



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

MAYARA ROBERTA ALVES DE MOURA

**MODELO *IN VITRO* DE DERMATOFITOSE UNGUEAL:
uma análise da patogenicidade fúngica e aspectos morfológicos**

Recife
2018

MAYARA ROBERTA ALVES DE MOURA

**MODELO *IN VITRO* DE DERMATOFITOSE UNGUEAL: uma análise da
patogenicidade fúngica e aspectos morfológicos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Linha de pesquisa: Projeto de pesquisa:
Aspectos Biotecnológicos e
Microbiológicos Aplicados à Patologia.

Área de concentração: Patologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rejane Pereira Neves

Recife

2018

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

M929m Moura, Mayara Roberta Alves de.
 Modelo *in vitro* de dermatofitose ungueal: uma análise da
 patogenicidade fúngica e aspectos morfológicos / Mayara Roberta Alves
 de Moura. – 2018.
 47 f.: il.; tab.; 30 cm.

 Orientadora: Rejane Pereira Neves.
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
 CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia. Recife, 2018.

 Inclui referências.

 1. Dermatofitose. 2. Fungos filamentosos. 3. Onicomicose. 4. Unhas.
 I. Neves, Rejane Pereira (Orientadora). II. Título.

616.07 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2019-050)

MAYARA ROBERTA ALVES DE MOURA

**MODELO *IN VITRO* DE DERMATOFITOSE UNGUEAL: uma análise da
patogenicidade fúngica e aspectos morfológicos**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Patologia do Centro de
Ciências da Saúde da Universidade Federal
de Pernambuco, para obtenção do título de
Mestre em Patologia.

Aprovada em: **15 DE MARÇO DE 2018**

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Reginaldo G., de Lima Neto (Examinador Interno)
(Dep. de Medicina tropical – UFPE)

Prof.^a Dr.^a Sibele Ribeiro de Oliveira (Examinador Externo)
(Centro Universitário Tabosa de Almeida - ASCES UNITA)

Prof.^a Dr.^a Oliane Maria Correia Magalhães (Examinador Externo)
(Dep. de Micologia Médica - UFPE)

AGRADECIMENTOS

Ao termino do Curso de Mestrado em Patologia encontrei pessoas que mudaram minha visão de mundo e adquiri conhecimentos específicos, os quais sou eternamente grata, principalmente aos professores e mestres que me possibilitaram à aprendizagem.

Agradeço à Jesus, autor e consumidor da minha fé, inspiração de vida que revolucionou e deu significado completo a palavra amor.

À meus pais, Everaldo e Roberta que são meus grandes incentivadores, assim como meu irmão Otávio pela paciência nos dias difíceis.

À minha avó Amara Maria pelo apoio e palavras sábias, as quais me ajudaram a seguir em frente.

Às minhas amigas Patrícia e Vanessa pela união, companherismo, ombro amigo nos momentos críticos, mas também pelas boas risadas;

À meu amigo Arthur pela motivação, pois foi com ele que aprendi a levar a vida de forma mais leve e divertida;

À minha orientadora Rejane pelo acolhimento e por estar sempre disposta a ajudar e, muitas das vezes, resolver problemas em situações complicadas;

À banca examinadora (Prof. Reginaldo, Prof.^a Sibeles e Prof.^a Olianete) pela presença e contribuições para conclusão final desse projeto;

Aos que não foram mencionados, mas que colaboraram direta ou indiretamente nessa conquista. Minha eterna gratidão.

RESUMO

A onicomicose é uma infecção fúngica que acomete as unhas das mãos e dos pés, podendo ser causada por leveduras, dermatófitos e outros fungos filamentosos. Os dermatófitos são conhecidos por possuírem um biotropismo especial por tecidos e estruturas queratinizadas, quando esse grupo de fungo acomete as unhas denominamos especificamente de dermatofitose ungueal. Portanto, o objetivo do presente estudo é avaliar o potencial patogênico de espécies de *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* em modelo de infecção *in vitro* da dermatofitose ungueal, assim como os aspectos morfológicos relacionados aos mesmos. Os isolados foram obtidos da Coleção de Cultura Micoteca URM e do Laboratório de Micologia Médica da Universidade federal de Pernambuco (UFPE). Foram preparadas suspensões padronizadas dos isolados em salina esterilizada. Em seguida, vertidos separadamente cada suspensão sobre as unhas contidas nas placas de Petri e mantidas a temperatura de 27°C e 37°C. O experimento foi conduzido através de observações macroscópicas e microscópicas das unhas durante 21 dias e acompanhado em intervalo de 7 dias. Para a análise estatística utilizamos o SPSS versão 18 e o teste exato de Fisher, com o nível de significância de 5%. O modelo experimental constatou estatisticamente que os isolados testados se desenvolveram melhor a 27°C do que a 37°C, além disso as unhas que apresentavam reentrâncias eram mais susceptíveis ao desenvolvimento do fungo. Quanto a patogenicidade, isolados de *T. rubrum* apresentou-se mais patogênico quando comparado as outras espécies. Todavia, podemos inferir que os 3 gêneros de fungos testados apresentaram um potencial capaz de obter nutrientes a partir da degradação da queratina, sendo potenciais agentes causadores de onicomicose.

Palavras-chave: Dermatofitose. Fungos filamentosos. Onicomicose. Unhas.

ABSTRACT

Onychomycosis is a fungal infection that affects the nails of the hands and feet, and can be caused by yeasts, dermatophytes and other filamentous fungi. Dermatophytes are known to have a special biotrophism by tissues and keratinized structures, when this group of fungi affects like nails specifically called nail dermatophytosis. For example, the objective of the present study is to evaluate the pathogenic potential of *Trichophyton*, *Microsporum* and *Epidermophyton* species in an in vitro infection model of nail dermatophytosis, as well as the morphological aspects related to them. The isolates were obtained from the Micoteca URM Culture Collection and the Medical Mycology Laboratory of the Federal University of Pernambuco (UFPE). Standard suspensions of the isolates were prepared in sterile saline. Thereafter, each suspension was poured over as nails contained in Petri dishes and maintained at 27°C and 37°C. The experiment was conducted by microscopic and microscopic observations of the units for 21 days and monitored at 7 day intervals. For analytical analysis, SPSS version 18 and Fisher's exact test, with a significance level of 5%. The experimental model showed statistically that the tested isolates developed better at 27 ° C than at 37 ° C, and nails with recesses were more susceptible to fungus development. As for pathogenicity, *T. rubrum* isolates were more pathogenic when compared to other species. However, we can infer that the 3 genera of fungi tested showed a potential capable of obtaining nutrients from the degradation of keratin, being potential agents that cause onychomycosis.

Keywords: Dermatophytosis. Filamentous fungi. Onychomycosis. Nails.

LISTA DE FIGURAS

Referencial teórico

Figura 1 -	Anatomia da unha. Fonte: Yarak & Araujo (2009)	20
------------	--	----

Materiais e Métodos

Figura 1 -	Macromorfologia e micromorfologia das colônias de <i>T. rubrum</i> . A) Colônia, algodosa branca. B) Microconídios e macroconídios.....	25
Figura 2 -	Macromorfologia e micromorfologia de <i>T. mentagrophytes</i> . C) Colônia plana, creme e de textura granular. D) Macroconídios em forma de charuto e microconídios globosos em cachos.	26
Figura 3 -	Macromorfologia e micromorfologia das colônias de <i>T. tonsurans</i> . E) Colônia granular de coloração branca. F) Microconídios em acladium.....	26
Figura 4 -	Macromorfologia e micromorfologia das colônias de <i>E. floccosum</i> . A) Colônia de aparência dobrada, penugenta de coloração amarelo-terrosa. D) Macroconídios.....	27
Figura 5 -	Macromorfologia e micromorfologia de <i>M. gypseum</i> . A) Colônia radial, pulverulenta de coloração creme. B) Macroconídios simétricos.....	28
Figura 6 -	Macromorfologia e micromorfologia de <i>M. canis</i> . C) Colônia radial, creme, apiculada. D) Macroconídios de extremidades aguda, e microconídios sésseis.....	28
Figura 7 -	A) Fragmentos ungueais, cortados e dispostos em recipiente esterilizado. B) Maceração das unhas em nitrogênio líquido.....	29
Figura 8 -	Controle de esterilização.....	29

Model of nail dermatophytosis: an analysis of fungal pathogenicity and morphological aspects

Figura 1 -	Setas indicando as estruturas fúngicas. As amostras foram previamente clarificadas com KOH a 40%. Aumento de 400x/ Microscopia Optica. A) Análise da amostra contida em TA. B) Análise da amostra contida a 37°C.....	34
------------	---	----

Figura 2 -	As setas evidenciam as estruturas fúngicas nos fragmentos ungueais. A, B e C foram mantidos em temperature ambiente e analisados com 7, 14 e 21 dias respectivamente. Enquanto que D, E e F foram condicionados a temperature de 37°C e analisados com 7, 14 e 21 dias respectivamente. (Preparação com KOH a 40% e Aumento de 400x Microscopia óptica)35
Figura 3 -	Fragmento ungueal visualizado através da microscopia eletrônica. As setas indicam a presença de hifas hialinas, septadas e artrosporadas. A) Aumento de 100x. B) Aumento de 400x. (Amostras tratadas com KOH a 40%).....36

LISTA DE TABELAS

Materiais e Métodos

Tabela 1-	Linhagens dos fungos obtidos da Coleção de Cultura da Micoteca URM e do Laboratório de Micologia Médica - UFPE.....	24
-----------	---	----

Model of nail dermatophytosis: an analysis of fungal pathogenicity and morphological aspects

Tabela 1-	Frequências das espécies testadas em função da temperatura e do desfecho. Foram analisados 4 isolados de cada espécie, sendo o desfecho contabilizado a cada sete dias através da microscopia óptica durante 21 dias.....	34
Tabela 2-	Resumo da significância dos dermatófitos positivos e negativos analisadas pelo Teste Exato de Fischer	36
Tabela 3-	Estatísticas do teste exato de Fischer ao nível de significância de 0,05 dos dermatófitos positivos e negativos.....	37

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO.....	12
1.1	CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA.....	12
1.2	JUSTIFICATIVA.....	14
1.3	OBJETIVOS.....	16
1.3.1	Objetivo Geral.....	16
1.3.2	Objetivos Específicos.....	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1	DERMATÓFITOS.....	17
2.2	DERMATOFITOSE UNGUEAL.....	18
2.3	UNHA: ANATOMIA E FUNÇÃO.....	19
2.4	CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA DA ONICOMICOSE.....	21
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1	ASPECTOS ÉTICOS.....	23
3.2	LOCAL DO ESTUDO.....	23
3.3	TIPO DE ESTUDO.....	23
3.4	PERÍODO DE REFERÊNCIA.....	23
3.5	OBTENÇÃO DAS CULTURAS DOS FUNGOS DERMATÓFITOS.....	23
3.6	REVISÃO TAXONÔMICA DOS DERMATÓFITOS.....	25
3.7	DESCRIÇÃO DAS ESPÉCIES.....	25
3.8	MODELO <i>IN VITRO</i> DA DERMATOFITOSE UNGUEAL.....	28
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31

4.1	MODEL OF NAIL DERMATOPHYTOSIS: AN ANALYSIS OF FUNGAL PATHOGENICITY AND MOFOLOGICAL ASPECTS.....	31
5	CONCLUSÃO.....	43
	REFERÊNCIAS.....	44

1 APRESENTAÇÃO

1.1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

A dermatofitose é uma micose superficial, causada por fungos denominados dermatófito, microrganismos que possuem um biotropismo especial por tecidos de estruturas queratinizadas. Tradicionalmente, as dermatofitoses são classificadas clinicamente de acordo com as localizações anatômicas afetadas por esses fungos. A denominação de cada tipo de dermatofitose é feita adicionando-se um nome latino que designa o local do corpo afetado à palavra *tinea*. A *tinea unguium*, por exemplo, é mais comumente conhecida como dermatofitose ungueal ou ainda onicomicose, sendo que esse último termo é comumente utilizado para todos os grupos de fungos que acometem as unhas (ELY et al., 2014; SANTOS et al., 2002).

Nessa perspectiva, a onicomicose é uma infecção fúngica que acomete as unhas das mãos e dos pés, podendo ser causada por leveduras, dermatófitos e outros fungos filamentosos. Estima-se que 15% a 40% de todas as onicopatias estão relacionadas às micoses de unha, além disso, é 20 vezes mais comum o acometimento das unhas dos pés do que das unhas das mãos. Na população em geral, estima-se que 2 a 9% apresentem essa disfunção, sendo que a cada década esses números vêm aumentando, o que podemos correlacionar também com o aumento de doenças como diabetes, imunodepressões, psoríase e realização de atividades esportivas associadas ao uso de calçados inadequados que produzem micro-traumatismos contínuos nas unhas (NAZAR et al., 2012; SCHMITT et al., 2013; CHIACCHIO et al., 2013; HAN et al., 2014).

Nos adultos, as onicomicoses são 30 vezes mais incidentes quando comparado as crianças. Ademais, é importante enfatizar que 10-15% da população humana pode vir a ser acometida por qualquer espécie de fungo no decorrer da vida, sendo eles dermatófitos ou não. Os dados são ainda mais preocupantes na população idosa, visto que a onicomicose acomete mais de 90% desses indivíduos. No Brasil, estima-se que haverá 34 milhões de idosos em 2025, levando o país à 6ª posição entre os mais envelhecidos do mundo. Além disso, a Organização Mundial de Saúde prevê que até 2025 serão 1,2 bilhões de pessoas com mais de 60 anos no mundo. Portanto, nessa perspectiva, a onicomicose tem representado uma importante causa de déficit na qualidade de vida. (SCHALKA et al., 2012; VASCONCELLOS et al., 2013).

A elevada prevalência das onicomicoses está relacionado a alguns fatores, incluindo: predisposição genética, comorbidades (como a diabetes e imunodepressão), sedentarismo, tabagismo, hábitos higiênicos e ocupacionais, além da questão climática e ambiental (ARRUA et al., 2015). Além disso, A onicomicose não só representa um problema estético para o paciente, mas pode afetar suas atividades diárias como andar ou exercitar. Ademais, a aparência das unhas pode inibir o indivíduo de usar sandálias, favorecendo dessa forma o uso de sapatos fechados tornando o processo ainda mais oportuno para o desenvolvimento fúngico (SALAS-CAMPOS et al., 2012).

Nessa perspectiva, é evidente que o comprometimento fúngico das unhas é considerado um problema de saúde pública, uma vez que é transmitido de pessoa para pessoa, tem alta ocorrência entre a população, é muito difícil de tratar e seu aparecimento pode ser facilitado pelas atividades modernas, como exercícios em ginásios, uso de piscinas e banheiros públicos. Além disso, como citado anteriormente, possui elevada frequência associada a morbididades, bem como outros fatores de predisposição (BARALDI et al., 2014; SALAS-CAMPOS et al., 2012).

Ademais, por ser uma doença que não requer notificação compulsória, não há uma estatística real da incidência. Além disso, a onicomicose em alguns casos reflete uma baixa autoestima interferindo no estado psicológico dos pacientes (SALAS-CAMPOS et al., 2012). Portanto, o objetivo do presente estudo é avaliar o potencial patogênico de espécies de *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* em modelo de infecção *in vitro* da dermatofitose ungueal, assim como os aspectos morfológicos relacionados aos mesmos.

1.2 JUSTIFICATIVA

O tema sugerido acrescentará novas explicações correlacionadas ao estudo da dermatofitose ungueal, visto que se trata de uma onicomicose com afecções muito frequentes na prática dermatológica. Além disso, mesmo que seja considerada uma doença comum, ainda é vista por vários autores como uma micose superficial de difícil tratamento, e segundo Ballesté et al., (2003) ainda que se realize o diagnóstico correto associado a uma medicação apropriada, um a cada cinco pacientes não obtém a cura.

Ainda segundo Tosti & Elewski (2016) o manejo efetivo da onicomicose geralmente requer muitos meses de tratamento. Sendo possível ocorrer recidivas dentro de um ano ou mais após a infecção ter sido erradicada, o que provavelmente acontece com mais da metade dos pacientes que foram considerados tratados com sucesso. De acordo com a literatura, as taxas de reinfecção estão entre 20 a 25% enquanto que as taxas de recorrência que variam de 6,5 a 53%. Todavia, sugere-se que a taxa de recorrência real pode ser superior a 10%, uma vez que os ensaios clínicos populacionais, geralmente, não são representativos e muitas vezes tornar-se difícil de acompanhar os pacientes cuja doença se repete.

É importante destacar que a onicomicose afeta 13% da população em geral e 25% da população geriátrica e diabética, sendo, assim, considerado um problema estético de grande importância. Ademais, deve-se considerar que essa onicopatía gera resultados emocionais e sociais negativos aos indivíduos afetados, visto que grande parte dos casos, pessoas com onicomicose são vistas com estranhamento em relação a seus hábitos higiênicos, afetando dessa forma na autoestima e influenciando até na convivência laboral com os demais (GHANNOUM et al., 2015).

Além disso, a onicomicose está condicionada a diferentes ocupações como manipuladores de alimentos, agricultores, esportistas e diáristas, impedindo-os de desenvolver normalmente suas funções. Desse modo, a reintegração dessas pessoas às suas tarefas habituais, a quantidade de unhas afetadas e a extensão das lesões, assim como a pesquisa do respectivo agente causal podem gerar gastos consideráveis ao Sistema Único de Saúde – SUS (GHANNOUM et al., 2015).

Por conseguinte, nota-se a importância desse tema, o que indica a necessidade de pesquisas mais aprofundadas relacionadas a essa micose superficial. Portanto esse projeto desenvolveu um modelo *in vitro* da dermatofitose ungueal, o qual possibilitará até mesmo

exclarecimentos a respeito das estratégias de instalação, sobrevivência e permanência desenvolvidas pelas diferentes espécies de fungo causadores da dermatofitose.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

- Avaliar o potencial patogênico de espécies de dermatófitos em modelo *in vitro* da dermatofitose ungueal, assim como seus aspectos morfológicos.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Selecionar, reativar e autenticar taxonomicamente culturas de dermatófitos estocadas Micoteca URM;
- Induzir *in vitro* o modelo da dermatofitose ungueal a partir de culturas estocadas na Micoteca URM;
- Avaliar o tempo de formação da infecção nos fragmentos ungueais;
- Analisar a influência da temperatura durante o processo de infecção;
- Relacionar a patogenicidade entre as espécies de dermatófitos estudadas;
- Avaliar características morfológicas do dano ungueal, pós modelo de infecção;

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DERMATÓFITOS

Dermatófito é a denominação atribuída ao grupo de fungos filamentosos que possuem características taxonômicas, morfológicas, fisiológicas e de antigenicidade semelhantes. Nesse sentido, representam um importante grupo de fungos queratinofílicos, ou seja, capazes de digerir e obter os nutrientes a partir da queratina, a qual está presente na pele, pelos e unhas (SIDRIM, 2004; AQUINO et al., 2007).

Em geral, os dermatófitos, compreendem três gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. O gênero *trichophyton* tem como espécies mais importantes: *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *T. schoenleinii*, *T. violaceum* e *T. verrucosum*, já o gênero *Microsporum* compreende espécies como *M. canis*, *M. gypseum*, *M. audouinii*, *M. cookei* e *M. nanum*. Enquanto que o gênero *Epidermophyton* integra uma única espécie importante: *E. floccosum* (SANTOS et al., 2002).

De acordo com o habitat primário e afinidade por hospedeiros, os dermatófitos podem ser classificados em três grupos: geofílicos, zoofílicos e antropofílicos (PERES et al., 2010; SIMPANYA, 2000). Os geofílicos são considerados saprófitas do solo, e possuem a capacidade de colonizar tecidos queratinizados em processo de decomposição, como cascos, chifres, pêlos, penas e escamas. Portanto, eles podem infectar seres humanos e animais, embora poucas espécies do grupo possuam esta capacidade, um exemplo é o *Microsporum gypseum* (SIMPANYA, 2000).

Enquanto que os dermatófitos zoofílicos parasitam preferencialmente animais, são responsáveis por cerca de 30% das dermatofitoses humanas e geralmente provocam uma inflamação aguda (PERES et al., 2010). Sendo pertencente a este grupo o *Microsporum canis*, o qual infecta principalmente animais domésticos como cães e gatos, facilitando a contaminação em ambiente domiciliar e, conseqüentemente, favorecendo o aparecimento de lesões dermatofíticas nos indivíduos que possuem contato com estes animais (SIMPANYA, 2000).

Já as espécies antropofílicas parasitam preferencialmente seres humanos, e por isso são os mais frequentes agentes causadores de dermatofitoses. Além disso, representam cerca de 70% das infecções nesses hospedeiros, causando uma infecção crônica e de progressão lenta,

sugerindo que o fungo tenha se adaptado ao hospedeiro humano (PERES et al., 2010). Portanto, Estes fungos raramente acometem outros animais ou conseguem sobreviver no solo. Entre os exemplos, destacam-se *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans* e *Epidermophyton floccosum* (SIMPANYA, 2000).

O modo de transmissão desses fungos ocorre pelo contato direto com seres humanos ou animais infectados, ou indiretamente através do trato com fontes contaminadas, como o solo por meio da inoculação no tecido e fômites (AQUINO et al., 2007; PIRES et al., 2013), e as formas clínicas variam de acordo com o agente etiológico (espécie) e o sítio anatômico acometido.

Quanto aos sintomas, considera-se que podem ser brandos ou severos dependendo do estado imunológico do hospedeiro, além disso, geralmente não ocorre invasão de tecidos subcutâneos ou órgãos internos. Ademais, as lesões características nas infecções de pele são circulares, eritematosas e pruriginosas, sendo consequentes da ação direta do fungo ou de reações de hipersensibilidade ao microorganismo e/ou a seus produtos metabólicos. Enquanto que as infecções de unha, conhecidas como onicomicose, podem ocorrer descolamento das bordas, espessamento da placa ungueal, aparecimento de manchas brancas e até mesmo a distrofia total das unhas (PERES et al., 2010)

2.2 DERMATOFITOSE UNGUEAL

Onicomicoses são manifestações clínicas causadas por variados fungos, os quais são responsáveis por quase metade de todas as alterações das unhas vistas na prática dermatológica (JINNA et al., 2015). Os dermatófitos se destacam como principal causador dessa importante condição clínica, uma vez que são os fungos mais frequentes, ganhando a denominação de dermatofitose ungueal (YUE et al., 2015).

De acordo com Ribeiro et al. (2014) os dermatófitos são isolados em 75% dos casos de Onicomicoses, seguidos por espécies de *Candida* com 18 – 20% e outros fungos filamentosos responsáveis por 1-5% das infecções. Para Chiacchio et al. (2013) três grupos de fungo podem causar a onicomiose, entretanto os dermatófitos são os agentes causadores de 80-90% dos casos; sendo mais comum o *T. rubrum* com 71% e *T. mentagrophytes* com 20%. Sendo importante salientar que raramente o gênero *Microsporum* ocasiona a dermatofitose ungueal (ZANARDI et al., 2008). Enquanto que as leveduras ficam apenas com 7% de todos os casos, evidenciando,

dessa forma, *Candida albicans* como o agente mais comum dentre esse grupo, restando aos outros fungos filamentosos somente 2% da totalidade dos casos.

O diagnóstico preciso é de fato muito importante para que se obtenha um tratamento efetivo. Faz-se necessário, portanto, a identificação das mudanças nas unhas, na clínica médica dermatológica, para uma posterior análise laboratorial, visto que na clínica o exame físico por si só pode ser impreciso, levando em consideração o diagnóstico diferencial com a psoríase, os traumas crônicos e outras infecções (WESTERBERG et al., 2013).

Nessa perspectiva, a análise laboratorial é feita mediante o exame microscópico direto do material biológico (unhas) e posterior cultivo com identificação da espécie. O exame direto é realizado após a clarificação das do material com solução aquosa de hidróxido de potássio de 10 a 40%, e na microscopia óptica são visualizadas hifas hialinas septadas e/ou artrosporadas. Entretanto, apesar do exame direto ser uma ferramenta de diagnóstico rápido, ele não é específico. Por isso, a cultura é considerada o padrão ouro para a onicomiose, todavia esses fungos podem levar 7 dias ou mais para seu crescimento. (CRUZ et al., 2011; NAZAR et al., 2012; HAN et al., 2014). Há outros exames que também podem ser realizados, e a biópsia da placa ungueal com Ácido periódico de Schiff (PAS) é um deles e, menos frequentemente, a imuno-histoquímica e ensaios de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) (SCHALKA et al., 2011).

2.3 UNHA: ANATOMIA E FUNÇÃO

O termo unha é derivado do latim *úngula*, diminutivo de *unguis*, que significa lâmina dura e semitransparente. Entretanto, quando se faz referência às doenças e alterações morfológicas das unhas, use-se sempre denominações vindas do grego *onyx*, *onychos* (YARAK et al., 2009; MAGALHAES et al., 2003).

O aparelho ungueal é um anexo cutâneo, formado por queratina, que se superpõe à face dorsal das falanges distais, sua principal função é proteger as extremidades dos dedos de traumatismos, além disso tem um importante papel na defesa, visto que se presta à função de arranhar, têm função de pinça e pode revelar doenças sistêmicas. Ademais, as unhas têm, também, uma apresentação estética no mundo moderno, principalmente para as mulheres (YARAK et al., 2009; MAGALHAES et al., 2003; RIBEIRO et al., 1995).

As unhas (Figura 1) são estruturas compostas por matriz ungueal, que é a porção geradora; A lâmina ungueal, a qual é um produto da queratinização da matriz, e possui três camadas horizontais: uma fina lâmina dorsal, uma lâmina intermediária mais espessa e uma camada ventral do leito ungueal, sendo importante constatar que em nível microscópico, a lâmina ungueal é composta por células escamosas achatadas com membranas plasmáticas tortuosas e entrecruzadas. O sistema cuticular, o qual engloba o eponíquio ou cutícula visível, derivada da prega ungueal proximal, e o hiponíquio, derivado do epitélio do leito ungueal; A porção de suporte representada pelo leito ungueal e falange óssea; A porção de ancoragem representada pelo mesênquima especializado que existe proximalmente entre a falange e a matriz, e distalmente entre a falange e a polpa digital lateral e distal, e finalmente o arcabouço composto pelas pregas ungueais: proximal, lateral e distal (RIBEIRO et al., 1995; MAGALHÃES et al., 2003).

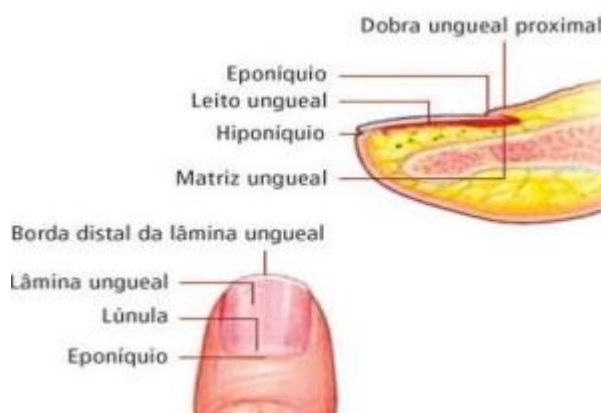


Figura 1: Anatomia da unha. Fonte: Yarak & Araujo (2009)

O aparelho ungueal tem seu desenvolvimento a partir da epiderme primitiva entre a nona e vigésima semana de vida intrauterina. Logo, a lâmina ungueal já está presente na vigésima semana, quando inicia seu movimento distal, o qual torna-se completo em torno da trigésima sexta semana, atingindo dessa forma as pontas dos dedos. No entanto, durante os processos iniciais de formação e ao longo de toda a vida, esse importante anexo epidérmico tem atividade intensa e complexa (RIBEIRO et al., 1995).

O crescimento ungueal é linear, plano e nivelado, preconiza-se que as unhas dos dedos das mãos crescem 0,1mm/dia e as dos pés 0,03 mm/dia a partir do epitélio expesso da matriz ungueal, variando de 0,5 a 0,75 mm. Além da placa ungueal ser altamente ordenada e densa, nela se faz presente uma estrutura composta de 80% de queratina e 0,1-1,0 % de lipídios (principalmente o colesterol), há a presença também de enxofre, nitrogênio, cálcio, magnésio,

sódio, ferro, cobre, zinco e água. No entanto, ao contrário de estrato córneo, a placa ungueal é extremamente dura e impermeável, isso se deve à estabilidade física e química das ligações de dissulfeto e de hidrogênio encontradas nas queratinas (YARAK et al., 2009; CHOUPAN et al., 2012).

Chama-se onicodistrofia ou onicose ou ainda oniconose a toda e qualquer alteração que acometa a lâmina, o leito e/ou a matriz ungueal. No entanto, quanto a essas alterações dois terços dos casos são causados por fungos, o que denominamos de onicomicrose, e cerca de um terço restante são quadros causados por doenças sistêmicas, alterações tegumentares e síndromes. Enquanto que o termo onicopatía refere-se a qualquer enfermidade na unha (RIBEIRO et al., 1995; GAMONAL et al., 2001).

Nas onicomicroses, estimam-se que cerca de 50 e 90% dos casos tenham localização em mãos e pés respectivamente, sendo os agentes etiológicos mais frequentes: *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum*, e outras espécies menos comum, como *Trichophyton equinum*, *Trichophyton soudanense*, *Trichophyton tonsurans* e *Microsporum canis* (KAUR et al., 2008).

2.4 CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA DA ONICOMICROSE

Clinicamente, ao avaliar as unhas, as micoses ungueais apresentam os seguintes achados: Alterações na cor, em que a unha se denota opaca, amarelada ou até mesmo esbranquiçada; aumento da espessura, a qual é caracterizada como hiperqueratose e deslocamento da lâmina ungueal, o que chamamos de onicolise (STEINER et al., 2014; BALLESTÉ et al., 2003; ARAUJO et al., 2003). A partir dessas alterações, de acordo com Ballesté et al. (2003), são observados quatro tipos diferenciados de acometimento das unhas:

- Onicomicrose subungueal distal lateral (OSDL) - É tipo mais comum dentre as classificações clínicas da onicomicrose, chegando a 90%. Os dermatófitos predominam nesse tipo clínico, com envolvimento ocasional por fungos não dermatófito. A invasão começa no hiponíquio e na borda distal e lateral da lâmina ungueal, estendendo-se de forma lenta e progressiva até o setor proximal da unha.
- Onicomicrose branca superficial (OBS) – É uma infecção superficial da unha causada primariamente por *T. mentagrophytes*, portanto representa dois a 5% das onicomicroses dermatofíticas. Algumas vezes, pode ser ocasionada pelo *Acremonium* sp. Caracteriza-se pela

penetração in situ de estruturas fúngicas em direção ao interior da lâmina ungueal, podendo ser facilitada por traumas anteriores, além disso é mais comumente observada nas unhas dos pés. Esse tipo tem recebido, recentemente, maior atenção por causa da maior ocorrência em paciente com AIDS;

- Onicomicose proximal subungueal (OPS) – É a variante clínica menos comum, todavia nota-se que normalmente afeta as unhas dos dedos das mãos, é primariamente resultado de infecção por *Candida*, e inicia-se pela invasão do fungo no estrato córneo da dobra ungueal proximal e subseqüentemente, na lâmina ungueal. No paciente com AIDS, pode ser causada por dermatófito;
- Onicodistrofia total (OT) – Caracterizada pela destruição total da placa (lâmina) ungueal, é frequentemente resultado de uma infecção por dermatofitos (STEINER et al., 2014; BALLESTÉ et al., 2003; ARAUJO et al., 2003; ZANARDI et al., 2008).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Esta pesquisa foi submetida para análise ao Comitê de Ética e Pesquisa com Seres Humanos, sob CAAE - Certificado de Apresentação para Apreciação de nº 6486131790000528, do Centro de Ciências da Saúde (CSS) da Universidade Federal de Pernambuco, para posterior início do desenvolvimento do estudo, de acordo com a Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde,

3.2 LOCAL DO ESTUDO

A pesquisa foi realizada no laboratório de Micologia Médica do Departamento de Micologia, localizado na Universidade Federal de Pernambuco.

3.3 TIPO DE ESTUDO

O estudo é do tipo experimental, longitudinal que avaliou a dermatofitose ungueal, através da coleta dos fragmentos ungueais de 80 indivíduos saudáveis.

3.4 PERÍODO DE REFERÊNCIA

O estudo foi realizado durante outubro de 2016 a dezembro de 2017.

3.5 OBTENÇÃO DA CULTURA DOS FUNGOS DERMATÓFITOS

Os fungos foram obtidos do Laboratório de Micologia Médica e da Coleção de Cultura Micoteca URM (www.ufpe.br/micoteca), ambos localizados no Departamento de Micologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). As amostras solicitadas eram provenientes de diferentes substratos (Tabela 1).

Das culturas, fragmentos foram transferidos para o caldo glicosado e os tubos mantidos a temperatura de 27°C ($\pm 2^\circ$) por um período de até 15 dias. Em seguida, foram semeados em ágar sabouraud para realização da revisão taxonômica.

Tabela 1. Linhagens dos fungos obtidos da Coleção de Cultura da Micoteca URM e do Laboratório de Micologia Médica, UFPE

Espécie	Nº da Linhagem	Ano de Depósito	Substrato/Hospedeiro
<i>T. rubrum</i>	URM 6213	2010	Epiderme
<i>T. rubrum</i>	MM 0001	2017	Unhas
<i>T. rubrum</i>	MM 0007	2017	Epiderme
<i>T. rubrum</i>	MM 0013	2016	Unhas
<i>T. mentagrophytes</i>	URM 6272	2010	Epiderme
<i>T. mentagrophytes</i>	MM 0002	2017	Epiderme
<i>T. mentagrophytes</i>	MM 0008	2016	Epiderme
<i>T. mentagrophytes</i>	MM 0014	2016	Epiderme
<i>T. tonsurans</i>	URM 6752	2012	Rins
<i>T. tonsurans</i>	MM 0003	2017	Unhas
<i>T. tonsurans</i>	MM 0009	2017	Epiderme
<i>T. tonsurans</i>	MM 0015	2017	Epiderme
<i>E. floccosum</i>	URM 4798	2004	Epiderme
<i>E. floccosum</i>	MM 0004	2016	Epiderme
<i>E. floccosum</i>	MM 0010	2017	Epiderme
<i>E. floccosum</i>	MM 0016	2016	Epiderme
<i>M. gypseum</i>	URM 6199	2010	Epiderme
<i>M. gypseum</i>	MM 0005	2016	Epiderme
<i>M. gypseum</i>	MM 0011	2017	Epiderme
<i>M. gypseum</i>	MM 0017	2017	*
<i>M. canis</i>	URM 6969	2013	Canino
<i>M. canis</i>	MM 0006	2016	Couro cabeludo
<i>M. canis</i>	MM 0012	2017	*
<i>M. canis</i>	MM 0018	2016	*

3.6 REVISÃO TAXONÔMICA DOS DERMATÓFITOS

As amostras solicitadas foram revistas taxonomicamente através de suas características macroscópicas (tempo de crescimento, diâmetro da colônia, borda, textura e coloração da colônia) e microscópicas através da retirada de um fragmento da cultura para montagem entre lâmina e lamínula, segundo a metodologia porposta por Lacaz, 2002. Os isolados testados foram semeados em meio de cultivo ágar sabouraud e conservados a 37°C para estimular crescimento das colônias, o que facilitou o estudo das características morfológicas de cada espécie.

3.7 DESCRIÇÃO DAS ESPÉCIES

Trichophyton

O gênero *Trichophyton* é particularmente importante e complexo, sendo o mais frequente comparado aos outros dois gêneros. No gênero *Trichophyton*, menos de 10 espécies são reconhecidas responsáveis por casos de dermatofitose humana e animal (MOLINA, 2011; SHARMA et al., 2015). *T. rubrum* (Figura 1), após cultura de 7-15 dias, apresenta colônias brancas de textura algodonosa (A) ou granular, com reverso apresentando uma coloração vermelha (HRYNCEWICZ-GWÓZDŹ et al., 2011). Microscopicamente (B), apresenta micrônídios que se exibem de forma regular e piriforme, em grande quantidade, dispostos em acladium. Os macroconídios, presentes eventualmente, são variáveis em número, tamanho e de forma cilíndrica (SIDRIM et al., 2004).

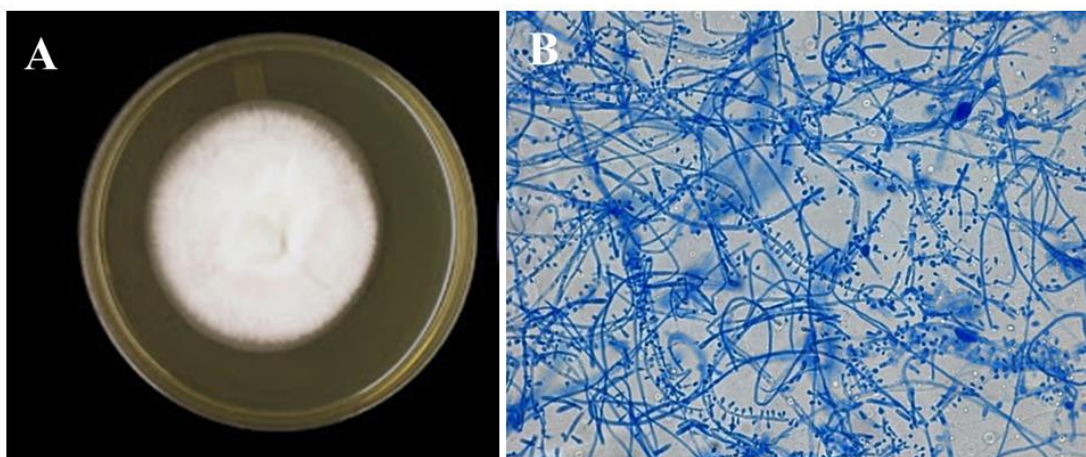


Figura 1: Macromorfologia e micromorfologia das colônias de *T. rubrum*. A) Colônia, algodonosa branca. B) Microconídios e macroconídios. **Fonte:** Adaptado de Yuri, 2015.

Enquanto que o *T. mentagrophytes* (Figura 2) apresenta colônias planas (C), de coloração branca a creme, textura pulverulenta, porém com reverso pigmentado de marrom (SIDRIM et al., 2004; LEE et al., 2014). Microscopicamente (D), se apresenta com raros macroconídios em forma de charutos e de parede fina, presos às hifas. A sua principal característica, no entanto, é a presença de microconídios globosos e agrupados nas ramificações cujo arranjo lembra um cacho de uvas. Podem também ser vistas hifas na forma de espiral (SIDRIM et al., 2004).

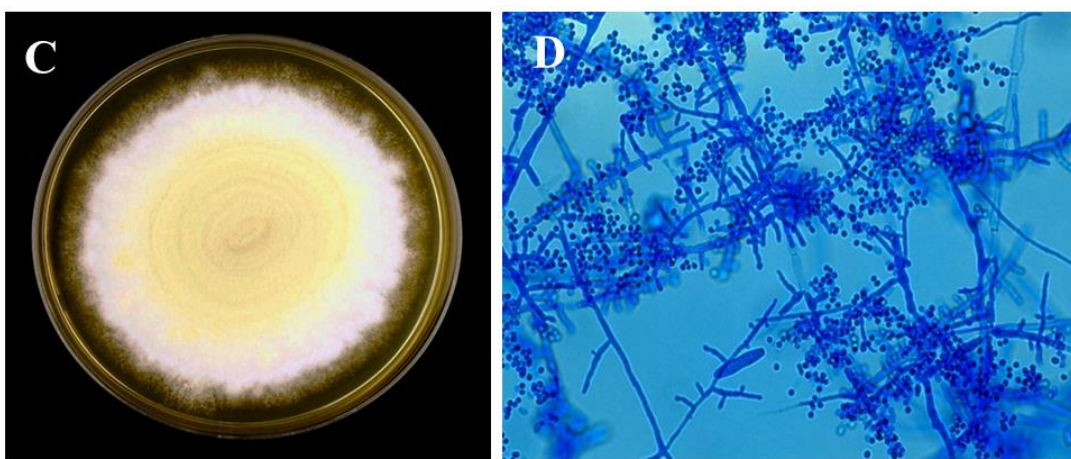


Figura 2: Macromorfologia e micromorfologia de *T. mentagrophytes*. C) Colônia plana, creme e de textura granular. D) Macroconídios em forma de charuto e microconídios globosos em cachos. **Fonte:** Adaptado de Yuri, 2015.

Já o *T. tonsurans* (Figura 3), após cultura (E), apresenta colônias planas com elevação central, de textura algodonosa ou granular, e coloração variando de branco a amarelo claro e reverso acastanhado (SIDRIM et al., 2004). Microscopicamente (F), apresenta numerosos microconídios piriformes ou em forma de lágrima e raramente macroconídios, os quais se apresentam em forma de cigarro ou clava com paredes lisas e muitas vezes com formas distorcidas (SIDRIM et al., 2004).



Figura 3: Macromorfologia e micromorfologia das colônias de *T. tonsurans*. E) Colônia granular de coloração branca. F) Microconídios em acladium. **Fonte:** Adaptado de Yuri, 2015.

Epidermophyton

Possui apenas 2 espécies conhecidas, sendo *E. floccosum* o único patógeno para o homem (MOLINA, 2011). O *E. floccosum* (figura 4) possui um crescimento rápido, atingindo a maturação em cerca de 4 a 6 dias. Macroscopicamente (A), as colônias apresentam textura penugenta, de coloração amarelo-terrosa. O reverso das colônias tende a acompanhar a coloração do verso. Microscopicamente (B), caracteriza-se pela presença de macroconídios de parede fina, com 2 a 5 septos e agrupados em cachos, como cachos de banana, formados sobre 1 ou 2 conidióforos curtos, e pela ausência de microconídios (SIDRIM et al., 2004)

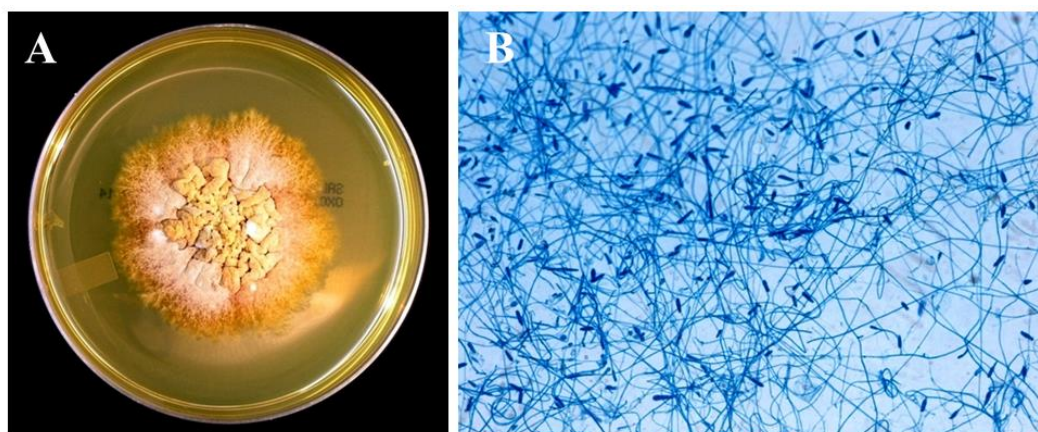


Figura 4: Macromorfologia e micromorfologia das colônias de *E. floccosum*. A) Colônia de aparência dobrada, penugenta de coloração amarelo-terrosa. D) Macroconídios. **Fonte:** Adaptado de Yuri, 2015.

Microsporum

Este gênero tem cerca de 20 espécies diferentes, dos quais cerca de 10 são patogênicos para o homem, podendo acometer a pele ou couro cabeludo (MOLINA, 2011; SHARMA et al., 2015). O *M. gypseum* (Figura 5) apresenta colônias macroscopicamente de textura pulverulenta com pigmentação creme. O reverso pode apresentar variações de cores que vão do amarelo ao marrom. Microscopicamente, apresentam bastantes macroconídios simétricos de paredes finas, multiseptados, de superfície levemente equinulada, menos fusiformes do que os macroconídios de *M. canis*, pois apresentam a extremidade distal arredondada e pouco microconídios (Figura 6) (SIDRIM et al., 2004),



Figura 5: Macromorfologia e micromorfologia de *M. gypseum*. A) Colônia radial, pulverulenta de coloração creme. B) Macroconídios simétricos. **Fonte:** Adaptado de Yuri, 2015.

Enquanto que o *M. canis* (Figura 6) apresenta colônias com relevo apiculado, textura algodonosa e tonalidade branca, com reverso de coloração amarela. Microscopicamente, apresenta grande quantidade de macroconídios fusiformes, multiseptados (8 a 15 septos) e de paredes espessas, que constituem uma característica marcante desta espécie. Os microconídios, quando estão presentes, são sésseis (SIDRIM et al., 2004).

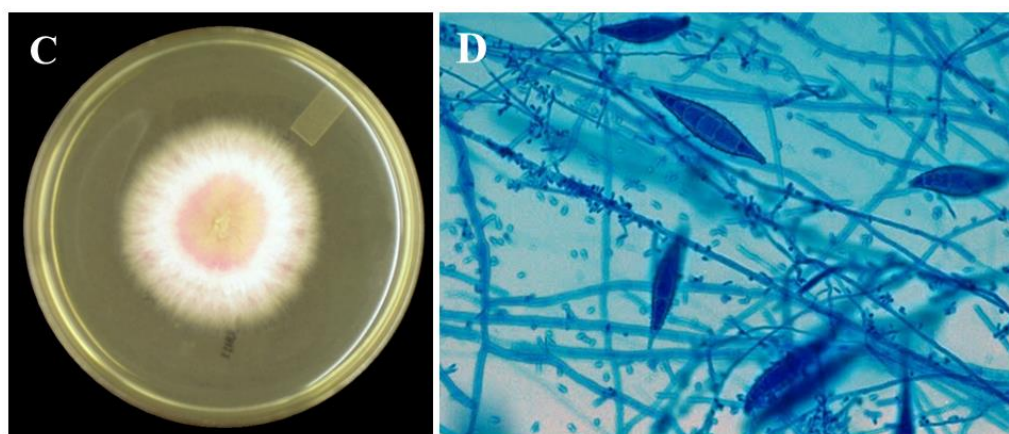


Figura 6: Macromorfologia e micromorfologia de *M. canis*. C) Colônia radial, creme, apiculada. D) Macroconídios de extremidades aguda, e microconídios sésseis. **Fonte:** Adaptado de Yuri, 2015.

3.8 MODELO *IN VITRO* DA DERMATOFITOSE UNGUEAL

As amostras de unhas, foram obtidas de indivíduos saudáveis que concordaram em assinar o TCLE. Durante a coleta, as unhas foram previamente limpas, sem resíduos de esmaltes, cortadas e dispostas em recipientes esterilizados (Figura 7). Posteriormente, os fragmentos das lâminas ungueais coletados foram submetidos a antissepsia adequada com álcool a 70% (AZAMBUJA et al., 2013). Assim, os fragmentos, adicionados as placas de petri,

seguiram para esterilização em autoclave a 120°C por 15 min. Após autoclavação, fragmentos ungueais foram inoculados em meio ágar sabouraud e levados a estufa como controle de esterilização (Figura 8). Em cabine de fluxo laminar foi realizado a maceração das unhas (B) em nitrogênio líquido (Figura 7), subsequentemente separadas em placas de petri e vedadas até o momento da infecção.



Figura 7: A) Fragmentos ungueais, cortados e dispostos em recipiente esterilizado. B) Maceração das unhas em nitrogênio líquido.

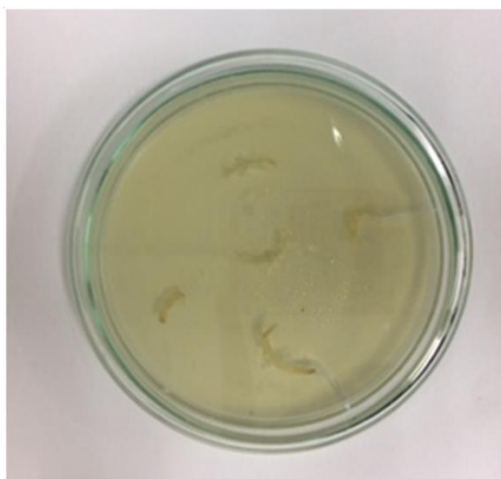


Figura 8: Controle de esterilização

Foram preparadas as suspensões dos isolados de *Trichophyton*, *Microsporum*, e *Epidermophyton* em 5,0 mL de salina esterilizada (0,85%) à uma concentração de 10^6 células/mL (NCCLS, 2002). Em seguida uma alíquota de 0,6 mL da suspensão foi vertida sobre as unhas contidas nas placas de Petri. Uma parte placas foram mantidas à 27°C ($\pm 2^\circ$) e a outra parte em 37°C. Como controle, 0,6 mL da salina esterilizada foi espargida sobre uma placa contendo as unhas (INÁCIO et al., 2016).

O experimento foi acompanhado durante intervalos de sete dias até o 21º dia, sendo o processo de infecção avaliado através da observação macroscópica das unhas e preparação de lâminas contendo as unhas possivelmente infectadas. Sobre estas, foram adicionados solução aquosa a 40% de Hidróxido de Potássio (KOH), para análise em microscópio óptico, assim foi possível avaliar se houve o processo de infecção ou parasitismo pelo fungo (YUE et al., 2015).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada usando o SPSS versão 18.0 e o Excel versão 2013. Para os dados analisados foi aplicado um teste não paramétrico exato de Fisher, considerando um nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MODEL OF NAIL DERMATOPHYTOSIS: AN ANALYSIS OF FUNGAL PATHOGENICITY AND MORFOLOGICAL ASPECTS

1. INTRODUÇÃO

A dermatofitose é uma micose superficial, causada por fungos denominados dermatófito, microrganismos que possuem um biotropismo especial por tecidos de estruturas queratinizadas.^{1,2} Tradicionalmente, as dermatofitoses são classificadas clinicamente de acordo com as localizações anatômicas afetadas por esses fungos. A denominação de cada tipo de dermatofitose é feita adicionando-se um nome latino que designa o local do corpo afetado à palavra *tinea*. A *tinea unguium*, por exemplo, é mais comumente conhecida como dermatofitose ungueal.³

Essa micose superficial acomete as unhas das mãos e dos pés, podendo ser causada não só por fungos dermatófitos, mas também por leveduras e outros fungos filamentosos, enquadra-se nesse contexto o termo onicomicose. Entretanto, são os dermatófitos que se destacam como principal causador dessa importante condição clínica, uma vez que são os fungos mais frequentemente citados na literatura.⁴ Os dermatófitos são isolados em 75% dos casos de onicomicoses, seguidos por espécies de *Candida* com 18 – 20% e outros fungos filamentosos responsáveis por 1-5% das infecções. Sendo importante salientar que entre os dermatófitos, as espécies mais frequentes são: O *T. rubrum* com 71% e *T. mentagrophytes* com 20%, e sabe-se que raramente o gênero *Microsporum* ocasiona a dermatofitose ungueal.^{5,6}

Estima-se que 15% a 40% de todas as onicopatias estão relacionadas às micoses de unha, além disso, é 20 vezes mais comum o acometimento das unhas dos pés do que das unhas das mãos.^{7,8} Na população em geral, estima-se que 2 a 9% apresentem essa disfunção, sendo que a cada década esses números vêm aumentando, o que podemos correlacionar também com o aumento de doenças como diabetes, imunodepressões, psoríase e realização de atividades esportivas associadas ao uso de calçados inadequados que produzem micro-traumatismos contínuos nas unhas.^{8,9,10}

É importante destacar que a onicomicose acomete 25% da população geriátrica e diabética, e mesmo assim ainda é considerado um problema estético de importância relativa. Levando em consideração que no Brasil estima-se que haverá 34 milhões de idosos em 2025,

levando o país à 6ª posição entre os mais envelhecidos do mundo e que essa onicopatia gera resultados emocionais e sociais negativos aos indivíduos afetados.^{11,12} Nota-se, então, a importância desse tema, e a necessidade de pesquisas mais aprofundadas relacionadas a essa micose superficial.

Nessa perspectiva, desenvolveu um modelo da dermatofitose ungueal, que mimetizasse como ocorre o processo de formação da infecção, *in vivo*. Para isso, optamos por escolher os fungos mais frequentemente relatados na literatura, além do *Microsporum gypseum* e *Microsporum canis*, que são agentes etiológicos extremamente raros em que o risco de infecção é associado apenas ao histórico da exposição e aos fatores de risco.¹³ Assim, foi possível estudar as principais características da doença, assim como o desenvolvimento dos isolados em função da temperatura e a patogenicidade entre as espécies.

2. MÉTODOS

O estudo é do tipo experimental, longitudinal que avaliou a dermatofitose ungueal *in vitro*, através da coleta dos fragmentos ungueais de 80 indivíduos saudáveis. A pesquisa foi realizada no laboratório do Departamento de Micologia, localizado na Universidade Federal de Pernambuco durante outubro de 2016 a dezembro de 2017. Os fungos foram obtidos do Laboratório de Micologia Médica e da Coleção de Cultura Micoteca URM, também localizados no departamento de Micologia da UFPE. Os isolados adquiridos foram revistos taxonomicamente através de suas características macroscópicas, tempo de crescimento, diâmetro da colônia, borda, textura e coloração da colônia. Enquanto que a análise microscópica foi realizada a partir da retirada de um fragmento da cultura para montagem entre lâmina e lamínula, assim observou-se, ao microscópio óptico, as estruturas fúngicas características dos dermatófitos.

Enquanto que as amostras de unhas, foram obtidas de indivíduos saudáveis que concordaram em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Durante a coleta, as unhas foram previamente limpas, sem resíduos de esmaltes, cortadas e dispostas em recipientes esterilizados. Posteriormente, os fragmentos das lâminas ungueais coletados foram submetidos a antissepsia adequada com álcool a 70%.¹⁴ Assim, os fragmentos, adicionados as placas de petri, seguiram para esterilização em autoclave a 120°C por 15 min. Após autoclave, alguns fragmentos ungueais foram inoculados em meio ágar sabouraud e levados a estufa como controle de esterilização. Em cabine de fluxo laminar foi realizado a maceração das unhas em

nitrogênio líquido, subsequentemente separadas em placas de petri e vedadas até o momento da infecção.

Concomitantemente, foram preparadas as suspensões das espécies *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* e *Epidermophyton floccosum* em 5,0 mL de salina esterilizada à 80% à concentração de 10^6 células/mL.¹⁵ Em seguida uma alíquota de 0,6 mL foi vertida sobre as unhas contidas nas placas de Petri. Uma parte placas foram mantidas à 27°C ($\pm 2^\circ$) e a outra parte em 37°C. Sendo válido salientar que utilizamos quatro isolados para cada espécie testada, e o experimento foi realizado em triplicata. Ademais, como controle, 0,6 mL da salina esterilizada foi espargida sobre uma placa contendo as unhas.²⁴

O experimento foi acompanhado durante intervalos de sete dias até o 21º dia, sendo o processo de infecção avaliado através da observação macroscópica das unhas e preparação de lâminas contendo as unhas possivelmente infectadas. Sobre estas, foram adicionados solução aquosa a 40% de Hidróxido de Potássio (KOH), para análise em microscópio óptico, assim foi possível avaliar se houve o processo de infecção pelo fungo.⁴

Para a análise estatística utilizamos o SPSS versão 18.0 e o Excel versão 2013. Para os dados analisados foi aplicado um teste não paramétrico exato de Fisher, considerando um nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS

O modelo experimental elaborado, de acordo com a frequência do desfecho, constatou estatisticamente que os isolados testados se desenvolveram mais em TA (temperatura ambiente/ 27°C $\pm$ 2°C) do que a 37°C (Tabela 1). Sendo importante destacar que durante o acompanhamento da infecção no microscópio óptico, de fato, as hifas hialinas septadas apresentaram um desenvolvimento maior e mais evidente em TA, visto que notamos um aumento considerável dessas estruturas a no decorrer do ensaio (Figura 1).

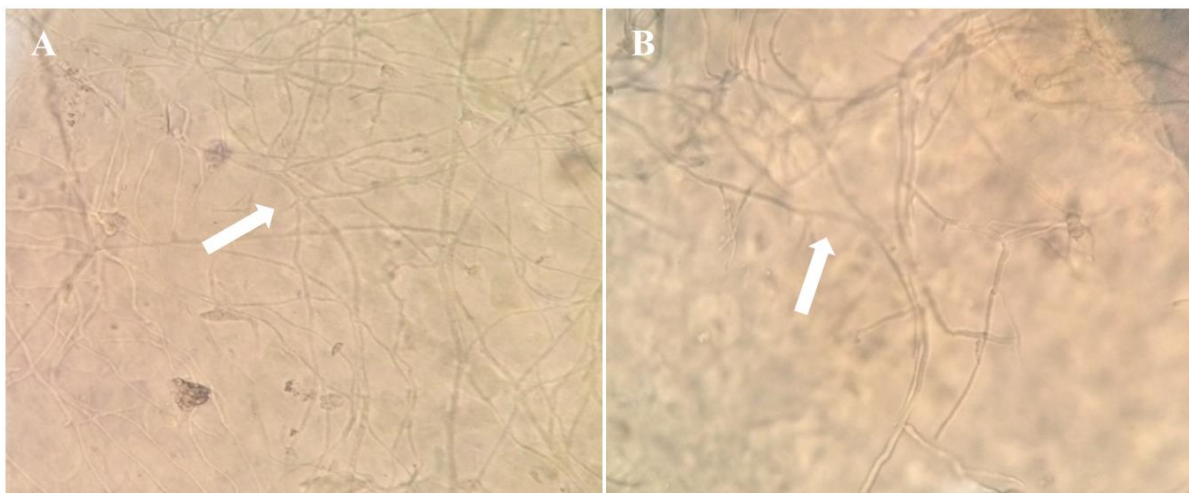


Figura 1: Setas indicando as estruturas fúngicas. As amostras foram previamente clarificadas com KOH a 40%. Aumento de 400x/ Microscopia Óptica. A) Análise da amostra contida em TA. B) Análise da amostra contida a 37°C

Tabela 1: Frequências das espécies testadas em função da temperatura e do desfecho. Foram analisados 4 isolados de cada espécie, sendo o desfecho contabilizado a cada sete dias através da microscopia óptica durante 21 dias.

Espécies	Temperatura	Desfecho	Frequência n	Porcentagem %
<i>T. rubrum</i>	27° C	positivo	36	50%
		negativo	0	0%
	37°C	positivo	36	50%
		negativo	0	0%
		Total	72	100%
<i>T. mentagrophytes</i>	27°C	positivo	36	50%
		negativo	0	0%
	37°C	positivo	29	40%
		negativo	7	10%
		Total	72	100%
<i>T. tonsurans</i>	27°C	positivo	35	49%
		negativo	1	1%
	37°C	positivo	27	38%
		negativo	9	12%
		Total	72	100%
<i>E. floccosum</i>	27°C	positivo	35	49%
		negativo	1	1%
		positivo	19	26%

	37°C	negativo	17	24%
		Total	72	100%
	27°C	positivo	36	50%
		negativo	0	0%
	37°C	positivo	21	29%
<i>M. gypseum</i>		negativo	15	21%
		Total	72	100%
<i>M. canis</i>	27°C	positivo	36	50%
		negativo	0	0%
	37°C	positivo	25	35%
		negativo	11	15%
		Total	72	100%

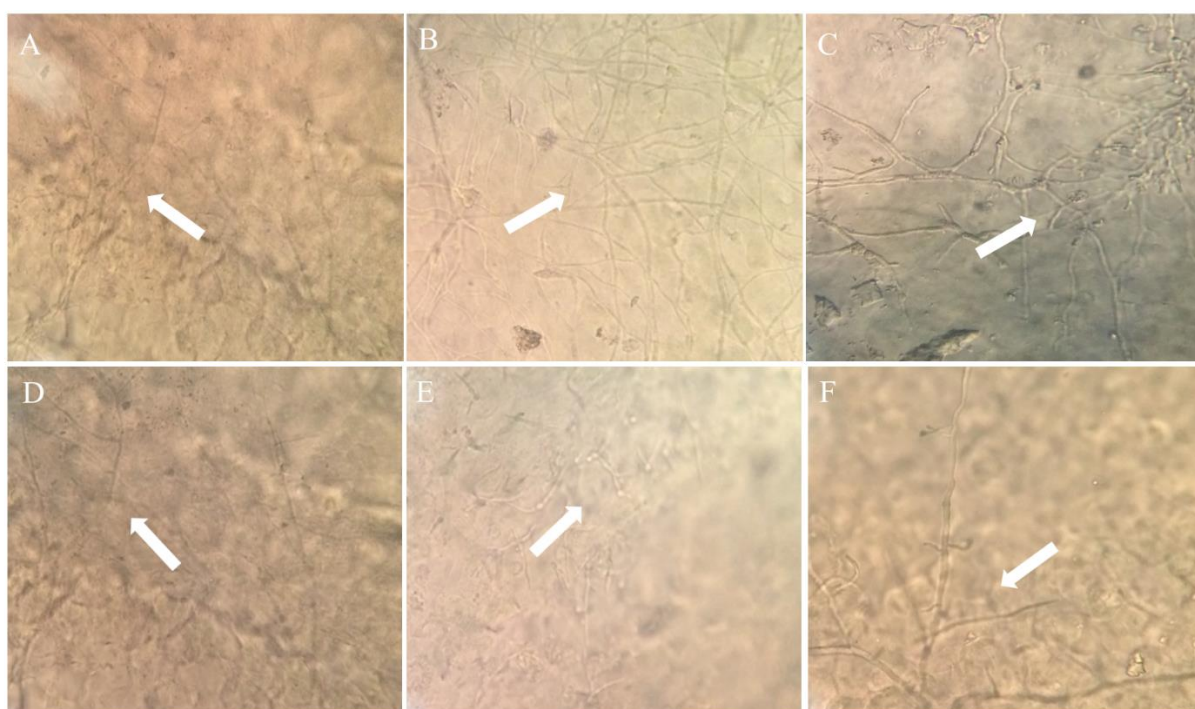


Figura 2: As setas evidenciam as estruturas fúngicas nos fragmentos ungueais. A, B e C foram mantidos em temperatura ambiente e analisados com 7, 14 e 21 dias respectivamente. Enquanto que D, E e F foram condicionados a temperatura de 37°C e analisados com 7, 14 e 21 dias respectivamente. (Preparação com KOH a 40% e Aumento de 400x/ Microscopia óptica).

O modelo experimental foi acompanhado por 21 dias, e avaliado através da microscopia óptica a cada 7 dias (Figura 2). Entretanto, foi constatado que o tempo de formação da dermatofitose ungueal *in vitro*, na grande maioria das análises, ocorreu no sétimo dia da infecção. Sendo importante destacar que os isolados do gênero *Microsporum* se desenvolveram-se preferencialmente após 7 dias em TA, enquanto que a 37°C o desenvolvimento começou a mostrar-se mais evidente a partir do 14º dia.

Ademais, as unhas que apresentavam reentrâncias demonstraram uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento do fungo como evidenciado na figura 3.

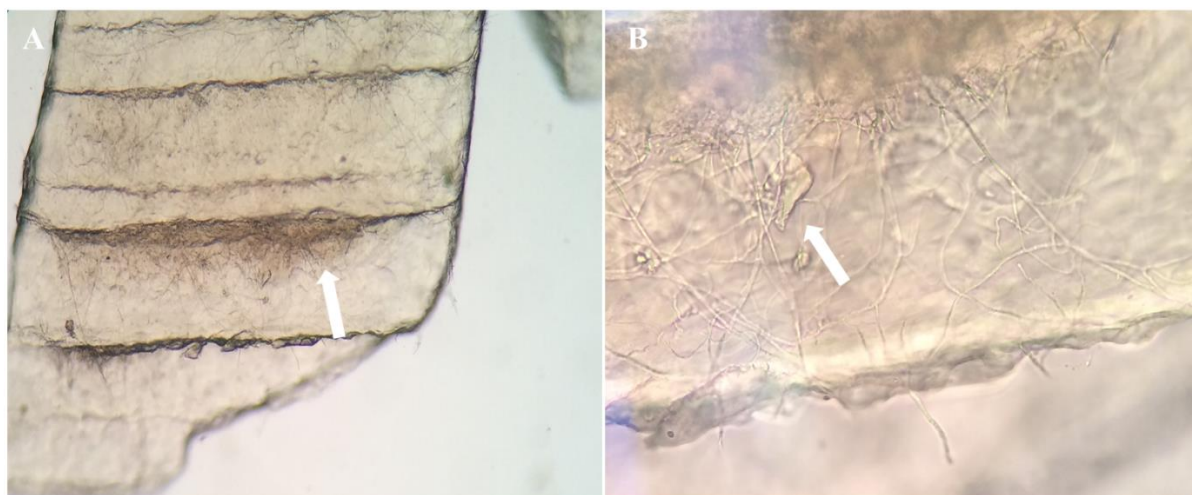


Figura 3: Fragmento ungueal visualizado através da microscopia óptica. As setas indicam a presença de hifas hialinas, septadas e artrosporadas. A) Aumento de 100x. B) Aumento de 400x. (Amostras tratadas com KOH a 40%)

Com relação a patogenicidade, verificou-se a diferença estatística na proporção de resultados positivos e negativos entre as espécies de dermatófitos, ou seja, comparando-os entre si. Logo, conseguimos inferir para as as unhas infectadas *in vitro* se um determinado dermatófito é tão patogênico quanto os outro ou se as patogenicidades são diferentes. Para isso, utilizamos o Teste Exato de Fisher com nível de significância de 5% e Intervalo de confiança de 95%.

Tabela 2: Resumo da significância dos dermatófitos positivos e negativos analisadas pelo Teste Exato de Fischer.

Dermatófitos	<i>T. rubrum</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. tonsurans</i>	<i>E. floccosum</i>	<i>M. gypseum</i>	<i>M. canis</i>
<i>T. rubrum</i>	-					
<i>T. mentagrophytes</i>	S	-				
<i>T. tonsurans</i>	S	NS	-			
<i>E. floccosum</i>	S	S	NS	-		
<i>M. gypseum</i>	S	NS	NS	NS	-	
<i>M. canis</i>	S	NS	NS	NS	NS	-

S – significativo NS – não significativo

Na Tabela 2, nota-se que todas as espécies confrontadas com o dermatófito *T. rubrum* foram estatisticamente significativas ao nível de 5% pelo teste exato de Fischer, onde o mesmo

apresentou maior patogenicidade em relação a todos as outras espécies de dermatófitos analisados.

Tabela 3: Estatísticas do teste exato de Fischer ao nível de significância de 0,05 dos dermatófitos positivos e negativos.

Dermatófitos analisados	p-valor	significância
<i>T. mentagrophytes</i> <i>T. tonsurans</i>	0,607	0,05
<i>E. floccosum</i> <i>T. mentagrophytes</i>	0,026*	0,05
<i>M. gypseum</i> <i>T. mentagrophytes</i>	0,103	0,05
<i>M. canis</i> <i>T. mentagrophytes</i>	0,451	0,05
<i>T. mentagrophytes</i> <i>T. rubrum</i>	0,013*	0,05
<i>E. floccosum</i> <i>T. tonsurans</i>	0,140	0,05
<i>M. gypseum</i> <i>T. tonsurans</i>	0,379	0,05
<i>M. canis</i> <i>T. tonsurans</i>	1,000	0,05
<i>T. rubrum</i> <i>T. tonsurans</i>	0,001*	0,05
<i>E. floccosum</i> <i>M. gypseum</i>	0,692	0,05
<i>E. floccosum</i> <i>M. canis</i>	0,212	0,05
<i>E. floccosum</i> <i>T. rubrum</i>	0,000*	0,05
<i>M. canis</i> <i>M. gypseum</i>	0,212	0,05
<i>M. gypseum</i> <i>T. rubrum</i>	0,000*	0,05
<i>M. canis</i> <i>T. rubrum</i>	0,001*	0,05

* Significante

Na tabela 3, podemos observar que as espécies que não foram significativas (*) pelo teste exato de Fischer, obtiveram patogenicidade estatisticamente semelhante. Isto é, não houve diferença estatística na proporção de positividade entre os ensaios com estes dois gêneros de dermatófitos.

4. DISCUSSÃO

Na literatura, podemos constatar que a construção de um modelo de infecção *in vitro* utilizando fungos já havia sido elaborado por alguns pesquisadores, porém apesar de alguns

desses estudos incluírem dermatófitos, os ensaios em sua totalidade eram realizados em fios de cabelo. Macedo et al (2005)¹⁶, por exemplo, verificou a capacidade de perfuração capilar de 15 isolados de *Epidermophyton floccosum*. Não obstante, dentro do estudo houve uma preocupação voltada para os para fatores de patogenicidade das espécies, como crescimento a 37°C e produção de proteinase e fosfolipase

Sem embargo, Rocha (2015)¹⁷ investigou a piedra preta ao realizar um modelo de infecção *in vitro* em cabelos saudáveis coma finalidade de mimetizar o processo de formação dos nódulos, *in vivo*. Para isso, o estudo utilizou fungos que nunca foram relatados na literatura como possíveis agentes etiológicos dessa micose, porém durante o processo de infecção, tornou-se possível estudar as principais características da doença. Nessa perspectiva, Inácio et al. (2016)¹⁸ ao estudar a piedra branca, também desenvolveu um modelo de infecção *in vitro* em cabelos, com a finalidade de analisar os aspectos morfológicos e ultraestruturais do gênero *Trichosporon*.

Diante da relevância dos modelos experimentais, e sabendo que a dermatofitose ungueal tem se tornando preocupante, principalmente pelo fato de ser uma onicomise que acomete principalmente a população idosa, e sabendo que expectativa de vida aumentou significativamente, elaboramos um novo modelo experimental, utilizando fragmentos de unhas, doados por indivíduos sadáveis, por isso denominamos com modelo de dermatofiose ungueal *in vitro*. Para isso, selecionamos os fungos dermatófitos destacados na literatura como os agentes mais incidentes para onicomiose, visando a possibilidade de estudar algumas características da doença, levando dessa forma em consideração a influências da temperatura e patogenicidade entre as espécies, com a finalidade de confrontar o que já existe na literatura a respeito do tema.

Diversos fatores estão relacionados com a patogenicidade e virulência dos fungos queratinofílicos, como a queratinofilia, temperatura ideal de crescimento de 37°C, capacidade de aderência em tecidos vivos, diversidade fenotípica e sintetização e liberação de toxinas e enzimas nocivas.^{13,19} Enquanto que a infecciosidade é diretamente relacionada a virulência do fungo e a incapacidade do hospedeiro em combater o agente agressor. O desequilíbrio entre a relação parasita e hospedeiro é o fator que favorece o desenvolvimento de micose.²⁰

Com relação a temperatura de crescimento do fungo nas amostras ungueais, nosso modelo constatou que os dermatofitos estudados, em geral, se desenvolveram mais rápido e de

forma mais pronunciada a 27°C do que a 37°C, sendo importante destacar principalmente o gênero *Microsporum*, o qual apresentou mais facilidade de infeccionar as unhas *in vitro* a temperatura ambiente, ou seja, com o tempo de desenvolvimento considerado menor quando comparado a temperatura de 37°C, enquanto que o *T. rubrum*, uma espécie considerada antropofílica, mostrou-se bem adaptável nas duas temperaturas.

Isso é explicado de acordo com a diversificação de hábitos dos seres humanos, bem como o clima em que se encontram, além disso, no decorrer dos anos, houve uma adaptação progressiva dos fungos dermatófitos. O ser humano pode ser infectado por espécies zoofílicas, como as o *Microsporum canis* e também geofílicas como o *Microsporum gypseum*. Assume-se, então que as espécies de dermatófitos antropofílicas estiveram adaptadas aos seres humanos desde o começo, enquanto que as zoofílicas se adaptaram mais recentemente devido a incorporação de animais domésticos a sua rotina.

É importante levar em consideração que as espécies foram acompanhadas por 21 dias, e analisadas a cada 7 dias, e durante esse período todos os isolados demonstram crescimento miceliano. Podendo concluir, dessa forma, que não houve morte durante a supervisão dos intervalos, logo podemos supor que os isolados utilizaram a queratina ungueal para seu desenvolvimento.

Além disso, sabe-se que há um favorecimento da infecção caso a unha apresente-se previamente danificada devido a algum trauma. Em nossos estudos, conseguimos corroborar essas afirmativas, ao constataremos a preferência das estruturas fúngicas pelas regiões ungueais que apresentaram uma maior deterioração. E isso também explica a predileção desse grupo de fungos pelas unhas dos pés, visto que são as que sofrem mais impacto pelas atividades cotidianas.²¹ Portanto, calçados de salto alto bastante utilizados pelas mulheres e repetitivos traumas nas unhas dos pés em jovens que praticam esportes como basquete, futebol e tênis podem favorecer a instalação do fungo dermatófito e consequente desenvolvimento de uma onicomicose.^{2,22}

Com relação a patogenicidade, nosso ensaio verificou a diferença estatística na proporção de resultados positivos e negativos entre as espécies de dermatófitos estudadas, ou seja, comparamos os isolados entre si. Assim, conseguimos inferir para as unhas infectadas *in vitro* se um determinado dermatófito é tão patogênico quanto os outros ou se as patogenicidades são diferentes. Nessa perspectiva, podemos constatar que as espécies que obtiveram

patogenicidade estatisticamente semelhante, foram: *E. floccosum* e *T. mentagrophytes*; *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*; *T. rubrum* e *T. Tonsurans*; *M. Gypseum* e *T. rubrum* e *M. Canis* e *T. rubrum*.

Desse modo, *Trichophyton rubrum*, como esperado, por ser uma espécie antropofílica apresentou-se maior adaptado a queratina humana. Porém, foi interessante constatar que o *Microsporum canis* e o *Microsporum gypseum* considerados zoofílicos e geofílicos respectivamente, *in vitro*, demonstraram a mesma capacidade de patogenicidade a queratina ungueal, quando comparado ao *T. Rubrum*. Nesse sentido, estudos epidemiológicos anteriores revelaram que os risco bem reconhecidos associados à onicomicose pelo gênero *Microsporum*, como por exemplo o estado imunossupressor subjacente ou o contato com cães e gatos não foram pontuados, indicando até que o *Microsporum* pode ter maior afinidade e patogenicidade na queratina das unhas do que se pensava anteriormente.¹³

É notório a importância clínica, e até mesmo veterinária, dos dermatófitos, por isso o *Broad Institute/NIH* começou um projeto de sequenciamento do genoma de cinco espécies : *T. tonsurans*, *T. rubrum*, *T. equinum*, *M. canis* e *M. gypseum*. Um dos objetivos desse projeto é utilizar a genômica comparativa para buscar características inerentes a cada espécie que permitam revelar mais a respeito da infecção e a indução de respostas de defesa distintas. No entanto, esses dados acoplados ao desenvolvimento de modelos de infecção *in vivo* e *in vitro*, poderão desvendar as estratégias desenvolvidas pelas diferentes espécies que permitem sua instalação, sobrevivência e permanência no tecido hospedeiro, possibilitando até um maior conhecimento da resposta imune desencadeada.²³

5. CONCLUSÃO

O Desfecho desse trabalho indicou que as espécies testadas desenvolveram-se preferivelmente à 27°C, e apesar do *T. rubrum* apresentar maior patogenicidade estatisticamente, concluiu-se que todas as espécies testadas, inclusive as do gênero *Microsporum* devem ser consideradas como potenciais agentes causadores da dermatofitose ungueal.

6. REFERÊNCIAS

1. Cruz Ch Rodrigo, Ponce E Eliette, Calderón R Leslie, Delgado V Natalia, Vieille O Peggy, Piontelli L Eduardo. Micosis superficiales en la ciudad de Valparaíso, Chile: Período 2007-2009. Rev. chil. infectol. 2011; 28(5): 40-409.

2. Ely JW, Rosenfeld S, Seabury Stone M. Diagnosis and management of tinea infections. Am Fam Physician. 2014 Nov 15;90(10):702-10.
3. Jairo I. dos Santos, Moema P. P. Coelho, Berenice P. Nappi. Diagnóstico laboratorial das dermatofitoses. RBAC, vol. 34(1): 3-6, 2002.
4. Yue X, Li Q, Wang H, Sun Y, Wang A, Zhang Q, Zhang C. An ultrastructural study of *Trichophyton rubrum* induced onychomycosis. *BMC Infect Dis*. 2015 Nov 17;15:532.
5. Ribeiro Clarissa Santos de Carvalho, Zaitz Clarisse, Framil Valéria Maria de Souza, Ottoni Thaíssa Santos de Carvalho, Tonoli Melissa Santos de Carvalho, Ribeiro Renata Pinto. Descriptive study of onychomycosis in a hospital in São Paulo. *Braz. J. Microbiol*. 2015; 46(2): 485-492.
6. Zanardi Daniela, Nunes Daniel Holthausen, Pacheco Alexsandra da Silva, Tubone Mariana Quirino, Souza Filho Jorge José de. Avaliação dos métodos diagnósticos para onicomicose. *An. Bras. Dermatol*. 2008 Apr; 83(2): 119-124.
7. Nazar Javier R, Gerosa Paula E, Díaz Osvaldo A. Onicomicosis: epidemiología, agentes causales y evaluación de los métodos diagnósticos de laboratorio. *Rev. argent. microbiol*. 2012; 44(1).
8. Han HW, Hsu MM, Choi JS, Hsu CK, Hsieh HY, Li HC, Chang HC, Chang TC. Rapid detection of dermatophytes and *Candida albicans* in onychomycosis specimens by an oligonucleotide array. *BMC Infect Dis*. 2014 Nov 7;14:581.
9. Schmitt Juliano Vilaverde, Bombonato Giovana, Trierweiler Stella Maris, Fabri Andrea Buosi. General aspects of drug interactions with systemic antifungals in a retrospective study sample. *An. Bras. Dermatol*. 2013 June ; 88(3): 476-479.
10. Chiacchio Nilton Di, Suarez Maria Victoria, Madeira Celso Luís, Loureiro Walter Refkalefsky. An observational and descriptive study of the epidemiology of and therapeutic approach to onychomycosis in dermatology offices in Brazil. *An. Bras. Dermatol*. 2013; 88(1): 3-11.
11. Ghannoum M, Isham N, Long L. In vitro antifungal activity of ME1111, a new topical agent for onychomycosis, against clinical isolates of dermatophytes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Sep;59(9):5154-8.
12. Vasconcellos Cidia, Pereira Carolina Queiroz Moreira, Souza Marta Cristina, Pelegrini Andrea, Freitas Roseli Santos, Takahashi Juliana Possato. Identification of fungi species in the onychomycosis of institutionalized elderly. *An. Bras. Dermatol*. 2013; 88(3): 377-380.
13. Martínez Erick, Ameen Mahreen, Tejada Diana, Arenas Roberto. *Microsporum* spp. onychomycosis: disease presentation, risk factors and treatment responses in an urban population. *Braz J Infect Dis*. 2014; 18(2): 181-186.
14. Azambuja CV, Pimmel LA, Klafke GB, Xavier MO. Onychomycosis: clinical, mycological and in vitro susceptibility testing of isolates of *Trichophyton rubrum*. *An Bras Dermatol*. 2014 Jul-Aug;89(4):581-6
15. NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos; Norma Aprovada. NCCLS document M38-A (ISBN 1-56238-470-8). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2002.
16. Macêdo Danielle Patrícia Cerqueira, Neves Rejane Pereira, Magalhães Oliane Maria Correia, Souza-Motta Cristina Maria de, Queiroz Lusinete Aciole de. Pathogenic aspects of *Epidermophyton floccosum* langeron et milochevitch as possible aethiological agent of *Tinea capitis*. *Braz. J. Microbiol*. 2005 Mar; 36(1): 36-37.

17. Rocha APS. Piedra preta: Características in vitro, aspectos ultraestruturais e identificação de novos agentes etiológicos. UFPE, 2015.
18. Inácio CP, Rocha AP, Barbosa Rdo N, Oliveira NT, Silva JC, de Lima-Neto RG, Macêdo DP, Neves RP. Experimental white piedra: a robust approach to ultrastructural analysis, scanning electron microscopy and etiological discoveries. *Exp Dermatol*. 2016 Jan;25(1):79-81.
19. Lacaz, C.S.; Porto, E.; Martins, J.E.C.; Heins-Vaccari, E.M. & Takahashi De Melo, N. – Tratado de *Micologia* médica; Prefácio: Bertrand Dupont. 9. ed. São Paulo, Sarvier, 2002.
20. Sidrim J.J.C., Rocha, M.F.G., *Micologia Médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Guanaba Koogan p. 135-161., 2004.
21. Ballesté DR, Mousqués N, Gezuele E. Onicomycosis. Revisión del tema. *Rev Med Uruguay* 2003; 19: 93-106
22. Ely JW, Rosenfeld S, Seabury Stone M. Diagnosis and management of tinea infections, *Am Fam Physician*. 2014 Nov 15;90(10):702-10.
23. Peres Nalu Teixeira de Aguiar, Maranhão Fernanda Cristina Albuquerque, Rossi Antonio, Martinez-Rossi Nilce Maria. Dermatofitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. *An. Bras. Dermatol*. 2010; 85(5): 657-667.

5 CONCLUSÃO

- As espécies testadas desenvolveram-se preferencialmente a 27° C quando comparado as espécies encubadas à 38° C;
- Estatisticamente, o *T. rubrum* apresentou maior patogenicidade;
- Os fragmentos ungueais que apresentavam maiores alterações morfológicas facilitaram o desenvolvimento das estruturas fúngicas, sendo um fato constatado através da microscopia óptica;
- Por fim, todos os isolados testados, inclusive os do gênero *Microsporum* podem ser considerados potenciais agentes causadores da dermatofitose ungueal.

REFERÊNCIAS

- AQUINO, V. R; CONSTANCE C.C; BAKOS L. Frequência das dermatofitoses em exames micológicos em Hospital Geral de Porto Alegre, Brasil. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 82, n. 3, p. 239-244, June 2007.
- ARAUJO, A.J. G; BASTOS, O. M. P; SOUZA, M. A. J; OLIVEIRA, J. C. Ocorrência de onicomicose em pacientes atendidos em consultórios dermatológicos da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. **An. Bras. Dermatol.** [online]. 2003, vol.78, n.3
- AZAMBUJA C.V.A; PIMMEL L.A; KLAFKE G.B; XAVIER M.O. Onychomycosis: clinical, mycological and in vitro susceptibility testing of isolates of *Trichophyton rubrum*. **An Bras Dermatol.** 2014;89(4):581-6.
- ARRUA, J.M.M; RODRIGUES, L.A.S; PEREIRA, F.O; LIMA, E. O. Prevalence of *Candida tropicalis* and *Candida krusei* in onychomycosis in João Pessoa, Paraíba, Brazil from 1999 to 2010. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, Rio de Janeiro, v. 87, n. 3, p. 1819-1822, Sept. 2015.
- BALLESTE, R; MOUSQUÉS, N; GEZUELE, E. Onicomycosis. Revisión del tema. **An Asoc Quim Farm Uruguay** 2003; 19:93-106.
- BARALDI, A; JONES, S.A; GUESNÉ, S; TRAYNOR, M.J; MCAULEY, W.J; BROWN, M.B; MURDAN, S. Human Nail Plate Modifications Induced by Onychomycosis: Implications for Topical Therapy. **Pharmaceutical Research** 32.5 (2015): 1626–1633.
- CHIACCHIO, N.D; SUAREZ, M.V; MADEIRA, C.L; LOUREIRO, W.R. An observational and descriptive study of the epidemiology of and therapeutic approach to onychomycosis in dermatology offices in Brazil. **An. Bras. Dermatol.** 2013, vol.88,
- CHOUHAN, P.; SAINI, T.R; Hydration of nail plate: a novel screening model for transungual drug permeation enhancers. **Int J Pharm.** 2012;436(1–2):179–82.
- CRUZ, C. R.; PONCE, E. E.; CALDERÓN, R. L.; DELGADO V. N.; VIEILLE, O. P.; PIONTELLI, L. E. Micosis superficiales en la ciudad de Valparaíso, Chile: Período 2007-2009. **Rev. chil. infectol.** 2011; 28(5): 40-409.
- INÁCIO, C.P.; ROCHA, A.P.; BARBOSA, R. D. O.; OLIVEIRA, N.T.; SILVA, J.C.; LIMA-NETO, R.G.; MACÊDO, D. P.; NEVES, R. P. Experimental white piedra: a robust approach to ultrastructural analysis, scanning electron microscopy and etiological discoveries. **Exp Dermatol.** 2016 Jan;25(1):79-81.
- SANTOS, J.J; COELHO, P.P; NAPPI, B.P. Diagnóstico laboratorial das dermatofitoses. **Rev Bras Anal Clin.** 2002;34:3–6
- WESTERBERG, D.P; MICHAEL, J.D.O. Onychomycosis: Current Trends in Diagnosis and Treatment, **Am Fam Physician.** 2013 Dec 1;88(11):762-770.
- ELY, J. W.; ROSENFELD S.A.; STONE M.S. “Diagnosis and management of tinea infections” **Am Fam Physician.** 2014 Nov 15;19 (10): 702-711.

GAMONAL, A.; CARVALHO, M. T. F.; MANSUR, M. C. D; et al. Distrofias Ungueais. **HU rev**; 27(1/3): 326-329, jan-dez. 2001.

GHANNOUM, M.; ISHAM, N.; LONG, L. In vitro antifungal activity of ME1111, a new topical agent for onychomycosis, against clinical isolates of dermatophytes. **Antimicrob Agents Chemother**. 2015 Sep;59(9):5154-8.

HAN, H.W.; HSU, M. M.; CHOI, J. S.; HSU, C.K.; HSIEH, H.Y.; LI, H.C.; CHANG, H. C.; CHANG, T.C. Rapid detection of dermatophytes and *Candida albicans* in onychomycosis specimens by an oligonucleotide array. **BMC Infectious Diseases**, Nov 2014.

HRYNCEWICZ-GWÓŹDŹ, A.; JAGIELSKI, T.; DOBROWOLSKA, A.; SZEPIETOWSKI, J.C.; BARAN, E. Identification and differentiation of *Trichophyton rubrum* clinical isolates using PCR-RFLP and RAPD methods. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 30, n. 6, p. 727–731, 2011.

JINNA, S.; FINCH, J. “Spotlight on Tavaborole for the Treatment of Onychomycosis.” **Drug Design, Development and Therapy** 9 (2015): 6185–6190.

LEE, W.J.; PARK, K.H.; KIM, M.S.; LEE, S.J.; KIM, D.W.; BANG, Y.J.; JUN J.B. Decreasing incidence of *Trichophyton mentagrophytes* in Korea: Analysis of 6,250 cases during the last 21-Year-Period (1992-2012). *Journal of Korean Medical Science*, v. 29, n. 2, p. 272-276, 2014.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M. & TAKAHASHI DE MELO, N. – **Tratado de Micologia médica**; Prefácio: Bertrand Dupont. 9. ed. São Paulo, Sarvier, 2002.

MAGALHAES, G. M.; SUCCI, I. C. B.; SOUSA, M. A. J. Subsídios para o estudo histopatológico das lesões ungueais. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 1, p. 49-61, Feb. 2003.

MACÊDO, D. P. C.; NEVES, R. P.; MAGALHÃES, O. M. C.; SOUZA-MOTTA, C. M.; & QUEIROZ, L. A. Pathogenic aspects of *Epidermophyton floccosum* langeron et milochevitch as possible aethiological agent of Tinea capitis. **Brazilian Journal of Microbiology**, 36(1), 36-37, 2005

MARTÍNEZ, E.; AMEEN, M.; TEJADA, D.; ARENA, ROBERTO. *Microsporum* spp. onychomycosis: disease presentation, risk factors and treatment responses in an urban population. *Braz J Infect Dis*. 2014; 18(2): 181-186.

MOLINA, A.D. Aspectos clínicos, diagnósticos y terapéuticos de las dermatofitosis. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica.*, v. 29, n. 33, p.33-39, 2011.

NAZAR, J.R.; GEROSA, P.E.; DIAZ, OSVALDO A. Onicomycosis: epidemiología, agentes causales y evaluación de los métodos diagnósticos de laboratorio. **Rev. argent. microbiol.**, Ciudad Autónoma de Buenos Aires , v. 44, n. 1, mar. 2012.

NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos; Norma Aprovada. NCCLS

document M38-A (ISBN 1-56238-470-8). **NCCLS**, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2002.

PERES, N. T. A.; MARANHÃO F. C. A.; ROSSI A.; MARTINEZ-ROSSI, N. M. Dermatofitos: Interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v.85, n. 5, p. 657-67, 2010

PIRES, C. A. A.; CRUZ, N. F. S; LOBATO, A. M.; SOUSA, P. O.; CARNEIRO, R.F.O.; MENDES, A. M. D. Clinical, epidemiological, and therapeutic profile of dermatophytosis. **An. Bras. Dermatol.** 2014; 89(2): 259-264.

RIBEIRO, C. S. C.; ZAITZ, C.Z.; VALÉRIA, M.S.; OTTOBONI, T. S.C.; TONOLI, M.S.C.; RIBEIRO, R.P. “Descriptive Study of Onychomycosis in a Hospital in São Paulo.” **Brazilian Journal of Microbiology** 46.2 (2015): 485–492.

RIBEIRO, L. H. S; NOVAES, E. M. C.; NEVES, R. G. A unha: estudo da anatomia, fisiologia e alterações da cor. **An. Bras. Dermatol.** Rio de Janeiro, v.70, n.6, oct. 1995.

ROCHA APS. Piedra preta: Características in vitro, aspectos ultraestruturais e identificação de novos agentes etiológicos. UFPE, 2015.

SHARMA, V.; KUMAWAT, T.K.; SHARMA, A.; SETH, R.; CHANDRA, S. Distribution and prevalence of dermatophytes in semi-arid region of india. *Advances in microbiology*, v. 5, n. 2, p. 93-106, 2015.

SALAS-CAMPOS, I.; GROSS-MARTÍNEZ, N.; CARRILLO-DOVER, P. Onicomycosis por hongos fuliginosos. **Acta Médica Costarricense** 2009, 51(4):241-244.

SCHALKA, S.; NUNES, S.; GOMES, N. A. Comparative clinical evaluation of efficacy and safety of a formulation containing ciclopirox 8% in the form of a therapeutic nail lacquer in two different posologies for the treatment of onychomycosis of the toes. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro , v. 87, n. 1, p. 19-25, Feb. 2012.

SCHMITT, J. V.; BOMBONATTO, G.; TRIERWEILER, S. M.; FABRI, A. B. General aspects of drug interactions with systemic antifungals in a retrospective study sample. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro , v. 88, n. 3, p. 476-479, June 2013

SIMPANYA, M. F. Dermatophytes: Their taxonomy, ecology and pathogenicity. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 17, p. 1-12, 2000.

SIDRIM J.J.C., ROCHA, M.F.G., *Micologia Médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Guanaba Koogan p. 135-161., 2004

TOSTI & ELEWSKI, Onychomycosis: Practical Approaches to Minimize Relapse and Recurrence. **Skin Appendage Disord** 2016;2:83–87 DOI: 10.1159/000448056

VASCONCELLOS C.; PEREIRA C. Q. M.; SOUZA, M.C.; PELEGRINI, A.; FREITAS, R. S., TAKAHASHI J.P. Identification of fungi species in the onychomycosis of institutionalized elderly. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro , v. 88, n. 3, p. 377-380, June 2013 .

ZANARDI, D.; NUNES, D.H.; PACHECO, A.S.; TUBONE, M.Q., SOUZA, F.J.J. Avaliação dos métodos diagnósticos para onicomicose. **An Bras Dermatol**. 2008;83(2):119-24.

YUE, Xueping et al. “An Ultrastructural Study of *Trichophyton Rubrum* Induced Onychomycosis.” **BMC Infectious Diseases** 15 (2015): 532.

YARAK, S.; ARAÚJO, T. M. A. Afecções ungueais nas doenças sistêmicas: o que as unhas podem dizer-nos. **Rev Bras Med**, v. 66, n. 6, p. 15-9, 2009.

YURI, **Fun With Microbiology** (What's Buggin' You?). 2015. Disponível em: <<http://thunderhouse4-yuri.blogspot.ca>>. Acesso em: 20 nov. 2017.

KAUR, R.; KASHYAP B.; BHALLA, P. Onychomycosis - epidemiology, diagnosis and management. **Indian J Med Microbiol** 2008; 26:108-16

WESTERBERG, D.P.; VOYACK, M.J. Onychomycosis: Current trends in diagnosis and treatment. **Am Fam Physician**. 2013;88:762–70