



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PTIRÍASE VERSICOLOR: PREVENÇÃO E TRATAMENTO

Trabalho submetido por
Susana Isabel Martins Carvalho
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

novembro de 2017



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PTIRÍASE VERSICOLOR: PREVENÇÃO E TRATAMENTO

Trabalho submetido por
Susana Isabel Martins Carvalho
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Mestre Teresa Maria Silva do Nascimento

novembro de 2017

*“Aqueles que
passam por nós não vão sós, não nos deixam sós.
Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós”
- Antoine de Saint-Exupéry*

Agradecimentos

A entrega desta monografia representa a conclusão de um ciclo e também a realização de um sonho: ser finalmente farmacêutica!

Desde já, quero agradecer aos meus pais, Eduardo e Anjos, por me apoiarem e ajudarem a realizar este sonho. Sem eles não teria sido, de todo, possível concluir este mestrado. Quero também agradecer ao meu padrinho, Bruno, por ser de facto um segundo pai para mim e acreditar sempre na sua menina. Ao Emanuel, companheiro de todas as aventuras e desaventuras, por me apoiar sempre e achar que sou capaz de tudo, desde que dê o meu melhor.

À minha orientadora, Teresa Nascimento, quero agradecer por todo o conhecimento transmitido no decorrer da licenciatura, mas também pelo apoio, disponibilidade, sugestões e conselhos na realização da tese.

Quero também agradecer às minhas companheiras de sempre, com as quais partilhei a vida académica e muito mais. Aninhas e Rita, são a prova de que a faculdade nos pode trazer amizades incríveis. Obrigada pelo apoio nos altos e baixos da minha vida durante este 5anos.

Não posso também esquecer-me de agradecer os restantes amigos, à Mónica Abreu, à Cláudia Freire e à Rita Palma que são o meu núcleo duro e que sempre me apoiaram.

A todos, muito, muito obrigada!

Resumo

As espécies do género *Malassezia*, comensais no Homem, podem desencadear doença quando o sistema imune do hospedeiro é afetado, causando infeções superficiais e sistémicas.

A Pitiríase Versicolor (PV) trata-se de uma das infeções fúngicas superficiais mais comuns, causada por este género de fungos. Esta patologia é caracterizada por causar manchas na pele que podem ser hipo- ou hiperpigmentadas. Os fatores de virulência estão relacionados com a alta concentração de lípidos da parede celular da célula fúngica, com produção de melanina e também de pigmentos indólicos, prejudiciais à pele do hospedeiro.

O diagnóstico da PV torna-se fácil dadas as suas particularidades clínicas características, embora possa ser confirmado por técnicas convencionais e não convencionais de diagnóstico. A Lâmpada de Wood, o exame direto e cultural são as técnicas convencionais habitualmente usadas na confirmação do diagnóstico da PV. No entanto as técnicas de biologia molecular, como a PCR, ou a recente técnica de cromatografia de massa, *matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry* (MALDI-TOF), são uteis para a identificação de espécies, essencial nas infeções sistémicas.

O tratamento de primeira linha inclui a aplicação tópica de soluções, champôs ou cremes de moléculas antifúngicas, como os antifúngicos imidázólicos e a terbinafina, e outros compostos como o sulfureto de selénio e a piritiona de zinco. Nas infeções sistémicas também são utilizados os imidazólicos, embora por via oral.

As recidivas desta patologia são comuns e constituem o principal desafio da terapêutica da PV. Para a prevenção de recidivas usam-se os antifúngicos aplicados no tratamento por administração oral.

Palavras-chave: *Malassezia*; pitiríase versicolor; infeção fúngica; tratamento prevenção.

Abstract

Species of the genus *Malassezia*, commensal in Humans, can trigger disease when the host's immune system is affected, causing superficial and systemic infections.

Pityriasis Versicolor (PV) is one of the most common superficial fungal infections caused by this genus. This condition is characterized by causing blemishes on the skin that may be hypo- or hyper pigmented. Virulence factors are related to the high concentration of cell wall lipids in the fungal cell, with production of melanin and of indolic pigments, harmful to the skin of the host.

The diagnosis of PV becomes easy given its characteristic clinical features, although it can be confirmed by conventional and unconventional diagnostic techniques. The Wood Lamp, direct examination and cultural examination are the conventional techniques commonly used to confirm the diagnosis of PV. However molecular biology techniques, such as PCR (polimerase chain reaction), or the recent mass-chromatographic technique, *matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry* (MALDI-TOF), are useful for the identification of species that is essential in systemic infections.

First-line treatment includes the topical application of solutions, shampoos or creams of antifungal molecules, such as imidazole antifungals, and other compounds such as selenium sulfide and zinc pyrithione. In systemic infections, imidazole is also used, although orally.

The relapses of this pathology are common and constitute the main challenge of PV therapy. For the prevention of relapses, the antifungal agents applied in the treatment by oral administration are used.

Keywords: *Malassezia*; pityriasis versicolor; fungal infection; treatment; prevention.

Índice

Índice de Figuras	7
Índice de Tabelas.....	9
Lista de Abreviaturas	11
Introdução	13
Biologia do género Malassezia	15
Pitíriase Versicolor.....	21
Manifestações clínicas.....	21
Patogénese	22
Fatores de Virulência.....	22
Fatores predisponentes do Hospedeiro	30
Epidemiologia	31
Diagnóstico.....	33
Exame micológico convencional	33
Exames micológicos não convencionais	36
Tratamento.....	39
Tratamento antifúngico.....	40
Outros compostos	46
Prevenção	47
Conclusão	49
Bibliografia	51

Índice de Figuras

Figura 1- Lesões de PV hipopigmentadas.....	21
Figura 2 - Lesões de PV hiperpigmentadas.....	21
Figura 3- Indóis de <i>Malassezia</i> spp.....	27
Figura 4 – Patógenese da PV.	29
Figura 5 - Cultura com hidróxido de potássio a 10% em meio Parker	33
Figura 6 - Cultura de <i>M. furfur</i> em Dixon agar	34
Figura 7 - Exame histopatológico de PV não inflamatória.....	35
Figura 8 – Pitiríase versicolor no ombro.....	36
Figura 9 – Comparação dos espectros obtidos de 6 espécies.....	38
Figura 10 - Alvos celulares das diferentes classes de AF	39
Figura 11 – Mecanismo de ação dos AF imidazólicos e da classe das alilaminas.....	43

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Classificação taxonómica de <i>Malassezia</i> spp.	15
Tabela 2 – Espécies de <i>Malassezia</i> spp.	18
Tabela 3 – Características dos AF utilizados na terapêutica da PV	45
Tabela 4 – Moléculas usadas na profilaxia da PV	48

Lista de Abreviaturas

AF- antifúngicos

AhR - recetor de hidrocarbonetos arila

EA – efeito adverso

MALDI-TOF - *matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*

PCR – reação de polimerase em cadeia

PV – Pitiríase Versicolor

PVa – Pitiríase Versicolor alba

RNA – Ácido Ribonucleico

rDNA - DNA ribossómico

µg/mL – micrograma por mililitro

Introdução

Conforme afirma Ferreira, Sousa, & Lima, (2010) “Os fungos são seres ubiqüitários que desempenham um papel importante na vida do Homem, quer de uma maneira benéfica , quer de um modo prejudicial.”(p.146) (Ferreira et al., 2010).

Os fungos são organismos vivos classificados taxonomicamente no reino *Mycota* que é composto por mais de 50 000 espécies das quais 300 estão identificadas como patogénicas para o Homem (Freitas & Vaz, 2014). Neste reino, quer os fungos leveduriformes ou os fungos filamentosos têm interesse clínico, diferindo entre si no aspeto morfológico e nas suas dimensões. Estes organismos são eucariotas e não fotossintéticos, dado que não possuem clorofila. Desta forma não podem sintetizar moléculas através do dióxido de carbono sendo heterotróficos, dado que utilizam moléculas orgânicas já existentes, para a obtenção de energia. Estes organismos reproduzem-se por esporos, tanto por reprodução assexuada (esporos sexuais) como por reprodução sexual (esporos assexuais) (Ferreira et al., 2010).

As micoses/infeções fúngicas tratam-se de patologias causadas por fungos, que podem ser divididas em quatro grupos: superficiais, mucocutâneas, subcutâneas e sistémicas, dependendo da invasão e multiplicação no Homem. As micoses superficiais, como é o caso da Pitiríase Versicolor (PV), são bastante comuns e localizam-se eletivamente na pele e/ou mucosas. Apesar de expressão clínica benigna, estas causam acentuada morbidade (Freitas & Vaz, 2014).

A PV é uma micose superficial, como referido anteriormente, causada por um fungo leveduriforme dimórfico, isto é, que vive e cresce habitualmente como fungo unicelular, passado à forma de pseudo-hifa e/ou hifa verdadeira, sempre que expressa a sua virulência. A diferenciação de uma morfologia para a outra faz-se como resposta a alterações nos fatores ambientais, nomeadamente temperatura, nutrientes, concentração de CO₂ e potenciais de oxi-redução (Ferreira et al., 2010; Freitas & Vaz, 2014). A PV trata-se de uma das micoses superficiais mais frequentes e é causada por *Malassezia* spp., um género de fungos comensais da pele humana (Freitas & Vaz, 2014). Apesar dos avanços das duas últimas décadas a nível molecular e genético, os mecanismos de patogenicidade fúngica são ainda pouco compreendidos (Freitas & Vaz, 2014)

A observação das primeiras células leveduriformes de *Malassezia* remonta ao ano de 1835, quando Eichstedt analisou as lesões de pele retiradas de indivíduos com Pitiríase Versicolor. Em 1853 Robin isolou um fungo de uma lesão semelhante às de PV, que denominou *Microsporum Furfur*. Em 1874 as células redondas a ovais em crescimento do organismo foram classificadas como *Malassez* (Gupta, R, & Summerbell, 2002). Atualmente são conhecidas 14 espécies deste género (Jagielski et al., 2014).

O diagnóstico diferencial compreende a Dermatite Seborreica e outras patologias igualmente caracterizadas por desordens de pigmentação, como o Vitiligo, *Tinea corporis* e outras vertentes de Pitiríase (Crespo-Erchiga & Florencio, 2006; Gupta et al., 2002).

O diagnóstico desta patologia inclui os métodos convencionais, como o exame com a Lâmpada de Wood, o exame cultural e o exame microscópico (Gupta et al., 2002) e métodos não convencionais como o PCR e a técnica de *matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry* (MALDI-TOF), recentemente aplicada a estes organismos.(Velegraki, Cafarchia, Gaitanis, Iatta, & Boekhout, 2015). Os métodos não convencionais são particularmente utilizados quando há necessidade de fazer uma identificação da espécie que causadora da patologia.

Na PV o tratamento tópico constitui o tratamento de primeira linha devido à reduzida taxa de efeitos adversos (Freitas & Vaz, 2014; Gupta & Foley, 2015). Como formulações terapêuticas tópicos são utilizados de forma eficaz os derivados dos antifúngicos imidazólicos, o piritiona de zinco e o sulfureto de selénio (Freitas & Vaz, 2014) As formulações orais são utilizadas no caso de o tratamento oral não ser eficaz, das recidivas serem comuns e de as lesões serem extensas (Gueho, Midgley, & Guillot, 1996; Pedrosa, Lisboa, & Rodrigues, 2014). Nestes casos são utilizados de forma eficaz alguns antifúngicos imidazólicos, como o fluconazol, o cetoconazol e o pramiconazol um triazol relativamente recente (Gaitanis, Magiatis, Hantschke, Bassukas, & Velegraki, 2012; Gupta & Foley, 2015).

As recidivas desta patologia são comuns, fundamentalmente por o aparecimento da mesma estar estritamente dependente dos fatores endógenos do indivíduo e por os fatores exógenos serem incontrolláveis. Nos casos referidos, os antifúngicos orais usados no tratamento. têm demonstrado prevenir as recidivas (Gupta et al., 2002).

Biologia do género *Malassezia*

Para uma interpretação precisa acerca da taxonomia deste género importa referir a sucessão de pesquisas científicas feitas nos últimos 20 anos que se basearam numa investigação meticulosa acerca dos diversos domínios da biologia de *Malassezia* spp. . A atual classificação taxonómica baseou-se nas diversas teorias derivadas do papel da *Malassezia* na pele como um fungo comensal e patogénico (Gaitanis et al., 2012). Atualmente *Malassezia* spp. é classificada taxonomicamente como descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação taxonómica da *Malassezia* spp. (Adaptado de Gaitanis, Magiatis, Hantschke, Bassukas, & Velegraki, 2012)

Reino	<i>Fungi</i>
Filo	<i>Basidiomycota</i>
Subfilo	<i>Ustilaginomycotina</i>
Classe	<i>Exobasidiomycetes</i>
Ordem	<i>Malasseziales</i>
Família	<i>Malasseziaceae</i>
Género	<i>Malassezia</i>

O género *Malassezia* é estudado há mais de 150 anos como espécies da flora cutânea humana bem como agentes etiológicos de diversas patologias da pele. No início do séc. XX constatou-se que as células da levedura e os seus filamentos se observavam em indivíduos com PV e que células de levedura sem filamentos se observaram em amostras de couro cabeludo saudável, com dermatite seborreica e com caspa. Porém, a ausência de filamentos nas amostras de dermatite seborreica e nas placas de caspa, levaram à incerteza da colocação de todas as leveduras isoladas no mesmo género taxonómico (Gaitanis et al., 2012).

Sabouraud terá colocado estas leveduras em géneros separados, classificando aquelas que formam filamentos na pele, como na PV, em *Malassezia furfur* (*M. furfur*) e as que não formam filamentos, como na dermatite seborreica e na caspa, como *Pityrosporum malasezii* (*P. malasezzi*). Após aproximadamente uma década *P. malasezii* foi classificado por nomenclatura binomial como *Pityrosporum ovale* (*P. ovale*) por Castellani e Chalmers. Subsequentemente, a dependência de lípidos para crescimento

destas leveduras foi estabelecida e foi confirmado que *Pityrosporum orbiculare* e *P. ovale* seriam variantes da mesma espécie (Gaitanis et al., 2012).

De um ponto de vista histórico, é interessante referir que foram isolados de uma lesão de dermatite exfoliativa de um rinoceronte por Weidman em 1925 e da otite externa de cães por Gustasson em 1955, espécies morfológicamente semelhantes e que foram classificadas, respetivamente, como *Pityrisporum pachydermatis* (*P. pachydermatis*) e *Pityrisporum canis* (*P. canis*). Considerando que estas duas espécies em isolamento não necessitavam de suplementação lipídica para o seu crescimento, agruparam *P. canis* e *P. pachydermatis* numa única espécie. Desta forma, de 1970 a 1984 aceitou-se que o género *Pityrosporum* incluía três espécies: *P. ovale*, *P. orbiculare* e *P. pachydermatis*. Durante estes 14 anos as semelhanças morfológicas entre *Pityrosporum* e *Malassezia* foram estudadas e avaliadas por Eichstedt e Panja. No início dos anos 80, foi aceite pelos taxonomistas que os géneros *Malassezia* e *Pityrosporum* seriam o mesmo, tendo-os agrupado e nomeado de *Malassezia*. Tendo em conta a morfologia, a ultraestrutura e as propriedades imunológicas deste género de fungos, esta classificação foi posteriormente revista (Gaitanis et al., 2012).

Quando foram observadas microscopicamente hifas nas lesões de PV de pele bem como a produção de hifas nas amostras clínicas de *P. orbiculare* foi reforçada a introdução desta espécie no género *Malassezia*. Assim *M. furfur* agrupou espécies dependentes de lípidos, anteriormente classificadas como *P. orbiculare* e *P. ovale*. (Gaitanis et al., 2012).

Através dos trabalhos pioneiros feitos com o conteúdo do DNA nuclear e as técnicas de hibridação foi descoberta uma nova espécie, *Malassezia sympodialis*, o que levou a revisão do género *Malassezia* e à introdução desta nova espécie no género em 1996.

De acordo com Gueho, Midgley, & Guillot (1996) e outros investigadores, as novas técnicas moleculares permitiram conhecer melhor a morfologia, ultraestrutura, fisiologia e biologia molecular deste género de fungos bem como possibilitou o conhecimento de novas espécies do mesmo. Desta forma *Malassezia* spp. englobou sete novas espécies: *M. furfur*, *Malassezia pachydermatis* (*M. pachydermatis*), *Malassezia sympodialis* (*M. sympodialis*), *Malassezia globosa* (*M. globosa*), *Malassezia obtusa* (*M. obtusa*), *Malassezia restricta* (*M. restricta*) e *Malassezia slooffiae* (*M. slooffiae*).

A dependência de lípidos para o crescimento manteve-se uma característica de todas as espécies do género, exceto de *M. pachydermatis*, e os dados da biologia molecular coincidiam com as diferentes propriedades fenotípicas das espécies. Estas propriedades englobavam capacidades específicas por espécie para utilizar lípidos, catalase, reações de β -glucosidase e resistência à temperatura (aos 32°C, 37°C e 40°C) o que permitia a identificação de rotina de amostras de *Malassezia* através destas propriedades fenotípicas. Embora este tipo de identificação tenha sido essencial começou a notar-se a obtenção de resultados ambíguos. Como exemplo temos a diferenciação precisa entre *M. furfur* e *M. sympodialis* que se torna difícil por testes fisiológicos com Tween, dado os resultados obtidos serem extremamente semelhantes.

Incontestavelmente, desde da década de 90, as técnicas moleculares como a sequenciação de RNA ribossómico (rRNA), auxiliaram a identificação não-cultural através de amostras retiradas de pele de indivíduos com patologias associadas à *Malassezia*. Estas inovações e as pesquisas acerca de *Malassezia*, promoveram a identificação baseada em métodos de PCR, o estudo da patologia e da correlação entre espécies e locais geográficos. As novas técnicas de (sistemática molecular) biologia molecular tiveram assim um impacto significativo no reconhecimento de novas espécies de *Malassezia* associadas a patologias humanas e animais. No ano de 2004 foram descritas três novas espécies: *Malassezia dermatis* (*M. dermatis*) e *Malassezia japonica* (*M. japonica*) isoladas de um eczema atópico de um indivíduo japonês; e *Malassezia yamatoensis* (*M. yamatoensis*) isolada de pele humana sã e de um indivíduo com dermatite seborreica. Recentemente foram descritas novas espécies dependentes de lípidos isoladas a partir de pele animal como *Malassezia nana* (*M. nana*), *Malassezia caprae* (*M. caprae*), *Malassezia equina* (*M. equina*) e *Malassezia cuniculi* (*M. cuniculi*) aumentando o número de espécies deste género para 14 (Gaitanis et al., 2012).

Atualmente o género *Malassezia* é composto por as 14 espécies (Jagielski et al., 2014) que se encontram na seguinte tabela (tabela 2).

Tabela 2 - Espécies de *Malassezia* spp.

Espécies de <i>Malassezia</i> spp.
<i>M. furfur</i>
<i>M. sympodialis</i>
<i>M. globosa</i>
<i>M. obtusa</i>
<i>M. restricta</i>
<i>M. slooffiae</i>
<i>M. dermatitis</i>
<i>M. equina</i>
<i>M. japonica</i>
<i>M. nana</i>
<i>M. yamatoensis</i>
<i>M. caprae</i>
<i>M. cuniculi</i>
<i>M. pachydermatis</i>

Todas as espécies de *Malassezia* spp. são lipofílicas exceto *M. pachydermatis*, como referido anteriormente (Jagielski et al., 2014). As espécies lipofílicas requerem lípidos específicos para o seu crescimento. Desta forma a sua distribuição está concentrada nas áreas da pele ricas em lípidos como o couro cabeludo, o rosto e o tronco (Prohic, Jovovic Sadikovic, Krupalija-Fazlic, & Kuskunovic-Vlahovljak, 2016).

M. globosa e *M. restricta* são as espécies mais comumente encontradas na pele humana saudável ou com doença (Prohic et al., 2016). As patologias clássicas associadas a *Malassezia* spp. são a PV e a foliculite por *Malassezia*. Outras doenças como a dermatite seborreica, a caspa e a dermatite atópica estão também relacionadas com este género, embora a PV seja a única patologia dermatológica que mostrou estar conclusivamente associada ao mesmo (Gupta et al., 2002; Pedrosa et al., 2014).

Malassezia spp. está também associado a infeções profundas no Homem, geralmente nosocomiais, como a fungémia e a infeções peritoneais e biliares que não têm sintomas específicos, dificultando o diagnóstico (Denis et al., 2017; Gupta et al., 2002). Alguns grupos como os recém-nascidos ou indivíduos sujeitos a nutrição parentérica por cateter são pacientes de risco para este tipo de infeções. Nestes casos é fundamental

distinguir a espécie em causa, dado que pouco se sabe sobre a virulência e epidemiologia deste género de fungo (Denis et al., 2017).

Por sua vez algumas espécies de *Malassezia* são comensais da pele de animais como *M. nana*, *M. caprae*, *M. equina* e *M. cuniculi* que estão presentes na pele de gatos, cabras, cavalos e coelhos, respetivamente (Denis et al., 2017). De acordo com Velegraki et al. (2015) também *M. pachydermatis* está presente na pele e no canal auditivo de cães e gatos causando frequentemente dermatites e otites em mamíferos.

Pitíriase Versicolor

Manifestações clínicas

A Pitíriase versicolor trata-se de uma patologia fúngica crónica superficial caracterizada por lesões arredondadas a ovais no tronco e na zona dos braços. As lesões variam em cor e podem ser hipo- (brancas), como se pode observar na figura 1, ou hiperpigmentadas (rosa, castanhas ou pretas), tal como na figura 2 (White et al., 2014). A variante de PV caracterizada por lesões despigmentadas denomina-se de Pitíriase Versicolor alba (PVa) (Hort & Mayser, 2011). A cor das manchas varia de acordo com a pigmentação normal do indivíduo, a exposição da área afetada à luz solar e a cronicidade da infeção (Gupta, Kogan, & Batra, 2005).

O tamanho das lesões também é variável, desde alguns centímetros de diâmetro a lesões que cobrem todo o tronco (Gupta et al., 2005). As lesões com maiores dimensões apresentam maior descamação mas apenas nos bordos (White et al., 2014). Alguns pacientes podem sentir um prurido ligeiro mas geralmente a PV é assintomática sendo que a maioria dos doentes se preocupam com o aspeto físico das lesões (Gupta et al., 2002).



Figura 1- Lesões de PV hipopigmentadas.
Retirado de Mycology Online (2016)



Figura 2 - Lesões de PV hiperpigmentadas.
Retirado de Mycology Online (2016)

A PV não é considerada uma doença infecciosa (Gaitanis et al., 2012) porque os microrganismos responsáveis pela mesma são considerados simbiosiontes humanas, isto é, multiplicam-se normalmente na pele humana sem causarem doença. Por isso, a noção de contágio torna-se pouco relevante nesta patologia (Freitas & Vaz, 2014; Gaitanis et al., 2012).

Patogénese

Fatores de Virulência

A fisiopatologia de *Malassezia* spp. está ainda pouco estudada dado que a sua interação com a pele é complexa (Velegraki et al., 2015). A PV ocorre quando a levedura, que normalmente coloniza a pele, altera a sua morfologia de esporo para uma hifa patológica que invade o estrato córneo (White et al., 2014). Esta alteração pode dar-se devido a vários fatores como a humidade e altas temperaturas, diaforese (sudorese excessiva), suscetibilidade de foro familiar e imunossupressão (Gupta & Foley, 2015). Na pele saudável esta levedura utiliza nutrientes essenciais para o seu crescimento sem causar doença. Quando este processo é alterado, devido aos fatores já referidos, o fungo adapta-se e modifica as enzimas produzidas na obtenção de energia, como as lípases e fosfolípases, formando também uma matriz de indóis que atuam através do recetor de hidrocarbonetos arila (AhR) (Velegraki et al., 2015). As espécies de *Malassezia* têm a capacidade de interagir com as células constituintes da pele, como algumas subpopulações de queratinócitos, ou linhagens celulares envolvidas nas funções imunitárias, como as células dendríticas apresentadoras de antígenos, macrófagos, eosinófilos e neutrófilos (Gaitanis et al., 2012). *Malassezia* sintetiza em larga escala ligandos AhR indólicos como a indirubina e indol(3,2-b)carbazol que alteram significativamente a função da maioria das células epidérmicas que expressam o recetor em causa - AhR (Jagielski et al., 2014)(Velegraki et al., 2015). Os indóis bloqueiam a respiração efetuada pelos neutrófilos e a indirubina e indol(3,2-b)carbazol inibem a maturação fenotípica das células dendríticas (Gaitanis et al., 2012).

Desta forma, as interações, ainda que pouco conhecidas, deste género de fungo com a pele saudável e lesionada, passam por: Comensalismo; Alterações nos melanócitos e na barreira epidérmica; Inflamação sem ativação de imunidade mediada por anticorpos (dermatite seborreica e caspa); Indução de imunidade específica (dermatite atópica); Invasão e inflamação do folículo piloso (foliculite por *Malassezia*) (Velegraki et al., 2015).

Por sua vez os fatores de virulência de *Malassezia* estão estritamente relacionados com: metabolismo lipídico; atividade enzimática; espécies reativas de oxigénio e lipoxigenase; crescimento de micélio; e produção de pigmentos (Hort & Mayser, 2011).

Metabolismo lipídico

A necessidade lipídica deste género, exceto de *M. pachydermatis*, deve-se a uma falha na síntese de ácido mirístico que funciona como precursor dos ácidos gordos de cadeia longa. A nível molecular esta deficiência metabólica pode ser explicada por a ausência de um gene que codifica a sintetase de ácidos gordos, já observada nos genomas de *M. globosa* e *M. restrita*, substituídos por diversos genes que codificam as hidrólases que poderiam fornecer estes lípidos. Os ácidos gordos de cadeia longa podem ser sintetizados a partir dos ácidos gordos de cadeia média. A modificação de ácidos gordos saturados em insaturados é possível. A composição lipídica destas leveduras não é constante, o que reflete dependência dos nutrientes lipídicos disponível no seu habitat (Hort & Mayser, 2011).

A parede celular das células fúngicas de *Malassezia* spp. é composta em 15% por lípidos o que representa uma percentagem alta, ao comparar com a composição de 1 a 2% de lípidos nas espécies de *Saccharomyces* spp. . Esta alta concentração de lípidos na parede é a possível razão pela qual a *Malassezia* apresenta uma grande resistência, refletindo-se na sua estabilidade mecânica e na sua resistência à água (osmoressistência). Por sua vez, a alta percentagem lipídica da parede é considerada um importante fator de virulência pois parece proteger as células fúngicas da fagocitose e diminuir a resposta imune inflamatória do hospedeiro. Além disso, a adesão às células do hospedeiro pode ser conseguida pela hidrofobicidade da parede (Hort & Mayser, 2011)

Atividade enzimática

Relativamente à atividade enzimática deste fungo filamentoso, a carência do mesmo para assimilar ácidos gordos através de fontes externas é refletida na presença de múltiplos genes que segregam lípases e fosfolípases (Hort & Mayser, 2011). Estas enzimas são responsáveis pela obtenção de energia destes microrganismos (Velegraki et al., 2015) . A PCR por transcriptase reversa e as análises proteómicas confirmaram a presença destas enzimas no couro cabeludo humano (Hort & Mayser, 2011).

Nas espécies de *Malassezia* observa-se a hidrólise de triglicéridos durante a libertação de glicerol e ácidos gordos livres. Usando diferentes ácidos gordos, Mayser et al. mostraram que esta hidrólise realizada por o fungo depende da fração de álcool dos

ésteres dos ácidos gordos sintéticos, e que o crescimento é mais estimulado quando usados ácidos gordos insaturados (Hort & Mayser, 2011).

Importa referir que na dermatite seborreica e na caspa se verifica uma composição diferente entre os lípidos da exsudação de pele saudável e da pele afetada, uma vez que para além de danificarem a função barreira, as lipases também modificam a composição da exsudação (Velegraki et al., 2015).

Até à data, três das lipases de *Malassezia* foram clonadas e caracterizados nomeadamente as lipases de *M. furfur*, *M. pachydermatis* e *M. globosa* (*M. globosa* *LIP1*). A caracterização das lipases recombinantes revelou diferentes propriedades bioquímicas entre as lipases das referidas espécies. As diferenças observadas entre espécies quanto ao seu metabolismo lipídico foram então usadas para distinção entre espécies (Hort & Mayser, 2011).

Por RT-PCR (PCR em tempo real), vários investigadores sequenciaram os genes expressos do couro cabeludo do Homem, sugerindo a presença de *M. globosa* *LIP1* associando a mesma à patogénese da caspa e da dermatite seborreica (Hort & Mayser, 2011).

A comparação da atividade da lipase e da fosfolipase entre *taxas* mostrou que *M. globosa* tem a mais alta atividade de lipase, que está ligada à sua patogenicidade, e que a maior atividade de fosfolipase foi detetada em *M. pachydermatis* (Hort & Mayser, 2011). Foi detetado que a atividade da lipase de *M. globosa* durante os meses de verão se encontrava significativamente mais elevada, o que se pode dever aos componentes da exsudação como o cloreto de sódio e o ácido láctico, o que facilita conhecimento das relações metabólicas, estruturais e funcionais entre as lipases de *M. globosa* e a pele humana (Velegraki et al., 2015).

Espécies reativas de oxigénio e lipoxigenase

As espécies de *Malassezia* têm a capacidade de produzir espécies reativas de oxigénio (ROS) *in vitro* que podem desempenhar um papel na patogénese da dermatite seborreica e na variante pigmentada da PV. Num estudo foram encontrados elevados níveis de peróxidos lipídicos e seus derivados nas lesões de indivíduos com PV, mas não em pele saudável dos mesmos. O aumento da formação de peróxidos lipídicos foi notado aquando do enriquecimento do meio com ácidos gordos polinsaturados. Desta forma a

despigmentação característica da PV foi explicada pelo efeito tóxico dos peróxidos nos melanócitos (Hort & Mayser, 2011).

Produção de hifas/filamentos/micélio

A morfologia deste fungo em micélio é de difícil obtenção em cultura, embora em alguns isolamentos de *M. furfur* se observe o crescimento de hifas de modo espontâneo. A indução desta estrutura foi conseguida pela adição de glicina ou colesterol e ésteres de colesterol ao meio. A formação de hifas foi também observada aquando do aumento da concentração de dióxido de carbono e no estrato córneo humano *in vitro*. A maioria das hifas foi produzida pelas estirpes *P. ovale* ATCC 44341 e ATCC 44031, ambas classificadas atualmente como *M. sympodialis*. Esta descoberta está de acordo com um estudo em que Saadatzaheh et al. testaram várias estirpes de *Malassezia* e descobriram que apenas as estirpes de *M. sympodialis* produziam hifas estas condições (Hort & Mayser, 2011).

Quando o isolamento da levedura da espécie *M. globosa* é feito a partir de amostras biológicas é possível observar a sua forma filamentosa. O mesmo já não se verifica quando o exame cultural é efetuado a partir de sucessivas repicagens. Considera-se que a morfologia em micélio desempenha um papel na patogénese da PV, dado que as hifas estão abundantemente presentes nas escamas de pele retiradas de lesões. A frequência da presença de hifas nos doentes com PV é de 100% nas lesões, de 42% na pele não-esquelética do tronco e de 50% na cabeça. No entanto estão também presentes em 6-7% das amostras observadas de pele (Hort & Mayser, 2011).

Produção de pigmentos

A produção de pigmentos característica destes fungos está associada à patogenicidade dos mesmos. Até à data foram estudadas duas vias metabólicas da produção de pigmentos no género *Malassezia*: a produção de melanina; e a produção de pigmentos indólicos através do triptofano.

Melanina

A produção de melanina está largamente relacionada com a patogenicidade de alguns fungos uma vez que está associada à resistência aos fármacos antifúngicos e à invasão do sistema imune do hospedeiro. Verificou-se que as estirpes de *Malassezia* produzem pigmento em agar L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), mas que esta produção não se verifica em agar de tirosina, levando à conclusão que a melanogênese (formação de melanina) pode ocorrer através de uma via independente da tirosinase. As estirpes de *M. dermatis* demonstraram a taxa de produção de pigmentos mais alta enquanto *M. furfur* demonstrou as taxas mais baixas desta produção. No entanto *Malassezia* spp. só oxida a L-DOPA após a ruptura das membranas, o que sugere que a fenoloxidase, a enzima que medeia a produção de melanina, não é segregada mas está ligada à parede celular ou à membrana plasmática (Hort & Mayser, 2011).

Pigmentos indólicos derivados de triptofano

Os estudos acerca das necessidades metabólicas de *Malassezia* concluíram que *M. furfur* consegue produzir um pigmento acastanhado que se difunde no agar quando cultivada em meio de agar seletivo, composto por o aminoácido triptofano (Trp) e uma fonte de lípidos. Chegou-se assim à conclusão que produção de pigmento é dependente da presença de Trp. A produção deste pigmento é característica tanto de *M. furfur* como *M. pachydermatis*, embora nesta última se observe em menor rendimento e em espectro limitado. Os pigmentos foram diferenciados por um conjunto de métodos cromatográficos e observou-se que os mesmos tinham uma composição complexa, com substâncias de cores diferentes e variados fluorocromos. Os mecanismos de ação dos mesmos revelaram-se pertinentes uma vez que explicavam alguns dos fenómenos relacionados com a PV. Foram encontradas substâncias que podem ser responsáveis pelas várias tonalidades de hiperpigmentação na patologia como a pitiriarubina, de cor vermelha, e a pitiriacitrina (figura 3 – molécula 4), de cor amarela. Por sua vez a pitirialactona é constituída por um composto fluorescente que poderá eliminar radicais e funcionar como protetor da luz devido à sua estrutura mesomérica. Esta substância demonstrou emitir fluorescência azul num ambiente lipofílico e fluorescência amarela num meio aquoso, o que explica os vários tons de lesões de PV descritos na literatura, dependendo se esta substância estiver dissolvida na sudação ou nos lípidos epidérmicos. Foram encontradas duas substâncias: indol A de *Malassezia* (figura 3 – molécula 4) - um

inibidor da tirosinase (a principal enzima da síntese de melanina); e a malassezina (figura 3 – molécula 1), que mostrou a indução da apoptose dose-dependente dos melanócitos. Estas duas substâncias podem explicar a despigmentação observada na PVa. A malassezina demonstrou também ser um agonista do recetor de hidrocarbonetos de arila e induzir o citocromo P450, em culturas de hepatócitos de ratinhos (Hort & Mayser, 2011). O dano causado nos melanócitos explica a lenta da repigmentação da pele, podendo levar meses a anos para ser impercetível a despigmentação causada (Gupta et al., 2005).

Devido à sua estrutura acíclica, a malassezina não é considerada um agonista AhR potente, como o indol(3,2-b)carbazol (figura 3- molécula 2). A classificação das pitiriarubinas como potentes inibidores da rutura dos granulócitos, explicam a ligeira inflamação observada nas lesões de PV. Por sua vez, a descoberta da capacidade da pitiriacitrina como filtro ultravioleta (UV), pode explicar a ausência de pigmentação, por proteção UV das lesões despigmentadas de PVa. No entanto, as funções das substâncias referidas permanecem questionáveis dado que as mesmas não foram encontradas em lesões de PV mas também por serem isoladas de *M. furfur* e não de *M. globosa*, sendo esta última considerada a espécie desencadeante da PV (Hort & Mayser, 2011).

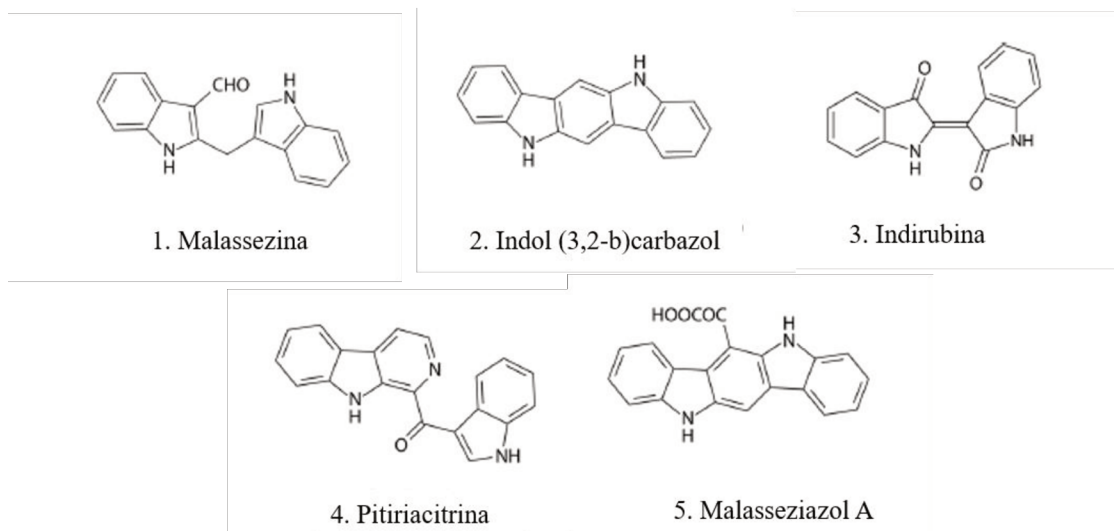


Figura 3- Indóis de *Malassezia* spp. . Retirado de Gaitanis, Magiatis, Hantschke, Bassukas, & Velegraki, (2012)

Recentemente foi estudada a produção de dois ligandos AhR considerados potentes: ICZ e indirubina (figura 3 – molécula 3), através de estirpes de *M. furfur*. Quando comparada a produção de ICZ entre lesões de PV e dermatite seborreica e a pele saudável, conclui-se que a produção deste ligando é substancialmente superior na pele lesionada. Por sua vez também se observou que a produção é superior nas lesões de dermatite

seborreica que nas lesões de PV. A função desta via indólica seria elucidada pelo estudo de produção de ICZ por diversas estirpes de *M. furfur* provenientes de doenças e locais geográficos distintos (Hort & Mayser, 2011). Dado que o AhR está envolvido na carcinogénese, na regulação da imunidade e na suscetibilidade à radiação UV, há a possibilidade do género *Malassezia* estar associado à carcinogénese das células da pele (Velegraki et al., 2015).

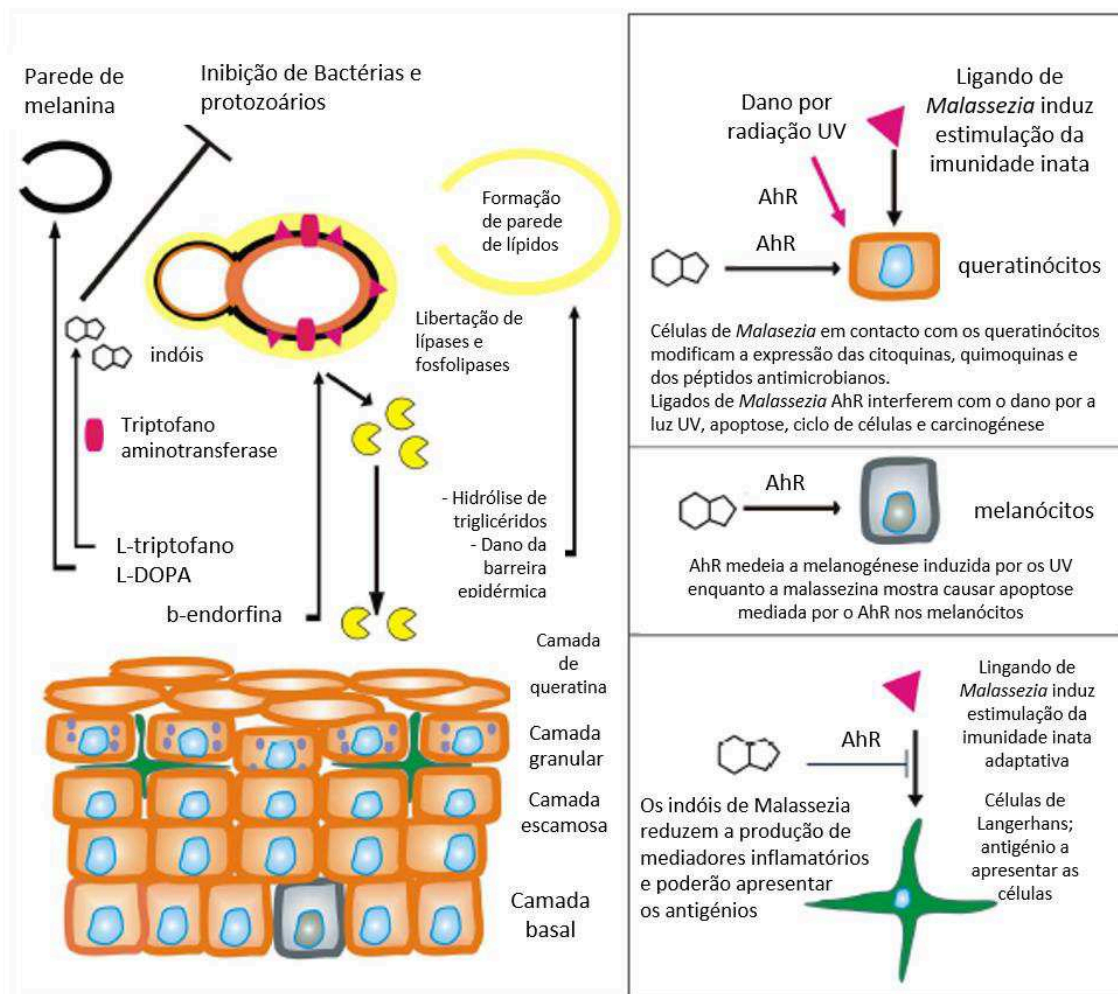


Figura 4 – Patógenese da PV. As espécies de *Malassezia* utilizam os lípidos da sudação para formarem a sua camada externa e os aminoácidos para a formação de melanina e de ligandos AhR indólicos. Por sua vez, também modificam a expressão das fosfolípases e lípases através da β-endorfina. Os componentes das células como as enzimas, as proteínas, os lípidos e os ácidos gordos são identificados pelo sistema imunitário inato e adaptativo, alterando a sua função. Os ligandos AhR reprimem a estimulação auto-imune, modificam as funções das células epidérmicas, alteram a proteção UV das mesmas e está a ser estudado que inibam os microrganismos antagonistas. Retirado e adaptado de Velegraki, Cafarchia, Gaitanis, Iatta, & Boekhout (2015)

Fatores predisponentes do Hospedeiro

O aparecimento desta patologia é significativamente afetado por fatores exógenos e endógenos ao hospedeiro. Aos fatores exógenos ou ambientais podemos associar a temperatura e humidade enquanto que aos fatores endógenos podemos associar a malnutrição, o estado imune do paciente (por utilização de contraceptivos orais, corticosteroides orais ou imunossupressores), diaforese e predisposição genética (Gaitanis et al., 2012; Gupta et al., 2002).

O desenvolvimento de PV está relacionado com a resposta imune alterada do organismo. Nos indivíduos com desordens na resposta imune como os doentes VIH-SIDA (Vírus da Imunodeficiência humana - Síndrome da imunodeficiência adquirida) ou Leishmaniose visceral, a PV pode ser mais prevalente e ocorrer em locais e de formas invulgares (Gupta et al., 2002).

Por sua vez, as infeções sistémicas por *Malassezia* spp. ocorrem maioritariamente em recém-nascidos com peso inferior a 1,5 kg ou prematuros, indivíduos a receber suplementação de lípidos parentericamente e indivíduos imunodeprimidos a receber nutrição parentérica através de um cateter ou hospitalizados por longos períodos de tempo (Velegraki et al., 2015).

Epidemiologia

De acordo com Gaitanis et al. (2012) a PV ocorre em todas as faixas etárias desde bebês de 4 meses a idosos, sendo mais prevalente na terceira e quarta décadas de vida. Alguns autores consideram que a PV é característica desta faixa etária devido á grande atividade das glândulas sebáceas e também à grande concentração de ácidos gordos na exsudação (Borelli, Jacobs, & Nall, 1991; Pedrosa et al., 2014). Esta patologia é raramente reportada em crianças com menos de 2 anos de idade, porém, quando ocorre, observa-se em recém-nascidos que estiveram hospitalizados numa unidade de cuidados intensivos após o nascimento. Os investigadores sugerem que o ambiente húmido e quente das incubadoras possa ser um fator predisponente da patologia (Gupta et al., 2002). Como referido anteriormente também nos doentes VIH-SIDA (Vírus da Imunodeficiência humana- Síndrome da imunodeficiência adquirida) ou na Leishmaniose visceral, a PV pode ser mais prevalente (Gupta et al., 2002).

Relativamente à distribuição geográfica desta patologia, sabe-se que ocorre em todo o mundo embora seja mais frequente nos climas húmidos e quentes (Borelli et al., 1991). As espécies de *Malassezia* mais associadas à PV são *M. globosa* e *M. sympodialis* (White et al., 2014). *M. globosa* foi a espécie mais frequentemente isolada das lesões de PV em estudos de variadas regiões geográficas que incluem a Grécia, Espanha e o Irão (Pedrosa et al., 2014). No entanto outras espécies como *M. furfur* e *M. sloffiae* são também isoladas de lesões, embora menos frequentemente. O facto de *M. furfur* se desenvolver melhor a temperaturas mais elevadas, explica a maior frequência de isolamentos em climas quentes em comparação com o número de isolamentos de *M. globosa* (White et al., 2014). Não foram encontrados no âmbito desta monografia dados epidemiológicos referentes à PV na população portuguesa, como era desejável. No entanto, de acordo com Sabino et al. (2017) sabe-se que as infeções da pele e das unhas são as mais prevalentes em Portugal.

Quanto à prevalência da PV de acordo com o sexo, as conclusões são controversas dado que alguns estudos concluem que a patologia é mais comum no sexo feminino e outros estudos concluem o contrário. No entanto, o peso da evidência sugere-nos que o género não tem influência na propensão para desencadear PV (Gupta et al., 2002).

Os fatores hereditários contribuem claramente para o seu aparecimento. Em alguns estudos, foram encontradas histórias familiares positivas de PV em aproximadamente 20% dos pacientes (Gaitanis et al., 2012).

Diagnóstico

Habitualmente o diagnóstico da PV é de fácil reconhecimento dado que se apoia nos factos clínicos característicos ou, muito raramente, através da pesquisa do agente nas escamas de pele. Porém a variada aparência das lesões pode confundir os clínicos inexperientes (Gupta et al., 2002).

O diagnóstico diferencial compreende outras patologias como a Dermatite Seborreica e patologias caracterizadas por desordens de pigmentação, como o Vitiligo, *Tinea corporis*, ou outras Pitiríases (alba, rotunda ou rósea) (Crespo-Erchiga & Florencio, 2006; Gupta et al., 2002).

Exame micológico convencional

Exame direto

O exame direto pode ser usado para a confirmação do diagnóstico. A amostra deve ser recolhida das extremidades das lesões dado que nestes locais se concentra um maior número de microrganismos (Gupta et al., 2002). De acordo com Gupta et al., (2002) uma fita-cola ou mesmo a borda de um bisturi podem ser utilizadas para a colheita de uma pequena quantidade de pele da lesão. Antes de realizar a observação microscópica, deve adicionar-se hidróxido de potássio a 10-15% à amostra, que ajudará a dissolver a queratina e os detritos, facilitando o exame dos elementos fúngicos. O aquecimento suave da lamela acelera a dissolução da queratina. No entanto, se deixada à temperatura ambiente, a amostra estará pronta para observação ao microscópio em 15-20 min.

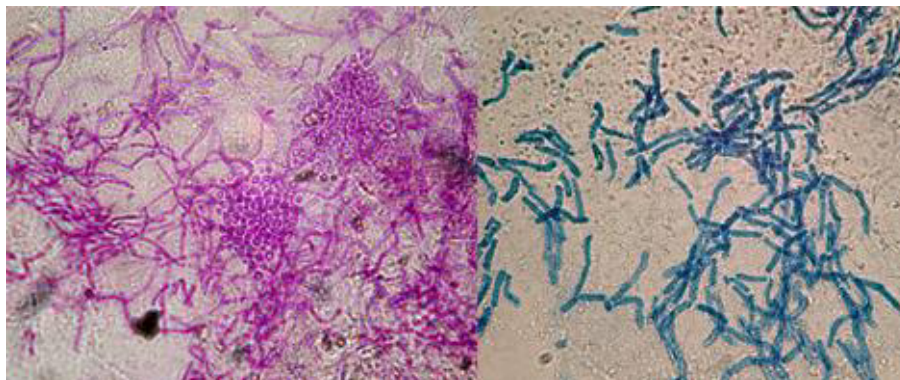


Figura 5 - Cultura com hidróxido de potássio a 10% em meio Parker onde se observam células fúngicas esféricas e pseudo-hifas típicas do fungo. Retirado de: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/mycoses/superficial/>

A observação microscópica revela que a levedura tem uma aparência característica de “*spaghetti and meatballs*”, dado que se visualizam tanto hifas como esporos (figura 6) (Gupta et al., 2002)

Exame Cultural

O exame cultural é raramente utilizado no diagnóstico de rotina da PV embora seja indispensável para o reconhecimento das espécies envolvidas na patologia. *Malassezia* spp. é fastidiosa nos seus requisitos de cultura.

Para o crescimento ótimo de *M. furfur* a temperatura deve estar entre 35° C e 37°C. Os meios de cultura como Sabouraud dextrose agar, Chocolate agar, tripticase soja agar com sangue de ovelha a 5% necessitam da adição de suplementos como azeite comercial para permitir o crescimento deste organismo (Kauffman, Pappas, Sobel, & Dismukes, 2011). Os meios usados são o Leeming and Notman e o meio Dixon modificado. As colónias desenvolver-se-ão após 3-4 dias (Crespo-Erchiga & Florencio, 2006). As colónias são secas e apresentam cor branca a creme. Quando crescem em meio adequado, produzem grupos ovais a redondos, com células leveduriformes de paredes grossas, com cicatrizes unipolares que formam se repetidamente a partir do mesmo polo de células progenitoras, dando o aspeto de *collarete*. As células medem aproximadamente 6 µm na sua maior dimensão (figura 7) (Kauffman et al., 2011).



Figura 6 - Cultura de *M. furfur* em Dixon agar. Retirado de: <https://mycology.adelaide.edu.au/>

Exame histopatológico

O exame histopatológico das lesões de PV revela uma hiperqueratose leve a moderada e acantose, embora raramente. De acordo com a extensão da inflamação clinicamente manifestada, a derme contém um infiltrado de células inflamatórias perivasculares superficiais como linfócitos, osteócitos e ocasionalmente células do plasma. Por vezes é observada uma leve perda de melanina. No estrato córneo encontram-se numerosas células fúngicas e pseudo-hifas (Gueho et al., 1996).

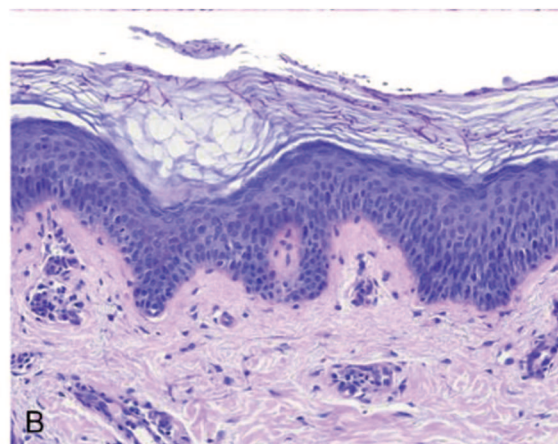
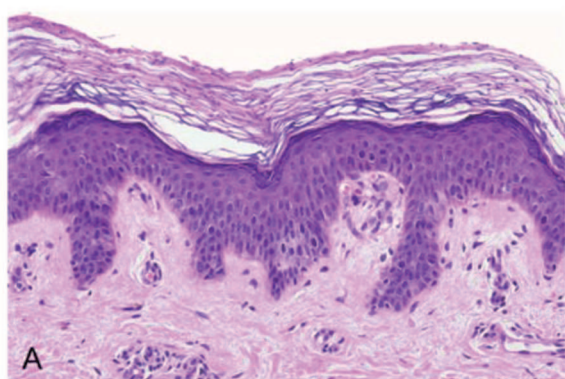


Figura 7 - Exame histopatológico de PV não inflamatória. Observa-se a infiltração de células fúngicas de *Malassezia* no estrato córneo hiperqueratósico bem como a presença de hifas; Retirado de (Gaitanis et al., 2012)

Lâmpada de Wood

O exame realizado com a Lâmpada de Wood, que consiste numa luz ultravioleta filtrada com um pico de comprimento de onda de 365 nm, pode auxiliar no diagnóstico de PV. Uma vez iluminadas por esta luz, as das lesões da PV apresentam-se de cor amarela ou dourada. Na maioria das vezes, a fluorescência inclui as áreas circundantes das lesões, o que indica que a infecção se está a difundir (Gupta et al., 2002). A Lâmpada de Wood pode ser útil para o diagnóstico diferencial dado que a fluorescência imitada é característica para a forma de micélio de *Malassezia* spp. . No entanto, em apenas um terço dos casos este método de diagnóstico fornece uma resposta positiva. Este terço está provavelmente relacionado com os casos que envolvem *M. furfur* (Gupta et al., 2002).

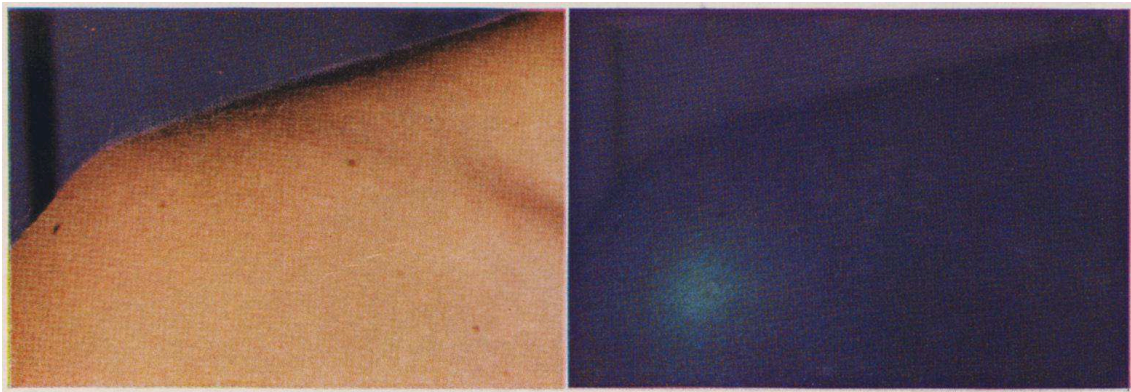


Figura 8 – Pitiríase versicolor no ombro. Na imagem do lado esquerdo é quase impossível reconhecer a extensão da lesão. À direita, podem identificar-se na mesma área várias lesões, através da Lâmpada de Wood. Retirado de Caplan (1967).

Exames micológicos não convencionais

Metodologias moleculares

Os métodos de diagnóstico molecular são os eleitos na identificação e tipagem de *Malassezia* spp. . Estes métodos são baseados na reação de PCR e podem ter como alvo de amplificação e sequenciação as zonas de transcrição interna do rDNA(DNA ribossômico) fúngico, nomeadamente o espaço de transcrição interna 2 (ITS2), as regiões fragmento restritivo de longo comprimento (RFLP), a análise de transcrição interna do spacer 2 (ITS2), do ITS 1+2 (incluindo o gene 5.8S do rRNA), a extremidade 5' da grande unidade (LSU ou 26S) do rDNA e do gene β -tubulina e também análise de polimorfismo do fragmento terminal longo (Velegraki et al., 2015).

Recentemente, a técnica de *matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS) foi utilizada para a identificação de todas as espécies de *Malassezia* conhecidas até ao momento e mostrou concordância com as análises baseadas no rDNA (Veleglaki et al., 2015; White et al., 2014).

Cromatografia de Massa (MALDI-TOF MS)

A tecnologia *matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS) trata-se de uma técnica que faz a análise de espectrometria de massa gerando um perfil, podendo identificar especificamente a espécie em causa. Esta metodologia permite a dessorção e ionização das proteínas, sendo realizada posteriormente a espectrometria de massa das mesmas. O espectro gerado é depois comparado com uma base de dados que contem espectros de caracterização fúngica previamente analisados e inseridos (REF)

Denis et al. (2017) colaboraram num estudo cujo objetivo seria criar uma base de dados para a identificação das espécies de *Malassezia* spp., através da tecnologia de MALDI-TOF MS. A base de dados obtida é constituída por as massas moleculares de algumas espécies de *Malassezia* clinicamente relevantes nomeadamente *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. sloffiae*, *M. globosa*, *M. restricta* e *M. pachydermatis* (figura 10). Neste estudo obteram-se culturas de *Malassezia* de doentes de três hospitais universitários franceses. Parte dos isolamentos serviram para a elaboração da base dados enquanto os restantes foram utilizados para testar a mesma. Para este teste, as estirpes isoladas dos pacientes foram comparadas com uma base de dados já criada, a Bruker Daltonics database MBT-5627. Através do primeiro grupo de amostras foram então obtidos perfis de espectro cuja média criou um perfil de espectro principal para cada espécie (figura 9). Esta análise foi obtida por uma espectrofotómetro de massa Microflex instalado com o software Biotyper. Os espectros foram obtidos numa amplitude de massa entre os 2 a 20 kDa (figura 6). Após a análise, o software Biotyper, gera um valor de pontuação entre 0 e 3. No caso de o valor ser superior ou igual a 1,7 indica que não foi feita identificação. Se o valor se encontrar entre 1,7 e 2,0, significa que foi feita uma identificação do género. Por sua vez, se o valor for igual ou superior a dois foi identificada a espécie em causa. As amostras submetidas foram totalmente identificadas por espécie o que certifica esta base de dados para a utilização em laboratórios clínicos para a identificação de espécies de

Malassezia. Concluiu-se que a implementação da mesma contribuirá para uma eficaz identificação das espécies de *Malassezia* spp. bem como ajudará na obtenção de um melhor conhecimento da sua epidemiologia (Denis et al., 2017).

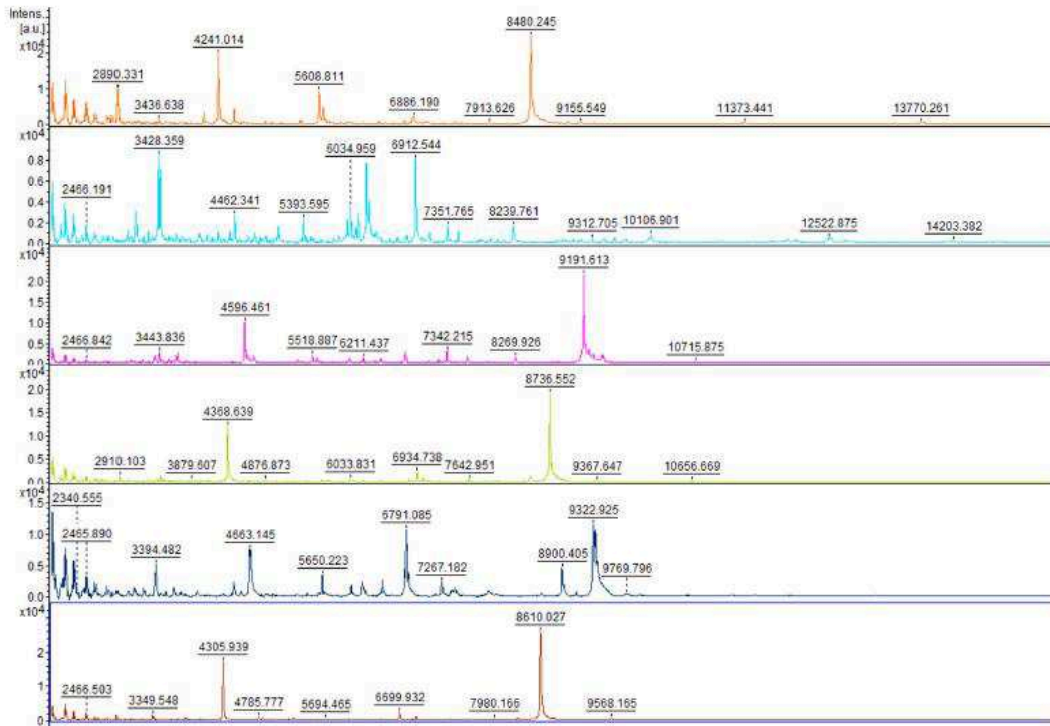


Figura 9 – Comparação dos espectros obtidos de 6 espécies *M. slooffiae* (laranja), *M. furfur* (azul), *M. globosa* (lilás), *M. pachydermatis* (verde), *M. restricta* (azul escuro) e *M. sympodialis* (vermelho). Retirado de Denis et al. (2017)

Tratamento

No tratamento de infecções fúngicas superficiais são utilizadas essencialmente moléculas antifúngicas da classe dos imidazólicos e das alilaminas. Os AF podem ser aplicados por via tópica ou administrados por via oral. Existem diversos AF tópicos em variadas formas de apresentação. A escolha da forma farmacêutica deve ter em conta a zona do corpo afetada, devendo utilizar-se formulações líquidas nas áreas pilosas, formulações em creme em zonas de pele fina ou de pregas, pomadas nas áreas hiperqueratósicas e pós em pregas e nos pés, com o fim de terem uma ação profilática. O efeito adverso (EA) mais observado na utilização de AF tópicos é a dermatite de contacto irritativa (Freitas & Vaz, 2014).

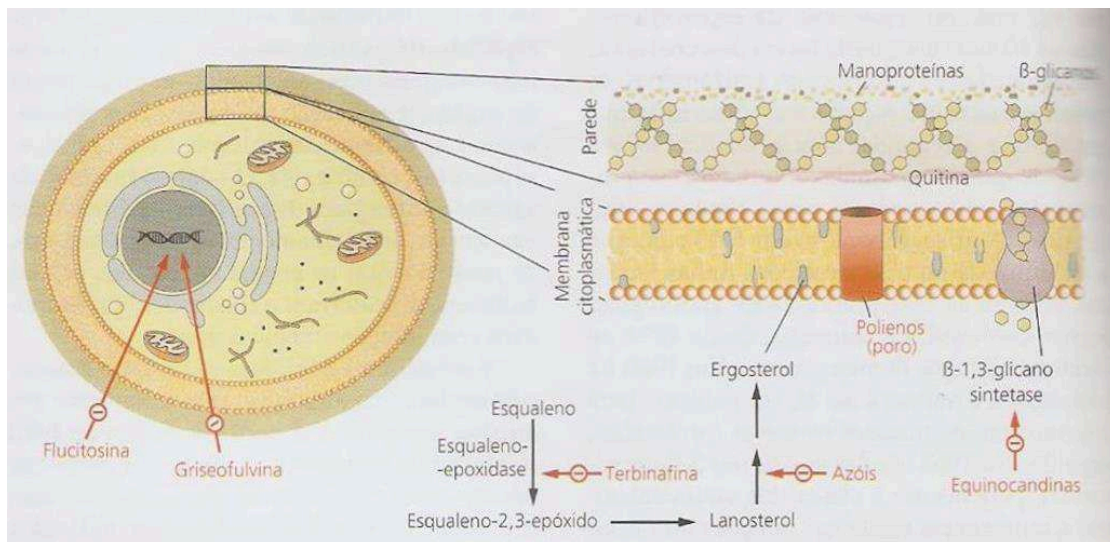


Figura 10 - Alvos celulares das diferentes classes de AF. Retirado de: Freitas & Vaz (2014)

Malassezia spp. é suscetível a um vasto conjunto de terapêuticas antifúngicas tópicos bem como a vários antifúngicos orais (Prohic et al., 2016). Na terapêutica da PV, o objetivo do tratamento não passa pela erradicação da *Malassezia* da pele mas sim pela regressão da levedura à estrutura em que se encontra quando é comensal da pele humana, isto é, a forma de esporo (Gaitanis et al., 2012). Na PV o tratamento tópico, em forma de solutos ou champôs, constitui o tratamento de primeira linha devido à reduzida taxa de efeitos adversos (Freitas & Vaz, 2014; Gupta & Foley, 2015). No tratamento por esta via são utilizados antifúngicos não-específicos bem como AF específicos (Gupta & Foley, 2015). Os AF tópicos específicos compreendem os derivados dos imidazólicos, que têm atividade fungistática direta e mostraram ser eficazes no tratamento da PV (Gupta &

Foley, 2015). Os pacientes devem ser avisados que a alteração de pigmentação pode persistir após o tratamento (Gupta & Foley, 2015). Os antifúngicos não específicos para o tratamento da PV não têm atividade propriamente contra o fungo. Estes atuam pela remoção física e/ou química do tecido inerte infetado no estrato córneo ou também pela alteração do *turnover* celular (Gupta et al., 2002). Os tratamentos não-específicos que têm mostrado eficácia no tratamento da PV incluem o Sulfureto de Selênio, Piritiona de Zinco e o Propilenoglicol, sendo os dois primeiros os mais usados (Gupta & Foley, 2015). Os AF tópicos específicos estudados mais recentemente para o tratamento da PV são o cetoconazol e a terbinafina (Gupta & Foley, 2015).

Nos casos severos ou persistentes de PV são usados antifúngicos imidazólicos orais como o itraconazol, o cetoconazol ou, mais recentemente, o pramiconazol. Esta via de administração tem como vantagem aumentar a *compliance* do utente (Gupta et al., 2005). Porém este tipo de tratamento está também associado a graves efeitos adversos (Gupta & Foley, 2015). Os AF orais apresentam a mesma eficácia que o AF tópicos no caso das dermatofitoses não complicadas. Porém devem ser considerados em variadas situações: infecções extensas ou disseminadas; risco de ineficácia da terapêutica tópica; infecção recorrente ou crônica; presença de lesões hiperqueratósicas e indivíduos com comorbidades (diabetes *mellitus*, imunodepressão, doença vascular periférica, entre outras). Estes AF estão totalmente contra-indicados na gravidez (Freitas & Vaz, 2014). Serão então abordados os estudos mais recentes, acerca da terapêutica oral da PV como o cetoconazol, o itraconazol, o fluconazol e o pramiconazol (Gaitanis et al., 2012).

Tratamento antifúngico

Azóis

Os antifúngicos da classe dos azóis compreendem os imidazóis (cetoconazol, miconazol, entre outros) e os triazóis (fluconazol, itraconazol, posaconazol) que diferem na sua estrutura química. Os imidazóis são compostos com um anel azol com dois nitrogénios e os triazóis têm, por sua vez, um anel azol com três nitrogénios. Os triazóis têm uma afinidade superior aos imidazóis para a membrana fúngica sendo dessa forma melhor tolerados. Estes AF possuem propriedades maioritariamente fungistáticas, atuando pela inibição de algumas enzimas do citocromo P450 das mitocôndrias das células fúngicas. Esta inibição observa-se principalmente a nível da 14 α -desmetilase, que

converte o lanosterol em ergosterol, como se pode observar na figura 12. Esta inibição bloqueia a síntese da membrana citoplasmática fúngica (Freitas & Vaz, 2014).

Antifúngicos Imidazólicos

Cetoconazol

O cetoconazol trata-se de um AF imidazólico de 1º linha no tratamento tanto de micoses superficiais (Gupta et al., 2005). Várias formulações mostraram ser eficazes no tratamento da PV como o creme, champô e espuma sendo o regime de tratamento mais comum a aplicação diária única de creme ou espuma durante 14 dias. Este regime parece ter eficácia em manter a recuperação completa em 3 a 12 meses após o tratamento. A vantagem da utilização da espuma de cetoconazol 1% inclui um tempo de evaporação menor e uma maior penetração transcutânea durante um maior período de tempo na epiderme comparado com os creme e a loção (Gupta & Foley, 2015). O tratamento tópico com champô de cetoconazol a 2% durante 1 a 3 dias demonstrou ser altamente efetivo a aliviar os sintomas de PV. Por sua vez o creme de cetoconazol a 2% é eficaz quando aplicado diariamente durante 2 semanas (Gupta et al., 2005).

De acordo com Gupta & Foley (2015), realizou-se recentemente um estudo clínico aleatório duplamente cego para investigar a utilização do adapaleno em gel. Neste estudo comparou-se a utilização da combinação de cetoconazol em creme e adapaleno em gel a 0.1% com a utilização de creme de cetoconazol isoladamente. O adapaleno trata-se de um derivado do ácido naftóico utilizado no tratamento da acne como inibidor da diferenciação celular. Neste estudo foram utilizados dois grupos de pacientes. Um dos grupos aplicou a combinação de creme de cetoconazol a 2% e gel de adapaleno a 0,1% com uma aplicação única diária, durante 14 dias. O segundo grupo aplicou creme de cetoconazol a 2% duas vezes ao dia no mesmo período de tempo. Verificou-se que a tratamento combinado deu uma melhoria clínica e eliminação do fungo mais rápida (exame micológico negativo dentro de 2 semanas) que o tratamento em monoterapia. Foram observados efeitos adversos moderados nos grupos de tratamento como eritema, pele seca e sensação de queimadura no grupo que utilizou o tratamento combinado e irritação moderada no grupo da monoterapia (Gupta & Foley, 2015).

Antifúngico triazólicos

Itraconazol

O itraconazol é usado na terapêutica oral da PV. Para o tratamento eficaz são necessários o mínimo de 1000 mg de itraconazol de modo a ser gerada uma resposta micológica significativa. O tratamento com 200 mg de itraconazol durante 5 dias tem mostrado alta eficácia e é recomendado no tratamento desta patologia. O tratamento com duração de 7 dias é o regime *standard* para o itraconazol. (Gupta & Foley, 2015)

Fluconazol

Este princípio ativo demonstrou ser eficaz topicamente quando aplicado em forma de champô a 2% durante 5 dias consecutivos (Gupta et al., 2005). No entanto, de acordo com o Infarmed, não estão autorizadas formulações tópicas deste AF em Portugal

Alguns estudos demonstraram que este princípio ativo é equivalente ou mesmo mais eficaz que o cetoconazol no tratamento oral da PV. Um estudo aleatório demonstrou a eficácia de dois regimes terapêuticos: 150 mg ou 300 mg por semana durante 4 semanas, ou 300 mg duas vezes por semana durante 4 semanas. Este estudo concluiu que 4 semanas após o último tratamento, o sucesso terapêutico (?) dos regimes de 300 mg de fluconazol foi significativamente superior aos regimes de 150 mg de fluconazol. O regime de 300 mg de fluconazol duas vezes por semana é o recomendado no tratamento da PV, uma vez que demonstrou ser mais eficaz que o regime de uma dose única de 450 mg (Gupta & Foley, 2015).

Pramiconazol

O pramiconazol tem mostrado ser eficaz contra espécies de *Malassezia* (Gupta & Foley, 2015). Em concentrações inferiores a 1 µg/mL, o pramiconazol é 10 vezes mais eficaz que o cetoconazol contra as espécies de *Malassezia*. Num estudo de fase II que incluía 19 indivíduos com PV foi avaliada a segurança e eficácia do regime de 200 mg de pramiconazol por dia, durante 3 dias e os indivíduos foram monitorizados durante 30 dias. Durante o estudo foram observados diversos efeitos adversos como eritema, prurido e descamação embora significativamente menores que no grupo de controlo. Após 10 dias de tratamento 8 pacientes apresentavam uma cultura em hidróxido de potássio negativa. Um mês após o início do tratamento todos os pacientes apresentavam culturas em hidróxido

de potássio negativas. Neste estudo não foram observados EA graves embora 9 pacientes tenham relatado EA, sendo o mais comum cefaleias (Gupta & Foley, 2015).

Num outro estudo foram avaliados 5 regimes de tratamento com pramiconazol comparados com placebo. Estes 5 regimes incluíam tratamentos com 100, 200 ou 400 mg de pramiconazol numa dose única ou 200 mg diários durante 2 ou 3 dias. Os pacientes foram avaliados ao 14º e 28º dias de estudo a nível cultural (hidróxido de sódio negativa) e quanto a EA observados. O sucesso terapêutico (sem EA e exame micológico em hidróxido de potássio negativo) foi significativamente superior no regime de 200 mg em dose única, seguido dos regimes de 400 mg diários, 200 mg por 2 dias e 200 mg por 3 dias. Os EA mais reportados foram diarreia e náuseas, embora sentidos numa minoria dos pacientes. Desta forma, o pramiconazol trata-se de um tratamento promissor da PV. A sua eficácia clínica como AF oral está a ser estudada, relativamente aos AF orais já utilizados (Gupta & Foley, 2015)

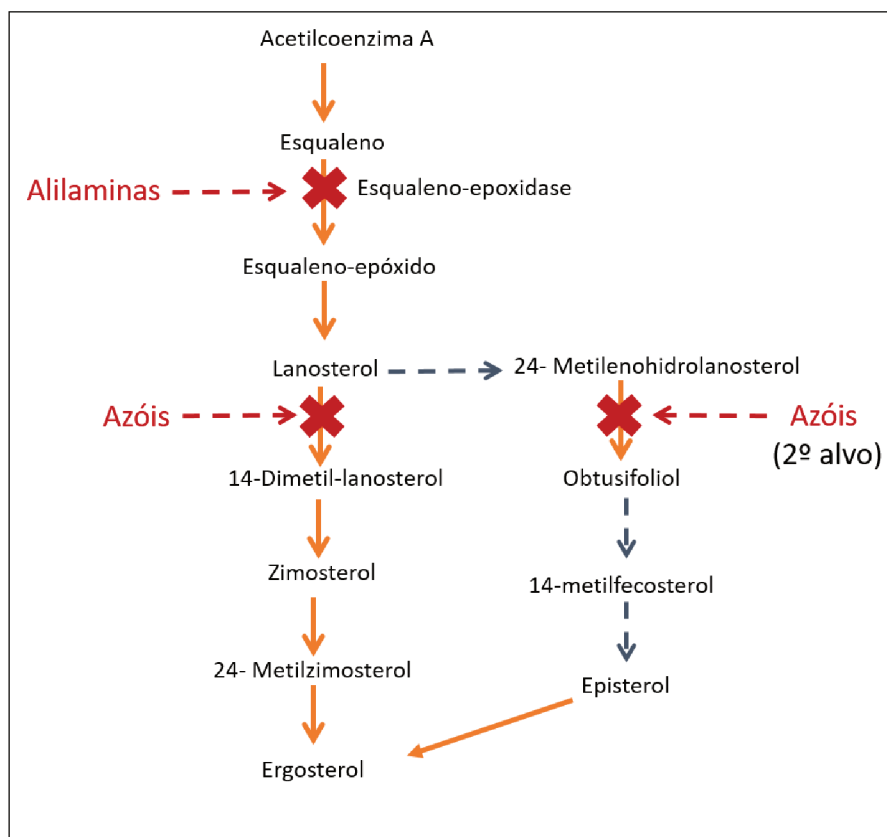


Figura 11 – Mecanismo de ação dos AF imidazólicos e da classe das alilaminas. Retirado e adaptado de Freitas & Pina Vaz (2014).

Alilaminas

Terbinafina

A Terbinafina trata-se de um AF da classe das alilaminas com ação fungicida sob dermatófitos, *Candida* spp., *M. furfur*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon* spp., *Aspergillus* spp., *Sporothrix schenckii*, *Penicillium marneffe* e sobre alguns fungos demaciáceos. As alilaminas também inibem a síntese de ergosterol, tal como os azóis, porém por meio de outra enzima. Esta classe de AF inibe a enzima esqualeno-epoxidase, que converte o esqualeno a esqualeno-2,3-epóxido (figura 12), levando à acumulação de esqualenos tóxicos para a membrana citoplasmática, alterando a integridade da membrana da célula fúngica (figura 11) (Freitas & Vaz, 2014; Gupta & Foley, 2015). O tratamento com terbinafina em creme é equivalente ao tratamento tópico com cetoconazol ou com bifonazol em creme com eliminação do fungo completa com percentagens de 88% a 100%. Num estudo randomizado duplamente cego foi investigada a eficácia da utilização da solução de terbinafina a 1%, aplicada duas vezes por dia, durante 7 dias. Este estudo concluiu que este regime se mostrou eficaz em 81% dos casos (Gupta & Foley, 2015). Este fármaco é relativamente bem tolerado apresentando como efeitos adversos mais comuns as reações cutâneas (Freitas & Vaz, 2014)

Tabela 3 - Características dos AF utilizados na terapêutica da PV. O- oral; SO – suspensão oral; T- tópica. Retirado e adaptado de (Freitas & Vaz, 2014)

Classe	Antifúngicos	Formulações	Mecanismos de ação	Tipo de ação	Posologia	Duração do tratamento	Outras características	
Alilaminas	Terbinafina	T	Inibição da síntese do ergosterol, através da enzima esqualeno-epoxidase	Fungistático	Aplicação 2x/dia da solução a 1%	7 dias	Em associação com azóis pode mostrar sinergismo	
Azóis	Imidazóis	Cetoconazol	O; T	Inibição da enzima 14 α -desmetilase, supressão da síntese do ergosterol	Fungistático	Aplicação diária na zona afetada	14 dias	
		Miconazol	T			Aplicação do creme 1x/dia	-	
		Clotrimazol	T					
		Econazol	T			Aplicação do creme, solução ou champô 1x/dia	-	
		Tioconazol	T				-	
	Triazóis	Fluconazol	O; SO	Idêntico aos imidazóis (com menos toxicidade e maior eficácia)	Fungistático	300 mg/2xsemana	4 semanas	
		Itraconazol	O; SO			200 mg/dia	7 dias	
		Pramiconazol	O			200 mg/ dia	3 dias	

Outros compostos

Sulfureto de Selénio

O Sulfureto de Selénio está disponível em loção a 2,5%, em creme ou champô e mostra-se eficaz no tratamento da PV. Tem como desvantagem o seu odor desagradável (Gupta et al., 2002). De acordo com o Infarmed (Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P.) está autorizada em Portugal a comercialização de Sulfureto de Selénio em champô com o nome comercial Selenix®.

Piritiona de Zinco

A piritiona de Zinco a 1% é usada em champô num período de tratamento de 2 semanas (Gupta et al., 2002). De acordo com o Infarmed estão autorizados o creme e a suspensão cutânea de piritiona zinco com o nome comercial de Z.P. Dermil® (Infarmed, 2006).

Como referido anteriormente o género *Malassezia* está relacionado com infeções sistémicas. Neste tipo de infeções deve ser identificada a espécie causadora da patologia, ser removido o cateter venoso central, descontinuada a suplementação lipídica e iniciada a terapêutica com Anfotericina B (Velegraki et al., 2015).

Prevenção

Embora a PV seja de relativamente fácil tratamento, a recorrência apresenta um dos maiores desafios no tratamento desta patologia (Gupta et al., 2005, 2002). A PV tem um carácter acentuadamente recidivante principalmente por as espécies de *Malassezia* serem constituintes da flora normal da pele (Gupta & Foley, 2015). Os motivos da recorrência devem-se aos fatores endógenos do hospedeiro e aos fatores ambientais desencadeantes da patologia serem incontroláveis (Gupta et al., 2002). Desta forma, o tratamento profilático efetivo e seguro da PV é bastante importante nos caso com recidivas frequentes, sendo aconselhável a sua realização semestral (Freitas & Vaz, 2014; Gupta et al., 2005). Porém, as abordagens terapêuticas para a profilaxia da PV não estão bem documentadas (Gaitanis et al., 2012).

O Cetoconazol demonstrou prevenir as recidivas quando administrados 400mg uma vez por mês ou 200mg por dia durante 3 dias consecutivos. Nos 11 meses seguintes à administração foi feito um *follow-up* que demonstrou menores taxas de recidiva nos pacientes a receber este tratamento profilático. Por sua vez, a toma de uma dose única 400 mg por mês de itraconazol durante 6 meses demonstrou ser significativamente mais efetivo que o placebo (Gupta et al., 2002). De acordo com Freitas & Vaz (2014) também estão indicadas para estas situações a administração de fluconazol numa dose única de 200 mg ou de 200 mg/dia de itraconazol, durante 5 dias. Em dois ensaios mais antigos foi relatado que itraconazol 200 mg duas vezes ao dia, uma vez por mês, reduziu suficientemente a taxa de recaídas da doença em comparação com o placebo. Hoje em dia não são conhecidos regimes preventivos ótimos utilizando outros antifúngicos orais ou tópicos dado que as formulações não foram adequadamente avaliadas até à data. (Gaitanis et al., 2012). Na tabela 6 estão descritos de forma esquemática os regimes profiláticos utilizados na PV.

Tabela 4 - Moléculas usadas na profilaxia da PV. O – oral.

Antifúngico	Formulação	Posologia	Duração	Referência
Cetoconazol	O	200 mg/dia	3 dias	Gupta et al. (2002)
		400 mg/mês (toma única)	1 mês	
Itraconazol	O	400 mg/mês (toma única)	6 meses	Freitas & Vaz (2014)
		200 mg/dia	5 dias	
		200mg/ 2x dia	1 mês	Gaitanis, Magiatis, Hantschke, Bassukas, & Velegraki (2012)
Fluconazol	O	200 mg/mês (toma única)	1 mês	Freitas & Vaz (2014)

Conclusão

De acordo com um estudo português recente sabe-se que as infecções das unhas e da pele constituem as infecções fúngicas mais comuns em Portugal. A PV está englobada neste tipo de infeções o que nos leva a concluir que a sua prevalência nos indivíduos portugueses é elevada. Desta forma é uma patologia a ter em atenção no nosso país.

Os fatores endógenos do indivíduo, como a predisposição genética ou a imunossupressão, têm um papel preponderante nesta patologia. Por sua vez, os fatores exógenos, com o clima também têm importância no desencadear da mesma.

O tratamento de 1º linha inclui os antifúngicos imidazólicos e outras moléculas que promovem a remoção física e/ou química do tecido inerte infetado no estrato córneo, como a piritiona de zinco e o sulfureto de selénio, todos os referidos em formulações tópicos. Nos casos de recidivas constantes ou de ineficácia do tratamento oral são usados os AF imidazólicos empregues para o tratamento comum, mas em formulações orais.

Apesar desta patologia não ser clinicamente relevante, os indivíduos com tendência para a desenvolver devem estar atentos e fazer tratamento profilático. Atualmente não existem muitos estudos acerca desta problemática. Assim a profilaxia ótima desta patologia ainda é desconhecida. No entanto alguns AF usados no tratamento mostraram ser eficazes a prevenir recidivas.

Bibliografia

- Borelli, D., Jacobs, P. H., & Nall, L. (1991). Tinea versicolor: Epidemiologic, clinical, and therapeutic aspects. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 25(2), 300–305. Disponível em: [http://doi.org/10.1016/0190-9622\(91\)70198-B](http://doi.org/10.1016/0190-9622(91)70198-B)
- Caplan, R. M. (1967). Medical uses of the Wood's lamp. *Jama*, 202(11), 1035–1038. Disponível em: <http://doi.org/10.1001/jama.1967.03130240077014>
- Crespo-Erchiga, V., & Florencio, V. D. (2006). Malassezia yeasts and pityriasis versicolor. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 19(2), 139–147. Disponível em: <http://doi.org/10.1097/01.qco.0000216624.21069.61>
- Denis, J., Machouart, M., Morio, F., Sabou, M., Kauffmann-LaCroix, C., Contet-Audonneau, N., ... Letscher-Bru, V. (2017). Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Identifying Clinical Malassezia Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(1), 90–96.
- Ferreira, W. F. C., Sousa, J. C. F. de S., & Lima, N. (2010). *Microbiologia*. Lisboa: LIDEL.
- Freitas, G., & Vaz, C. P. (2014). Micologia Médica. In H. Barroso, A. Meliço-Silvestre, & N. Taveira (Eds.), *Microbiologia Médica - Volume 2* (pp. 283–400). Lisboa: LIDEL.
- Gaitanis, G., Magiatis, P., Hantschke, M., Bassukas, I. D., & Velegaki, A. (2012). The Malassezia Genus in Skin and Systemic Diseases, 106–141. Disponível em: <http://doi.org/10.1128/CMR.00021-11>
- Gueho, E., Midgley, G., & Guillot, J. (1996). The genus Malassezia with description of four new species. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69(4), 337–355. Disponível em: <http://doi.org/10.1007/BF00399623>
- Gupta, A., & Foley, K. (2015). Antifungal Treatment for Pityriasis Versicolor. *Journal of Fungi*, 1(1), 13–29. Disponível em: <http://doi.org/10.3390/jof1010013>
- Gupta, A., Kogan, N., & Batra, R. (2005). Pityriasis versicolor: a review of pharmacological treatment options. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 6, 165–

178. Disponível em: <http://doi.org/10.1517/14656566.6.2.165>

Gupta, A., R. B., & Summerbell, R. (2002). Pityriasis Versicolor. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 16, 1. Disponível em: <http://doi.org/10.1001/archdermatol.2010.259>

Hort, W., & Mayser, P. (2011). Malassezia virulence determinants. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 24(2), 100–5. Disponível em: <http://doi.org/10.1097/QCO.0b013e328342f787>

Infarmed. (2006). *Resumo das Características do Medicamento de Z.P. Dermil*. Portugal. Retirado de: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=9390&tipo_doc=rcm

Jagielski, T., Rup, E., Ziółkowska, A., Roeske, K., Macura, A. B., & Bielecki, J. (2014). Distribution of Malassezia species on the skin of patients with atopic dermatitis, psoriasis, and healthy volunteers assessed by conventional and molecular identification methods. *BMC Dermatology*, 14(1), 3. Disponível em: <http://doi.org/10.1186/1471-5945-14-3>

Kauffman, C. A., Pappas, P. G., Sobel, J. D., & Dismukes, W. E. (2011). *Essentials of Clinical Mycology*. (C. A. Kauffman, P. G. Pappas, J. D. Sobel, & W. E. Dismukes, Eds.). New York, NY: Springer New York. Disponível : <http://doi.org/10.1007/978-1-4419-6640-7>

Pedrosa, A. F., Lisboa, C., & Rodrigues, A. G. (2014). Malassezia infections: A medical conundrum. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 71(1), 170–176. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.jaad.2013.12.022>

Prohic, A., Jovovic Sadikovic, T., Krupalija-Fazlic, M., & Kuskunovic-Vlahovljak, S. (2016). Malassezia species in healthy skin and in dermatological conditions. *International Journal of Dermatology*, 55(5), 494–504. Disponível em: <http://doi.org/10.1111/ijd.13116>

Sabino, R., Veríssimo, C., Brandão, J., Martins, C., Alves, D., Pais, C., & Denning, D. W. (2017). Serious fungal infections in Portugal. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 36(7), 1345–1352. Disponível em: <http://doi.org/10.1007/s10096-017-2930-y>

Velegraki, A., Cafarchia, C., Gaitanis, G., Iatta, R., & Boekhout, T. (2015). Malassezia Infections in Humans and Animals: Pathophysiology, Detection, and Treatment. *PLoS Pathogens*, *11*(1), 1–6. Disponível em: <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004523>

White, T. C., Findley, K., Jr, T. L. D., Scheynius, A., Boekhout, T., Cuomo, C. A., ... Saunders, C. W. (2014). Fungi on the Skin : Dermatophytes and Malassezia, 1–16.