

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**PERFIL DE SUSCETIBILIDADE DE ISOLADOS DE  
*Malassezia pachydermatis*, COMENSAIS E  
PATÓGENOS, FRENTE A AGENTES  
ANTIFÚNGICOS.**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Caroline Borges Weiler**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2012**

**PERFIL DE SUSCETIBILIDADE DE ISOLADOS DE  
*Malassezia pachydermatis*, COMENSAIS E PATÓGENOS,  
FRENTE A AGENTES ANTIFÚNGICOS.**

**Caroline Borges Weiler**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**

**Orientador: Prof. Dr. Sydney Hartz Alves**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2012**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado**

**PERFIL DE SUSCETIBILIDADE DE ISOLADOS DE *Malassezia  
pachydermatis*, COMENSAIS E PATÓGENOS, FRENTE A AGENTES  
ANTIFÚNGICOS.**

elaborada por  
**Caroline Borges Weiler**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências Farmacêuticas**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Sydney Hartz Alves, Dr.**  
(Presidente/Orientador)

**Solange Cristina da Silva Martins Hoelzel, Dr<sup>a</sup>. (UNIFRA)**

**Luciane Teresinha Lovato, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**

Santa Maria, 30 de janeiro de 2012.

## AGRADECIMENTOS

Achei que este seria o capítulo mais simples de escrever mas, sinceramente, como posso expressar o quão importante foram todas essas pessoas apenas com palavras. Mesmo assim, vou tentar...

Agradeço, em primeiro lugar, aos meus pais, Lauro e Darlene, pelo amor incondicional, pelo apoio em todas as horas, pela extrema confiança e por sempre acreditarem em mim. Às minhas irmãs, Gabriela e Angélica, pelo amor e amizade, muito obrigada de coração.

Ao meu namorado, Daniel, que me apoiou e, com muito amor e paciência esperou por este dia. Te amo!

À minha grande amiga-irmã, Jana, que esteve sempre disposta a me ajudar a qualquer hora e momento, muito obrigada!

Ao professor Sydney, que tantas vezes deixou o “posto” de professor para ocupar o “posto” de amigo. Muito obrigada pela confiança e pelos ensinamentos.

Aos amigos do LAPEMI, começando pela Débora, a Laura e a Luana, que se mostraram amigas carinhosas e atenciosas, com as quais eu sei que posso contar. À Sandra, muito obrigada pelo carinho e pela amizade que construímos neste período. Ao Régis e ao Érico, muito obrigada pelos ensinamentos, pela grande ajuda e desculpem o incomodo causado pelas conversas femininas na “sala da inteligência”. À Frã, meu muito obrigada especial, por ter sido sempre tão prestativa, carinhosa e por ter me ajudado tanto. Vou sentir saudades de vocês, das conversas alegres com a Fê, a Maiara, a Claudinha, a Bel, a Deise, o Marcelo, o Pedro, a Carine e o professor Janio e, das brincadeiras com a Louise. Aprendi muito com cada um de vocês.

Enfim, obrigada a todos que me ajudaram e acreditaram em mim.

Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o que, com frequência, poderíamos ganhar, por simples medo de arriscar.

(William Shakespeare)

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal de Santa Maria

### **PERFIL DE SUSCETIBILIDADE DE ISOLADOS DE *Malassezia pachydermatis*, COMENSAIS E PATÓGENOS, FRENTE A AGENTES ANTIFÚNGICOS.**

Autora: Caroline Borges Weiler

Orientador: Sydney Hartz Alves

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 30 de janeiro de 2012.

*Malassezia pachydermatis* é uma levedura oportunista que acomete principalmente animais, estando associada a dermatomicoses e otopatias em cães e gatos. Por se tratar de um fungo de grande importância na medicina veterinária, o conhecimento do seu perfil de suscetibilidade frente a diversos antifúngicos se faz necessário para obtermos sucesso no tratamento e na prevenção de recidivas da malasseziose. Este estudo teve como objetivo principal comparar o perfil de suscetibilidade de isolados de *M. pachydermatis*, patógenos e comensais, frente aos antimicóticos cetoconazol, miconazol, clotrimazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol, nistatina e anfotericina B utilizando a técnica de microdiluição em caldo RPMI 1640 tamponado, proposta pelo protocolo M27-A3 do CLSI (2008). Através da avaliação das CIMs, constatou-se menor sensibilidade dos isolados oriundos de processos infecciosos (G1) a todos os antifúngicos testados. As melhores respostas foram observadas frente aos azólicos cetoconazol, itraconazol e voriconazol, sendo o itraconazol considerado o mais eficiente, visto que a maioria dos isolados testados se mostraram sensíveis às menores concentrações deste antifúngico. Ao comparar o perfil de suscetibilidade dos dois grupos, foi observada diferença significativa entre eles frente aos antifúngicos miconazol, clotrimazol, fluconazol, anfotericina B e nistatina, fato que poderia ser explicado pela variação do conteúdo lipídico da cápsula que envolve o microrganismo e da concentração de enzimas antioxidantes intracelulares.

**Palavras-chave:** *Malassezia pachydermatis*. Suscetibilidade. Agentes antifúngicos.

## **ABSTRACT**

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal de Santa Maria

### **SUSCEPTIBILITY PROFILE OF COMMENSAL AND PATHOGENIC *Malassezia pachydermatis* ISOLATES AGAINST ANTIFUNGAL AGENTS.**

Autora: Caroline Borges Weiler

Orientador: Sydney Hartz Alves

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 30 de janeiro de 2012.

*Malassezia pachydermatis* is opportunistic yeast that primarily affects animals, being associated with dermatomycoses and ear diseases in dogs and cats. This is important yeast in veterinary medicine and therefore the knowledge of its susceptibility profile against various antifungal agents, is necessary to obtain success in treating and preventing relapses of infection. The aim of this study was to compare the susceptibility between pathogenic and commensal *M. pachydermatis* strains against ketoconazole, miconazole, clotrimazole, itraconazole, fluconazole, voriconazole, amphotericin B and nystatin. All isolates were tested by the broth microdilution method using the CLSI M27-A3 (2008). The strains isolated from infectious processes (G1) showed higher MICs than commensals strains (G2). The azoles ketoconazole, itraconazole and voriconazole showed excellent effectiveness against *M. pachydermatis* isolates. Differences in susceptibility to amphotericin B, nystatin, miconazole, clotrimazole and fluconazole were observed between G1 and G2 groups. It can be explained by the variation in the lipid content of the capsule surrounding the organism and the concentration of intracellular antioxidant enzymes. *M. pachydermatis* is important yeast in veterinary medicine and therefore the knowledge of its susceptibility profile against various antifungal agents, is necessary to obtain success in treating and preventing relapses of infection.

**Keywords:** *Malassezia pachydermatis*. Susceptibility. Antifungal agents.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 – <i>Breakpoints</i> estabelecidos pelo protocolo M27-A3 para classificação das leveduras (CLSI, 2008).....	30
Quadro 2 – Faixa de concentração testada para cada antifúngico.....	31



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros de suscetibilidade dos grupos G1 e G2 de <i>Malassezia pachydermatis</i> frente a antifúngicos poliênicos e azólicos.....	34
Tabela 2 - Distribuição das CIMs para <i>Malassezia pachydermatis</i> , de diferentes origens.....	35

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	10
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	12
<b>2.1 Gênero <i>Malassezia</i></b>	12
<b>2.2 <i>Malassezia pachydermatis</i></b>	14
2.2.1 Taxonomia	15
2.2.2 Morfologia e identificação	15
2.2.3 Meios de cultivo	17
2.2.4 Epidemiologia e patogenia em humanos e animais	17
2.2.5 Tratamento	20
<b>2.3 Antifúngicos</b>	21
2.3.1 Antifúngicos poliênicos	22
2.3.1.1 Nistatina	22
2.3.1.2 Anfotericina B	23
2.3.2 Antifúngico azólicos	24
2.3.2.1 Cetoconazol	25
2.3.2.2 Miconazol	25
2.3.2.3 Clotrimazol	26
2.3.2.4 Itraconazol	26
2.3.2.5 Fluconazol	27
2.3.2.6 Voriconazol	28
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	29
<b>3.1 Microrganismos</b>	29
<b>3.2 Agentes antifúngicos</b>	29
<b>3.3 Testes de suscetibilidade</b>	30
3.3.1 Preparação do inóculo	31
3.3.2 Determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIMs)	31
3.3.3 Análise estatística	32
<b>4 RESULTADOS</b>	33
<b>5 DISCUSSÃO</b>	36
<b>6 CONCLUSÃO</b>	41
<b>REFERÊNCIAS</b>	42

# 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Malassezia* foi descoberto em 1846 pelo pesquisador alemão Eichstedt quando analisava amostras de lesões de pele oriundas de pacientes com pitiríase versicolor. Até então, não se sabia que esta doença se tratava de uma micose (GIUSIANO, 2006). No momento da descoberta, o gênero recebeu o nome de *Microsporum*, depois foi renomeado e passou a ser chamado de *Malassezia*; com o passar dos anos, outros estudos foram feitos e novas características do gênero foram descobertas. Desde então, ficou determinado que a fase leveduriforme fosse denominada *Pityrosporum* e a fase micelial *Malassezia*. Só em 1986 foi extinto o nome *Pityrosporum* e adotada a nomenclatura oficial, até hoje aceita, *Malassezia* (GUÉHO, 1988; SALKIN & GORDON, 1977).

Atualmente o gênero *Malassezia* é formado por quatorze espécies, consideradas microrganismos leveduriformes comensais da maioria dos vertebrados de sangue quente. Nestes hospedeiros, ao encontrarem condições favoráveis para seu crescimento exacerbado, passam a atuar como patógenos oportunistas causando infecções tanto em humanos como em animais (GUILLOT & BOND, 1999). Dentre as quatorze espécies, treze são lipodependentes, ou seja, necessitam de lipídios para seu desenvolvimento, são elas: *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. restricta*, *M. obtusa*, *M. globosa*, *M. slooffiae*, *M. dermatis*, *M. japonica*, *M. yamatoensis*, *M. nana*, *M. caprae*, *M. equina* e *M. cuniculi* sp.; a *M. pachydermatis* é a única espécie que, mesmo sendo lipofílica, não apresenta esta característica (CABAÑES et al., 2011).

Os seres humanos são acometidos, principalmente, pelas espécies lipodependentes do gênero *Malassezia*, que causam infecções como dermatite, caspa seborréica, pitiríase versicolor, foliculite e fungemias (PIÉRARD et al., 2003). Nos animais, as espécies *M. nana*, *M. caprae*, *M. equina*, *M. cuniculi* sp. e *M. pachydermatis* são as mais isoladas, sendo que animais domésticos, como cães e gatos, são mais acometidos por *M. pachydermatis*. Esta espécie é responsável pela maioria dos casos de otite externa e dermatite nestes animais (CAFARCHIA et al., 2011b; GIRÃO et al., 2004).

O tratamento das infecções por *Malassezia* pode ser tópico ou sistêmico,

dependendo da intensidade da infecção e, além da terapia antifúngica, é necessário atenuar o(s) fator(es) que desencadearam o desenvolvimento acelerado destas leveduras. As recidivas são comuns nos casos de malasseziose, possivelmente pelo tratamento incorreto ou pelo surgimento de resistência a determinado antifúngico, fato ainda pouco explorado na espécie *M. pachydermatis* (BOEKHOUT et al., 2010).

Mesmo as infecções por *Malassezia* sendo consideradas de grande importância na medicina veterinária e, em especial, a espécie *M. pachydermatis* sendo um dos principais patógenos de pequenos animais, ainda se têm poucos estudos nacionais que avaliam o seu perfil de suscetibilidade (BOEKHOUT et al., 2010). Por isso a importância de novas pesquisas e a realização de novos testes de suscetibilidade que visam esclarecer o comportamento desta espécie frente aos antifúngicos disponíveis no mercado.

Neste contexto, o presente estudo foi objetivado a:

a) avaliar o perfil de suscetibilidade de isolados de *M. pachydermatis*, provenientes do conduto auditivo de cães e gatos que apresentavam otite, frente aos antifúngicos: cetoconazol, miconazol, clotrimazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol, anfotericina B e nistatina;

b) avaliar o perfil de suscetibilidade de isolados de *M. pachydermatis*, oriundos do conduto auditivo de cães e gatos saudáveis, frente aos antifúngicos: cetoconazol, miconazol, clotrimazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol, anfotericina B e nistatina;

c) comparar o perfil de suscetibilidade de isolados de *M. pachydermatis* frente aos antifúngicos: cetoconazol, miconazol, clotrimazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol, anfotericina B e nistatina considerando sua origem comensal e patógena.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Gênero *Malassezia*

Em 1846, o pesquisador alemão Eichstedt descobriu que a pitiríase versicolor tratava-se de uma doença fúngica e, pela primeira vez, descreveu o agente desta doença. A descoberta ocorreu a partir da análise de amostras oriundas de pacientes que apresentavam lesões características de pitiríase versicolor e, seus achados micológicos foram correlacionados com fungos do gênero *Microsporum* (GIUSIANO, 2006; SIDRIM & DIÓGENES, 1999). Um ano depois, Sluyer, descreveu detalhadamente estas estruturas fúngicas e, em 1853, Robin nomeou este agente de *M. furfur*, fazendo uma comparação com o *M. audouinii*, por causar lesões com características furfuráceas relacionadas com as causadas por dermatófitos (GUILLOT & DUPONT, 1995). Em 1889, Baillon renomeou o gênero por discordar que a origem dos fungos causadores da pitiríase versicolor e das dermatofitoses fosse a mesma. O gênero passou a ser chamado de *Malassezia*, em homenagem ao pesquisador Malassez que havia feito estudos anteriores com estas leveduras (BAILLON, 1889).

Sabouraud, em 1904, ao observar amostras provenientes de lesões de pele, encontrou estruturas fúngicas que apresentavam morfologias distintas, sendo assim, nomeou a fase leveduriforme de *Pityrosporum* e manteve o nome *Malassezia* para denominar a fase micelial (GIUSIANO, 2006). Alguns anos depois, foi observado que a fase leveduriforme apresentava variações morfológicas, dando origem a duas espécies distintas: *P. ovale* (CASTELLANI & CHALMER, 1913) e *P. orbiculare* (GORDON, 1951); a primeira apresentava células ovóides e, a segunda, células globosas (SIDRIM & DIÓGENES, 1999).

No ano de 1925, Weidman isolou uma levedura com características do gênero *Pityrosporum* de lesões cutâneas de um rinoceronte indiano (*Rhinoceros unicornis*). Num primeiro momento, este isolado foi denominado como *P. pachydermatis* por ser semelhante aos encontrados em humanos, porém, não requerendo lipídeos para seu crescimento. Esta característica foi comprovada mais tarde, em 1952, por

Lodder (GUILLOT & BOND, 1999) com base nos estudos feitos por Benham que observou, pela primeira vez, que as espécies necessitavam de condições diferentes para seu crescimento em meio de cultura (GIUSIANO, 2006).

Em 1963, Shifrine e Marr demonstraram que o *P. ovale*, *P. orbiculare* e *M. furfur* não produziam ácidos graxos de cadeias curtas necessários para o seu desenvolvimento. A partir deste achado, foi possível desenvolver meios adequados para cultivo e armazenamento das diferentes espécies, os quais também permitiram a realização de estudos bioquímicos, fisiológicos e taxonômicos para uma melhor compreensão deste gênero (GUILLOT et al., 1996).

Com o passar dos anos, foi se percebendo que as formas celulares ovais e arredondadas podiam se originar uma da outra dependendo do meio de cultura e das condições de crescimento as quais eram submetidas e, que o fungo poderia se apresentar ora como hifa ora como levedura (GIUSIANO, 2006). Esta situação foi avaliada em 1986 quando, através de estudos micológicos, imunológicos e análises genéticas, se confirmou que as fases leveduriforme e micelial eram diferentes estágios de desenvolvimento do ciclo de vida do mesmo fungo. Desde então, o gênero *Pityrosporum* foi extinto e a nomenclatura oficial adotada foi *Malassezia* para qualquer forma deste microrganismo (GUÉHO, 1988; SALKIN & GORDON, 1977). A confirmação de que as espécies *P. ovale* e *P. orbiculare* eram o mesmo microrganismo ocorreu em 1989, através da análise do DNA destes fungos (GUÉHO & MEYER, 1989), sendo agora denominadas de *M. furfur* (ZAITZ, 1998).

Em 1990, surgiu uma nova espécie descrita por Simmons e Guého, a *M. sympodialis*. Uma espécie lipodependente, isolada de um paciente imunocomprometido (AIDS) e que se diferenciava da *M. furfur* pelo baixo conteúdo guanina/citosina (54%, sendo 66% na *M. furfur*) e pelo tipo simpodial de gemulação (SIMMONS & GUÉHO, 1990).

Guého et al., em 1996, identificaram mais quatro espécies, sendo elas: *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta* e *M. slooffiae*. A diferenciação destas novas espécies incluiu aspectos morfológicos da colônia, das células, detalhes ultra-estruturais, atividade da catalase, tolerância a 37°C, utilização de Tween como fonte de gordura, sequenciamento de RNA e análise de DNA (GUÉHO et al., 1996).

As técnicas moleculares desempenham um papel importante na diferenciação das espécies ao permitirem a comparação de seus genomas. Desta forma, através do sequenciamento de DNAr foi possível identificar *M. dermatitis* em amostras de

pacientes que apresentavam dermatite atópica (SUGITA et al., 2002), *M. japonica* em material proveniente de pacientes saudáveis e com dermatite atópica (SUGITA et al., 2003), *M. yamatoensis* isolada de pacientes saudáveis e com dermatite seborréica (SUGITA et al., 2004) e *M. nana* em amostras oriundas de felinos e bovinos com otite externa (HIRAI et al., 2004). Mais recentemente, o sequenciamento de RNAr permitiu a identificação de isolados de *M. caprae*, *M. equina* (CABAÑES et al., 2007) e *Malassezia cuniculi* sp. (CABAÑES et al., 2011).

Atualmente, o gênero *Malassezia* é composto por quatorze espécies; treze espécies que apresentam lipodependência e uma não-lipodependente – *M. pachydermatis*. Dentre as treze lipodependentes, nove espécies (*M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. restricta*, *M. obtusa*, *M. globosa*, *M. slooffiae*, *M. dermatis*, *M. japonica*, *M. yamatoensis*) têm sido isoladas de seres humanos, como comensais ou relacionadas a infecções fúngicas como pitíriase versicolor, foliculite, dermatite seborréica e atópica. As espécies *M. nana*, *M. caprae*, *M. equina*, *M. cuniculi* sp. e *M. pachydermatis* estão associadas a infecções em animais (CAFARCHIA et al., 2011b).

A distribuição das diferentes espécies, a prevalência da colonização e a densidade da população de *Malassezia* variam de acordo com o portador e as regiões acometidas, estando este fato associado à composição lipídica da pele e a presença de uma microbiota competitiva (bactérias e fungos) (SUGITA et al., 2010).

A importância da diferenciação das espécies deste gênero não está apenas no fato da identificação por si só, mas sim no fato de que possam ocorrer diferenças na virulência e na suscetibilidade aos antifúngicos (SCHLOTTFELDT et al., 2002).

## **2.2 *Malassezia pachydermatis***

A *M. pachydermatis* é considerada uma levedura zoofílica e lipofílica, porém não lipodependente (DUARTE et al., 1999). Dentre as espécies do gênero *Malassezia*, é a mais adaptada aos animais, sendo frequentemente isolada do conduto auditivo de cães e gatos (GIRÃO et al. 2004). Esta espécie faz parte da microbiota da maioria dos vertebrados de sangue quente (GUILLOT & BOND, 1999), sendo encontrada principalmente na pele e nas mucosas destes animais, podendo

ser isolada também do reto, sacos anais e vaginais (BOND et al., 1996). Seu isolamento em seres humanos é raro (ZAITZ et al., 2000). Mesmo sendo um microrganismo comensal, ao encontrar condições que permitam o seu crescimento exacerbado, esta levedura passa a atuar como patógeno oportunista, causando infecções (COUTINHO et al., 2006). Em cães e gatos, tem sido comumente associada a processos de desequilíbrio local, como otite externa e dermatite (GIRÃO et al., 2004).

### 2.2.1 Taxonomia

A espécie *M. pachydermatis* foi classificada como membro do reino *Fungi*, filo *Basidiomycota*, classe *Blastomycetes*, ordem *Cryptococcales*, família *Cryptococcaceae* e gênero *Malassezia*, devido as suas características bioquímicas, fisiológicas, genéticas e reprodutivas (ASPÍROZ et al., 1999; BAILON, 1889; GUILLOT & BOND, 1999; SHLOTTFELDT et al., 2002).

### 2.2.2 Morfologia e identificação

Para a correta identificação de isolados fúngicos é importante avaliar, além das características morfológicas da célula e da colônia, as características fisiológicas e bioquímicas do isolado. A identificação morfológica pode ser feita no exame direto através da observação microscópica (40-100x) de amostras oriundas de lesões ou meios de cultura, previamente coradas com azul algodão, azul de metileno, solução de Albert, entre outros corantes (GIUSIANO, 2006; GUILLOT et al., 1998).

Microscopicamente, *M. pachydermatis* se apresenta como células leveduriformes pequenas, isoladas ou em grupos, em formato oval ou elíptico, podendo apresentar-se arredondada. As dimensões variam de 2-7  $\mu\text{m}$ , com parede celular espessa e de múltiplas camadas (lamelar), apresentando uma estrutura semelhante a uma cápsula, de composição lipídica. As hifas e pseudohifas normalmente não são vistas no exame direto (ASHBEE, 2007; GUÉHO et al., 1996;



GUILLOT & BOND, 1999; MITTAG, 1995).

As colônias apresentam-se opacas com coloração inicial amarelo-creme tornando-se marrom com o passar do tempo; a textura pode ser seca, friável, granulosa ou ainda, apresentar-se gordurosa; sua superfície apresenta-se em forma de cúpula, medindo de 3-5 mm (GUÉHO et al., 1996, GUILLOT & BOND, 1999). O crescimento das colônias acontece numa faixa de temperatura de 25°C a 41°C, por 24, 48 ou até 96 horas (AKERSTEDT & VOLLSET, 1996), sendo que a condição ideal de crescimento para a espécie *M. pachydermatis* é a 37°C, durante 24 a 48 horas (GUÉHO et al., 1996). Após o período de incubação, os isolados podem ser mantidos à temperatura ambiente. A liofilização e a preservação em nitrogênio líquido também são métodos eficientes de conservação desta espécie (BREIEROVA et al., 1991; GUÉHO et al., 1996; MIDGLEY, 1989).

Dentre as espécies do gênero *Malassezia*, a espécie *M. pachydermatis* é a que apresenta maior sensibilidade ao frio (MIDGLEY, 1989); a maioria dos isolados torna-se inviável depois de três meses a 4°C, sendo que as outras espécies permanecem viáveis mesmo depois de cinco anos nesta mesma temperatura (GUILLOT & BOND, 1999). *M. pachydermatis* suporta condições de aerofilia, microaerofilia, porém seu desenvolvimento fica prejudicado em condições anaeróbias (FAERGEMANN & BERNANDER, 1981).

A reprodução destas leveduras é assexuada e, segundo Nishimura, o brotamento ocorre em etapas. Primeiro, a célula-mãe projeta, a partir da sua parede celular, uma estrutura semelhante a uma orelha dando origem à célula-filha. À medida que esta estrutura vai crescendo, sua parede celular vai se tornando mais espessa, apresentando-se serrilhada e em camadas. Ao atingir o tamanho da célula-mãe, o broto se separa deixando uma cicatriz na célula de origem (AHEARN & SIMMONS, 1998; COUTINHO & PAULA, 2000; GUILLOT & BOND, 1999).

*M. pachydermatis* é a única espécie do gênero *Malassezia* capaz de se desenvolver em ágar Saboraud sem suplementação lipídica. Esta característica de não ser lipodependente, embora seja lipofílica, é crítica para sua identificação. As demais espécies necessitam de uma fonte exógena de lipídios devido a um defeito na capacidade de sintetizar ácidos graxos saturados importantes para o desenvolvimento (GUILLOT et al., 1996; GUPTA et al., 2004b; KANEKO et al., 2007).

Além das características citadas anteriormente, esta espécie evidencia

atividade da urease e, é positiva para a prova de coloração por azul de diazônio B (DDB); a atividade da enzima catalase é variável (GUÉHO et al., 1996; GUILLOT et al., 1996; KANEKO et al., 2007). A prova de assimilação dos Tweens evidencia plena assimilação dos Tweens 40, 60 e 80, porém, a assimilação do Tween 20 é variável. Segundo alguns autores, a incorporação de 10% de Tween 20 no meio já faz de inibir o crescimento da *M. pachydermatis* (GUÉHO et al., 1996; GUILLOT et al., 1996; KANEKO et al., 2007; MIDGLEY et al., 1998).

### 2.2.3 Meios de cultivo

Para o isolamento ou armazenamento das espécies do gênero *Malassezia* podem ser utilizados, na rotina laboratorial, os meios de Dixon e Leeming-Notman, ou ainda o ágar Sabouraud acrescido de uma fonte de lipídios como: o azeite de oliva, leite, Tweens ou glicerol (ASHBEE & BOND, 2010; GIUSIANO, 2006; GUILLOT et al., 1998; SIDRIM & DIÓGENES, 1999).

Para a espécie *M. pachydermatis* não é necessária a utilização destes meios enriquecidos, pois, ela apresenta bom desenvolvimento em ágar Sabouraud, acrescido de cloranfenicol e cicloheximida, visto que não requer lipídios como fonte de carbono (GUÉHO et al., 1996).

### 2.2.4 Epidemiologia e patogenia em humanos e animais

Os seres humanos são mais acometidos pelas espécies lipodependentes do gênero *Malassezia*. Estas leveduras encontram-se em maior concentração em áreas do corpo que apresentam maior produção de sebo, como couro cabeludo, face, peito e parte superior das costas; existem relatos da presença destes microrganismos em glândulas do pênis e, também no prepúcio (FAERGEMANN, 2002; GUÉHO et al., 1998; GUPTA & KOHLI, 2004a; MAYSER et al., 2001). A densidade destas leveduras é maior durante a puberdade e nos adultos jovens, onde a produção de sebo está elevada devido a alta atividade das glândulas sebáceas nestes períodos.

Com o envelhecimento, a capacidade destas glândulas diminui e, conseqüentemente, diminui a população de *Malassezia* (FAERGEMANN, 2002; GUÉHO et al., 1998; GUPTA & KOHLI, 2004a). A incidência destas leveduras em crianças fica em torno dos 25%; em adolescentes e adultos jovens chega a 100% (ISKIT et al., 2006). Além da idade, a etnia e os hábitos alimentares também influenciam na concentração destas leveduras em determinadas regiões do corpo (ASHBEE, 2007; GUPTA et al., 2001a, 2001b, 2004a).

As espécies do gênero *Malassezia* estão associadas a vários tipos de infecções em humanos como pitíriase versicolor, dermatite seborréica, foliculite, dermatite atópica, fungemias, peritonite e meningite e, as espécies mais isoladas são *M. sympodialis*, *M. globosa* e *M. restricta* (ASHBEE, 2007; PIÉRARD et al., 2003; SIDRIM & DIÓGENES, 1999).

A *M. pachydermatis* é isolada principalmente de animais e por isso é considerada uma levedura zoofílica, embora existam relatos de infecções em seres humanos. Tais infecções ocorreram principalmente em UTIs neonatais, onde os recém-nascidos faziam uso de cateteres para nutrição parenteral lipídica (CHANG et al., 1998; CHRYSSANTHOU et al., 2001; LAROCCO et al., 1988). Casos de infecções sistêmicas e granuloma facial também foram descritos em seres humanos devido a contaminação por esta levedura. O sintoma mais comum das fungemias por *Malassezia* é a febre alta e, órgãos como o coração e o pulmão são os mais afetados (FAN et al., 2006; GOMPERTZ & CORNEJO, 1998; GUÉHO et al., 1987; LAROCCO et al., 1988). Alguns estudos já constataram a presença de *M. pachydermatis* nas mãos de proprietários de animais domésticos devido ao contato direto destes com seus animais de estimação, fato que os torna possíveis carreadores desta levedura (CHANG et al., 1998; MORRIS et al., 2005).

Na medicina veterinária, o conhecimento sobre *M. pachydermatis* é muito importante visto que é frequentemente encontrada em carnívoros selvagens e domésticos, principalmente cães e gatos (GIRÃO et al., 2004; GUILLOT et al., 1994). Esta espécie está presente tanto em animais sadios como em animais que apresentam o processo infeccioso. A frequência de isolamento parece ser equivalente entre os dois grupos; todavia, a diferença está na densidade de microrganismos isolados de cada grupo; os animais com malasseziose apresentam uma concentração maior do microrganismo do que os animais apenas colonizados (BAUWENS et al., 1996; FRASER, 1961).

A *M. pachydermatis* é isolada principalmente da pele, mucosas, regiões interdigitais, reto, glândulas perianais e vaginais e do conduto auditivo de animais domésticos (BOND & LLOYD, 1997; KENNIS et al., 1996; LUCKMAN, 1982). É um microrganismo comensal que faz parte da microbiota destes animais, porém, quando encontra condições que favoreçam o seu crescimento exacerbado, se torna o agente patogênico de algumas infecções (COUTINHO et al., 2006). Desordens hormonais, distúrbios no sistema imune do hospedeiro, deficiências nutricionais, rompimento da barreira cutânea devido à presença de doenças de base (diabetes, infecções bacterianas, alterações endócrinas e alergias), alta produção de sebo, elevada umidade e temperatura são alguns dos fatores que determinam o crescimento descontrolado da *M. pachydermatis* e a instalação do processo infeccioso (BOND et al., 1996; CHEN & HILL, 2005; MATOUSEK & CAMPBELL, 2002; MAULDIN et al., 1997). Algumas raças de cães, como Basset Hound, Dachshund, Cocker Spaniel, West Highland White Terrier, Poodle e Australian Silky Terrier são mais acometidas por *Malassezia* por apresentarem orelhas longas e pendentes, presença de pêlos no canal auditivo e/ou sistema imune deficiente que os torna predispostos a infecções de pele ou ouvido por esta levedura (BOND et al., 1996; CHOI et al., 2001; MALDIN et al., 1997).

Doenças como dermatite e otite são os casos mais comuns de infecções por *Malassezia* em cães e gatos (CAFARCHIA et al., 2005); a dermatite se caracteriza por lesões eritematosas, pruriginosas, alopecia local, com ou sem hiperpigmentação e, geralmente acometem a região do abdômen, axilas e áreas interdigitais do animal, podendo ser lesões localizadas ou disseminadas. As lesões crônicas apresentam-se hiperpigmentadas e com uma superfície mais espessa (CHEN & HILL, 2005; MATOUSEK & CAMPBELL, 2002). Nos casos de otite externa, observa-se formação excessiva de cerume marrom escuro/negro e prurido com eritema do meato acústico externo. A confirmação de otite por *M. pachydermatis* se dá através do exame direto e da cultura deste exsudato. Alguns autores consideram que apenas a presença de *M. pachydermatis* não determina a etiologia da infecção. Porém, se esta levedura se apresentar em grande número no exame direto pode ser considerada o agente da doença (BOND et al., 1996; HIRAI et al., 2004). Entretanto, existem casos onde esta espécie encontra-se em altas concentrações tanto em animais saudáveis como nos doentes. Sendo assim, deve-se levar em consideração as manifestações clínicas do animal.

### 2.2.5 Tratamento

Para se obter sucesso no tratamento das infecções por *Malassezia* é importante saber qual o motivo que desencadeou o crescimento descontrolado desta levedura e, atenuá-lo para evitar recidivas. O tratamento varia de acordo com a intensidade e a gravidade das lesões, podendo ser um tratamento tópico ou sistêmico.

O tratamento tópico é indicado quando se tem poucas lesões ou na profilaxia das recidivas. Consiste numa terapia com agentes fungicidas ou agentes que alteram o estrato córneo e acabam prejudicando o desenvolvimento da levedura. As formas farmacêuticas mais utilizadas neste tratamento são loções, xampus, cremes e sabonetes (PATTERSON & FRANK, 2002; ZAITZ et al., 2000). O uso de substâncias desengordurantes ou que promovem a descamação da pele antes da aplicação tópica do antifúngico garante uma melhor absorção deste medicamento e, em casos de uso profilático, estes ativos diminuem as condições favoráveis para o desenvolvimento acelerado destas leveduras. Peróxido de benzoíla, ácido salicílico e enxofre são algumas substâncias utilizadas para este fim. Os antifúngicos mais utilizados são sulfeto de selênio, cetoconazol e miconazol, sozinhos ou em combinação com clorexidine (LEEMING et al., 1997; PATTERSON & FRANK, 2002).

Quando a terapia tópica não é eficaz ou as lesões são mais graves e recorrentes, o tratamento sistêmico é indicado. Antifúngicos como cetoconazol, itraconazol e fluconazol são os mais utilizados e a duração do tratamento varia de acordo com as manifestações clínicas do animal (FAERGEMANN, 1994; PATTERSON & FRANK, 2002; ZAITZ & SAMPAIO, 1995). Dentre os azóis, o cetoconazol é o que causa mais efeitos colaterais, dependendo da dose e do tempo de administração. Náuseas, vômitos, diarreia, anorexia e alterações das enzimas hepáticas são alguns dos efeitos colaterais observados (DE JAHAN et al., 2000; SCOTT et al., 2001).

Em casos de infecções em humanos, mais acometidos por espécies lipodependentes do gênero *Malassezia*, é recomendado evitar o uso de óleos/lubrificantes corporais em áreas da pele onde a produção de sebo é mais intensa e tomar banho após situações de sudorese excessiva. Tais práticas ajudam na prevenção de infecções por *Malassezia* spp. (ZAITZ et al., 2000). O percentual de

recidivas de malasseziose é alto; de acordo com alguns autores, 60% dos pacientes apresentam novamente a infecção após um ano de cura e 80% após dois anos de cura clínica (FAERGEMANN, 1997).

As espécies do gênero *Malassezia* apresentam diferentes perfis de suscetibilidade frente a determinados antifúngicos. Estudos *in vitro* demonstram que estas leveduras são sensíveis ao cetoconazol, clotrimazol, miconazol, itraconazol e voriconazol (GARAU et al., 2003; HAMMER et al., 2000; NAKAMURA et al., 2000), porém, a *M. pachydermatis* apresenta menor sensibilidade frente a classe de antifúngicos azólicos (NAKAMURA et al., 2000). A terbinafina e nistatina também são ativas contra *Malassezia* spp., sendo que o poliênico necessita de concentrações maiores, *in vitro*, quando comparado aos azólicos (KOGA et al., 2009; RUBIN et al., 2002).

### 2.3 Antifúngicos

A moderna antifungoterapia teve início em 1949 com a nistatina e, em 1956, outro poliênico foi introduzido no mercado, a anfotericina B; um ano depois, se conheceu a 5-fluorocitosina, todos antimicóticos ainda em uso para o tratamento de doenças fúngicas.

Os antifúngicos azólicos passaram a ser utilizados a partir de 1969, com o lançamento do clotrimazol para uso tópico. A seguir, o miconazol firmou-se como agente tópico de amplo espectro. O cetoconazol surgiu na década de 80, com a vantagem de ser administrado oralmente e possuir baixa toxicidade. Estes três azólicos constituem o grupo dos imidazólicos.

Nos anos 90, a incorporação de um átomo de nitrogênio no grupamento azol, permitiu o desenvolvimento dos triazólicos, grupo formado pelo fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol. Estes antimicóticos são mais indicados para uso sistêmico, onde os mais novos agentes (voriconazol e posaconazol) possuem um amplo e bem definido espectro de ação

No grupo das alilaminas, a terbinafina é o principal destaque e, a partir do ano 2000, o grupo das equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina) passaram a integrar o arsenal antifúngico cujos usos e associações estão sob

intenso estudo.

Atualmente, a maioria dos agentes antifúngicos disponíveis age sobre a biossíntese do principal esteroide da membrana celular fúngica, o ergosterol. Os antifúngicos alilaminas e azólicos atuam sobre etapas desta biossíntese e causam alterações na membrana fúngica. Já os poliênicos atuam diretamente sobre o ergosterol e, as equinocandinas agem sobre a síntese da parede celular através do bloqueio da enzima  $\beta$ -1,3-D-glucana sintetase. Esta classe de medicamentos apresenta maior segurança e espectro de ação (COWEN, 2008).

A escolha da terapia antifúngica deve levar em consideração o microrganismo envolvido na infecção, a região que está sendo acometida, o estado imunológico do paciente e a farmacocinética (absorção, eliminação, toxicidade) do antifúngico a ser escolhido (LOEFFLER & STEVENS, 2003). O perfil de suscetibilidade a antifúngicos é um fator ainda pouco explorado, mas de crescente importância.

### 2.3.1 Antifúngicos poliênicos

Esta classe de antifúngicos apresenta uma estrutura química semelhante aos antibacterianos macrolídeos. Possuem um anel macrocíclico com uma parte rígida lipofílica e outra flexível hidrofílica, esta estrutura é responsável pela ação antifúngica destes medicamentos (SANDE & MANDELL, 1987).

#### 2.3.1.1 Nistatina

A nistatina é um poliênico isolado do *Streptomyces noursei*, que apresenta ação fungistática e fungicida, cujo alvo é o esteroide das membranas fúngicas, causando danos nesta estrutura e morte do microrganismo (GOODMAN & GILMAN, 2003).

Este poliênico apresenta um amplo espectro de ação, sendo eficaz no tratamento de infecções por *Pseudallescheria* sp., *Alternaria* sp., *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Sporothrix* sp.,

*Trichosporum* sp. e *Penicilium*. Porém, alguns isolados de *Fusarium* spp. mostraram-se resistentes a este medicamento (BENNETT, 2006).

A nistatina é muito utilizada na terapia tópica das micoses superficiais de pele e mucosas, principalmente nos casos de candidíase. A administração oral não garante uma boa absorção gastrointestinal e o uso por via parenteral deve ser avaliado devido à elevada toxicidade deste antifúngico (SANDE & MANDELL, 1987).

Este poliênico pode ser encontrado também na forma lipossomal que causa menos efeitos colaterais que a fórmula original, sendo o principal efeito colateral deste medicamento a ruptura das hemáceas do paciente (BENNETT, 2006).

### 2.3.1.2 Anfotericina B

A atividade antimicótica deste medicamento é resultado de sua ligação com a fração esterol presente na membrana fúngica, o ergosterol. Assim, formam-se poros ou canais que alteram a permeabilidade e a função de transporte desta membrana, originando perda de íons  $K^+$  intracelulares e morte do microrganismo (BENNETT, 2006; GOODMAN & GILMAN, 2003).

A anfotericina B possui atividade frente a vários fungos como *Trichosporum* spp., *Aspergillus*, spp., *Malassezia* spp. e *Fusarium* spp. (PFALLER et al., 2002; SUTTON et al., 1999). Porém, algumas espécies de *Candida* vêm demonstrando redução da sensibilidade frente a este antifúngico (PFALLER & DIEKEMA, 2004).

A administração da anfotericina B por via oral não garante uma boa absorção do medicamento, esta via é escolhida apenas em casos de infecções fúngicas gastrointestinais. Em infecções sistêmicas, a via de escolha é a intravenosa e, a administração deve ser lenta. Nas formulações injetáveis, a anfotericina B encontra-se complexada com desoxicolato de sódio ou com lipídios, ou ainda, encapsulada em lipossomas (SILVA, 2006).

Seu uso é recomendado nos casos mais graves de infecções fúngicas, devido a sua toxicidade. Embora ela apresente uma elevada afinidade pelo ergosterol fúngico, a interação entre este medicamento e o esterol das membranas do hospedeiro (colesterol) não está descartada. Este fato está ligado aos efeitos colaterais deste medicamento (COWEN, 2008; LOEFFLER & STEVENS, 2003).



### 2.3.2 Antifúngicos azólicos

Os azóis são compostos sintéticos que atuam sobre a biossíntese do ergosterol fúngico através do bloqueio de enzimas do citocromo P450. O principal mecanismo de ação destes antifúngicos é o bloqueio da enzima 14 $\alpha$ -demetilase, que acarreta num acúmulo de lanosterol (tóxico), um precursor do ergosterol, e conseqüentemente, numa diminuição da produção deste esterol fúngico (JOSEPH-HORNE & HOLLOMON, 1997; KELLY et al., 1997; VANDEN, 1991). As ações destes medicamentos sobre os lipídios da membrana plasmática e sobre a enzima 3-cetoesterol redutase, que participa da biossíntese do metilesterol, também são consideradas (JOSEPH-HORNE & HOLLOMON, 1997; LOEFFLER & STEVENS, 2003).

Dependendo do número de átomos de nitrogênio no anel azólico, esta classe de antifúngicos se divide em imidazóis e triazóis. Cetoconazol, miconazol e clotrimazol fazem parte do grupo imidazólico; itraconazol, fluconazol, voriconazol, ravuconazol e posaconazol pertencem ao grupo triazólico.

Dentre os derivados azólicos, os triazóis apresentam grande eficiência e baixa toxicidade. Ao contrário dos imidazólicos, este grupo possui alta afinidade pelas enzimas do citocromo P450 fúngico, não apresentando afinidade pelo citocromo P450 dos mamíferos (SPINOSA et al., 2002). Esta menor especificidade dos imidazóis explica a incidência de interações com outros medicamentos e a incidência de efeitos colaterais durante seu uso (BENNETT, 2006).

#### 2.3.2.1 Cetoconazol

O cetoconazol foi o primeiro antifúngico azólico administrado oralmente e que atingia bons níveis sanguíneos (BORELLI et al., 1979; SILVA, 2006). É um medicamento que se distribui facilmente pelos tecidos e líquidos teciduais, porém, para alcançar níveis terapêuticos no SNC é necessária a administração de altas doses (SILVA, 2006). O cetoconazol apresenta alguns efeitos colaterais como, por exemplo, distúrbios gastrointestinais leves, alterações das enzimas hepáticas e,

raramente, hepatite (BENNETT, 2006). Em altas doses, podem inibir a síntese de esteróides e testosterona e assim, causar ginecomastia (SILVA, 2006).

Seu espectro de ação é bastante amplo, sendo ativo contra espécies de *Candida* spp., *Blastomyces*, *Histoplasma* sp., *Coccidioides* sp., *Cryptococcus* spp. (ROSENBLATT et al., 1980; WARNOCK et al., 1983). Porém, relatos de resistência primária a este antifúngico incluem isolados de *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e *C. glabrata* (AHEARN & McGLOHN, 1984).

A interação com outros medicamentos deve ser levada em consideração ao escolher o tratamento com cetoconazol, fármacos antagonistas de receptores H2 e antiácidos, por exemplo, diminuem a absorção deste antifúngico, reduzindo sua concentração plasmática (SILVA, 2006).

#### 2.3.2.2 Miconazol

Este imidazólico pode ser administrado por via oral, em casos de infecções no trato gastrointestinal ou por via parenteral, em situações de infecção sistêmica (NEGRONI et al., 1977; ROLAN et al., 1983; SUNG et al., 1977). A via tópica é a mais empregada em casos de infecções superficiais (BENNETT, 2006). O miconazol apresenta uma boa distribuição no tecido ósseo, nas articulações e no tecido pulmonar, porém, não atinge concentrações terapêuticas no SNC. O efeito colateral mais comum consiste em distúrbios gastrointestinais; problemas mais graves são raros, mas existem relatos de discrasias sanguíneas (SILVA, 2006).

#### 2.3.2.3 Clotrimazol

Também faz parte do grupo dos imidazólicos que pode ser utilizado na terapia tópica de dermatofitoses, candidíase e malasseziose (LOBELL et al., 1995; SAWYER et al., 1975) com variações no percentual de sua absorção; até 0,5% do clotrimazol é absorvido quando aplicado à pele intacta e de 3 a 10% quando aplicado na mucosa vaginal (SANDE & MANDELL, 1987). O clotrimazol apresenta

uma metabolização, principalmente, hepática e os efeitos colaterais observados, na administração parenteral, são náuseas e vômitos. Durante o tratamento tópico podem surgir eritema, prurido, ardência, descamação e formação de vesículas (SANDE & MANDELL, 1987).

Tanto o miconazol quanto o clotrimazol, além da atividade sobre o biossintese do ergosterol, podem estar envolvidos na lise da membrana celular fúngica, fato que potencializa seu efeito fungicida (MATHEWS et al., 1998; VANDEN, 1988). Mesmo se tratando de medicamentos mais antigos, ainda têm um papel importante no tratamento tópico das infecções por leveduras e fungos filamentosos (HECTOR, 2005).

#### 2.3.2.4 Itraconazol

O itraconazol foi o primeiro triazólico a ser usado em humanos (LOEFFLER & STEVENS, 2003). Sua molécula é altamente lipossolúvel, com grande afinidade por órgãos que contenham queratina e tecido adiposo, chegando a concentrações, na pele, cinco vezes maiores do que no plasma (RICHARDSON & WARNOCK, 1993; WHEAT et al., 1995). A administração oral de cápsulas contendo o medicamento não garantiu uma boa absorção do itraconazol, sendo assim, outras formas farmacêuticas surgiram como, por exemplo, a solução intravenosa e a solução oral (WILLEMS et al., 2001). Sua metabolização ocorre no fígado e seu metabólito primário também possui ação antifúngica (VANDEN et al., 2003). Por agir sobre certas enzimas do citocromo P450, sofre interações com outros medicamentos, como: varfarina, ciclospina e digoxina (WILLEMS et al., 2001).

Geralmente é bem tolerado, porém, durante a terapia com itraconazol, dependendo da dose administrada, podem ser observados alguns efeitos colaterais, tais como: erupções cutâneas, aumento da concentração das enzimas fosfatase alcalina e aminotransferase, anorexia, vasculite, entre outras (LEGENDRE et al., 1996; PLOTNICK et al., 1997; SHEEHAN et al., 1999).

Pode ser utilizado tanto no tratamento de micoses superficiais (dermatifitose, candidíase e malasseziose) como em micoses sistêmicas (candidíase sistêmica,

aspergilose, histoplasmose, esporotricose e cromomicose), em humanos e animais (LEGENDRE et al., 1996; RICHARDSON & WARNOCK, 1993; WHEAT et al., 1995).

#### 2.3.2.5 Fluconazol

Este triazólico é bastante hidrossolúvel, apresentando baixa ligação com as proteínas plasmáticas e ampla distribuição pelos líquidos corporais incluindo saliva, escarro e leite materno. Atinge boas concentrações no líquor e, tanto sua administração oral como intravenosa garantem bons níveis plasmáticos do medicamento (BENNETT, 2006; RIPA et al., 1993). O fluconazol sofre uma pequena metabolização e sua principal rota de eliminação são as vias urinárias, sendo encontrado na forma inalterada na urina e nas fezes dos pacientes sob tratamento (HUMPHREY et al., 1985). Por esse motivo é indicado para o tratamento de infecções fúngicas do trato urinário, exceto as causadas por *Aspergillus* spp. e outros fungos filamentosos (BODEY, 1992; ESPINEL-INGROFF et al., 1995). Possui baixa atividade contra *Histoplasma capsulatum* e *Blastomyces* spp. (PAPPAS et al., 1997; WHEAT et al., 1997); nas infecções por *Sporothrix* spp., apresenta bons resultados (KAUFFMAN et al., 1996).

Geralmente, o fluconazol apresenta boa tolerabilidade e, efeitos colaterais como a hepatotoxicidade são raros (HECTOR, 2005). A interação com outros medicamentos é difícil, pois, entre os azólicos, é o antifúngico que menos interage com as enzimas hepáticas (BENNETT, 2006). Além de ser utilizado na terapia de infecções fúngicas já instaladas, pode ser usado em tratamentos profiláticos. O problema nestes casos é a possibilidade dos patógenos desenvolverem resistência e não mais responderem ao tratamento com este antifúngico (LOEFFLER & STEVENS, 2003).

### 2.3.2.6 Voriconazol

O voriconazol é estruturalmente similar ao fluconazol e, apresenta-se na forma de comprimidos e soluções intravenosas, com boa biodisponibilidade quando comparado aos demais antifúngicos (HECTOR, 2005). Por ser metabolizado pelas enzimas hepáticas pode interferir no metabolismo de outros medicamentos, como ciclosporinas, benzodiazepínicos, estatinas, omeprazol e varfarina (GROLL et al., 2003).

Apresenta amplo espectro de ação, mostrando-se ativo contra espécies de *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *C. albicans* e não-*albicans*, *Cryptococcus* spp., *Rhizopus* spp., *Acremonium* spp. e *Pseudallescheria boydii* (KAPPE, 1999; MANAVATHU et al., 2000; PERFECT et al., 2003; RAAD et al., 2006).

Devido a sua potente ação e seu amplo espectro de ação, o voriconazol se mostrou uma alternativa eficaz para substituir a anfotericina B em algumas infecções, principalmente, em casos de pacientes neutropênicos e que apresentam febre persistente (WALSH et al., 2002).

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 Microrganismos**

Os isolados de *M. pachydermatis* avaliados neste estudo são provenientes do Laboratório de Biologia Molecular e Celular da Universidade Paulista (UNIP). Estes foram separados em dois grupos (G1 e G2), sendo o G1 composto por 40 amostras provenientes do conduto auditivo de cães e gatos que apresentavam otite externa e, o G2 formado por 40 amostras oriundas do conduto auditivo de cães e gatos saudáveis.

A identificação fenotípica destes isolados foi feita através da análise macroscópica da colônia seguida de coloração de Gram, prova da urease, crescimento em meio Sabouraud sem acréscimo de gordura e, a identificação molecular foi confirmada por randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) utilizando os primers Mpa-F CTGCCATACGGATGCGCAAG e 58S-R TTCGCTGCGTTCTTCATCGA (SUGITA et al., 2003).

### **3.2 Agentes antifúngicos**

Os agentes antifúngicos utilizados neste estudo foram obtidos a partir de seus fabricantes na forma de pó puro ou soluções para administração intravenosa de potência conhecida. A solução-estoque de cetoconazol, miconazol, clotrimazol, itraconazol, voriconazol e nistatina foram preparadas utilizando dimetilsulfóxido (DMSO), enquanto que a solução-estoque de fluconazol foi preparada em água destilada estéril. A solução-estoque de anfotericina B foi a própria solução intravenosa.

As soluções-intermediárias foram feitas a partir da diluição das soluções-estoque, utilizando Caldo RPMI 1640 tamponado com ácido morfolino propanossulfônico (MOPS). Visto que há uma diluição 1:2 do antifúngico quando

combinado com o inóculo, as concentrações iniciais destas soluções eram duas vezes mais concentradas do que as concentrações finais desejadas para o teste.

### 3.3 Testes de suscetibilidade

Para *M. pachydermatis* não existem testes de suscetibilidade padronizados. Sendo assim, a suscetibilidade dos isolados foi determinada pelo método de microdiluição em Caldo RPMI 1640 tamponado proposto pelo protocolo M27-A3 aprovado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008) e, na ausência de *breakpoints* específicos para *Malassezia* spp., utilizamos aqueles descritos para *Candida* spp. (Quadro 1).

As faixas de concentrações testadas para cada antifúngico estão descritas no Quadro 2.

Antifúngicos	CIM (µg/mL)	Classificação
Fluconazol	≤8	Sensível
	16-32	Sensível dose-dependente
	≥64	Resistente
Itraconazol	≤0,125	Sensível
	0,25-0,5	Sensível dose-dependente
	≥1	Resistente
Voriconazol	≤1	Sensível
	2	Sensível dose-dependente
	≥4	Resistente
Anfotericina B	>1	Possível resistência

Quadro 1 – *Breakpoints* estabelecidos pelo protocolo M27-A3 para classificação das leveduras (CLSI, 2008).

<b>Antifúngicos</b>	<b>Faixa de concentração (µg/mL)</b>
Cetoconazol	16-0,007
Miconazol	64-0,125
Clotrimazol	64-0,125
Itraconazol	16-0,007
Fluconazol	64-0,125
Voriconazol	16-0,007
Anfotericina B	16-0,007
Nistatina	64-0,125

Quadro 2 - Faixa de concentração testada para cada antifúngico.

### 3.3.1 Preparação do inóculo

Os isolados foram cultivados em tubos contendo meio de Dixon e incubados por 48-72h a 37°C.

Para a preparação do inóculo, utilizou-se solução salina estéril (0,85%) acrescida de Triton-X 100 (0,05%) para obter uma suspensão do microrganismo, ajustada de acordo com o tubo 0,5 da escala de MacFarland. A seguir esta suspensão foi diluída a 1:50 com água destilada estéril e depois, a 1:20 com Caldo RPMI 1640 tamponado.

### 3.3.2 Determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIMs)

Para o ensaio de determinação das CIMs utilizou-se microplacas de poliestireno contendo 96 poços com fundo chato. Primeiramente, adicionou-se 100 µL do antifúngico nas diferentes concentrações, distribuídos de forma seriada nos poços de 1 a 8 das microplacas. Posteriormente, adicionou-se 100 µL do inóculo



previamente ajustado e diluído em Caldo RPMI 1640 tamponado.

As CIMS foram determinadas após 48h de incubação em estufa a 35°C. A leitura foi realizada com base na inibição total do crescimento do fungo, comparado ao seu controle positivo. Como controle negativo foi utilizado o antifúngico diluído e o próprio meio RPMI.

A partir dos valores das CIMs para cada antifúngico, foi possível determinar a CIM<sub>50</sub> e a CIM<sub>90</sub> (concentração inibitória mínima capaz de inibir o crescimento de 50% e 90% dos isolados, respectivamente).

Todos os testes foram realizados em duplicata e repetidos quando ocorria discordância entre os resultados.

### 3.3.3 Análise estatística

O teste Mann-Whitney foi utilizado para comparar os dois grupos de isolados, visando observar se os grupos em estudo apresentavam perfis de suscetibilidade semelhantes ou não, frente aos antifúngicos testados.

A interpretação do teste estatístico foi feita da seguinte forma: quando o valor encontrado era de  $p \geq 0,05$ , a diferença entre os grupos não foi considerada significativa; quando  $p < 0,05$ , a diferença entre eles foi considerada significativa.

## 4 RESULTADOS

Com a finalidade de comparar os perfis de suscetibilidade dos dois grupos de isolados frente aos antifúngicos: anfotericina B, nistatina, cetoconazol, miconazol, clotrimazol, fluconazol, itraconazol e voriconazol, foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas (CIMs). A leitura e interpretação das CIMs foi de acordo com o protocolo M27-A3 e M27-S3, respectivamente (CLSI, 2008).

Em relação aos intervalos de suscetibilidade, as CIMs, em geral, variaram de [0,01-2,0 µg/mL] no grupo dos isolados de animais com otite (G1) e de [0,01-1,0 µg/mL] no grupo de isolados comensais (G2); as CIM<sub>50</sub> foram de [0,01-0,25 µg/mL] para o G1 e de [0,03-0,125 µg/mL] para o G2. As concentrações inibitórias para 90% dos isolados (CIM<sub>90</sub>) variaram de [0,125-1,0 µg/mL] no G1 e de [0,125-0,5 µg/mL] no G2. A tabela 1 dispõe estes resultados.

Neste estudo, podemos observar que as melhores respostas foram frente ao cetoconazol, itraconazol e voriconazol visto que o maior número de isolados sensíveis se encontra nas menores concentrações destes antifúngicos (Tabela 2). O voriconazol se destacou por apresentar as menores variações das CIMs; no G1 a variação foi de [0,01-0,25 µg/mL] e no G2 de [0,01-0,125 µg/mL] (Tabela 1) e todos os isolados foram sensíveis a este antifúngico.

Seguindo o protocolo M27-S3, na avaliação da suscetibilidade frente ao itraconazol, fluconazol e anfotericina B, observamos que 100% dos isolados mostraram-se sensíveis, com CIMs variando de [0,01-1,0 µg/mL], sendo que a faixa de variação das CIMs no G1 foi maior que no G2 (Tabela 1).

Através da análise estatística observou-se que existem diferenças significativas de suscetibilidade entre os grupos G1 e G2. Nos testes frente à anfotericina B, nistatina, fluconazol, miconazol e clotrimazol, o G1 apresentou CIMs significativamente mais elevadas que o G2 ( $p < 0,05$ ). A detecção de CIMs significativamente diferentes entre os dois grupos revelou menor sensibilidade dos isolados oriundos de casos de infecção (G1) frente a estes antimicóticos (Tabela 1).

Tabela 1 - Parâmetros de suscetibilidade dos grupos G1 e G2 de *Malassezia pachydermatis* frente a antifúngicos poliênicos e azólicos.

<b>Antifúngicos</b>	<b>Grupos</b>	<b>Faixa CIM<sup>a</sup></b> <b>(µg/mL)</b>	<b>CIM<sub>50</sub><sup>b</sup></b> <b>(µg/mL)</b>	<b>CIM<sub>90</sub><sup>c</sup></b> <b>(µg/mL)</b>	<b>MG<sup>d</sup></b> <b>(µg/mL)</b>
<b>Cetoconazol</b>	G1	0,01-0,5	0,06	0,5	0,048
	G2	0,01-0,5	0,06	0,25	0,041
<b>Fluconazol</b>	G1*	0,01-1,0	0,25	0,5	0,219
	G2**	0,01-0,5	0,125	0,5	0,068
<b>Itraconazol</b>	G1	0,01-0,5	0,01	0,25	0,032
	G2	0,01-0,25	0,03	0,125	0,032
<b>Voriconazol</b>	G1	0,01-0,25	0,03	0,125	0,042
	G2	0,01-0,125	0,03	0,125	0,029
<b>Clotrimazol</b>	G1*	0,01-1,0	0,25	0,5	0,163
	G2**	0,01-0,5	0,06	0,5	0,069
<b>Miconazol</b>	G1*	0,01-0,5	0,25	0,5	0,124
	G2**	0,01-0,5	0,06	0,5	0,061
<b>Nistatina</b>	G1*	0,01-2,0	0,25	1,0	0,181
	G2**	0,01-1,0	0,06	0,5	0,084
<b>Anfotericina B</b>	G1*	0,01-1,0	0,25	0,5	0,180
	G2**	0,01-0,5	0,125	0,5	0,081

G1: isolados de animais com otite; G2: isolados comensais; <sup>a</sup>Intervalo entre a menor e maior CIMs dos isolados; <sup>b</sup> Concentração mínima do antifúngico capaz de inibir o crescimento de 50% dos isolados; <sup>c</sup> Concentração mínima do antifúngico capaz de inibir o crescimento de 90% dos isolados; <sup>d</sup> Média geométrica das CIMs; (\*) (\*\*) Perfis de suscetibilidade estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Tabela 2 - Distribuição das CIMs para *Malassezia pachydermatis*, de diferentes origens.

	Grupos	Nº (%) de isolados sensíveis nas concentrações de (µg/mL):							
		0,01	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1,0	2,0
<b>CTZ<sup>a</sup></b>	G1	19(47.5)		3(7.5)	8(20)	2(5)	8(20)		
	G2	17(42.5)	2(5)	5(12.5)	10(25)	4(10)	2(5)		
<b>FLZ<sup>b</sup></b>	G1	2(5)	2(5)	3(7.5)	9(22.5)	5(12.5)	15(37.5)	4(10)	
	G2	13(32.5)	2(5)	2(5)	11(27.5)	5(12.5)	7(17.5)		
<b>ITZ<sup>c</sup></b>	G1	22(55)	2(5)	4(10)	5(12.5)	3(7.5)	4(10)		
	G2	17(42.5)	3(7.5)	10(25)	9(22.5)	1(2.5)			
<b>VRZ<sup>d</sup></b>	G1	10(25)	10(25)	9(22.5)	7(17.5)	4(10)			
	G2	16(40)	9(22.5)	6(15)	9(22.5)				
<b>CLZ<sup>e</sup></b>	G1	5(12.5)	4(10)	1(2.5)	7(17.5)	7(17.5)	12(30)	4(10)	
	G2	6(15)	11(27.5)	4(10)	9(22.5)	5(12.5)	5(12.5)		
<b>MCZ<sup>f</sup></b>	G1	6(15)	6(15)	2(5)	4(10)	8(20)	14(35)		
	G2	9(22.5)	10(25)	5(12.5)	5(12.5)	4(10)	7(17.5)		
<b>NYS<sup>g</sup></b>	G1	3(7.5)	6(15)	3(7.5)	5(12.5)	7(17.5)	11(27.5)	1(2.5)	4(10)
	G2	7(17.5)	8(20)	5(12.5)	6(15)	5(12.5)	7(17.5)	2(5)	
<b>AnfoB<sup>h</sup></b>	G1	4(10)	4(10)	1(2.5)	7(17.5)	7(17.5)	13(32.5)	4(10)	
	G2	12(30)	3(7.5)	2(5)	8(20)	3(7.5)	12(30)		

G1: isolados de animais com otite; G2: isolados comensais; <sup>a</sup>cetoconazol; <sup>b</sup>fluconazol; <sup>c</sup>itraconazol; <sup>d</sup>voriconazol; <sup>e</sup>clotrimazol; <sup>f</sup>miconazol; <sup>g</sup>nistatina; <sup>h</sup>anfotericina B.

## 5 DISCUSSÃO

Os fungos leveduriformes do gênero *Malassezia* são microrganismos comensais e fazem parte da microbiota de seres humanos e animais. Algumas condições podem alterar a integridade da pele ou das mucosas e favorecer o crescimento acelerado destas leveduras, instalando-se um processo infeccioso (CHEN & HILL, 2005). Dentre as espécies do gênero *Malassezia*, a *M. pachydermatis* - lipofílica, mas não-lipodependente – é a mais isolada de animais, principalmente cães e gatos, e está envolvida nos quadros de otite externa e dermatite destes animais (CABAÑES et al., 2011; GIRÃO et al., 2004; NARDONI et al., 2004).

As opções terapêuticas para o tratamento da malasseziose incluem, principalmente, o uso de antifúngicos azólicos, clorexidina e sulfeto de selênio (REX et al., 1995). Os casos de falha terapêutica podem acontecer devido ao diagnóstico ou tratamento inadequados. Na avaliação dos fatores responsáveis por este insucesso, deve-se considerar a resistência das espécies frente aos antifúngicos. Os testes de suscetibilidade *in vitro* são importantes neste contexto e buscam reconhecer antecipadamente a resposta do microrganismo a determinado antifúngico padrão e, com isso, detectar uma possível resistência que poderá surgir durante a antifúngicoterapia (DIMOPOULOS et al., 2009).

Apesar da necessidade de se conhecer o perfil de suscetibilidade da espécie *M. pachydermatis*, visto que esta levedura é de grande importância principalmente para a medicina veterinária (BOEKHOUT et al., 2010), ainda não se dispõe de uma técnica padrão para testes de suscetibilidade para esta espécie. Neste contexto, este estudo foi baseado na técnica de microdiluição em caldo proposta pelo protocolo M27-A3 (CLSI, 2008) e os *breakpoints* utilizados foram aqueles descritos para *Candida* spp.

A partir da leitura das CIMs foi possível observar que todos os isolados mostraram-se sensíveis aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e voriconazol. Garau et al. (2003) e Jesus et al. (2011) também encontraram, em seus estudos, 100% dos isolados testados sensíveis à anfotericina B e ao fluconazol (GARAU et

al., 2003; JESUS et al., 2011). Em 2004, Velegraki et al. avaliaram o perfil de suscetibilidade das espécies do gênero *Malassezia* através de duas técnicas, a microdiluição em caldo (M27-A2) e o Etest, e encontraram valores de CIMs para anfotericina B muito próximos aos encontrados para alguns isolados neste estudo (0,05 µg/mL e 0,12 µg/mL) (VELEGRAKI et al., 2004). Em contra partida, Brito et al. (2007) observaram sensibilidade reduzida a este antifúngico, onde 68,75% dos isolados foram sensíveis a este poliênico e, Bernardo et al. (1998) encontraram um isolado de *M. pachydermatis* resistente a anfotericina B, nistatina e miconazol (BERNARDO et al., 1998; BRITO et al., 2007).

O voriconazol se destacou por apresentar as menores variações das CIMs; no G1, a faixa de variação foi de [0,01-0,25 µg/mL], resultado semelhante ao encontrado por Gupta et al. (2000) e Rincón et al. (2006) que observaram CIMs de 0,03 µg/mL a 0,25 µg/mL e CIM igual a 0,25 µg/mL, respectivamente (GUPTA et al., 2000; RINCÓN et al., 2006). No G2, a variação foi de [0,01-0,125 µg/mL], dados que também foram observados por Garau et al. (2003) que descreveram uma variação de 0,03 µg/mL a 0,120 µg/mL para os isolados de *M. pachydermatis* (GARAU et al., 2003).

Os testes com os azólicos cetoconazol, itraconazol e voriconazol revelaram que as melhores respostas foram frente a estes antifúngicos, visto que o maior número de isolados sensíveis se encontra nas menores concentrações destes antimicóticos (Tabela 1). Gupta et al. (2000) também chegaram a esta conclusão em suas pesquisas quando encontraram, para 95% dos 55 isolados testados, CIMs  $\leq$  0,03 µg/mL (GUPTA et al., 2000). No mesmo ano, Hammer et al. (2000) avaliaram o perfil de suscetibilidade de várias espécies de *Malassezia*, a melhor resposta foi frente ao cetoconazol, onde a CIM<sub>50</sub> foi igual a 0,06 µg/mL e CIM<sub>90</sub> igual a 0,25 µg/mL (HAMMER et al., 2000), sendo estes dados semelhantes aos encontrados em nosso estudo.

No Brasil, Eichenberg et al., em 2003, relataram a detecção de 3,7% dos isolados de *M. pachydermatis* como resistentes ao cetoconazol e 2,4% resistentes ao fluconazol (EICHENBERG et al., 2003) e, Nascente et al., em 2009, relataram 23,5% de isolados de *M. pachydermatis* resistentes ao cetoconazol, os dois estudos utilizaram a técnica de microdiluição em caldo (NASCENTE et al., 2009). Todavia, nestes estudos não houve comparação entre os perfis de suscetibilidade dos isolados comensais e patógenos.

Observamos na avaliação da suscetibilidade dos isolados de *M. pachydermatis* frente ao itraconazol, que apesar de todos serem sensíveis, no G1, um percentual de 82,5% apresentaram CIMs  $\leq 0,125 \mu\text{g/mL}$ , sendo considerados sensíveis ao antifúngico e, 17,5% apresentaram CIMs entre  $0,25 \mu\text{g/mL}$  e  $0,5 \mu\text{g/mL}$ , ou seja, podem ser classificados como sensíveis dose-dependente; no G2, o percentual de isolados sensíveis foi mais alto que no G1 (97,5%) e apenas 2,5% dos isolados foram considerados sensíveis dose-dependente. Esta sensibilidade reduzida que alguns isolados de *M. pachydermatis* demonstraram já foi observada em outros estudos; Nakamura et al. (2000) avaliaram a suscetibilidade de sete espécies do gênero *Malassezia* frente ao itraconazol, dentre elas a menos sensível foi a *M. pachydermatis* (NAKAMURA et al., 2000) e Piérard et al., em 2003, através de um bioensaio, estudaram o percentual de inibição do crescimento de espécies do gênero *Malassezia* pelo uso do itraconazol; após duas semanas de tratamento, os autores observaram um percentual de inibição de 19,6% da *M. pachydermatis*, enquanto as outras espécies do gênero tiveram seu crescimento inibido em torno de 40% (PIÉRARD et al., 2003).

Assim como a menor sensibilidade demonstrada por alguns microrganismos a certos antifúngicos, os casos de resistência a antifungoterapia também merecem importância. O surgimento de isolados resistentes provavelmente é consequência de um tratamento inadequado, mas deve-se considerar a hipótese de resistência cruzada. Jesus et al. (2011) induziram isolados de *M. pachydermatis* à resistência ao fluconazol e depois avaliaram a suscetibilidade destes frente ao itraconazol e ao voriconazol. Os resultados detectaram que 80% e 83% dos isolados, sensíveis ao fluconazol, apresentaram-se sensíveis ao itraconazol e o voriconazol, respectivamente; ao analisarem o grupo formado pelos isolados resistentes ao fluconazol, detectaram redução da sensibilidade frente ao itraconazol e voriconazol caracterizando claramente a ocorrência de resistência cruzada (JESUS et al., 2011).

Através da análise estatística foi possível detectar diferenças significativas entre o perfil de suscetibilidade do G1, formado por isolados oriundos de animais doentes, e do G2, formado por isolados provenientes de animais saudáveis, frente aos antifúngicos anfotericina B, nistatina, miconazol, clotrimazol e fluconazol. Um estudo feito por Cafarchia et al. (2011) que avaliou a suscetibilidade de *M. pachydermatis* patógenos e comensais, também evidenciaram diferenças entre as respostas dos dois grupos. Neste estudo os isolados patógenos apresentaram menor

suscetibilidade aos antifúngicos cetoconazol, miconazol, itraconazol, voriconazol e fluconazol, sendo que os resistentes ao fluconazol mostraram-se resistentes também aos outros azólicos, evidenciando a ocorrência de resistência cruzada (CAFARCHIA et al., 2011a). Em 2007, Lyskova et al. já haviam feito este mesmo estudo, porém não observaram diferenças entre o perfil de suscetibilidade dos dois grupos de isolados (LYSKOVA et al., 2007).

As espécies do gênero *Malassezia* possuem uma estrutura semelhante a uma cápsula ao redor de sua parede celular, similar à encontrada no *Cryptococcus* spp. (ASHBEE & BOND, 2010), o que lhe confere proteção. No estado de saprofitismo, esta cápsula se encontra com alto teor de lipídeos, não permitindo a exposição das proteínas antigênicas do fungo. Os fatores desencadeantes da malasseziose favorecem a rápida multiplicação da *M. pachydermatis*, que é acompanhada da redução do conteúdo lipídico capsular e, conseqüentemente, maior exposição de partículas antigênicas.

A reduzida sensibilidade que os isolados do G1 apresentaram frente aos azólicos pode estar ligada a variação da composição lipídica. O principal mecanismo de ação dos azólicos é a inibição da síntese de ergosterol, todavia, a atuação desta classe de antifúngicos é mais complexa, pois atuam também sobre a membrana celular através da interação direta com seus componentes lipídicos (HITCHCOCK et al., 1986). Assim, no processo infeccioso, as células de defesa do organismo liberam substâncias capazes de promover um desequilíbrio na constituição lipídica da membrana fúngica, afetando a permeabilidade desta estrutura (DE KRUYFF et al., 1973) podendo interferir na ação dos azólicos.

A ausência de diferenças de suscetibilidade entre os dois grupos frente ao cetoconazol, itraconazol e voriconazol poderia ser explicada pelos mecanismos de interação entre a molécula do antifúngico e a célula fúngica, onde as alterações na composição lipídica da membrana não afetariam a penetração destes azólicos.

No caso dos poliênicos, a reduzida sensibilidade do G1 pode estar relacionada à atividade de enzimas intracelulares fúngicas (catalase e/ou superóxido dismutase). Nos microrganismos, a catalase desempenha uma importante função na detoxificação de espécies reativas de oxigênio liberadas por células fagocíticas de defesa do hospedeiro (HAMPTON et al., 1998). Considerando que os poliênicos agem diretamente sobre o ergosterol fúngico, ocasionando dano oxidativo direto na membrana celular, a presença da catalase na célula fúngica poderia proteger o



fungo da ação oxidativa dos poliênicos, justificando-se as CIMs mais elevadas nos isolados de casos de malasseziose.

## 6 CONCLUSÃO

Através deste estudo foi possível concluir que os isolados de *M. pachydermatis* provenientes de processos infecciosos (G1) mostraram-se menos sensíveis aos antifúngicos testados quando comparados aos isolados comensais. Esta sensibilidade reduzida do grupo G1 pode estar associada às mudanças que ocorrem na própria levedura durante a infecção; alterações na composição lipídica da cápsula que a envolve, por exemplo, poderia torná-las menos sensíveis aos azólicos e, a presença de enzimas antioxidantes intracelulares estaria ligada a menor suscetibilidade destas leveduras aos poliênicos, levando em consideração o mecanismo de ação destes antifúngicos.

O complexo ambiente infeccioso num sítio naturalmente não estéril como o conduto auditivo de cães e gatos, pode, *per sí*, justificar as variações de suscetibilidade aqui relatadas. É reconhecida a capacidade dos patógenos bacterianos produzirem exoenzimas, toxinas e outros fatores; o efeito dos mesmos sobre os substratos presente no ambiente infeccioso, ou até mesmo diretamente sobre *M. pachydermatis* é desconhecido, mas não pode ser descartado. Ao contrário, tais interações merecem ser melhor exploradas na busca de elucidar fatores que intervêm no complexo fenômeno da suscetibilidade dos fungos aos agentes antimicóticos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AHEARN, D. G.; MCGLOHN, M. S. *In vitro* susceptibilities of sucrose-negative *Candida tropicalis*, *Candida lusitanae* and *Candida norvegensis* to amphotericin B, 5-fluorocytosine, miconazole and ketoconazole. **J Clin Microbiol**, v.19, n.3, p.412-416, 1984.
2. AHEARN, D. G.; SIMMONS, R. B. *Malassezia* Baillon. *In*: Kurtzman, C. P.; Fell, J. W. (eds) **The yeasts, a taxonomic study**. Elsevier, Amsterdam, Holanda, p.782-784, 1998.
3. AKERSTEDT, J.; VOLLSET, I. *Malassezia pachydermatis* whit special reference to canine skin disease. **Br Vet J**, v.152, p.269-281, 1996.
4. ASHBEE, H. R. Update on the genus *Malassezia*. **Med Mycol**, v.45, p.287-303, 2007.
5. ASHBEE, R.; BOND, R. *Malassezia* Species and Immunity: Host-Pathogen Interactions. *In*: BOEKHOUT, T.; GUÉHO-KELLERMANN, E.; MAYSER, P.; VELEGRAKI, A. (eds). **Malassezia and skin – Science and Clinical Practice**. Springer, New York, USA, p.144-146, 2010.
6. ASPÍROZ, C.; MORENO, L. A.; REZUSTA, A. Differentiation of three biotypes of *Malassezia* species on normal human skin. Correspondence with *M. globosa*, *M. sympodialis* and *M. restricta*. **Mycopathol**, v.145, p.69-74, 1999.
7. BAILLON, E. H. **Traité de botanique médicale**. Faculté de Médecine de Paris, p.234, 1889.
8. BAUWENS, L.; DE VROEY, C.; DE MEURICHY, W. A case of exfoliative dermatitis in a captive southern white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*). **J Zoo Wildl Med**, v.27, p.271-274, 1996.
9. BENNETT, J. E. Antimicrobial Agents: Antifungal agents. *In*: GOODMAN & GILMAN (eds.). **The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 11ed., cap.48, Digital Edition Set ISBN: 0-07-146804-146808, 2006.

10. BERNARDO, F. M.; MARTINS, H. M.; MARTINS, M. L. A survey of mycotic otitis external of dogs in Lisbon. **Rev Iberoam Micol**, v.15, p.163-165, 1998.
11. BODEY, G. P. Azole antifungal agents. **Clin Infect Dis**, v.14, suppl.1, p.S161-S169, 1992.
12. BOEKHOUT, T.; GUÉHO, E.; MAYSER, P. **Malassezia and Skin - Science and Clinical Practice**. Springer, New York, USA, 1ed, p.229-247, 2010.
13. BOND, R. et al. Factores associated with elevated cutaneous *Malassezia pachydermatis* population in dogs with pruritic skin disease. **J Small Anim Pract**, v.37, p.103-107, 1996.
14. BOND, R.; LLOYD, D. H. Skin and mucosal populations of *Malassezia pachydermatis* in the healthy and seborrheic Basset Hounds. **Vet Dermatol**, v.8, p.101-106, 1997.
15. BORELLI, D. et al. Ketoconazole, an oral antifungal: laboratory and clinical assessment of imidazole drugs. **Postgrad Med J**, v.55, p.657-661, 1979.
16. BREIEROVA, E. et al. *Malassezia pachydermatis*: properties and storage. **Mycoses**, v.34, p.349-352, 1991.
17. BRITO, E. H. S. et al. Phenotypic characterization and *in vitro* antifungal sensitivity of *Candida* spp. and *Malassezia pachydermatis* strains from dogs. **Vet J**, v.174, p.147-153, 2007.
18. CABAÑES, F.J.; VEGA, S.; CASTELLÁ, G. *Malassezia cuniculli* sp. nov., a novel yeast species isolated from rabbit skin. **Med Mycol**, v.49, p.40-48, 2011.
19. CABAÑES, J. et al. Two new lipid-dependent *Malassezia* species from domestic animals. **FEMS Yeast Res**, v.7, p.1064-1076, 2007.

20. CAFARCHIA, C. et al. *In vitro* antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* from dogs with and without skin lesions. **Vet Microbiol**, doi: 10.1016/j.vetmic.2011.09.008, 2011a.
21. CAFARCHIA, C. et al. Occurrence and population size of *Malassezia* spp. in the external ear canal of dogs and cats both healthy and with otitis. **Mycopathol**, v.160, p.143-149, 2005.
22. CAFARCHIA, C. et al. Physiological and molecular characterization of atypical lipid-dependent *Malassezia* yeasts from a dog with skin lesions: adaptation to a new host?. **Med Micol**, v.49, p.365-374, 2011b.
23. CASTELLANI, A.; CHALMERS, A. J. *Pityrosporum ovale*. In: CASTELLANI, A.; CHALMERS, A. J. (eds). **Manual of Tropical Medicine**. Baillere Tindall and Cox, London, p.1747, 1913.
24. CHANG, H. J. et al. An epidemic of *Malassezia pachydermatis* in an intensive care nursery associated with the colonization of health care workers' pet dogs. **N Engl J Med**, v.338, n.11, p.706-711, 1998.
25. CHEN, T.; 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.
26. CHOI, W. P.; LEE, S. I.; LEE, K. W. A etiological and epidemiological features of canine dermatitis. **Korean J Vet Res**, v.40, p.94-100, 2001.
27. CHRYSSANTHOU, E.; BROBERGER, U.; PETRINI, B. *Malassezia pachydermatis* fungaemia in a neonatal intensive care unit. **Acta Pediatr**, v.90, p.323-327, 2001.
28. CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved Guideline M27-A3, 2008.
29. COUTINHO, S. D.; FEDULLO, J. D.; CORRÊA, S. H. Isolation of *Malassezia* spp. from cerumen of wild felids. **Med Mycol**, v.44, p.383-387, 2006.

30. COUTINHO, S. D.; PAULA, C. R. Proteinase, phospholipase, hyaluronidase and chondroitin-sulphate production by *Malassezia pachydermatis*. **Med Mycol**, v.38, p.73-76, 2000.
31. COWEN, L. E. The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. **Nat Rev Microbiol**, v.6, n.3, p.187-198, 2008.
32. De JAHAM, C. et al. **Antifungal dermatologic agents**: Azoles and allylamines. *Compend. Cont.* 22ed, v.6, p.548-559; 2000.
33. DE KRUYFF, B. et al. The effect of different fatty acid and sterol composition on the erythritol flux through the cell membrane of *Acholeplasma laidlawii*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v.298, p.479-499, 1973.
34. DIMOPOULOS, G.; VELEGRAKI, A.; FALAGAS, M. F. A 10-year survey of antifungal susceptibility of candidemia isolates from intensive care unit patients in Greece. **Antimicrob Agents Ch**, v.53, n.3, p.1242-1244, 2009.
35. DUARTE, E. R. et al. Prevalence of *Malassezia* spp. in the ears of asymptomatic cattle and cattle with otitis in Brazil. **Med Mycol**, v.37, p.159-162, 1999.
36. EICHENBERG, M. L. et al. Susceptibility of *Malassezia pachydermatis* to azole antifungal agents evaluated by a new broth microdilution method. **Acta Sci Vet**, v.31, n.2, p.75-80, 2003.
37. ESPINEL-INGROFF, A. et al. Comparative and collaborative evaluation of standardization of antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. **Antimicrob Agents Chem**, v.39, p.314-319, 1995.
38. FAERGEMANN, J. Atopic dermatitis and fungi. **Clin Microbiol Rev**, v.15, p.545-563, 2002.
39. FAERGEMANN, J. *Pityrosporum* yeasts – what's new? **Mycoses**, v.40, suppl. 1, p.29-32, 1997.

40. FAERGEMANN, J. Treatment of pityriasis versicolor with a single dose of fluconazole. **Acta Derm Venereol**, v.72, p.74-75, 1994.
41. FAERGEMANN, J.; BERNANDER, S. Micro-aerophilic and anaerobic growth of *Pityrosporum* species. **Sab**, v.19, p.117-121, 1981.
42. FAN, Y.M. et al. Granulomatous skin infection caused by *Malassezia pachydermatis* in a dog owner. **Arch Dermatol**, v.142, p.1181-1184, 2006.
43. FRASER, G. *Pityrosporum pachydermatis* Weidman of canine origin. **Trans Br Mycol Soc**, v.44, p.441-448, 1961.
44. GARAU, M.; PEREIRO, M. Jr.; DEL PALACIO, A. *In vitro* susceptibilities of *Malassezia* species to a new triazole, albaconazole (UR-9825), and other antifungal compounds. **Antimicrob Agents Chem**, v.47, p.2342-2344, 2003.
45. GIRÃO, M. D. et al. Viability of *Malassezia pachydermatis* strains maintained in various storage mediums. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.37, n.3, 2004.
46. GIUSIANO, G. E. *Malassezia*, estado del conocimiento y perspectivas em su estudio. **Rev Arg Microbiol**, v.38, p.41-48, 2006.
47. GOMPERTZ, O. F.; CORNEJO, L. Z. Criptococose e outras leveduroses. *In*: ZAITZ, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, A. S.; RUIZ, L. R. B.; SOUZA, V. M. **Compêndio de Micologia Médica**. MEDSI, Rio de Janeiro, Brasil, p.297-308, 1998.
48. GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, 2003.
49. GORDON, M. A. The lipophilic mycoflora of the skin. *In vitro* culture of *Pityrosporum orbiculare*. **Mycol**, v.43, p.524-535, 1951.

50. GROL, A. H. et al. Clinical Pharmacology of Antifungal Compounds. **Inf Dis Clin N Am**, v.17, p.159–191, 2003.
51. GUÉHO, E. Réévaluation du genre *Malassezia* à l'aide de la microscopie électronique et des comparaisons génomiques. **Bull Soc Fr Mycol Méd**, v.27, p.245-254, 1988.
52. GUÉHO, E. et al. The role of *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogen. **Med Mycol**, v. 36, p.220-229, 1998.
53. GUÉHO, E.; MEYER, S.A. A reevaluation of the genus *Malassezia* by means of genome comparison. **Anton Leeuw**, v.55, p.245-251, 1989.
54. GUÉHO, E.; MIDGLEY, G.; GUILLOT, J. The genus *Malassezia* with description of four new species. **Anton Leeuw**, v.69, p.337-355, 1996.
55. GUÉHO, E. et al. Association of *Malassezia pachydermatis* with systemic infections of humans. **J Clin Microbiol**, v.25, n.9, p.1789-1790, 1987.
56. GUILLOT, J.; BOND, R. *Malassezia pachydermatis*: a review. **Med Mycol**, v.37, p.295-306, 1999.
57. GUILLOT, J. et al. Usefulness of modified Dixon's medium for quantitative culture of *Malassezia* species from canine skin. **J Vet Diagn Investig**, v.10, p. 384-386, 1998.
58. GUILLOT, J.; CHERMETTE, R.; GUÉHO, E. Prévalence du genre *Malassezia* chez les mammifères. **J Mycol Med**, v.4, p.72-79, 1994.
59. GUILLOT, J.; DUPONT, B. **Taxonomie et phylogénie des levures du genre *Malassezia***. 1995. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Universidade de Paris XII, Paris, 1995.
60. GUILLOT, J. et al. Identification of *Malassezia* species. A practical approach. **J Mycol Med**, v.6, p.103-110, 1996.



61. GUPTA, A.; KOHLI, Y. Prevalence of *Malassezia* species on various body sites in clinically healthy subjects representing different age groups. **Med Mycol**, v.42, p.35-42, 2004a.
62. GUPTA, A. K. et al. Skin diseases associated with *Malassezia* species. **J Am Acad Dermatol**, v.51, p. 785-798, 2004b.
63. GUPTA, A. K. et al. Epidemiology of the *Malassezia* yeast associated with pityriasis versicolor in Ontario, Canada. **Med Mycol**, v.39, p.199-206, 2001a.
64. GUPTA, A. K. et al. *In vitro* susceptibility of the seven *Malassezia* species to ketoconazole, voriconazole, itraconazole e terbinafina. **Brit J Dermatol**, v.142, p.758-765, 2000.
65. GUPTA, A. K. et al. Quantitative culture of *Malassezia* species from different body sites of individuals with or without dermatoses. **Med Mycol**, v.39, p.243-251, 2001b.
66. HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V.; *In vitro* activities of ketoconazole, econazole, miconazole and melaleuca alternifolia (tea tree) oil against *Malassezia* species. **Antimicrob Agents Chem**, v.44, p.467-469, 2000.
67. HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase and bacterial killing. **Blood**, v.92, p.3007-3017, 1998.
68. HECTOR, R. F. An overview of antifungal drugs and their use for treatment of deep and superficial mycoses in animals. **Clin Tech Small Anim Pract**, v.20, p.240-249, 2005.
69. HIRAI, A. et al. *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. **Int J Syst Evol Microbiol**, v.54, p.623-627, 2004.

70. HITCHCOCK, C.; BARRET-BEE, K.; RUSSEL, N. The lipid composition of azoles-sensitive and azole-resistant strains of *Candida albicans*. **Journal of General Microbiology**, v.132, p.2421-2431, 1986.
71. HUMPHREY, M. J.; JEVONS, S.; TARBIT, M. H. Pharmacokinetic evaluation of UK-49,858, a metabolically stable triazole antifungal drug, in animals and humans. **Antimicrob Agents Chem**, v.28, n.5, p.648-653, 1985.
72. ISKIT, S. et al. Effect of circumcision on genital colonization of *Malassezia* spp. in a pediatric population. **Med Mycol**, v.44, p.113-117, 2006.
73. JESUS, F. P. K. et al. *In vitro* susceptibility of fluconazole-susceptible and -resistant isolates of *Malassezia pachydermatis* against azoles. **Vet Microbiol**, v.152, p.161-164, 2011.
74. JOSEPH-HORNE, T.; HOLLOMON, D.W. Molecular mechanisms of azole resistance in fungi. **FEMS Microbiol Lett**, v.149, p.141-149, 1997.
75. KANEKO, T. et al. Revised culture-based system for identification of *Malassezia* species. **J Clin Microbiol**, v.45, n.11, p.3737-3742, 2007.
76. KAPPE, R. Antifungal activity of the new azole UK-109,496 (voriconazole). **Mycoses**, v.42, n.2, p.83-86, 1999.
77. KAUFFMAN, C. A. et al. Treatment of lymphocutaneous and visceral sporotrichosis with fluconazole. **Clin Infect Dis**, v. 22, p.46-50, 1996.
78. KELLY, S. L. et al. Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol  $\Delta^{5,6}$ -desaturation. **FEBS Lett**, v.400, p.80-82, 1997.
79. KENNIS, R. A. et al. Quantity and distribution of *Malassezia* organisms on the skin of clinically normal dogs. **J Am Vet Med Assoc**, v.208, p.1048-1051, 1996.
80. KOGA, H. et al. *In vitro* antifungal activities of luliconazole, a new topical imidazole. **Med Mycol**, v.47, p.640-647, 2009.

81. LAROCCO, M. et al. Recovery of *Malassezia pachydermatis* from eight infants in a neonatal intensive care nursery: clinical and laboratory features. **Ped Inf Dis J**, v. 7, n.6, p.398-401, 1988.
82. LEEMING, J. P.; SANSOM, J.E.; BURTON, J.L. Susceptibility of *Malassezia furfur* subgroups to terbinafine. **Brist J Dermatol**, v.137, p.764-767, 1997.
83. LEGENDRE, A. M. et al. Treatment of Blastomycosis with itraconazole in 112 dogs. **J Vet Intern Med**, v.10, n.6, p.365-371, 1996.
84. LOBELL, R.; WEINGARTEN, A.; SIMMONS, R. Um novo agente para o tratamento da otite externa canina. **A Hora Vet**, v.88. p.29-33, 1995.
85. LOEFFLER, J.; STEVENS, D. Antifungal drug resistance. **Clin Infect Dis**, Supl.1, p.S31-S41, 2003.
86. LUCKMAN, P. *Pityrosporum canis* in healthy and diseased dogs. **Vet Archiv**, v.52, p.37-44, 1982.
87. LYSKOVA, P.; VYDRZALOVA, M.; MAZUROVA, J. Identification and antimicrobial susceptibility of bacteria and yeasts isolated from healthy dogs and dogs with otitis externa. **J Vet Med**, v.54, p.559-563, 2007.
88. MANAVATHU, E. K. et al. A comparative study of the *in vitro* susceptibilities of clinical and laboratory-selected resistant isolates of *Aspergillus* spp. to amphotericin B, itraconazole, voriconazole and posaconazole (SCH 56592). **J Antimicrob Chem**, v.46, p.229-234, 2000.
89. MATHEWS, K. G. et al. Comparison of topical administration of clotrimazole through surgically placed versus nonsurgically placed catheters for treatment of nasal aspergillosis in dogs: 60 cases (1990-1996). **J Am Vet Med Assoc**, v. 213, n.4, p.501-506, 1998.
90. MATOUSEK, J. L., CAMPBELL, K. L. *Malassezia* dermatitis. **Compendium**, v.24, n.3, p.224-231, 2002.

91. MAULDIN, E. A. et al. *Malassezia* dermatitis in the dog: a retrospective histopathological and immunopathological study of 86 cases (1990-1995). **Vet Dermatol**, v.8, p.191-202, 1997.
92. MAYSER, P. et al. Frequency and spectrum of *Malassezia* yeasts in the area of the prepuce and glans penis. **BJU Intern**, v.88, p.554-558, 2001.
93. MIDGLEY, G. The diversity of *Pityrosporum* (*Malassezia*) yeasts *in vivo* and *in vitro*. **Mycopathol**, v.106, p.143-153, 1989.
94. MIDGLEY, G.; GUÉHO, E.; GUILLOT, J. Diseases caused by *Malassezia* species. In: BALOWS, A.; SUSSMAN, M. (eds). **Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections**, 9ed. Oxford University Press, Oxford, p.201-211, 1998.
95. MITTAG, H. Fine structural investigation of *Malassezia furfur*. II. The envelope of the yeast cells. **Mycoses**, v.38, p.13-21, 1995.
96. MORRIS, D. O. et al. *Malassezia pachydermatis* carriage in dog owners. **Emerg Inf Dis**, v.11, n.1, p.83-88, 2005.
97. NAKAI, T. et al. *In vitro* antifungal activity of Micafungin (FK463) against dimorphic fungi: Comparison of yeast-like and mycelia forms. **Antimicrob Agents Chem**, v.47, n.4, p.1376-1381, 2003.
98. NAKAMURA, Y. et al. Susceptibility testing of *Malassezia* species using the urea broth microdilution method. **Antimicrob Agents Chem**, v.44, n.8, p.2185-2186, 2000.
99. NARDONI, S. et al. Occurrence of *Malassezia* species in healthy and dermatologically diseased dogs. **Mycopathol**, v.157, p.383-388, 2004.
100. NASCENTE, P. S. et al. Comparison of the broth microdilution technique and Etest to Ketoconazole front *Malassezia pachydermatis*. **Braz J Vet Res Anim Sc**, v.46, n.3, p.222-227, 2009.
101. NEGRONI, R. et al. Results of miconazole therapy in twenty-eight patients with paracoccidiomycosis (South American blastomycosis). **Proc Royal Soc Med**, v.70, suppl.1, p.24-28, 1977.

102. PAPPAS, P. G. et al. Treatment of blastomycosis with higher doses of fluconazole. **Clin Infect Dis**, v.25, p.200-205, 1997.
103. PATTERSON, A.P.; FRANK, L.A. How to diagnose and treat *Malassezia dermatitis* in dogs. **Vet Med**, p. 612-623, 2002.
104. PERFECT, J. R. et al. Voriconazole treatment for less-common, emerging or refractory fungal infections. **Clin Infect Dis**, v.36, n.9, p.1122-1131, 2003.
105. PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **J Clin Microbiol**, v.42, n.10, p.4419-4431, 2004.
106. PFALLER, M. A. et al. Antifungal activities of posaconazole, ravuconazole and voriconazole compared to those of itraconazole and amphotericin B against 239 clinical isolates of *Aspergillus* spp. and other filamentous fungi. **Antimicrob Agents Chem**, v.46, n.4, p.1032-1037, 2002.
107. PIÉRARD, G. E.; ARRESE, J. E.; PIÉRARD, F. Itraconazole corneofungimetry bioassay on *Malassezia* species. **Mycoses**, v.47, p.418-421, 2003.
108. PLOTNICK, A. N.; BOSHOVEN, E. W.; ROSYCHUK, R. A. Primary cutaneous coccidioidomycosis and subsequent drug eruption to itraconazole in a dog. **J Am Anim Hosp Assoc**, v.33, n.2, p.139-143, 1997.
109. RAAD, I. I. et al. Posaconazole as salvage treatment for invasive fusariosis in patients with underlying hematologic malignancy and other conditions. **Clin Infect Dis**, v.42, n.10, p.1398-1403, 2006.
110. REX, J. H.; RINALDI, M. G.; PFALLER, M. A. Resistance of *Candida* species to fluconazole. **Antimicrob Agents Chem**, v.39, n.1, p.1-8, 1995.
111. RICHARDSON, M. D.; WARNOCK, D. W. **Fungal infection – Diagnosis and management**. Blackwell, London, England, p.17-43, 1993.

112. RINCÓN, S.; GARCIA, M. C. C.; INGROFF, A. E. A modified christensen's urea and CLSI broth microdilution method for testing susceptibilities of six *Malassezia* species to voriconazole, itraconazole and ketoconazole. **J Clin Microbiol**, v.44, n.9, p.3429-3431, 2006.
113. RIPA, S.; FERRANTE, L.; PRENNA, M. Pharmacokinetics of fluconazole in normal volunteers. **Chem**, v.39, n.1, p.6-12, 1993.
114. ROLAN, P. E. et al. Phenytoin intoxication during treatment with parenteral miconazole. **Brist Med J**, v.287, n.6407, p.1760, 1983.
115. ROSENBLATT, H. M. et al. Successful treatment of chronic mucocutaneous candidiasis with ketoconazole. **J Ped**, v.97, p.657-660, 1980.
116. RUBIN, A. I.; BAGHERI, B.; SCHER, R. K. Six novel antimycotics. **Am J Clin Dermatol**, v.3, n.2, p.71-81, 2002.
117. SALKIN, I. F.; GORDON, M. A. Polymorphism of *Malassezia furfur*. **Can J Microbiol**, v.23, p. 471-475, 1977.
118. SANDE, M. A.; MANDELL, G. L. Drogas antimicrobianas – Drogas antimicóticas e antivirais. *In*: GOODMAN, L.; GILMAN, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Guanabara, Rio de Janeiro, Brasil, cap.54, p.799-807, 1987.
119. SAWYER, P. R. et al. Clotrimazole: a review of its antifungal activity and therapeutic efficacy. **Drugs**, v.9, n.6, p.424-447, 1975.
120. SCHLOTTFELDT, F. S. et al. Reclassificação taxonômica de espécies do gênero *Malassezia*: revisão de literatura sobre as implicações clínico-laboratoriais. **J Bras Patol Med Lab**, v.38, n.3, p.199-204, 2002.
121. SCOTT, D.W. et al. Antifungal therapy. *In*: SCOTT, D. W. (ed.). **Muller & Kirk's Small Animal Dermatology**, 6ed. W.B. Saunders, Philadelphia, USA, p. 409-415, 2001.

122. SHEEHAN, D. J.; HITCHCOCK, C. A.; SIBLEY, C. M. Current and emerging azole antifungal agents. **Clin Microbiol Rev**, v.12, n.1, p.40-79, 1999.
123. SIDRIM, J. J. C.; DIÓGENES, J. N. Micoses superficiais estritas. *In*: SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. (eds). **Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica**. Guanabara, Brasil, cap.11, p.97-106, 1999.
124. SILVA, P. Fármacos antifúngicos. *In*: P. Silva (ed.), **Farmacologia**, 7ed. Guanabara, Rio de Janeiro, Brasil, p.1072-1074, 2006.
125. SIMMONS, R. B.; GUÉHO, E. A new species of *Malassezia*. **Mycol Res**, v.94, p. 1146-1149, 1990.
126. SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 3ed. Guanabara, Rio de Janeiro, Brasil, p.752, 2002.
127. SUGITA, T. et al. Epidemiology of *Malassezia* – related skin diseases. *In*: BOEKHOUT, T.; GUÉHO, E.; MAYSER, P.; VELEGRAKI, A. (eds), ***Malassezia and the Skin: Science and Clinical Practice***. Springer, New York, USA, p. 65-120, 2010.
128. SUGITA, T. et al. New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. **J Clin Microbiol**, v.40, n.4, p.1363-1367, 2002.
129. SUGITA, T. et al. A new yeast, *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. **Microbiol Immunol**, v.48, n.8, p.579-583, 2004.
130. SUGITA, T. et al. Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. **J Clin Microbiol**, v.41, n.10, p.4695-4699, 2003.
131. SUNG, J. P.; GREND AHL, J. G.; LEVINE, H. B. Intravenous and intrathecal miconazole therapy for systemic mycoses. **West J Med**, v.126, n.1, p.5-13, 1977.

132. SUTTON, D.A. et al. *In vitro* amphotericin B resistance in clinical isolates of *Aspergillus terreus*, with a head-to-head comparison to voriconazole. **J Clin Microbiol**, v.37, n.7, p.2343-2345, 1999.
133. VANDEN, B. H. Ergosterol biosynthesis inhibitors. *In*: Prasad, R. (ed.) **Candida albicans**. Springer, Berlin, Alemanha, p.239-257, 1991.
134. VANDEN, B. H. Mode of action of pyridine, pyrimidine and azole antifungals. *In*: BERG, D.; PLEMPER, M. (eds). **Sterol Biosynthesis Inhibitors**. Ellis Horwood Ltd., Chichester, England, p.79-119, 1988.
135. VANDEN, B. H.; ENGELEN, M.; ROCHETTE, R. Antifungal agents of use in animal health- chemical, biochemical and pharmacological aspects. **J Vet Pharmacol Therap**, v.26, p.5-29, 2003.
136. VELEGRAKI, A. et al. Use of fatty acid RPMI 1640 media for testing susceptibilities of eight *Malassezia* species to the new triazole posaconazole and to six established antifungal agents by a modified NCCLS M27-A2 microdilution method and Etest. **J Clin Microbiol**, v.42, n.8, p.3589-3593, 2004.
137. WALSH, T. J.; PAPPAS, P.; WINSTON, D. J. Voriconazole compared with liposomal amphotericin B for empirical antifungal therapy in patients with neutropenia and persistent fever. **N Engl J Med**, v.346, p.225-234, 2002.
138. WARNOCK, D. W. et al. Modified response to ketoconazole of *Candida albicans* from a treatment failure. **Lancet**, v.1, p.642-643, 1983.
139. WHEAT, J. et al. Itraconazole treatment of disseminated histoplasmosis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. **Am J Med**, v.98, p.336-342, 1995.
140. WHEAT, J. et al. Treatment of histoplasmosis with fluconazole in patients with acquired immunodeficiency syndrome. **Am J Med**, v.103, p.223-232, 1997.
141. WILLEMS, L.; VAN DER, G. R.; DE BEULE, K. Itraconazole oral solution and intravenous formulations: a review of pharmacokinetics and pharmacodynamics. **J Clin Pharm Ther**, v.26, p.159-169, 2001.



142. ZAITZ, C. Micoses Propriamente Ditas. *In*: ZAITZ, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, S. A.; RUIZ, L. R. B.; SOUZA, V. M. (eds.). **Compêndio de Micologia Médica**. MEDSI, Rio de Janeiro, Brasil, p.65-79, 1998.
143. ZAITZ, C.; RUIZ, L. R. B.; SOUZA, V. M. Dermatoses associadas às leveduras do gênero *Malassezia*. **An Bras Dermatol**, v.75, n.2, p.129-142, 2000.
144. ZAITZ, C.; SAMPAIO, S. A. P. Avaliação da eficácia e tolerabilidade do itraconazol no tratamento da pitiríase versicolor. **An Bras Dermatol**, v.70, n.3, p.195-198, 1995.