



***GENOTIPIFICACIÓN DE *Malassezia furfur* ATÍPICA Y UNA APROXIMACIÓN
DE POTENCIALES INHIBIDORES DE CRECIMIENTO***

DIANA CATALINA ROJAS PADILLA

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ D.C. 2018**



**GENOTIPIFICACIÓN DE *Malassezia furfur* ATÍPICA Y UNA APROXIMACIÓN
DE POTENCIALES INHIBIDORES DE CRECIMIENTO**

VILMA YAMILE MARTÍNEZ GRANADOS

Asesor interno

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

ADRIANA MARCELA CELIS RAMÍREZ M.Sc. Ph.D.

Asesor externo

Universidad de los Andes

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ D.C. 2018**

DEDICATORIA

A mis padres, Angélica Padilla y Gabriel Rojas por apoyarme incondicionalmente en lo recorrido de este proceso, a mi abuela por ser ese apoyo en mi vida y por darme fuerzas cada día de mi vida, a mis hermanos y toda mi familia por su apoyo. A Julián gracias por acompañarme en todo el proceso de mi carrera profesional, por motivarme siempre a dar lo mejor de mí y alegrarme en cada momento por más difícil que fuera.

A mis amigos, sin ellos la universidad no habría sido lo mismo, por estar en los momentos alegres y difíciles, de cada uno de ellos me llevo lo mejor.

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo agradezco a Dios, por permitirme realizar este trabajo. A mi familia por ser el motor de mi vida, mi fortaleza y mi apoyo.

A la Doctora Adriana Celis, le dio mis gracias infinitas por darme la oportunidad de trabajar y aprender con ella, muchas gracias por su acompañamiento, paciencia y por la dedicación de su tiempo en la realización de este proyecto.

A la Doctora Marcela Guevara, que me guio por todo el camino en la construcción de este trabajo de grado, aprendí demasiado con ella, gracias por el tiempo y la paciencia que dedico en todo el proceso de este trabajo.

A la profesora Vilma Martínez, por darme la oportunidad de que sea mi asesora interna y por todos los conocimientos que adquirí en sus clases.

Agradezco a la Universidad de los Andes y a todas las personas que me colaboraron en este proceso y que hicieron de este trabajo una increíble experiencia para mi vida personal y profesional.

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, por la formación integral y por todos los conocimientos adquiridos durante todos estos años.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	16
1. OBJETIVOS.....	19
1.1 GENERAL.....	19
1.2 ESPECÍFICOS.....	19
2. ANTECEDENTES.....	20
3. MARCO TEÓRICO.....	22
3.1 Taxonomía.....	22
3.2 Características microbiológicas.....	24
3.2.1 Morfología.....	24
3.2.2 Ultraestructura.....	25
3.2.3 Lipidodependencia.....	25
3.2.4 Patogenicidad.....	26
3.2.5 Reproducción.....	27
3.3 Epidemiología y ecología en humanos.....	27
3.4 Identificación.....	29
3.4.1 Condiciones de cultivo.....	29
3.4.2 Pruebas fenotípicas y fisiológicas.....	30
3.4.3 Identificación molecular.....	32
3.5 Tratamiento.....	34
3.6 Pruebas de sensibilidad <i>in vitro</i>	35
3.7 Inhibidores.....	36
3.7.1 Lisina.....	36
3.7.2 Treonina.....	36
4. Diseño metodológico.....	38
4.1 Tipo de investigación.....	38

4.2 Hipótesis.....	38
4.3 Variables e indicadores.....	39
4.4 Técnicas y procedimientos.....	40
4.4.1 Origen de los aislados.....	40
4.4.2 Pruebas fenotípicas y fisiológicas.....	41
4.4.3 Extracción de ADN.....	42
4.4.4 PCR convencional.....	42
4.4.5 Secuenciación.....	43
4.4.6 Ensamblaje de secuencias.....	44
4.4.7 Alineamientos múltiples.....	44
4.4.8 Análisis filogenético.....	44
4.4.9 Pruebas de sensibilidad antifúngica <i>in vitro</i>	45
4.4.9.1 Preparación del inóculo.....	45
4.4.9.2 Preparación de las diluciones del antifúngico y de los inhibidores Sensibilización de las placas.....	46
4.4.9.3 Técnica de Macrodilución.....	46
5. RESULTADOS.....	49
5.1 Caracterización morfológica y fisiológica.....	49
5.2 Identificación molecular.....	56
5.2.1 PCR.....	57
5.2.2 Análisis filogenético.....	58
5.3 Sensibilidad de los inhibidores.....	59
5.3.1 Técnica de microdilución.....	60
5.3.2 Técnica de macrodilución.....	63
5.3.3 Técnica de difusión en agar.....	64
6. DISCUSIÓN.....	67
7. CONCLUSIONES.....	73
REFERENCIAS	

ANEXOS.....89

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Variables e indicadores del estudio.....	39
Tabla 2. Cepas de <i>Malassezia furfur</i> incluidas en este estudio.....	41
Tabla 3. Programas y ciclos térmicos utilizados para la amplificación.....	43
Tabla 4. Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación.....	43
Tabla 5. Morfología micro y macroscópica en Agar Dixonm de las cepas de <i>M. furfur</i> evaluadas en el estudio.....	49
Tabla 6. Características fisiológicas de <i>Malassezia</i> spp., incluidas en este estudio. * Cepas con patrón atípico.....	50
Tabla 7. Orden de inoculación en las microplacas.....	60
Tabla 8. Sensibilidad <i>in vitro</i> de <i>Malassezia</i> spp y <i>Candida</i> spp a Anfotericina B, L-lisina y L-treonina.....	62

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general de la metodología del estudio.....	40
Figura 2. Procedimiento técnica de macrodilución de L-lisina y L-treonina.....	47
Figura 3. Pruebas ureasa positiva de las cepas de <i>M. furfur</i>	50
Figura 4. Patrones de asimilación de Tween y Cremophor de las cepas de referencia de <i>M. furfur</i>	51
Figura 5. Patrones de asimilación de Tween y Cremophor cepas atípicas <i>M. furfur</i>	52
Figura 6. Crecimiento de <i>M. furfur</i> en agar Sabouraud con 10% de Tween 20 y 0.1% de Tween 80.....	53
Figura 7. Crecimiento de <i>M. furfur</i> atípicas en agar Sabouraud con 10% de Tween y 0.1% de Tween 80.....	53
Figura 8. Crecimiento de <i>M. furfur</i> atípicas en agar Sabouraud con 10% de Tween y 01% de Tween 80.....	54
Figura 9. Crecimiento y producción de pigmento en agar triptófano, cepas de referencia de <i>M. furfur</i>	55

Figuras 10 y 11. Crecimiento y producción de pigmento en agar triptófano, de las cepas atípicas de <i>M. furfur</i>	55, 56
Figura 12. Gel de agarosa 1.5% del producto de amplificación de ITS y LSU.....	57
Figura 13. Gel de agarosa 1.5% del producto de amplificación del gen RPB2.....	58
Figura 14. Árbol filogenético construido con verosimilitud, se incluyen las especies de <i>Malassezia</i> , inferido con las secuencias de RPB2.....	59
Figura 15. Resultado de placas sensibilizadas con Anfotericina B e inoculadas con <i>Malassezia</i> spp y <i>Candida</i> spp.....	60
Figura 16. Resultado de placas sensibilizadas con L-lisina e inoculadas con <i>Malassezia</i> spp y <i>Candida</i> spp.....	61
Figura 17. Resultado de placas sensibilizadas con L-treonina e inoculadas con <i>Malassezia</i> spp y <i>Candida</i> spp.....	62
Figura 18. Macrodilución de L-lisina y L-treonina. A. <i>M. furfur</i> CBS 1878, B. <i>M. furfur</i> CBS 6094, C. <i>M. furfur</i> 13MC, D. <i>M. pachydermatis</i> CBS 1878, E. <i>C. krusei</i> ATCC 6258, F. <i>M. furfur</i> 4DS.....	64
Figura 19. Prueba de sensibilidad de L-lisina, difusión en agar Dixon de las cepas de referencia de <i>M. furfur</i>	65

Figura 20. Prueba de sensibilidad de L-lisina, difusión en agar Dixon de las cepas atípicas de *M.*

furfur.....65

Figura 21. Prueba de sensibilidad de L-treonina, difusión en agar Dixon de las cepas de referencia de *M.*

furfur.....66

Figura 22. Prueba de sensibilidad de L-treonina, difusión en agar Dixon de *M.*

furfur

atípica.....66

Figura 23. Esquema de diluciones intermedias. A. Anfotericina B (Diluyente DMSO). B. Inhibidores L-lisina y L-treonina (Diluyente Caldo

Urea).....91

Figura 24. Esquema de montaje sensibilización en microplacas de 96 pozos de fondo redondo con Anfotericina B y los inhibidores (L-lisina L-

treonina).....93

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de extracción de ADN.....	84
Anexo 2. Protocolo de preparación de las diluciones del antifúngico y de los inhibidores.....	86
Anexo 3. Sensibilización de microplacas.....	87



UNIVERSIDAD COLEIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

**GENOTIPIFICACIÓN DE *Malassezia furfur* ATÍPICA Y UNA APROXIMACIÓN
DE POTENCIALES INHIBIDORES DE CRECIMIENTO**

RESUMEN

Malassezia hace parte de la micobiota normal de la piel de humanos y animales de sangre caliente; son levaduras lipofílicas y lípido-dependientes, relacionadas con entidades dermatológicas e infecciones sistémicas. Actualmente, el género incluye 18 especies, entre las cuales se puede destacar a: *M. globosa*, *M. restricta*, *M. furfur*, *M. sympodialis* como las especies con mayor frecuencia aisladas a partir de pacientes con enfermedades como, pitiriasis versicolor, caspa, dermatitis seborreica, dermatitis atópica, foliculitis, psoriasis y *M. pachydermatis* en otitis y dermatitis en animales domésticos. Debido a la presentación de tipo crónico de estas enfermedades y al uso recurrente de compuestos antifúngicos, que está relacionado con fallas terapéuticas, hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas para su tratamiento. El objetivo de este estudio fue caracterizar

fenotípica y molecularmente ocho cepas de *M. furfur* con patrón de asimilación de Tween 80 atípico (diferente). Además de evaluar su sensibilidad *in vitro* a dos inhibidores, usando los métodos de microdilución en placa (M27-A3CLSI, modificada), macrodilución (M27-A3) y difusión en agar (M44-A). En general, nuestros resultados de caracterización morfológica y fisiológica confirmaron el patrón atípico. Los análisis filogenéticos multilocus permitieron verificar la posición filogenética de nuestros aislados al formar un clado independiente dentro del complejo de *M. furfur*, utilizando las secuencias de ITS y LSU. Además, el análisis con el fragmento de RPB2 indica que nuestros aislados son potencialmente una nueva especie dentro del género con una distancia filogenética de aproximadamente 6% con cepas de *M. furfur*. En la sensibilidad antifúngica *in vitro* con los inhibidores Lisina y Treonina, no se observó inhibición en los ensayos de sensibilidad.

Palabras clave: *M. furfur* atípica, sensibilidad antifúngica, filogenia, Lisina, Treonina.

INTRODUCCIÓN

Las levaduras del género *Malassezia* pertenecen al phylum *Basidiomycota* y se caracterizan por su lipofilia y lipodependencia. Hacen parte de la microbiota normal de la piel en humanos y algunos animales¹. A pesar de su estatus dentro del microbioma humano, en ocasiones *Malassezia* puede proliferar en exceso y se relaciona con el establecimiento e inicio de diferentes entidades dermatológicas². Sin embargo, algunas de las especies como, *M. furfur* y *M. pachydermatis* han sido reportadas en casos de infecciones sistémicas en pacientes inmunosuprimidos con alimentación parenteral suplementada con lípidos³.

En Colombia Rincón *et al.*, reportaron que *M. globosa*, *M. sympodialis* y *M. furfur* son las especies más frecuentemente aisladas, sin embargo también encontraron la presencia de aislados que no pudieron ser identificados a nivel de especie⁵. Posteriormente la caracterización molecular reveló que formaban un clado filogenéticamente relacionado con *M. furfur*, a pesar de presentar características fisiológicas diferentes; por lo tanto, fueron etiquetados como *M. furfur* atípica⁵. *M. furfur* es una especie altamente variable, Wu *et al.*, en 2015 sugirieron la presencia de un complejo de esta especie⁶. Posteriores análisis filogenéticos permitieron establecer la relación de la cepa atípica *M. furfur* 4DS con *M. furfur* CBS 7982 dentro de este complejo, sin embargo, mantenían una relación lejana con otras cepas de esta especie⁷. Todos estos hallazgos sugieren la presencia de una nueva especie en el complejo de *M. furfur*. El Grupo de Investigación Celular y Molecular de Microorganismos Patógenos de la Universidad de los Andes (CeMoP) ha realizado diferentes acercamientos con el fin de esclarecer el estatus de *M. furfur* atípica como: estudios fisiológicos, secuenciación de genomas, reconstrucción metabólica y análisis de balance de flujo, proteómica y lipidómica así como también evaluación en modelo murino^{7,9}.

Teniendo en cuenta lo anterior, es necesario revisar la posición filogenética de estas cepas mediante una aproximación molecular usando genes ribosomales: los espaciadores transcritos internos (ITS), 5.8S y la región D1/D2 del 28S de la subunidad grande (LSU) y del gen que codifica para la segunda subunidad mayor de la ARN polimerasa II (RPB2), usados actualmente para la identificación a nivel de especie de ciertos grupos de hongos⁸, que permitan confirmar si estas cepas corresponden a *M. furfur* o por el contrario si pueden ser considerados como una nueva especie dentro del género.

Adicionalmente, el interés de las especies del género *Malassezia* está relacionado con su relevancia clínica, el uso frecuente de compuestos antifúngicos para su tratamiento y la emergencia de resistencia. En un estudio anterior de Rojas F *et al.*, en 2014, se determinó la sensibilidad antifúngica *in vitro* de *M. furfur*, *M. globosa* y *M. sympodialis*, frente a diferentes antifúngicos. Se observó que *M. furfur* tenía los valores de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) más altos para los antifúngicos fluconazol, ketoconazol, miconazol, voriconazol, itraconazol y anfotericina B¹⁰. Leong C *et al.*, en 2017, describieron la resistencia intrínseca debido los altos valores de CMI de varias especies de *Malassezia* spp., para equinocandinas¹¹. Dada la alta variabilidad en el perfil de sensibilidad frente a los antifúngicos y a los posibles efectos tóxicos de estos compuestos en el hospedero, es necesario candidatizar nuevas moléculas para el tratamiento de las enfermedades relacionadas con esta levadura. Previamente el CeMoP había postulado dos aminoácidos (Lisina y Treonina) con potencial inhibitorio en el crecimiento de *Malassezia* spp. Debido a la capacidad que estos tienen para inhibir la Homocitrato Sintasa y Homoserina Deshidrogenasa, enzimas clave en el metabolismo de microorganismos^{12, 13}

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto surgen las siguientes preguntas de investigación:

¿*M. furfur* atípica puede ser una potencial especie nueva dentro de este género de levaduras lípidodependientes?

¿Serán Lisina y Treonina inhibidores del crecimiento de los aislados atípicos de *M. furfur* y potenciales candidatos terapéuticos?

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Revisar la posición taxonómica y filogenética de aislados identificados como *Malassezia furfur* atípica y evaluación de potenciales inhibidores.

1.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Caracterizar fenotípica y molecularmente aislados de *M. furfur* atípica.
- Determinar las relaciones filogenéticas de *M. furfur* atípica con cepas de referencia de *M. furfur* mediante análisis multilocus de secuencias.
- Evaluar la actividad antifúngica *in vitro* de los potenciales inhibidores Lisina y Treonina, frente a *M. furfur* atípica.

2. ANTECEDENTES

Debido a la lipiodependencia y lipofilia del género *Malassezia* el conocimiento acerca de aspectos relacionados con su epidemiología, ecología y procesos de interacción con el hospedero se han visto retrasados. Sin embargo en las últimas décadas se han llevado a cabo diversos acercamientos que han permitido avanzar en la comprensión de la relación de su estatus como parte de la micobiota normal.

Este género de levaduras ha sido objeto de diversas re evaluaciones taxonómicas y desde los 90's, con la implementación de técnicas moleculares se condujo a la explosión en el número de especies descritas, siendo tan solo siete especies para 1996, número que aumento a 18 en este último año¹.

La epidemiología de *Malassezia* difiere de acuerdo a diversos factores entre ellos características geográficas, étnicas, relacionados con la edad entre otros¹. En Colombia, son pocos los estudios realizados de diversidad de especies de *Malassezia*. Uno de los principales trabajos fue realizado por Rincón *et al.*, en 2005 quienes identificaron las especies más frecuentes a partir de pacientes con lesiones dermatológicas e individuos sanos. Las especies más frecuentemente aisladas fueron *M. globosa*, *M. sympodialis*, *M. furfur* y *M. restricta*, siendo *M. globosa* la especie más frecuentemente aislada a partir de pacientes con pitiriasis versicolor y dermatitis seborreica. También se reportó la presencia de siete aislados que fueron etiquetados como *Malassezia* spp., debido a que en la identificación fenotípica se observó un patrón atípico de asimilación de Tween que no correspondía a ningún patrón anteriormente descrito⁴, posteriores estudios revelaron su relación con el género *M. furfur*, sin embargo, evidencia posterior sugiere que corresponde a una nueva especie.

Otros estudios han permitido evidenciar diferencias importantes en *M. furfur* atípica. Triana *et al.*, en 2017, llevaron a cabo la secuenciación de genomas, reconstrucción metabólica y análisis de balance de flujo de las especies *M. furfur*, *M. furfur* atípica, *M. globosa*, *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, demostrando diferencias genómicas y metabólicas importantes entre estas especies⁷. El tamaño del genoma de *M. furfur* (14.9 Mpb) y de *M. furfur* atípica (10.3 Mpb) es de casi el doble al reportado para las otras especies que se encuentra aproximadamente entre 7.0 y 9.0 Mpb^{6, 7}, sugiriendo posibles fenómenos de hibridación que pudieran dar lugar a la presencia de nuevas especies.

A nivel metabólico *M. furfur* atípica presenta un mayor número de reacciones relacionadas con el metabolismo de los lípidos comparado con *M. furfur* y entre ellas con las otras especies, denotando su versatilidad metabólica. Se encontraron un mayor número de reacciones relacionadas con el metabolismo del ácido araquidónico, precursor de compuestos eicosanoides como prostaglandinas y leocotrienos. Además de diferencias en el número de reacciones relacionadas con síntesis, elongación y degradación de ácidos grasos⁷.

M. furfur atípica también presenta diferencias a nivel de su lipidoma que permiten separarla de *M. furfur*, con un contenido de Triglicéridos (C:16, C:18) y fosfatidilcolinas diferente (Datos no publicados).

Dada su relación con diversas entidades dermatológicas y fungemia, establecer tratamientos apropiados para controlarla de forma eficiente y sin causar efectos secundarios en el hospedero, debido su estatus como comensal es fundamental. Estudios previos de Camelo *et al.*, en 2017, demostraron la capacidad de Lisina para actuar como un posible inhibidor de la producción de biomasa de *M. pachydermatis*. Mediante un tamizaje *in silico* a través de una aproximación basada en *docking* molecular se puede predecir que la L-lisina es un inhibidor competitivo de la enzima homocitrato sintasa¹². Por otra parte Rodríguez *et al.*, candidatizó a L-treonina como un posible candidato de inhibición frente a *M. furfur*, dado que este aminoácido actúa como un inhibidor competitivo frente al etanol (sustrato) sobre la actividad enzimática de Homoserina deshidrogenasa¹³.

MARCO TEÓRICO

3.1 Taxonomía

En 1846, Eichstedt describió la presencia de células levaduriformes a partir de muestras de pacientes con Pitiriasis versicolor (PV) ¹⁴. No obstante, en 1853 Robin designó el nombre de “*Microsporon furfur*” al ver células con morfología redondeada en pacientes con escamas dérmicas¹⁵. En el mismo año (1853), Malassez describió estas mismas células levaduriformes reproduciéndose en la capa más superficial de la epidermis de pacientes con afecciones en la piel, pero fue hasta el año 1889 que Baillon designó el género como *Malassezia* en honor a Malassez y el nombre “*Microsporon furfur*” fue cambiado por *Malassezia furfur*¹⁵.

Sabouraud en 1904, se refirió a dos morfologías diferentes: describió el género *Pityrosporum malassezi* para referirse a las levaduras que no formaban filamentos en escamas de pacientes con Dermatitis Seborreica (DS); y sostuvo el nombre de *Malassezia furfur* a las levaduras que formaban filamentos en escamas de piel con lesiones correspondientes a Pitiriasis Versicolor (PV) ¹⁶. Para hacer más compleja la nomenclatura del género, Castellani y Chalmers, en 1913, separaron en dos especies las levaduras por su morfología variable, además de lograr por primera vez el crecimiento en el laboratorio de este microorganismo; nombraron *P. ovale* a las levaduras con morfología oval, mientras que Gordon en 1951 llamó *P. orbiculare* a las levaduras con forma esférica¹⁷.

A partir de muestras obtenidas en la piel de rinoceronte, Weidman en 1925, logró aislar levaduras que crecían sin suplementación de ácidos grasos, a las cuales nombró *P. pachydermatis*¹⁸.

Pero fue en 1986 cuando la Comisión Internacional para la Taxonomía de Hongos decidió dejar un solo nombre válido (*Malassezia*) para referirse a estas

levaduras, aceptando dos especies en el género: *M. furfur*, asociada a humanos, y *M. pachydermatis*, asociada a animales¹⁹.

En la década de los 90 Simmons y Guého, describieron una nueva especie lipofílica designada como *M. sympodialis*. Guillot y Guého, secuenciaron y estudiaron el ADNr, incluyendo además el estudio de criterios morfológicos y fenotípicos describiendo cuatro especies nuevas: *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta* y *M. slooffiae*²⁰.

Sugita *et al.*, mediante el estudio de las secuencias del ADNr (Regiones ITS y D1/D2), describieron las especies *M. dermatis* (2002), *M. japónica* (2003), *M. yamatoensis* (2004)^{21, 22, 23}.

El grupo de investigación de Hirai en 2004, describió una nueva especie, pero esta vez en animales proveniente de un aislado de un gato japonés con otitis externa, comparándolo con aislados de ganado vacuno de Brasil; describiendo a *Malassezia nana* por medio de secuenciación de ADNr de la subunidad 26S y del ITS1²⁴.

Cabañes *et al.*, en el año 2006, describieron dos nuevas especies provenientes de aislados de animales; *M. caprae* aislada de piel sana principalmente de cabras y *M. equina* aislada principalmente de caballos, se realizó la descripción por medio de análisis comparativos de marcadores moleculares¹⁵. El mismo autor describió por métodos moleculares otras tres especies asociadas a animales, *M. cuniculi* (Piel de conejo) en el año 2011, *M. brasiliensis* (Loro) y *M. psittaci* (Loro) en 2016^{25, 26, 27}.

Honnavar *et al.*, en 2016, describieron *M. arunalokei* a partir de aislados clínicos de pacientes en la India con Dermatitis Seborreica; y caracterizó la nueva especie por técnicas moleculares como amplificación y secuenciación de las

regiones D1/D2 del ADNr 26S²⁸. La última especie aceptada dentro del género fue descrita por Lorch *et al.*, en 2018, como *M. vespertilinois*, la cual fue aislada a partir de muestras de piel de murciélagos en Estados Unidos²⁹. Esta nueva especie se caracteriza principalmente por crecer en un amplio rango de temperatura (7-40°C), teniendo un crecimiento óptimo a 24 °C²⁹ y es la última especie aceptada a la fecha.

En la actualidad el género *Malassezia* se encuentra clasificado dentro del phylum *Basidiomycota*, Subphylum *Ustilaginomycotina*, clase *Malasseziomycetes*, orden *Malasseziales*, familia *Malasseziaceae*. Actualmente incluye un total de 18 especies¹.

3.2. Características microbiológicas

Las especies de este género presentan características fenotípicas únicas dentro del grupo de levaduras y de los hongos en general. Entre ellas se destacan la composición de su pared celular, morfología, requerimiento de lípidos, y su reproducción.

3.2.1 Morfología

Las colonias macroscópicas del género *Malassezia* spp., en agar Dixon modificado, pueden ser variables, observándose colonias pequeñas o de diferentes tamaños dependiendo la especie, de color blanquecino a marrón, lisas o ligeramente rugosas umbilicadas, de textura cremosa o friable, planas o convexas, umbonadas, brillantes u opacas, con bordes lobulados o lisos³⁰. Micromorfológicamente, pueden variar dependiendo la especie, de ovaladas a esféricas o cilíndricas de 2-4 µm de largo por 1-2 µm de ancho aproximadamente; debido a su reproducción monopolar le da una característica de huella de zapato, también pueden tener forma de botella³¹.

3.2.2 Ultraestructura

La pared celular de *Malassezia* spp., se caracteriza por ser más gruesa de lo normal que en otros hongos; puede cambiar dependiendo la especie, pero aproximadamente el rango es de 0,5µm a 1,1µm; está compuesta por varias capas, lamela externa, una pared multicapa y membrana plasmática. Los componentes de esta pared son: carbohidratos (70%), proteínas (10%), lípidos (15 a 20%) y quitina (1 a 2%) con bajas cantidades de sulfuro y nitrógeno. Con relevancia a la cantidad de lípidos que presentan a diferencia de otras levaduras como *Saccharomyces* que es de aproximadamente 1 a 2 %. Esto le podría conferir resistencia a factores externos como cambios osmóticos, fuerzas mecánicas³².

3.2.3 Lipidodependencia

En cuanto al genoma, se ha comprobado que las especies del género *Malassezia* carecen de genes que codifican el complejo de enzimas de la Acido-graso-sintasa con lo cual carecen de síntesis *de novo* de ácidos grasos. Esta deficiencia enzimática se compensa con la presencia de genes codificantes para enzimas como lipooxigenasas, esterasas, lipasas y proteasas, lo que explica su capacidad para hidrolizar los lípidos y otros sustratos que tenga en su ambiente y usarlos como fuente de carbono³³. *M. pachydermatis* se consideraba como la única especie no lipidodependiente, ya que es capaz de crecer en medios sin suplementación lipídica como el agar Sabouraud (SDB), pero se demostró la ausencia del gen codificante para el complejo Acido-graso-sintasa además de estudios que demuestran cierto grado de dependencia y es necesario administrar lípidos al medio³⁴. En condiciones de cultivo, en el agar Dixon modificado estos lípidos (Glicerol, Ácido oleico, Tween 40) son proporcionados por el medio³⁰.

El género *Malassezia* se puede encontrar en la capa superficial de la piel obteniendo nutrientes esenciales para su crecimiento sin causar daño alguno; sin embargo, su patogenicidad esta mediada por diferentes factores en el huésped,

daño en la barrera cutánea, estilo de vida, estrés y el microbioma de la piel. Debido a su incapacidad de producir ácidos grasos, *Malassezia* debe obtenerlos a partir del medio de cultivo o de su huésped.

En el sebo de la piel humana se pueden encontrar ácidos grasos como triglicéridos, colesterol, cera, ésteres, escualeno³⁵; para obtenerlos esta levadura, secreta lipasas y fosfolipasas para la síntesis de ácidos grasos. Estas enzimas Faa1, Faa2, Faa3, Faa4, Fat1 tienen una función de translocar esos ácidos grasos al interior de la levadura para utilizarlos en formas diferentes: la primera es realizar síntesis de ácidos grasos en forma de triglicéridos o ésteres de esteroles y almacenarlos en los “lipid droplets” o también conocidos como oleosomas o cuerpos de lípidos, la segunda es realizar betaoxidación para obtener energía inmediatamente y sintetizar otros ácidos grasos que pasarían luego a otras rutas metabólicas^{36, 37}. Estaba descrito y estudiado en *Saccharomyces cerevisiae* que la reacción se llevaba a cabo en el peroxisoma, en el estudio de Triana *et al*, en 2018 de reconstrucción y caracterización del metabolismo de *Malassezia*, demostraron que esas reacciones de betaoxidación probablemente también ocurren en la mitocondria^{7, 36}.

3.2.4 Patogenicidad

Malassezia aprovecha la síntesis de ácidos grasos para formar la capa lipídica de la parte externa de la pared celular. La secreción de enzimas mencionadas anteriormente³³, en la piel del huésped puede causar inflamación, apoptosis de melanocitos y queratinocitos mediada por la producción de indoles, los cuales son ligandos del receptor de hidrocarburos Aryl (AhR) un regulador transcripcional, que conlleva a la apoptosis celular; además, la inhibición de tirosinasa una enzima importante para la producción de melanina en los melanocitos causando una hipopigmentación^{38, 39}. La patogenicidad y colonización también está relacionada a las propiedades de adherencia que poseen estas levaduras, mediadas por la capa lipídica que se encuentra al exterior de la pared celular, esta

capa también ha sido asociada a la evasión del sistema inmune, disminución de la acción fagocítica y supresión de citoquinas⁴⁰.

3.2.5 Reproducción

Malassezia se reproduce por gemación desde el mismo lugar en un polo (monopolar), blástica y percurrente. La célula hija se desprende de la célula parental, por medio de la formación de un septo. Este desprendimiento deja una cicatriz en la célula parental y tras consecutivas gemaciones se forma un collarete (cicatriz en forma de collar)³⁰.

A la fecha no se ha descrito la fase sexual de *Malassezia* spp. No obstante, algunos reportes indican la presencia de genes MAT (acrónimo en inglés *mating-type*), relacionados con reproducción sexual en los genomas de algunas especies de levaduras^{6, 41}.

3.3 Epidemiología y ecología en humanos

Se ha demostrado en varios estudios la presencia de *Malassezia* en la microbiota de la piel desde el nacimiento^{42, 43}, normalmente se encuentra en lugares del cuerpo en áreas ricas de sebo como: cara, cuero cabelludo y tronco superior. Factores como el género y la edad son clave para la distribución y composición de esta levadura en el cuerpo humano. La presencia de *Malassezia* incrementa en hombres con edades de 15 a 18 años, en mujeres incrementa alrededor de los 10 a 12 años².

Tradicionalmente, *Malassezia* ha sido relacionada como un microorganismo comensal en la piel de los animales que habita, las especies predominantes en la piel humana son *M. globosa* y *M. restricta*, pero también se han detectado otras especies como *M. arunalokei*, *M. furfur*, *M. japónica*, *M. obtusa*, *M. pachydermatis*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis*, *M. yamatoensis*, en ciertas condiciones y cambios en la piel pueden crecer en exceso y convertirse en patógeno oportunista⁴⁴. En

condiciones normales estas levaduras obtienen energía a través de los lípidos de la piel del huésped sin causar enfermedad, pero al presentar cambios o estrés en este ambiente puede proliferar y causar afecciones, como es el caso en cambios morfológicos de los melanocitos sin presentar inflamación en el tejido (Pitiriasis versicolor). En patologías como dermatitis seborreica puede presentarse inflamación del tejido epidérmico sin inducir respuesta inmune específica a diferencia de la dermatitis atópica que si la induce. *Malassezia* también es capaz de provocar inflamación en otros tejidos, causando enfermedades como foliculitis u onicomycosis⁴⁵.

La pitiriasis versicolor es una afección dermatológica que normalmente se presenta en lugares tropicales. Se caracteriza por la hipo o hiperpigmentación de la piel en cuello, brazos, o tronco, sin presencia de inflamación; no es claro totalmente la fisiopatología de esta enfermedad, pero ha sido asociada por la producción de indoles como malassezina, indirubina, indolo, carbazolo y formilindolo carbazol de triptófano, de especies como *M. furfur*, *M. globosa*, *M. sympodialis*^{38, 39}.

La dermatitis seborreica es una enfermedad dermatológica crónica, se caracteriza por la aparición de lesiones eritematosas con descamación y picazón en la piel, suele presentarse en zonas sebáceas como la cara, cuero cabelludo y pecho. Su incidencia en la población sana es del 1-3%, pero la incidencia en pacientes con Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA), es del 30-83%. Las especies más frecuentes y aisladas de estos pacientes son *M. globosa* y *M. restricta*; estas levaduras liberan diferentes enzimas como lipasas, fosfolipasas C y ácido esfingomielinasas que hidrolizan lípidos presentes en la piel del huésped, causando irritación e inflamación en el tejido epidérmico.^{46, 47}

La dermatitis atópica se caracteriza por la presencia de lesiones inflamatorias como eritema, vesículas, pápulas y exudación. Es una enfermedad multifactorial, asociada con disturbios en la barrera de la piel, estrés, alérgenos, estilo de vida,

factores ambientales y genéticos. La especie más aislada en esta patología es *M. sympodialis*^{44, 48}.

La foliculitis causada por *Malassezia* que coloniza e infecta los folículos pilosos, se caracteriza por la aparición de erupciones papulopustulares inflamatorias y pruriginosas, se encuentra normalmente en el tronco superior del cuerpo. La patología ocurre por la hidrólisis de triglicéridos que conduce a una reacción inflamatoria en los folículos pilosos^{48, 49}. Anteriormente ya se había mencionado algunos casos en los que *Malassezia* puede convertirse en un microorganismo oportunista causando fungemia, en pacientes inmunocomprometidos y/o con dispositivos médicos que tienen contacto con emulsiones ricas en lípidos^{50, 51}.

3.4 Identificación

3.4.1 Condiciones de cultivo

Debido a sus requerimientos nutricionales a diferencia de otras levaduras, *Malassezia* crece en medios con suplementación lipídica, el primer cultivo de este género se le otorga a Panja, en 1927, quien logro cultivarla en un medio con base de huevo⁵². El crecimiento óptimo de estas levaduras se logró con la formulación del medio de cultivo modificado de Dixon, modificación realizada por Midgley, este es el medio usado normalmente para el aislamiento de *Malassezia* a partir de muestras previamente inoculadas en soluciones de Tween 80 al 0.5 y se incuban a una temperatura de 32 °C por 2 semanas³⁰. Al obtener crecimiento de colonias compatibles con *Malassezia* se procede a su identificación a nivel de especie por medio de diferentes pruebas fenotípicas y fisiológicas.

3.4.2 Pruebas fenotípicas y fisiológicas

La identificación a nivel de especie y diferenciación fenotípica de *Malassezia* se basa en distintas pruebas bioquímicas. Entre las cuales se incluyen: la actividad

de catalasa, actividad de ureasa, actividad de β -glucosidasa, crecimiento en medio Sabouraud y asimilación de los Tween 20, 40, 60, 80 y Cremophor.

3.4.2.1 Actividad de catalasa

Determina la existencia de la enzima catalasa en la levadura, si es capaz de descomponer el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), en agua (H_2O) y oxígeno (O_2). La prueba se considera positiva al observar la presencia de burbujas. La única especie que no posee la enzima es *M. restricta* y *M. arunalokei*^{20, 28, 53}.

3.4.2.2 Actividad de ureasa

Prueba clave para diferenciar levaduras del Phylum *Basidiomycota* del *Ascomycota*, siendo positivo para los microorganismos basidiomicetos. Las levaduras de este género poseen la enzima ureasa, utilizando el nitrógeno proveniente de la urea, lo hidrolizan, liberando dos moléculas de amoniaco y dióxido de carbono. Estos productos metabólicos alcalinizan el medio, virando el indicador rojo de fenol de amarillo a fucsia⁵³.

3.4.2.3 Actividad de β -glucosidasa

Algunas especies de este género poseen la enzima β -glucosidasa, que es capaz de hidrolizar el enlace glucosídico de la esculina, liberando glucosa y esculineta. La reacción positiva se observa por el viraje del medio a color negro, por efecto de la reacción entre el grupo fenólico de la esculineta y una sal de hierro. Especies como *M. sympodialis* y *M. obtusa* producen una reacción positiva por la actividad de la β -glucosidasa⁵³.

3.2.2.4 Crecimiento en Agar Sabouraud

El crecimiento en agar Sabouraud es una prueba utilizada para la diferenciación de *M. pachydermatis* con las demás especies del género, dado que

esta tiene la capacidad de crecer en este medio de cultivo, al no requerir una fuente lipídica alta a diferencia de las demás especies⁵³.

3.2.2.5 Producción de pigmento en p-agar

Mayser *et al.*, demostraron que *M. furfur* era la única especie con la capacidad de crecer en este medio y producir pigmentos oscuros a partir de la utilización del triptófano como fuente principal de nitrógeno, lo cual es asociado a la patología de pitiriasis versicolor donde se presentan hiperpigmentaciones en las áreas de la lesión causadas por *M. furfur*⁶⁴.

3.2.2.6 Asimilación de Tween y Cremophor EL

La capacidad de *Malassezia* para asimilar suplementos lipídicos como Tween 20, 40, 60, 80, y Cremophor EL, se debe a diferentes enzimas como lipasas e hidrolasas. Cada especie tiene una afinidad diferente por los ésteres de polisorbitano (Tween) y Cremophor EL. Se considera una reacción positiva si después de 5 días de incubación se observa un halo de asimilación alrededor del pozo y una reacción negativa como la ausencia del halo. Por medio de esta prueba, se pueden observar los patrones de asimilación de estos componentes. Se ha descrito que *M. furfur* tiene la capacidad de asimilar todos los Tween y Cremophor^{20, 53, 55}.

3.2.2.7 Crecimiento a diferentes temperaturas

La literatura describe el crecimiento de *Malassezia* a 37 y 40 °C, la temperatura ideal para *Malassezia* es de 32 °C. Aunque, con *M. pachydermatis* se ha observado un mejor crecimiento a 37 °C. Hay especies menos termotolerantes como *M. obtusa*, *M. restricta*^{20, 53}.

3.2.2.8 Crecimiento en agar Sabouraud con 10% de Tween 20 y agar Sabouraud con 0.1% de Tween 80.

De *M. furfur* se ha descrito que tiene un patrón de asimilación de Tween 20, 40, 60 y 80 en las placas suplementadas con los ésteres de polisorbitato 20 y 80. Esta especie tiene la capacidad de asimilarlos y utilizar esa fuente lipídica suministrada en el medio Sabouraud (SDB) ²⁰.

3.4.3 Identificación molecular

Las técnicas de caracterización molecular han permitido la identificación de nuevas especies de *Malassezia*, además de estudiar la variabilidad intra e inter especies.

3.4.3.1 Amplificación y secuenciación del rDNA y regiones codificantes

El método de elección para la identificación de especies es la secuenciación de los dominios D1/D2 del gen 28S rRNA, aunque la región ITS también es utilizada. El estudio en la divergencia a nivel molecular, entre especies de *Malassezia* se ha estudiado en regiones del ARN ribosomal como, la región 18S o SSU (Subunidad pequeña ribosomal), ITS1 (Región espaciadora interna transcrita del ADN ribosomal 1), 5.8S (Subunidad grande del ribosoma) la más conservada, ITS2 (Región espaciadora interna transcrita del ADN ribosomal 2) y 26S o LSU (Subunidad grande ribosomal). También se han secuenciado los genes ribosomales, genes codificantes de proteínas para la identificación de especies pertenecientes a este género, como el gen de la β -tubulina, factor de elongación, RPB1 (Primera subunidad mayor de la ARN polimerasa II), RPB2 (Segunda subunidad mayor de la ARN polimerasa II), CHS2 (Gen de quitina sintasa) ^{2, 5, 29}. Los genes del ARNr se pueden comparar filogenéticamente entre especies distantes por lo que las secuencias son altamente conservadas, para especies relacionadas se pueden comparar debido a la presencia de fragmentos de ADN con mayor variabilidad^{2, 56}.

3.4.3.1.1 Región espaciadora transcritora interna (ITS)

Es una región espaciadora pequeña que consta de dos fragmentos transcritos que se localizan entre los genes nucleares 18S, 5.8S y 28S que codifican para el ARNr. Es una región demasiado polimórfica por lo cual es utilizada para estudios que incluyen análisis filogenéticos y taxonómicos. Debido a la alta variabilidad de los fragmentos se usa para estudios a nivel de especies y géneros próximos. El espaciador interno ITS1 es una región no codificante que se encuentra entre los genes 18S y 5.8S del ADNr. Sus regiones variables han sido de gran utilidad para estudiar las relaciones filogenéticas entre especies⁵⁷.

3.4.3.1.2 Región grande de la subunidad de ARNr (LSU)

Actualmente se usan múltiples regiones de los genes de ARNr de hongos para estudiar la taxonomía y diversidad en hongos. La subunidad grande (LSU) del ribosoma, está compuesta por dos regiones hipervariables, denominadas D1 y D2, que son flanqueadas por regiones altamente conservadas en gran proporción en los hongos. Este gen proporciona un marcador molecular ampliamente usado para la identificación de levaduras⁵⁸.

3.4.3.1.3 Gen de la segunda subunidad mayor de la ARN polimerasa

Este gen codifica para la segunda subunidad mayor de la enzima ARN polimerasa II, involucrada en la reparación y participación en la síntesis de precursores de ARN mensajero y microARNs; este gen es adecuado para el estudio filogenético y taxonómico gracias a su fácil alineamiento y análisis entre especies que están estrechamente relacionadas, presenta una copia dentro del genoma o múltiples copias idénticas⁵⁹.

3.4.3.3 Detección por PCR

La llegada de las técnicas moleculares como PCR, han sido de gran utilidad para la identificación de especies de *Malassezia*. A partir de muestras de escamas de piel humana, se ha podido hallar la detección de distintas especies de

Malassezia. Técnicas como PCR múltiplex han podido amplificar a partir de una muestra la presencia simultánea de varias especies⁶⁰.

Y métodos como PCR en tiempo real que permiten detectar y cuantificar el ADN amplificado, para tener un aproximado de las especies de *Malassezia* en la piel humana⁶¹.

Diferentes técnicas basadas en PCR, donde se pueden comparar los patrones de bandas por ejemplo RAPD (Amplificación aleatoria de ADN polimórfico), AFLP (Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados), PCR-RFLP (Reacción en cadena de la polimerasa con análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción)^{5, 6}; estas técnicas han permitido identificar la variabilidad intraespecífica dentro de la misma especie de *M. furfur*⁶.

3.5 Tratamiento

Para el tratamiento en pacientes con patologías causadas por *Malassezia*, actualmente son administrados medicamentos de clase azoles como: fluconazol, ketoconazol, itraconazol, voriconazol, antifúngicos que intervienen en la síntesis del ergosterol el principal componente de la membrana celular de la levadura, mediante la inhibición del citocromo P450-3-A de la célula fúngica, debido a la inactivación de la enzima C-14- α -dimetilasa,. En los casos de fungemia, es utilizada la anfotericina B, de estructura polieno, que tiene la capacidad de unirse al ergosterol de la membrana de la levadura, promoviendo la formación de poros que alteran la permeabilidad de la membrana, perdiendo proteínas, glúcidos y cationes, causando la muerte celular⁴⁵.

3.6 Pruebas de sensibilidad *in vitro*

Las pruebas de sensibilidad *in vitro* han permitido evaluar la sensibilidad y/o resistencia tanto de hongos levaduriformes como filamentosos a los distintos fármacos disponibles en el mercado. Actualmente, existen diversas metodologías

estandarizadas por el *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) y el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), los cuales se encuentran descritas en protocolos disponibles en el mercado. Por ejemplo, el CLSI para hongos levaduriformes como *Cryptococcus* y *Candida* ha desarrollado diversos test como: la microdilución en placa descrita en el Documento M27-A3) macrodilución (Documento M27-A3), y el método de difusión en disco (Documento M44-A^{62, 63, 64}. Los resultados de los tests de sensibilidad antifúngica se proporcionan en términos de concentración mínima inhibitoria (MIC; la dilución más baja de antifúngico que es capaz de inhibir en gran medida el crecimiento del hongo en estudio) o en términos de concentración mínima efectiva (MEC; la dilución más baja del antifúngico capaz de provocar alteraciones estructurales evidentes en el hongo en estudio) ^{65, 66}.

Sin embargo, pese a los altos niveles de estandarización y reproducibilidad de estas técnicas, en la actualidad no está estandarizado un protocolo para el montaje de pruebas de sensibilidad *in vitro* del género *Malassezia*. Por lo cual, usualmente se utilizan métodos estandarizados como microdilución en placa para levaduras ⁶², con modificaciones. Dentro de las principales modificaciones de este protocolo, se encuentra la suplementación del medio RPMI 1640 con componentes lipídicos, tiempo de incubación y preparación del inóculo. No obstante, se ha demostrado en diferentes estudios que el medio RPMI 1640 no es 100% óptimo para la evaluación de la sensibilidad antifúngica *in vitro* de especies de *Malassezia*, proponiendo nuevos medios suplementados con lípidos como el caldo urea Christensen (CUB), y el caldo Sabouraud con dextrosa (SDB), los cuales han demostrado ser más eficientes. Además, la diferencia en la temperatura de incubación para levaduras como *Candida* spp., es de 37°C y para *Malassezia* es de 33°C^{67, 68, 69}.

3.7 Inhibidores

3.7.1 L-Lisina

Es un aminoácido necesario y esencial para sintetizar proteínas, como también para el metabolismo de carbohidratos y de lípidos. Los animales no tienen la capacidad de sintetizarlo, por lo cual es uno de los aminoácidos estrictamente esencial. En microorganismos la lisina se sintetiza a partir de ácido aspártico. En naturaleza química actúa como una base, por lo que su cadena lateral contiene un grupo amino que por lo general actúa en los puentes de hidrogeno y como base general en catálisis. Ese grupo amino provee carga positiva a las proteínas, es acetilable por enzimas como las acetiltransferasas⁷⁰.

En un estudio previo de Triana *et al.*, L-Lisina ha sido postulado como un posible candidato de inhibición de levaduras del género *Malassezia*, L-lisina es capaz de retroalimentar la homocitrato sintasa e inhibir competitivamente la actividad de dicha enzima que actúa normalmente en el metabolismo de la producción de biomasa de *M. pachydermatis* CBS 1879 y *M. furfur* CBS 1878^{12, 71}. La homocitrato sintasa se encarga de catalizar la primera reacción de la ruta metabólica del α -aminoadipato, que tiene como objetivo final la producción de aminoácidos para el crecimiento del microorganismo.

3.7.2 L-Treonina

L-treonina es otro de los aminoácidos estrictamente esenciales para los humanos. En microorganismos L-treonina, es sintetizada a partir del ácido aspártico por la vía α -Aspartil-semialdehído y homoserina⁷². L-treonina ha sido probado como inhibidor al actuar sobre la enzima homosiderina deshidrogenasa, es uno de los productos finales en la vía metabólica de aspartato de la síntesis de aminoácidos, actúa como inhibidor en la retroalimentación de la vía sobre las enzimas aspartato quinasa y homosiderina deshidrogenasa, se entiende que al ser el producto final de la ruta puede actuar sobre estas enzimas y ser capaz de parar la vía metabólica e interrumpir todo el proceso, evitando la producción de cualquier producto de la ruta^{73, 74, 75}.

En estudios anteriores se ha demostrado que la inhibición de la Homosiderina deshidrogenasa afecta la adhesión celular y el producto de aminoácidos en los hongos, lo que alteraría la patogenicidad y virulencia del hongo al no tener producción de aminoácidos esenciales para esto⁷⁶.

4. DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 Tipo de investigación

Este estudio de investigación es cuantitativa descriptiva.

Universo

Colección fúngica del Grupo de Investigación Celular y Molecular de Microorganismos Patógenos (CeMoP) de la Universidad de los Andes, Colombia.

Población

Cepas de *Malassezia* conservadas en -80 del grupo de investigación CeMoP.

Muestra

Cepas identificadas previamente como *Malassezia furfur* atípica (Tabla 2).

Cepas de referencia *M. furfur* (CBS 7019, 1878, 6094, 7982), y *Candida* spp (ATCC 6258, 22019).

Aminoácidos candidatos a inhibidores: L-lisina (Sigma–Aldrich, United States) y L-treonina (Sigma–Aldrich, United States)

4.2 Hipótesis

“Las cepas con patrón atípico de *M. furfur* pueden ser consideradas como nueva especie.”

“Los aminoácidos L-lisina y L-treonina, pueden considerarse como posibles inhibidores para estas cepas atípicas y las cepas de referencia.”

4.3 Variables e Indicadores

Tabla 1. Variables e indicadores del estudio.

VARIABLE INDEPENDIENTE	VARIABLE DEPENDIENTE	INDICADOR
-Cepas de <i>M. furfur</i> atípica. -Pruebas fenotípicas y bioquímicas. -Extracción y amplificación del ADN.	-Obtención de la caracterización fenotípica y molecular de las cepas de <i>M. furfur</i> atípica.	-Obtención de la caracterización fenotípica y molecular de las cepas de <i>M. furfur</i> atípica.
-Secuencias de genes ITS, LSU y RPB2 de las cepas de referencia <i>Malassezia</i> y <i>Malassezia furfur</i> atípica. -Alineamientos múltiples de los genes secuenciados.	-Filogenia de las cepas de referencia de <i>Malassezia</i> y <i>M. furfur</i> atípica.	-Cepas de <i>M. furfur</i> atípica considerada como nueva especie o corresponde filogenéticamente a la especie <i>M. furfur</i> .
-Cepas de <i>M. furfur</i> atípica. -Concentraciones deseadas de los posibles inhibidores L-lisina y L-treonina.	-Actividad antifúngica frente a las cepas de <i>M. furfur</i> atípica.	-Inhibición o crecimiento frente a los candidatos como inhibidores L-lisina y L-treonina frente a las cepas control y cepas de <i>M. furfur</i> con patrón atípico.

4.4 Técnica y procedimientos

A continuación, se describen y explican los métodos que fueron usados para cumplir con los objetivos propuestos en este estudio.

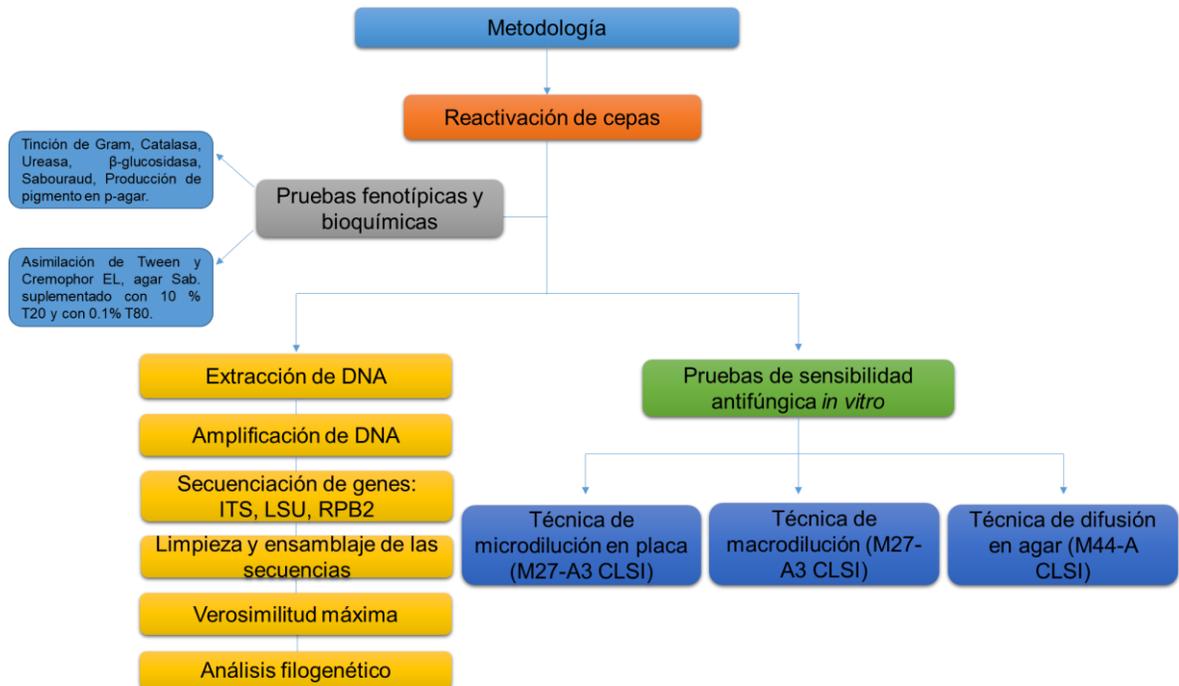


Figura 1. Esquema general de la metodología del estudio.

4.4.1 Origen de los aislados

Un total de 12 cepas de *Malassezia* fueron incluidas en este estudio, todas estas pertenecientes a la micoteca del Grupo de Investigación Celular y Molecular de Microorganismos Patógenos (CeMoP) de la Universidad de los Andes. Del total de cepas incluidas, cuatro correspondían a aislados de *M. furfur* de referencia de la colección del *Westerdijk Fungal Biodiversity Institute* (Utrecht, Holanda) y ocho de *M. furfur* atípica (Con patrón de Tween desconocido), previamente aisladas en otros estudios⁴ (Tabla 2). Las cepas se encontraban previamente conservadas en medio Skim Milk al 10% a una temperatura de -80 °C⁷⁷. Para la activación, las cepas fueron retiradas del ultracongelador (-80 °C), y sembradas en placas de agar Dixon

modificado (Dixonm) (3.6% de extracto de levadura, 2.0% oxgall desecada, 1.2% agar, 0.6% peptona, 0.2% glicerol, 1.0% Tween 40, 0.2% ácido oleico)¹. Posteriormente, se incubaron a 33 °C durante 5-7 días.

Tabla 2. Cepas de *Malassezia furfur* incluidas en este estudio.

Cepa	Origen	Referencia
CBS 7019	Humano	V. K. Hopsu-Havu
CBS 1878	Humano (Finlandia)	R. W. Benham
CBS 7982	Humano (Francia)	E. Guého, 1995
CBS 6094	Humano (Estados Unidos)	F. Keddie
MTB*	Desconocido	T. Boekhout, 2000
45.1 PV*	Humano, (Colombia)	Rincón, 2005
45.1*	Humano, lesiones de Pitiriasis Versicolor (Colombia)	Rincón, 2005
1828 PV (INS)*	Humano, lesiones de Pitiriasis Versicolor (Colombia)	Rincón, 2005
39C1*	Humano, individuos sano (Colombia)	Rincón, 2005
28A1*	Humano, individuos sano (Colombia)	Rincón, 2005
13MC*	Humano, individuo sano (Colombia)	Rincón, 2005
4DS*	Humano, lesiones de Dermatitis seborreica (Colombia)	Rincón, 2005

*Cepas de *Malassezia furfur* con patrón de asimilación de Tween atípico

4.4.2 Pruebas fenotípicas y fisiológicas

A partir de las cepas aisladas se realizaron las pruebas fenotípicas y fisiológicas. La prueba de catalasa en lámina con una gota de peróxido de hidrogeno⁵³ y el frotis en lámina para tinción de Gram, tomando directamente de las colonias; además de la siembra directa en agar Triptófano por duplicado para cada cepa⁵⁴. Se realizaron suspensiones de levadura en tubos con 5ml de agua destilada a una escala de 0.5 Mc Farland. Se adicionaron 500 µl de solución de cada *Malassezia* más agua destilada a una concentración de 0.5 en la escala de Mc Farland, a una caja de agar Sabouraud suplementado con 10 % Tween 20 y 500 µl de dicha solución en una caja de agar Sabouraud suplementado con 0.1% Tween

80²⁰.

Se adicionaron 3 ml de la suspensión a un tubo con agar Sabouraud (18 ml), en estado líquido, se homogenizaron las muestras y se sirvieron en placas de Petri estériles. Luego de la solidificación con un sacabocado fueron retirados 5 pozos en cada placa, se adicionaron 5 µl de cada Tween y en el pozo del centro el Cremophor EL. También se inocularon tubos con agar Sabouraud (8 ml), agar bilis esculina (8 ml) y dos asadas para los tubos con caldo urea (5 ml) ^{53, 55}.

Las cajas de agar triptófano fueron incubadas a una temperatura de 37 °C y 42 °C durante tres semanas revisándolas cada siete días, las demás placas y tubos se incubaron durante cinco días a una temperatura de 33 °C⁵⁴.

4.4.3.1 Extracción de ADN

Para la obtención de ADN nuclear, los aislados se cultivaron en placas de en agar Dixonm durante 4 a 5 días a 33 °C. Posteriormente, se transfirieron a tubos Falcón de 5 mL mediante el raspado superficial de la colonia, para realizar el proceso de liofización. El ADN se extrajo mediante el método de fenol-cloroformo⁷⁸, el protocolo de extracción se describe en el Anexo 1.

4.4.4 Amplificación por PCR convencional

La caracterización molecular se realizó mediante la amplificación y secuenciación de tres diferentes marcadores genéticos: ITS, LSU, y RBP2. Los cebadores y programas de amplificación se detallan en las Tablas 3 y 4. Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se realizaron en un volumen final de 25 µl, que contenían 1 µl de ADN (150 ng/ µl), 2.5 µl de Buffer de Taq 10x, 2 µl de MgCl₂, 0.5 µl de dNTPs, 0.5 µl de Primer reverse (0.5 µM), 0.5 µl de primer forward (0.5 µM), 0.2 µl de Taq-polimerasa, 0,4 µl de DMSO, 17.4 µl de agua de PCR (TermoFisher). El termociclador usado para las amplificaciones fue C1000 Bio-Rad)

⁷⁹.

Tabla 3. Programas y ciclos térmicos utilizados para la amplificación.

Locus	Cebador	Dirección	Secuencia del Cebador	Tamaño del amplicon	Referencia
ITS yLSU	ITS1	<i>Forward</i>	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	1500 pb	White <i>et al.</i> 1990 ⁸⁰
	LR5	<i>Reverse</i>	TCC TGA GGG AAA CTT CG		Vilgalys & Hester, 1990 ⁸¹
RPB2	5F	<i>Forward</i>	GAY GAY MGW GAT CAY TTY GG	1200 pb	Liu <i>et al.</i> 1999 ⁸²
	7CR	<i>Reverse</i>	CCC ATR CGC TTG YTT RCC CAT		

Gen	Desnaturalización inicial	Ciclos	Desnaturalización	Anillaje	Elongación	Elongación Final
ITS, LSU	94 °C, 3 min	10	94 °C, 30 s	54 °C, 60 s	72 °C, 120 s	72 °C, 10 min
		34	94 °C, 30 s	52 °C, 60 s	72 °C, 120 s	
RPB2	94 °C, 3 min	10	94 °C, 30 s	54 °C, 60 s	72 °C, 120 s	
		34	94 °C, 30 s	52 °C, 60 s	72 °C, 120 s	

Tabla 4. Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación⁵.

Para la visualización de los productos de amplificación se realizó mediante electroforesis convencional en gel de agarosa al 1 %. Para lo cual se utilizaron 2 µl de los productos de PCR, mezclado previamente con Buffer de Carga al 6X (ADN loading, Thermo Scientific). Se usó como marcador de peso molecular 2 log-ADN ladder 1kb (Bio Labs). Las electroforesis fueron programadas durante 30 minutos a 100 Voltios. Los gels fueron fotografiados en el Fotodocumentador Chemidoc MP (Bio-Rad).

4.4.5 Secuenciación

Finalmente, los productos de la PCR se enviaron para su purificación y

secuenciación en ambas direcciones (forward y reverse) al laboratorio de secuenciación de la Universidad de los Andes, utilizando los mismos pares de cebadores empleados para su amplificación.

4.4.6 Ensamblaje de secuencias

Los electroferogramas de las secuencias obtenidas (Forward y Reverse) se revisaron visualmente para determinar la calidad de las mismas. El ensamblaje de las secuencias y la obtención de las secuencias consenso se realizó utilizando el programa Geneious Trial, versión 11.1.5)⁸³.

4.4.7 Alineamientos múltiples

Se realizaron alineamientos individuales con cada uno de los genes amplificados, incluyendo nuestras secuencias y secuencias de las cepas de referencia de las especies aceptadas para *Malassezia*, además de incluir secuencias de referencia de otras cepas filogenéticamente relacionadas (*Ustilago maydis*). Fueron tomadas las secuencias del gen 5.8, la región ITS2, 28S y el gen RPB2 del Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank), de las cepas tipo de las 18 especies descritas actualmente. Los alineamientos fueron realizados utilizando el algoritmo ClustalW⁸⁴ incorporado en la plataforma *Molecular Evolutionary Genetic Analysis* (MEGA) versión 7.0⁸⁵ y refinados usando el algoritmo *Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation* incluido en la misma plataforma⁸⁶.

4.4.8 Análisis filogenético

Las reconstrucciones filogenéticas para cada gen y para los alineamientos concatenados se realizaron utilizando el método de Máxima verosimilitud (ML)⁸⁷. Los análisis de ML se llevaron a cabo utilizando el software MEGA en su versión 7.0., con el uso de 1000 iteraciones, donde valores de Bootstrap (bs) $\geq 70\%$ fueron considerados estadísticamente significativos. La selección del modelo de

sustitución nucleotídica más apropiado para cada gen se realizó utilizando la herramienta *Find Best DNA/Protein Model* incluida en el software MEGA para ML o, en su defecto⁸⁸.

4.4.9 Pruebas de sensibilidad antifúngica *in vitro*

La evaluación de la sensibilidad antifúngica *in vitro* de las 12 cepas se evaluó para los inhibidores Lisina y Treonina, usando como control de las técnicas la Anfotericina B. Para tal fin, se siguió los protocolos: microdilución en placa descrito por el *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* en el documento M27-A3 (CLSI 2008)⁶², la macrodilución descrita en el mismo documento, y la difusión en agar M44A⁶⁴, con modificaciones. Los rangos de concentraciones de los inhibidores ensayados en microdilución en placa fluctuaron entre 0,03–16 µg/mL, para macrodilución entre 40–160 µg/mL. Las concentraciones evaluadas en los sensidiscos fueron de 20-160 µg/mL.

4.4.9.1 Preparación del inóculo y técnica de microdilución en microplaca

Para la preparación de los inóculos, los aislados en estudio se sembraron en agar Dixonm y se incubaron a 33 °C durante 4- 5 días Posteriormente, se tomaron aproximadamente tres colonias con la ayuda de un asa, y la masa fúngica obtenida se suspendió en agua destilada más Tween 80 al 0.5%, el cual se filtró mediante una gasa estéril de forma sucesiva para eliminar los restos de levaduras. Las suspensiones de levaduras se cuantificaron a través de recuento en cámara de Neubauer y se ajustaron a una concentración de $3 \times 10^5 - 4 \times 10^6$ levaduras/mL mediante dilución (factor de dilución 1/50) en medio de Urea suplementado (Tween 40 0.5% y Tween 80 0.1%). Las suspensiones de levaduras se inocularon en microplacas de 96 pocillos, las cuales contenían los antifúngicos a ensayar. Las microplacas se incubaron en la oscuridad, sin agitación, a 35 °C durante 24–48 horas.

La lectura de la sensibilidad para las microplacas se realizó a las 24, 48 y 72 horas de incubación el parámetro evaluado era la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Este parámetro se define como la mínima concentración de antifúngico que es capaz de conseguir el 100% de inhibición del crecimiento del hongo en el caso de Anfotericina B. Para los inhibidores se evaluó la concentración del inhibidor que era capaz de conseguir el 50% de inhibición del crecimiento de las levaduras. Las lecturas se llevaban a cabo visualmente con ayuda de un espejo invertido. Los perfiles de sensibilidad antifúngica *in vitro* siempre se realizaron por duplicado. Para el control de calidad de las pruebas, se utilizaron las cepas de *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

4.4.9.2 Preparación de las diluciones del antifúngico y de los inhibidores

La preparación del antifúngico (Anfotericina B), los inhibidores, y el protocolo de sensibilización de las microplacas se detalla en el anexo 2.

4.4.9.3 Técnica de Macrodilución

Se probaron los dos inhibidores (L-lisina y L-treonina) a concentraciones mayores a las usadas en la microdilución. Las concentraciones evaluadas fueron 160 ug/ml, 80 ug/ml y 40 ug/ml. Como los inhibidores eran solubles en agua se realizó en tubos de 20 ml con un volumen final de 10 ml (Caldo urea más volumen del inhibidor). Todas las cepas fueron evaluadas. El inóculo utilizado fue el mismo que se usó para el montaje de las placas de microdilución. A continuación, en la figura se explica el procedimiento realizado. Las lecturas se realizaron a las 24, 48 y 72 horas como lectura final, se incubaron a 33 °C.

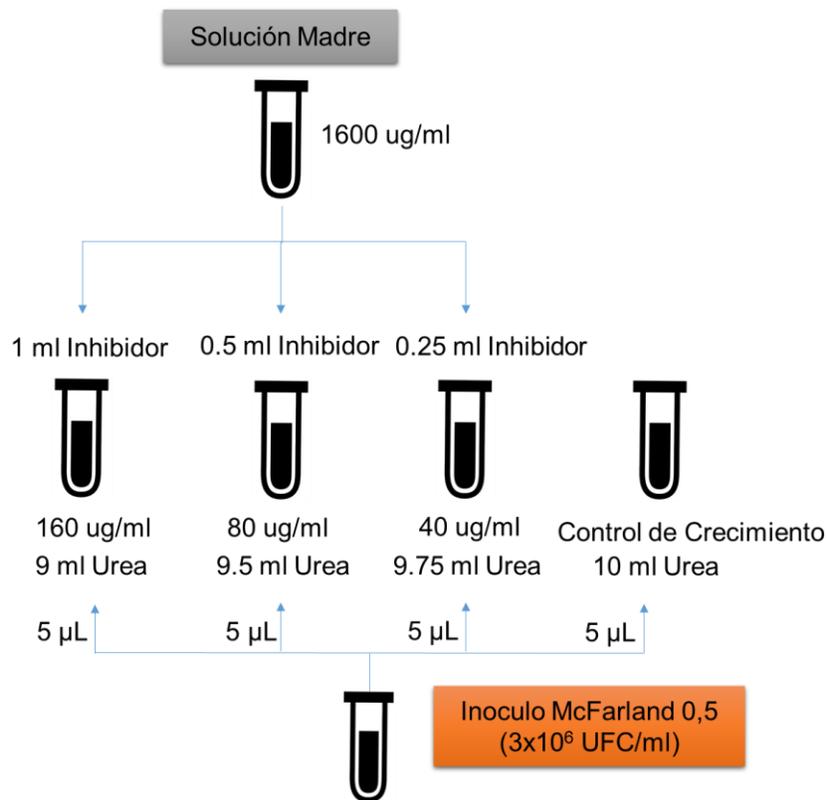


Figura 2. Técnica de macrodilución de L-lisina y L-treonina.

3.4.9.6 Difusión de disco en agar Dixonm

A partir de la solución stock de los inhibidores (1600 ug/ml) se realizaron diluciones para obtener concentraciones de 160 ug/ml, 80 ug/ml, 40 ug/ml y 20 ug/ml, para sensibilizar con 10 µl de cada concentración de L-lisina y L-treonina sensidiscos estériles.

Se sumergió una torunda de algodón en la suspensión del inóculo previamente usado en las técnicas de micro y macrodilución 3×10^6 UFC/ml, fue retirado el exceso de líquido rozando la torunda con las paredes del tubo, luego se sembró la placa masivamente. Se dejaron secar las placas durante 3 minutos y posteriormente se colocaron los sensidiscos⁶⁴.

Se inocularon dos placas de agar Dixon para cada cepa, una incluía los sensidiscos de L-lisina y la otra los sensidiscos de L-treonina; como control positivo de inhibición se usaron sensidiscos comerciales de voriconazol 1 ug (BD BBL). Fueron agregados los 4 sensidiscos de cada inhibidor y el antifúngico (Voriconazol). La temperatura de incubación fue de 33 °C, las lecturas se realizaron cada 24 horas por días 3 días (24, 48 y 72 horas de inoculadas).

5. RESULTADOS

5.1 Caracterización morfológica y fisiológica

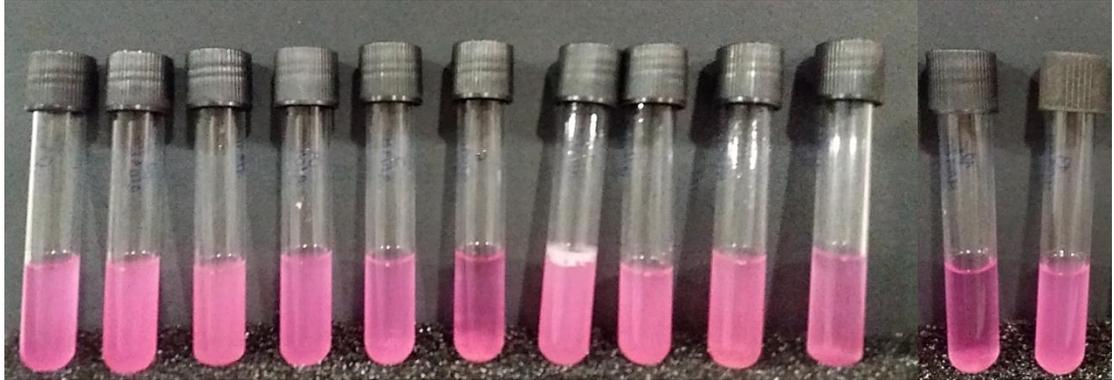
Un total de ocho cepas identificadas previamente como *M. furfur* atípica fueron incluidas en este estudio y cuatro cepas de referencia de *M. furfur*, se realizó la caracterización morfológica y fisiológica. Todas las cepas presentaron características macro y micromorfológicas similares (Tabla 5). Macroscópicamente en Agar Dixonm las colonias se caracterizaron por ser umbonadas, opacas y secas. A nivel microscópico con tinción de Gram, se observaron blastoconidias en forma de botella con un extremo redondo y otro romo, con gemación unipolar de las cepas de *M. furfur* evaluadas.

Tabla 5. Morfología micro y macroscópica en Agar Dixonm

Cepa	Colonia Microscópica	Colonia Macroscópica
<i>M. furfur</i> CBS 7019	Blastoconidias en forma de botella, unigemantes	Colonia umbonada, opaca y cremosa, de color crema
<i>M. furfur</i> CBS 1878	Blastoconidias en forma de botella, unigemantes	Colonia umbonada, opaca y cremosa, de color crema
<i>M. furfur</i> CBS 7982	Blastoconidias en forma de botella, unigemantes	Colonia umbonada, opaca y cremosa, de color crema
<i>M. furfur</i> CBS 6094	Blastoconidias en forma de botella, unigemantes	Colonia umbonada, opaca y cremosa, de color crema
<i>M. furfur</i> MTB	Blastoconidias en forma de botella, unigemantes	Colonia umbonada, opaca y seca, de color crema
<i>M. furfur</i> 45.1 PV	Blastoconidias en forma de botella, unigemantes	Colonia umbonada, opaca y seca, de color crema
<i>M. furfur</i> 45.1	Blastoconidias en forma de botella, unigemantes	Colonia umbonada, opaca y seca, de color crema
<i>M. furfur</i> 1828 PV (INS)	Blastoconidias en forma de botella, unigemantes	Colonia umbonada, opaca y seca, de color crema
<i>M. furfur</i> 39C1	Blastoconidias en forma de botella, unigemantes	Colonia umbonada, opaca y seca, de color crema
<i>M. furfur</i> 28A1	Blastoconidias en forma de botella, unigemantes	Colonia umbonada, opaca y seca, de color crema
<i>M. furfur</i> 13MC	Blastoconidias en forma de botella, unigemantes	Colonia umbonada, opaca y seca, de color crema
<i>M. furfur</i> 4DS	Blastoconidias en forma de botella, unigemantes	Colonia umbonada, opaca y seca, de color crema

Fisiológicamente, todas las cepas fueron capaces de descomponer el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) en agua y oxígeno ($H_2O + O_2$), siendo catalasa positiva. Igualmente, las cepas tuvieron la capacidad de hidrolizar el nitrógeno de la urea en moléculas amoniaco y anhídrido carbónico (Figura 3).

Figura 3. Pruebas ureasa positiva en las cepas de *M. furfur*.



Respecto a la asimilación de ácidos grasos, las cepas de referencia presentaron los resultados esperados para *M. furfur*, asimilaron todos los reactivos químicos (Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80 y Cremophor); de igual forma el crecimiento en los medios con agar Sabouraud suplementados con Tween 20 al 10% y Tween 80 al 0.1%, no obtuvieron variaciones ni cambios respecto al estudio ya realizado con estas cepas (Tabla 6). En la figura 4 se pueden observar los patrones de asimilación de las cuatro cepas de referencia de *M. furfur*. La cepa *M. furfur* CBS 6094 es la única cepa de referencia con un patrón de asimilación de Tween similar al de las cepas atípicas, esta cepa solo asimila Tween 80.

Cepas	Asimilación de:					β-Gluco.	Sab. con 10% T20	Sab. con 0.1% T80	A. Tryptofano		A. Dixon		Catalasa	A. Sab.	Ureasa
	T20	T40	T60	T80	Cre				37 °C	42 °C	37 °C	40 °C			
<i>M. furfur</i> CBS 7019	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
<i>M. furfur</i> CBS 1878	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
<i>M. furfur</i> CBS 7982	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
<i>M. furfur</i> CBS 6094	-	-	-	++	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+
<i>M. furfur</i> MTB*	-	+	+	++	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+
<i>M. furfur</i> 45.1 PV*	-	+	+	++	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+
<i>M. furfur</i> 45.1*	-	+	+	++	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+
<i>M. furfur</i> 1828 PV (INS)*	-	+	+	++	+	-	+/-	+	+	-	+	+	+	-	+
<i>M. furfur</i> 39C1*	-	+	+	++	+	-	+/-	+	+	-	+	+	+	-	+
<i>M. furfur</i> 28A1*	-	+	+	++	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
<i>M. furfur</i> 13MC*	-	+	+	++	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+
<i>M. furfur</i> 4DS*	-	+	+	++	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+

Tabla 6. Características fisiológicas de las cepas *Malassezia furfur* incluidas en este estudio. * Cepas con patrón atípico.

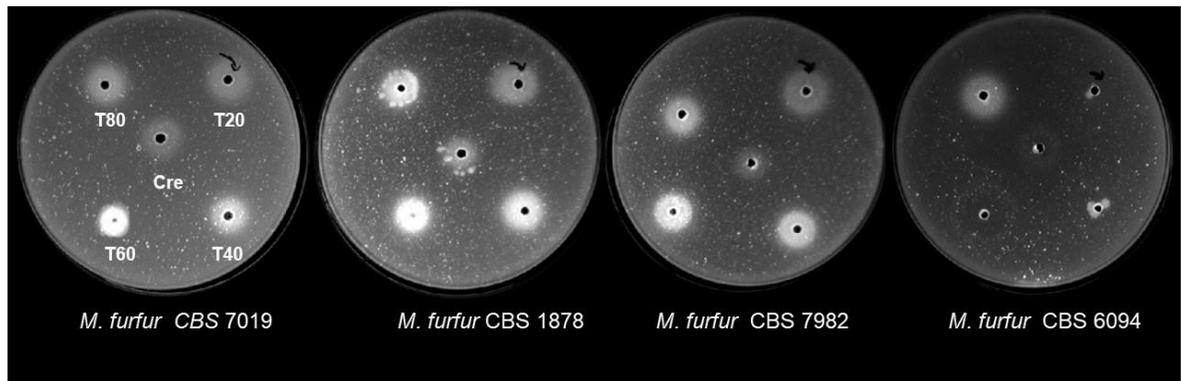


Figura 4. Patrones de asimilación de Tween y Cremophor de cepas de referencia de *M. furfur*.

De las cepas consideradas como atípicas, en ninguna se observó asimilación de Tween 20, en contraste lograron asimilar Tween 40 y Tween 60, pero se evidencio poco crecimiento comparándolo respecto a la asimilación de Tween 80 en donde todas las cepas lograron asimilarlo en mayor proporción a diferencia de los otros Tween evaluados. Sin embargo, este patrón no está asociado a alguna especie descrita actualmente. Se observó un patrón de asimilación particular en las cepas *M. furfur* 39C1 y *M. furfur* 13MC, se diferenciaron de las demás cepas porque no lograron asimilar totalmente Tween 40 y 60, y se evidenció inhibición en lo más próximo al pozo y luego un delgado halo de crecimiento (Figura 5).

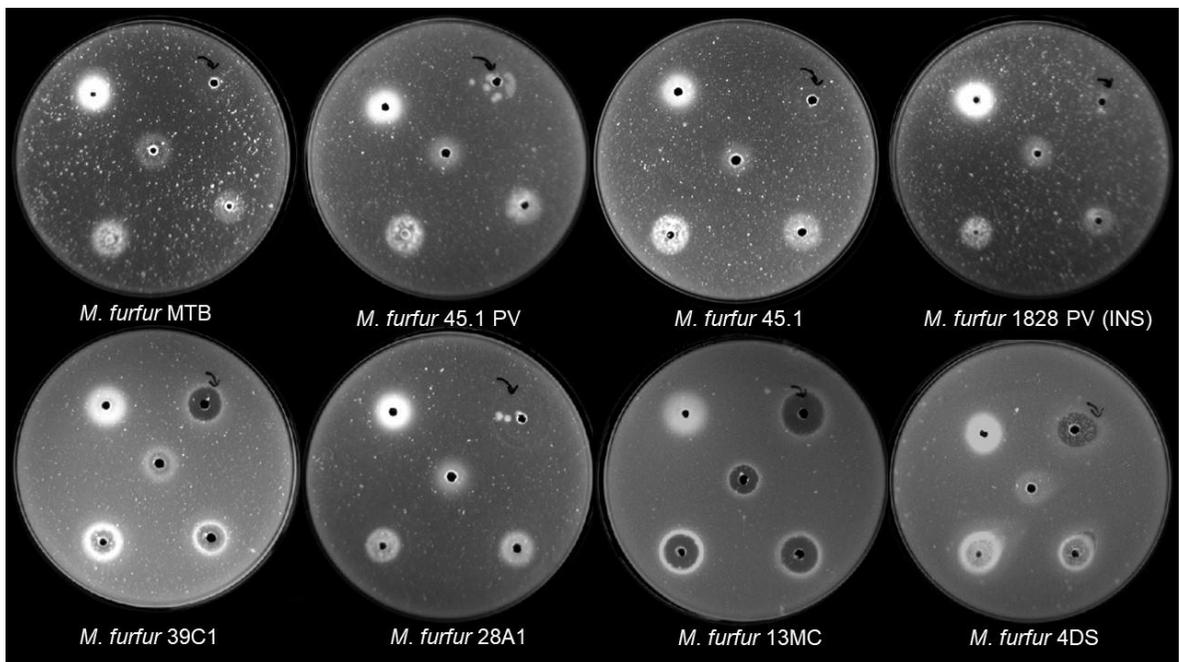


Figura 5. Patrones de asimilación de Tween y Cremophor cepas atípicas de *M. furfur*.

Las cepas de referencia de *M. furfur* demostraron crecimiento en las placas con agar Sabouraud suplementado con 10% de Tween 20 y 0.1% de Tween 80, de la cepa *M. furfur* CBS 6094 únicamente se observó crecimiento en la placa suplementada con 0.1% de Tween 80 (Figura 6).

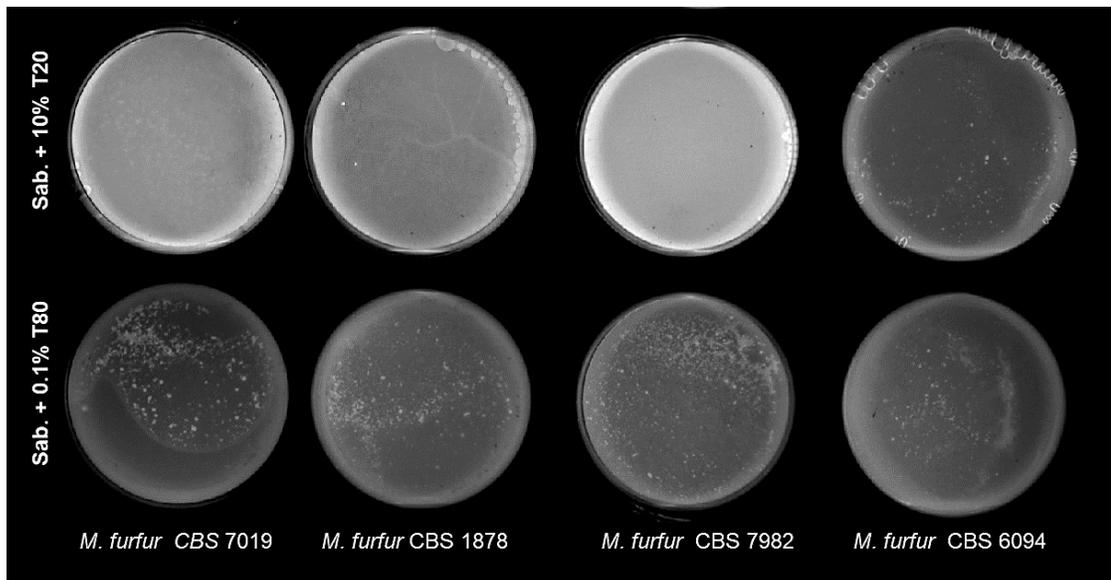


Figura 6. Crecimiento de *M. furfur* en agar Sabouraud con 10% de Tween 20 y 0.1% de Tween 80.

Respecto a las cepas atípicas *M. furfur* 1828 PV (INS), *M. furfur* 39C1, *M. furfur* 28A1 tuvieron un comportamiento diferente al obtener un crecimiento variable en la placa con agar Sabouraud con 10% de Tween 20, que no se correlaciona con las pruebas de asimilación de Tween. Aunque no es masivo el crecimiento comparado con el de las cepas de referencia de *M. furfur*, se logra observar algo de crecimiento en la placa (Figuras 7 y 8).

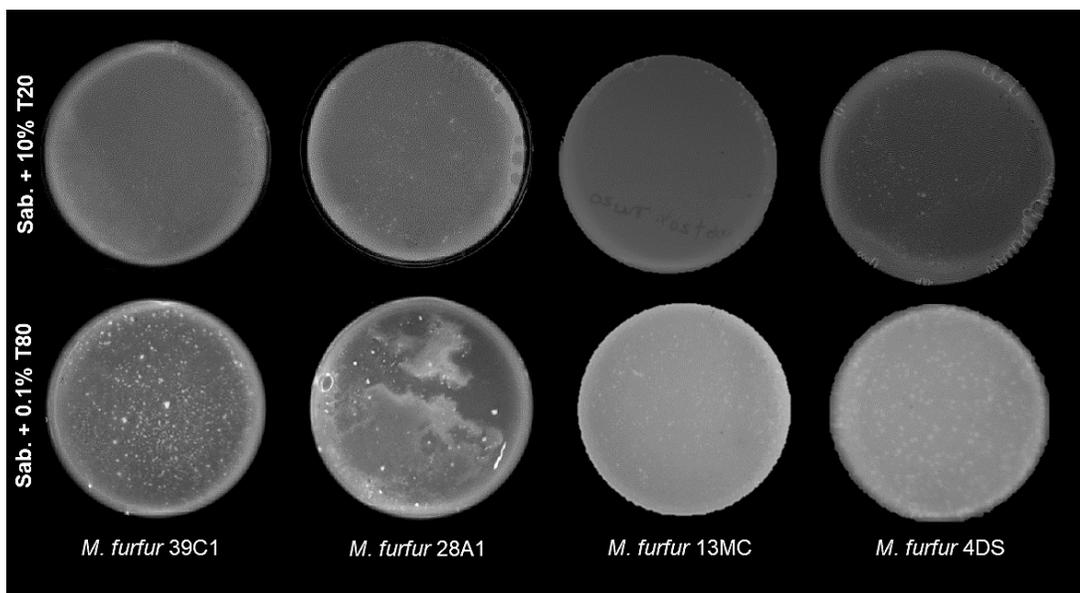


Figura 7. Crecimiento de *M. furfur* atípicas en agar Sabouraud con 10% de Tween 20 y 0.1% de Tween 80.

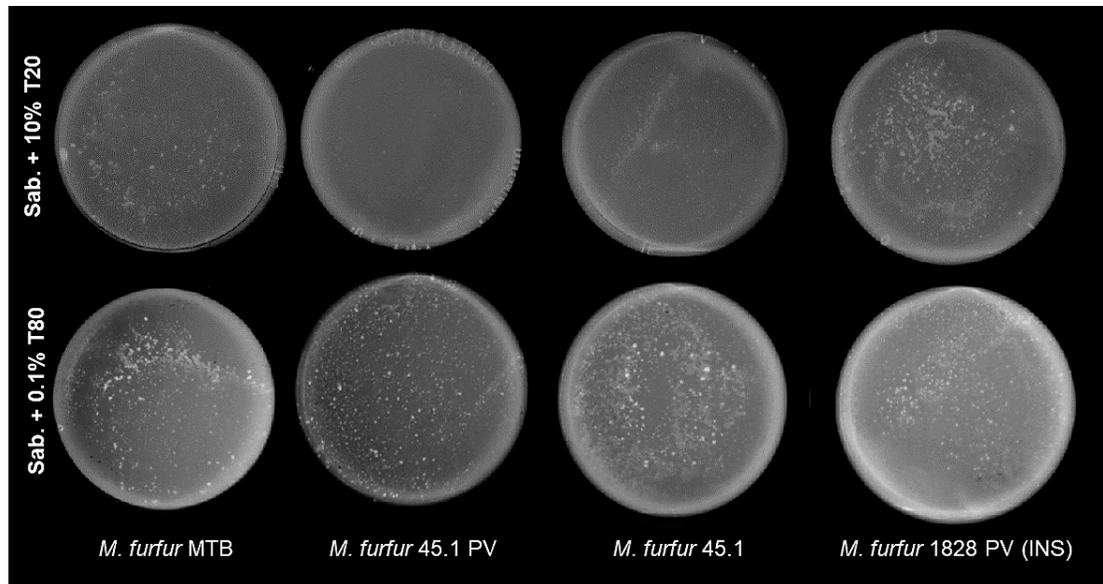


Figura 8. Crecimiento de *M. furfur* atípicas en agar Sabouraud con 10% de Tween y 01% de Tween 80.

En el medio triptófano a una temperatura de 42 °C, ninguna de las cepas evaluadas logró crecer ni producir pigmento. Todas las cepas excepto *M. furfur* CBS 6094 tuvieron la capacidad de producir pigmento y crecer satisfactoriamente en el medio a la temperatura de 37 °C (Figuras 9, 10 y 11).

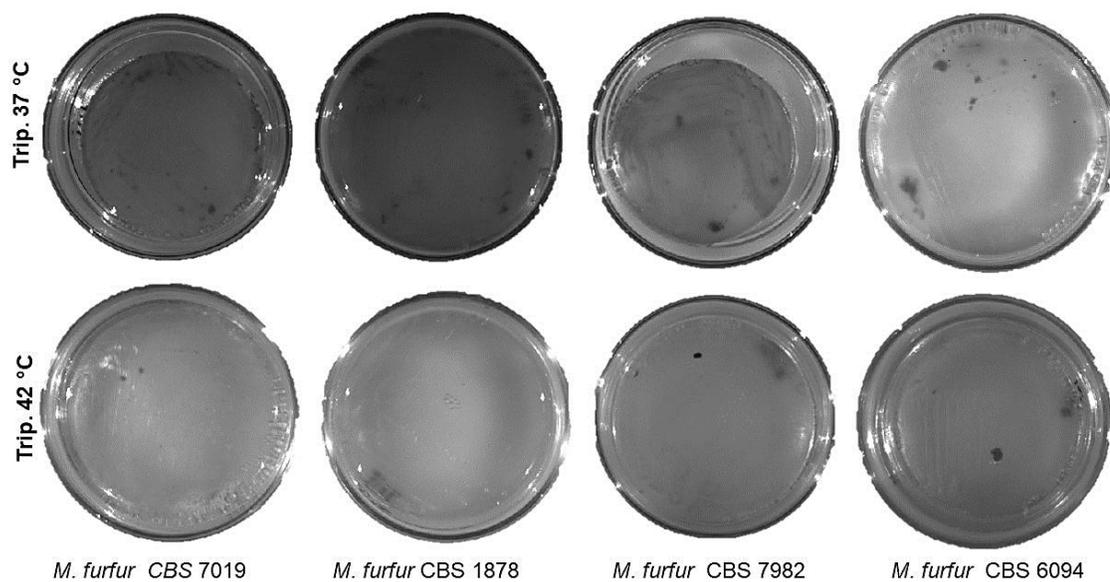


Figura 9. Crecimiento y producción de pigmento en agar triptófano, cepas de referencia de *M. furfur*.

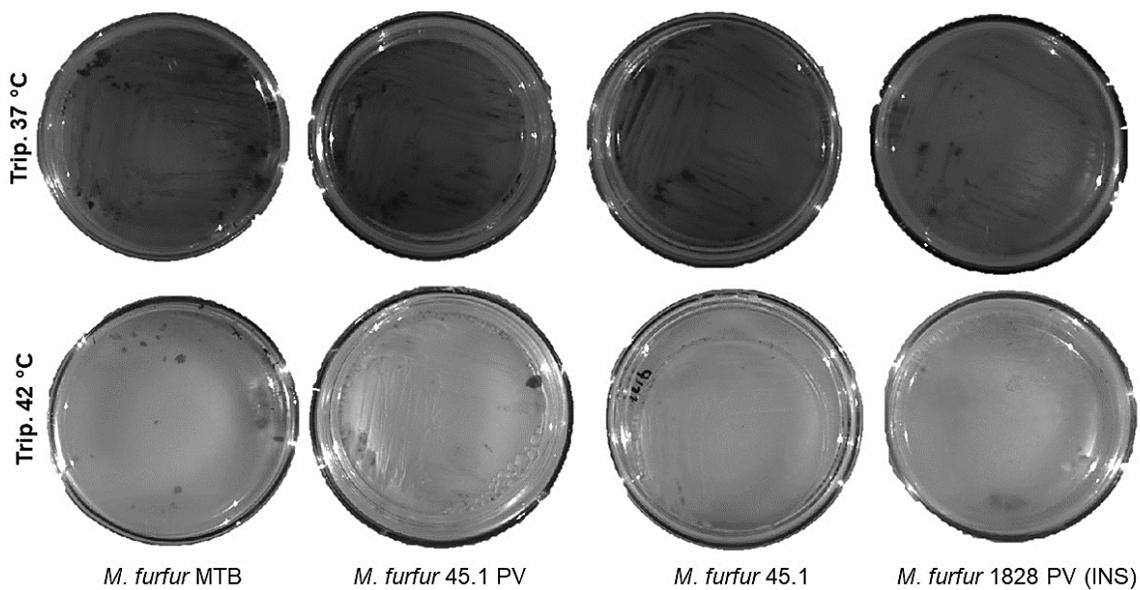


Figura 10. Crecimiento y producción de pigmento en agar triptófano, de las cepas de *M. furfur* MTB, *M. furfur* 45.1 PV, *M. furfur* 45.1, *M. furfur* PV (INS).

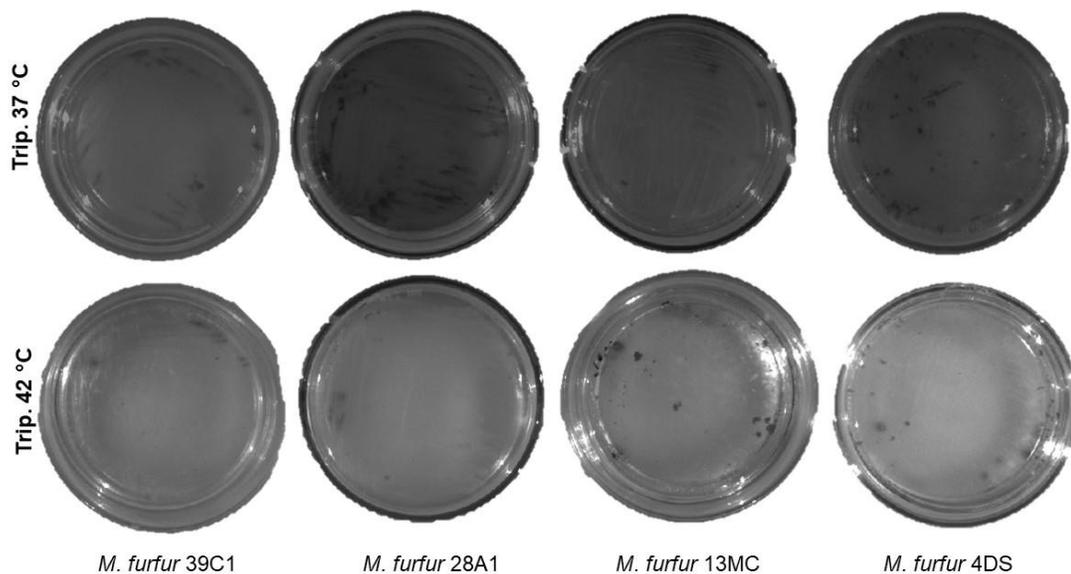


Figura 11. Crecimiento y producción de pigmento en agar triptófano, de las cepas *M. furfur* 39C1, *M. furfur* 28A1, *M. furfur* 13MC, *M. furfur* *M. furfur* 4DS.

5.2 Identificación molecular

El ADN obtenido en la extracción fue tratado con RNAsa. Se obtuvieron resultados óptimos en la extracción de ADN, con una concentración entre 150 ng/μl y 2000 ng/μl de ADN de buena calidad. Se ajustaron las concentraciones del ADN de todas las cepas a 150 ng/μl para su amplificación.

La identificación molecular se llevó a cabo mediante la amplificación y secuenciación de los genes en interés (ITS, LSU y RPB2) y su visualización en la electroforesis en gel de agarosa. Posteriormente los amplificados de los genes fueron secuenciados por el método de Sanger, se visualizó su calidad en los electroferogramas de las secuencias obtenidas para su ensamblaje. Se realizaron alineamientos individuales de las secuencias de los genes amplificados de las cepas ensayadas en este estudio y secuencias de las cepas de las especies aceptadas para *Malassezia*, obtenidas del Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank). Posteriormente se realizó su análisis filogenético por medio de las reconstrucciones filogenéticas para cada gen de cada cepa.

5.2.1 Amplificación por PCR convencional

Respecto a los productos de amplificación obtenidos para las regiones utilizadas, obtuvimos un tamaño de amplicon aproximadamente de 1500 pb para las regiones ITS1, 5.8S, ITS2 y un fragmento del 28S (Figura 12). Para el gen RPB2 se obtuvieron amplicones de aproximadamente 1200pb (Figura 13).

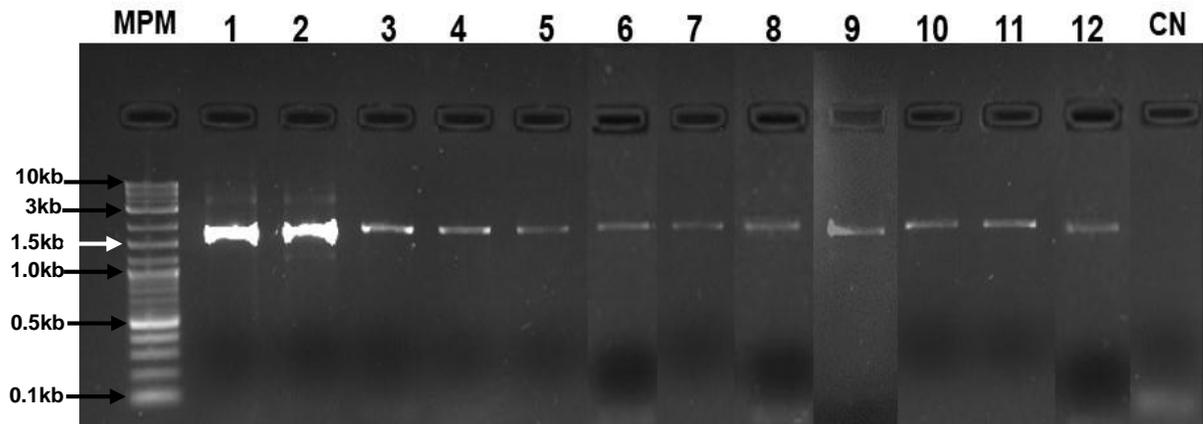


Figura 12. Gel de agarosa 1.5% del producto de amplificación de ITS y LSU. 1 kb Plus DNA Ladder (100pb a 10kb), marcador de peso molecular. De todas las cepas evaluadas se obtuvieron amplicones de alrededor de 1500pb. 1. *M. furfur* CBS 7019, 2. *M. furfur* CBS 1878, 3. *M. furfur* CBS 7982, 4. *M. furfur* CBS 6094, 5. *M. furfur* MTB, 6. *M. furfur* 45.1 PV, 7. *M. furfur* 45.1, 8. *M. furfur* 1828 PV (INS), 9. *M. furfur* 39C1, 10. *M. furfur* 28A1, 11. *M. furfur* 13MC, 12. *M. furfur* 4DS.

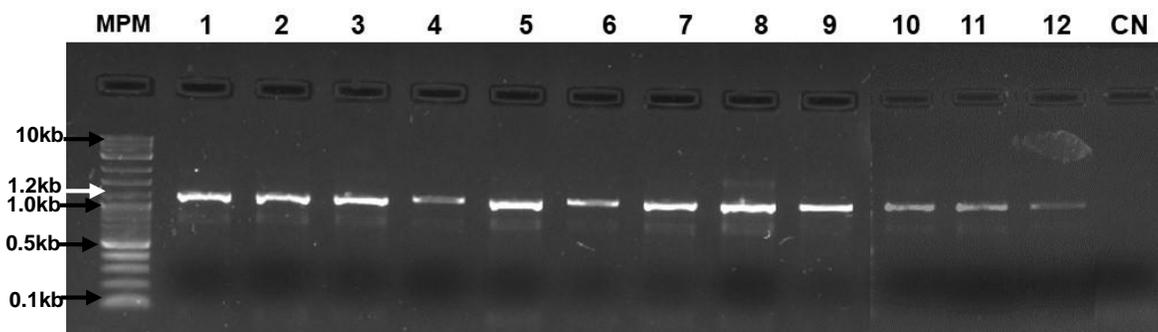


Figura 13. Gel de agarosa 1.5% del producto de amplificación del gen RPB2. 1 kb Plus DNA Ladder (100pb a 10kb), marcador de peso molecular. De todas las cepas evaluadas se obtuvieron amplicones de aproximadamente de 1200pb. *M. furfur* CBS 7019, 2. *M. furfur* CBS 1878, 3. *M. furfur* CBS 7982, 4. *M. furfur* CBS 6094, 5. *M. furfur* MTB, 6. *M. furfur* 45.1 PV, 7. *M. furfur* 45.1, 8. *M. furfur* 1828 PV (INS), 9. *M. furfur* 39C1, 10. *M. furfur* 28A1, 11. *M. furfur* 13MC, 12. *M. furfur* 4DS.

El análisis de secuencias de los marcadores ITS y LSU nos permitió confirmar que tenían porcentajes de similitud superiores a 99% con secuencias de *M. furfur* depositadas en el Genbank. Un análisis adicional (Figura 14) se realizó con las secuencias de RPB2. En este se puede observar que nuestros aislamientos formaron un clado bien soportado (98% bs) con cepas de referencia de *M. furfur*; pero se observó la formación de un clado dentro del complejo (100% bs) el cual agrupó a los aislamientos de *M. furfur* atípica. Un análisis de distancia filogenética reveló una distancia de aproximadamente 6% entre los dos clados.

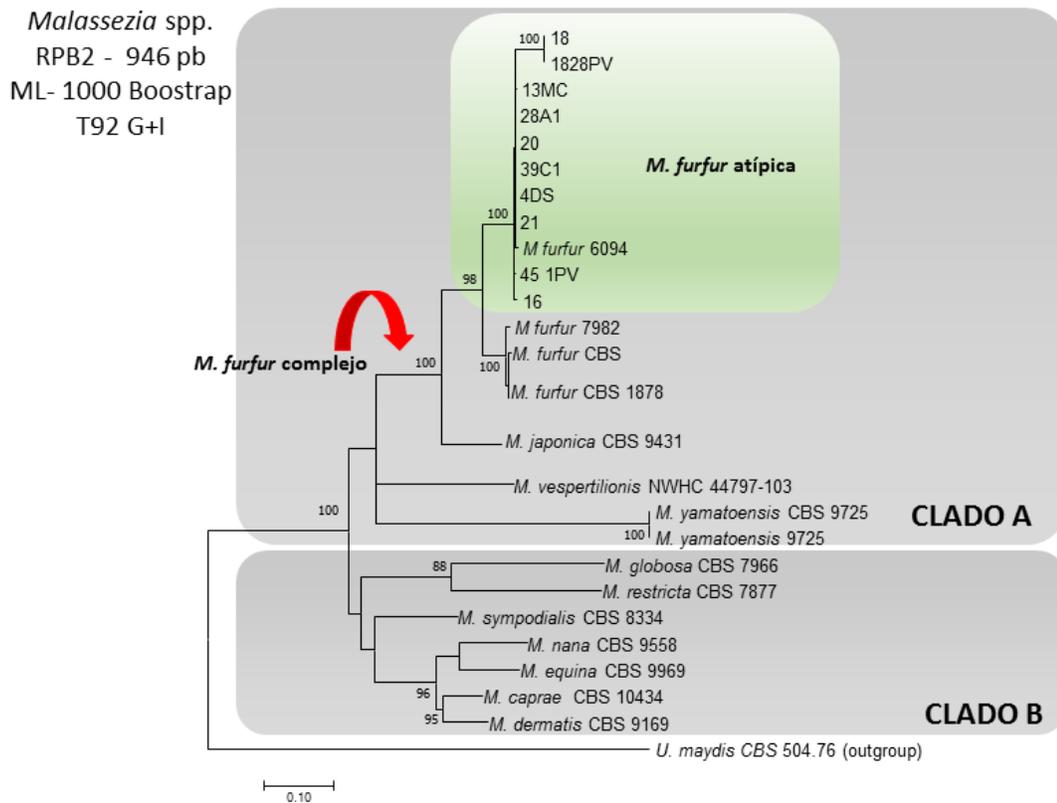


Figura 14. Árbol filogenético construido con verosimilitud, se incluyen las especies de *Malassezia*, inferido con las secuencias de RPB2. Las longitudes de las ramas son proporcionales a la distancia filogenética. Soporte Bootstrap superiores a 70 se indican en los nodos. El árbol está enraizado con *U. maydis* CBS 504.

5.3 Pruebas de sensibilidad antifúngica *in vitro*

Para la sensibilidad antifúngica *in vitro* se evaluaron las dos candidatos (Lisina y Treonina) como inhibidores y un Antifúngico de uso comercial frente a las doce cepas en las pruebas de microdilución y macrodilución, para la prueba en difusión de disco se usó el antifúngico Voriconazol como control. Todas las pruebas se leyeron después de 72 horas de incubación a 33 °C.

5.3.1 Técnica de microdilución

Respecto a la técnica de microdilución, las microplacas fueron sensibilizadas con Anfotericina B, L-lisina y L-treonina, y se inocularon las cepas en el siguiente orden como se describe en la tabla 7. De los pozos 1 al 10, se sensibilizaron las microplacas a las concentraciones deseadas de 16 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ – 0.03 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, el pozo 11 correspondía al control de esterilidad y el pozo 12 fue el control de crecimiento.

Tabla 7. Orden de inoculación en las microplacas.

Bloque A		Bloque B	
Fila	Cepa	Fila	Cepa
A	<i>M. furfur</i> CBS 7019	A	<i>M. furfur</i> MTB
B	<i>M. furfur</i> CBS 1878	B	<i>M. furfur</i> 45.1 PV
C	<i>M. furfur</i> CBS 7982	C	<i>M. furfur</i> 45.1
D	<i>M. furfur</i> CBS 6094	D	<i>M. furfur</i> 1828 PV (INS)
E	<i>M. pachydermatis</i> CBS 1879	E	<i>M. furfur</i> 39C1
F	<i>M. furfur</i> 4DS	F	<i>M. furfur</i> 28A1
G	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	G	<i>M. furfur</i> 13MC
H	<i>C. parasilopsis</i> ATCC 22019	H	<i>C. krusei</i> ATCC 6258

Todas las cepas ensayadas fueron sensibles frente a Anfotericina B, como se puede observar en la tabla 8. Además, las cepas control de *Candida* se encontraron en el rango de sensibilidad de la norma M27-A2 del CLSI⁶²; *C. parasilopsis* ATCC 22019 0.5-4.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y para *C. krusei* ATCC 6258 1.0-4.0 $\mu\text{g}/\text{ml}^2$.

De las cepas de referencia, *M. furfur* CBS 7982 no se observó un crecimiento en el control, pero en la concentración de 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de las microplacas con lisina, se obtuvo un crecimiento. Por lo tanto esta cepa se diferenció de las demás por presentar un crecimiento heterogéneo en este método.

No se observó inhibición a ninguna concentración de L-lisina y L-treonina en las cepas evaluadas (Tabla 8).

Respecto a las cepas atípicas de *M. furfur* (45.1 PV, 45.1, 28A1), se determinó que tienen crecimiento heterogéneo a comparación de las cepas de

referencia. Cuatro de las cepas atípicas (MTB, 1828 PV, 39C1) no presentaron crecimiento en las microplacas (Figuras 15, 16 y 17), pero en el control del inculo realizado en las placas de Dixon se observaron colonias incontables.

Al comparar el crecimiento entre las cepas de referencia con las cepas atípicas de *M. furfur*, se observó una diferencia respecto al tamaño visualizado en las microplacas. La cepa *M. furfur* 13MC solo presento crecimiento en el control en la microplaca con L-lisina.

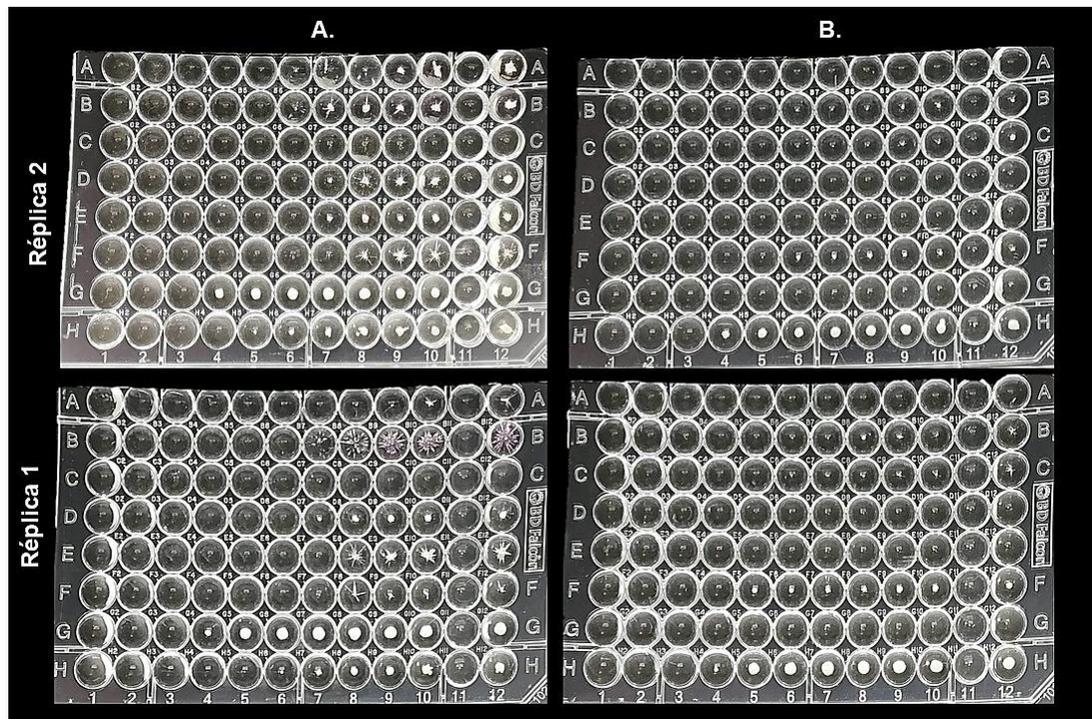


Figura 15. Resultado de placas sensibilizadas con Anfotericina B e inoculadas con *Malassezia* spp y *Candida* spp 6258

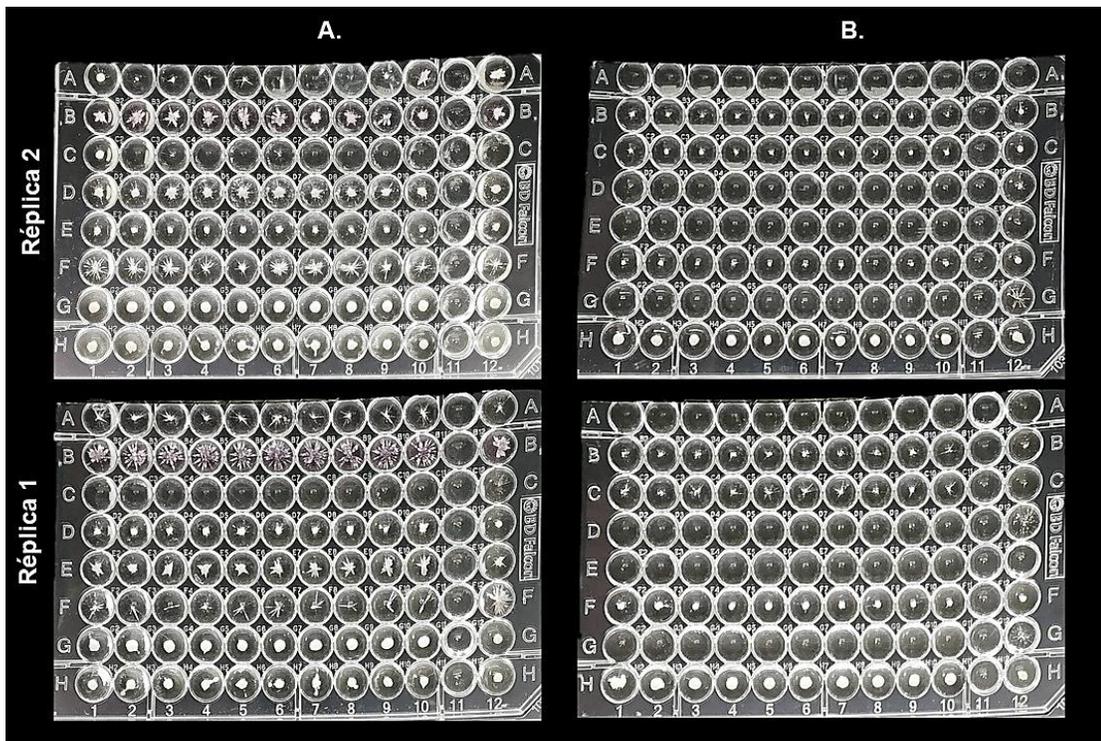


Figura 16. Resultado de placas sensibilizadas con L-lisina e inoculadas con *Malassezia* spp y *Candida* spp.

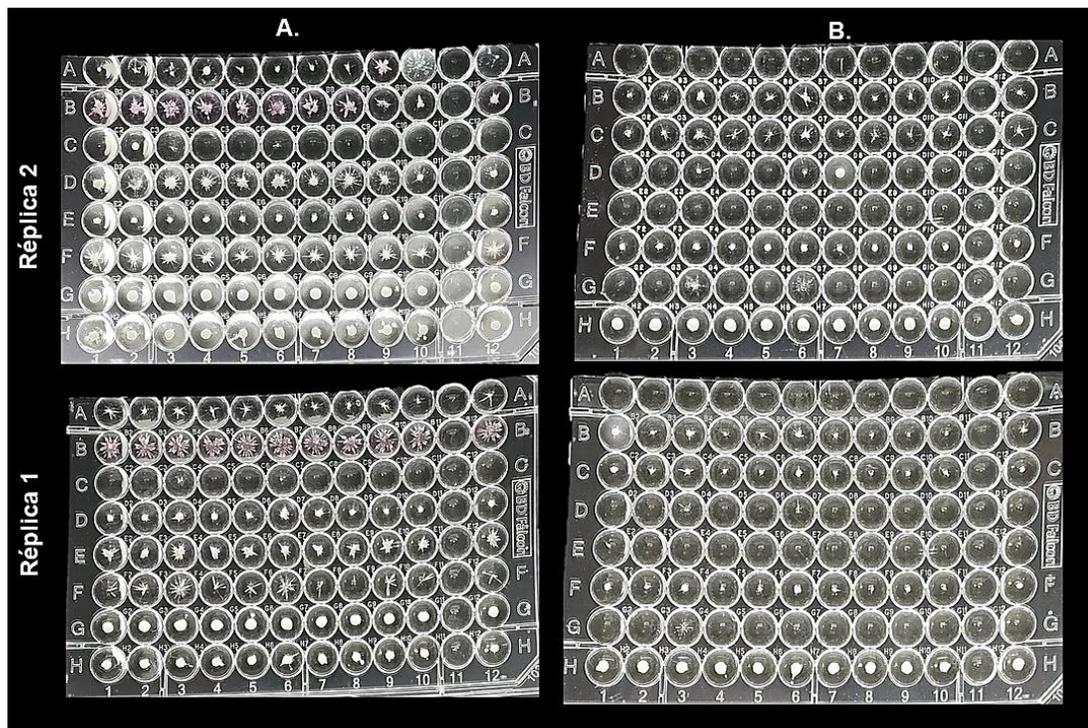


Figura 17. Resultado de placas sensibilizadas con L-treonina e inoculadas con *Malassezia* spp. y *Candida* spp.

Tabla 8. Sensibilidad *in vitro* de *Malassezia* spp. y *Candida* spp. a Anfotericina B, L-lisina y L-treonina.

Cepa	Antifúngico CMI (µg/ml)		
	Anfotericina B	Lisina	Treonina
<i>M. furfur</i> CBS 7019	0.25	>16	>16
<i>M. furfur</i> CBS 1878	0.5	>16	>16
<i>M. furfur</i> CBS 7982	-	-	-
<i>M. furfur</i> CBS 6094	0.25	>16	>16
<i>M. furfur</i> MTB	-	-	-
<i>M. furfur</i> 45.1 PV	0.5	>16	>16
<i>M. furfur</i> 45.1	0.5	>16	>16
<i>M. furfur</i> 1828 PV (INS)	-	-	-
<i>M. furfur</i> 39C1	-	-	-
<i>M. furfur</i> 28A1	1	>16	>16
<i>M. furfur</i> 13MC	-	-	-
<i>M. furfur</i> 4DS	0.25	>16	>16
<i>M. pachydermatis</i> CBS 1879	0.25	>16	>16
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	2	>16	>16
<i>C. parasilopsis</i> ATCC 22019	1	>16	>16

5.3.1 Técnica de macrodilución

En la evaluación de la técnica de macrodilución a concentraciones más altas: 160 µg/ml, 80 µg/ml y 40 µg/ml, de los inhibidores (Lisina y Treonina), se evidenció crecimiento en todas las concentraciones ensayadas de las cepas de referencia *M. furfur* CBS 1878, *M. furfur* CBS 6094, *M. furfur* CBS 7019, *M. furfur* CBS 7982 *M. pachydermatis* CBS 1879 y *C. krusei* ATCC 6258 como control (Figura 18).

Las cepas atípicas de *M. furfur* demostraron un comportamiento diferente, ya que en la lectura final a las 72 horas no se observó crecimiento, ni siquiera en el control (medio sin inhibidor). Se leyeron 24 horas después (96 horas) y se logró ver crecimiento en presencia de los inhibidores evaluados, pero en comparación con

las cepas de referencia de *M. furfur*, su crecimiento no se evidencio de igual modo, lo que se correlaciona con los datos obtenidos en el ensayo de microdilución.



Figura 18. Macrodilución de L-lisina y L-treonina. A. *M. furfur* CBS 1878, B. *M. furfur* CBS 6094, C. *M. furfur* 13MC, D. *M. pachydermatis* CBS 1878, E. *C. krusei* ATCC 6258, F. *M. furfur* 4DS. De izquierda a derecha 40, 80 160 ug/µl de lisina, 40, 80 160 ug/µl de treonina y el ultimo tubo correspondia al control de crecimiento.

5.3.2 Técnica de difusión disco en agar Dixon

En la evaluación de los inhibidores en sensidiscos a concentraciones de: 160 µg/ml, 80 µg/ml, 40 µg/ml y 20 µg/ml en placas de agar Dixonm, medio óptimo para el crecimiento de *Malassezia*, se obtuvo crecimiento de todas las cepas a todas concentraciones evaluadas de los inhibidores.

Respecto a la difusión en disco en agar Dixonm, no se evidencio inhibición a ninguna concentración de los sensidiscos sensibilizados con L-lisina y L-treonina. Como control positivo de antifúngico se usó Voriconazol 1 µg/ml (BD BBL), todas las cepas fueron sensibles al antifúngico excepto la cepa *M. furfur* CBS 1878 y *M. furfur* 28A1, posiblemente el sensidisco no tuvo un buen contacto con la placa de Dixonm (Figuras 19-22).



Figura 19. Prueba de sensibilidad de L-lisina, difusión en agar Dixon de las cepas de referencia de *M. furfur*.

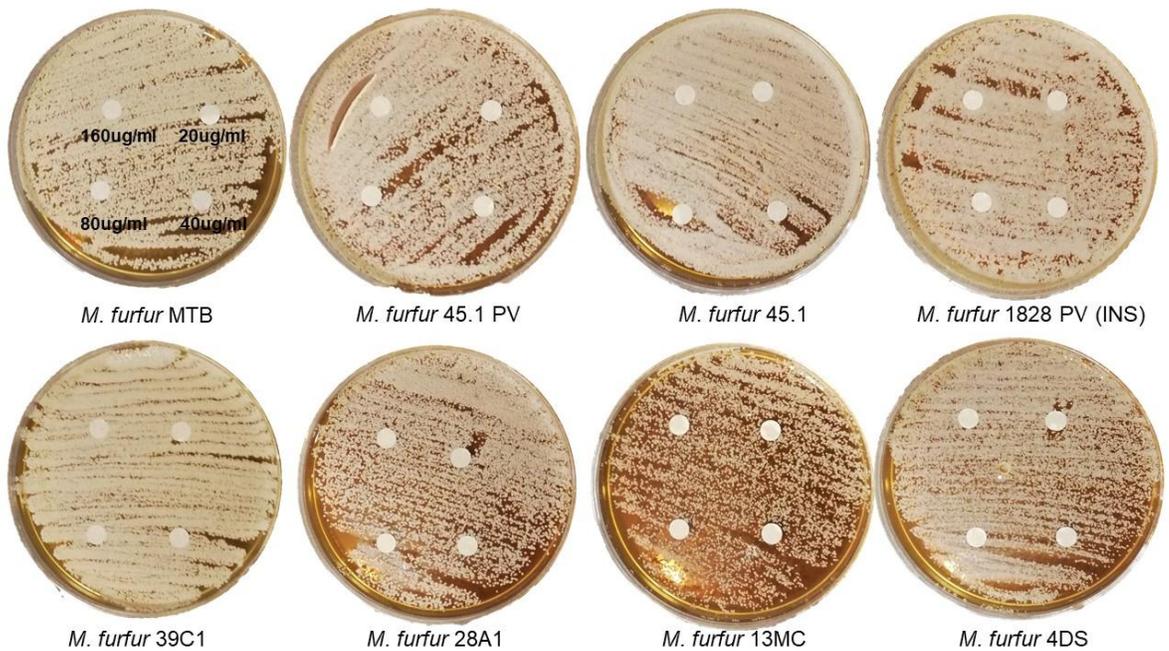


Figura 20. Prueba de sensibilidad de L-lisina, en difusión en agar Dixon de las cepas atípicas de *M. furfur*.



Figura 21. Prueba de sensibilidad de L-treonina, difusión en agar Dixon cepas de referencia de *M. furfur*.

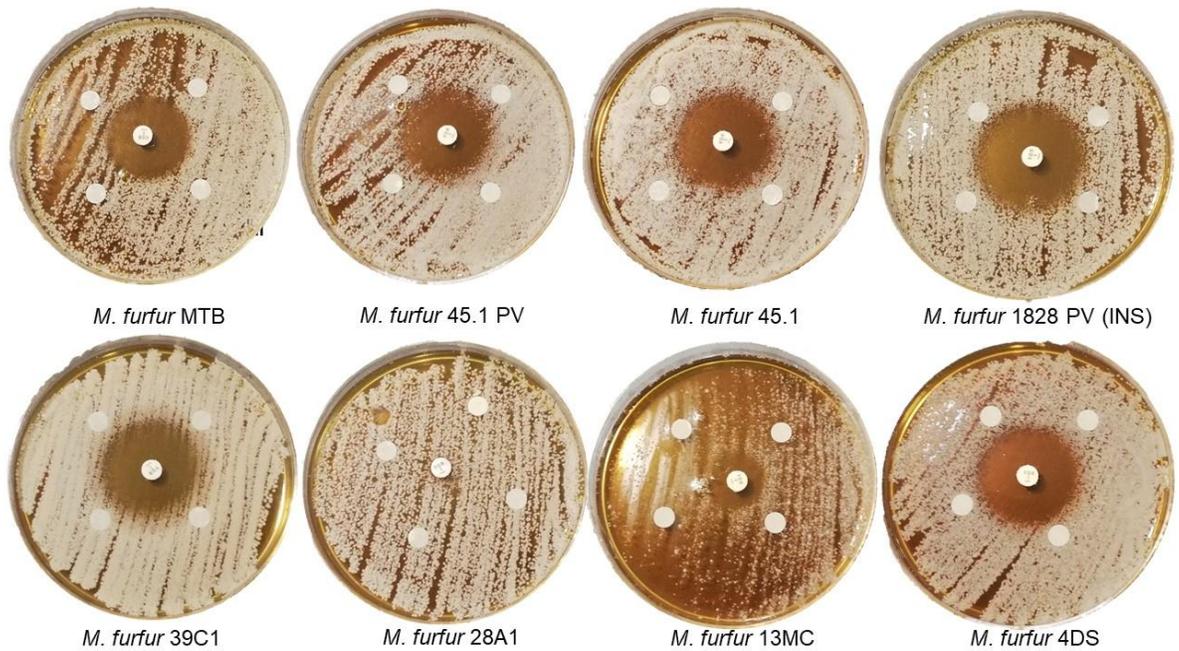


Figura 22. Prueba de sensibilidad de L-treonina, difusión en agar Dixon. *M. furfur* 45.1; *M. furfur* 1828 PV (INS); *M. furfur* 39C1; *M. furfur* 28A1; *M. furfur* 13MC; *M. furfur* 4DS.

6. DISCUSIÓN

En este estudio, se confirmó el patrón atípico de las cepas estudiadas con algunas variaciones. Mediante los análisis filogenéticos con ITS y LSU se confirmó la posición taxonómica de los aislados dentro del clado del complejo de especies de *M. furfur*. Un análisis adicional con la región de RPB2 mostró que nuestros aislados corresponden a una especie potencialmente nueva para el género, al mostrar una distancia filogenética de aproximadamente 6% respecto a la cepa tipo de *M. furfur*. No se observó inhibición del crecimiento con L-lisina y L-treonina en las técnicas de sensibilidad antifúngica *in vitro*, evaluadas en el estudio.

Las cepas de *M. furfur* atípica incluidas en este estudio, fueron caracterizadas fenotípicamente en el estudio de González *et al.*⁵, quienes reportaron la asimilación atípica de Tween 80. No obstante, con base en la implementación de los mismos acercamientos fisiológicos y bioquímicos, encontramos diferencias relacionadas con la asimilación de Tween. Las cepas atípicas evaluadas, fueron capaces de asimilar levemente Tween 40 (monopalmitato de polioxietilen (20)sorbitano) y Tween 60 (monoestearato de polioxietilen(20)sorbitano), sin embargo mantuvieron un fuerte patrón de asimilación del Tween 80 (monooleato de polioxietilen(20)sorbitano). Adicionalmente, estas cepas mantuvieron la ausencia de asimilación de Tween 20 (monolaurato de polioxietilen(20)sorbitano)⁵. Estas diferencias en los perfiles de asimilación de Tween pueden ser debido a diversos factores como variaciones relacionadas con la implementación de la técnica, variabilidad y plasticidad fenotípica ó versatilidad metabólica^{89, 90}.

La técnica de asimilación de Tween es un método estándar de identificación de especies de *Malassezia*. Sin embargo, no es un método estandarizado y es dependiente del inóculo y de la difusión del Tween en el agar Sabouraud. La interpretación de esta metodología está sujeta al individuo que la está evaluando y con el incremento en el número de especies y la semejanza en los patrones de asimilación (por ejemplo *M. furfur* y *M. yamatoensis* entre otros), se hace

indispensable incluir identificación molecular para definir correctamente las especies dentro de este género⁹¹. Adicionalmente, la presencia de pequeñas trazas de lípidos, puede influir en la interpretación de la prueba como ha sido sugerido por otros autores³⁴.

Estudios previos han descrito la presencia de otros fenotipos diferentes en *M. furfur* con asimilación atípica de Cremophor EL y aislamientos no lípido dependientes, igualmente se ha descrito una amplia variabilidad a nivel macro y microscópico. La presencia de estos fenotipos ha sido relacionada con la capacidad de adaptación de estas especies a su hospedero^{91, 92, 93}. Estas diferencias pueden estar relacionadas con variabilidad metabólica debido a cambios en el contenido lipídico en las regiones anatómicas que estas levaduras colonizan e incluso en la adaptabilidad en los procesos de diseminación en torrente sanguíneo en las cuales también pueden estar asociadas^{7,89}.

Estudios de reconstrucción metabólica y balance de flujo demostraron la amplia versatilidad metabólica de este género y propusieron que estas variaciones podrían explicar las diferencias en los perfiles de asimilación de Tween. Dichos estudios igualmente demostraron que *M. furfur* fue la única especie capaz de usar Tween 40 en contraste con la cepa atípica, debido probablemente a defectos en la activación del ácido palmítico⁷.

La alta variabilidad en *M. furfur* puede estar relacionada también con plasticidad fenotípica, la cual se refiere al conjunto de fenotipos que puede producir un único genotipo al estar expuesto a diferentes condiciones ambientales. Mallick *et al*, describieron la plasticidad fenotípica en *Candida* spp, demostrando características diferentes en su virulencia con los ensayos *in vivo* realizados a diferentes temperaturas en peces cebras, utilizaron estos peces como un modelo para evaluar el sistema inmunitario frente a la infección con *Candida* spp, demostrando a que temperaturas más altas de 30 °C y 33 °C, las células blancas fueron más virulentas que las células opacas a esa temperatura⁹⁴.

Como reportó González *et al.*, se obtuvo producción de pigmento a una temperatura de 37 °C, pero no a 42°C. *M. furfur*, es la única especie capaz de utilizar el triptófano como fuente de nitrógeno para su crecimiento en este medio y debido a su metabolización se produce el pigmento oscuro, lo cual está correlacionado *in vivo*, a las lesiones características en los humanos al producir hiperpigmentaciones en la piel del huésped⁵⁴. La ausencia de crecimiento y formación de pigmento a 42 °C puede estar relacionado con la presencia de un ambiente hostil para estas levaduras. En *Malassezia* la temperatura óptima de crecimiento se ha descrito entre 32 – 34 °C, sin embargo recientemente se reportó la presencia de una nueva especie *M. vespertilionis* la cual es capaz de crecer en rangos de temperatura entre 7 – 10 °C con una óptima de crecimiento de 24°C, lo cual denota la capacidad de adaptación de estas levaduras, sin embargo, el crecimiento disminuyó a temperaturas superiores de 40 °C^{29, 91}.

Pese a la variabilidad fenotípica en *M. furfur* y su relación con la presencia de aislamientos de *M. furfur* atípica, otros acercamientos sugieren la presencia de una nueva especie, como son, la diferencia en el tamaño de los genomas, en el contenido y metabolismo de lípidos y su modo de infección en el modelo murino^{7,9}. El análisis multilocus propuesto en este estudio nos permitió confirmar que estos aislamientos atípicos se encuentran filogenéticamente relacionados con el complejo *M. furfur*. No obstante, aunque la región ribosomal LSU no permitió resolver a *M. furfur* atípica como una nueva especie, la secuencia de RPB2 puede ser propuesta como un marcador útil para resolver nuevas especies dentro del género *Malassezia*.

En este sentido, González *et al.*, 2009 mediante el análisis de las secuencias ITS, 5.8S y D1/D2 28S RNA no lograron resolver la posición taxonómica de *M. furfur* atípica, lo cual confirmamos en este estudio. Sin embargo, otros estudios sugieren que el análisis de estas regiones ribosomales, en conjunto con la región codificante TEF1 (factor de elongación 1), permitieron la diferenciación entre *M. restricta* y *M. arunalokei* y el reporte de esta última como una especie nueva²⁸. No obstante, a la fecha el uso de genes codificantes dentro de la taxonomía del género no ha sido

explorada para todas las especies. Uno de los marcadores propuestos es β -tubulina que ha sido utilizado dentro de la evaluación de diversidad intra específica en *M. pachydermatis*. Respecto al gen RPB2, aunque, no se ha utilizado totalmente taxonomía de *Malassezia*, en la última especie aceptada dentro del género, *M. vespertilionis*²⁹, se demostró su utilidad en la descripción de nuevas especies. Por otro lado, este gen ha sido propuesto previamente en otros géneros como un marcador molecular con potencial para la identificación de especies nuevas en géneros como *Penicillium*, *Talaromyces* y *Neocosmospora*, además en estos géneros se acepta que distancias filogenéticas superiores a 2% con genes codificantes de proteínas son suficientes para la proposición de especies nuevas^{95, 96, 97, 98}.

Por otro lado, en este estudio fue evaluada la actividad antifúngica *in vitro* de los posibles candidatos como inhibidores L-lisina y L-treonina, según los resultados obtenidos en los protocolos utilizados, ninguno de los candidatos demostró inhibición frente a las cepas de *M. furfur* de referencia, *M. furfur atípica*, *M. pachydermatis* y *Candida* spp.

Previamente en un estudio realizado por Pascale *et al.*, se demostró inhibición de microorganismos como *S. cerevisiae*, *C. neoformans*, mediante ensayos enzimáticos y cinética de inhibición, ensayaron seis inhibidores de la homosiderina quinasa, enzima implicada en la producción de aminoácidos necesaria para el crecimiento de estos microorganismos. Dos de los inhibidores (1-(naphthalen-2-yl) prop-2-en-1-one, 3,6-Dimethyl-1-phenylpyrazolo[5,4-b]pyridin-4-ol) presentaron actividad antifúngica *in vitro*, usando concentraciones de 0 – 128 ug/ml y se estableció que la CMI obtenida reduce el crecimiento de estos microorganismos a un 80%⁹⁹.

Matijevi *et al.*, demostró utilizando ácido N-phthaloyl-amino, sustancia sintetizada por el aminoácido Glicina, la actividad antibacteriana y antifúngica de este inhibidor, donde la actividad antibacteriana obtuvo mejores resultados y

también se observó sensibilidad antifúngica en el método de difusión en agar Mueller-Hinton, a concentraciones de 1.000–0.500mg/ml del inhibidor, frente a diferentes especies de *Candida*. (*C. tropicalis*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parasilopsis*, *C. krusei*), *C. neorformans*, *Geotrichum* sp, *S. cerevisiae*¹⁰⁰. Lo que sugiere que algunos aminoácidos pueden funcionar como posibles candidatos de inhibición del crecimiento de levaduras.

En el género *Malassezia* no hay protocolos estándar para llevar a cabo las pruebas de sensibilidad a compuestos antifúngicos y esta es la principal limitante en el momento de realizar este tipo de acercamientos y tamizajes con nuevas moléculas. Una variable importante en este estudio fue el medio utilizado en las técnicas de sensibilidad antifúngica, se demostró que para algunas cepas el medio no tenía los suficientes componentes nutricionales ideales para el desarrollo de *M. furfur* y *M. furfur* atípica. En un medio no óptimo las cepas atípicas y *M. furfur* CBS 7982, no suplió todos los requerimientos nutricionales, aunque se le agregó 0.5% de Tween 40 y 0.1% de Tween 80, no fue suficiente para su crecimiento al tener una baja cantidad de ácidos grasos necesarios para su metabolismo. Por lo anterior, presentaron una heterogeneidad en su crecimiento, en las técnicas de microdilución y macrodilución respecto al comportamiento de las cepas de referencia, además se probaron los inhibidores por el método de difusión en agar Dixonm, en el que todas las cepas tuvieron un crecimiento homogéneo en presencia de los inhibidores. En estudios realizados de sensibilidad antifúngica *in vitro*, utilizando este medio y suplementado con estos porcentajes se obtuvo un buen crecimiento para las especies de *M. globosa* y *M. restricta* y *M. pachydermatis*^{68, 69}, lo que podría explicar que las cepas atípicas de *M. furfur*, necesitan de una mayor cantidad de estas sustancias lipídicas para su crecimiento.

CONCLUSIONES

Se llevó a cabo la confirmación fenotípica de las cepas identificadas como *M. furfur* atípica, sin embargo, se observaron leves diferencias con respecto a los reportes previos. Las pruebas de sensibilidad antifúngica arrojaron resultados discordantes, dada la presencia de un crecimiento homogéneo en las cepas de referencia, mientras un crecimiento heterogéneo en las cepas atípicas.

El análisis filogenético multilocus, permitió confirmar la relación de *M. furfur* atípica con el complejo *M. furfur*. Además, se propone a RPB2 como un buen marcador molecular para la identificación de especies potencialmente nuevas para el género.

El medio de cultivo caldo urea suplementado utilizado en este estudio no tuvo el mejor rendimiento para las cepas atípicas de *M. furfur* debido a la presencia de un crecimiento heterogéneo en los ensayos realizados. Es necesario estandarizar un medio óptimo para la implementación de estas técnicas, en levaduras lípido-dependientes como *Malassezia*.

Los candidatos propuestos como potenciales inhibidores, Treonina y Lisina, no tuvieron efecto inhibitorio en el crecimiento de las cepas de *M. furfur* y *M. furfur* atípica mediante la evaluación con técnicas de sensibilidad *in vitro*. Se sugiere realizar modificaciones en la técnica que optimicen la actividad de dichos inhibidores.

Se sugiere realizar nuevos estudios que permitan resolver la posición taxonómica de *M. furfur* atípica, como la inclusión en los análisis multilocus de genes codificantes de proteínas como RPB1, RPB2, TEF1 (Factor de elongación), MCM7 (Proteína 7 de mantenimiento de mini-cromosomas), CHS2; genes aceptados actualmente para la diferenciación taxonómica a nivel de especies y para la

evaluación de su diversidad^{28, 29, 101}, además de modificaciones en las técnicas de sensibilidad que optimicen la evaluación de los inhibidores candidatos.

REFERENCIAS

1. Celis A, Wösten H, Triana S, Restrepo S, Cock H. *Malassezia* spp. beyond The Mycobiota. SMDJ [Internet]. 2017 Noviembre [Citado 2018 marzo 17]; 3(3):1019. Disponible en: <https://dspace.library.uu.nl/handle/1874/359018>
2. Sugita T, Boekhout T, Velegriaki A, Guillot J, Hađina S, Cabañes J. Epidemiology of *Malassezia*-related skin diseases. En: Boekhout T, Guého E, Mayser P, Velegriaki A, editors. *Malassezia* and the skin. 1ra ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. 2010 [Citado 2018 marzo 17]; pp. 65–119. Disponible en: <http://www.westerdijkinstituut.nl/images/ResearchGroups/Publications/2010Sugita0001.pdf>
3. Dankner W, Spector S, Fierer J, Davis C. *Malassezia* fungemia in neonates and adults: complication of hyperalimentation. JSTOR [Internet]. 1987 [Citado 2018 marzo 17]; (4). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3125578>
4. Rincón S, Celis A., Sopo L, Motta A., Cepero M. *Malassezia* yeast species isolated from patients with dermatologic lesions. Biomédica [Internet]. 2005 [Citado 2018 marzo 17]; 25(2). Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572005000200005
5. González A, Sierra R, Cárdenas E, Grajales A, Restrepo S, Cepero M, *et al.* Physiological and Molecular Characterization of Atypical Isolates of *Malassezia furfur*. JCM [Internet]. 2009 [Citado 2018 marzo 17]; 47(1):48-53. Disponible en: <http://jcm.asm.org/content/47/1/48.full#xref-fn-1-1>
6. Wu G, Zhao H, Li C, Rajapakse P, Wong C, Xu J, *et al.* Genus-Wide Comparative Genomics of *Malassezia* Delineates Its Phylogeny, Physiology, and Niche Adaptation on Human Skin. PLoS Genet. [Internet]. 2015 [Citado 2018 Agosto 13]; 11(11):e1005614. Disponible en: <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005614>

7. Triana S, Cock H, Ohm R, Danies G, Wösten H, Restrepo S, *et al.* Lipid Metabolic Versatility in *Malassezia spp.* Yeasts Studied through Metabolic Modeling. *Front Microbiol* [Internet]. 2017 [Citado 2018 marzo 17]. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01772>
8. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community Huzefa A. Raja†, Andrew N. Miller‡, Cedric J. Pearce§, and Nicholas H. Oberlies*
9. Molina A, Celis A. Evaluación de la colonización de aislamientos de *Malassezia furfur* cepa CBS 1878 y *Malassezia furfur* con asimilación de Tween 80 Cepa 4DS, causantes de dermatitis atópica en modelo murino. [Internet]. Universidad de los Andes. 2014 [Citado 2018 marzo 17]; Disponible en: https://biblioteca.uniandes.edu.co/visor_de_tesis/web/?SessionID=L1Rlc2IzXzEyMDE0MjAvNDA3MC5wZGY%3D
10. Rojas F, Sosa M, Fernández M, Cattana M, Córdoba S, Giusiano G. Antifungal susceptibility of *Malassezia furfur*, *Malassezia sympodialis*, and *Malassezia globosa* to azole drugs and amphotericin B evaluated using a broth microdilution method. *Med Mycol* [Internet]. 2014 [Citado 2018 marzo 17]; 52(6). Disponible en: <https://doi.org/10.1093/mmy/myu010>
11. Leong C, Buttafuoco A, Glatz M, Bosshard P. Antifungal Susceptibility Testing of *Malassezia spp.* with an Optimized Colorimetric Broth Microdilution Method. *JCM* [Internet]. 2017 [Citado 2018 marzo 17]; 55(6):1883-1893. Disponible en: <http://jcm.asm.org/content/55/6/1883.full#T4>
12. Camelo L, Triana S, Celis A, Reyes A, González A. Estudio de la Enzima Homocitrato Sintasa de *Malassezia pachydermatis* como Candidata a Blanco Terapéutico y Evaluación del Efecto de la L-Lisina como Inhibidor Mediante Docking Molecular. Universidad de los Andes. 2017 [Citado 2018 marzo 17].

13. Rodríguez N, Celis A, González A. Purificación de la enzima homoserina deshidrogenasa de *Malassezia furfur* y detección de treonina como inhibidor competitivo a partir de la actividad enzimática y los parámetros cinéticos. Universidad de los Andes.
14. Moore M. *Malassezia furfur* the cause of tinea versicolor: cultivation of the organism and experimental production of the disease. Arch Dermatol. [Internet]. 1940 [Citado 2018 abril 15]; 41:253-261. Disponible en: <https://jamanetwork.com/journals/jamadermatology/article-abstract/519402>
15. Bailon H. Traité de botanique médicale cryptogamique. BHL. [Internet]. 1889 [Citado 2018 abril 15]; 234-239. Disponible en: <https://www.biodiversitylibrary.org/bibliography/5409#/summary>
16. Sabouraud R. Malasies du cuir chevelu. [Internet]. 1904 [Citado 2018 abril 15]; Disponible en: <https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k5724249d.texteImage>
17. Castellani A. Chalmers A. Manual of tropical medicine. [Internet]. 1913. [Citado 2018 abril 15]. Disponible en: <https://catalog.hathitrust.org/Record/011681469>
18. Sloof, W. C. 1971. Genus Pityrosporum, p. 1167-1186. In Lodder (ed.), The yeasts, 2nd ed. North-Holland Publishing, Amsterdam, The Netherlands.
19. Cannon P. International Commission on the taxonomy of fungi (ICTF): name changes in fungi of microbiological, industrial and medical importance. Microbiol Sci [Internet]. 1986 [Citado 2018 marzo 17]; 3:285-287. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3153589>
20. Guého E, Midgley G, Guillot J. The genus *Malassezia* with description of four new species. Antonie van Leeuwenhoek. [Internet]. 1996. [Citado 2018 abril 15]; 69:337-355. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8836432>
21. Sugita T, Takashima M, Shinoda T, Suto H, Unno T, Tsuboi R, *et al.* New Yeast Species, *Malassezia dermatis*, Isolated from Patients with Atopic

- Dermatitis. JMC [Internet]. 2002 [Citado 2018 marzo 22]; 40(4):1363-1367. Disponible en: <http://jcm.asm.org/content/40/4/1363>
22. Sugita T, Takashima M, Kodama M, Tsuboi R, Nishikawa A. Description of a New Yeast Species, *Malassezia japonica*, and Its Detection in Patients with Atopic Dermatitis and Healthy Subjects. JCM [Internet]. 2003 [Citado 2018 marzo 22]; 41(10):4695-4699. Disponible en: <http://jcm.asm.org/content/41/10/4695>
23. Sugita T, Tajima M, Takashima M, Amaya M, Saito M, Tsuboi R, *et al.* A New Yeast, *Malassezia yamatoensis*, Isolated from a Patient with Seborrheic Dermatitis, and Its Distribution in Patients and Healthy Subjects. Med. Microbiol. Immunol [Internet]. 2004 [Citado 2018 marzo 22]; 48(8):579–583. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1348-0421.2004.tb03554.x>
24. Hirai A, Kano R, Makimura K, Robson E, Soares J, Lachance M, *et al.* *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. IJSB [Internet]. 2004 [Citado 2018 marzo 22]; 54:623-627. Disponible en: <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/54/2/623.pdf?expires=1522277504&id=id&accname=guest&checksum=A26067D7AA0D607FDBA6D1C7D11205A6>
25. Cabañes J, Theelen B, Castellá G, Boekhout T. Two new lipid-dependent *Malassezia* species from domestic animals. FEMS Yeast Res [Internet]. 2007 [Citado 2018 marzo 22]; 7(6):1064–1076. Disponible en: <https://academic.oup.com/femsyr/article/7/6/1064/532248>
26. Cabañes J, Vega S, Castellá G. *Malassezia cuniculi* sp. nov., a novel yeast species isolated from rabbit skin. Med Mycol [Internet]. 2011 [Citado 2018 marzo 22]; 49(1):40-48. Disponible en: <https://academic.oup.com/mmy/article/49/1/40/1390469>
27. Cabañes J, Coutinho S, Puig L, Bragulat M, Castellá G. New lipid-dependent *Malassezia* species from parrots. Rev Iberoam Micol [Internet]. 2016 [Citado

- 2018 marzo 22]; 33(2):92-99. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1130140616300031?via%3Dihub>
28. Honnavar P, Prasad G, Ghosh A, Dogra S, Handa S, Rudramurthy S. *Malassezia arunaloeki* sp. nov. , a novel yeast species isolated from seborrhoeic dermatitis patients and healthy individuals from India. JCM [Internet]. 2016 [Citado 2018 marzo 22]. Disponible en: <http://jcm.asm.org/content/54/7/1826.full>
29. Lorch J, Palmer J, Vanderwolf K, Schmidt K, Verant M, Weller T, *et al.* *Malassezia vespertilionis* sp. nov.: a new cold-tolerant species of yeast isolated from bats. Persoonia [Internet]. 2018 [Citado 2018 marzo 25]; 41:56-70. Disponible en: <https://doi.org/10.3767/persoonia.2018.41.04>
30. Guého E, Boekhout T, Begerow D. Biodiversity, phylogeny and ultrastructure. En: Boekhout T, Guého E, Mayser P, Velegraki A, eds. *Malassezia* and the skin [Internet]. Berlin: Springer; 2010 [Citado 2018 marzo 25] p: 17-63. Disponible en: <http://www.westerdijkinstituut.nl/images/ResearchGroups/Publications/2010Sugita0001.pdf>
31. Ahearn D, Simmons R. *Malassezia* Baillon. En: Kurtzman C, Fell J, eds. The yeast, a taxonomic study, 4a ed. [Internet]. Elsevier, Amsterdam; 1998 [Citado 2018 marzo 25] p: 782-784. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-044481312-1/50105-2>
32. Mittag H. Fine structural investigation of *Malassezia furfur*. II. The envelope of the yeast cells. Mycoses [Internet]. 1995 [Citado 2018 marzo 25]; 38(1-2):13-21. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7637677>
33. Brunke S, Hube B. MfLIP1, a gene encoding an extracellular lipase of the lipid-dependent fungus *Malassezia furfur*. Microbiology. [Internet]. 2006 [Citado 2018 Agosto 11]; 152:547-554. Disponible en: <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/152/2/547.pdf>

[?expires=1534839822&id=id&accname=guest&checksum=70294F820EA2BDBFA60806B9CB3C47A1](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179148)

34. Puig L, Bragulat M, Castellá G, Cabañes J. Characterization of the species *Malassezia pachydermatis* and re-evaluation of its lipid dependence using a synthetic agar medium. PLoS ONE.[Internet]. 2017 [Citado 2018 marzo 25]; 12(6):e0179148. Disponible en: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0179148>
35. Ro B, Dawson T. The role of sebaceous gland activity and scalp microfloral metabolism in the etiology of seborrheic dermatitis and dandruff. J Investig Dermatol Symp Proc. [Internet]. 2005 [Citado 2018 marzo 25]; 10:194-197. Disponible en: [https://www.jidsponline.org/article/S0022-202X\(15\)52586-4/fulltext](https://www.jidsponline.org/article/S0022-202X(15)52586-4/fulltext)
36. Færgeman NJ, Black PN, Zhao XD, Knudsen J, DiRusso CC. The Acyl-CoA Synthetases encoded within FAA1 and FAA4 in *Saccharomyces cerevisiae* function as components of the fatty acid transport system linking import activation, and intracellular utilization. J Biol Chem. 2001; 276:37051-37059.
37. Wang CW. Lipid droplet dynamics in budding yeast. Cell Mol Life Sci. 2015; 72: 2677-2695.
38. Mayser P, Gaitanis G. Physiology and biochemistry. In: *Malassezia* and the skin: science and clinical practice. Boekhout T, Guého-Kellermann E, Mayser P, Velegaki A (Eds.). 2010 Springer Science & Business Media, Germany: 121-137.
39. Furue M, Takahara M, Nakahara T, Uchi H. Role of AhR/ARNT system in skin homeostasis. Arch Dermatol Res. [Internet]. 2014 [Citado 2018 abril 15]; 306:769-779. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4220966/>
40. Angiolella L, Leone C, Rojas F, Mussin J, de Los Angeles Sosa M, Giusiano G. Biofilm, adherence, and hydrophobicity as virulence factors in *Malassezia furfur*. Med Mycol [Internet]. 2017 [Citado 2018 abril 5]; 56:110-1116. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/mmy/myx014>

41. Coelho M, Sampaio J, Gonçalves P. Living and Thriving on the Skin: *Malassezia* Genomes Tell the Story. mBio [Internet]. 2013 [Citado 2018 abril 5]; 4(2). Disponible en: <http://mbio.asm.org/content/4/2/e00117-13.full>
42. Ashbee H, Evans E. Immunology of diseases associated with *Malassezia* species. Clin Microbiol Rev [Internet]. 2002 [Citado 2018 abril 5]; 15:21–57. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC118058/>
43. Zomorodian K, Mirhendi H, Tarazooie B. Molecular analysis of *Malassezia* species isolated from hospitalized neonates. Pediatr Dermatol [Internet]. 2008 [Citado 2018 abril 5]; 25:312–316. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1525-1470.2008.00673.x>
44. Gaitanis G, Magiatis P, Hantschke M, Bassukas I, Velegraki A. The *Malassezia* Genus in Skin and Systemic Diseases. CMR [Internet]. 2012 [Citado 2018 marzo 20]; 1:106-141. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3255962/>
45. Velegraki A, Cafarchia C, Gaitanis D, Iatta R, Boekhout T. *Malassezia* infections in humans and animals: pathophysiology, detection, and treatment. PLOS Pathog [Internet]. 2015 [Citado 2018 abril 5]; 11. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.1371%2Fjournal.ppat.1004523>
46. Borda L, Wikramanayake T. Seborrheic dermatitis and dandruff: a comprehensive review. J Clin Investig Dermatol [Internet]. 2015 [Citado 2018 abril 5]; 3(2). Disponible en: <https://doi.org/10.13188/2373-1044.1000019>
47. Gaitanis G, Mayser P, Scheynius A, Cramer A. *Malassezia* Yeasts in Seborrheic and Atopic Eczemas. En: *Malassezia* and the skin: science and clinical practice. Boekhout T, Guého-Kellermann E, Mayser P, Velegraki A, Eds. [Internet] Alemania: Springer Science & Business Media; 2010 [Citado 2018 abril 5] p: 201-228. Disponible en: <http://www.westerdijkinstituut.nl/images/ResearchGroups/Publications/2010Sugita0001.pdf>

48. Harada K, Saito M, Sugita T, Tsuboi R. *Malassezia* species and their associated skin diseases. J. Dermatol [Internet]. 2015 [Citado 2018 abril 5]; 42:250-257. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/1346-8138.12700>
49. Gaitanis G, Velegriaki A, Mayser P, Bassukas I. Skin diseases associated with *Malassezia* yeasts: facts and controversies. Clin Dermatol [Internet]. 2013 [Citado 2018 abril 5]; 31:455-463. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2013.01.012>
50. Tragiannidis A, Groll A, Velegriaki A, Boekhout T. *Malassezia* Fungemia, Antifungal Susceptibility Testing and Epidemiology of Nosocomial Infections. Boekhout T, Guého-Kellermann E, Mayser P, Velegriaki A, Eds. En: *Malassezia* and the skin: science and clinical practice [Internet] Alemania: Springer Science & Business Media; 2010 [Citado 2018 abril 5] p: 221-251. Disponible en: <http://www.westerdijkinstituut.nl/images/ResearchGroups/Publications/2010Sugita0001.pdf>
51. Curvale-Fauchet N, Botterel F, Legrand P, Guillot J, Bretagne S. Frequency of intravascular catheter colonization by *Malassezia* spp. in adult patients. Mycoses [Internet]. 2004 [Citado 2018 abril 5]; 47:491-494. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2013.01.012>
52. Hay B, Midgley H. *Malassezia* yeasts from a historical perspective. Boekhout T, Guého-Kellermann E, Mayser P, Velegriaki A, Eds. En: *Malassezia* and the skin: science and clinical practice [Internet]. Alemania: Springer Science & Business Media; 2010 [Citado 2018 abril 10] p: 221-251. Disponible en: <http://www.westerdijkinstituut.nl/images/ResearchGroups/Publications/2010Sugita0001.pdf>
53. Guillot, J., E. Guého, M. Lesourd, G. Midgley, G. Chevrier, and B. Dupont. 1996. Identification of *Malassezia* species. J. Mycol. Med. 6:103-110.

54. Mayser P, Wille G, Imkampe A, Thoma W, Arnold N, Monsees T. Synthesis of fluorochromes and pigments in *Malassezia furfur* by use of tryptophan as the single nitrogen source. *Mycoses* [Internet]. 1998 [Citado 2018 abril 5]; 41:265-271. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9861829>
55. Mayser, P., P. Haze, C. Papavassilis, M. Pickel, K. Gruender, and E. Gueho. 1997. Differentiation of *Malassezia* species: selectivity of Cremophor EL, castor oil and ricinoleic acid for *M. furfur*. *Br. J. Dermatol.* 137:208-213.
56. Sugita T, Boekout T, Velegriaki A, Guillot J, Hadina S, Cabañes J. Epidemiology of *Malassezia*-related skin diseases. In:
57. Makimura K, Tamura Y, Kudo M, Uchida K, Saito H, Yagamuchi H. Species identification and strain typing of *Malassezia* species stock strains and clinical isolates based on the ADN sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *J. Med. Microbiol* [Internet]. 2000 [Citado 2018 abril 5]; 49: 29-35. Disponible en: <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/jmm/49/1/mjm4901.29.pdf?expires=1532308107&id=id&accname=guest&checksum=5F8A1CBF75ACD2DA402365414971B620>
58. Zhao Z, Liu H, Luo Y, Zhou S, An L, *et al.* Molecular evolution and functional divergence of tubulin superfamily in the fungal tree of life. *J. Nat* [Internet]. 2014 [Citado 2018 abril 5]; 4: 6746. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/srep06746.pdf>
59. Acevedo Y. Taxonomía molecular de aislamientos de *Fusarium* obtenidos a partir de muestras clínicas. UN [Internet]. 2013 [Citado 2018 abril 5]. Disponible en: <http://bdigital.unal.edu.co/11742/1/88031844.2014.pdf>
60. Vuran E, Karaarslan A, Karasartova D, Turegun B, Sahin F. Identification of *Malassezia* species from pityriasis versicolor lesions with a new multiplex PCR method. *Mycopathologia* [Internet]. 2014 [Citado 2018 abril 10]; 177:41-49. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11046-013-9704-6>

61. Akaza N, Akamatsu H, Sasaki Y, Takeoka S, Kishi M, Mizutani H, *et al.* Cutaneous *Malassezia* microbiota of healthy subjects differ by sex, body part and season. J Dermatol [Internet]. 2010 [Citado 2018 abril 10]; 37(9):786-792. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1346-8138.2010.00913.x>
62. Wayne, P. National Commite for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standards M27-A2. 2008. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).
63. Rex J. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast M27-A3. 2008. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).
64. Rex J. Method for antifungal disk difussion susceptibility testing of yeasts M44. 2009. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)
65. Canton E, Martin E, Espinel-Ingroff A. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). Rev Iberoam Micol. [Internet]. 2007 [Citado 2018 Mayo 20]. Disponible en: <http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo15.pdf>
66. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard, 2nd ed. Document M38-A2. Wayne: CLSI; 2008.
67. Galvis J, Rodriguez M, Pulido A, Castañeda R, Celis A, Linares Melva. Actividad antifúngica in vitro de azoles y anfotericina B frente a *Malassezia furfur* por el método de microdilución M27-A3 del CLSI y Etest®. Rev Iberoam Micol [Internet]. 2017 [Citado 2018 abril 10]; 34(2):89-93. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.riam.2016.05.004>
68. Cafarchia C, Figueredo L, Favuzzi V, Surico M, Colao V, LattolR, *et al.* Assessment of the antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* in various media using a CLSI protocol. Vet Microbiol [Internet]. 2012 [Citado 2018 abril 10]; 159(3-4):536-540. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.04.034>

69. Rincón S, Cepero de García M, Espinel-Ingroff A. A Modified Christensen's Urea and CLSI Broth Microdilution Method for Testing Susceptibilities of Six *Malassezia* Species to Voriconazole, Itraconazole, and Ketoconazole. J. Clin. Microbiol. [Internet]. 2006 [Citado 2018 abril 10]; 44(9):3429-3431. Disponible en: <http://jcm.asm.org/content/44/9/3429.full>
70. AJINOMOTO ANIMAL NUTRITION GROUP. Lisina Cristal. Ajinomoto. [Internet]. Brasil: AJINOMOTO; 2010 [Citado 2018 abril 10]. Disponible en: http://www.lisina.com.br/lisina_cristal_esp.aspx
71. Triana S, González A, Restrepo S, Celis A. New therapeutic targets in two species of *Malassezia* spp discovered by In silico enzyme deletion in their metabolic reconstruction. Repositorio Uniandes [Internet]. 2014 [Citado 2018 abril 10]; 1-25. Disponible en: <https://documentodegrado.uniandes.edu.co/documentos/9226.pdf>
72. Jastrzębowska K, Gabriel I. Inhibitors of amino acids biosynthesis as antifungal agents. J Amino Acids [Internet]. 2015 [Citado 2018 marzo 25]; 47(2):227-249. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4302243/>
73. Galili G. Regulation of Lysine and Threonine Synthesis. Plant Cell [Internet]. 1995 [Citado 2018 abril 10]; 7:899-906. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC160885/>
74. Bearer C, Neet K. Threonine Inhibition of the Aspartokinase-Homoserine Dehydrogenase I of *Escherichia coli*. Threonine Binding Studies, Biochemistry [Internet]. 1978 [Citado 2018 abril 10]; 17(17):3512-3516. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28752>
75. Schroeder A, Zhu C, Yanamadala S, Cahoon R, Arkus K, Wachsstock L, et al. Threonine-insensitive Homoserine Dehydrogenase from Soybean. JBC [Internet] 2010 [Citado 2018 abril 10]; 285(2):827-834. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.1074%2Fjbc.M109.068882>

76. Tsai P, Chien C, Yeh Y, Tung L, Chen H, Chang T, L *et al.* *Candida albicans* Hom6 is a homoserine dehydrogenase involved in protein synthesis and cell adhesion. *J Microbiol Immunol Infect* [Internet]. 2016 [Citado 2018 abril 10]; 20:1-9. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.imii.2016.03.001>
77. Crespo M, Abarca M, Cabanes F. Evaluation of different preservation and storage methods for *Malassezia* spp. *J. Clin. Microbiol.* [Internet]. 2000 [Citado 2018 Mayo 15]; 38:3872-3875. Disponible en: https://jcm.asm.org/content/38/10/3872?ijkey=9fcaa9f46a47815776232804c33761da868747bb&keytype2=tf_ipsecsha
78. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
79. Williams J, Kubelik A, Livak K, Rafalski J, Tingey S. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* [Internet]. 1990 [Citado 2018 Agosto 13]; 18:6531-6535. Disponible en: <https://academic.oup.com/nar/article-abstract/18/22/6531/1054266>
80. White J, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *Genetics and Evolution.* [Internet]. 1990 [Citado 2018 Agosto 13]; 315-321. Disponible en: <https://nature.berkeley.edu/brunslab/papers/white1990.pdf>
81. Vilgalys R, Hester M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus species*. *J Bacteriol.* [Internet]. 1990 [Citado 2018 Agosto 13]; 172(8):4238-46. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2376561>
82. Liu Y, Whelen S, Hall B. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Mol Biol Evol.* [Internet]. 1999 [Citado 2018 Agosto 13]; 16(12):1799-808. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10605121>
83. A synopsis of the saddle fungi (Helvella: Ascomycota) in Europe – species delimitation, taxonomy and typification. Skrede I, Carlsen T, Schumacher T.

- Persoonia. [Internet]. 2017 [Citado 2018 Agosto 13]; 39: 201–253. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5832953/>
84. Thompson J, Higgins D, Gibson T. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. [Internet]. 1994 [Citado 2018 Agosto 13]; 22:4673-80. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7984417>
85. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S; MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Mol Biol Evol. [Internet]. 2013 [Citado 2018 Agosto 13]; 30(12): 2725–2729. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3840312/>
86. Robert C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res. [Internet]. 2004 [Citado 2018 Agosto 13]; 32(5):1792-7. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
87. Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. Mol Biol Evol. [Internet] 2008 [Citado 2018 Agosto 13]; 25(7):1253-6. Disponible en: <https://academic.oup.com/mbe/article/25/7/1253/1045159>
88. Hall B. Building Phylogenetic Trees from Molecular Data with MEGA. Mol Biol Evol. [Internet] 2013 [Citado 2018 Agosto 13]; 30(5):1229-35. Disponible en: <https://academic.oup.com/mbe/article/30/5/1229/992850>
89. Celis A. Unraveling lipid metabolism in lipid-dependent pathogenic *Malassezia* yeasts. Doctoral dissertation, Utrecht University. [Internet] 2017 [Citado 2018 Agosto 13]; Disponible en: <https://dspace.library.uu.nl/bitstream/1874/356776/1/Celis.pdf>
90. Crespo M, Abarca M, Cabañes F. Evaluation of Different Preservation and Storage Methods for *Malassezia* spp. J Clin Microbiol. [Internet]. 2000 [Citado 2018 Agosto 13]; 38(10): 3872–3875. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC87498/>

91. E. Guého-Kellermann, T. Boekhout, D. Begerow, Biodiversity, Phylogeny and Ultrastructure, in: T. Boekhout, P. Mayser, E. Guého-Kellermann, A. Velegraki (Eds.), *Malassezia* Ski. Sci. Clin. Pract., Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2010: pp. 17–63.
92. Crespo M, Abarca M, Cabañes F. Atypical Lipid-Dependent *Malassezia* Species Isolated from Dogs with Otitis Externa. J. Clin. Microbiol. [Internet]. 2000 [Citado 2018 Agosto 11]; 38(6), 2383–2385. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC86813/>
93. Zinkeviciene A, Norkunas V, Citavicius D. Atypical non-lipid-dependent strains of *Malassezia furfur*. cent.eur.j.biol. [Internet]. 2012 [Citado 2018 Agosto 11]; 7: 241. Disponible en: <https://doi.org/10.2478/s11535-012-0018-3>
94. Mallick E, Bergeron A, Jones S, Newman Z, Brothers K, Creton R, *et al.* Phenotypic Plasticity Regulates *Candida albicans* Interactions and Virulence in the Vertebrate Host. Front Microbiol. [Internet]. 2016 [Citado 2018 Agosto 11]; 7:780. Disponible en: 10.3389/fmicb.2016.00780
95. Yilmaz N, Visagie C, Houbraken M, Frisvad J, Samson J. Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. Studies in Mycology. [Internet]. 2014 [Citado 2018 Agosto 17]; 78, 175-341. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4255554/>
96. Visagie C, Houbraken J, Frisvad J, Hong S, Klaassen C, Perrone G, *et al.* Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. Studies in mycology. 2014 [Citado 2018 Agosto 17]; 78, 343-371. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166061614000074?via%3Dihub>
97. Guevara-Suarez M, Sutton D, Gené J, García D, Wiederhold N, Guarro J, Cano-Lira J. Four new species of *Talaromyces* from clinical sources. Mycoses. [Internet]. 2017 [Citado 2018 Agosto 17]; 60(10), 651-662. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/myc.12640>

98. Sandoval-Denis M, Crous, P. Removing chaos from confusion: assigning names to common human and animal pathogens in *Neocosmospora*. *Persoonia*. [Internet]. 2018 [Citado 2018 Agosto 17]; 41, 109-129. Disponible en: <http://www.repository.naturalis.nl/document/656257>
99. Pascale G, Griffiths E, Shakya T, Nazi I, Wright G. Identification and characterization of new inhibitors of fungal homoserine kinase. *ChemBiochem*. [Internet]. 2011 [Citado 2018 Agosto 11]; 12(8):1179-82. Disponible en: <https://vdocuments.net/identification-and-characterization-of-new-inhibitors-of-fungal-homoserine.html>
100. Matijevi J, Cvetni Z. Antimicrobial activity of N-phthaloylamino acid hydroxamates. *Acta Pharm*. [Internet]. 2004 [Citado 2018 Agosto 11]; 55:387–399. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16375828>
101. Castellá G, Dall' S, Coutinho A, Cabañes J. Phylogenetic relationships of *Malassezia* species based on multilocus sequence analysis. *Medical Mycology*. [Internet]. 2014 [Citado 2018 Agosto 11]; 52: (1)99–105, <https://doi.org/10.3109/13693786.2013.815372>

Anexo 1. Protocolo de extracción de ADN.

Todo el crecimiento de la caja fue recolectado en tubos Falcon de 15 ml. Se realizaron dos lavados con 6 ml de agua destilada más Tween 80 al 0.5%, se centrifugaron entre cada lavado a 10000 rpm a 9 °C por 5 minutos. Posteriormente se realizaron otros dos lavados con cloroformo para remover la grasa y se realizaron centrifugaciones entre cada lavado con los mismos intervalos de tiempo y temperatura. Luego de la última centrifugación se decantó el sobrenadante y se congeló a -80 °C durante 12 horas. Se llevó a cabo el proceso de liofilizado de las muestras durante 24 horas⁷⁸.

Con las muestras liofilizadas se procedió a realizar el protocolo de extracción de DNA. Como primer paso se añadió 100mg de cada muestra en tubos Eppendorf de 1.5 ml esteriles y se agregaron dos perlas de vidrio en cada tubo. Luego se añadió 600 µl Buffer de lisis (Tris HCl 50mM pH 8.0, EDTA 50mM pH 8.0 SDS al 3%) a todas las muestras y 60 µl de β-mercaptoetanol para llevarlo al Mini-Beadbeater durante un minuto. Se agregó 8 µl de Proteinasa K (200 mg/ml), se mezcló suavemente y dejó incubando durante una hora a 65 °C, mezclando suavemente cada 20 minutos. Se añadió 600 µl de Buffer de extracción fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos. Después de la centrifugación se transfirió la fase acuosa de todas las muestras a otro tubo y se realizaron otros dos lavados con el mismo Buffer de extracción y se centrifugó por 5 minutos a 14000 rpm. De la fase acuosa del último lavado se transfirió a otro tubo y se realizaron dos lavados con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) con la misma cantidad obtenida de la fase acuosa y durante cada lavado se centrifugó por 5 minutos a 14000 rpm. Se transfirió 500 µl del sobrenadante de cada muestra a otro tubo y se agregó 10 µl de Acetato de Sodio 3M y dos volúmenes de isopropanol, se mezcló varias veces⁷⁹.

Se dejaron las muestras a -20 °C durante toda una noche, al siguiente día el ADN fue centrifugado por 15 minutos a 0 °C a 12000 rpm hasta que se obtuvo el precipitado en el fondo del tubo, se decantó el isopropanol y se lavó el ADN con 1

ml de Etanol al 70%, sin que se agitara el precipitado. Luego se centrifugaron las muestras por 15 minutos a 0 °C a 12000 rpm, el etanol fue decantado y se secaron las muestras en el Speedvac durante 30 minutos a 45 °C, hasta que se eliminó completamente el etanol. Luego se resuspendió el ADN en agua de PCR 50 µl⁷⁹.

Se añadieron 2.5 µl de RNAsa a cada muestra y se incubo durante una hora a 37 °C. La visualización del ADN se realizó en gel de agarosa al 0.8%, se adicono 2 µl de Buffer de carga y 3 µl de ADN luego se corrió en la cámara de electroforesis a 100 Voltios durante 30 minutos. El ADN fue cuantificado en Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific) y posteriormente se ajustaron las concentraciones a 150 ng/µl con agua de PCR⁷⁹.

Anexo 2. Protocolo de preparación de las diluciones del antifúngico y de los inhibidores

Se realizaron diluciones intermedias para obtener las concentraciones de 1600 ug/ml-3.125 ug/ml. Los tubos del 1 al 10 se les adiciono la cantidad necesaria del diluyente DMSO, en el caso de la Anfotericina B; se adiciono caldo urea para los inhibidores que eran solubles en agua (L-lisina y L-treonina)⁶⁶.

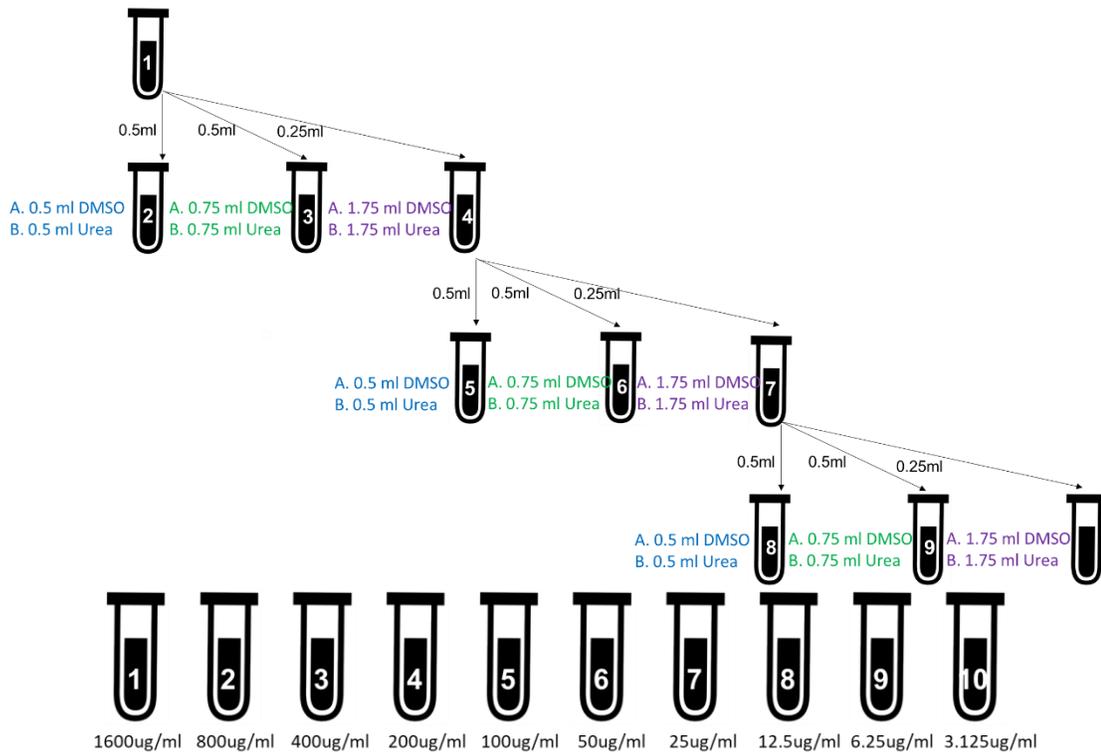


Figura 23. Esquema de diluciones intermedias. A. Anfotericina B (Diluyente DMSO). B. Inhibidores L-lisina y L-treonina (Diluyente Caldo Urea).

El siguiente paso fue realizar una dilución 1/50 tomando 100 µl de cada tubo y se transfirieron a otro tubo que contenía 4,9 ml de Caldo Urea para los inhibidores y la Anfotericina B, la concentración final quedo dos veces mayor que la concentración final deseada (32 µg/ml - 0,06 µg/ml)⁶².

Anexo 3. Sensibilización de microplacas

El contenido del tubo N° 1 (Dilución 1+4.9 ml Urea) se vertió en una placa de Petri estéril y con ayuda de una pipeta multicanal (12 canales) se tomaron 100 µl y se llenaron los pocillos de la columna N° 1 (1A - 1H). Así sucesivamente con los demás tubos de cada inhibidor y antifúngico desde la mayor concentración a la menor concentración, es decir hasta la fila N° 10. Las placas quedaron sensibilizadas con las concentraciones deseadas de 16 ug/ml a 0.03 ug/ml⁶².

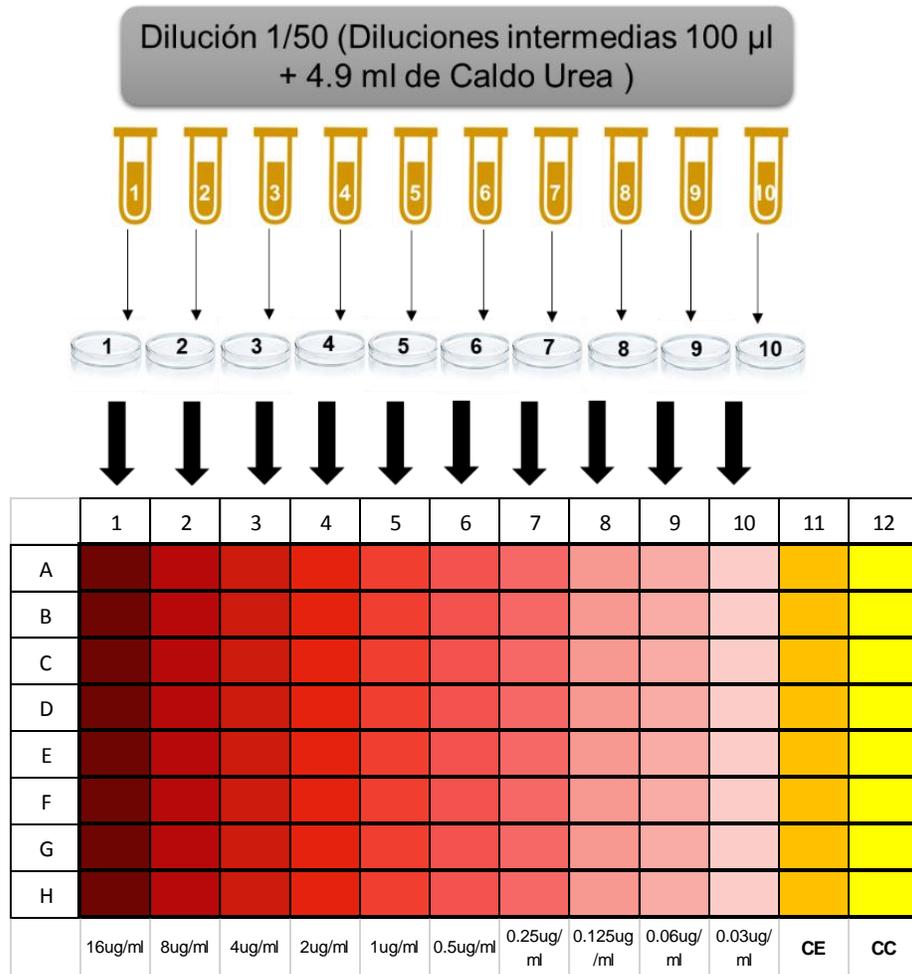


Figura 24. Esquema de montaje sensibilización en microplacas de 96 pozos de fondo redondo con Anfotericina B y los inhibidores (L-lisina L-treonina).

Los pocillos de la fila N° 11 y 12 se llenaron con 100 µl de Caldo Urea (control de esterilidad y control de crecimiento). Para las placas sensibilizadas con Anfotericina B la fila N° 12 se llenó con 100 µl de Caldo Urea con 1% de DMSO. Una vez sensibilizadas las placas se sellaron con stickers de microplacas para evitar la evaporación, y se congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.