al., 2005).

Tendo em vista, a escassez de estudos para determinar as espécies de *Malassezia* mais frequentes em nosso meio, bem como a relação entre espécies isoladas e o significado de sua presença em indivíduos aparentemente são e em pacientes com diferentes dermatoses, o presente trabalho visou trabalhar com esta lacuna existente, avaliando o perfil fenotípico das cepas de *Malassezia* spp., através de métodos convencionais e comparando seu comportamento aos métodos moleculares de identificação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leveduras do gênero *Malassezia*

O gênero *Malassezia*, descrito em 1889 por Baillon, enquadra a espécie *furfur*, considerada no passado como o único agente da pitiríase versicolor. Trata-se de levedura lipofílica com células vegetativas que variam de globosas a elipsóides, produzindo conídios unipolares.

Em 1902, o famoso micologista francês, Sabouraud, estudou a seborréia definindo-a como um fluxo de sebo secretado pelas glândulas sebáceas da pele, pensando que a mesma era provocada por um “bacilo seborréico”.

Dois anos depois, em 1904, Sabouraud escreveu a obra clássica sobre “Pityriasis pelliculaires” com o objetivo de descrever moléstias descamativas, entre elas a pitiríase do couro cabeludo ou “pityriasis simplex”. O esporo de “*Malassez*”, atualmente *Malassezia furfur*, foi encontrado nas lesões, sendo então considerada a expressão microbiana constante da pitiríase simples, provocando a formação de escamas seca, principalmente no couro cabeludo.

Segundo McGinnis (1980), *Pityrosporum ovale* (CASTELLANI e CHALMERS, 1913) e *Pityrosporum orbiculare* (GORDON, 1951) eram sinônimos de *Malassezia furfur*. As semelhanças entre os gêneros *Pityrosporum* e *Malassezia* são marcantes, daí a razão pela qual o autor, com sua reconhecida autoridade em taxonomia de fungos, colocou o gênero *Pityrosporum* na sinonímia de *Malassezia*, descrita 16 anos antes e, portanto, com prioridade.

Tudo faz crer que nas formas ditas pitirospóricas (formas redondas ou ovóides, com brotamento), a célula-mãe separa-se da célula-filha por um colarete ou pescoço bem nítido (observado principalmente à microscopia de varredura) podendo permanecer com esta morfologia nos folículos pilosos da pele normal, nas dobras retro-auriculares, nas escamas de pacientes com D.S. e na chamada “pityriasis simplex capitis” (LACAZ et al., 2002).

Seguindo a orientação de Yarrow e Ahearn (1984), que escreveram o

capítulo sobre o gênero *Malassezia* Baillon, 1889, na obra clássica sobre leveduras (estudo taxonômico), coordenada por Kreger van Rij (1984), apenas a espécie *furfur* foi considerada como agente da P.V. O gênero *Pityrosporum* foi caracterizado por apresentar células globosas a elipsóides, com brotamento polar, raramente formando micélio ou pseudomicélio; temperatura ótima de crescimento a 36 °C, estimulada por óleos naturais.

Excelentes trabalhos de revisão sobre esta levedura lipofílica foram publicados por Civita et al., 1978; Silva-Hunter et al., 1980; Salcedo, 1980; Trope, 1990; Ingham e Cunningham, 1993; e Hernández-Molina et al., 1993. Também, devem ser citadas as dissertações de mestrado e teses de doutorado (BAPTISTA, 1984; DINATO, 1989; SILVA VARGAS, 1997).

Guillot et al., 1996, (Fig 1) e Aspíroz et al., 1997, consideraram as seguintes espécies de *Malassezia*: *M. furfur* – (ROBIN e BAILLON, 1889); *M. pachydermatis* - (WEIDMAN e DODGE, 1935); *M. Sympodialis* – (SIMMONS e GUÉHO, 1990); *M. globosa* – (MIDLEY, GUÉHO e GUILLOT, 1998); *M. obtusa* - (MIDLEY, GUILLOT e GUÉHO, 1998); *M. restricta* – (GUÉHO, GUILLOT e MIDGLEY, 1996) e *M. slooffiae* – (GUILLOT et. al., 1996).

Malassezia sympodialis - Simmons e Guého, 1996, espécie lipo-dependente, apresenta brotamento do tipo simpodial, o que a diferencia da *M.furfur*. Possui β - glicosidase caracteristicamente positiva em 24h, não assimila Tween 20 nem Cremophor-EL.

Malassezia globosa – Midgley, Guillot e Guého, 1996; *Malassezia obtusa* (MIDGLEY, GUILLOT e GUÉHO, 1998), são espécies facilmente reconhecidas por suas características morfológicas. A primeira possui células globosas e a segunda, células cilíndricas. A reação de catalase é positiva e a de β - glicosidase é negativa para *M. globosa*, enquanto as duas reações são positivas para *M. obtusa* além de ambas crescem a 37 °C.

M. restricta - Guého, Guillot e Midgley, 1996, espécie lipo-dependente,

bastante exigente, não assimila Tween 20, 40, 60, 80 ou Cremophor-EL como suplemento lipídico, sendo a única espécie catalase negativa.

Malassezia slooffiae - Guillot, Midgley e Guého, 1996, diferencia-se da *M. furfur* pela ausência de crescimento em Cremophor-EL e da *M. sympodialis* pela ausência da enzima β -glicosidase, não assimilando Tween 80. A assimilação do Tween 20, 40, 60 e 80, produção de catalase e a capacidade de crescimento em diversas temperaturas constituem alguns dos critérios para a diferenciação dessas leveduras lipofílicas.

Malassezia pachydermatis (WEIDMAN) Dodge, 1935, única a se desenvolver em Ágar-Sabouraud, sem suplemento lipídico; cresce a 37°C, podendo apresentar as reações de catalase e β -glicosidase positiva ou negativa. Não tem relação com seres humanos, estando freqüentemente relacionada com otite em cães. Sobre a *Malassezia pachydermatis*, leia-se a revisão de Guillot e Bond (1999).

Malassezia furfur - Robin e Baillon, 1889, sinonímia: *P. ovale* e *P. orbiculare*. É lipo-dependente, necessitando para seu crescimento de suplemento de ácidos graxos de cadeias longas (C12 a C14). Cresce bem em ágar-Sabouraud enriquecido com Tween 20, 40, 60 e 80 (0,1 a 10%) como único suplemento lipídico. É a única espécie que cresce na presença de Cremophor-EL adicionado ao ágar-Sabouraud. Cresce a 37 °C, explicando sua possível passagem para o sistema circulatório; é catalase positiva e β -glicosidase negativa (SIDRIM e DIOGENES, 1999; LACAZ et al., 2002). *Malassezia furfur* possui intensa atividade de hidrólise com a liberação de ácidos gordurosos sobre substratos de gorduras. Atividade fosfolipásica é também evidente nesta levedura lipofílica (LACAZ et al., 2002).

Weiss et al. (1999) realizaram revisão sobre a classificação taxonômica de leveduras do gênero *Malassezia* e o significado clínico tanto no homem como nos animais. Os autores comentam que em amostras clínicas o isolamento de *M. sympodialis*, *M. globosa* e *M. obtusa* podem dificultar a interpretação dos resultados obtidos através da identificação morfológica e bioquímica. O significado clínico de *M. furfur* na P.V. e nas infecções sistêmicas é bem aceito. Nos cães e gatos, *M.*

pachydermatitis tem sido isolada com frequência nos casos de otite externa e D.S.

Schmidt e Erust (2000), no capítulo sobre infecções por leveduras, do gênero *Malassezia*, descreve a importância das mesmas e suas respectivas espécies, tanto no homem, como nos animais. Relata ainda, a importância das doenças da pele causada principalmente pela *Malassezia furfur*.

Schlottfeldt et al. (2002) realizaram revisão da literatura baseada na reclassificação taxonômica de espécies do gênero *Malassezia* e suas implicações clínicas - laboratoriais, citando o estudo e a caracterização morfológica das espécies, tolerância térmica, suas necessidades nutricionais para determinados ácidos graxos e a composição e as características do DNA de cada uma das espécies de *Malassezia*.

Batra et al. (2005) realizaram excelente revisão sobre o gênero *Malassezia*, incluindo os recentes avanços tecnológicos para a identificação e classificação desta levedura e de suas respectivas espécies. A associação clínica de espécies de *Malassezia* com o número de doenças dermatológicas em mamíferos incluindo: P.V., D.S. psoríase, foliculites e otite foram discutidas.

Giusiano et al. (2003) relataram que durante muitos anos o estudo de leveduras do gênero *Malassezia* foi proposto através da variabilidade morfológica e características nutricionais. Através dos métodos de biologia molecular, foi possível realizar uma revisão taxonômica para este gênero, obtendo grande interesse e importância na clínica. São conhecidas 12 espécies de *Malassezia*, das quais 10 são lipofílicas, apresentando características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas semelhantes. Os métodos moleculares são ferramentas exatas na identificação, permitindo melhores conhecimentos epidemiológicos e ecológicos deste gênero. Variações de suscetibilidade aos antifúngicos têm sido observadas em algumas espécies, embora não haja um método padrão para estas leveduras. Os autores concluem que *Malassezia* spp é reconhecida como membro da biota normal da pele do homem e de animais e, sua implicação em processos patogênicos, incluindo doenças da pele e infecções sistêmicas, é importante para determinar a real

importância destas leveduras.

2.2 Posição sistemática das leveduras do gênero *Malassezia*

Subdivisão: *Deuteromycotina*, Ordem: *Blastomycetes*, Classe: *Cryptococcales*, Família: *Cryptococcaceae*, Gênero: *Malassezia*, Espécies: *M. furfur*, *M. globosa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis*, *M. obtusa*, *M. pachydermatis*, *M. nana*, *M. dermatis*, *M. yamatoensis*, *M. japonica* e *M. baillon*.

Sinonímia: *Malassezia furfur* Robin, 1853; *Microsporum furfur* Robin, 1853, *Saccharomyces ovalis* Bizzozero, 1884; *Saccharomyces sphaericus* Bizzozero, 1884; *Sporotrichum furfur* Saccardo, 1886; *Malassezia furfur* Baillon, 1889; *Oidium furfur* Zopf, 1890; *Pityrosporum malassezi* Sabouraud, 1904; *Pityrosporum ovale* (BIZZOZERO) Castellani e Chalmers, 1913; *Dermatophyton malassezi* Dodge, 1916; *Malassezia ovalis* (BIZZOZERO) Acton e Panja, 1927; *Cryptococcus malassezi* Benedek, 1930; *Monilia furfur* Vuillemin, 1931; *Malassezia tropica* Castellani, 1939; *Pityrosporum orbiculare* Gordon, 1951 e *Pityrosporum furfur* Emmons, 1970.

2.3 Identificação das leveduras do gênero *Malassezia*

Identificação e diferenciação de leveduras do gênero *Malassezia* baseiam-se em suas características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares.

Estas técnicas permitem detectar a produção das enzimas catalase e β -glicosidase, a tolerância à temperatura de 38 °C e o crescimento em fontes únicas de suplementação lipídica como o Tween 20, 40, 60, 80 e o Cremophor – EL (GUÉHO et al., 1996; GUILLOT et al., 1996; MAYSER et al., 1997, e GUÉHO et al., 1998).

2.3.1 Métodos Convencionais

2.3.1.1 Exame direto

Pesquisa das leveduras do gênero *Malassezia* é feita através de exame direto de escamas, obtidas de pele aparentemente sadia ou de lesão. Utiliza-se a raspagem ou método da fita adesiva, método de Jarbas Porto (LACAZ et al., 2002), e posterior clarificação das escamas com KOH 20% ou , através da coloração com lactofenol azul de algodão, onde serão observadas células leveduriformes agrupadas, assemelhando-se a cachos de uva e fragmentos de pseudohifas curtas e grossas (LACAZ et al., 2002).

Trope (1990) estudou a histopatologia das lesões de P.V, verificando que a coloração pelo método de PAS é mais sensível que o método de Grocott para a visualização do fungo no folículo piloso. A levedura utiliza uma enzima capaz de metabolizar lípidos (lípase) garantindo, deste modo, nutrientes necessários ao seu crescimento.

2.3.1.2 Cultivo

Baptista (1986) isolou 50 amostras de humanos (*M. furfur*) e de cães (*M. pachydermatis*). O autor realizou a identificação dessas amostras através de provas de assimilação de fontes de carbono, apresentando em ambos os casos resultados uniformes. Observou-se que os halos de assimilação das fontes de carbono ficaram mais evidentes adicionando lugol na superfície do meio.

O autor obteve bons resultados utilizando o meio de ágar Sabouraud-Dextrose acrescido de 1% de bile de boi, para a obtenção e manutenção de colônias típicas de leveduras do gênero *Malassezia* e para realização de provas fisiológicas. Neste estudo, não foi observada capacidade fermentativa nos cultivos de *Malassezia* e a prova de hidrólise da uréia não permitiu a separação de espécies lipofílicas, conforme outros relatos.

Lemming e Notman (1987) descreveram um meio de cultura específico para *Malassezia furfur* no qual a levedura tem excelente crescimento. Este meio é composto de: 1% de peptona, 0,5% de glicose, 0,01% de extrato de levedura, 0,4% de ágar bile de boi, 0,1% de glicerol, 0,5% de glicerol monoesterato, 0,05% de Tween 60, 1% de leite integral e 1,5% de ágar em água destilada. Este meio de cultura foi utilizado para a identificação de três espécies de *Malassezia* spp., *M. globosa*, *M. sympodialis* e *M. restricta*.

Mayser et al. (1997) verificaram que apenas *Malassezia furfur* é metabolizada pelo Cremophor-EL (Sigma), uma das substâncias emulsificadoras utilizadas na identificação de outras espécies deste gênero. Cremophor-EL contém óleo de rícino e ácido rícino-oléico, sob forma hidrofílica. Esta prova de assimilação associada à da esculina permite a separação de *M. furfur*, *M. sympodialis* e *M. slooffiae*.

Hammer e Riley (2000) estudaram em amostras de leveduras do gênero *Malassezia* a formação de um precipitado em ágar-Dixon. Verificaram que *M. sympodialis* (32 amostras) e *M. globosa* (6 amostras) formavam o referido precipitado ao contrário da *M. furfur* (12 amostras), *M. obtusa* (2 amostras) e *M. slooffiae* (3 amostras). Segundo esses autores, esta prova pode ser útil na diferenciação das espécies de *Malassezia*.

Saadatzadeh et al. (2001) obtiveram a forma miceliana de diferentes espécies de leveduras do gênero *Malassezia*, “*in vitro*”, em 40% das 33 amostras analisadas, utilizando diferentes tipos de meios de cultura.

Murai et al. (2002) estudaram amostras de leveduras de *Malassezia*, utilizando meio de Dixon modificado acrescido de glicina. Os autores observaram que *Malassezia furfur* pode utilizar a glicina como única fonte de nitrogênio, enquanto que as demais espécies não.

Kaneko et al. (2006) desenvolveram um teste para identificação de nove espécies de *Malassezia* (*M. furfur*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis*, *M. restricta*, *M.*

obtusa, *M. globosa*, *M. pachyermatis*, *M. dermatitis* e *M. japonica*) baseado em suas características biológicas. Este método utiliza o Tween 40, baseado em meio modificado de *Malassezia* através de ágar cromogênico modificado (Chromagar) e através dos meios de ágar Sabouraud–dextrose, ágar Cremophor-EL e ágar Esculina com Tween 60, além das reações de catalase. Os autores concluíram que as 26 amostras testadas com o novo meio de cultura para *Malassezia* apresentou excelentes resultados confirmados através de técnicas moleculares.

Kaneko et al. (2007) isolaram 46 amostras de *Malassezia* spp. de 366 isolados clínicos de humanos e de cães. A identificação da maioria das amostras foi realizada com as técnicas convencionais: assimilação através do Cremophor – EL hidrólise da esculina e crescimento em temperaturas acima dos 40 °C. Todas as espécies de *Malassezia* foram identificadas através de suas características morfológicas em Chromagar *Malassezia*, meio este que os autores testaram para isolar a *M. globosa*, *M. restricta* e *M. furfur*.

Neste trabalho, os autores isolaram *M. globosa* de pitíriase versicolor e *M. restricta* de dermatite seborréica. Os resultados obtidos indicaram que o sistema de identificação que foi proposto pode ser utilizado na rotina clínica para isolamento de *Malassezia* spp.

2.3.1.3 Provas Bioquímicas e Enzimáticas

O teste do Tween permite diferenciar *M. furfur*, *M. sympodialis* e *M. slooffiae* conforme o precipitado formado ou o crescimento observado para cada fonte de lipídeo. O processo de formação do precipitado corresponde à hidrólise dos Tweens liberando ácidos graxos insolúveis no meio. No entanto, quando o Tween permite o crescimento da levedura, o precipitado é ausente após uma semana de cultivo devido à acidificação do meio. Áreas de inibição de crescimento são observadas na alta concentração do Tween 20, provavelmente causada pela toxicidade do ácido láurico (GUILLOT et al., 1996).

Mayser et al., 1996, determinaram a quantidade de lipase e atividade de

hidrólise em 150 amostras de *Malassezia furfur*. As culturas de leveduras do gênero de *Malassezia* foram semeadas em meio seletivo para fungos patogênicos, onde o uso de óleo em algumas amostras permitiu o crescimento em curto período de tempo. O uso do Tween associado com o meio seletivo possibilitou observar com precisão a atividade de hidrólise de cada amostra estudada.

2.4 Métodos Moleculares

Atualmente com o aprimoramento de técnicas moleculares foi possível identificar vários grupos de fungos, como por exemplo, o das leveduras, onde as variações morfológicas observadas nos métodos clássicos de identificação são mínimas. Os métodos moleculares são úteis no diagnóstico clínico porque são rápidos, sensíveis e específicos (CISALPINO e TRAVASSOS, 2002).

O desenvolvimento da técnica de amplificação de segmentos de DNA utilizando a reação de polimerização em cadeia (PCR) tem possibilitado novas perspectivas na análise de genes, no diagnóstico de doenças genéticas, a na detecção de agentes infecciosos, entre outros (PASSAGLIA e ZAHA, 1996).

Maiwald (1994) descreveu um método que permitiu a identificação rápida de 12 leveduras clinicamente importantes, baseado na amplificação por PCR de um segmento do gene 18S rRNA, seguida da digestão dos amplicons com endonucleases de restrição (Alu1, *Ban*1, *Bbs*1, *Dra*11, *Eco* 471 e *Nhe*1), de modo a gerar padrões de bandas características para as espécies *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, entre outras.

Makimura et al. (1994) descreveram um método de PCR baseado na construção de oligonucleotídeos para regiões de sequências conservadas do 18S rRNA, dirigidos exclusiva e seletivamente à amplificação do DNA de fungos patogênicos. Um fragmento de 687pb foi detectado em 78 cepas de 25 espécies diferentes de fungos, incluindo-se espécies dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Malassezia* e *Pneumocystis*. Os resultados, a partir do soro, fluido

cérebro-espinhal e pus sugeriram que o método poderia ser mais útil que os métodos convencionais.

Anthony et al. (1994) realizaram um dos primeiros estudos moleculares em leveduras do gênero *Malassezia*, isolando *M. pachydermatis* em animais domésticos e silvestres, através das técnicas de Southern blotting, cariotipagem e RFLP.

Os autores observaram que com a técnica de RFLP, usando a enzima de restrição *HpaII*, houve o aparecimento de número limitado de bandas que eram apropriadas para uma comparação entre si, embora em 39% dessas amostras produziram padrões indistinguíveis. O teste de Southern blotting com probe denominado de GT, através da digestão da enzima *BglII* apresentou variação considerável para se tornar método ideal de diferenciação entre as amostras de *M. pachydermatis*.

Belkum et al. (1994) descreveram a aplicação de PCR “fingerprinting” para a identificação do agente etiológico de surto de infecção sistêmica em UTI neonatal. Isolou-se 2 espécies de leveduras do gênero *Malassezia*: *M. furfur* e *M. pachydermatis*. As amostras foram analisadas através do PCR e seis genótipos diferentes foram detectados nas amostras tidas como padrão desta levedura. Em dez amostras padrão de *M. pachydermatis*, nove genótipos diferentes foram detectados através de três ensaios diferentes de PCR. Nenhum dos ensaios conseguiu diferenciar geneticamente os isolados clínicos de *M. furfur* ou *M. pachydermatis*. Com base nesses resultados, os autores concluíram que a presença de isolados de *M. furfur* e *M. pachydermatis* na UTI neonatal ocorre devido à persistência das espécies de leveduras do gênero *Malassezia* em colonizar superfícies de incubadoras por um longo período de tempo; o PCR “fingerprinting” é um método adequado para identificação de leveduras do gênero *Malassezia*.

As características moleculares são fundamentais para a diferenciação de espécies com resultados similares em testes fisiológicos. As percentagens molares de guanina e citosina, e a sequência de DNA/RNA do fragmento ribossomal 25S contribuíram para caracterização molecular das leveduras do gênero *Malassezia*

(GUÉHO et. al, 1996).

Guillot e Guého (1995) utilizaram 104 amostras de *Malassezia* spp., 52 isoladas de humanos e 52 de animais, e realizaram comparação utilizando a porção do LSU e sequência de RNA/DNA. Oito grupos foram reconhecidos como espécies geneticamente diferentes. Cada amostra foi confirmada através da percentagem molar obtida de guanina e citosina e de DNA/ RNA, Obteve-se 85% de associação, demonstrando que com essa técnica obtêm-se bons resultados.

Boekhout et al. (1998) realizaram estudo molecular das sete espécies de leveduras do gênero *Malassezia* utilizando as técnicas de eletroforese em campo pulsátil (PFGE). Observaram diferentes cariótipos da levedura com a técnica do polimorfismo de DNA amplificado aleatoriamente (RAPD), que permite observar variações genéticas de uma mesma espécie de leveduras do gênero *Malassezia*. Os autores concluem que os resultados obtidos indicaram cariótipos diferentes entre as espécies e que a variação intra-específica de cariótipos também pode existir.

A técnica de cariotipagem serve para identificar todas as espécies de *Malassezia* enquanto que o RAPD pode ser utilizado em investigações epidemiológicas.

Senczek et al. (1999) estudaram 220 isolados de leveduras do gênero *Malassezia* obtidos da pele de animais e humanos, identificados através de características morfológicas, bioquímicas e da técnica de eletroforese em campo pulsátil (PFGE), que permitiram obter resultados específicos destas leveduras.

Makimura et al. (2000) demonstraram a aplicação do espaço transcrito interno (ITS-1) na sequência de DNA ribossomal na identificação de espécies de 28 amostras padrão e 46 isolados clínicos do gênero de *Malassezia*. As espécies de *Malassezia* foram classificadas dentro dos sete ITS-1 de grupos homólogos e 22 ITS-1 idênticos em grupos individuais.

Guillot et al. (2000) descreveram técnica baseada no PCR-REA para

diferenciação das sete espécies de leveduras do gênero *Malassezia*. 55 amostras foram isoladas e analisadas com um único par de “primers”, designados na amplificação de RNA (LSU e RNA) do gene das sete espécies de leveduras do gênero *Malassezia* e a identificação dos produtos do PCR, com uso de três enzimas de restrição: Ban I, Hae II e Msp I. Os resultados obtidos são específicos para cada espécie investigada, além disso, PCR-REA permitiu a detecção e a caracterização das misturas de diversas espécies de *Malassezia* concluindo que, as técnicas moleculares através do estudo de um único gene do LSU rRNA é um método confiável e rápido para diferenciar todas as espécies de leveduras do gênero *Malassezia*.

Gupta et al. (2000) analisaram 78 amostras de isolados clínicos e obtidas de coleção de culturas de leveduras do gênero *Malassezia*, para observar a variação de DNA ribossomal. Através do PCR regiões dos ITS foram amplificadas e o produto obtido digerido com enzimas de restrição. Neste estudo a análise do PCR-RFLP de uma única região dos ITS provou ser suficiente para resolver sobre a ambigüidade fisiológica existente em três espécies: *M. furfur*, *M. sympodialis* e *M. slooffiae*, que fisiologicamente são muito parecidas. Os autores também observaram que o crescimento de *M. obtusa* é muito parecido ao da *M. globosa* e *M. restricta*, sendo possível observar as diferenças existentes entre estas espécies através das técnicas moleculares, observando regiões dos ITS.

Hoog et al. (2000) estudaram espécies de leveduras do gênero *Malassezia*, através das características micromorfológicas, fisiológicas e moleculares diferenciando, respectivamente, sete espécies dessa levedura.

Aizawa et al. (2001) estudaram através da técnica molecular de RAPD e com o uso da enzima CHS2-quitina sintetase 110 isolados clínicos de *M. pachydermatis* de cães e gatos. A análise do RAPD demonstrou que *M. pachydermatis* é constituída de quatro tipos genéticos diferentes (A, B, C e D). Todos estes tipos genéticos foram encontrados nas amostras isoladas de diferentes materiais clínicos nos animais que apresentavam: otite externa, D.S, D.A e dermatite alérgica. Os autores observaram que o tipo A predomina em todos os casos,

enquanto que os tipos B, C e D apenas estão presentes em casos de otite externa.

Gupta et al. (2001) estudaram 356 casos de leveduras do gênero *Malassezia*, sendo que em apenas 156 amostras esta levedura foi isolada em cultura. Além das provas utilizadas de rotina, a análise molecular feita através de PCR permitindo detectar com exatidão as espécies de leveduras do gênero *Malassezia*: *M. sympodialis* (59,4%), *M. globosa* (25,2%) e *M. furfur* (10,8%), sendo que *M. globosa* não foi isolada através de cultura.

Sugita et al. (2001) descreveram nova espécie de levedura do gênero *Malassezia*, a *M. dermatis*, isolada de pacientes com D.A. e identificada através da análise ribossomal das sequências de DNA.

Sugita et al. (2002) fizeram a extração do DNA de amostras de leveduras do gênero *Malassezia*, em pacientes com D.A. através utilizando a técnica de nested - PCR. Observaram que *M. globosa* e *M. restricta* foram detectadas em aproximadamente 90% dos pacientes com dermatite atópica e *M. furfur* e *M. sympodialis* em 40% dos casos. Já nos pacientes controles, leveduras do gênero *Malassezia* foram observadas em 78% dos casos, neste estudo o nested PCR foi utilizado pela primeira vez para analisar as amostras de leveduras do gênero *Malassezia*.

Gaitanis et al. (2002) desenvolveram método baseado na extração do DNA de amostras obtidas de escamas de pele. O DNA da levedura foi extraído através de método modificado, denominado CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) para posterior realização de PCR utilizando primers específicos: ITS 1/4 e ITS 1/3. Realizaram ainda o RFLP através da análise dos produtos obtidos pelo PCR, que possibilitou a identificação das diferentes espécies de *Malassezia*.

Yamada et al. (2003) relataram o uso da sequência parcial da subunidade de RNA mitocondrial ribossomal (LsmtrRNA) do gene para analisar a relação das sete espécies de leveduras do gênero *Malassezia*. Foi detectado um nucleotídeo diferente entre as sequências dos dois tipos de amostras de *M. furfur* (CBS 1878 e

CBS 7019). Os autores sugerem que a sequência do gene *LsmtrRNA* seja confiável para a identificação das espécies assim como a tipagem das amostras de leveduras do gênero *Malassezia*.

Sugita et al. (2004) compararam sequências de DNA da região IGS (espaço intergênico), localizado entre as regiões 26S e 5S do rDNA da *Malassezia restricta* isolada de raspado de pele de 13 pacientes com dermatite atópica e de 12 indivíduos saudáveis, analisando ainda três amostras tidas como padrão e provenientes do CBS. Sequências de IGS 1 foram divididas dentro de grupos maiores, correspondendo aos pacientes com D.A. e os indivíduos saudáveis. Esses achados sugeriram que genótipos de *M. restricta* que colonizaram a pele da população estudada eram significativamente diferentes, no entanto, quando estudada a relação entre a *M. restricta* e os pacientes com D.S., esses genótipos foram considerados semelhantes.

Gandra (2004) coletou raspado de pele de 201 pacientes sendo que 87 apresentavam P.V., 46 D.S. e 68 D.S. e positividade para HIV (D.S. - HIV). O isolamento das espécies de leveduras do gênero *Malassezia* foi de 63,7% e a espécie mais isolada foi *M. furfur* (30,8%). As amostras provenientes dos pacientes com D.S. - HIV apresentaram positividade superior a 80%, tanto para a enzima proteinase como para a fosfolipase. A atividade de lipase apresentou índice 3 em 80,0% das amostras de *M. furfur*, enquanto que para a atividade de DNase nenhuma cepa produziu esta enzima. O autor utilizou as toxinas killer, que são produzidas por leveduras capazes de inibir fungos patogênicos e outros microorganismos sensíveis. O biotipo "killer" mais frequente foi 888 com 57,0% para as amostras de *M. furfur*. A resistência das amostras frente aos antifúngicos itraconazol, fluconazol e cetoconazol foram maiores nos pacientes com D.S. - HIV. Por meio da técnica de PCR-RAPD e análise filogenética as amostras de *M. furfur* mostraram uma heterogeneidade, sendo definido dois grupos distintos de cepas, um originário de D.S. e outro de P.V.

Mirhendi et al. (2005) realizaram o PCR-RFLP usando a região 26S rDNA e duas enzimas de restrição: *CfoI* e *BstF51* para a identificação de 11 espécies de

leveduras do gênero *Malassezia* de amostras padrão e 13 amostras clínicas. As amostras isoladas foram identificadas através das técnicas convencionais e confirmadas com sucesso pelas técnicas moleculares.

Morishita et al. (2006) estudaram 49 pacientes com P.V., sendo 32 do sexo masculino e 17 do feminino, faixa etária variando dos 16-83 anos. As amostras de raspado de pele foram identificadas através da micromorfologia como leveduras do gênero *Malassezia*. Nestes isolados, os autores identificaram a *M. nana*, no entanto, infecção por esta levedura não é conhecida, isolaram também a *M. pachydermatis* que é rara em humanos. Sendo assim, os autores excluíram estas espécies no estudo. Além do método convencional de identificação, utilizaram a técnica molecular de Nested-PCR, utilizando primers específicos para identificar as leveduras do gênero *Malassezia*, nos 49 pacientes. Antes do tratamento, as espécies mais isoladas foram a *M. globosa* e *M. restricta*, ambas com 93,9% e as demais espécies com 35%. Estes resultados sugerem que *M. globosa* e *M. restricta* são espécies comuns em pacientes com P.V., semelhantes aos pacientes com DA e em pacientes saudáveis, não existindo diferenças significativas na prevalência de *M. globosa* e *M. restricta* entre a pele normal e a com lesões.

Gaitanis et al. (2006) estudaram a distribuição das espécies de leveduras do gênero *Malassezia* em casos de P.V., D.S. e através do ITS1 que facilita a detecção de subtipos de *M. globosa* e *M. sympodialis*. Estudaram 109 pacientes gregos com P.V. e D.S. em culturas positivas de leveduras do gênero *Malassezia* incluídas neste estudo, levando em consideração a idade, sexo e manifestações clínicas. A região do ITS1 da *M. globosa* e *M. sympodialis* das amostras clínicas foram analisadas, através da reação de PCR-SSCP (simples análise do polimorfismo).

M. globosa foi a espécie mais freqüente nos isolados de P.V. e D.S. (77% e 13% respectivamente) ou em combinação (13% e 18%) com outra espécie de *Malassezia*. Através da técnica de PCR-SSCP foi possível diferenciar 05 subtipos de *M. globosa*. Todos os isolados de *M. sympodialis*, demonstraram perfil homogêneo da região ITS1 no PCR-SSCP. Os isolados das espécies de *Malassezia* identificados neste estudo correspondem aos encontrados em estudos do sudoeste da Europa.

Gandra et al. (2006) isolaram 27 amostras de *M. furfur* de três grupos de pacientes: 21 com P.V., 15 com D.S. e 11 com D.S. - HIV. A identificação das amostras foi realizada através de técnicas moleculares, utilizando o RAPD/ PCR. Através da realização de um dendrograma foi possível observar as diferenças existentes entre os isolados de *M. furfur* de P.V. e D.S. e nos pacientes com HIV. Os autores concluíram que a técnica de RAPD apresenta alto padrão discriminatório nas amostras isoladas podendo ser utilizada em investigações epidemiológicas de doenças de pele causadas por *M. furfur*.

2.5 Aspectos Imunológicos das leveduras do gênero *Malassezia*

Na classificação de Cunningham e Leeming, 1990, *Malassezia sympodialis*, *M. globosa* e *M. restricta* correspondem ao sorotipo A, B e C.

Ashbee et al. (1993) estudaram através de provas de soroaglutinação os soropositivos de *Malassezia furfur*. A *M. furfur* apresenta três sorotipos: A, B e C, não havendo diferenças quanto a sua frequência em casos de P.V. e D.S.

Silva Vargas (1997) em casos de P.V., D.S. e em indivíduos normais, observou as formas redonda, ovóide e orbicular da forma pitirospórica da *Malassezia furfur*, verificando, através do preparo de exo-antígenos que uma fração dominante de 70 kilodawtons (kDa) estava sempre presente como marcador para P.V e D.S. A análise molecular mostrou polimorfismo genético muito grande entre amostras de *M. furfur*. A forma oval de *M. furfur* provocou resposta de IgG em pacientes com P.V e D.S através de provas de ELISA.

Faggi et al. (1998) pesquisaram anticorpos precipitantes anti-*Malassezia* em 868 amostras de soros, utilizando filtrado de cultivo de *M. furfur* como antígeno. Em crianças abaixo de 11 anos não foram demonstrados anticorpos, os quais começaram a aparecer após esta idade, atingindo máximo de frequência entre 31 e 40 anos. No total, anticorpos foram encontrados em 31% da população.

Kesavan et al. (1998) utilizando técnicas de ELISA e do bioensaio, pesquisaram a capacidade de células de leveduras do gênero *Malassezia*, preservadas em formalina e também sob a forma de leveduras viáveis (variedades A, B e C) em produzir “*in vitro*”, citocinas inflamatórias dos tipos IL-6, IL-1 β e TNF- α sobre células mononucleares sanguíneas, após período de incubação de 48 horas. A observação mais consistente registrada pelos autores foi a de que as células formalizadas e viáveis de leveduras do gênero *Malassezia* diminuem de modo significativo “*in vitro*” a produção de IL-1 β , IL-6 e TNF- α com relação aos monócitos do sangue periférico na pele. Estas citocinas parecem desempenhar papel crítico no início do processo inflamatório.

Gandra (1999) avaliou atividade alergênica da *Malassezia furfur* utilizando o líquido de Coca, baseado nas características de crescimento da levedura. As maiores concentrações de proteínas e carboidratos foram obtidas em extratos no 10º dia. Extratos do 2º, 6º, 10º e 28º dias foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e os mesmos apresentaram 16, 8, 13 e 29 bandas. O autor ainda realizou testes de punctura com extratos foram realizados em 70 pacientes previamente diagnosticados com diversas manifestações alérgicas e 30 indivíduos saudáveis, utilizados como controle. Dos pacientes analisados 13 (18,6%) apresentaram reação alérgica local. Quatro frações protéicas, com pesos moleculares de 88, 61, 52 e 39 KDa mostraram reatividade a imunoglobulina da classe IgE, através da técnica de Western- Blotting. Importantes parâmetros foram estabelecidos na tentativa de utilização de extratos de *M. furfur* em testes de diagnóstico de triagem em pacientes alérgicos.

Bergbrant et al. (1999) estudaram em 12 pacientes com P.V. e 15 com D.S. a imunidade mediada por células, utilizando linfócitos e vários mitógenos. Observaram que em casos de P.V. a imunidade medida por células é mais baixa do que a registrada em D.S. e controles.

Faergemann et al. (2001) relatam a presença de células inflamatórias e mediadoras em estudo realizado com pacientes com D.S., foliculite pitirospórica e pacientes-controle.

Selander et al. (2006) investigaram se existem diferenças de pH em indivíduos que apresem eczema atópico, dos indivíduos com pele sadia e que poderiam influenciar na produção de alergenios de *Malassezia*. Utilizaram amostra padrão ATCC de *M. sympodialis* cultivada em caldo Dixon pH 6,1 e pH 5,0 durante 1-15 dias. A cultura do sobrenadante foi analisada e com as células de *M. sympodialis* foi realizado o PCR para obter expressão alergênica da levedura.

Os autores determinaram que a produção de células de *M. sympodialis* apresentou, quando mantidas em pH 6,1, melhor resultados confirmados quando se observaram alergenios com frações maiores que 67 KDa, sendo designado de Mala s 12. Os dados obtidos sugerem que, o fato dos pacientes com eczema atópicos não apresentarem a pele integra talvez seja causado por fatores externos, como o meio ambiente contribuindo para um quadro de inflamação na presença de alergenios da *M. sympodialis*.

A importância dos fatores imunológicos na P.V. ainda é pouco conhecida, mesmo não ocorrendo importantes alterações imunológicas podem ser observadas alterações na resposta imune celular em relação a *M.furfur*, ocorrendo diminuição na produção de IL-1b (ASPIROZ et al., 1997).

Sabe-se que a maioria dos indivíduos normais apresenta anticorpos séricos (IgG) à *M.furfur*. Em adultos os títulos são mais elevados do que em crianças, sendo assim, a resposta imune-humoral pode estar relacionada à condição de portador são do indivíduo e não da patogênese da P.V ou de outras dermatoses causadas pelo gênero *Malassezia* (ASPIROZ et al., 1997).

2.6 Epidemiologia das Dermatoses atribuídas às leveduras do gênero *Malassezia*

2.6.1 Idade

Lopes et al. (1994) relataram caso de criança de sete anos que durante quatro anos apresentava nódulos no cabelo, na região temporal. Observaram

também que a irmã de onze anos apresentava nódulos idênticos no cabelo durante 3 anos. Exame microscópico revelou presença de leveduras do gênero *Malassezia*. Testes de rotina identificaram presença de *M.furfur*. A paciente foi tratada com xampu de sulfeto de selênio, a 2,5% observando-se o desaparecimento dos nódulos após semanas de tratamento.

Filgueiras de Souza (1996) em um grupo de 52 lactentes de 0 a 1 ano de idade, com D.S., verificaram ao exame microscópico do couro cabeludo e da região frontal, *Malassezia furfur* em percentuais bastante elevados (78,9% de positividade). Tal observação confirma a presença desta levedura lipofílica como microrganismo da microbiota normal do couro cabeludo, com eventuais implicações na etiopatogenia da D.S.

Rapelanoro et al. (1996) estudaram 13 recém nascidos, menores do que um mês de vida que apresentavam eritema e pústulas na região da face, pescoço e couro cabeludo. Através de exame microscópico obtido do local das lesões foi observada e isolada a *M. furfur* em oito dos treze casos. O tratamento foi realizado com 2% de ketoconazol tópico, após um mês de aplicação, houve melhora das lesões. Os autores concluem que *M. furfur* está associada com uma foliculite comum em recém nascidos.

Bouassida et al. (1998) em estudo retrospectivo de 1379 casos de P.V., encontraram 164 casos em crianças de 5 meses a 14 anos. Nestas crianças houve um discreto predomínio no sexo feminino, as lesões na face foram mais frequentes e os aspectos hipocrômico e acrômico predominaram, fazendo-se necessário o diagnóstico diferencial com outras lesões hipopigmentares da face.

Cuevas et al. (1999) comentam caso de sepsis, causada pela *Malassezia furfur* em neonato internado durante 64 dias na UTI, recebendo alimentação parenteral com suplemento lipídico, através de cateter. No esfregaço de sangue corado por Giemsa, foram observadas formas leveduriformes compatíveis com *M. furfur*, confirmada através do isolamento em meio específico para esta levedura. Após a retirada do cateter e tratamento com antifúngico, houve melhora após 21

dias.

Isa et al. (2001) durante o período de um ano, estudaram pacientes com P.V. Todos os casos foram confirmados através de exame direto realizado com fita adesiva (durex) e corante azul de metileno.

Entre 5160 casos de P.V. encontraram 797 casos em menores de 15 anos dos quais 92 (11%) eram lactentes. Os lactentes apresentavam manifestações clínicas atípicas e lesões localizadas com maior frequência na face (81%), tronco (16%), pescoço (8,6%) e extremidades (5%).

Bernier et al. (2002) estudaram a incidência de leveduras do gênero *Malassezia* em 102 recém-nascidos com pustolosis cefálica (acne neonatal) e suas respectivas mães. Em 11 recém-nascidos e 36 mães, isolaram leveduras do gênero *Malassezia*, sendo *M. globosa* e *M. sympodialis* as mais freqüentes. A colonização por *Malassezia* foi tanto maior quanto mais grave a “acne neonatal”.

Ashbee et al. (2002) estudaram recém-nascidos com menos de 28 dias de dias de vida e crianças maiores de 28 dias, durante 20 semanas. Coletando, com swabs, material da face de 245 recém-nascidos e 42 crianças, observaram que 78 dos recém-nascidos (31,8%) e 41 das crianças (97,6%) apresentaram colonização por leveduras do gênero *Malassezia*.

Ingordo et al. (2003) pesquisaram a prevalência de P.V. em população de marinheiros italianos jovens, avaliando a influência dos hábitos e dos fatores de risco que afetam esses indivíduos. Analisaram 1024 marinheiros jovens, sendo 975 (95,2%) homens e 49 (4,8%) mulheres, com faixa etária de 18-30 anos; o diagnóstico de P.V. foi baseado na clínica e/ou no uso da lâmpada e Wood. P.V. foi diagnosticada em 22 indivíduos todos do sexo masculino. Não foi encontrada uma associação estatisticamente significativa entre P.V. e prática de esportes relatada por alguns destes marinheiros.

A *M. furfur* é amplamente distribuída na natureza, nunca foi isolada do solo,

mas pode ser observada em animais clinicamente sãos (ZAITZ et al., 1998; ROZA et al., 2003).

Fatores responsáveis pelo isolamento de leveduras do gênero *Malassezia* em alguns indivíduos não são conhecidos. Alguns autores sugerem a predisposição genética, desnutrição, sudorese excessiva e gravidez como fatores predisponentes no desenvolvimento da doença (SIDRIM e DIÓGENES, 1999). Noventa por cento a 100% de indivíduos normais são portadores desta levedura, principalmente em regiões do corpo ricas em glândulas sebáceas, uma vez que a *M. furfur* faz parte da microbiota normal da pele, principalmente do folículo piloso. Sob certas condições clínicas pode ocorrer o aparecimento de pseudofilamentos desta levedura, marcando sua patogenicidade (ASPIROZ et al., 1997).

Crespo-Erchiga et al. (1999) estudando a prevalência de espécies de *Malassezia* isoladas de pele normal, de portadores de P.V. (100 amostras) e de D.S. (75 amostras), verificaram que *M. globosa* em sua fase miceliana, era predominante como agente etiológico da P.V. Na D.S. predominava *M. restrita* e *M. globosa*, e na pele normal a *M. sympodialis*.

Aspiroz et al. (2002) em 79 amostras de pacientes com P.V. obtiveram isolamento de *M. globosa* e *M. sympodialis* em 90% e 45% respectivamente. Os resultados confirmam que *M. globosa* é o principal agente da P.V..

Aste et al. (2002) relatam caso de P.V. em paciente de 31 anos, originário da Sardenha que apresentava mais de 40 lesões localizadas no tronco, membros superiores e inferiores lembrando lesões de Pitiríase rotunda. A Pitiríase rotunda é doença incomum com lesões arredondadas, ovais e de colorações variadas, do rosa ao marrom. Através do exame micológico direto foi possível determinar o diagnóstico correto, tratamento com antifúngicos foi bem sucedido. A raridade do caso estava na forma das lesões que se apresentavam em círculos, pois a P.V. é muito semelhante à pitiríase rotunda e vice-versa especialmente nos países onde essas duas doenças são endêmicas.

2.7 Ecologia das leveduras do gênero *Malassezia* nas diferentes dermatoses a elas associadas

2.7.1 No Brasil

Martins et al. (1989) examinaram 4.267 indivíduos do município de Santo André (Estado de São Paulo) e, isolaram *Malassezia furfur* em 132 casos, o que correspondendo a 31% dos indivíduos.

Miranda et al. (2004) realizaram revisão atualizada sobre leveduras do gênero *Malassezia*, incluindo a taxonomia, epidemiologia, quadro clínico, diagnóstico, tratamento e profilaxia da P.V. Observaram que na maioria dos estudos a espécie predominante em casos de P.V. foi *M. globosa*, ultrapassada pela *M. sympodialis* em estudos realizados no Canadá, Espanha, França e Índia, sugerindo uma provável correlação da espécie com as condições climáticas.

2.7.2 No Mundo

Aspiroz et al. (1999) realizaram estudo de 120 isolados de *Malassezia spp*, obtidos de 38 voluntários que não apresentavam lesões. O material foi obtido de três diferentes regiões do corpo: couro cabeludo, tronco e região escapular. Através das características morfológicas e bioquímicas, foram determinados três biótipos: *M. globosa* (biótipo 1), *M. sympodialis* (biótipo 2) e *M. restricta* (biótipo 3). Os autores concluem que através da identificação morfológica, bioquímica e localização das lesões o biotipo 1 corresponde à descrição de *Pitirosporum orbiculare* e, o biotipo 3 corresponde ao *P. ovale*. No biótipo 2 o pleomorfismo pode ocorrer quando encontrado com frequência na região escapular, mas não está associado com as espécies de *Pitirosporum*.

Hernández-Hernández et al. (2003) determinaram a frequência e a distribuição das espécies de leveduras do gênero *Malassezia* em pacientes com psoríase, D.S. e P.V. em um hospital do México. Dos 59 cultivos de leveduras do gênero *Malassezia* de 46 pacientes (20 com psoríase, 15 com D.S. e 11 com P.V.) e de 17 indivíduos sãos, obtiveram 96 isolados. A frequência das espécies

identificadas nos isolamentos foi: psoríase (*M. sympodialis* – 38,2%; e *M. furfur* – 26,5%), D.S. (*M. sympodialis* - 38,5% e *M. slooffiae* – 34,6%); P.V. (*M. globosa* – 46,7% e *M. sympodialis* – 26,7%). Nos indivíduos sãos isolaram-se principalmente a *M. restricta* (47,6%) e *M. globosa* (23,8%). Os autores concluem que: a) ocorre uma grande diversidade das espécies de leveduras do gênero *Malassezia* associadas às diferentes dermatoses; b) esta diversidade ocorre também em indivíduos sadios; e c) com exceção da P.V., estes estudos não permitem estabelecer papel patogênico desta levedura em outras dermatoses.

Arsic-Arsenijevic et al. (2003) relatam primeiro caso de *M. globosa* na Sérvia, em pacientes com P.V. A identificação da espécie foi feita através das características macro-micromorfológicas e bioquímicas. O isolamento foi feito em Ágar Leeming – Notman e em Ágar Dixon, a 35 °C durante uma semana.

A *M. globosa* pode estar implicada em doenças que afetam somente a pele e, em pacientes imunocomprometidos e em neonatos, sendo então a causa de infecções sistêmicas.

Canteros et al. (2003) determinaram a frequência de leveduras do gênero *Malassezia* envolvidas em doenças de pele. De Fevereiro de 1999 a Outubro de 2001, 456 raspados de pele foram realizados, sendo 447 pacientes diagnosticados com P.V., foliculite e D.A. Foram analisadas através de exame micológico direto e culturas. Leveduras do gênero *Malassezia* foram observadas em 255 amostras de raspado de pele (55,9%), mas, somente 99 amostras (38,8%) foram recuperadas.

Espécies de *Malassezia* foram isoladas de 10 raspados da lesão (3,9%) que foram negativas no exame direto. Sendo assim, o total de isolados foi de 109 obtendo os seguintes resultados: *M. sympodialis* (58,7%) predominou entre as demais espécies, seguidas de *M. globosa* e *M. furfur* (18,3% e 9,2%). Isolados únicos recuperados de *M. obtusa*, *M. slooffiae* e *M. restricta* (0,9% respectivamente), em 11 isolados (10,1%) a identificação não pode ser realizada, pois as culturas foram inviáveis.

Os autores concluem no primeiro estudo de leveduras do gênero *Malassezia* associado às doenças de pele na cidade de Buenos Aires, Argentina, que é necessário o estudo desta levedura em outras regiões geográficas do país para a confirmação de resultados.

2.8 Atividades dos Antifúngicos contra as leveduras do gênero *Malassezia*

Heins-Vaccari et al., 1984, 1987, verificaram que o cetoconazol é “*in vitro*”, mais ativo que o itraconazol.

Segundo Dinato (1989) *Malassezia furfur* sofre algumas mudanças na sua morfologia quando observada a viabilidade desta levedura lipofílica, pelo método de fluorescência com diacetato de fluorescência e brometo de etídio (DF+BE). A autora registrou aos 60 dias, remissão do quadro clínico, com o uso do cetoconazol por 10 dias (200mg diariamente).

M. furfur também sofre, *in vitro*, ação do itraconazol bem como de outro derivado triazólico sintetizado pela Janssen Pharmaceutica – Berse, Bélgica e não comercializado - o BAY 7133.

Balfour e Fauld (1992) verificaram que leveduras do gênero *Malassezia* sofrem “*in vitro*”, a ação da terbinafina em concentração inibitória mínima de 0,2 - 0,8 µg/l, sensibilidade superior à observada para os dermatófitos em geral.

Candido et al. (1996) verificaram que *M. pachydermatis*, agente de otite em cães e gatos sofre a ação fungicida do iodo, mertiolate e violeta de genciana, sendo o último o anti-séptico mais eficaz “*in vitro*” para esta levedura.

Chai et al. (2000) estudaram caso raro de *M. sympodialis* em paciente de 53 anos insulino dependente que, apresentava otite externa grave, obtendo sucesso terapêutico com anfotericina B.

Murai et al. (2002) estudou a suscetibilidade *in vitro* de 24 amostras de *M. pachydermatis* utilizando quatro antifúngicos: bifonazol, itraconazol, amorolfina e terbinafina em combinação com lisozima utilizando caldo uréia no método da microdiluição, determinados pela concentração inibitória mínima (MIC). Resultados sugerem que a *M. pachydermatis* pode não estar afetando a defesa natural dos hospedeiros.

2.9 Dermatoses associadas às leveduras do gênero *Malassezia*

2.9.1 Infecções pela levedura

2.9.1.1 Pitíriase Versicolor

A P.V. é infecção fúngica superficial da camada córnea, assintomática, muitas vezes recidivante, tornando o tratamento difícil. É causada por leveduras do gênero *Malassezia*, principalmente a *Malassezia furfur* (ROZA et al., 2003).

É micose de distribuição mundial, afeta ambos os sexos e todas as raças, prevalece nos trópicos, sendo rara nos países de clima temperado. Pode causar fungemia, adquirida pela introdução de cateter tanto em adultos como em neonatos que recebem alimentação parenteral rica em lipídios (Fig 2, Fig 3 e Fig 4).

Nogueira et al. (1988) estudaram as características morfológicas macro e microscópicas de *Malassezia furfur*, através de exame micológico direto e cultura, de pacientes com P.V. e de pele normal de indivíduos sadios.

Silva et al. (1996) avaliaram a importância diagnóstica de *M. furfur* em material biológico através do exame microscópico direto semiquantitativo (EMDS). Este método tem como finalidade observar as amostras de *M. furfur* utilizando a coloração descrita por Cohen, 1954. Os autores estudaram 76 indivíduos, sendo: 46 pacientes com P.V., e 30 indivíduos sãos. Observaram que no exame direto todos os pacientes com P.V. apresentavam mais do que 10 a 20 células do fungo por campo.

No entanto, 100% das amostras dos indivíduos sãos apresentaram menos de 10 células por campo sendo que 90% apresentaram menos do que três células de *M. furfur* por campo. Nas amostras de pacientes com P.V., microscopicamente foram observadas leveduras agrupadas em cachos e hifas septadas, irregulares e de parede grossa, nos indivíduos sãos foram observados leveduras de morfologia globosa e oval. Os autores concluem que o EMDS é um método prático e sensível para avaliar a presença do agente na pele, evidenciando relação quantitativa direta entre *M. furfur* com a pele de indivíduos sãos e com P.V..

Em pacientes usuários crônicos de corticosteroides, transplantados renais e em desnutridos observa-se grande incidência da P.V. Como causa desta susceptibilidade sugere-se a diminuição da imunidade mediada por células (SIDRIM e DIÓGENES, 1999).

Lesões hipocrômicas ocorrem devido à produção pela levedura de ácidos dicarboxílicos que usam como substrato os lipídios da pele que vão inibir a tirosinase causando efeito tóxico sobre os melanócitos (SUNENSHINE et al., 1998).

O isolamento em cultura é realizado em meios ricos em gordura. Utiliza-se o meio de Ágar Sabouraud acrescido de óleo de oliva ou o meio seletivo de Ágar Dixon e Ágar Kimming, incubados a 37 °C durante uma semana. Após este período, observa-se crescimento de colônias leveduriformes de coloração variável do branco amarelado ao creme. No estudo microscópico da cultura, observam-se células leveduriformes, de brotamento único e com aspecto de “garrafa de boliche” (ZAITZ et al., 2000; LACAZ et al., 2002).

Botterel et al. (2000) estudaram a frequência da colonização de cateter de alimentação parenteral por leveduras do gênero *Malassezia* utilizados por pacientes com alimentação parenteral lipídica. Dos 100 cateteres analisados, leveduras do gênero *Malassezia* foram isoladas em cinco, observando a colonização por essa levedura em pacientes adultos na proporção de 5,6%. Novos estudos estão sendo realizados utilizando-se biofilme na ponta do cateter para observar a frequência de colonização pela *Malassezia*.

Arenas et al. (2001) observaram 100 casos de P.V. realizando estudos micromorfológicos e isolando leveduras do gênero *Malassezia*.

Aspiroz et al. (2002) estudaram isolados clínicos de pacientes com P.V. Todos os isolados lipofílicos foram identificados como: *M. globosa*, *M. restricta* e *M. sympodialis* seguindo os métodos descritos previamente por Guillot e Guého. As duas espécies mais freqüentemente isoladas foram *M. globosa* e *M. sympodialis*.

Balestre et al. (2000) registraram dois casos de P.V. em lactentes com lesões no tronco e na face. Os autores concluem que pode existir predisposição genética nestes casos, já que os pais dos lactantes apresentavam o mesmo tipo de lesão.

Em relação ao diagnóstico clínico, pode ser observado o aspecto das lesões, através dos Sinais de Zileri (estiramento da pele comprometida e observação de descamação fina) ou de Besnier (raspado da lesão com a unha e observação de descamação fina). Também com auxílio da lâmpada de Wood é possível observar a fluorescência verde-amarelada das lesões de P.V., permitindo avaliar a extensão das mesmas (SIDRIM e DIÓGENES, 1999; LACAZ et al., 2002).

Roza et al. (2003) realizaram estudos comparativos buscando as diferenças da P.V. no imunocompetente e no imunodeprimido pelo HIV. Avaliaram 50 pacientes HIV positivos e grupo controle de 50 indivíduos soronegativos para HIV. A P.V. foi diagnosticada clinicamente no grupo HIV positivo em sete (14%) pacientes, resultando ser igual ao grupo controle. Observaram que 12 pacientes (24%) já haviam apresentado a P.V. no grupo HIV positivo, sendo igual à frequência no grupo controle. Concluiu-se que a P.V. não se mostrou mais frequente e nem mais agressiva na população imunodeprimida pelo HIV em relação ao grupo controle. Neste mesmo estudo a dermatite seborréica apresentou-se com maior frequência no grupo de infectados pelo HIV.

Aste et al. (2002) relatam caso de um homem de 45 anos que apresentava P.V. na região inguinal, mas, as características clínicas eram de eritrasma. Os

autores destacam a importância da P.V. ser clinicamente muito parecida com o eritasma. Com a ajuda de simples exame micológico podem ser evitados erros no diagnóstico e no tratamento.

Tarazooie et al. (2004) compararam a distribuição de espécies de leveduras do gênero *Malassezia* isoladas de lesões de P.V. e de alguns isolados de pele normal. De acordo com os dados obtidos, *M. globosa* foi a espécie que mais prevaleceu na pele de indivíduos sadios com presença somente de células leveduriformes. No entanto, a forma miceliana de *M. globosa* foi isolada como espécie dominante nas lesões de P.V. A predisposição de fatores na conversão de levedura para micélio e o envolvimento na patogenicidade da P.V. for considerada.

Miranda et al. (2004) afirmam que a escolha terapêutica vai depender da extensão do quadro clínico, idade do paciente, existência de doenças concomitantes. Tratamentos tópicos são preferidos nas crianças e em pacientes que apresentem poucas lesões. Podem ser utilizados agentes ceratolíticos, como loções, xampus ou sabonetes de sulfeto de selênio, hipossulfito de sódio e o ácido salicílico. Também podem ser usados derivados imidazólicos, morfolínicos e terbinafina 1%.

O tratamento sistêmico é recomendado nos pacientes com lesões extensas ou recidivantes de P.V. ou quando ocorre intolerância à medicação tópica. O uso de drogas de amplo espectro de ação, como os derivados azólicos (cetoconazol) ou triazólicos (itraconazol ou fluconazol) é indicado. Nos pacientes tratados, a recidiva é muito freqüente, 60% no primeiro ano e 80% no segundo (ZAITZ et al., 2000).

2.9.1.2 Onicomicose

Leveduras do gênero *Malassezia* podem raramente colonizar as unhas de indivíduos que apresentem algum fator predisponente como: diabetes, dermatite seborréica, dermatite de contato, trauma ungueal ou que estejam fazendo uso de drogas imunossupressoras.

Escobar et al. (1999) isolaram como único agente de onicomicose a

Malassezia spp. em 32% dos casos, estando associada a *Candida* spp. em 30%. Em 22% dos casos, leveduras do gênero *Malassezia* foram observadas, mas não cultivadas. Casos de onicomicose por *Malassezia furfur* também foram publicados por Civita et al., 1982 e Silva et al., 1997.

2.9.1.3 Malasseziose

Guého et al. (1998) em recente revisão bibliográfica, descrevem o papel ecológico e patogênico das espécies de levedura do gênero *Malassezia*. Frequentemente, as espécies lipo-dependente isoladas de pele hígida de humanos ou animais, na presença de fatores predisponentes, podem desencadear doença. *M. furfur* está associada às pústulas neonatais e septicemias em pacientes imunocomprometidos, semelhantes à *M. pachydermatis*. Foram observados quadros fatais de doença invasiva em neonatos com alimentação parenteral. A *Malassezia furfur* é também a principal espécie envolvida nos casos de P.V. e de dermatite seborréica em humanos, no entanto, as demais espécies como a *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. restricta* e *M. slooffiae* já foram associadas a estas dermatoses.

Em determinadas condições clínicas, a colonização por leveduras do gênero *Malassezia* pode evoluir para uma fungemia, podendo acometer crianças de baixo peso como em adultos debilitados (ZAITZ et al., 2000). Em crianças a colonização pela levedura pode ocorrer através de cateteres utilizados para alimentação parenteral com suplemento lipídico. A remoção do cateter contaminado é suficiente para limitar a infecção.

Morrisson e Weisforf (2000) estudando transplantados de medula óssea, observaram que seis pacientes desenvolveram infecções causadas por leveduras do gênero *Malassezia* num período de 59 dias após o transplante. Em pacientes imunocomprometidos é comum a infecção por *Malassezia*, no entanto a retirada do cateter e o início do tratamento com medicamentos de largo espectro é importante para a cura dos pacientes.

Alves et al. (2000) descrevem a foliculite pitirospórica, que é caracterizada

pela presença de pápulas e pústulas pruriginosas na região da face e parte superior do tronco. Sua incidência pode estar associada com estado de imunossupressão.

Kessler et al. (2002,)relatam caso de criança prematura que desenvolveu tromboembolia periférica associada com endocardite causada por fungemia pela *Malassezia furfur*.

Virgili et al. (2002) observaram em pacientes transplantados, manifestações clínicas causadas por vários tipos de fungo entre eles, leveduras do gênero *Malassezia*.

Chu et al. (2002) relataram caso de paciente dependente de ventilação que desenvolveu fungemia por leveduras do gênero *Malassezia*.

As únicas espécies que foram identificadas como causa de doença sistêmica são a *M. furfur* e *M. pachydermatis* (CHEN et al., 2005).

Em trabalho de revisão sobre dermatoses associada às leveduras do gênero *Malassezia*, Weary et al., 1969, observaram P.V., foliculite pitirospórica, D.S., D.A., papilomatose confluenta e reticulada, psoríase, pustulose neonatal, obstrução do canal lacrimal e formas disseminadas.

2.10 Outras Dermatoses associadas às leveduras do gênero *Malassezia* sem infecção

Leveduras do gênero *Malassezia* podem ser encontradas em casos de otites, psoríase e acne, conforme relatos na literatura (ASHBEE et al., 2002; CHEN et al., 2005).

2.10.1 Dermatite Seborréica

A dermatite seborréica é dermatose de distribuição mundial, caracterizada por inflamação e descamação em áreas ricas em glândulas sebáceas como: couro

cabeludo, face e tronco (CHEN et al. 2005) (Fig 5).

Indivíduos acima dos 40 anos e do sexo masculino são o grupo mais atingido. Nos indivíduos HIV soropositivos e em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida, a frequência é em torno de 80% (ZAITZ et al., 2000; SCHLOTTFELDT et al., 2002).

É doença multifatorial onde as leveduras do gênero *Malassezia* podem contribuir para sua exacerbação.

As espécies mais isoladas em pacientes com D.S. são *M. furfur*, *M. globosa* e *M. sympodialis*, sendo as duas primeiras as mais freqüentes (CHEN et al., 2005).

Moore, em trabalhos de 1936 e 1940, foi um dos primeiros pesquisadores a correlacionar *M. furfur* com a D.S..

Silva Vargas (1995) estudando *Malassezia furfur*, verificou a ocorrência desta levedura em pacientes com D.S. e psoríase.

Piérard-Franchimont et al. (1998) compararam a quantidade das leveduras do gênero *Malassezia* com a gravidade da seborréia. Analisaram os pacientes antes e depois do emprego de “shampoo” de cetoconazol a 1%, que foi utilizado diariamente em 20 pacientes, durante 6 semanas, demonstrando que o tratamento diminui de modo significativo, o número de microorganismos, considerados pelos autores como comensais.

Nakabayashi et al. (2000) identificaram em 42 isolados de pacientes com D.S., 17 com D.A., 22 com P.V., 35 indivíduos normais e em 73 estudantes de medicina que não apresentavam nenhum tipo de lesão de pele, espécies de leveduras do gênero *Malassezia*. A frequência de *Malassezia spp* encontrada nos 35 indivíduos normais foi: *Malassezia globosa* 22%, *M. sympodialis* 10% e *M. furfur* 3%. *M. slooffiae*, *M. pachydermatis*, *M. restricta* e *M. obtusa* não foram isoladas com frequência de pele normal. Nos pacientes com D.A. a *M. furfur* foi isolada com maior

frequência de lesões (21%) do que de pele íntegra (11%). Os resultados obtidos são insuficientes para considerar a *Malassezia furfur* um fator de exacerbação da D.A. Na D.S., *M. furfur* (35%) e *M. globosa* (22%) foram isoladas de lesões da face, apresentando significância quando comparada aos resultados obtidos a partir de escamas de indivíduos sãos.

M. furfur e/ou *M. globosa* são consideradas patógenos da P.V.. *M. globosa* foi isolada em 55% das lesões de P.V. enquanto todas as outras espécies apenas em 10%. Os autores sugerem que, neste estudo, *M. globosa* pode ser considerada espécie patogênica da P.V..

Rendic et al. (2003) analisaram raspados de pele de 81 pacientes com D.S., e 79 indivíduos normais. *Malassezia* spp foi isolada em 76% dos pacientes com D.S. e 82% nos indivíduos normais, Quatro espécies de *Malassezia* foram identificadas: *M.globosa* foi encontrada em 67% dos pacientes seguida de *M.furfur* e *M.pachydermatis*. Nos indivíduos normais, *M.globosa* foi a espécie com maior frequência de isolamento (77%), seguida de *M.ympodialis* (12%), *M.slooffiae* (7%) e *M.furfur* (4%). Os autores concluem que a presença de *Malassezia* spp, não está associada à etiologia da D.S..

2.10.2 Papilomatose Confluente e Reticulada de Gourgerot–Carteaud

Considerada doença benigna rara e de etiologia desconhecida. Foi descrita inicialmente em 1927 por Gourgerot e Carteaud. É caracterizada pelo aparecimento de pápulas verrucosas de tamanho pequeno, localizadas inicialmente no pescoço e tronco, estendendo-se na forma de grandes placas pigmentadas que podem se confluir dando um aspecto reticular (Fig 6). Geralmente ocorre na puberdade, predominando no sexo feminino e na raça negra (ACAR et al., 2002).

O diagnóstico é feito através de exames clínicos e histopatológicos. Em alguns pacientes, ao exame micológico, podem ser encontradas células leveduriformes de *Malassezia* spp, porém, seu encontro não está associado à etiologia da doença (ZAITZ et al., 2000).

2.10.3 Dermatite Atópica

Resposta de IgE no organismo pode ser pesquisada usando testes intradérmicos, prick-test e ELISA. Seis espécies de *Malassezia* já foram isoladas de pacientes com dermatite atópica: *M. furfur*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. globosa*, *M. sympodialis* e *M. dermatis*. Em pacientes atópicos, com resposta de hipersensibilidade para leveduras do gênero *Malassezia*, a terapia antifúngica pode ser incluída no tratamento (NAKABAYASHI et al., 2000; GUPTA et al., 2001; CHEN et al., 2005).

Segundo Zaitz et al (2000) o significado do isolamento de *Malassezia* spp em indivíduos com dermatite atópica é controversa.

Figura 1- Microfotografias eletrônicas de varredura de várias espécies de *Malassezia* (GUILLOT et al., 1996).

- A) e B) *M. furfur*, formas globosa e elíptica respectivamente;
 C) *M. pachydermatis*;
 D) *M. sympodialis*;
 E) *M. globosa*;
 F) *M. obtusa*;
 G) *M. restricta*;
 H) *M. slooffiae*.

Figura 2- Região das costas evidenciando lesões típicas de Pitiríase Versicolor.

Figura 3- Lesões Hipocrômicas de Pitiríase Versicolor.

Figura 4- Pitiríase Versícolor, lesões na face.

Figura 5- Couro cabeludo com descamação típica de Dermatite Seborréica.

Figura 6- Placas hiperpigmentadas e hiperqueratóticas de Gougerot – Carteaud.

3. OBJETIVOS

Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Analisar a distribuição de *Malassezia* spp. recuperada a partir de escamas obtidas de pacientes com diferentes dermatoses e de indivíduos aparentemente saudáveis, utilizando métodos morfológicos, bioquímicos e moleculares (PCR e PCR/FLP).

3.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar o isolamento de *Malassezia* spp. comparando o emprego dos meios: a) ágar Sabouraud/dextrose acrescido de 1% de óleo de oliva e bile de boi; b) ágar Dixon modificado; c) ágar Kimming e d) ágar Dixon/Kimming;
2. Avaliar a frequência de *Malassezia* spp. na pele de indivíduos portadores de Pitíriase versicolor, Dermatite seborréica, Síndrome de Gourgerot-Carteaud e de indivíduos aparentemente saudáveis, através de métodos bioquímicos;
3. Genotipar amostras clínicas de leveduras do gênero *Malassezia* identificadas pelos métodos bioquímicos;
4. Comparar os resultados obtidos pelos dois métodos e determinar sua importância na pesquisa clínica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Esquema Metodológico

4.2 Material

Durante o período de junho de 2005 á outubro de 2006, foi utilizado material de 85 pacientes, obtido a partir de escamas de pele. Os pacientes apresentavam diferentes dermatoses: 58 - Pitiríase versicolor, 25 - Dermatite seborréica e 02 - Síndrome de Gourgerot-Carteaud. Neste período, quinze amostras obtidas a partir de escamas de pele de indivíduos aparentemente sadios, também foram estudadas. No grupo estudado a faixa etária foi dos 17 aos 65 anos, sendo 60 do sexo masculino e 40 do feminino.

As amostras foram coletadas nos Departamentos de Dermatologia do Hospital das Clínicas / FMUSP e na Clínica de Dermatologia da Santa Casa de São Paulo. Todos os pacientes eram procedentes de diversas regiões do Estado de São Paulo.

4.3 Métodos Convencionais

4.3.1 Coleta

Quatro amostras de escamas de diferentes regiões do corpo foram coletadas.

4.3.2 Identificação das leveduras

A identificação das espécies de leveduras do gênero *Malassezia* foi realizada através de provas micro e macromorfológicas, bioquímicas e moleculares (PCR/RFLP).

4.3.2.1. Identificação Micro e Macromorfológica

Exame direto de todas as amostras foi realizado utilizando KOH 20% e fita adesiva (método de Jarbas Porto) com lactofenol azul de algodão.

O material analisado foi semeado em quatro meios diferentes de cultura:

- ✓ ágar Sabouraud /dextrose acrescido de 1% de óleo de oliva e bile de boi;
- ✓ ágar Dixon modificado;
- ✓ ágar Kimming;
- ✓ ágar Dixon/Kimming (mistura dos dois meios).

Todas as amostras foram mantidas em temperaturas de 30, 32 e 37°C por no máximo 15 dias. Avaliaram-se as características desta levedura: lisas ou levemente pregueadas, brilhantes ou opacas e, variações na coloração.

4.3.2.2. Provas Bioquímicas

Em todas as amostras identificadas micro e macromorfológicamente para *Malassezia* spp foram realizadas provas bioquímicas.

4.3.2.2.1 Teste da Catalase

Adicionamos peróxido de hidrogênio (10 vol.) em esfregaço de cultura na lâmina de vidro ou diretamente sobre um fragmento da cultura. Produção de bolhas de gás indicou reação positiva.

4.3.2.2.2 Hidrólise da Esculina

Foram semeados pequenos fragmentos das leveduras cultivadas no meio Dixon/Kimming em caldo-esculina e mantidas a 30 - 37 °C, durante 5-10 dias. As amostras que foram positivas hidrolisaram através da atividade da β -glicosidase, a esculina em esculetina e observou-se o escurecimento do meio.

4.3.2.2.3 Teste do Tween

Utilizamos quatro tipos de ácidos graxos: Tween 20 (Polioxietileno sorbitano monolaurato), Tween 40 (Polioxietileno sorbitano monopalmitato), Tween 60

(Polioxietileno sorbitano laurato) e Tween 80 (Polioxietileno sorbitana monoléico).

Preparamos suspensão das leveduras (10^5 células/ ml) em 2 ml de água destilada estéril, que foi misturada a 60 ml de ágar Sabouraud-dextrose resfriado a 45 °C, e colocado em placa de Petri.

Após a solidificação do meio de cultura, foram feitas quatro cavidades de ($\pm$ 6 mm) eqüidistantes uma da outra, com o auxílio da base de ponteiros de 100 μ l estéreis cortadas no meio. Identificou-se cada cavidade de aproximadamente 6 mm no reverso da placa com os diferentes tipos de Tween e no orifício colocou-se 5 μ l do Tween correspondente à marcação (20, 40, 60 e 80).

As placas foram incubadas a 32°C durante uma semana para então observar a presença ou não de halo ao redor de cada cavidade.

4.4 Identificação Molecular

Entre as 55 amostras positivas para *Malassezia* spp oriundas de pacientes, selecionamos 23 para serem estudadas através de PCR/RFLP, assim distribuídas: 17 P.V., 04 D.S. e 02 GC.

4.4.1 Preparação das leveduras

As colônias identificadas como leveduras do gênero *Malassezia*, foram cultivadas em 35 ml de caldo Dixon/ Kimming em tubos Falcon e, mantidas a 35 °C sob agitação durante 7 a 10 dias.

As células foram lavadas e centrifugadas cinco vezes com 90 mM de Tris, 90 mM de ácido bórico, 2 mM de EDTA (pH 8,0) a 1000 g por 10 minutos. Todas as culturas foram analisadas através de exame direto com lactofenol azul de algodão.

Destas células obtivemos protoplastos através da digestão da parede das

leveduras utilizando a mistura de: 60 mg/ml de *Trichoderma harzianum* (Sigma), 160 mM de EDTA (pH 8,0); 250 mM de sorbitol (pH 6,5) e 50 mM de β – mercaptoetanol, que foram incubadas a 37 °C por 2 a 3 horas. A cada 30 minutos os tubos contendo o preparado com pérolas de vidro foram misturados e vortexados.

Após a incubação, os protoblastos foram centrifugados e lavados duas vezes no mesmo tampão por 10 minutos e estocadas a -20 °C até a extração do DNA.

4.4.2 Purificação do DNA

Os protoplastos foram digeridos em tampão de lise, contendo 10 mM de Tris-HCl (pH 8,0); 10mM de EDTA; 0,5% de SDS; 0,01% de N-laurilsarcozil e 100µg/ml de proteinase K e incubados a 56°C até completar a lise das células em torno de 1-2 horas.

O DNA foi extraído pelo método de fenol/ clorofórmio/ álcool isoamílico e precipitado pelo isopropanol. Após lavagem com etanol a 70% por 10 minutos a 10,000g obtivemos pellet de aproximadamente 20 µg/ml. As concentrações de DNA das amostras de leveduras do gênero *Malassezia* foram determinadas através da densidade óptica (O.D.) em 260nm.

4.4.3 PCR – RFLP

A amplificação foi realizada com kit da Amersham-Pharmacia – Biotech que contém PCR já liofilizado composto de 1.5 unidades de *Taq* DNA polimerase, 10 mM de Tris-HCL (pH 9,0); 50 mM de KCL; 1,5 mM de $MgCl_2$ e 200 mM de dNTPs.

Para cada reação utilizamos 85-90 ng/µl de cada amostra de DNA e 50 p. moles de cada primer em um volume total de 25 µl.

A seleção dos primers e enzima de restrição para a digestão e amplificação dos produtos analisados foram baseadas em estudos prévios.

Os primers utilizadas foram: sense (5'TAACAAGGATTCCCCTAGTA3') e antisense (5'ATTACGCCAGCATCCTAAG3'), estes amplificam a região conservada de 26S rDNA do gene de leveduras do gênero *Malassezia* (MIRHENDI et al., 2005).

A reação foi processada em termociclados (Techne-Progene) tendo 30 ciclos; 1 ciclo de 5' – 95 °C; seguido de 30 ciclos de desnaturação de 1' – 95 °C; 30 ciclos de anelamento de 1' – 55 °C; 30 ciclos de extensão de 1' – 72 °C e 1 ciclo de extensão de 5' – 72 °C.

Para cada corrida de amplificação foram utilizados dois controles negativos: um com DNA purificado de *Cryptococcus neoformans* e o outro com água ultrapura (Mili Q).

4.4.4 Eletroforese em gel de agarose

A estimativa do tamanho dos fragmentos obtidos pela amplificação do DNA das amostras foi realizada através da técnica de PCR-RFLP.

Para determinar as diferentes espécies de *Malassezia*, produtos do PCR foram digeridos com *Hha-I* seguindo as instruções do fabricante. Os produtos do PCR e a digestão - restrição dos fragmentos foi realizada em 2% de gel de agarose e em tampão TBE [1x]. A mistura foi dissolvida por aquecimento em forno microondas, vertida na cuba de eletroforese horizontal, e adicionada de brometo de etídio (2 µl) da solução estoque. Foram feitos os poços no gel, o DNA das amostras foi diluído em tampão de corrida TBE [1x] contendo glicerol, xilenocianol e azul de bromofenol e então realizada a corrida (SAMBROOK et al., 1989).

Além de usar dois controles negativos, um dos poços do gel foi reservado ao marcado de peso molecular de 100 pb (Invitrogen).

A corrida eletroforética de 100 v foi realizada utilizando tampão TBE [1x] dos produtos da digestão que foram obtidos, sendo de 400 m num período de 40 minutos.

A visualização dos fragmentos de DNA foi realizada em transluminador de luz ultravioleta (UV), com comprimento de onda de 302 nm, e o gel foi fotografado utilizando o programa Gene Snap – Syngene.

5. RESULTADOS

5.1 Identificação Morfológica das amostras de *Malassezia* spp.

5.1.1 Exame direto

A micromorfologia ao exame direto, utilizando tanto KOH 20% como fita adesiva (método de Jarbas Porto), quando positivo (Fig 7 e Fig 8), revelou a presença de blastoconídios agrupados em cachos e presença de hifas curtas e grossas.

Das amostras obtidas de 85 pacientes, em apenas 55 obtivemos positividade para *Malassezia* spp, assim distribuídos: 34 com P.V., 19 com D.S. e 02 com Gougerout Carteaud.

Das amostras obtidas de quinze indivíduos aparentemente saudáveis, em apenas 10 obteve-se positividade para a levedura.

Figura 7 - Exame direto de raspado de pele. KOH 20% positivo para *Malassezia spp*

Figura 8 - Exame direto de raspado de pele, coloração lactofenol azul de algodão. Presença de leveduras em cachos e hifas curtas e grossas.

5.1.2 Cultura

Todas as amostras positivas, ao exame direto, obtidas dos 55 pacientes estudados, cresceram em cultura.

Das amostras positivas ao exame direto obtidas de 10 indivíduos aparentemente saudáveis, em apenas 8 houve crescimento em cultura.

5.1.2.1 Em ágar Sabouraud/dextrose acrescido de 1% de óleo de oliva e bile de boi

No meio de ágar Sabouraud/ dextrose acrescido de 1% de óleo de oliva e bile de boi, nas temperaturas de 30, 32 e 37°C, o tempo de crescimento observado, foi em torno de 15 dias. Macroscopicamente observaram-se colônias secas, opacas e de coloração bege características das leveduras do gênero *Malassezia*.

5.1.2.2 Em ágar Dixon modificado

No meio de ágar Dixon modificado, nas temperaturas de 30, 32 e 37°C, o tempo de crescimento observado, foi de 10 a 15 dias. Macroscopicamente observaram-se colônias secas, opacas e de coloração bege características das leveduras do gênero *Malassezia*.

5.1.2.3 Em ágar Kimming

No meio de ágar Kimming, nas temperaturas de 30, 32 e 37°C, o tempo de crescimento observado, foi em torno de 15 dias. Macroscopicamente observaram-se colônias secas, opacas e de coloração bege características das leveduras do gênero *Malassezia*.

5.1.2.4 Em ágar Dixon/Kimming (associação de dois meios de cultura)

Devido à demora para o crescimento das culturas nos meios tradicionais,

decidimos tentar a fusão do meio de Dixon modificado com o meio Kimming para semearmos as amostras nas mesmas temperaturas já utilizadas. Após 7-10 dias observamos o crescimento de colônias típicas de *Malassezia* spp (Tabela 2 e Fig 9, Fig 10, Fig 12, Fig 13 e Fig 14).

5.2 Identificação Bioquímica das amostras de *Malassezia* spp.

Em todas as amostras estudadas de 55 pacientes, nas quais *Malassezia* spp foi isolada tanto pelos métodos micromorfológicos como macromorfológicos, realizamos as provas de Catalase, Esculina e Tween (Fig 11). Estas provas bioquímicas também foram realizadas nas oito amostras isoladas em cultura de indivíduos aparentemente saudáveis.

Nas 34 amostras isoladas de pacientes com P.V. identificamos 18 *M. furfur* (53%), 07 *M. globosa* (20,6%), 08 *M. sympodialis* (23,5%) e 01 *M. slooffiae* (3,0%). (Tabelas 1)

Nas 19 amostras isoladas de pacientes com D.S. identificamos 12 *M. furfur* (63,1%), 02 *M. globosa* (10,6%), 04 *M. sympodialis* (21%) e 01 *M. slooffiae* (6,7%).

Nas 02 amostras de pacientes com Síndrome de Gourgerout-Carteaud, identificamos *M. furfur* e *M. sympodialis*.

Nas 08 amostras isoladas em cultura de indivíduos aparentemente saudáveis identificamos *M. furfur* em todas as amostras (Tabela 1).

5.3 Identificação através das técnicas de PCR e FFLP

5.3.1. Comparações entre as amostras identificadas pelos Métodos Convencionais e Moleculares

Os métodos convencionais e moleculares foram compatíveis em 19 das 23 amostras de leveduras do gênero *Malassezia* estudadas (Fig 15).

M. furfur foi identificada em 11 amostras, *M. sympodialis* em 04, *M. globosa* em 03 e *M. slooffiae* em 01 amostra.

Em 04 amostras de leveduras do gênero *Malassezia*, a identificação pelos métodos convencionais não foi compatível com a identificação determinada pela técnica de PCR/RFLP. Duas amostras, classificadas pelos métodos convencionais como *M. furfur* e uma como *M. obtusa*, na técnica de PCR/ RFLP foram genotipadas como *M. sympodialis*. O mesmo ocorreu em uma amostra classificada com *M. sympodialis* que foi genotipada como *M. furfur* (Tabela 4).

A *M. furfur* foi a espécie mais isolada: 12 pacientes, sendo 08 com P.V., 03 com D.S. e 1 com síndrome de Gourgerot-Cardaud. *M. sympodialis* foi isolada em 7 pacientes, sendo 05 com P.V., 01 com D.S. e 01 com síndrome de Gourgerot-Cardaud (Tabela 3). Em 04 pacientes com P.V. *M. globosa* foi identificada em 3 e *M. slooffiae* em um.

Figura 9 - Colônias de *Malassezia* spp após cinco dias de crescimento em ágar Dixon/Kimring incubadas a 37 °C.

Figura 10 - Colônia de *Malassezia furfur* em ágar Dixon/Kimring.

Figura 11 - Teste do Tween para *Malassezia furfur* (crescimento em todas as fontes de lipídeos).

Figura 12 - *Malassezia globosa*.

Figura 13 – *Malassezia sympodialis*.

Figura 14 – *Malassezia obtusa*.

Tabela 1 - Distribuição das espécies isoladas de leveduras do gênero *Malassezia* das 55 amostras identificadas, com método bioquímico, nas diferentes dermatoses estudadas e das oito amostras obtidas a partir de indivíduos aparentemente saudáveis.

Espécie de Leveduras do Gênero <i>Malassezia</i>	Pacientes com Pitiríase Versicolor (63 / 34)	Pacientes com Dermatite Seborréica (63 / 19)	Pacientes com Gougerout-Cardéaud (63 / 2)	Pacientes Aparentemente Saudáveis (63 / 8)
<i>M. furfur</i>	18 (53%)	12 (63,1%)	01 (3,6%)	08 (100%)
<i>M. sympodialis</i>	08 (23,5%)	04 (21%)	01 (3,6%)	----
<i>M. globosa</i>	07 (20,6%)	02 (10,6%)	----	----
<i>M. slooffiae</i>	01 (3,0%)	01 (5,3%)	----	----
TOTAL	34	19	02	08

Tabela 2 - Comparação entre as temperaturas de incubação das amostras de leveduras do gênero *Malassezia* nos quatro meios utilizados. Avaliação do crescimento nas diferentes dermatoses e nos indivíduos aparentemente saudáveis.

Amostras	1) Ágar Sabouraud Dextrose e 1% de Óleo de Oliva e Bile de Boi			2) Ágar Dixon			3) Ágar Kimming			4) Ágar Dixon/Kimming		
	30°C	32°C	37°C	30°C	32°C	37°C	30°C	32°C	37°C	30°C	32°C	37°C
Pitiríase											+	+
Versicolor	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		+	+		+	+					+	+
Dermatite		+	+		+	+		+	+		+	+
Seborreica	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
					+	+		+	+		+	+
Gougerot-Carteaud	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
Indivíduos											+	+
Aparentemente	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+
Sadios											+	+

(-) ausência de crescimento

(+) crescimento fraco

(++) crescimento moderado

(+++) excelente crescimento

Tabela 3 - Distribuição das leveduras do gênero *Malassezia* nas diferentes dermatoses de acordo com a genotipagem realizada através de PCR/RFLP nas 23 amostras selecionadas.

Espécies de Leveduras do Gênero <i>Malassezia</i>	Pitíriase Versicolor	Dermatite Seborréica	Síndrome de Gougerot-Carteaud
<i>M. furfur</i>	03	0	0
<i>M. sympodialis</i>	08	03	01
<i>M. globosa</i>	01	0	0
<i>M. slooffiae</i>	05	01	01
TOTAL	17	04	02

Tabela 4- Concordâncias e discordâncias observadas através da comparação do método bioquímico com PCR e PCR/RFLP das 23 amostras clínicas de *Malassezia* spp.

	Métodos	Total	Identificação das Espécies de <i>Malassezia</i>				
			<i>M. furfur</i>	<i>M. sympodialis</i>	<i>M. slooffiae</i>	<i>M. obtusa</i>	<i>M. globosa</i>
Concordância	Bioquímicos e PCR	19	11	04	01	0	03
	Bioquímicos		02 ^a	02 ^a 01 ^b	0	01 ^c	0
Discordância		04					
	PCR/ RFLP		01 ^b	01 ^c	0	0	0

(^a) amostras classificadas fisiologicamente como *M. furfur* e genotipadas como *M. sympodialis*;

(^b) amostras classificadas fisiologicamente como *M. sympodialis* e genotipada como *M. furfur*;

(^c) amostras classificadas fisiologicamente como *M. obtusa* e genotipada como *M. sympodialis*.

Figura 15 - Identificação das amostras de *Malassezia* spp através de PCR /RFLP.

Canaletas 1 e 7 - padrão de peso molecular de 100pb;
Canaleta 2 - produtos do PCR de 580 pb;
Canaletas 3 – 6 - produtos do PCR após digestão com *HhaI*;
Canaleta 3 - *M. sympodialis*;
Canaleta 4 - *M. slooffiae*;
Canaleta 5 - *M. furfur*;
Canaleta 6 - *M. globosa*.

6. DISCUSSÃO

Discussão

Existem poucos estudos brasileiros que procuram isolar e identificar leveduras do gênero *Malassezia* em nosso meio, tanto através das técnicas convencionais como com as moleculares, em indivíduos aparentemente saudáveis e em pacientes com dermatoses a elas relacionadas.

Na literatura internacional atual, podemos encontrar publicações de vários grupos que estudam *Malassezia* spp. com técnicas moleculares e que têm isolado e caracterizado novas espécies da levedura.

As espécies de leveduras do gênero *Malassezia* são semelhantes entre si, podendo ser diferenciadas através de testes morfológicos e bioquímicos (GUILLOT et al., 1996; MAYSER et al., 1997). Estes testes permitem a observação de diferenças morfológicas e de atividade enzimática entre as espécies.

Através de técnicas moleculares é possível, cada vez mais, detectar diferenças e características do DNA de diferentes espécies da levedura, o que é difícil apenas utilizando as técnicas convencionais (BOEKHOUT et al., 1998; GUPTA et al., 2000).

O meio inicialmente utilizado para o isolamento de *Malassezia* spp. é o meio de Sabouraud dextrose acrescido de 1% de óleo de oliva (LACAZ et al., 2002). Segundo Guillot et al., 1996, leveduras do gênero *Malassezia* crescem e podem ser bem mantidas em ágar Dixon. Quando iniciamos o trabalho, utilizamos quatro diferentes meios: Sabouraud dextrose acrescido de 1% de óleo de oliva e bile de boi; ágar Dixon modificado; ágar Kimming e ágar Dixon/Kimming, nas temperaturas de 30°C, 32°C e 37°C. Pudemos observar crescimento de maior número de culturas em menor tempo quando utilizamos ágar Dixon/Kimming na temperatura de 37°C. Decidimos então padronizar o ágar Dixon/Kimming para a caracterização morfológica das leveduras em nosso estudo.

Todas as 55 amostras, obtidas de pacientes com dermatoses relacionadas às leveduras do gênero *Malassezia*, positivas ao exame direto, cresceram no meio Dixon/Kimming a 37°C, enquanto das 10 amostras positivas ao exame direto,

oriundas de indivíduos aparentemente saudáveis, em apenas oito foi possível observar crescimento em cultura. O tempo médio de crescimento das culturas, de sete a 10 dias, foi considerado excelente, quando comparado ao tempo de crescimento obtido com a utilização dos outros meios. A mistura dos dois ágar tornou o meio mais rico em lípidos, o que pode explicar os resultados preliminares por nós obtidos.

Utilizamos a técnica bioquímica de Tween para identificação das amostras que cresceram no ágar Dixon/Kimming. Através delas foi possível identificar todas as 64 amostras de leveduras estudadas: 55 obtidas de pacientes com diferentes dermatoses relacionadas às leveduras do gênero *Malassezia* e oito de indivíduos aparentemente saudáveis.

Analisando-se trabalhos realizados em diferentes partes do mundo com o objetivo de determinar a frequência de isolamentos de espécies de *Malassezia*, podemos confirmar que as diferentes espécies da levedura sofrem influência de condições climáticas para predominarem em uma ou outra região. A frequência de isolamento desta levedura não depende apenas de condições climáticas, mas também de fatores sócio-econômicos e ocupacionais para seu desenvolvimento (GUILLOT et al., 1996; GUÉHO et al., 1998).

A maioria dos trabalhos realizados na Europa (CRESPO-ERCHIGA et al., 1999; CRESPO-ERCHIGA et al., 2000; GUPTA et al., 2001; ASPIROZ et al., 2002; DUTTA et al., 2002; NAKABAYASHI et al., 2002), mostram a predominância da *Malassezia globosa* em pacientes com P.V. e com D. S.. Outros trabalhos utilizando técnicas bioquímicas e moleculares também mostram que *Malassezia globosa* é a espécie que prevalece em amostras clínicas de pacientes com pitíriase versicolor (GUPTA et al., 2004; MORISHITA et al., 2005).

Já, em trabalhos semelhantes realizados no Canadá, a frequência de *Malassezia sympodialis* predominou em pacientes com P.V..

Em nosso estudo, das 34 amostras obtidas de pacientes com P.V. obtivemos, através do teste de Tween, *Malassezia furfur* em 53% (18/34) das

amostras, seguida de *Malassezia sympodialis* em 23,5% (08/34), *Malassezia globosa* em 20,5% (07/34) e *Malassezia slooffiae* em 3% (01/34).

A P.V. é considerada infecção por leveduras do gênero *Malassezia* pois, ao exame direto de escamas da dermatose, encontramos tanto células leveduriformes como pseudo filamentos. As Malassezioses, também são infecções por estas leveduras. Outras dermatoses estão relacionadas às leveduras, mas a relação não é de infecção e sim de maior ou menor colonização devido a fatores patogênicos destas dermatoses.

Estudamos também pacientes com duas dermatoses nas quais as leveduras do gênero *Malassezia* estão aumentadas em número: Dermatite seborréica e Síndrome de Gougerot-Carteaud. Nos 19 casos de D.S. a prevalência de *Malassezia furfur* foi de 63,1% (12/19), seguida de *Malassezia sympodialis* em 21% (04/19), *Malassezia globosa* em 10,6% (02/19) e *Malassezia slooffiae* em 5,3% (01/19). Nas amostras obtidas de dois pacientes com Síndrome de Gougerot-Carteaud isolamos *Malassezia furfur* e *Malassezia sympodialis*.

Nossos resultados foram diferentes dos trabalhos europeus, mostrando prevalência da *Malassezia furfur* na P.V. e na D.S., nas amostras estudadas. Provavelmente isto se deve ao clima subtropical em que vivemos.

Pequenas diferenças entre algumas espécies de leveduras do gênero *Malassezia*, são difíceis de serem distinguidas através dos métodos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos, como por exemplo, o que utiliza o teste de Tween (KWON-CHUNG et al., 1992; WARREN et al., 1993, e MAKIMURA et al., 2000). Uma possibilidade de resolver essas ambiguidades seria a utilização de testes bioquímicos adicionais como a adição de Cremophor-EL e a caracterização da atividade de β -glicosidase (MAYSER et al., 1997).

A identificação das espécies de *Malassezia*, baseada no estudo de suas características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas não resolve problemas de ambigüidades que algumas espécies apresentam, podendo levar à interpretações

errôneas. Devido a estas dificuldades, muitos grupos de investigação têm desenvolvido metodologias de identificação baseadas nas técnicas moleculares. (GUISIANO et al., 2003).

Vários métodos moleculares para a caracterização de espécies de leveduras do gênero *Malassezia* tem sido utilizados. A eletroforese em campo pulsátil (PFGE) tem diferenciado sete diferentes cariótipos. No entanto, é método trabalhoso devido ao longo tempo necessário para sua padronização, não podendo ser utilizado como método de rápido diagnóstico (SENCZEK et al., 1999).

A técnica de polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) e a análise de produtos gerados pela amplificação aleatória de DNA (RAPD) podem ser utilizadas para a subtipagem e diferenciação entre amostras de *Malassezia*. Os resultados são de difícil interpretação e pouco confiáveis (THEELEN et al., 2001).

A utilização da técnica de PCR/RFLP mostrou-se eficiente para detectar pequenas diferenças existentes entre espécies de *Malassezia* spp. (GUPTA et al., 2000; SUGITA et al., 2001; SUGITA et al., 2002; GIUSIANO et al., 2003; SUGITA et al., 2003 e MIRHENDI et al., 2005).

A PCR/RFLP por ser de execução rápida e econômica além de se mostrar útil em pacientes terminais. Tem sido utilizada recentemente na identificação de diferentes microorganismos, tanto em estudos epidemiológicos como de avaliação de novas drogas. Alguns trabalhos podem ser citados com parasitas: *Leishmania* spp, *Giardia* spp, *Toxoplasma gondii*; bactérias: *Mycoplasma avium*; vírus: *Coxsackie B* e outras leveduras: *Cryptococcus neoformans* (CURRIE et al., 1994; GRIGG e BOOTHROID, 2001; LATOUCHE et al., 2003; VOLPINI et al., 2003; READ et al., 2004; PATEL et al., 2004; BERTRAND et al., 2005; KHAN et al., 2005 e SEQUEIRA et al., 2005).

Trabalhos que genotipam leveduras do gênero *Malassezia* com PCR/RFLP também são encontrados na literatura: Guillot et al., 2000; Gupta et al., 2000;

Gaitanis et al., 2002, e Mirhendi et al., 2005.

A técnica de PCR/RFLP é método rápido para diferenciação molecular das espécies de leveduras do gênero *Malassezia* e pode ser usado para complementar o diagnóstico convencional principalmente, quando os isolados forem atípicos (GUILLOT et al., 2000; HIRAI et al., 2004 e MIRHENDI et al., 2005).

Decidimos então, comparar os resultados por nós obtidos com as provas bioquímicas e as possíveis concordâncias e discordâncias com técnicas moleculares de PCR/RFLP. Para tanto selecionamos 23 das 55 amostras oriundas de pacientes com dermatoses relacionadas às leveduras do gênero *Malassezia*.

O método bioquímico de Tween, descrito por Guého et al., em 1996, e, por nós utilizados foi bastante sensível. Os resultados foram concordantes com a genotipagem através do PCR/RFLP em 83%. Os 17% de discordância que obtivemos correspondem a quatro das 23 amostras testadas: duas amostras identificadas bioquimicamente como *M. furfur* e uma como *M. obtusa* que foram genotipadas como *M. Sympodialis* e uma identificada como *M. sympodialis* genotipada como *M.furfur*. Essa discordância pode ser explicada pelo fato das três espécies serem fisiologicamente semelhantes (GUILLOT et al., 1996; GUPTA et al., 2000).

As principais desvantagens da técnica que pudemos observar são: ser extremamente trabalhosa, a inexistência de uma biblioteca de sondas disponíveis e o alto custo para sua realização.

Acreditamos que para identificação de leveduras do gênero *Malassezia* devemos utilizar os métodos convencionais (exame direto, testes fisiológicos e bioquímicos). As técnicas moleculares, devido às suas desvantagens, só poderão ser incluídas na rotina laboratorial quando estudos clínicos laboratoriais demonstrarem que sua utilização traz algum benefício na evolução clínica dos pacientes.

Os resultados por nós obtidos são inéditos, sugerindo que o PCR/RFLP, pode ser usado em estudos epidemiológicos e clínicos. Essa metodologia apesar de ser trabalhosa, é prática e eficiente para a identificação das espécies de leveduras do gênero *Malassezia*.

7. CONCLUSÕES

1. O isolamento de *Malassezia* spp, no material obtido de 55 pacientes e 10 indivíduos aparentemente saudáveis, nas temperaturas 30°C, 32°C e 37°C mostrou crescimento mais eficiente das leveduras e em menor tempo (7 a 10 dias) no ágar Dixon/Kimming, quando comparado ao crescimento observado nos meios de ágar Sabouraud / dextrose acrescido de 1% de óleo de oliva e bile de boi (15 dias); ágar Dixon modificado (10 a 15 dias) e ágar Kimming (15 dias).

2. Houve crescimento de todas as 55 amostras positivas ao exame direto, obtidas de escamas de pacientes, no ágar Dixon/Kimming.

3. Houve crescimento de apenas 08 das 10 amostras positivas ao exame direto, obtidas de escamas de indivíduos aparentemente saudáveis, no ágar Dixon/Kimming.

4. Das culturas obtidas dos 34 pacientes com Pitíriase versicolor foram isoladas, através de métodos bioquímicos as espécies: *Malassezia furfur* (18), *Malassezia globosa* (07), *Malassezia sympodialis* (08) e *Malassezia slooffiae* (01).

5. Das culturas obtidas dos 19 pacientes com Dermatite seborréica foram isoladas através de métodos bioquímicos as espécies: *Malassezia furfur* (12), *Malassezia globosa* (02), *Malassezia sympodialis* (04) e *Malassezia slooffiae* (01).

6. Das culturas obtidas dos 02 pacientes com Síndrome de Gougerot Carteaud foram isoladas, através de métodos bioquímicos as espécies: *Malassezia furfur* (01) e *Malassezia sympodialis* (01).

7. Das culturas obtidas dos 08 indivíduos aparentemente saudáveis foram isoladas, através de métodos bioquímicos, apenas *Malassezia furfur* (08).

8. Não houve diferença na distribuição das espécies de leveduras do gênero *Malassezia* isoladas por métodos bioquímicos e genotipadas através de PCR nas 23 amostras selecionadas.

9. Houve diferença (quatro discordâncias) na distribuição das espécies de leveduras do gênero *Malassezia* isoladas por métodos bioquímicos e genotipadas através de PCR / RFLP nas 23 amostras selecionadas.

10. Duas amostras classificadas bioquimicamente como *Malassezia furfur* foram genotipadas por PCR/RFLP como *Malassezia sympodialis*; uma amostra classificada bioquimicamente como *Malassezia sympodialis* foi genotipada por PCR/RFLP como *Malassezia furfur* e uma amostra classificada bioquimicamente como *Malassezia obtusa* foi genotipada por PCR/RFLP como *Malassezia sympodialis*.

11. O teste do Tween é um método bioquímico rápido e simples para a identificação de amostras de leveduras do gênero *Malassezia*, no entanto, em alguns casos pode deixar dúvidas.

12. A técnica molecular de PCR/RFLP é simples e pode ser usada em estudos epidemiológicos e clínicos proporcionando resultados confiáveis.

REFERÊNCIAS

ACAR, M.R; ACEVEDO, A.M.C. Papilomatosis reticulada y confluyente de Gourgerot-Carteaud: presentación de un caso. **Rev. Cent. Dermatol. Pascua**, v. 11, n.1, p. 49-52, 2002.

AIZAWA, T.; KANO, R.; NAKAMURA, Y.; WATANABE, S.; HASEGAWA, A. The genetic diversity of clinical isolates of *Malassezia pachydermatis* from dogs and cats. **Med. Mycol**, p. 329-334, 2001.

ALVES, V.E.; MARTINS, C.E.J.; RIBEIRO, E.B.O.; SOTTO, N.M. Pityrosporum folliculitis: renal transplantation case report. **J. Dermatol.**, v. 27, p. 49-51, 2000.

ANTHONY, R.M.; HOWELL, S.A.; LLOYD, D.H.; PINTER, L. Application of DNA typing metho D.S to the study of the epidemiology of *Malassezia pachydermatis*. **Microb. Ecol. Healt Dis.**, v. 7, 161-168, 1994.

ARENAS, R.; ISA, I.R.; CRUZ, A.C. Pitiriasis versicolor en Santo Domingo, República Dominicana. Datos morfológicos de *Malassezia spp.* "In vivo" em 100 casos. **Rev. Iberoam. Micol**, p. 29-32, 2001.

ARSIC-ARSENJEVIC, V.; MILOBRATOVIC, D.; DZAMIC, A.; MITROVIC, S.; RADONJIC, I.; PETKOVIC, L.; KRANJCIC-ZEC, I. First case of *Malassezia globosa* isolation in Serbia. **Srp. Arh. Celok. Lek.**, v.131, 454-457, 2003.

ASHBEE, H.R.; INGHAM, E.; HOLLAND, K.T.; CUNLIFFE, W.J. The carriage of *Malassezia furfur* serovars A, B and C in patients with pityriasis versicolor, seborrhoeic dermatitis and controls. **Brit. J. Dermatol.**, v.129, 533-540, 1993.

ASHBEE, H.R.; LECK, A.K.; PUNTIS, J.W.; PARSONS, W.J.; EVANS, E.G. Skin colonization by *Malassezia* in neonates and infants. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v.23, n. 4, p. 212-216, 2002.

ASPIROZ, C.; MORENO, L.A.; REZUSTA, A.; RUBIO, C. Differentiation of three biotypes of *Malassezia* species on human normal skin correspondence with *M. globosaa*, *M. sympodialis* and *M. restricta*. **Mycopathologia**, 145:69-74, 1999.

ASPIROZ, C.; ARA M.; VAREA M.; REZUSTA A.; RUBIO C. Isolation of *Malassezia globosa* and *M. sympodialis* from patients with pityriasis versicolor in Spain. **Mycopathologia**, v.154, n. 3, p.111-117, 2002.

ASPÍROZ, M.C.; MORENO, L.A.; RUBIO, M.C. Taxonomia de *Malassezia furfur*: estado de la cuestión. **Rev. Iberoam. Micol.**, v.14, p.147-149, 1997.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referencias: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ASTE, N.; PANU, M.; ASTE, N.; BIGGIO, P. Case report. Pityriasis versicolor mimicking Pityriasis rotunda. **Mycoses**, v. 45: 126-128, 2002.

BALESTRE, R.; FERNANDEZ, N.; CALEGARI, L.; GEZNALE, E. Pitiriasis versicolor em lactantes. **Rev. Med. Urug.**, v.16, p. 257-260, 2000.

BALFOUR, J.A.; FAULD, S.D. Terbinafine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in superficial. **Mycoses Drugs**, v. 43, p. 259-284, 1992.

BAPTISTA, G. **Incidência, características morfológicas, fisiológicas e antigênicas de leveduras do gênero *Malassezia***. Tese (Doutorado) - Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1984.

BAPTISTA, G. Características fisiológicas de leveduras del genero *Malassezia*. **Rev. Argent.**, v. 9, p. 5-6, 1986.

BATRA, R.; BOEKHOUT, T.; GUÉHO, E.; CABAÑES, J.F.; DAWSON JR. T.L.; GUPTA, A.K. Mini review: *Malassezia Baillon*, emerging clinical yeasts. **FEMS Yeast Res.**, v.5, p. 1101-11013, 2005.

BELKUM, A.; BOEKHOUT, T.; BOSBOOM, R. Monitoring spread of *Malassezia* infections in a neonatal intensive care unite by PCR – mediated genetic typing. **J. Clin. Microbiol.**, v.32, n.10, 2528-2532, 1994.

BERGBRANT, I.M.; ANDERSSON, B.; FAERGEMANN, J. Cell-mediated immunity to *Malassezia furfur* in patients with seborrhoeic dermatitis and pityriasis versicolor. **Clin. Exp. Dermatol.**, v.24, p. 402- 406, 1999.

BERNIER, V.; WEILL, F.X.; HIRIGOYEN, V.; ELLEAU, C.; FEYLER, A.; LABREZ, C.; SARLANGUE, J.; CHENE, G.; COUPRIE, B.; TAIB, A. Skin colonization by *Malassezia* species in neonates: a prospective study and relationship with neonatal cephalic pustulosis. **Arch. Dermatol.**, v.138, n.2, 215-218, 2002.

BERTRAND, I.; ALBERTINI, L.; SCWARTZBRO, D.J. Comparison of two target genes for detection and genotyping of *Giardia lamblia* in human feces by PCR and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, p. 5940-5944, 2005.

BOEKHOUT, T.; KAW, M.; GUÉHO, E. Molecular typing of *Malassezia* species with PFGE and RAPD. **Med. Mycol.**, v.36, p. 365-372, 1998.

BOTTEREL, F.; CURVALE, N.; FOULET, F.; POIROT, J.L. ; BRETAGNE, E.T. Fréquence de la colonisation des catheters vasculaires par *Malassezia sp* chez l'adulte. **J. Mycol. Méd.**, p. 203-203, 2000.

BOUASSIDA, S.; BOUDAYA, S. ; GRORBEL, R. ; MEZIOU, T.J. ; TURKI, H.; ZAHAF, A. Pityriasis versicolor de l'enfant: E'tude retrospective de 164 cas. **Ann. Dermatol. Venerol.**, v. 125, p. 581-584, 1998.

CANDIDO, R.G.; ZAROR, L.; FISCHMAN, O.; GREGÓRIO, Z.; ISIDORO, T.; CASTANHA, J. Actividad de antisépticos en *M. pachydermatis* aislada de oído externo en perros y gatos. **Bol. Micol.**, v. 11, p. 51-54, 1996.

CANTEROS, C.E.; SORIA, M.; RIVAS, C.; LEE, W.; LOPEZ, M.C.J.; RODERO, L.; PERROTA, D.; KORTE, C.; DAVEL, G. *Malassezia* species isolated from skin diseases in a care center in the city of Buenos Aires, Argentina. **Rev. Argent. Microbiol.**, v.35, n.3, p. 156-161, 2003.

CHAI, FC.; AURET, K.; CHRISTIANSEN, K.; YUREN, P.W.; GARDAM, D. Malignant otitis external caused by *Malassezia sympodialis*. **Head Neck**, v.22, p. 87- 89, 2000.

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

CHU, C.M.; LAI, RW. *Malassezia furfur* fungaemia in a ventilator-dependent patient without known risk factors. **Hong-Kong Med. J.**, v.8, n. 3, p. 212-214, 2002.

CIVILA, E.S. Hyphal production by *Pityrosporum ovale*. **Int. J. Derm.**, v.17, p. 74-77, 1978.

CIVILA, E.S.; VIGNALE, R.A.; CONTI-DIAZ, I.A. *Malassezia ovalis*: Mycologic and Immuno-Antigenic aspects and probable pathogenic role. *In*: International Conference on the Mycoses. **Superf. Cutan. Infect.**, v.5, p.55-62, 1980.

CIVILA, E.S.; CONTI-DIAZ, I.A.; VIGNALE, R.A.; CALEGARI, L.F. Onixis por *Malassezia* (*Pityrosporum ovalis*). **Med. Cut.**, v.10, p. 343-346, 1982.

CISALPINO, P.S.; TRAVASSOS, L.R. Aplicações da Biologia Molecular à Micologia Médica. *In*: LACAZ, C. da S. et. al. **Tratado de Micologia Médica**. São Paulo: Ed. Sarvier, 2002. p.174-203.

COUTINHO, S.D. ***Malassezia pachydermatis*. Caracterização fenotípica de amostras isoladas de pelame e ducto auditivo externo de cães.** Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

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

CRESPO-ERCHIGA, V.; MARTOS, A.O.; CASAÑO, A.V.; CRESPO-ERCHIGA, A.; FAJARDO, F.S.; GUÉHO, E. Mycology of Pityriasis versicolor. **J. Mycol. Méd.**, p. 143-148, 1999a.

CRESPO-ERCHIGA, V.; MARTOS, A.O.; CASAÑO, A.V.; CRESPO-ERCHIGA, A.; FAJARDO, F.S. Aislamento e identificação de *Malassezia spp* em pitiríasis versicolor, dermatitis seborreica y piel sana. **Rev. Iberoam. Micol.**, v.16: n.16, 1999b.

CRESPO-ERCHIGA, V.; MARTOS, A.O.; CASAÑO, A.V.; CRESPO-ERCHIGA, A.; FAJARDO, F.S. *Malassezia globosa* as the causative agent of Pityriasis versicolor. **Br. J. Dermatol.**, v.143, p. 799- 803, 2000.

CRESPO, M.J.; ABARCA, M.L.; CABAÑES, F.J. Occurrence of *Malassezia spp* in the external ear canals of dogs and cats with and without otitis externa. **Med. Mycol.**, v.40, p. 115 -121, 2002.

CUEVAS, G.; ALAYETO, J.; JUNCOSA, T.; GÁRCIA-FRUCTUOS, M. T.; MORENO, J.; LATONE C. Sepsis neonatal por *Malassezia furfur* . **Rev. Iberoam. Micol.**, v.16, p. 157-160, 1999.

CUNNINGHAM, AC.; LEEMING, J.P. Differentiation of three serovars of *Malassezia furfur*. **J. Appl. Bacteriol.**, v.68, p. 439-446, 1990.

CURRIE, B.P.; FREUNDLICH, L.F.; CASADEVALL, A. Restriction fragment length polymorphism analysis of isolates from cryptococcus neoformans environmental (Pigeon Excreta) and clinical sources in New York City. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p.1188-1192. 1994.

DEL PALACIO, A.; MOORE, N.K. Pitiríaseis versicolor y otros procesos superficiales producidos por levaduras lipofílas. **Micología Médica**. Barcelona: Manou S.A. p. 51-63, 1994.

DINATO, M.L.S. **Viabilidade da *Malassezia furfur* e microscopia eletrônica de varredura, antes e após o tratamento com ketoconazol**. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

DUTTA, S.; BAJAJ, A.K.; BASU, S.; DIKSHIT A. Pityriasis versicolor: socioeconomic and clinico-mycologic study in Índia. **Int. J. Dermatol.**, v. 41, n.11, p. 823-4, 2002.

ESCOBAR, L.M.; CARMONA-FONSECA, J.; SANTAMARÍA, L. Onicomycosis por *Malassezia*. **Rev. Iberoam. Micol.**, v.16, p. 225-229, 1999.

FAERGEMANN, J.; BERGHRAM, I.M.; DOHSÉ, M.; SCOTT, A.; WESTGATE, G. Seborrheic dermatitis and *Pityrosporum (Malassezia)* folliculitis: characterization of inflammatory cells and mediators in the skin by immunohistochemistry. **Br. J. Dermatol.**, v.144, p. 549 – 556, 2001.

FAGGI, E.; PINI, G.; CAMPI S.I.E.; GARGANI, G. Anti- *Malassezia furfur* antibodies in the population. **Mycoses**, v. 41, p. 273-275,1998.

FILGUEIRAS de SOUZA, C.L. Pesquisa da *Malassezia furfur* em couro cabeludo de lactentes. **An. Bras. Dermatol.**, v.7, p. 1335-339, 1996.

GAITANIS, G.; VELEGRAKI, A.; FRANGOULIS, E.; MITROUSSIA, A.; TSIGONI, A.; TZIMOGIANNI, A.; KATSAMBAS, A.; LEGAKIS, N.J. Identification of *Malassezia* species from patients skin scales by PCR-RFLP. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.8, n.3, p.162-173, 2002.

GAITANIS, G.; CHASAPI, V.; VELEGRAKI, A. Novel application of the Masson - Fontana stain for demonstrating *Malassezia* species melanin – like pigment production *in vitro* and clinical specimens. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, n.8, p.4147-4151, 2005.

GAITANIS, G.; VELEGRAKI, A.; ALEXOPOULOS, E.C.; CHARAFIM, V.; TSIGONIA, T.; KATSAMBA, A. Distribution of *Malassezia* species in pityriasis versículo and seborrhoeic dermatitis in Greece. Typing of the mayor pitiriasis versículo isolate *M. globosa*. **Br. J. Dermatol.**, v.154 n.5, p. 854-859, 2006.

GANDRA, R.F. ***Malassezia furfur*: avaliação da atividade alergênica de extratos obtidos nas diferentes fases de crescimento**. Tese (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

GANDRA, R.F. **Ocorrência e caracterização fenotípica de *Malassezia spp.* isolada de pacientes com pitíriase versicolor e dermatite seborréica: diversidade genotípica, respostas as micocinas "killer", sensibilidade aos antifúngicos das amostras de *Malassezia furfur***. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

GANDRA, R.F.; SIMÃO, R.C.; MATSUMOTO, F.E.; da SILVA, B.C.; RUIZ, L.S.; da SILVA, E.G.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R. Genotyping by PAPD – PCR analyses of *Malassezia furfur* strains from pityriasis versicolor and seborrhoeic dermatitis patients. **Mycopathology**, v.162, n.4, p. 273- 280, 2006.

GEIGER, D.C.P. **Tipagem molecular de leveduras do gênero *Candida* pela aplicação da técnica de “Pulsed-field Gel Eletrophoresis”**. Tese (Mestrado) - Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1997.

GEMMER, C.M.; ANGELIS, de Y.M.; THEELEN, B.; BOEKHOUT, T.; DAWSON, T.L.J.R. Fast, noninvasive method for Molecular Detection and Differentiation of *Malassezia* yeast species on human skin and Application of the Methods to Dandruff Microbiology. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n.9, p. 3350-3357, 2002.

GRIGG, M.E.; BOOTHROYD, J.C. Rapid identification of virulent type I strains of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* by PCR-restriction fragment length polycorphism analysis of the B1 gene. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, p. 398-400, 2001.

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

GUÉHO, E.; BOEKHOUT, T.; ASHBEE, H.R.; GUILLOT, J.; VAN BELKUM, A.; FAERGEMAN-N, J. The role of *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogens. **Med. Mycol.**, v.36, p. 220-229, 1998.

GUILLOT, J.; GUÉHO, E. - The diversity of *Malassezia* yeast confirmed by rRNA séquense and nuclear DNA comparisons. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.67, p. 297-314, 1995.

- GUILLOT, J.; GUÉHO, E.; LESOURD, M.; MIDGLEY G.; CHÉVRIER, G.; DUPONT, B. Identification of *Malassezia* species. A practical approach. **J. Mycol. Med.**, v.6, p. 103-110, 1996.
- GUILLOT, J.; BOND, R. *Malassezia pachydermatis*: a review. **Med. Mycol.**, v.37, p. 295-306, 1999.
- GUILLOT, J.; DEVILLE, M.; BERTHELEMY, M.; PROVOST, F.; GUÉHO, E. A single PCR- restriction endonuclease analysis for rapid identification of *Malassezia* species. **Appl. Microbiol.**, v.31, p. 400-403, 2000.
- GUISIANO, G.B.; BUSTILLO, S.; MANGIATERRA, S.; DELUCA, G. Identification of *Malassezia* species by PCR-REA. **Rev. Argent. Microbiol.**, v.35, p.162-166, 2003.
- GUPTA, A.K.; KOHLI, Y.; SUMMERBELL, R.C. Molecular differentiation of seven *Malassezia* species. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 1869-1875, 2000.
- GUPTA, A.K.; KOHLI, Y.; FAERGERMANN, J.; SUMMERBELL, R.C. Epidemiology of *Malassezia* yeasts associated with pityriasis versicolor in Ontário, Canadá. **Med. Mycol.**, p. 199-206, 2001.
- GUPTA, A.; BLUHM, R. Seborrheic dermatitis. **J.W.A.D.V.**, v.18, p.13-26, 2004.
- HAMMER, K.; CARSON, A.C.F.; RILEY, T.V. In vitro susceptibility of *Malassezia furfur* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 35, p. 375-377, 1997.
- HAMMER, K., A.; RILEY, T.V. Precipitate production by some *Malassezia* species on Dixon's agar. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 105-107, 2000.
- HEINS-VACCARI, E.M.; TAKAHASHI de MELO, N.; LOPES, G.R.; LACAZ, C. da S.; SALEBIAN, A. Ação "in vitro" do ketoconazol e BAY nº 7133 sobre a *Malassezia furfur*. **An. Bras. Dermatol.**, v.59, p. 221-223, 1984.
- HEINS-VACARI, E.M.; TAKAHASHI de MELO, N.; LACAZ, C. da S.; DEL NEGRO, G.; SALEBIAN, A. Ação "in vitro" do itraconazol (R-51. 211) sobre *Malassezia furfur*. **An. Bras. Dermatol.**, v.62, p. 75-78, 1987.
- HERNANDEZ, F.H.; TOVAR, L.J.M.; MORA, E.B.; LOPEZ, A.A.; BERMEJO, A.V.; MARTÍNEZ R.L. Especies de *Malassezia* asociadas a diversas dermatosis y la piel sana en población mexicana. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 20, p. 141-144, 2003.
- HERNANDEZ-HERNANDEZ, F.; MENDEZ-TOVAR, L.J.; BAZN-MORA, E.; AREVALO-LOPEZ, A.; VALERA-BERMEJO, A.; LOPEZ-MARTINEZ, R. Species of *Malassezia* associated with various dermatoses and healthy skin in the Mexican population. **Rev. Iberoam. Micol.**, v.20, p.141-144, 2003.

HERNÁNDEZ-MOLINA, J.M. Revisión bibliográfica sobre *Malassezia* (*Pityrosporum*) taxonomia y su importancia en las infecciones sistemicas. **Rev. Iberoam. Micol.**, v.10, p. 24-28,1993.

HIRAI, A.; KANO, R.; MAKIMURA, K.; DUARTE, E.R.; HAMDAN, J.S.; LACHANCE, M.A.; YAMAGUCHI, H.; HASEGAWA, A. *Malassezia nana* sp. Nov., a novel lipid-dependent yeast species isolates from animal. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.54, p. 623 – 627, 2004.

HOOG, G.S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FILGUEIRAS, M.J. **Atlas of clinical fungi**. 2 ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000.

INGHAN, E.; CUNNINGHAM, A.C. *Malassezia furfur* - review article. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.13, p. 265-288, 1993.

INGORDO, V.; NALDI, L.; COLECCHIAS, B.; LICCI, N. Prevalence of pityriasis versicolor in young Italian sailors. **Brit. J. Dermatol.**, v.149, p.1270-1272, 2003.

ISA, I.R.; CRUZ, A.C.; ARENAS, R.; DUARTE, Y.; LINARES, M.C.; BOGAERT, H. Pitiriasis versicolor em lactantes. Estudo de 92 casos. **Rev. Iberoam. Micol.**, p.109-112, 2001.

KANEKO, T.; MAKIMURA, K.; SUGITA, T.; YAMAGUCHI, H. Tween 40 based precipitate production observe don modified chromogenic agar and development of biological identification kit for *Malassezia* species. **Med. Mycol.**, v.44, p.227- 231, 2006.

KANEKO, T.; MAKIMURA, K.; ABE, M.; SHIOTA, R.; NAKAMURA, Y.; KANO, R.; HASEGAWA, A.; SUGITA, T.; SHIBUYA, S.; WATANABE, S.; YAMAGUCHI, H.; ABE, S.; OKAMURA, N. Revised culture – based system for identification of *Malassezia* species. **J. Clin. Microbiol.**, v.45, n.11, p. 3737 – 3742, 2007.

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

KESSLER, A.T.; KOURTIS, A.P.; SIMONE, N. Peripheral thromboembolism associated with *Malassezia furfur* sepsis. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v.21, n. 4, p.356-357, 2002.

KHAN, A.; GERMAN M, C.S.U.; STORCH, C.A.; CLIFFORD. D.B.; SIBLEY L.D.. Genotyping of toxoplasma gondii strains from immunocompromised patients reveals high prevalence of type I strains. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 5940-5944, 2005.

KREGER-VAN RIJ, N.J.W. *Malassezia* Baillon by D. Yarrow and D.G. Aheam. In: Kreger- van Rij, N.J.W. **The yeasts a taxonomic study**. Amsterdam, Elsevier Science Publishers , 1984.

KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E. Infection caused by *Malassezia species* (tinea versicolor, pityriasis versicolor, dermatomycosis furfuracea, tinea flava, "liver spots"). In: AUTOR, X. **Medical Mycology**. Philadelphia, Lea: Febiger, 1992. p. 170-182.

LACAZ, C. da S.; NAGAO, M.T. Isolamento de *Malassezia, furfur*. **An. Bras. Dermatol.**, v. 58, p. 241-244, 1983.

LACAZ, C. da S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO N.T. Leveduras de interesse médico. In: _____. **Tratado de micologia médica Lacaz**. São Paulo: Ed. Sarvier, 2002. cap. 6.

LATOUCHE, G.N.; HUYNH, M.; SORRELL, T.C.; MEYER, W. PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the phospholipase B (*PLB*) Gene for subtyping of *Cryptococcus neoformans* isolates applied and environmental **Microbiology**, v.69, p. 2080-2086, 2003.

LEMMING, J.; NOTMAN, F.H.; Improved methods for isolation and enumeration of *Malassezia furfur* from human skin. **J. Clin. Microbiol.**, v.25, p. 2017 – 2019, 1987.

LONG, G. J.; KEYSERLING, L.H. Catheter-related infection in infants due to an unusual lipophilic yeast, *Malassezia furfur*. **Pediatr**, v.76, 1985.

LOPES, J.O.; ALVES, S.H.; BENEVENGA, J.P. ENCARNÇÃO, C.S. Nodular infection of the hair caused by *Malassezia furfur*. **Mycopathologia**, v.125, p. 149-152, 1994.

MAIWALD, M. Rapid presumptive identification of medically relevant yeasts to species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.32, p. 115-122, 1994.

MAKIMURA, K.; MURAYAMA, S.Y.; YAMAGUCHI, H. Detection of a wide range of medically important fungi by polymerase chain reaction. **J. Med. Mycol.**, v.40, p. 358–364, 1994.

MAKIMURA, K.; TANUMA, Y.; KUDO, M.; UCHIDA, K.; SAITO, H.; YAMAGUCHI, H. Species identification and strain typing of *Malassezia* species stock strains and clinical isolates based on the DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. **J. Med. Microbiol.**, v.49, p. 29-35, 2000.

MARCON, J.M.; POWELL, A.D.; DURRELL, E.D. Methods for optimal recovery of *Malassezia furfur* from blood culture. **J. Clin. Microbiol.**, v. 24, p.696-700, 1986.

MARTINS, E.L.; GONÇALVES, A.C.; MELLONE, F.F.; PAVES, L.; TCHERNIAKOVSKY, M.; NETO, M.; MONTES, M.; RESSURREIÇÃO, P.S.; ZEQUI, S. de C.; LACAZ, C. da S. Estudo prospectivo sobre a incidência da pitíriase versicolor em uma população do Município de Santo André (Estado de São Paulo). **Med. Cut.**, v.12, p.287-291, 1989.

MAYSER, P.; SCHEURER, C.; PAPAVALASSILIS, C.; GRÜNDER, K. Hydrolyse activity of 150 *Malassezia furfur* isolates of different clinical origin. **Mycoses**, p.225-231, 1996.

MAYSER, P.; HAZE, P.; PAPAVALASSILIS, C.; PICKEL, M.; GRUENDER, K.; GUÉHO, E. Differentiation of *Malassezia* species: selectivity of Cremophor EL, castor oil and ricinoleic acid for *M.furfur*. **Brit. J. Dermatol.**, v.137, p. 208-213, 1997.

MAYSER, P.; PICKEL, M.; HAZE, P.; ERDMANN, F.; PAPAVALASSILIS, C.; SCHINWT, R. Different utilization of neural lipids by *Malassezia furfur* and *Malassezia sympodialis*. **Med. Mycol.**, v.36, p. 7-14, 1998a.

MAYSER, P.; WILLE, G.; IMKAMPE, A.; THOMA, W.; ARNOLD, N.; MONSEES, T. Synthesis of fluorochromes and pigments in *Malassezia furfur* by use of Tryptophan as the single nitrogen source. **Mycoses**, v.41, p. 265-271, 1998b.

MIDGLEY, G. The diversity of Pityrosporn (Malassezia) yeasts in vivo and in vitro. **Mycopathologia**, v.106, p.143-153, 1989.

MIDGLEY, G. Morphological variation in Malassezia and its significance in pityriasis versicolor. In: VANDEN BOSSCHE, H. et al. (Ed.). **Dimorphic Fungi in Biology and Medicine**. New York: Plenus Press, 1993. p. 267- 277.

MIDGLEY, G.; GUÉHO, E.; GUILLOT, J. Diseases caused by *Malassezia species*. In: AJELLO, L.; HAY, R. **Medical Mycology**. 9th ed. London: Arnold, 1998. v.4, p. 201- 221.

MIRANDA, L.G.A.; MAGALHAES, V.; LIMA, E.O.; OLIVEIRA, N.M.C.; VIEIRA, W.L. Pityriase versicolor: abordagem clinica e laboratorial. **Rev. Patol.Trop.**, v.33, n. 3, p. 265- 275, 2004.

MIRHENDI, H.; MAKIMURA, K.; ZOMORODIAN, T.; YAMADA, T.; SUGITA, T.; YAMAGUSHI, H. A simple PCR-RFLP method for identification and differentiation of 11 Malassezia species. **J. Microbiol. Methods**, v.61, p. 281-284, 2005.

MOORE, M. Dermatitis seborréica. El cultivo del organismo causal y la producción experimental de la dermatitis. **Arch. Urug. Méd.**, v. 8, p. 245 – 248, 1936.

MOORE, M. *Malassezia furfur*: the cause of tinea versicolor. **Arch. Derm. Syph.**, v.41, p. 253 - 260, 1940.

MORISHITA, N.; SEI Y.; TAKIUCHI, I.; SUGITA, T. Examination of the causative agent of Pityriasis versicolor. **Nip. ish. Gak. Zas**, v. 46, p.169-170, 2005.

MORISHITA, N.; SEI, Y.; SUGITA, T. Molecular analysis of Malassezia microflora from patients with pityriasis versicolor. **Mycopathologia**, v. 161, p. 61-65, 2006.

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

MURAI, T.; NAKAMURA, Y.; KANO, R.; WATANABA, S.; HASEGAWA, A. Suscetibility testing of *Malassezia pachydermatis* using the urea broth microdilution method. **Mycoses**, v. 45, p. 84-87, 2002a.

MURAI, T.; NAKAMURA, Y.; KANO, R.; WATANABE, S.; HASEGAWA, A. Differentiation of *Malassezia furfur* and *Malassezia sympodialis* by glicine utilization. **Mycoses**, v. 5, p. 180-183, 2002b.

NAKABAYASHI, A.; SEI, Y.; GUILLOT, J. Identification of *Malassezia* species isolates from patients with seborrhoeic dermatitis, atopic dermatitis, pityriasis versicolor and normal subjets. **Med. Mycol.**, p. 337-341, 2000.

NOGUEIRA, M.C.M.; COSTA, O.R.; SUDO, L.; JARBAS, A.P. *Malassezia furfur* na pitiríase versicolor e em sadios. **An. Bras. Dermatol.**, v.63, p. 229-234, 1988.

PADILHA-GONÇALVES, A. A single method to stain *Malasszia furfur* and *Corynebacterium minutissimum* in scales. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v.38, p. 299-320 1996.

PARRA, I.V.; BARAJOS, D.F.; MEDINA, G.M. Papilomatosis confluyente y reticulada de Gougerot–Carteaud: variedade numular. **Dermatol. Rev. Mex.**, v.48, p. 219-221, 2004.

PASSAGLIA, L.M.P.; ZAHA, A. Técnicas de DNA recombinante. *In*: ZAHA, A. **Biologia Molecular Básica**. São Paulo: Ed. Mercado Aberto, 1996. cap. 15, p. 307-331.

PATEL, D.D.; KAPOOR, A.; Ayyagari, A.; DHOLE, T.N. Development of a simple restriction fragment length polymorphism assay for subtyping of coxsackie B viruses. **J. Virol. Methods**, v.15, p.167-172, 2004.

PEREIRO-MIGUENS, M.; PEREIRO FERREIROS, M.M. Epidemiologia y patogenia de la *Pitiriasis versicolor*. **Rev. Iberoam. Micol.**, v.3, p. 39-46, 1986.

PIÉRARD-FRANCHIMONT, C.; ARRESE, J.E.; DURUPT, G.; ET AL. Correlation between *Malassezia spp* load and Dandruff severity. **J. Mycol. Med.**, v.8, p.83-86, 1998.

PORRO, N.M.; PASSI, S.; CAPRILLI, F.; MERCANTILI, R. Induction of hyphae in cultures of *Pityrosporum* by cholesterol and cholesterol esters. **J. Invest. Dermatol.**, v.69, p. 531-534,1977.

POWELL, A.; DWIGHT, A.; AUNGST, J.; SNEDDEN, S.; HANSENN, S.; BRADY, M. Broviac catheter-related *Malassezia furfur* sepsis in five infants receiving intravenous fat emulsions. **J. Pediat.**, p. 987- 989, 1984.

RAPELANORO, R.; MORTUREUX, P.; COUPRIE, B.; MALEVILLE, J.; TAIEB, A. Neonatal *Malassezia furfur* pustulosis. **Arch. Dermatol.**, p.132:190-193, 1996.

READ, C.M.; MONIS, P.T.; THOMPSON, R.C. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. **Infect. Genet. Evol.**, v.4, p.125-130, 2004.

REDLINE, R.W.; REDLINE, S.S.; BOXERBAUM, B.; DAHMS, B.B. *Systemic Malassezia furfur* Infections in patients receiving intralipid therapy. **H. Pathol.**, v.16, p. 815- 822, 1985.

RENDIC, E; DIAZ, C.; FISCH, F. Characterization of species of the gender *Malassezia* in patients with seborrheic dermatitis and subjects without skin lesions. **Rev. Med. Chil.**, v.131, n.11, p. 1295- 1300, 2003.

ROZA, M.S.; DORNELLAS, D.; RODRIGUES, M.T.; VIEIRA, P.V.; FRADE, M.A.C.; CARVALHO, M.T.F. Pitiríase versicolor e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). **An. Bras. Dermatol.**, v. 78, n. 5, p.569-577, 2003.

SAADATZADEH, M.R.; ASHBEE, H.R.; HOLLAND, K.T.; INGHAM, E. Production of the mycelial phase of *Malassezia* "in vitro". **Med. Mycol.**, p.487- 493,2001.

SABOURAUD, R. **Maladie di cuir chevelu I. Les maladies séborrhéiques. Séborrhée, Acnés, Calvitie.** Paris: Mason et Cie, Éditeurs, 1902.

SABOURAUD, R. **Maladie du cuir chevelu II. Les maladies desquamatives. Pityriasis et alopecies pelliculaires.** Paris: Mason et Cie, Éditeurs, 1904.

SALCEDO, N. Cultures and physiologic proprieties of the fungus producing tinea versicolor. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE MYCOSES: SUPERFICIAL, CUTANEOUS AND SUBCUTANEOUS INFECTIONS, 5., 1980, Washington, DC. **Proceedings...** Washington, DC: Pan American Health Organization, 1980. p. 44-54.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning.** A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press,1989.

SCHIMIDT, A.; ERUST, J.F. Dimorphism in human pathogenic and apathogenic yeasts. **Contrib. Microbiol. Basel, Karger**, v.5, p. 36 -53,2000.

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 clinico laboratoriais. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v.38, n.3, 2002.

SCHWARTZ, D.C.; CANTOR, C.R. Separation of yeasts chromosome sized DNAs by pulsed gradient gel electrophoresis. **Cell**, v.37, p.67-75, 1984.

SELANDER, C.; ZARGARI, A.; MÖllby, R.; RASSOOL, O.; SCHEYNIUS, A. Higher pH level, corresponding to that on the skin of patients with atopic eczema, simulates the release of *Malassezia sympodialis* allergens. **Allergy**, v.61, p. 1002 -1008, 2006.

SENCZEK, K.D.; SIESENOP, U.; BÖHM, H. K.Characterization of *Malassezia* species by mean of phenotypic characteristics and detection of electrophoretic karyotypes by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). **Mycoses**, v.42, p.409 - 414, 1999.

SEQUEIRA, P.C.; FONSECA, L.S.; SILVA, M.G.; SAAD, M.H. *Mycobacterium avium* restriction fragment length polymorphism-*IS* *ISI245* and the simple double repetitive element polymerase chain reaction typing method to screen genetic diversity in Brazilian strains. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.100, p. 743-748, 2005.

SIDRIM, J.J.C.; DIÓGENES, M.J.N. Micoses superficiais estritas. In: SIDRIM, J.J.C. (Org.). **Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

SILVA-HUNTER, M. *Malassezia furfur* as pathogen and in culture: a review. In: LNTEMATIONAL CONFERENCE ON THE MYCOSES SUPERFICIAL, CUTANEOUS INFECTIONS, 5., 1980, Venezuela. **Proceedings...** Washington: PAHO, 1980. Publicado na Scient. Publ., v.396, p. 29-37, 1980.

SILVA, V.; FISCHMAN, O.; ZAROR, L. Importância del examen microscópico directo semi-cuantitativo em el diagnostico de *Malassezia furfur*. **Rev. Iberoam. Micol.**, v.13, p.90-92, 1996.

SILVA VARGAS, V.E. **Associação de *Malassezia furfur* com patologias com componente seborréico**. Dissertação (Mestrado) - Escola Paulista de Medicina. São Paulo, 1995.

SILVA VARGAS, V.E. **Estudos imuno-molecular de *Malassezia furfur*. RAPD a avaliação da resposta humoral de pacientes com dermatite seborréica e pitiríase versicolor**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1997a.

SILVA VARGAS, V.E.; MORENO, G.A.; ZAROR, L.; OLIVEIRA, E. ; FISCHMAN, O. Isolation of *Malassezia furfur* from patients with onychomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.35, p.73-74, 1997b.

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

SODRÉ, C.T. Pitiríase versicolor: atualização. **An. Bras. Dermatol. Rev**, v.59 p, 275-280, 1984.

SOHNLE, G.P.; COLLINS-LECH, C. Cell-Mediated Immunity to *Pityrosporum orbiculare* in Tinea versicolor. **J. Clin. Invest.**, v.62, p. 45-53, 1978.

SUGITA, T.; SUTO, H.; UNNO, T.; TSUBOI, R.; OGAWA, H.; SHINODA, T.; NISHIKAWA, A. Molecular analysis of *Malassezia* microflora on the skin of atopic dermatitis patients and healthy subjects. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, p. 3486-3490, 2001.

SUGITA, T.; TAKASHIMA, M.; SHINODA, T.; SUTO, H.; UNNO, T.; TSUBOI, R.; OGAWA, H.; NISHIKAWA, A. New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patient with atopic dermatitis. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, p.1363 -1367, 2002.

SUGITA, T.; TAJIMA, M.; AMAYA, M.; TSUBOI, R.; NISHIKAWA, Y. Genotype analysis of *Malassezia restricta* as the mayor cutaneous flora in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. **Microbial. Immunol.**, v.48, n.10, p. 755-759, 2004.

SUNENSHINE, P.J.; SCHWARTZ, R.A.; JANNIGER, C.K. Tinea versicolor. **Int. J. Dermatol.**, v.37, p.648 – 655, 1998.

TARAZOOIE, B.; KORDBACHEH, P.; ZAINI, F.; ZOMORORIAN, K.; SAADAT, F.; ZERAATI, H.; HALLAJI, Z.; REZAIE, S. Study of the distribution of *Malassezia* species in patients with pityriasis versicolor and healthy individuals in Tehran, Iran – **BMC. Dermatology**, v.4, n.5, 2004.

THEELEN, B.; SILVESTRI, M.; GUEHO, E.; VAN BELKUM, A.; BOEKHOUT, T. Identification and typing of *Malassezia* yeasts using amplified fragment length polymorphism (AFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). **FEMS Yeast Res.**, v.1, n.2, p. 79-86, 2001.

TROPE, B.M. **Pitiríase versicolor. Correlação clínica – histopatológica evolutiva após terapêutica tópica.** Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1990.

VIRGILI, A.; ZAMPINO, M.R.; MANTOVANI, L. Fungal skin infections in organ transplantation recipients. **Ann. J. Clin. Dermatol.**, p.19-35.2002.

VOLPINI, A.C.; PASSOS, V.M.; OLIVEIRA, G.C.; ROMANHA, A.J. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing american cutaneous leishmaniasis. **Acta Trop.**, v. 90, p. 31- 37, 2003.

YAMADA, Y.; OSUMI, M.; MAKIMURA, K.; YAMAGUCHI, H. Overview of lipophilic yeast *Malassezia*: the current status of the molecular diagnosis. **Jpn. J. Antibiotic.**, v.55, n.5, p. 493- 499, 2002.

YAMADA, Y.; MAKIMURA, K.; UEDA, K.; NISHIYAMA, Y.; UCHIDA, K.; YAMAGUCHI, H.; OSUMI, M. DNA base alignment and taxonomic study of genus *Malassezia* based upon partial sequences of Mitochondrial large subunit ribosomal RNA gene. **Microbiol. Immunol.**, v.47, n.6, p. 475-478, 2003.

YARROW, D.; AHEARN, D.G. *Malassezia* Baillon. In: KREGER VAN RIJ, N.J.W. (Ed.). **The Yeasts, a taxonomic study.** 3rd ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1984. p.882- 885.

WARREN, N.G.; HAZEN, K.C. Candida, Cryptococcus and other yeasts of medical importance. In: MURRAY, P.R.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. (Ed.). **Manual of clinical within internal transcribed spacer 1 of the Sclerotiniaceae. Mycologia**, v.85, p. 415–427, 1993.

WEISS, J.S.; SCHUCH, E.P.; CUNHA, A.B. *Malassezia furfur* fungemia associated with central venous catheter lipid emulsion infusion. **Heart Lung**, v.20, p. 87-90, 1999.

ZAITS, C. Micoses propriamente ditas. In: ZAITS, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, S.A.; RUIZ, L.R.B; SOUZA, V.M. **Compêndio de Micologia Médica**. São Paulo: MEDSI, 1998. p. 65 – 79.

ZAITS, C.; RUIZ, B.R.L.; SOUZA, M.V. Dermatoses associadas às leveduras do gênero *Malassezia*. **An. Bras. Dermatol.**, v.75, p. 129-142, 2000.

ANEXO A – MEIOS DE CULTURA

Meios de Cultura para Manutenção dos Isolados de leveduras do gênero *Malassezia*

- Ágar Sabouraud + Bile de Boi + Cicloheximida + Cloranfenicol + Óleo de Oliva

Ágar-Sabouraud	100 ml
Bile de Oliva	3 g
Cicloheximida	50 mg
Cloranfenicol	6 mg
Óleo de Oliva	0,5 -1,0 ml

Preparo: Distribuir o meio em tubos de 18x18mm;
Esterilizar em autoclave, à temperatura de 120°C.

- Ágar Dixon (Ellis, D.et al., 1992)

Extrato de Malte	36 g
Peptona	6 g
Bile de Boi	20 g
Ágar	7,5 g
Tween 40	50 ml
Glicerol	2,5 ml
Água destilada	500 ml

Preparo: Adicionar os ingredientes em balão de vidro com água destilada;
Dissolver aquecendo em banho-maria;
Distribuir em tubos, tamponar e esterilizar a 120 °C por 15 minutos.

- Ágar Kimming

Glicose	9,5 g
Peptona	7,5 g
Glicerina	2,5 ml
Cloreto de Sódio	0,1 g
Óleo de Oliva	5,0 ml
Tween 80	5,0 ml
Ágar	7,5 g
Água destilada	500 ml

Preparo: Adicionar os ingredientes em balão de vidro com água destilada;
Dissolver aquecendo em banho-maria;
Distribuir em tubos, tamponar e esterilizar a 120 °C por 15 minutos.

- Ágar Sabouraud modificado para Teste do Tween (Guého et al., 1996)

Ágar	15 g
Peptona	10 g
Dextrose	40 g
Água destilada	1 ml
Cicloheximida	0,05%
Cloranfenicol	0,05%

Preparo: Distribuir os ingredientes;
Tamponar;
Autoclavar à temperatura de 120 °C, por 15 minutos.

▪ Ágar Esculina (Cowan; Steel, 1965)

Ágar	15 g
Esculina	1 g
Citrato Férrico	0,5 g
Peptona	10 g
NaCl	5 g
Água destilada	1 ml

Preparo: Dissolver os ingredientes em 1litro de água e distribuir em tubos;
Autoclavar durante 15 minutos a 120 °C.

Meios de Cultura para Extração das leveduras do gênero *Malassezia*

• Caldo Dixon (Ellis, D.et al., 1992)

Extrato de Malte	36 g
Peptona	6 g
Bile de Boi	20 g
Tween 40	50 ml
Glicerol	2,5 ml
Água destilada	500 ml

Preparo: Dissolver o singredientes e distribuir em enlermayer;
Tamponar e esterilizar a 120 °C por 15 minutos.

- Caldo Kimming

Glicose	9,5 g
Peptona	7,5 g
Glicerina	2,5 ml
Cloreto de Sódio	0,1 g
Óleo de Oliva	5,0 ml
Tween 80	5,0 ml
Água destilada	500 ml

Preparo: Dissolver e distribuir os ingredientes em enlarmeyer;
Tamponar e esterilizar a 120 °C por 15 minutos.

ANEXO B – COLORAÇÕES

Soluções - Corantes

- Coloração de Giemsa

Técnica de Coloração

- a) Fixar o esfregaço com álcool metílico absoluto, durante 3-5 minutos;
- b) Cobrir o esfregaço com a solução corante e deixar por cerca de 15 minutos;
- c) Escorrer o corante e lavar em água da torneira;
- d) Secar a lamina com papel de filtro.

- Coloração de Gram

Técnica de Coloração

- 1) Preparar o esfregaço, secar e fixar na chama do Bico de Bunsen,
- 2) Cobrir o esfregaço com solução de Cristal Violeta por 1 segundo,
- 3) Lavar com água,
- 4) Fixar com solução de Lugol por 1 minuto,
- 5) Lavar com água,
- 6) Descorar com Álcool – Acetona,
- 7) Cobrir com solução de Fucsina por 30 segundos.

- Coloração Lactofenol Azul de Algodão (Meio de Amann)

Ácido Lático	20 ml
Cristais de Fenol	20 ml
Glicerina	20 ml
Azul de algodão (Methyl blue/Difco)	0,05g
Água destilada	20 ml

Preparo: Fundir os cristais de fenol em banho-maria;

Adicionar o restante dos ingredientes;

Deixar descansar por 24 horas e filtrar.

ANEXO C – REAGENTES E SOLUÇÕES

Extração de DNA

- EDTA 0.5 M pH 8,0

EDTA 2H ₂ O (Gibco, BRL)	186,1 g
Água milli Q	1 ml

Preparo: Dissolver o EDTA em 800 ml de água milli Q (utilizando o agitador magnético);
Acrescentar NaOH (20 pastilhas) e ajustar o pH até 8.0;
Completar volume para 1 ml;
Autoclavar a 121 °C por 20 minutos.

- Tampão Sorbitol (1 M Sorbitol, 125 mM EDTA, 1,4% de β- mercaptoetanol)

Solução para 50 mL pH 6.5

Sorbitol (sigma)	9,11 g
EDTA 0.5 mM (pH 8.0)	2,5 ml
Água Mili Q q.s.p	50ml

Preparo: Colocar 20 mL de água Mili Q para dissolver o Sorbitol;
Acrescentar o EDTA. Acertar o pH para 6,5;
Acrescentar 700 µl de β- mercaptoetanol e completar volume de 50 mL com água mili Q.

- Solução Estoque de *Trichoderma harzianum*

<i>Trichoderma harzianum</i>	60 mg/ml
Água milli Q	1 ml

Preparo: Diluir a *Trichoderma harzianum* em água milli Q;
Armazenar em tubos eppendorfs e manter a – 20 °C.

- Tampão CES (Citrato, EDTA, Sorbitol) pH 8.0

Citrato de Sódio 1M pH 5,6	2 ml (20 mM)
EDTA 0, 5 M pH 8,0	10 ml (50 mM)
Sorbitol 2,5 M	36 ml (0,9 M)
Água destilada	100 ml

- Tampão Citrato de Sódio (pH 5,6)

Citrato de Sódio	14,70 g
Água destilada	50 ml

* Sorbitol 2,5 M

Sorbitol	22,77 g
Água destilada	50 ml

- Tampão de Lise (pH 8.0)

10 mM Tris-HCL
10 mM EDTA
0,5% SDS
0,01% N- lauroilsarcozine

- Sodium Dodecyl Sulfatase (SDS) 10%

SDS (sigma)	100 g
Água Mili Q (q.s.p)	1000 ml

Preparo: Foram dissolvidos 100g de SDS em 800 ml de água mili Q;
Aquecendo a solução à 50 ou 68 °C;
Ajustar pH para 7,0 com HCl concentrado e o volume final completado para 1000 ml;
Estocar em temperatura ambiente.

- Solução Estoque da Proteinase K (concentração final de 20 mg/ml)

Ressuspender a Proteinase K em água Mili Q e aliquotar (100 µl em cada flaconete) e estocar a – 20 °C.

- Tampão TBE [10x]

Tris-Base (Sigma)	54g
Ácido Bórico (Sigma)	27,5 g
EDTA 0.5 M (pH 8.0)	20 ml
Água Mili Q	500ml

Preparo: Dissolver o trizma base e o ácido bórico em água milli Q e adicionar o EDTA;
Autoclavar a 121 °C por 20 minutos.

- Solução Tampão TBE [1x] para corrida

TBE [10x]	900 ml
Água milli Q	100 ml

ANEXO D – PREPARO: PCR / RFLP

Purificação e realização do PCR e RFLP nas amostras de leveduras do gênero *Malassezia*.

- Kit Amersham - Pharmacia – Biotech para PCR.

Cada eppendorf está constituído de: 1.5 U de *Taq* DNA Polimerase, 10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 1.5 mM de $MgCl_2$, 200 mM de dNTPs estabilizadas com BSA.

- Primers e Enzimas (Mirhendi et al., 2005)

- 1) sense 5' TAACAAGGATTCCCCTAGTA 3' (Invitrogen – USA)
- 2) antisense 5' ATTACGCCAGCATCCTAAG 3' (Invitrogen- USA)
- 3) Enzima de digestão HhaI (Invitrogen-USA)

- Brometo de Etidio

Solução de estoque (Concentração de 10 mg/ml)

Brometo de Etidio	1 g
Água destilada	100 ml

Guardar em temperatura ambiente em frasco âmbar.

- Solução de Uso para corar o gel

Brometo de Etidio (10 mg/ml)	15 µl
Água destilada	300 ml

- Gel de corrida

Gel de agarose para corrida (2%)

Agarose Ultra-pure (Gibco)	2 g
TBE [1 x]	100 ml
Brometo de Etídio	2 µl

Preparo: Dissolver a agarose e a solução de TBE [1 x] no microondas;
Aliquotar 35 ml em tubos falcon e manter a temperatura ambiente.

- Condições de corrida

A corrida eletroforética foi realizada durante 45 minutos usando 100 volts, 400 mA e um tampão TEB [10x].

ANEXO E – TERMO DE CONSENTIMENTO

TERMO DE CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO CLÍNICO.

Eu, _____, abaixo assinado, concordo em participar, de livre e espontânea vontade do estudo clínico “Comparação das Técnicas Micromorfológicas e Moleculares na Pesquisa e Identificação de *Malassezia spp* em Indivíduos Sadios e com Manifestações Dermatológicas”.

Estou ciente e esclarecido (a) sobre eventuais desconfortos que poderei sofrer, assim como dos benefícios em que o estudo pode resultar. Poderei abandonar a experiência a qualquer momento, se assim eu o desejar.

São Paulo, ____ de _____ de 200__