

00322

204



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE ESPECIES DE Malassezia ASOCIADAS A ALGUNAS DERMATOSIS Y A PIEL SANA.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

CARMEN ADRIANA VALERA BERMEJO

DIRECTOR DE TESIS: DRA. FRANCISCA HERNANDEZ HERNANDEZ



MEXICO, D. F.



2003

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

A



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**TESIS CON  
FALLA DE  
ORIGEN**



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AGRICULTURA Y  
MADERA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de este trabajo académico.

NOMBRE: Carmen Adriana Valera Bermejo  
FECHA: 10-nov-03  
FIRMA: [Signature]

**DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA**  
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente.

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

Aislamiento e identificación de especies de *Malassezia* asociadas a algunas dermatosis y a piel sana.

Realizado por Pas. De Biología: Carmen Adriana Valera Bermejo

Con número de cuenta 9961038-0, quien cubrió los créditos de la carrera de Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dra. Francisca Hernández Hernández

Propietario Biol. Elva Bazán Mora

Propietario Dra. Maria Lucia Taylor da Cunha e Mello

Suplente M. en Med. Trop. Laura Rocío Castañón Olivares

Suplente M. en C. Rafael Romero Martínez

*[Signatures of Proprietors and Supplentes]*

Consejo Departamental de Biología

*[Signature]*  
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA  
DE BIOLÓGICA

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Micología Médica, del Departamento de Microbiología y Parasitología, de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Es parte de las actividades del taller "Biología de Hongos de Importancia Médica" de la Facultad de Ciencias, cuyos profesores son el Dr. Rubén López Martínez, la Dra. Francisca Hernández Hernández, la Biol. Elva Bazán Mora, la M. en Med. Trop. Rocío Castañón Olivares y la M. en C. Patricia Manzano Gayosso.

Cuando la gratitud es tan absoluta, las palabras sobran.  
Gracias por todo, José Luis, Melina, Luis Alejandro y José Manuel.

Grandes lecciones de ti he aprendido, me has mostrado que la vitalidad no solamente se revela por la capacidad de persistir sino por la de volver a empezar, me has enseñado que la esencia de la vida es ir hacia adelante; y que vivir no es solo existir, sino existir y crear, no siempre haciendo lo que se quiere, pero queriendo siempre lo que se hace. ¡Te amo Papaíto!

Uno de los mayores consuelos de la vida es tener alguien con quien conversar y compartir los momentos más importantes que ocurren día tras día. Me has enseñado tantas cosas, como que no se puede dormir sin soñar, ya que los sueños en cualquier momento pueden ser realidades, y la forma más rápida de alcanzarlos es mediante trabajo y esfuerzo. También me has mostrado que el éxito se alcanza convirtiendo cada paso en una meta y cada meta en un paso superando los momentos difíciles. Pero sobre todo me has enseñado que la constancia es la virtud por la que todas las cosas finalmente dan su fruto. ¡Te amo, Mamaíta!

Siempre un consejo acertado, reflexivo que tantas veces necesité y tú estabas ahí. Has logrado que gracias a tu imaginación, la naturaleza de la que me veo constantemente rodeada, se vuelva una obra de arte. ¡Te quiero mucho Luis!

Tu alegría, tu cariño y tu sentido del humor me han hecho sonreír un sin número de veces, haciéndome olvidar mis momentos de tensión, eres una de mis más grandes bendiciones. ¡Te quiero mucho Josef!

Abue, mi ángel de la guarda, te dedico cada una de las letras que conforman este trabajo, ya que en cada una están mis emociones, mis ilusiones y mi esfuerzo, tú siempre has estado conmigo. ¡Gracias!

Lo que hace plena una relación son los intereses comunes; lo que la hace interesante son las pequeñas diferencias. Einige Male ermangeln Wörter, um die Gefühle der Seele auszudrücken. ¡Gracias por tu cariño Arturo!

Un amigo es la persona que nos muestra el rumbo y recorre con nosotros una parte del camino. Gracias Nancy por recorrerlo conmigo.

La independencia y la perseverancia son características necesarias para lograr lo que deseamos. Gracias Edith por enseñarme a valorarlo.

La amistad duplica las alegrías y divide las angustias por la mitad. Gracias por todos los momentos felices Claudia y Carlos.

Nuestra amistad no depende de cosas como el espacio y el tiempo; sino mas bien de querer las mismas cosas, y no querer las mismas cosas, eso, Edelen es lo que en el fondo nos hace verdaderas amigas. Gracias!!

La fuerza del pensamiento es la luz del conocimiento; la fuerza de la voluntad es la energía del carácter; la fuerza del corazón la llevo con ustedes. Gracias abuelos, tios y primos por estar conmigo.

## Agradecimientos

Al Dr. Rubén López Martínez, por permitirme formar parte de su grupo de investigación, ya que gracias a esto logré acercarme al microscópico mundo de los hongos.

A la Dra. Francisca Hernández Hernández por sus valiosas aportaciones, su tiempo, su asesoría y la confianza que tuvo al asignarme este trabajo.

Quiero agradecer especialmente a la Biol. Elva Bazán Mora, por el tiempo que me ha dedicado, por sus observaciones, sus enseñanzas, por haber sido tan importante en mi formación académica y por impulsarme a superarme y a buscar nuevas metas para mi desarrollo como investigador. Pero sobre todo por su amistad y apoyo en los momentos en que lo necesité.

A la M. en Med. Trop. Rocío Castañón Olivares quien con su entusiasmo me motivó a seguir el camino de la micología médica y quien ha estado a mi lado desde entonces aconsejándome y asesorándome.

A la QFB. Erika Cordova Martínez por su paciencia, su amistad y su ejemplo, que han contribuido a que aprenda que el que sabe buscar, logra encontrar lo que desea.

Al M. en C. Rafael Romero, por escucharme, por sus consejos, y por dedicar tiempo para aportar sus valiosas sugerencias a la mejora de este trabajo.

A la Dra. Maria Lucia Taylor da Cunha e Mello, gracias por sus palabras y por permitirme conocer que hay nuevas posibilidades para crecer y desarrollarme profesionalmente.

A la M. en C. Patricia Manzano Gayosso por sus comentarios y opiniones, que fueron de gran ayuda durante mi estancia en el laboratorio.

Cada amigo representa un mundo dentro de nosotros, un mundo que tal vez no habría nacido si no lo hubiéramos conocido. Arthur, Blanca, Carlitos, Claus, Edelen, Editha, Elva, Erikacea, Harry, Itari, Ivan, Jorge, Karen, Kendo, Lupe, Marce, Migue, Nancita, Nanda, Quika, Roberto, Vania, Yola, Alexopolous, Gracias a todos!!!!

Agradecimientos especiales a aquellas personas que de alguna forma mostraron interés en mi desarrollo académico.

Ing. Adrián Valera  
Biol. Ana Jiménez  
Beatriz Gómez Varela  
Ing. Carlos Ferro  
M. en C. Carmen Salazar  
Dr. Eduardo Rendón  
Biol. Elva Bazán  
QFB. Erika Córdova  
Q. Esther Cervantes  
Felipe Bermejo  
Dra. Lucia Taylor  
Dra. Margarita Villegas  
Mercedes Arcega  
Patricia Bermejo  
Dra. Patricia Ramos  
M. en C. Rafael Romero  
M. en Med. Trop. Roció Castañón  
Dra. Rosaura Mayen  
Sara Negrete

**“Para tener el infinito en la palma de la mano, y la eternidad en una hora, hay que ser capaz de ver el universo en un grano de arena”.**

Hilario Pisani Ricci

## Resumen

Las levaduras del género *Malassezia* constituyen parte de la biota normal de la piel; son organismos lipofílicos que se aíslan principalmente de las zonas seboreicas del cuerpo humano. En la actualidad se conocen por lo menos ocho especies. La mayoría de ellas ha sido relacionada con diversas dermatosis humanas, particularmente con pitiriasis versicolor y dermatitis seboreica. En México se desconoce la frecuencia de especies de *Malassezia* asociadas a estas patologías. El objetivo de este trabajo fue establecer la prevalencia de las distintas especies en personas sanas, en pacientes con dermatitis seboreica y en pacientes con pitiriasis versicolor. Se procesaron 42 especímenes de oído externo de individuos sanos, 22 de pacientes con dermatitis seboreica y 10 de pacientes con pitiriasis versicolor (escamas provenientes de las lesiones). Los especímenes fueron cultivados en agar Dixon modificado e incubadas a 32 °C por un periodo aproximado de 10 días. Las especies fueron determinadas en base a los criterios macro y micromorfológicos, además de diferentes pruebas fisiológicas, de acuerdo a Gúeho, *et al.* 1996 y Guillot, *et al.* 1996.

Considerando los tres grupos de estudio, se lograron identificar seis de las especies descritas. En la dermatitis seboreica *Malassezia sympodialis* fue la especie predominante, sola o asociada a *Malassezia slooffiae*, *Malassezia furfur* y *Malassezia obtusa*. En la pitiriasis versicolor se aisló principalmente a *Malassezia globosa*, sola o asociada a *M. sympodialis* y a *M. restricta*. En piel sana se obtuvieron 17 cultivos, y la especie predominante fue *M. restricta* seguida por *M. globosa*, *M. sympodialis* y *M. slooffiae*.

# Índice

1. Introducción	1
1.1 Aspectos generales de los hongos	1
1.2 Levaduras de importancia médica	2
1.3 El género <i>Malassezia</i>	4
1.31 Antecedentes históricos	4
1.32 Ecología	7
1.33 Descripción del género	8
1.34 Características morfológicas y fisiológicas de las especies.	10
2. Antecedentes	14
2.1 Patologías causadas por <i>Malassezia</i>	14
2.2 Patologías asociadas a <i>Malassezia</i>	18
3. Planteamiento del Problema	21
4. Objetivos	22
5. Pacientes y Metodología	23
5.1 Toma y procesamiento de muestras	23
5.2 Identificación de especies	23
5.21 Morfología macroscópica	24
5.22 Morfología microscópica	24
5.23 Pruebas fisiológicas	24
5.231 Hidrólisis de urea	24
5.232 No dependencia de ácidos grasos	24
5.233 Catalasa	25

5.234 Termotolerancia	25
5.235 Asimilación de diferentes Tween	25
6. Resultados	28
7. Discusión	41
8. Conclusiones	44
9. Perspectivas	45
10. Bibliografía	46
11. Anexos	52

# 1. Introducción

## 1.1 Aspectos generales de los hongos

Los hongos son organismos eucariontes, polimorfos y variables en cuanto a sus requerimientos fisiológicos y bioquímicos, pertenecientes al reino Fungi. Son aerobios, heterótrofos, que tienen reproducción sexual y/o asexual. Su pared celular contiene básicamente polisacáridos como glucanas, mananas, quitina y glucoproteínas. Su membrana plasmática contiene ergosterol y el citoplasma carece de un aparato de Golgi típico y no fotosintetizan. <sup>(33)</sup>

Por la morfología microscópica del talo se dividen en filamentosos y levaduriformes; los primeros son pluricelulares y están constituidos por hifas que son estructuras flexibles, cilíndricas, con crecimiento apical, generalmente muy ramificadas que se entrelazan para formar el micelio; los segundos son levaduras, unicelulares, y pueden tener formas muy diversas (esféricas, ovoides, cilíndricas) y alcanzar dimensiones muy variadas que van desde 1  $\mu\text{m}$  hasta 15  $\mu\text{m}$ . <sup>(33)</sup>

Geográficamente los hongos se encuentran ampliamente distribuidos, desde climas tropicales hasta desérticos, a diferentes latitudes y altitudes. Son capaces de desarrollarse bajo condiciones mínimas de nutrición, pH extremo y crecer como saprobios, simbioses y parásitos. <sup>(33)</sup>

La mayoría de los hongos de importancia médica para el hombre, son saprobios de plantas y suelo, por lo que los micólogos han tenido interés en buscar los reservorios específicos naturales. <sup>(1)</sup>

Los hongos pueden ocasionar enfermedades a los humanos y otros animales denominadas micosis, que son provocadas por especies de micromicetos cuya capacidad para causar daño parece ser un fenómeno circunstancial ya que solo si las defensas del hospedero no son adecuadas para inhibir al microorganismo, se establece y progresa la infección. <sup>(51)</sup>

La clasificación general de las micosis, basada en la profundidad anatómica del desarrollo del hongo en el hospedero consiste en: superficiales, subcutáneas y sistémicas <sup>(51,11)</sup>. Las micosis superficiales incluyen enfermedades que no se consideran serias en términos de morbilidad y mortalidad, pero que son crónicas,

molestas y antiestéticas. Los hongos involucrados están confinados al estrato corneo de la piel o a los ejes de los pelos, alejados de los tejidos vivos, por lo que generalmente no se presenta una respuesta celular del hospedero. Dentro de este tipo de padecimientos se encuentran las dermatofitosis, la tiña negra, la piedra negra, la piedra blanca y la pitiriasis versicolor. <sup>(51)</sup>

Las micosis subcutáneas incluyen un grupo variado de infecciones, que se caracteriza por el desarrollo de una lesión en el sitio de la inoculación. En algunos casos son el resultado de implantación traumática dentro de la piel del ser humano. Algunas de estas infecciones se pueden diseminar vía los canales linfáticos como en el caso de la esporotricosis. Otras micosis son la cromoblastomicosis, faeohifomicosis y el micetoma. <sup>(11)</sup>

Las micosis sistémicas se dividen en dos grupos con diferencias importantes en cuanto a virulencia del agente causal. El primer grupo incluye a los hongos verdaderamente patógenos que entran principalmente por vía pulmonar: *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Blastomyces* y *Paraccoccidioides*. Los individuos afectados por este grupo de hongos generalmente tiene una respuesta inmune adecuada y los hongos causantes de infección tienen un alto poder patógeno. El segundo grupo incluye agentes etiológicos de infecciones oportunistas: *Candida*, *Cryptococcus*, agentes de hialohifomicosis (*Aspergillus*, *Fusarium*, etc), agentes de zygomicosis y muchos otros hongos <sup>(11)</sup>. En este caso el hospedero generalmente presenta alguna condición de inmunosupresión y los agentes infecciosos son de baja virulencia. Los padecimientos oportunistas más frecuentes que son causados por levaduras son la candidosis y la criptococcosis. En las últimas dos décadas ha habido un creciente interés en el estudio de estos padecimientos porque causan complicaciones en los pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). <sup>(57)</sup>

## 1.2 Levaduras de importancia médica

Se conocen aproximadamente 500 especies de levaduras. Los géneros encontradas con más frecuencia en el ser humano son *Candida*, *Cryptococcus*,

*Malassezia*. Algunos otros géneros como *Saccharomyces*, *Rhodotorula* y *Trichosporon* son patógenos poco comunes. <sup>(57)</sup>

Las levaduras no patógenas se encuentran distribuidas ampliamente en la naturaleza y con frecuencia viven en ciertos nichos ecológicos en donde se han adaptado al ambiente. Estos pueden ser plantas, flores, insectos y otros animales con los que el hombre entra fácilmente en contacto. <sup>(33)</sup>

La ecología de las levaduras patógenas de géneros como *Candida*, *Cryptococcus* y *Malassezia* es diversa. *Candida* forma parte de las superficies mucosas de animales de sangre caliente y del cuerpo humano, por lo que ha sido aislada de personas sanas en frecuencias variables. También ha sido aislada de diversos materiales y del aire en hospitales <sup>(57)</sup>; en menor proporción puede ser aislada de agua, suelo, restos de plantas y animales, frutos, líquidos fermentados, alimentos lácteos y excremento. <sup>(33)</sup>

*Cryptococcus* es una levadura con distribución mundial. No forma parte de la biota normal del humano. Su hábitat natural se encuentra en excretas de palomas y de algunas otras aves, pero también puede ser encontrada en el suelo en menor proporción. <sup>(57)</sup>

Las levaduras del género *Malassezia* se encuentran como parte de la biota normal en la piel del ser humano y algunos animales de sangre caliente, por lo que pueden estar presentes sin producir síntomas; no ha sido aislada a partir de fuentes que no sean humanas o de otros animales <sup>(31)</sup>. Los padecimientos que causa son pitiriasis versicolor, dermatitis seborreica y foliculitis entre otros; son muy comunes en climas tropicales como Centro y Sudamérica, África, India <sup>(13)</sup>, pero también puede presentarse en climas templados a fríos como Canadá, Japón y Rusia. <sup>(7, 16)</sup>

Se desconoce porqué algunas personas son portadoras de levaduras y otras no; en la biota normal de la piel humana la presencia de levaduras es regularmente como patógenos potenciales. Los factores determinantes de la composición de la biota normal de la piel son variados: el clima, el sexo, la edad, la alimentación, las interacciones microbianas, factores inespecíficos del hospedero, el funcionamiento del sistema inmune y algunos otros. Un factor

importante para la colonización y para la patogenia de las enfermedades causadas por levaduras parece ser la adhesividad de las levaduras a las células epiteliales. (30, 7)

### 1.3 El Género *Malassezia*

#### 1.31 Antecedentes Históricos

Las levaduras del género *Malassezia* fueron asociadas a una afección de la piel por primera vez en 1846, cuando Eishstedt reportó la presencia de levaduras y filamentos en escamas de un paciente afectado por pitiriasis versicolor. <sup>(27)</sup>

De manera independiente en 1853 Robin le asignó un nombre al agente causal de la pitiriasis versicolor denominándolo *Microsporon furfur* debido a la observación de hifas curvadas y torcidas con la presencia de pequeñas esporas esféricas circunscritas por dos líneas concéntricas que se encontraban separadas por un espacio claro y en cúmulos. Rivolta en 1873 observó levaduras solas en escamas de diversas regiones de piel cabelluda sana, pero el cultivo de estas tuvo cierta dificultad ya que no se conocía su naturaleza lipofílica y las clasificó como *Cryptococcus*. En 1874 Malassez describió la presencia de estructuras esféricas y de estructuras con gemación ovalada presentes en pacientes con pitiriasis capitis (caspa) y con dermatitis seborreica a las que denominó esporas. También fue quien por primera vez describió la forma filamentosa y la presencia de levaduras que aparece en las lesiones cutáneas de pacientes con pitiriasis versicolor. Baillon en 1889 consideró la presencia de filamentos y cúmulos de levaduras observados por Malassez en las lesiones de pitiriasis versicolor, nombrando al organismo *Malassezia furfur* (dedicado al médico francés L. Malassez, con el suf. lat. *-ia* que denota pertenencia). <sup>(56)</sup>

En 1904 Sabouraud propuso el nombre genérico de *Pityrospurm* (del gr. *pityron*, caspa, tiña, y *sporon* en lat. *sporum*, espora) denominando a las esporas de Malassez como *Pityrosporum malassezii*, y consideró a esta especie como la causante de la pitiriasis capitis que comprende células de tipo elipsoidal y esférico. Estudió la etiología de este trastorno en la piel cabelluda y la comparó con la pitiriasis versicolor, en el que regularmente se observaban conjuntamente hifas y

cúmulos de esporas si el padecimiento estaba avanzado. Sabouraud concluyó que las dos micosis eran prácticamente idénticas; el hongo se desarrollaba en el mismo estrato corneo de la piel y se comportaba similar durante el tratamiento. Sin embargo *Pityrosporum* en la pitiriasis capitis no presentaba los elementos miceliales abundantes observados en la pitiriasis versicolor. La ausencia de hifas en *Pityrosporum* fue la razón principal por la que no se establecía una relación con *Malassezia*. Debido a la forma de gemación con el desarrollo de un septo, Sabouraud consideró a *Pityrosporum* dentro de los Blastomycetes: un orden contemporáneo de organismos levaduriformes que comprendía representantes de géneros actuales como *Cryptococcus*, *Candida* y *Rhodotorula*.<sup>(56)</sup>

En 1925, Weidman describió *Pityrosporum pachydermatis* que fue aislada a partir de las escamas de piel inflamada de rinocerontes de la India.

En 1927, Acton y Panja observaron hifas en cultivos de escamas de pacientes con pitiriasis versicolor y también de escamas de pacientes con pitiriasis capitis. Debido a este hecho, y a que las colonias aisladas de ambos padecimientos fueron idénticas, concluyeron que *Pityrosporum* era un sinónimo de *Malassezia* y nombraron al hongo presente en las escamas de la pitiriasis capitis *M. ovalis*. Panja fue el primero en obtener a *M. ovalis* y a *M. furfur* en cultivo puro, en el medio Petroff modificado.<sup>(56)</sup>

Dodge (1935) reclasificó a *P. pachydermatis*, especie capaz de crecer en medios no enriquecidos de ácidos grasos, nombrándola *M. pachydermatis*.

Mientras tanto Gordon (1951), con el deseo de cultivar el agente causal de la pitiriasis versicolor, adicionó sustancias grasas como aceite de oliva o ácido esteárico al agar Sabouraud u otros medios de cultivo, con lo que observó un excelente crecimiento de este microorganismo. Al mismo tiempo, aisló una forma esférica de *Pityrosporum*, denominando a la especie *Pityrosporum orbiculare* usualmente responsable de la pitiriasis versicolor.<sup>(56)</sup>

Unos años después Gustafson (1955) aisló un gran número de levaduras de otitis externa en perros y describió la gemación en el polo de la célula en una base ancha; no observó la formación de micelio o pseudomicelio y las células eran esféricas o ligeramente ovaladas. También estableció que no requería de

sustancias grasas para continuar su crecimiento, lo que abrió nuevas perspectivas para el género. Gustafson denominó a sus aislamientos *P. canis*; y en un estudio para la obtención de *Pityrosporum* de varias especies de animales, encontró *P. ovale* y *P. canis* en las orejas de cerdos. Las levaduras no lipofílicas recuperadas de animales habían sido asignadas a una especie única *Pityrosporum canis* (= *P. pachydermatis*). Esta se encontraba asociada con dermatitis, especialmente otitis externa en carnívoros domésticos. <sup>(56)</sup>

Van Abbé (1964) utilizó un medio elaborado por DIXON® (Anexo 1.5). Este medio fue utilizado en una investigación de personas con pitiriasis capitis de quienes recuperó en varias ocasiones a *P. orbiculare*. <sup>(59)</sup>

En 1966, Keddle estudió la pared celular de *Pityrosporum* y *Malassezia* con microscopía electrónica de transmisión y observó la presencia de multiestratificaciones, característica común, por lo que concluyó que pertenecían al mismo género, y propuso cambiar el nombre de *Malassezia ovalis* propuesto por Acton y Panja 1927, por *Pityrosporum ovale* especie descrita por Castellani y Chalmers 1913. <sup>(56)</sup>

Una vez que la naturaleza lipofílica de estas levaduras fue reconocida hizo posible su recuperación en cultivos. Cuando diferentes investigadores observaron el cambio espontáneo de un tipo morfológico a otro, se llegó a la conclusión de que las tres especies aisladas en humanos y conocidas hasta ese momento como *P. ovale*, *P. orbiculare* y *M. furfur*, eran sólo variantes de una misma especie por lo que prevaleció la nomenclatura *M. furfur*. <sup>(22)</sup>

Las especies aceptadas hasta entonces eran *M. furfur* (por Baillon, 1889) y *M. pachydermatis* (por Dodge, 1935), y fue hasta 1990 que Simmons y Guého describieron una nueva especie, *M. sympodialis*, que fue diferenciada de *M. furfur* por la gemación simpodial ocasional y también fue la primera especie, de este género a la que se le aplicaron técnicas moleculares para su identificación, mostrando un contenido molecular bajo en guanina-citosina respecto a *M. furfur* <sup>(55)</sup>. Se hicieron nuevos estudios al género basándose en la morfología, ultraestructura, fisiología y biología molecular describiendo cuatro nuevas especies: *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta* y *M. slooffiae* <sup>(27)</sup>. En el 2002 Sugita

*et al.* hicieron la descripción de una nueva especie denominada *M. dermatis* mediante el análisis de secuencias de DNA ribosomal, por lo que ahora se reconocen ocho especies. <sup>(58)</sup>

En la actualidad existe un interés creciente en identificar todos los aislamientos clínicos y comensales de *Malassezia*. La identificación de todas las especies de este género originó ciertas dificultades debido a la ausencia de características que pudieran ser determinadas por técnicas bioquímicas simples <sup>(29)</sup>. Las características fisiológicas como la asimilación de diferentes fuentes de lípidos revelan la diversidad de las especies lipofílicas <sup>(29)</sup>. Algunas de estas pruebas son difíciles de interpretar o poco prácticas para algunos laboratorios. Los métodos moleculares actuales para identificar a este género de levaduras incluyen la cariotipificación <sup>(60,12)</sup>, análisis por RFLP <sup>(28)</sup>, comparaciones de la secuencia del DNA correspondiente a la subunidad mayor del RNA ribosomal. <sup>(25)</sup>

### 1.32 Ecología

Las levaduras lipofílicas forman parte de la biota cutánea de los animales de sangre caliente. La presencia de las especies de *Malassezia* en piel humana sana, fue detectada desde los inicios de la segunda mitad del siglo XIX. De las ocho especies reconocidas del género *Malassezia* se ha confirmado que *M. pachydermatis* esta claramente adaptada a animales pero ocasionalmente puede ser aislada de humanos <sup>(26,41)</sup>. En cambio las especies dependientes de lípidos se ha demostrado que pueden estar presentes tanto en animales como en humanos <sup>(29)</sup>. En diferentes estudios se ha observado que de todas las especies, *M. globosa* y *M. sympodialis* son las especies aisladas con más frecuencia en diferentes partes del cuerpo como piel cabelluda, frente, tronco y espalda tanto en personas sanas como en pacientes con diferentes afecciones cutáneas; y solo se tienen registrados dos trabajos de aislamiento de este organismo a partir de oído externo de individuos sanos y de neonatos <sup>(47,48)</sup>. La frecuencia de *M. restricta* es variable, *M. slooffiae* y *M. furfur* se obtienen en menor frecuencia y de todas las especies *M. obtusa* es la que menos se obtiene. También se ha reportado la asociación de algunas de especies, siendo la de *M. globosa* con *M. sympodialis* la

que se reporta más frecuentemente <sup>(15,8,43,45,31)</sup>. En cuanto a *M. dermatis* de un estudio de 19 pacientes con dermatitis atópica, en tres casos se demostró que estaba presente. <sup>(58)</sup>

La frecuencia y densidad de la colonización de estas levaduras se encuentran relacionadas con la edad de la persona y la actividad de las glándulas sebáceas del área corporal en estudio <sup>(40)</sup>. Pero también se menciona que la diferencia entre los estudios realizados podría ser explicada por la diversidad en las técnicas de muestreo, el medio de cultivo utilizado y posiblemente también a factores geográficos y étnicos. <sup>(16)</sup>

### **1.33 Descripción del Género *Malassezia***

El género *Malassezia* está formado por levaduras que comparten características morfológicas, nutricionales y moleculares. Las células pueden ser esféricas, ovales o cilíndricas, dependiendo de la especie; la pared celular es gruesa y multiestratificada; la reproducción asexual se da por un proceso de gemación repetitiva, monopolar o simpodial, dejando una prominente cicatriz en el lugar de la gemación en la célula madre. Algunas especies pueden desarrollar pseudomicelio *in vivo* así como *in vitro*. <sup>(42,18)</sup>

Desde un punto de vista fisiológico, la característica principal de estas levaduras es la lipofilia; estudios detallados en su cultivo y morfología se han enfocado en su naturaleza lipofílica, ya que casi todas las especies requieren esencialmente de lípidos como fuente de carbono para su crecimiento. Con la presencia de ácidos grasos libres en el medio de cultivo durante su incubación se ha demostrado la presencia de lipasas que permiten que la levadura utilice lípidos para su nutrición <sup>(46)</sup>, con excepción de *M. pachydermatis* <sup>(28)</sup>. Ran <sup>(46)</sup> observó que *M. furfur* presentaba la actividad de lipasa más alta en una fracción insoluble, que se localiza principalmente en la pared rica en glucanas y/o en sistemas membranales; también observó que las hifas se desarrollan cuando el crecimiento de la levadura es acelerado adicionando taurocolato de sodio como activador de lipasas. Respecto a los estudios de adherencia de *Malassezia* spp. no se ha

observado una relación directa entre la capacidad de la levadura para adherirse a los queratinocitos y la capacidad para producir infección. (53)

La dificultad para aislar y mantener a estas levaduras en cultivo ha sido uno de los factores principales para impedir su estudio, y es lo que ha llevado a una gran confusión durante décadas. (42,18)

A pesar de que no se ha descrito para ninguna de las especies el estado teleomórfico, la viabilidad de las técnicas moleculares, especialmente la secuenciación de DNA ribosomal, llevó a la inclusión de estas levaduras dentro del phylum Basidiomycota en la clase Ustilaginomycetes, una subclase dentro de los que se caracterizan por ser patógenos de plantas, y por carecer de xylosa en su pared celular. (23,10)

#### Clasificación taxonómica

<b>Reino:</b>	Fungi
<b>Phyllum:</b>	Basidiomycota
<b>Clase:</b>	Ustilaginomycetes
<b>Orden:</b>	Malasseziales
<b>Género:</b>	<i>Malassezia</i>
<b>Especies:</b>	<i>M. furfur</i>
	<i>M. pachydermatis</i>
	<i>M. sympodialis</i>
	<i>M. globosa</i>
	<i>M. restricta</i>
	<i>M. obtusa</i>
	<i>M. slooffiae</i>
	<i>M. dermatis</i>

(Fell, *et al.*, 2000, Begerow *et al.*, 2000 Sugita, *et al.*, 2002)

### 1.34 Características morfológicas y fisiológicas de las especies.

(Guého, *et al.*, 1996; Guillot, *et al.*, 1996; Sugita, *et al.*, 2002).

En 1996 y 2002, las técnicas moleculares, en conjunción con estudios morfológicos hicieron posible la descripción de ocho especies cuyas características particulares se describen a continuación (Cuadro 1).

#### ***Malassezia furfur***

Características morfológicas: Después de siete días de incubación en agar Dixon modificado (ADm) las colonias son lisas, brillantes y convexas. La micromorfología es variable; comprende células ovoides, cilíndricas (1.5 - 3.0 x 2.5 - 8.0  $\mu\text{m}$ ), o esféricas (2.5 - 5.0  $\mu\text{m}$ ). Las gemas se forman en una base ancha.

Características fisiológicas: Catalasa y ureasa positivas, presenta crecimiento en los Tween 20, 40, 60 y 80; tiene buen crecimiento en ADm a 32 °C, 37 °C y 40 °C, y no crece en agar dextrosa Sabouraud (ADS) a 32 °C.

Guanina-Citocina (GC): 66.0 - 66.7 %

#### ***Malassezia pachydermatis***

Características morfológicas: Después de siete días de incubación en ADm, las colonias son mate, convexas y algunas veces umbonadas. Las células son ovoides (2.0 - 2.5 X 4.0 - 5.0  $\mu\text{m}$ ). Las gemas se forman en una base ancha, dejando una cicatriz prominente en la célula madre después de la gemación.

Características fisiológicas: Catalasa usualmente positiva; ureasa positiva; no asimila el Tween 20; tiene buen crecimiento en ADm a 32 °C, 37 °C y 40 °C, y es la única especie que presenta crecimiento en ADS a 32 °C.

GC: 55.5 - 56.0 %

#### ***Malassezia sympodialis***

Características morfológicas: Después de siete días de incubación en ADm, las colonias son brillantes, lisas y con una ligera elevación central. La micromorfología comprende células ovoides a esféricas (1.5 - 2.5 X 2.5 - 6.0  $\mu\text{m}$ ). La base de la

gema es mas angosta que la célula madre, y algunas de las células pueden presentar gemación de tipo simpodial.

Características fisiológicas: Catalasa y ureasa positivas, no asimila el Tween 20, presenta crecimiento en ADm a 32 °C, 37 °C y 40 °C, y no crece en ADS a 32 °C.

GC: 61.9 - 62.5 %

### ***Malassezia globosa***

Características morfológicas: Después de siete días de incubación en ADm, las colonias son elevadas, plegadas y rugosas. Las células son esféricas (2.5 - 8.0 µm). Las gemas se forman en una base angosta, y en comparación con las otras especies, las cicatrices de gemación no son prominentes. En algunas células se puede observar la presencia de gemas alargadas.

Características fisiológicas: Catalasa y ureasa positivas; presenta patrones irregulares de asimilación de los Tween, puede presentarse un anillo de precipitación alrededor del Tween 40 y del Tween 60, tiene buen crecimiento en ADm a 32 °C puede o no crecer a 37 °C, pero no crece a 40 °C, y no crece en ADS a 32 °C.

GC: 53.5 - 53.7 %

### ***Malassezia slooffiae***

Características morfológicas: Después de siete días de incubación en ADm, las colonias son de textura mate, rugosas y de bordes aserrados. Las células son cilíndricas pero cortas (1.0 - 2.0 X 1.5 - 4.0 µm). Las gemas se forman en una base ancha.

Características fisiológicas: Catalasa y ureasa positivas; no asimila bien el Tween 80; tiene buen crecimiento en ADm a 32 °C, 37 °C y 40 °C, y no presenta crecimiento en ADS a 32°C.

GC: 68.5 - 69.0 %

### ***Malassezia restricta***

Características morfológicas: Después de siete días de incubación en ADm, las colonias son puntiformes, de bordes ondulados o enteros. La micromorfología es variable: células esféricas a ovoides (1.5 - 2.0 X 2.5 - 4.0  $\mu\text{m}$ ). Las gemas se forman en una base angosta.

Características fisiológicas: Catalasa negativa, ureasa positiva; presenta patrones irregulares de asimilación de los Tween y no presenta crecimiento en ADS a 32 °C  
GC: 59.8 - 60.0 %

### ***Malassezia obtusa***

Características morfológicas: Después de siete días de incubación en ADm las colonias son lisas y planas. Las células son cilíndricas (1.5 -2.0 X 4.0 - 6.0  $\mu\text{m}$ ). Las gemas se forman en una base ancha y entre la célula madre y la gema pueden alcanzar las 10  $\mu\text{m}$

Características fisiológicas: Catalasa y ureasa positivas; es incapaz de utilizar cualquiera de los Tween como única fuente de lípidos, y no presenta crecimiento en ADS a 32 °C.

GC: 60.5 - 60.7 %

### ***Malassezia dermatis***

Características morfológicas: Después de siete días de incubación en ADm las colonias son convexas de margen continuo o lobulado. La micromorfología es variable, comprende células esféricas, ovoides y elipsoidales (2.0 - 8.0 X 2.0 -10.0  $\mu\text{m}$ ).

Características fisiológicas: Catalasa y ureasa positivas, asimila todos los Tween, tiene buen crecimiento en ADm a 32 °C, 37 °C y 40 °C, y no presenta crecimiento en ADS a 32°C.

GC: 60.4 %

Cuadro 1. Pruebas fisiológicas para identificar las especies de *Malassezia*

Especie	Ureasa	Catalasa	ADS 32 °C	ADm 32 °C	ADm 37 °C	ADm 40 °C	Tw 20	Tw 40	Tw 60	Tw 80
<i>M. furfur</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. pachydermatis</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>M. sympodialis</i>	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
<i>M. globosa</i>	+	+	-	+	+/-	-	-	-	-	-
<i>M. obtusa</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>M. slooffiae</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>M. restricta</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>M. dermatis</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+

## 2. Antecedentes

### 2.1 Patologías causadas por *Malassezia*

A pesar de que las levaduras de *Malassezia* forman parte de la biota cutánea normal del ser humano <sup>(47,48,22)</sup>, bajo la influencia de factores predisponentes que permitan el crecimiento masivo del hongo <sup>(31)</sup> pueden tornarse patógenas y/o estar asociadas a un gran número de padecimientos <sup>(20)</sup>. Dentro de los padecimientos causados por este género de levaduras, se encuentran la pitiriasis versicolor <sup>(35,17,44,9,32,36,20)</sup>, la foliculitis por *Malassezia* <sup>(22,5,3,34)</sup>, la septicemia <sup>(38, 41, 24)</sup>, la pustulosis neonatal <sup>(4,49)</sup> y la dermatitis seborreica. <sup>(53,45,16,20, 54, 31)</sup>

En otros padecimientos esta levadura se encuentra en gran número sin que su participación etiológica haya sido definida. Por lo anterior consideramos que existen otras patologías en las que *Malassezia* se encuentra asociada como la papilomatosis reticulada y confluyente de Gougerot y Carteaud <sup>(14,52)</sup>, la onicomycosis <sup>(19)</sup>, la dermatitis atópica <sup>(20,44,37)</sup> y la psoriasis. <sup>(2)</sup>

#### Pitiriasis versicolor

La pitiriasis versicolor es un trastorno crónico y superficial, asintomático, usualmente localizado en la parte superior del tronco, cuello y parte superior de los brazos. Gordon en 1951 sugirió que la forma esférica de *Malassezia*, referida entonces a *P. orbiculare*, era el agente etiológico de pitiriasis versicolor. En estudios recientes se ha observado que las especies predominantes en este grupo de pacientes son *M. sympodialis* y *M. globosa* (Cuadro 2) dejando a las otras cuatro especies con una frecuencia mucho menor. <sup>(20)</sup>

La pitiriasis versicolor tiene una distribución mundial en áreas tropicales en donde ha sido reportada hasta en un 30 a 40 % de la población. La incidencia es mucho menor en climas templados (1 a 4 %). Generalmente es una afección de las edades postpubertal y madura, cuando las glándulas sebáceas se encuentran mas activas y es generalmente vista en gente saludable. La edad en que este padecimiento se observa con mayor frecuencia es entre los 15 y 45 años <sup>(22)</sup>; es

poco frecuente antes de los cinco años de edad y ha sido descrita como excepcional en lactantes <sup>(35)</sup>. Afecta a ambos sexos, con ligero predominio en mujeres. <sup>(7)</sup>

Se localiza en piel en donde hay abundantes glándulas sebáceas, y es frecuente localizarla en tronco, comúnmente ocultas por la vestimenta. Se caracteriza por la presencia de pequeñas lesiones que son ligeramente descamativas, papulares, y eritematosas; pueden unirse para abarcar partes más grandes del cuerpo y pueden variar en forma y color (rojo, marrón o blanco). Los factores exógenos más importantes son las altas temperaturas y la alta humedad, lo que probablemente explicaría porqué la pitiriasis versicolor es más común en los trópicos en donde es más frecuente localizarla en la cara. Los factores endógenos más importantes son la piel grasosa, la hiperhidrosis, factores hereditarios, tratamiento con corticosteroides e inmunodeficiencia. <sup>(20,35,17)</sup>

El diagnóstico de la pitiriasis versicolor se basa en la observación de levaduras típicas y pseudomicelio en las escamas de lesiones utilizando hidróxido de potasio y tinta Parker. De todos los estudios realizados, es claro que *M. globosa* es la especie asociada principalmente con la pitiriasis versicolor, que es el único padecimiento cutáneo en el cual la relación con *Malassezia* no se encuentra en controversia. <sup>(17)</sup>

Cuadro 2. Frecuencia de especies en pacientes con pitiriasis versicolor.

Especies encontradas		País	Autor	Pacientes
<i>M. globosa</i>	55%	Japón	Nakabayashi et al. (2000)	22
Cada una de las otras	10%			
<i>M. globosa</i>	60%	España	Crespo et al. (2000)	96
<i>M. globosa</i> - <i>M. sympodialis</i>	29%			
<i>M. globosa</i> - <i>M. slooffiae</i>	7%			
<i>M. globosa</i>	58%	Zaragoza	Aspiroz et al. (2001)	79
<i>M. globosa</i> - <i>M. sympodialis</i>	30%			
<i>M. sympodialis</i>	12%			
<i>M. sympodialis</i>	59%	Canadá	Gupta et al. (2001)	111
<i>M. globosa</i>	25%			
<i>M. furfur</i>	11%			

## **Foliculitis**

Es un padecimiento benigno que se caracteriza por la presencia de pápulas foliculares y pústulas localizadas en la espalda, pecho, parte superior de los brazos, algunas veces cuello y raramente en la cara. La condición comúnmente se diagnostica erróneamente como acné <sup>(34)</sup>. Pero la presencia de prurito y la ausencia de comedones y lesiones faciales hacen que se distingan ambos padecimientos. Su aparición es mas frecuente en regiones tropicales y en verano en regiones templadas <sup>(22)</sup>. La oclusión del folículo piloso parece jugar un papel importante en este padecimiento que también ha estado asociado a tratamiento con antibióticos, corticosteroides e inmunosupresión asociada con transplante de órganos <sup>(3)</sup>. Bajo la influencia de factores predisponentes, la foliculitis por *Malassezia* puede ser explicada como un crecimiento extenso seguido de la presencia de levaduras en el folículo <sup>(5)</sup>. La inflamación puede deberse a la producción de ciertas sustancias por la levadura o a la liberación de ácidos grasos como resultado de la actividad enzimática del hongo. Los estudios histopatológicos y de microscopía directa muestran la presencia de abundantes levaduras de *Malassezia* en el folículo pilosebáceo. Las especies que han sido encontradas *M. globosa*, *M. furfur* y *M. pachydermatis*. <sup>(20)</sup>

## **Septicemia**

Actualmente las especies del género *Malassezia* se consideran patógenos emergentes que pueden causar sepsis asociada a catéteres en la población pediátrica que recibe alimentación lipídica parenteral prolongada, especialmente cuando se trata de prematuros de bajo peso internados durante largos periodos en unidades de cuidados intensivos. Si bien esta es la menos frecuente de las infecciones provocadas por estos hongos, es la más importante debido al alto porcentaje de mortalidad. <sup>(38)</sup>

La primera aparición nosocomial de *M. pachydermatis* se describió en 1980. Esta especie, que hasta ese momento sólo se había aislado como causante de infecciones en animales, se aisló más adelante, en varias ocasiones, en infecciones nosocomiales en sala de cuidados intensivos de neonatos donde, a

través de métodos moleculares, pudo comprobarse la transmisión nosocomial <sup>(41)</sup>. Posteriormente, se describieron especies lipofílicas de *Malassezia* recuperadas de formas invasivas en pacientes pediátricos, considerándose todas ellas *M. furfur*. <sup>(24)</sup>

### **Pustulosis neonatal**

Este padecimiento se caracteriza por la presencia de papulopústulas no foliculares localizadas en cara y cuello en recién nacidos <sup>(4)</sup>. La especie descrita como causante de esta entidad es *M. furfur*. Se ha sugerido que esta condición pudo haberse confundido en algunas ocasiones con acné neonatal. <sup>(49)</sup>

### **Dermatitis Seborreica**

La dermatitis seborreica es un trastorno crónico y recurrente de la piel, caracterizado por la presencia de inflamación, lesiones eritematosas, pruriginosas y descamativas, localizadas en áreas con abundantes glándulas sebáceas, como piel cabelluda, cejas, pliegues nasolabiales, las regiones paranasales, mejillas, orejas, regiones preesternal e interescapulares y axilas <sup>(53,22)</sup>. La pitiriasis capitis es considerada como la manifestación inicial que afecta del 5 - 10 % de la población adulta. Las complicaciones incluyen infecciones secundarias bacterianas y otitis externa. El curso de la dermatitis seborreica tiende a ser crónico. En climas templados tiende a mejorar durante el periodo de verano. El padecimiento empeora durante los periodos de tensión física y mental. <sup>(20)</sup>

La frecuencia no se conoce con exactitud, sin embargo, es un padecimiento frecuente en los primeros tres meses de vida, inicia generalmente a partir de la segunda semana y afecta por igual a ambos sexos. Es un padecimiento que se presenta en 2 - 5 % de la población general; en los recién nacidos en el 12 % y aumenta a 46 - 86 % en los pacientes con SIDA; este porcentaje sugiere que el sistema inmune juega un papel importante en esta enfermedad. Algunos de los factores que pueden predisponer al individuo a presentar dermatitis seborreica son: factores genéticos, enfermedades neurológicas como la enfermedad de

Parkinson, la esclerosis múltiple, enfermedades cardíacas, la depresión y alcoholismo crónico. <sup>(16)</sup>

La relación existente entre las levaduras del género *Malassezia* y la dermatitis seborreica todavía es un factor de controversia. En una revisión Shuster llegó a la conclusión de que *P. ovale* era el agente etiológico, y desde entonces numerosos estudios han demostrando que el número de levaduras presentes en la pitiriasis capitis eran significativamente mayores comparadas con los individuos sanos; además existe una relación entre la severidad de la dermatitis seborreica y la cantidad de las levaduras de *Malassezia*. <sup>(54)</sup>

Algunos estudios han determinado las especies de *Malassezia* asociadas a lesiones de dermatitis seborreica; *M. globosa* y *M. sympodialis* predominan sobre las otras especies (Cuadro 3).

Cuadro 3. Especies de *Malassezia* asociadas a dermatitis seborreica.

Especies encontradas	País	Autor	Pacientes estudiados
<i>M. restricta</i> <i>M. globosa</i>	España	Crespo et al. (1999)	75
<i>M. furfur</i> <i>M. globosa</i>	Canadá	Nakabayashi et al. (2000)	28
<i>M. globosa</i> <i>M. sympodialis</i>	Japón	Gupta et al. (2001)	42

## 2.2 Patologías asociadas a *Malassezia*

### Papilomatosis confluyente y reticulada de Gougerot-Carteaud

Este padecimiento se caracteriza por pápulas hiperqueratósicas confluentes, que tienen una pigmentación marrón-grisácea y se localizan predominantemente en el tronco. Frecuentemente se asocia a levaduras lipofílicas en el estrato corneo observado por la microscopía directa y la histopatología <sup>(14)</sup>. Roberts (1969) sugirió que tanto la papilomatosis confluyente como la reticulada podrían representar una forma peculiar de reacción del hospedero a la colonización por levaduras de este género de levaduras. En algunos casos

estudiados se ha observado la presencia de *M. furfur* y *M. sympodialis* principalmente. Es posible que este problema dermatológico tenga un gran número de causas, y que las levaduras de *Malassezia* estén involucradas en la patogenia de algunos casos con patrones clínicos similares a la pitiriasis versicolor<sup>(52)</sup>. En México este padecimiento se presenta en un 1.5-3%, siendo más frecuente su aparición en el sexo femenino, y la edad predominante de los 16 a los 20 años.

### **Onicomycosis**

Las onicomycosis son afecciones de las uñas tanto de las manos, como de los pies causadas por hongos como *Candida spp.* y algunos dermatofitos<sup>(13)</sup>. Se han descrito algunos casos de onicomycosis involucrando a las especies de *Malassezia*. En 1982 por primera vez relacionó a este organismo con una onicomycosis<sup>(19)</sup>. La presencia de estas levaduras en la uña, es conocida aunque poco frecuente, y probablemente su presencia se deba a la colonización del área sub-ungueal, lo que hace poco certera la relevancia de estos reportes<sup>(16)</sup>, y en los cuales no se hace referencia a la descripción clínica de las alteraciones aparentemente causadas por *Malassezia*, por lo que es cuestionable que esta levadura sea la causa de una onicomycosis.

### **Dermatitis atópica**

La dermatitis atópica es un padecimiento hereditario, crónico y recurrente de la piel, que se caracteriza por lesiones eritematosas, con prurito intenso, descamación y frecuentemente resequead en diferentes partes del cuerpo. Se presenta en brotes agudos por tiempos e intensidad variables. Además se manifiesta una reactividad muy alta de la piel a estímulos físicos e irritantes directos como sustancias ambientales, cierto tipo de tejidos, detergentes, alergias y estrés. Tiende a agudizarse cuando la temperatura es muy elevada o baja, cuando el paciente sufre una infección bacteriana o cuando la piel resulta irritada. Entre los niños que padecen de esta enfermedad, el 60 por ciento muestra signos en el primer año de vida y el 85 por ciento en los 5 primeros años.<sup>(44)</sup>

Afecta mayormente a los niños pequeños, y puede persistir hasta que el niño alcanza la adolescencia o la edad adulta. La distribución de las lesiones puede variar con la edad; en niños pequeños, suelen localizarse en la cara, la parte externa de los codos y en las rodillas. En los niños mayores y adultos tiende a manifestarse en manos, pies, brazos y en la parte posterior de las rodillas. <sup>(37)</sup>

Poco se conoce sobre el papel real de *Malassezia* en la dermatitis atópica; sin embargo el mejoramiento de los pacientes con los tratamientos antifúngicos hace pensar en estas levaduras como agentes causales, las cuales actuarían como un importante alérgeno que provoca la reacción cutánea especialmente en pacientes con dermatitis atópica localizada en piel cabelluda, cara y cuello. <sup>(22)</sup>

### Psoriasis

La psoriasis es una enfermedad crónica que evoluciona en brotes y que puede ser desencadenada por factores genéticos, inmunológicos, infecciosos, psicológicos, físicos o bioquímicos. Dentro de los factores infecciosos involucrados se encuentran *Staphylococcus aureus*, *Candida spp* y ahora se presume la presencia de *Malassezia spp*. Se caracteriza por placas eritemato-escamosas en diferentes partes de la piel, de diverso tamaño y número. Por lo general las placas son bien delimitadas por bordes definidos, no activos, muy blancas, con aspecto de yeso y gruesas. Se presenta por igual en hombres y en mujeres de todas las edades, predominando en jóvenes y más frecuentemente en personas de piel blanca (parece que la presencia de melanina protege contra la enfermedad). <sup>(2)</sup>

Los sitios predominantes para la aparición de las lesiones, son los salientes óseos como codos y rodillas, la piel cabelluda, la región sacrocoxígea, pueden aparecer en el tronco ventral y dorsalmente o en lugares especiales poco comunes como las palmas de las manos, las plantas de los pies y el pene. <sup>(2)</sup>

Las especies encontradas en pacientes con las diferentes dermatopatías tanto causadas como asociadas a este género, se encuentran *M. globosa* y *M. sympodialis*; el resto de las especies se presenta en una frecuencia menor y ésta es bastante variable en cada estudio y en cada padecimiento. <sup>(16)</sup>

### 3. Planteamiento del Problema

A partir de 1996 se conoce una nueva clasificación del género *Malassezia* que incluye hasta hoy ocho especies (*M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. restricta*, *M. obtusa*, *M. slooffiae* y *M. dermatis*).

En México no se han realizado estudios que determinen la frecuencia y variedad de estas especies en la población con dermatosis y en piel sana.

Por lo anterior es necesario realizar estudios epidemiológicos en nuestra población que permitan definir la diversidad y frecuencia de especies de *Malassezia* en individuos mexicanos.

## 4. Objetivos

### 4.1 Objetivo general

- Aislar e identificar especies de *Malassezia* presentes en piel de individuos sanos y de pacientes con dermatosis.

### 4.2 Objetivos particulares

- Aislar levaduras de *Malassezia* a partir de escamas provenientes de oído externo de individuos sanos.
- Aislar levaduras de *Malassezia* de lesiones presentadas en pacientes con dermatitis seborreica y pitiriasis versicolor.
- Diferenciar las especies de *Malassezia* asociadas a piel sana y a piel afectada por pitiriasis versicolor y dermatitis seborreica.
- Determinar la frecuencia de especies de *Malassezia* asociadas a piel sana y a piel afectada por pitiriasis versicolor y por dermatitis seborreica.

## 5. Pacientes y Metodología

### 5.1 Toma y procesamiento de muestras

Se obtuvieron escamas de un total de 74 individuos: 42 sanos y 32 con lesiones en piel, de los cuales 22 fueron de pacientes con dermatitis seborreica y 10 de pacientes con pitiriasis versicolor.

De los pacientes con dermatosis las escamas de piel afectada fueron obtenidas mediante un raspado de la lesión con bisturí estéril. De los individuos sanos el espécimen fue obtenido del oído externo con ayuda de una espátula estéril.

Los especímenes tanto de individuos sanos como de pacientes fueron cultivados en agar Dixon modificado con antibióticos (ADm+A) (Anexo 1.1) e incubados a 32 °C por diez días. Estos cultivos fueron revisados periódicamente para detectar colonias con aspecto levaduriforme.

A las colonias sugestivas del género *Malassezia* se les realizó un examen directo con tinta Parker para identificar levaduras con micromorfología compatible. Una vez identificado el género, las colonias fueron purificadas principalmente de bacterias, mediante diluciones para resiembras sucesivas en ADm con cloranfenicol. Cuando se obtuvieron colonias de *Malassezia* con diferente morfología, cada una fue resembrada por separado nuevamente en ADm. El mantenimiento de las colonias puras se realizó en ADm y en caldo Dixon modificado con antibióticos (CDm+A) (Anexo 1.2) a 32 °C (Cuadro 4).

### 5.2 Identificación de especies

La identificación de las especies se realizó mediante la morfología de la colonia, la morfología celular y diversas pruebas fisiológicas. Tanto las características morfológicas como las fisiológicas se evaluaron utilizando cultivos en crecimiento de 3 a 10 días.

### **5.21 Morfología macroscópica**

Las placas de agar fueron inoculadas con 10 µl de una suspensión de levaduras que fueron distribuidos en la superficie del agar para poder obtener colonias separadas. La morfología colonial se determinó mediante la examinación de los cultivos en ADm de siete días que permanecieron en una temperatura constante de 32°C. Las características estudiadas fueron el tamaño, la forma, el color y el aspecto de la colonia; el tipo de borde y su elevación.

### **5.22 Morfología microscópica**

La morfología de las levaduras se examinó mediante un frotis teñido con Gram, realizado a partir de cultivos de 2 a 3 días de crecimiento en CDM. Se observó si las células eran esféricas, ovoides o cilíndricas, el tipo de gemación (simpodial o fialídico), si la gema provenía de una base ancha o angosta.

### **5.23 Pruebas fisiológicas (Cuadro 5).**

#### **5.231 Hidrólisis de Urea**

La hidrólisis de urea, se utiliza para la identificación de basidiomicetos. Fue realizada mediante la siembra de un inóculo de levaduras en agar urea de Christensen manteniendo los cultivos a 37°C. Se utilizó como control negativo una cepa de *Candida*, y como control positivo una cepa de *Cryptococcus*. El resultado positivo se determina al observar un cambio de color del medio de amarillo a rosa intenso.

#### **5.232 No dependencia de ácidos grasos**

Todas las colonias fueron sembradas en Agar de Dextrosa Sabouraud (ADS) a 32°C por siete días para verificar la no dependencia de ácidos grasos descrita únicamente para *M. pachydermatis*.

### **5.233 Catalasa**

La reacción de catalasa fue determinada mediante la aplicación de una gota de peróxido de hidrogeno en un fragmento de colonia sobre un portaobjetos. La producción de burbujas de gas indicó una reacción positiva.

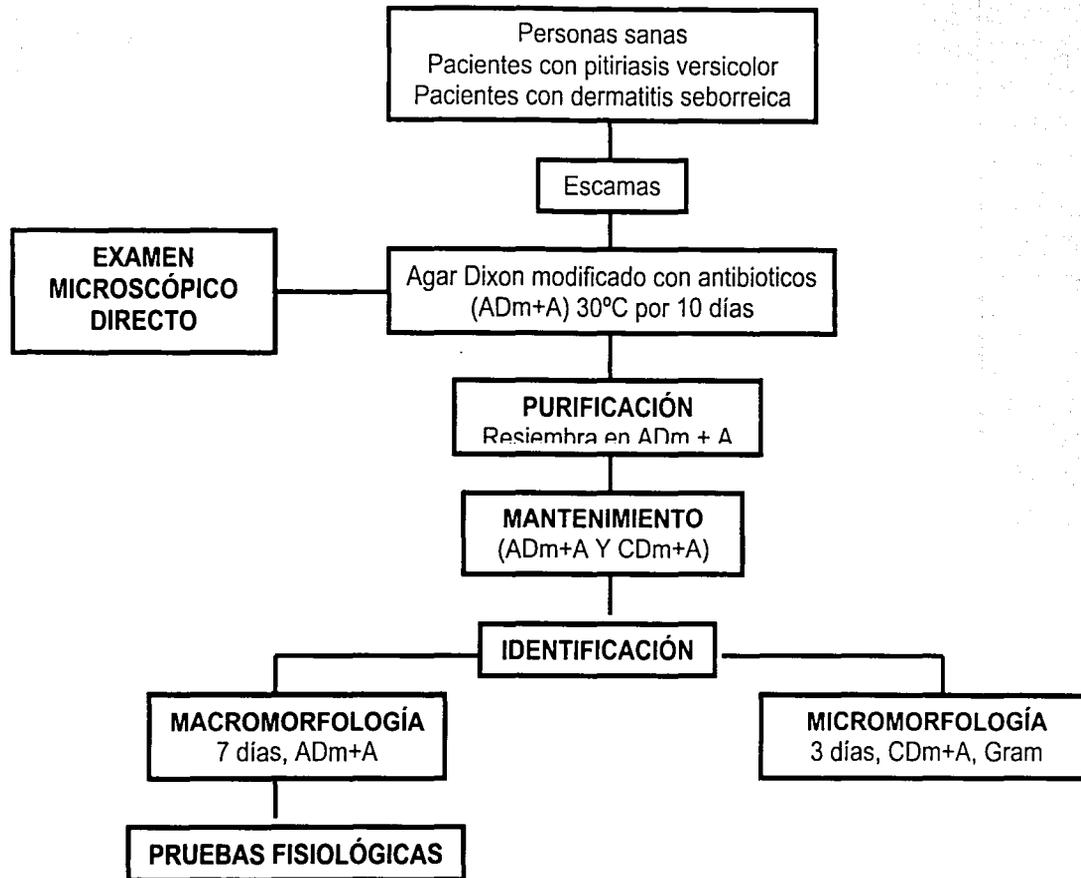
### **5.234 Termotolerancia**

Para demostrar la capacidad de crecer a diferentes temperaturas, los aislamientos fueron incubados en tubos de agar Dixon modificado a 32 °C, 37 °C y 40 °C por siete días.

### **5.235 Asimilación de diferentes Tween**

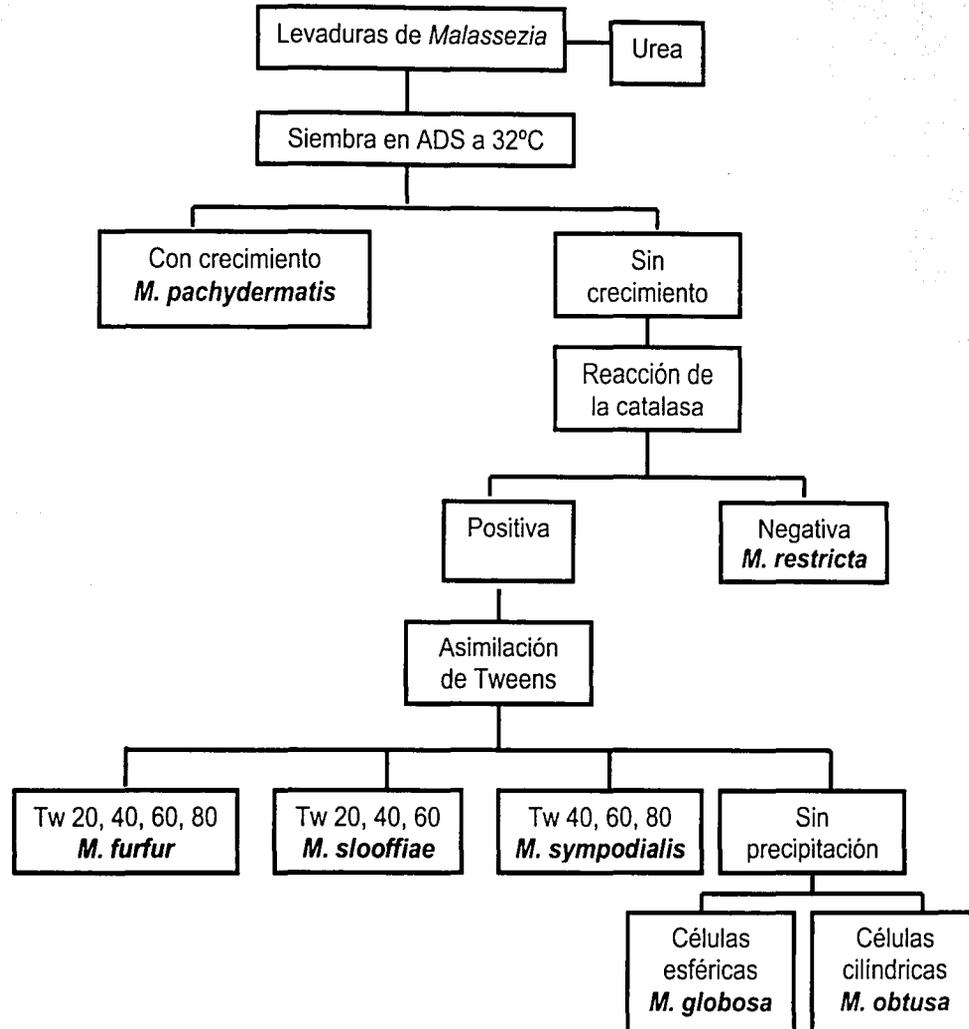
La capacidad de utilizar los Tween fue probada utilizando 16 ml de agar de dextrosa Sabouraud con antibióticos (Anexo 1.4) mantenido a 50 °C. Al medio se añadieron 2 ml de una suspensión de levaduras en una concentración de  $10^5$  células/ml haciendo el conteo en cámara de Newbauer. El agar fue mezclado y depositado en caja Petri. Una vez solidificado el medio, se hicieron cuatro orificios de 2 mm de diámetro aproximadamente y llenados con 5  $\mu$ l de Tween 20, 40, 60 y 80 respectivamente. Las cajas fueron incubadas por siete días a 32°C. La prueba fue valorada por el grado de crecimiento y/o la reacción de precipitación alrededor de los pozos.

Cuadro 4. Procesamiento de especímenes para el aislamiento de *Malassezia spp.*



Cuadro 5. Procedimiento para la Identificación de Especies de *Malassezia*

(Tomado y modificado de Guillot, et al., 1996)



## 6. Resultados

De los 74 individuos estudiados se obtuvieron 39 cultivos positivos: 17 correspondientes a personas sanas, 13 a pacientes con dermatitis seborreica y 9 a pacientes con pitiriasis versicolor. Debido a que de varios individuos se obtuvieron asociaciones de especies, se obtuvo un total de 55 aislamientos distribuidos como se muestra en la Cuadro 6.

Cuadro 6. Cepas de *Malassezia* obtenidas de piel sana y piel con dermatosis

	Individuos estudiados	No. de cultivos positivos	No. de aislamientos	% de recuperación de <i>Malassezia</i>
Sanos	42	17	20	40.5
Dermatitis seborreica	22	13	21	59.1
Pitiriasis versicolor	10	9	14	90.0
Total	74	39	55	52.7

## Pruebas fisiológicas

### Hidrólisis de Urea

Todas las cepas resultaron positivas para la hidrólisis agar urea de Christensen a 37 °C en los primeros 2 días (Figura 1). Las pertenecientes a *M. restricta* fueron las que tardaron más tiempo para dar el resultado positivo.

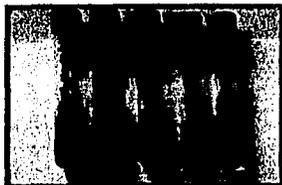


Figura 1. Hidrólisis de urea para *M. slooffiae*, *M. globosa* y *M. sympodialis*.

### No dependencia de Ácidos Grasos

Ninguna de las cepas tuvo crecimiento durante su incubación en agar de dextrosa Sabouraud a 32 °C, descartando así la presencia de *Malassezia pachydermatis*.

### Catalasa

De todos los aislamientos, 43 resultaron positivos a la prueba de catalasa observándose la presencia de burbujas por la liberación del oxígeno libre, y 12 de los aislamientos resultaron negativos.

### Dixon modificado a diferentes temperaturas

Durante la incubación a diferentes temperaturas en ADm, se observó que todos los cultivos crecieron a 32 °C. La mayoría de los cultivos presentó crecimiento a 37 °C, y solo 25 crecieron a 40 °C.

### **Asimilación de Tween**

La asimilación de Tween (Figura 2) fue medida por la precipitación y crecimiento alrededor de los pozos, en donde:

- En 2 cepas hubo crecimiento alrededor de todos los pozos (Figura 2A).
- En 7 cepas hubo poco o nulo crecimiento alrededor del pozo que contenía Tween 80, pero crecimiento en el resto de los pozos (Figura 2B).
- En 16 cepas hubo poco o nulo crecimiento alrededor del pozo que contenía Tween 20, pero crecimiento en el resto de los pozos (Figura 2C).
- En 30 de las cepas no se estableció un patrón de asimilación de Tween (Figuras 2D, 2E y 2F).

Al integrar los datos del estudio macroscópico y microscópico, además de los resultados de las pruebas fisiológicas se llegó a los siguientes resultados.

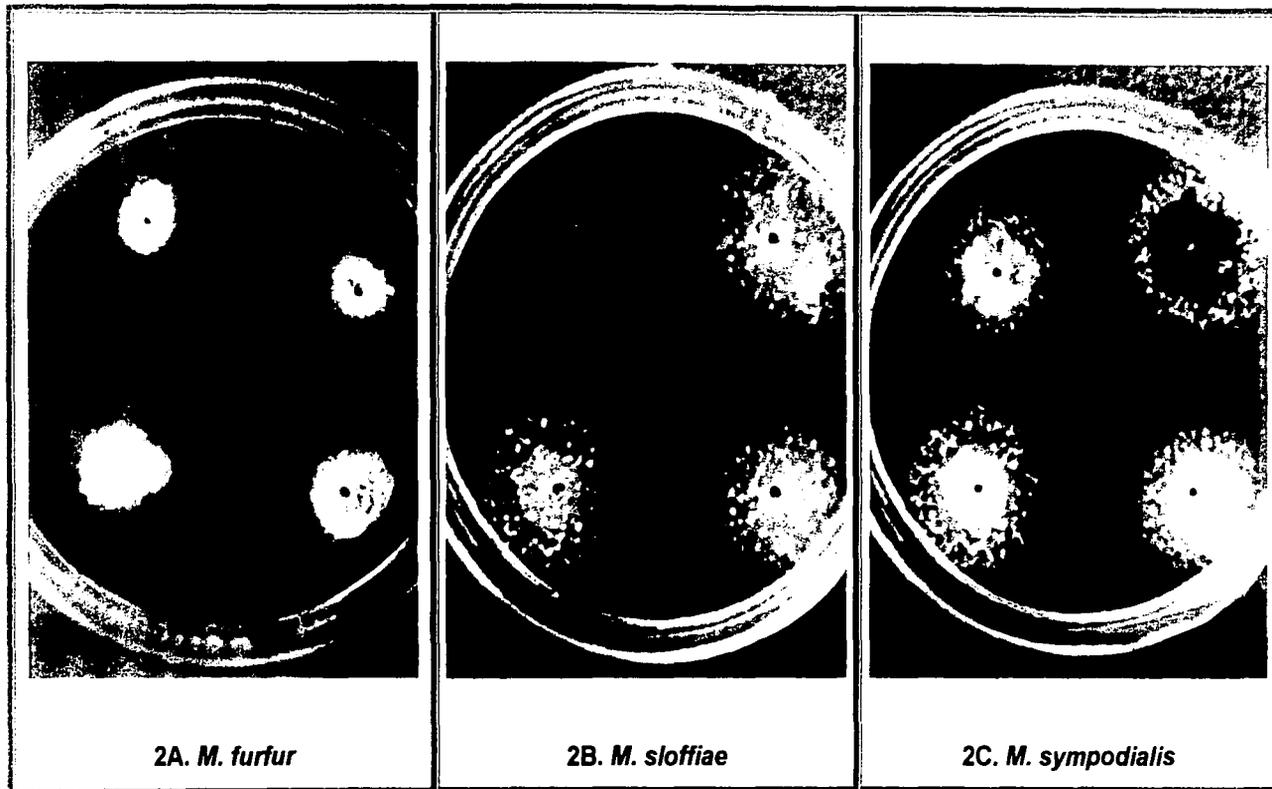
### **Individuos sanos**

De los 42 individuos a quienes se les realizó cultivo, 17 fueron positivos, catorce se encontraron como especies únicas y en tres se obtuvieron al menos dos colonias de diferentes especies. En diez aislamientos se identificó a *Malassezia restricta*, siendo la especie aislada con más frecuencia en este grupo, seguida de *M. globosa*, *M. sympodialis* y *M. slooffiae* (Cuadro 7).

Cuadro 7. Especies y frecuencia de *Malassezia* identificadas en personas sanas.

Individuos estudiados	Especies identificadas	No. de cultivos positivos	Número y porcentaje total de especies	No. total De aislamientos
42	<i>M. restricta</i> <i>M. globosa</i> <i>M. sympodialis</i> <i>M. sympodialis-M. restricta</i> <i>M. sympodialis-M. slooffiae</i> <i>M. globosa-M. restricta</i>	8 4 2 1 1 1	<i>M. restricta</i> 10 (50%) <i>M. globosa</i> 5 (25%) <i>M. sympodialis</i> 4 (20%) <i>M. slooffiae</i> 1 ( 5%)	20
Asociaciones: 3 de 17 = 17.6%				

Figura 2. Asimilación de Tween



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

80 20  
60 40



2D. *M. restricta*



2E. *M. obtusa*



2F. *M. globosa*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

60 20

60 40

### **Dermatitis seborreica**

De los 22 pacientes incluidos en el estudio, se obtuvieron 13 cultivos positivos: siete de especies únicas, cuatro con mezcla de dos especies y 2 con mezcla de tres especies. *M. sympodialis* fue la especie aislada con más frecuencia en este grupo seguida de *M. slooffiae* y en menor número *M. globosa*, *M. furfur* y *M. obtusa*.

En este grupo de individuos se observó el mayor porcentaje de asociación (46.1%) de los tres grupos estudiados. (Cuadro 8).

### **Pitiriasis versicolor**

De 10 pacientes con este padecimiento, se obtuvieron 9 cultivos positivos, 6 de especies únicas, y 3 asociaciones. *M. sympodialis* fue la especie aislada con más frecuencia y se encontró asociada con *M. restricta* y *M. globosa* (Cuadro 9).

Cuadro 8. Especies y frecuencia de *Malassezia* identificadas en pacientes con dermatitis seborreica.

Pacientes estudiados	Especies identificadas	No. de cultivos positivos	Número de especies y porcentaje total	No. total de aislamientos
22	<i>M. globosa</i>	4	<i>M. sympodialis</i> 7 (33.3%)	21
	<i>M. sympodialis</i>	2	<i>M. slooffiae</i> 6 (28.6%)	
	<i>M. slooffiae</i>	1	<i>M. globosa</i> 5 (23.8%)	
	<i>M. sympodialis-M. slooffiae</i>	3	<i>M. furfur</i> 2 ( 9.5%)	
	<i>M. furfur-M. globosa</i>	1	<i>M. obtusa</i> 1 ( 4.8%)	
	<i>M. furfur-M. sympodialis-</i>			
	<i>M. slooffiae</i>	1		
	<i>M. sympodialis-M. slooffiae-M. obtusa</i>	1		
Asociaciones: 6 de 13 = 46.1%				

Cuadro 9. Especies y frecuencia de *Malassezia* identificadas en pacientes con pitiriasis versicolor

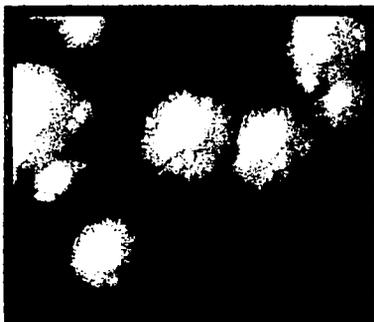
Pacientes estudiados	Especies identificadas	No. de cultivos positivos	Número de especies y porcentaje total	No. total de aislamientos
10	<i>M. globosa</i>	4	<i>M. globosa</i> 7 (50.0%)	14
	<i>M. sympodialis</i>	2	<i>M. sympodialis</i> 5 (35.7%)	
	<i>M. sympodialis-M. globosa</i>	1	<i>M. restricta</i> 2 (14.3%)	
	<i>M. sympodialis-M. restricta-</i>			
	<i>M. globosa</i>	2		
Asociaciones: 3 de 9 = 33.3%				

Comparando las especies encontradas (Figura 3) de personas sanas y de pacientes se determinó que la especie aislada con más frecuencia fue *M. globosa*, seguida por *M. sympodialis* y por *M. restricta* (Cuadro 10).

Cuadro 10. Total de colonias de especies de *Malassezia* asociadas a piel sana y a piel con dermatosis

Especie	Personas sanas n= 17	Pacientes con dermatitis seborreica n= 13	Pacientes con pitiriasis versicolor n= 9	Total de aislamientos
<i>M. globosa</i>	5 (25.0%)	5 (23.8%)	7 (50.0%)	17 (30.9%)
<i>M. sympodialis</i>	4 (20.0%)	7 (33.3%)	5 (35.7%)	16 (29.1%)
<i>M. restricta</i>	10 (50.0%)	-	2 (14.3%)	12 (21.8%)
<i>M. slooffiae</i>	1 ( 5.0%)	6 (28.6%)	-	7 (12.7%)
<i>M. furfur</i>	-	2 ( 9.5%)	-	2 ( 3.7%)
<i>M. obtusa</i>	-	1 ( 4.8%)	-	1 ( 1.8%)
<b>Total</b>	20	21	14	55

Fig. 3. Morfología macroscópica (izquierda) y microscópica (derecha) de *Malassezia* spp.

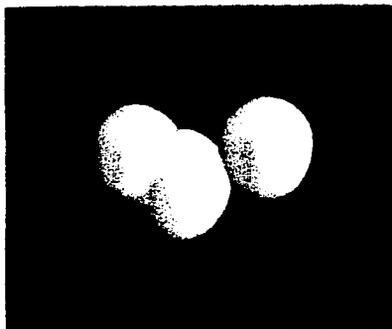


A. *M. globosa*. Colonias crema, opacas, de bordes lobulares, con pliegues radiales, elevadas.

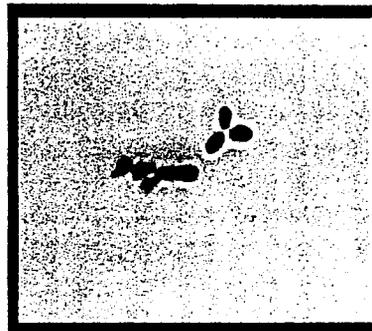


a. *M. globosa*. Células esféricas con una gema alargada proveniente de una base angosta.

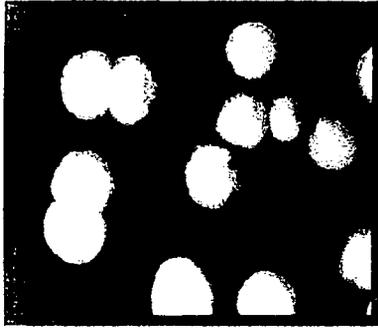
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



B. *M. sympodialis*. Colonias crema, brillantes, de bordes regulares, lisas, con una elevación central



b. *M. sympodialis*. Células ovoides con gemas provenientes de una base estrecha, y gemación simpodial.

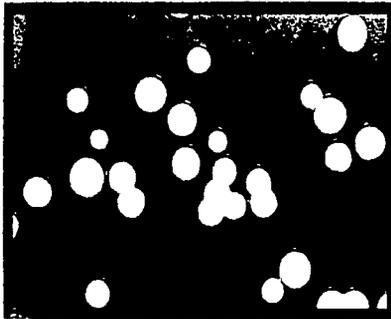


**C. *M. slooffiae*.** Colonias crema, umbonadas, de apariencia mate, con surcos en los bordes.

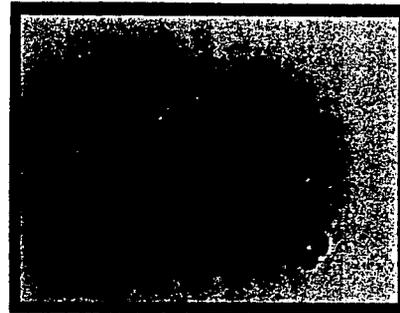


**c. *M. slooffiae*.** Células ovoides con gemas que provienen de una base ancha.

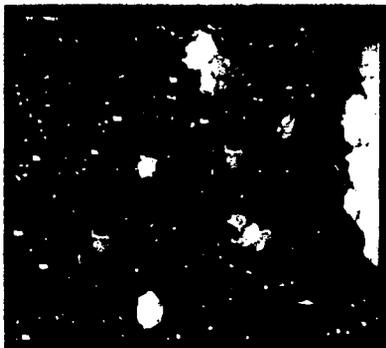
TESIS CON  
FALLA EN EL ORIGEN



**D. *M. furfur*.** Colonias blanquecinas, brillantes, lisas, de bordes regulares, con una elevación convexa.



**d. *M. furfur*.** Células ovoides, y cilíndricas, con gemas provenientes de una base ancha.

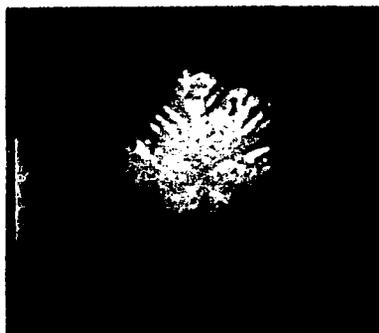


**E. *M. restricta*.** Colonias blanquecinas, brillantes, de bordes rugosos, puntiformes.



**e. *M. restricta*.** Células esféricas y ovoides, con gemas que provienen de una base angosta.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**F. *M. obtusa*.** Colonias crema, con escasos pliegues radiales, de bordes lobulados, ligeramente elevadas.



**f. *M. obtusa*.** Células cilíndricas, con gemas que provienen de una base ancha.

## 7. Discusión

Los registros que se tienen en México acerca de la participación del género *Malassezia*, son anteriores a que se hiciera la revisión taxonómica, por lo que los datos existentes pertenecen al género *Pityrosporum* asociado a padecimientos como dermatitis seborreica y pitiriasis versicolor<sup>(39)</sup>, o bien a *M. furfur* como se describió durante muchos años.<sup>(5)</sup>

Siguiendo la metodología para la identificación de especies del género *Malassezia* realizada por Guého, *et al.*, en 1996 y Guillot, *et al.* en 1996, en este trabajo se logró hacer la identificación de seis de las especies descritas en tres grupos que incluyeron de pacientes con dermatitis seborreica, pacientes con pitiriasis versicolor y de individuos sanos.

El oído externo es una región rica en ácidos grasos por lo que aumentamos las posibilidades de aislamiento de la levadura de interés. En este estudio se observó que la especie aislada con más frecuencia de la piel del oído externo en individuos sanos fue *M. restricta* en un 50%. El espécimen de esta región corporal sólo ha sido reportada en dos estudios anteriores buscando obtener la frecuencia de *P. ovale* en la oreja humana<sup>(47,48)</sup>. De acuerdo a los conocimientos actuales, y considerando que los estudios previos a la descripción de nuevas especies se basaban en la morfología del género *Pityrosporum*, es difícil definir la especie aislada por este autor ya que morfológicamente podría corresponder a *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. restricta* o *M. obtusa*.

Otros estudios realizados en Canadá, Rusia y España, indican que la especie predominante aislada de personas con piel sana es *M. sympodialis* en un porcentaje que va desde el 26% hasta el 60%, aunque ha sido de otras regiones corporales (tronco, cara, piel cabelluda, espalda y frente)<sup>(31,15)</sup>.

En este trabajo, el aislamiento de *M. globosa* se obtuvo de un 25% de los casos, concordando con otros trabajos en donde *M. globosa* también ha sido descrita como la segunda especie aislada con una frecuencia que va del 10% al 51%<sup>(45,43,15,17)</sup>. *M. sympodialis* se observó en un 20% de los casos y solo hubo un

aislamiento de *M. slooffiae* (5%); no hubo aislamientos del resto de las especies, como se han aislado en otras regiones del mundo.

La diversidad de especies encontradas en los estudios reportados por diferentes autores indica que probablemente la especie aislada depende de la región corporal estudiada. Varios tipos de lípidos son encontrados naturalmente en la barrera lipídica de la piel, como las ceramidas (40%), colesterol (10%), sulfato de colesterol (25%), y ácidos grasos libres (25%). El cerumen localizado en el oído se encuentra formado por esterés (combinación de un alcohol y un ácido graso)<sup>(50,6)</sup>, y probablemente *M. restricta* asimile de mejor forma los esterés encontrados en el cerumen, que los ácidos grasos libres presentes en la piel, permitiéndole desarrollarse mejor.

En el grupo de pacientes con dermatitis seborreica la especie aislada con mayor frecuencia fue *M. sympodialis* (33.3%) seguida por *M. slooffiae* (28.6%) y por *M. globosa* (23.8%). En otros grupos de estudio, la especie que prevalece en cada uno de ellos es variable. En Japón, la especie predominante fue *M. furfur* en un 35%<sup>(45)</sup>; en Canadá, se reporta a *M. globosa* en un 45%<sup>(31)</sup> y en España la especie más frecuente en dos estudios fue *M. restricta* en porcentajes de 43% y 65% respectivamente<sup>(15,17)</sup>. En este trabajo solo se encontraron tres especies únicas: *M. globosa*, *M. sympodialis* y *M. slooffiae*, pero éstas también se encontraron asociadas a otras especies, o entre sí. Este es el grupo de dermatosis en el que se encontraron más asociaciones: tres de *M. sympodialis* con *M. slooffiae* (23%) y una de *M. furfur* con *M. globosa* (7.7%). También hubo dos asociaciones de tres especies: *M. sympodialis*, *M. slooffiae* y *M. furfur* (7.7%) y *M. obtusa*, *M. slooffiae* y *M. sympodialis* (7.7%). El total de asociaciones fue de 46.1%, porcentaje similar a lo reportado en los estudios realizados en España en donde los autores reportan un 46.7%, y las asociaciones se dan entre *M. globosa* con *M. sympodialis*, *M. slooffiae* y *M. restricta*; y *M. sympodialis* con *M. restricta*.<sup>(15)</sup>

En el grupo de pacientes con pitiriasis versicolor se aislaron únicamente tres especies de las cuales *M. globosa* fue aislada en la mitad de los casos. Este resultado es similar al reporte de otros autores, en donde la aparición de esta especie se observa desde un 25% hasta un 90%<sup>(32,45,15,8)</sup>. En uno de nuestros

siete casos, esta especie se encontró asociada con *M. sympodialis* (11.1%), que es una de las asociaciones reportadas con una frecuencia de alrededor del 30% (15,8,9). *M. restricta* parece estar relacionada en muy baja proporción con este padecimiento. Se ha reportado su aparición como especie única en un trabajo realizado en Málaga, España (17), pero no ha sido observada su asociación con otra especie.

En los trabajos realizados en otras partes del mundo se observa que las especies más frecuentes tanto de individuos sanos como de pacientes son *M. globosa* y *M. sympodialis* (17,32,8,9). La proporción del resto de las especies es muy variable y menor en comparación con las anteriormente mencionadas.

Considerando los resultados globales de este estudio se observó que las especies predominantes fueron: *M. globosa* (30.9%), *M. sympodialis* (29.1%) y *M. restricta* (21.8%).

Las levaduras del género *Malassezia*, se encuentran como parte de la biota normal de la piel. En dermatitis seborreica este género puede actuar como un factor generador de sensibilización en la piel (39), y con esto contribuir al desarrollo de las lesiones características de este padecimiento, pero no tiene el papel de agente etiológico. En pitiriasis versicolor se podría considerar a *M. globosa* como la especie causal para el desarrollo de esta enfermedad; esta reportado que es la especie que posee una capacidad patógena y enzimática superior en comparación con el resto de las especies de este género (15).

Los estudios disponibles respecto a los factores de patogenicidad de las diversas especies de *Malassezia* son aún insuficientes para comprender el papel de estas levaduras en la fisiopatogenia de las patologías a las cuales han sido asociadas. Esta limitante seguramente será superada en un corto plazo.

## 8. Conclusiones

De las ocho especies de *Malassezia* descritas, en este trabajo se identificaron seis de ellas: *M. globosa*, *M. sympodialis*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. furfur* y *M. obtusa*.

A partir de escamas del oído externo de individuos sanos, se identificaron cuatro especies: *M. restricta*, *M. globosa*, *M. sympodialis* y *M. slooffiae*.

En el grupo de pitiriasis versicolor se identificaron tres especies: *M. globosa*, *M. sympodialis* y *M. restricta*.

De los pacientes con dermatitis seborreica se identificaron cinco especies: *M. sympodialis*, *M. slooffiae*, *M. globosa*, *M. furfur* y *M. obtusa*; siendo el grupo con mayor diversidad de especies.

Las especies predominantes en este estudio fueron: *M. globosa*, seguida por *M. sympodialis* y *M. restricta*.

Este representa el primer estudio realizado en México enfocado a determinar la diversidad de especies de *Malassezia* presentes en piel sana y en piel con pitiriasis versicolor y dermatitis seborreica.

## 9. Perspectivas

La incursión en el estudio del género *Malassezia* ha permitido visualizar otros campos relacionados en los que se podría profundizar para comprender mejor la fisiopatogenia de las dermatosis que han sido relacionadas con la presencia de esta levadura. Algunos aspectos a retomar o iniciar son:

1. Ampliar el número de individuos estudiados, tanto sanos como con dermatosis.
2. Estudiar pacientes con otras dermatosis relacionadas con *Malassezia* como dermatitis atópica, folliculitis, pustulosis neonatal y onicomycosis.
3. Identificar la especie descrita como *M. dermatitis* utilizando técnicas moleculares.
4. Buscar factores de virulencia en las diferentes especies como presencia de adhesinas y determinación cuantitativa y cualitativa de lipasas.

## 10. Bibliografía

1. Ajello L. 1958. Occurrence of *Cryptococcus neoformans* in soils. Amer J Hyg. 2: 67-72.
2. Alfonso I, Díaz MA, Sagaró B, Alfonso Y. 2001. Patogenia de la psoriasis a la luz de los conocimientos actuales. Rev Cubana Med 40: 122-134.
3. Alves EV, Martins JE, Ribeiro EB, Sotto MN. 2000. *Pityrosporum* folliculitis: renal transplantation case report. J Dermatol. 27: 49-51.
4. Aractingi S, Cadranet S, Reygagne P, Wallach D. 1991. Neonatal pustulosis induced by *Malassezia furfur* Ann Dermatol Venereol. 118: 856-858.
5. Archer-Dubon C, Icaza-Chivez ME, Orozco-Topete R, Reyes E, Baez-Martínez R, Ponce de León S. 1999. An epidemic outbreak of *Malassezia* folliculitis in three adult patients in an intensive care unit: a previously unrecognized nosocomial infection. Int J Dermatol. 38: 453-456.
6. Arenas R. 1996. Dermatología: atlas, diagnóstico y tratamiento. McGraw Hill Interamericana. México.
7. Arenas R. 2003. Micología Médica Ilustrada. Mc-Graw-Hill Interamericana. México
8. Aspiroz C, Moreno LA, Rezusta A, Rubio C. 1999. Differentiation of three biotypes of *Malassezia* species on human normal skin. Correspondence with *M. globosa*, *M. sympodialis* and *M. restricta*. Mycopathologia. 145: 69-74.
9. Aspiroz C, Ara M, Varea M, Rezusta A, Rubio C. 2001. Isolation of *Malassezia globosa* and *M. sympodialis* from patients with pityriasis versicolor in Spain. Mycopathologia. 154: 111-117.
10. Begerow D, Bauer R. 2000. Phylogenetic placements of ustilagomycetous anamorphs as deduced from nuclear LSU rDNA sequences. Mycol Res. 104: 53-60.
11. Beneke J. 1996. Medical Mycology and Human Mycoses. Star Publishing company. Korea.

12. Boekhout T, Renting M, Scheffers WA, Bosboom R. 1993. The use of karyotyping in the systematics of yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 63: 157-163.
13. Bonifaz A. 1998. *Micología Médica Básica*. Ed. Méndez Cervantes. México.
14. Carbajosa J, Vega E, Álvarez L, Ocejo D, Toussaint S, Rodríguez G, Arenas R. 1995. ¿Cuál es la relación de *Pityrosporum ovale* con la papilomatosis reticulada y confluyente de Gougerot y Carteaud? *Dermatol Rev Mex* 39: 265-267.
15. Crespo V, Ojeda A, Vera A, Crespo A, Sánchez F. 1999. Aislamiento e identificación de *Malassezia spp* en pitiriasis versicolor, dermatitis seborreica y piel sana. *Rev Iberoam Micol* 16: S16-S21
16. Crespo V, Delgado V. 2002. *Malassezia* species in skin diseases. *Curr Opin Infect Dis*. 15: 133-142.
17. Crespo V, Ojeda A, Vera A, Crespo A, Sánchez E. 2000. *Malassezia globosa* as the causative agent of pityriasis versicolor. *Br J Dermatol*. 143: 799-803.
18. Cunningham AC, Ingham E, Gowland G. 1992. Humoral responses to *Malassezia furfur* serovars A, B and C in normal individuals of various ages. *Br J Dermatol*. 127: 476-481.
19. Escobar ML, Carmona-Fonseca J, Santamaría L. 1999. Onicomycosis por *Malassezia*. *Rev Iberoam Micol* 16: 225-229.
20. Faergemann J. 1997. *Pityrosporum* yeasts – what's new?. *Mycoses*. 40: 29-32
21. Faergemann J, Aly R, Maibach HI. 1983. Adherence of *Pityrosporum orbiculare* to human stratum corneum cells. *Arch Dermatol Res*. 275: 246-250
22. Faergemann J. 1999. *Pityrosporum* species as a cause of allergy and infection. *Allergy*. 54: 413-419.
23. Fell JW, Boekhout T, Fonseca A, Scorzetti G, Statzell-Tallman A. 2000. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by

- large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int J Syst Evol Microbiol.* 50: 1351-1371.
24. Gonzales-Cuevas A, Alayeto J, Juncosa T, Garcias-Fructuoso MT, Moreno J, Latorre C. 1999. Sepsis neonatal por *Malassezia furfur*. *Rev Iberoam Micol.* 16: 157-160.
  25. Guého E, Meyer SA. 1989. A reevaluation of the genus *Malassezia* by means of genome comparison. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 55: 245-251.
  26. Guého E, Simmons RB, Pruitt WR, Meyer SA, Ahearn DG. 1987. Association of *Malassezia pachydermatis* with systemic infections of humans. *J Clin Microbiol.* 25: 1789-1790.
  27. Guého E, Midgley G, Guillot J. 1996. The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie van Leeuwenhoek.* 69: 337-355.
  28. Guillot J, Guého E, Chermette R. 1995 Confirmation of the nomenclatural status of *Malassezia pachydermatis*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 67: 173-176.
  29. Guillot J, Guého E. 1995. The diversity of *Malassezia* yeasts confirmed by rRNA sequence and nuclear DNA comparisons. *Antonie van Leeuwenhoek.* 67: 297-314.
  30. Guillot J, Guého E, Lesourd M, Midgley G, Chévrier G, Dupont B. 1996. Identificación of *Malassezia* species, a practical approach.. *J Mycol Med.* 6: 103-110.
  31. Gupta A, Kohli Y, Summerbell R, Faergemann J. 2001. Quantitative culture of *Malassezia* species from different body sites of individuals with or without dermatoses. *Med Mycol.* 39: 243-251.
  32. Gupta AK, Kohli Y, Faergemann J, Summerbell RC. 2001 Epidemiology of *Malassezia* yeasts associated with pityriasis versicolor in Ontario, Canada. *Med Mycol.* 39: 199-206
  33. Herrera T., & Ulloa M. 1998. El Reino de los Hongos, Micología básica y aplicada. 2ª. ed. Fondo de cultura económica, México.
  34. Heymann W, Wolf D. 1986. *Malassezia (Pityrosporum)* folliculitis occurring during pregnancy. *Int J Dermatol.* 25: 49-51.

35. Isa R, Cruz AC, Arenas R, Duarte Y, Linares CM, Bogaert H. 2001. Pitiriasis versicolor en lactantes. Estudio de 92 casos. Rev Iberoam Micol 18: 109-112.
36. Janaki C, Sentamilselvi G, Janaki VR, Boopalraj JM. 1997. Unusual observations in the histology of pityriasis versicolor. Mycopathologia. 139: 71-74.
37. Kieffer M, Bergbrant IM, Faergemann J, Jemec GB, Ottevanger V, Stahl Skov P, Svejgaard E. 1990. Immune reactions to *Pityrosporum ovale* in adult patients with atopic and seborrheic dermatitis. J Am Acad Dermatol. 22: 739-742.
38. Long JG, Keyserling HL. 1985. Catheter-related infection in infants due to an unusual lipophilic yeast--*Malassezia furfur*. Pediatrics. 76: 896-900.
39. Macotela E, López R, Mejorada A, Carmona A. 1987. Papel patógeno de *Pityrosporum ovale* en la dermatitis seborreica y pitiriasis versicolor. Gaceta Médica de México. 123: 187-191.
40. Marcon MJ, Powell DA. 1992. Human infections due to *Malassezia spp.* Clin Microbiol Rev. 5: 101-119.
41. Mickelsen PA, Viano-Paulson MC, Stevens DA, Diaz PS. 1988. Clinical and microbiological features of infection with *Malassezia pachydermatis* in high-risk infants. J Infect Dis. 157: 1163-1168.
42. Midgley G. 1989. The diversity of *Pityrosporum (Malassezia)* yeasts in vivo and in vitro. Mycopathologia 106: 143-153.
43. Midgley G. 2000. The lipophilic yeasts: state of the art and prospects. Med Mycol. 38: 9-16.
44. Moreno G. 2000. Dermatitis atópica. Alergol Inmunol Clin. 15: 279-295.
45. Nakabayashi A, Sei Y, Guillot J. 2000. Identification of *Malassezia* species isolated from patients with seborrheic dermatitis, atopic dermatitis, pityriasis versicolor and normal subjects. Med Mycol. 38: 337-341.
46. Ran Y, Yoshiike T, Ogawa H. 1993. Lipase of *Malassezia furfur*: some properties and their relationship to cell growth. J of Med Vet Mycol. 31: 77-85

47. Randjandiche M. 1975. Occurrence of *Pityrosporum ovale* in the human ear. *Dermatologica*. 151: 100-103.
48. Randjandiche M. 1981. Présence de *Pityrosporum ovale* dans l'oreille de nouveau-nés. *Sabouraudia*. 19: 143-145.
49. Rapelanoro R, Mortureux P, Couprie B, Maleville J, Taieb A. 1996 Neonatal *Malassezia furfur* pustulosis. *Arch Dermatol*. 132: 190-193.
50. Ricci G. 2001. Ceramidas e outros lipídios encontrados na pele humana. *Int J Pharm Comp*. 3: 94-97.
51. Rippon J. 1982. *Medical Mycology. The Pathogenic Fungi and The Pathogenic Actinomycetes*. 2a. Ed. W. B. Saunders, Filadelfia.
52. Roberts SO, Lachapelle JM. 1969. Confluent and reticulate papillomatosis (Gougerot-Carteaud) and *Pityrosporum orbicular*. *Br J Dermatol*. 81: 841-845.
53. Schechtman RC, Midgley G, Bingham JS, Hay RJ. 1995. Adherence of *Malassezia* isolates to human keratinocytes in vitro - a study of HIV-positive patients with seborrhoeic dermatitis. *Br J Dermatol*. 133: 537-541.
54. Shuster S. 1984. The aetiology of dandruff and the mode of action of therapeutic agents. *Br J Dermatol*. 111: 235-242.
55. Simmons RB, Guého E. 1990. A new species of *Malassezia*. *Mycol. Res*. 94: 1146-1149.
56. Sloof W. 1970. Genus 6: *Pityrosporum* Sabouraud. En: *The Yeasts, a Taxonomic Study* 2<sup>nd</sup> ed. North-Holland, Amsterdam.
57. Stenderup A. 1986. Ecology of yeast and epidemiology of yeast infections. *Acta Derm Venereol Suppl*. 121: 27-37.
58. Sugita T, Takashima M, Shinoda T, Suto H, Unno T, Tsuboi R, Ogawa H, Nishikawa A. 2002. New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. *J Clin Microbiol*. 40: 1363-1367.
59. Van Abbé N. 1964. The investigation of dandruff. *J Soc Cosmetic Chemist*. 15: 609-30.

60. Van Belkum A, Boekhout T, Bosboom R. 1994. Monitoring spread of *Malassezia* infections in a neonatal intensive care unit by PCR-mediated genetic typing. *J Clin Microbiol.* 32: 2528-2532.

## 11. Anexos

### Anexo 1.1

#### • Agar Dixon Modificado

Extracto de Malta	36 g
Peptona	6 g
Bilis disecada de Buey (Bacto-oxgall)	20 g
Agar bacteriológico	12 g
Tween 40	10 ml
Glicerol	2 ml
Ácido oleico	2 ml
Agua destilada	1000 ml

#### Cloranfenicol

- Suspender el extracto de malta, la peptona, la bilis disecada de buey, el agar bacteriológico en el agua destilada y mezclar.
- Calentar y hervir con agitación frecuente hasta disolver completamente.
- Retirar y adicionar el Tween 40, el glicerol, el ácido oleico y mezclar.
- Esterilizar a 121°C por 15 minutos.
- Adicionar antibiótico cuando el medio se encuentre a 50 °C.
- Distribuir en cajas petri en condiciones estériles.

### Anexo 1.2

#### • Caldo Dixon Modificado

Extracto de Malta	36 g
Peptona	6 g
Bilis disecada de Buey (Bacto-oxgall)	20 g
Tween 40	10 ml
Glicerol	2 ml
Ácido oleico	2 ml
Agua destilada	1000 ml

## Cloranfenicol

- Suspender el extracto de malta, la peptona y la bilis disecada de buey en el agua destilada y mezclar.
- Calentar y hervir con agitación frecuente hasta disolver completamente.
- Retirar y adicionar el Tween 40, el glicerol, el ácido oleico y mezclar.
- Esterilizar a 121°C por 15 minutos.
- Adicionar antibiótico cuando el medio se encuentre a 50 °C.
- Distribuir en matraces o frascos de 100ml en condiciones estériles.

## Anexo 1.3

### • Agar Urea de Christensen

#### Solución A:

Base de urea (DIFCO)	29 g
Agua destilada	100 ml

- Disolver la base de urea en 100ml de agua destilada y mezclar perfectamente
- Esterilizar por filtración milipore con membranas de 0.45µm.

#### Solución B:

Agar-agar (Bioxon)	15 g
Agua destilada	900 ml

- Suspender el agar en agua destilada, hervir hasta disolver.
- Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.
- Enfriar a 50°C.
- Combinar asépticamente ambas soluciones.
- Distribuir en tubos estériles 2ml.
- Enfriar a temperatura ambiente en posición inclinada.

#### Anexo 1.4

- **Agar de Dextrosa Sabouraud adicionado con antibióticos (para prueba de Tweens)**

Agar dextrosa Sabouraud con antibioticos	36 g
Agua destilada	1000 ml
Tween 20, 40, 60 y 80	

#### Suspensión de levaduras

- Suspender el agar de dextrosa Sabouraud con antibioticos en el agua destilada y mezclar.
- Calentar y hervir con agitación frecuente hasta disolver completamente.
- Distribuir 16ml en tubos de ensaye.
- Esterilizar a 121°C por 15 minutos.
- Estabilizar la temperatura a 50°C
- Adicionar la suspensión de levaduras a cada tubo
- Distribuir en cajas petri en condiciones estériles.
- Hacer cuatro pozos de 2mm y agregar 5µl de cada Tween.

#### Anexo 1.5

- **Agar DIXON® (Van Abbe, 1964)**

Extracto de malta	36 g
Agar Bacteriológico	15 g
Bilis disecada de buey	20 g
Peptona micológica	6 g
Tween 40	10 ml
Glicerol mono-oleato	2.5 ml

- Suspender el extracto de malta, la peptona, la bilis disecada de buey, el agar bacteriológico en el agua destilada y mezclar.
- Calentar y hervir con agitación frecuente hasta disolver completamente.
- Retirar y adicionar el Tween 40 y el glicerol. Mezclar.
- Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

- Distribuir en cajas petri en condiciones estériles.

## **Anexo 1.6**

- **Tinción de Gram**

Cristal violeta

Lugol

Alcohol-acetona

Safranina

- Realizar un frotis con el cultivo, y fijar directamente a la flama.
- Teñir con cristal violeta durante 1 minuto
- Retirar el exceso de colorante con agua.
- Cubrir la preparación con lugol durante 1 minuto.
- Enjuagar el frotis rápidamente con alcohol-acetona.
- Teñir de contraste con safranina durante 30 segundos.
- Lavar ligeramente con agua y dejar secar.