



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

**PIEDRA PRETA: CARACTERÍSTICAS *IN VITRO*, ASPECTOS
ULTRAESTRUTURAIS E IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS
AGENTES ETIOLÓGICOS**

ANA PAULA SANTIAGO ROCHA

RECIFE

2015

Ana Paula Santiago Rocha

**PIEDRA PRETA: CARACTERÍSTICAS *IN VITRO*, ASPECTOS
ULTRAESTRUTURAIS E IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS
AGENTES ETIOLÓGICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia do Centro de Ciências da Saúde para obtenção do Grau de Mestre em Patologia com orientação da profa. Dra. Rejane Pereira Neves e co-orientação do prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto da Universidade Federal de Pernambuco.

**RECIFE
2015**

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

R672p Rocha, Ana Paula Santiago.
Piedra preta: características *in vitro*, aspectos ultraestruturais e identificação de novos agentes etiológicos / Ana Paula Santiago Rocha. – Recife: O autor, 2015.
75 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Rejane Pereira Neves.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2015.
Inclui referências e anexos.

1. Fungos filamentosos. 2. Microscopia eletrônica de varredura. 3. Micoses. 4. Piedra preta. 5. Fungos demáceos. I. Neves, Rejane Pereira (Orientadora). II. Título.

616.07 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2015-192)

ANA PAULA SANTIAGO ROCHA

PIEDRA PRETA: CARACTERÍSTICAS *IN VITRO*, ASPECTOS
ULTRAESTRUTURAIS E IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS AGENTES
ETIOLÓGICOS

Dissertação aprovada em: 20/02/2015

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes-Filho (Dep. de Patologia - UFPE)

Profa. Dra. Danielle Patrícia Cerqueira de Macedo (Dep. de Ciências
Farmacêuticas - UFPE)

Profa. Maria Bernadete Sousa Maia (Dep. de Fisiologia e Farmacologia - UFPE)

MEMBROS SUPLENTE:

Prof. Dr. André Ferraz Goiana Leal (Dep. de Micologia - UFPE)

Profa. Dra. Manuela Figueiroa (Dep. de Patologia - UFPE)

RECIFE

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

R E I T O R

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE- REITOR

Prof. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

Prof.^a Catarina de Oliveira Neves

COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof.^a Manuela Figueroa Lyra de Freitas

VICE-COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof. Lucas Brandão

“ Dedico aos meus pais: ***Carmen Lúcia e Watson Rocha*** pelo apoio e a fé que depositaram em mim ao longo desses anos de batalhas”.

“A todos os amantes da Micologia Médica, assim como eu, uma Fungada de carteirinha”

AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar!

Aos meus pais, Carmem Lúcia e Watson Rocha pelo apoio e incentivo ao longo dos anos!

A Universidade Federal de Pernambuco por me conceder fazer parte dessa grande escola de ensinamentos e aprendizados, bem como ao Programa de Pós-Graduação em Patologia por me receber nesse grande grupo de mestres e doutores !

Aos amigos da turma do mestrado de Patologia!

Aos amigos do laboratório de Micologia Médica !

Aos mestres e doutores que passaram por esse caminho de ensino, mostrando seus conhecimentos!

Aos meus queridos orientadores, Profa. Rejane e Prof. Reginaldo, pela ajuda no momento da execução deste trabalho!

A todos que contribuíram de forma direta, ou indireta para a realização deste trabalho: professores (em especial, Prof^a Oliane Magalhães), estagiários da patologia e secretaria (em especial, Margarete)!

À banca examinadora, pelas sugestões e correções!

A Capes pela bolsa concedida ao longo desses dois anos de desenvolvimento do projeto!

Ao CETENE pela parceria na obtenção das imagens utilizadas no trabalho!

Muito obrigada por tudo.

"Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso e pessoas fracassadas. O que existem são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles."

Autor: Augusto Cury
livro: Nunca desista dos seus sonhos

RESUMO

Piedra preta é uma micose superficial assintomática, caracterizada pela formação de nódulos rígidos e enegrecidos localizados ao longo do fio capilar. É uma micose considerada rara, inócua, podendo acometer tanto o gênero feminino quanto o masculino em qualquer faixa etária. *Piedraia hortae*, agente etiológico desta micose, é um fungo filamentoso, demáceo que produz o pigmento melanina, caracterizando uma coloração enegrecida na parede celular e nas estruturas fúngicas. Este pigmento, por sua vez, é caracterizado como um potente fator de virulência, favorecendo, desse modo, seu potencial em causar parasitismo no cabelo. Na literatura, não há referências citando que outros fungos demáceos, que formam ascostroma, ascos e ascosporos, semelhantes ao *P. hortae*, possam ser agente etiológico dessa feohifomicose. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade de fungos demáceos de formarem nódulos na porção extrafolicular de fios de cabelo humano, semelhantes aos da piedra preta. Foram obtidos onze isolados de fungos demáceos, sendo dez da Coleção de Cultura Micoteca URM, UFPE, os quais estavam preservados sob óleo mineral e posteriormente semeados em meio Ágar Batata Dextrose para estimulação do crescimento; e um isolado proveniente do Laboratório de Micologia Médica. Foram preparadas suspensões dos isolados dos fungos demáceos em 2,0 ml de água destilada esterilizada, ajustada para concentração final de 10^6 células/mL. Em seguida, vertidos separadamente 0,5 mL de cada suspensão sobre os fios de cabelo contidos nas placas de Petri previamente esterilizada e mantidas a temperatura de 28°C e 37°C. O experimento foi conduzido através de observações macroscópicas e microscópicas dos cabelos durante 40 dias e acompanhado em intervalo de 5 dias. Dois isolados (970 e 3334) mostraram um elevado potencial capaz de causar infecção no fio capilar. Entretanto, oito isolados apresentaram apenas uma colonização. *Exophiala dermatitidis* e *Cladosporium tenuissimum* foram capazes de formar nódulos semelhantes ao da piedra preta, porém estruturas de reprodução como ascostroma, ascos e ascosporos, não foram visualizadas. Todavia, podemos inferir que esses fungos apresentam um potencial capaz de parasitar os fios de cabelo, degradando e destruindo a queratina e os componentes cuticulares, sendo o potente agente de tricomomicose.

Palavras-chave: Fungos filamentosos. Microscopia eletrônica de varredura. Micoses. Piedra preta. Fungos demáceos.

ABSTRACT

Black piedra is a superficial mycosis asymptomatic, characterized by the formation of hard lumps and blackened located along the capillary yarn. It is a mycosis considered rare, innocuous and can affect both the female and the male at any age. *Piedraia hortae*, the etiologic agent of this mycosis, is a filamentous fungus, dematiaceous that making the pigment melanin, featuring a blackish color in the cell wall and the fungal structures. This pigment, in turn, is characterized as a potent virulence factor, facilitating there by the potential to cause parasitic hair. In the literature, there are no references citing that other demáceos fungi that form ascostroma, asci and ascospores, similar to *P. hortae*, may be etiologic agent of this phaeohyphomycosis. The objective of this paper is to demáceos fungal ability to form nodules in extrafollicular portion of human hair, similar to those of black piedra. Eleven isolates of fungi demáceos, obtained of the Culture Collection URM, UFPE, which were preserved under mineral oil and then plated on potato dextrose agar medium for growth promotion; and one isolated from the Medical Mycology Laboratory. Fungal isolates demáceos suspensions were prepared in 2.0 ml of sterile distilled water, adjusted to a final concentration of 10^6 cells / ml. Then separately poured into 0.5 mL of each suspension over the strands of hair contained in the previously sterile Petri dishes and kept at 28 °C and 37 °C. The experiment was conducted by macroscopic and microscopic observations of the hair for 40 days and monitoring in the range of 5 days. Two isolates (970 and 3334) showed a high potential capable of causing infection in the capillary. However, eight isolates showed only colonization. *Exophiala dermatitidis* and *Cladosporium tenuissimum* was capable of forming nodules were similar to those of black piedra; however ascostroma structures such as playback, asci and ascospores were not displayed. However, we can infer that these fungi have the potential able to parasitize the hairs, degrading and destroying the keratin and cuticular components, the powerful Trichomycosis agent.

Keywords: Filamentous fungi. Scanning electron microscopy. Mycoses. Black piedra. Demáceos fungi.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A: Placa de Petri contendo a suspensão fúngica com fios de cabelos. B: Lâminas clarificadas com KOH a 20%, para avaliação do processo de infecção.

Figura 2: Microscopia eletrônica de varredura (MEV + EDX). A: Montagem do cabelo nos stubs. B e C: Metalização da amostra. D: Processamento do material metalizado no equipamento para realização das imagens.

Figura 3: Características macro e microscópicas da colônia de *Exophiala dermatitidis* em BDA. A: Colônias de aspecto mucóide e pigmentação demácea. B: Micromorfologia da cultura evidenciando hifas ramificadas e septadas e células de leveduras ovais.

Figura 4: Macro e microscopia do *Cladosporium cladosporioides*. A: Colônia demácea, extensa e com aspecto aveludado. B: Numerosas hifas demáceas, septadas e ramificadas. Conídios em forma de “limão”.

Figura 5: Aspectos macro e microscópicos do *Cladosporium tenuissimum*. A: Colônia extensa com aspecto aveludado e coloração verde oliva. B: Hifas demáceas, septadas, ramificadas e conídios em cadeias.

Figura 6: Aspectos macro e microscópicos do *Cladosporium carrioni*. A: Colônia extensa com aspecto pulverulento e coloração verde oliva. B: Hifas demáceas, septadas e conídios com aspecto limoniforme.

Figura 7: Aspectos macro e microscópicos da *Curvularia lunata*. A: Colônia extensa, negra e aspecto penugento. B: Hifas demáceas e septadas; conídios de coloração marrom claro e septados.

Figura 8: Macro e microscopia da colônia de *Curvularia pallescens*. A: Colônia com aspecto de “lã”, extensa e coloração cinza. B: Hifas enegrecidas, ramificadas e septadas, conídios marrom claro com 2 ou 3 septos.

Figura 9: Aspectos macro e microscópicos da cultura de *Alternaria alternata*. A: Colônia com aspecto pulverulento e coloração verde oliva. B: Hifa demáceas e septadas, conídios em forma de clava e coloração marrom clara.

Figura 10: Aspectos macro e microscópicos da cultura de *Alternaria tenuissima*. A: Colônia negra com aspecto aveludado. B: Hifas demáceas e conídios com septação transversal e longitudinal.

Figura 11: Macroscopia e microscopia da cultura de *Phialophora pedrosoi*. A: Colônia com aspecto aveludado e coloração verde oliva. B: Hifas demáceas, septadas e ramificadas.

Figura 12: Aspectos macro e microscópicos da cultura de *Cladophialophora devriessi*. A: Colônia negra e algodonsa. B: Hifas demáceas, septadas e ramificadas.

Figura 13: Característica morfológica do *Piedraia hortae*. A: Nódulo fixado na porção extrafolicular do cabelo. B: Numerosos ascus, localizados no interior do nódulo. C: Esmagamento do nódulo, evidenciando os ascosporos. D: Ascosporos em forma de “bananinha”.

Figura 14: Microscopia eletrônica de varredura do fio de cabelo, evidenciando as camadas cuticulares e seu aspecto em forma de “tapete”.

Figura 15: EDX dos elementos químicos C, S, O e Al, encontrados no fio capilar.

Figura 16: Microscopia eletrônica de varredura das estruturas fúngicas. A: Numerosas células de leveduras com morfologia variada; B: Células de leveduras e hifas; C: Emaranhado de numerosos filamentos micelianos.

Figura 17: Formação inicial do nódulo de *Exophiala dermatitidis*. Observar o aglomerado de leveduras localizadas na região lateral do cabelo, formando uma estrutura semelhante ao pseudoparênquima.

Figura 18: Microscopia eletrônica de varredura evidenciando uma parcial colonização no fio capilar.

Figura 19: Aspecto de degradação da *Exophiala dermatitidis*. A: Comprometimento das camadas cuticulares. B: Várias células de leveduras fortemente aderidas na fibra capilar, evidenciando o intenso parasitismo.

Figura 20: Processo de infecção gradativo do fio capilar pelo *Cladosporium tenuissimum* (3334).

Figura 21: Microscopia eletrônica de varredura mostrando as etapas de infecção do fio capilar. Em (A) aumento de 2.500 x. Em (B) aumento de 3.000 x. Em (C) aumento de 300x.

Figura 22: A e B: Microscopia óptica do cabelo mostrando o estágio inicial de infecção do cabelo. C e D: Microscopia eletrônica de varredura evidenciando o estágio inicial, bem como a morfologia das estruturas fúngicas.

Figura 23: Microscopia eletrônica de varredura mostrando os estágios de infecção pela *Exophiala dermatitidis*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Linhagens dos fungos obtidos da Coleção de Cultura da Micoteca URM, UFPE.

Tabela 2: Análise do processo de colonização, infecção e formação dos nódulos pelos fungos demáceos.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SDA - Agar Sabouraud Dextrose
BDA - Agar Batata Dextrose
MEV – Microscopia eletrônica de varredura
EDX - Energy-dispersive X-ray spectroscopy
ED- Exame direto
KOH – Hidróxido de Potássio
P. hortae – *Piedraia hortae*
C. carrioni – *Cladosporium carrioni*
C. lunata – *Curvularia lunata*
C. pallescens – *Curvularia pallescens*
A. tenuissima – *Alternaria tenuissima*
A. alternata – *Alternaria alternata*
C. devriessi – *Cladophialophora devriessi*
E. dermatitidis – *Exophiala dermatitidis*
C. cladosporioides – *Cladosporium cladosporioides*
P. pedrosoi – *Phialophora pedrosoi*
Au - Ouro
C- Carbono
S – Enxofre
Na – Sódio
Cl - Cloro

SUMÁRIO

1	Apresentação.....	16
2	Introdução.....	17
3	Fundamentação Teórica.....	19
3.1	Fio capilar e aspectos morfológicos.....	19
3.2	Piedra preta.....	21
3.3	<i>Piedraia hortae</i>.....	25
3.4	Aspectos ultraestruturais do <i>Piedraia horta</i>.....	27
3.5	Diagnóstico laboratorial micológico.....	28
3.6	Tratamento da piedra preta.....	28
3.7	Fungos demáceos agentes de Feohifomicoses.....	28
4	Objetivo.....	31
4.1	Objetivo geral.....	31
4.2	Objetivos específicos.....	31
5	Material e métodos.....	32
5.1	Aspectos éticos.....	32
5.2	Área de estudo.....	32
5.3	Tipo de estudo.....	32
5.4	Seleção dos fungos utilizados para os ensaios <i>in vitro</i> da Coleção de Culturas Micoteca URM/UFPE.....	32
5.5	Revisão taxonômica e identificação das culturas.....	33
5.5.1	Características macroscópicas.....	33
	Características microscópicas.....	33
5.5.2	Modelo de infecção <i>in vitro</i>.....	34
5.6	Determinação dos fatores de patogenicidade.....	35
5.6.1	Crescimento a 37°C.....	35
5.6.2	Deteção da atividade queratinolítica.....	35
5.7	Microscopia eletrônica de varredura e EDX.....	36
6	Resultados e Discussão.....	37
6.1	Isolados de fungos demáceos.....	37
6.2	Revisão taxonômica dos isolados.....	38
6.2.1	Características morfológicas.....	38
6.2.2	Descrição das espécies.....	40
6.3	Resultados obtidos pela Microscopia Eletrônica de Varredura e EDX.....	51

6.3.1	Características morfológicas do cabelo.....	51
6.3.2	Características morfológicas dos fungos.....	53
6.4	Avaliação da capacidade de formação de nódulos <i>in vitro</i>	54
6.5	Patogenia da Piedra preta.....	59
6.6	<i>Exophiala dermatitidis</i> : um possível agente de piedra preta?.....	62
7	Conclusão.....	66
	Referências.....	67
	Anexos	75

1. APRESENTAÇÃO

A piedra preta é uma micose superficial causada por fungos demáceos que apresentam a capacidade de infectar a porção extrafolicular dos fios de cabelo, formando nódulos. Acomete tanto o gênero feminino quanto o masculino em qualquer idade. É uma micose considerada inócua, ou seja, não oferece grandes prejuízos ao hospedeiro acometido, no entanto interfere nas questões estéticas e, conseqüentemente, na autoestima. Descrita como rara, pouco se sabe acerca das questões que envolvem a ecologia e epidemiologia desta micose. Sabe-se que sua incidência é mais frequente em regiões que apresentam clima tropical (quente e úmido), principalmente nos países da América do Sul, o qual pode favorecer o aparecimento e desenvolvimento da piedra preta. Provavelmente, falta de informações sobre características particulares desta micose, é devido à escassez de referências bibliográficas, visto que as poucas informações que existem, são obsoletas. *Piedraia hortae* é o agente etiológico da piedra preta. É um fungo filamentoso e melanizado, cuja característica primordial é a formação de nódulos enrijecidos contendo as estruturas de reprodução sexuada, como ascos e ascosporos. Essas estruturas por sua vez, caracteriza esse fungo como pertencente ao filo Ascomycota. Assim, o diagnóstico laboratorial micológico da piedra preta é realizado pela visualização dos nódulos na porção extrafolicular dos cabelos parasitados, associado com o isolamento do agente etiológico no meio de cultura. Desse modo, a correta identificação do fungo bem como o conhecimento das suas características ecológicas e epidemiológicas, contribuem para o estudo mais detalhado desta doença, melhorando o diagnóstico e facilitando no tratamento dos acometidos.

2. INTRODUÇÃO

Piedra ou tricomycose nodular é uma infecção fúngica de caráter assintomático, a qual resulta na formação de nódulos variando da cor branca, bege e preta, de diferentes consistências ao longo do cabelo. É uma micose superficial e limitada a porção extrafolicular do pelo, onde na maioria das vezes, não ocasiona resposta inflamatória no hospedeiro (DE HOOG, 1998; FIGUERAS e GUARRO, 2000; SAXENA et al., 2012). Desse modo, características particulares diferenciam as pedras e assim são classificadas como piedra branca ou preta.

A piedra preta, também conhecida como tricomycose dos estudantes é uma infecção fúngica que acomete preferencialmente os pelos do couro cabeludo. É uma micose superficial de caráter contagioso que é caracterizada pelo aparecimento de nódulos enegrecidos e de consistência pétrea, os quais são formados por uma massa compacta de estruturas fúngicas fortemente aderidos ao fio capilar (ARÊA-LEÃO, 1941; FISHMAN, 1973; FIGUEIRAS e GUARRO, 1996; LACAZ, 2002; BONIFAZ et al., 2010).

Adicionalmente é considerada inócua, ou seja, é uma micose que não oferece grandes prejuízos ao hospedeiro acometido, no entanto interfere nas questões estéticas e, por conseguinte, na autoestima. De acordo com alguns autores, sua propagação fora das regiões endêmicas é descrita como baixa; o que provavelmente pode ser explicada pela escassez de referências bibliográficas sobre esta micose (FIGUERAS e GUARRO, 1996; FIGUERAS e GUARRO, et al 1997).

O fungo filamentoso demáceo, *Piedraia hortae*, é o agente etiológico da piedra preta, o qual ocasiona o enfraquecimento do fio capilar, tornando-o facilmente susceptível à quebra. De expressiva atividade queratinolítica, esse fungo é capaz de penetrar na cutícula e no córtex do fio capilar, acarretando a ruptura do mesmo. O aspecto da degradação do *P. hortae* nos componentes histológicos do cabelo possui um padrão semelhante ao observado nos dermatófitos e em outros fungos com atividade queratinolítica (ARÊA-LEÃO, 1941; FIGUERAS e GUARRO, 1996; ONIFADE et al., 1998).

Esta infecção fúngica apresenta uma característica particular entre as micoses superficiais, que é formação de ascos e ascosporos como estrutura de reprodução deste fungo, dando origem aos nódulos. Sabe-se que a presença desses nódulos pode dificultar a ação dos medicamentos usados para tratar esta infecção, a qual se não tratada corretamente,

pode evoluir para a forma crônica, sendo a terapia clássica a tricotomia total do cabelo (FIGUERAS e GUARRO, 1996; PAIXAO et al., 2001). Além de tudo, o *P. hortae* é capaz de produzir um material extracelular, pseudoparênquima, o qual provavelmente é o principalmente responsável pela resistência às agressões do meio ambiente e desidratação (FIGUERAS e GUARRO, 1997 e 2000).

O pigmento melanina produzida por este fungo, além de servir como mecanismo protetor contra os raios UV, desidratação e altas temperaturas, também atua como sequestrador de radicais oxidativos do oxigênio (ROS), tornando este fungo mais resistente aos mecanismos de defesa do hospedeiro e principalmente aos medicamentos antifúngicos; caracterizando este pigmento como um potente fator de virulência (VIDAL-CROS et al 1994; ROZENTAL et al 1994 e 1996).

Diante da existência de características semelhantes entre os fungos demáceos e o *P. hortae*, o presente trabalho pretendeu investigar a possibilidade da ocorrência de novos agentes etiológicos causadores da piedra preta, capazes de desenvolverem nódulos na porção extrafolicular do fio capilar, e desse modo contribuir para o estudo mais detalhado desta doença, melhorando o diagnóstico e facilitando no tratamento dos acometidos.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Fio capilar e aspectos morfológicos

O fio capilar ou cabelo é uma estrutura única que está presente em todos os mamíferos. Desempenha um papel importante na proteção do couro cabeludo contra raios solares, frio, traumas mecânicos na cabeça e pescoço, além de facilitar a homeotermia (ROBBINS, 1994; BUFOLLI et al., 2013). É formado por estruturas denominadas de folículos pilosos, localizados na epiderme, camada logo abaixo da derme, os quais são responsáveis por produzir fibras com tamanho, espessura e colorações variadas. O folículo pode ser considerado um órgão, pois contém componentes glandulares e musculares e podem ser divididos anatomicamente em bulbo, regiões supra bulbares, istmo e zonas infundibulares (SPERLING, 1991; DRESSLER e CURTIUS, 1999; POZEBON et al., 1999; LIMA e SILVA, 2007).

Desse modo, os folículos pilosos surgem a partir do terceiro folheto embrionário em formação, o ectoderma, onde as células germinativas capilares do embrião em desenvolvimento levam a formação inicial do cabelo, através das interações entre células mesenquimais na papila dérmica (ABELL, 1994; POZEBON et al., 1999).

A fibra capilar consiste em um filamento queratinizado, formado principalmente pela proteína alfa-queratina, proteína de forma espiralada, a qual é responsável pela sustentação do fio. Essa molécula é encontrada imersa em grande quantidade na matriz, região com elevada concentração de tirosina e enxofre e numerosas ligações dissulfídicas (BENCZE, 1990; JONES et al., 1997; CHATT, 1998).

De acordo com Bencze (1990) e Chatt (1998), o diâmetro do fio capilar pode variar de 15 a 120µm, dependendo da raça. Este se divide basicamente em três camadas: cutícula (camada externa composta por várias subcamadas separadas por um complexo de células – endocutícula, epicutícula e exocutícula), córtex (componente principal, formado por um conjunto de células cilíndricas que recebe o nome de matriz, local onde fica situado a queratina e outras proteínas) e medula (camada mais interna que em alguns tipos de cabelos pode não estar presente).

Em relação aos componentes cuticulares, a epicutícula é considerada a principal região da cutícula onde se observa a presença de lipídios (ácido 18-metileicosanóico), que conferem um caráter oleoso ao cabelo, apresentando uma alta concentração de cistina. A exocutícula,

camada mais externa e rígida, é composta novamente por cistina a qual constitui quase a metade da cutícula. Entretanto, a endocutícula possui uma pequena quantidade de cistina, apresentando uma consistência mais macia (SMITH e SWIFT, 2002; VELASCO et al., 2009).

O córtex constitui a região intermediária, formada por células queratinizadas e melanizadas, que originam extensas fibras conhecidas como microfibras. Ocupa a maior área do cabelo e é composto por uma grande quantidade de cistina. Contudo, no centro do eixo do cabelo, se encontra a região medular, a qual é constituída por camadas de células que formam estruturas cilíndricas. Apresenta uma grande quantidade de lipídios e pouca concentração de cistina, além de conter grânulos como citrulina, um aminoácido que é exclusivo para a manutenção da região medular (POZEBON et al., 1999; LIMA e SILVA, 2007; VELASCO et al., 2009).

Segundo BENCZE (1990), cada folículo possui um ciclo de desenvolvimento individual que pode ser dividido em três fases: anágena, catágena e telógena, as quais desempenham funções indispensáveis para o crescimento e desenvolvimento do fio capilar. Na anágena acontece o desenvolvimento e crescimento do fio, onde a papila que está situada na parte inicial da raiz do cabelo está em íntimo contato com os vasos sanguíneos, realizando a absorção das substâncias presentes. A maioria dos elementos químicos liga-se irreversivelmente ao grupamento S - H dos aminoácidos contendo enxofre (absorção endógena). Nos indivíduos que não possuem distúrbios decorrentes de doenças do couro cabeludo ou contaminação por metais pesados, 85% dos cabelos estão nesta fase de desenvolvimento. A catágena é considerada uma fase intermediária que dura apenas algumas semanas, onde o cabelo para de crescer e não há mais irrigação sanguínea, ou seja, o cabelo morre. No indivíduo hígido, 1% dos cabelos encontra-se nessa fase. Na última fase, telógena é onde ocorre a queda do fio, sendo impelido por um novo pelo que nasce no mesmo local dando continuidade ao ciclo de desenvolvimento.

Os primeiros estudos analíticos do cabelo foram realizados por Hoppe em 1958, onde verificou a presença de arsênio (AS) no cabelo de cadáveres exumados após 11 anos de sepultamento. Flesch em 1945 sugeriu que o cabelo pudesse ser utilizado para determinar compostos presentes no corpo humano, principalmente em casos de envenenamento e homicídios, já que o cabelo funciona como um pequeno órgão excretor. Todavia, variações observadas na composição dos elementos traços, devido às diferenças encontradas no preparo das amostras, tais como sexo, idade, fatores regionais, dentre outros, foram consideradas condições que podem dificultar na resolução desses casos (POZEBON et al., 1999).

Passwater e Cranton (1993) e Robbins (1994) procederam a uma análise por difração de Raios-X do fio capilar onde observaram que 30% da estrutura do cabelo era composto por um material cristalino, enquanto que 70% era constituído por uma substância amorfa, a qual foi denominada como peptídeos de conformação não definida. Observaram também que proteínas (80%), água (15%) e lipídios eram os constituintes presentes em maior quantidade na fibra capilar, além de outros elementos como os macrominerais, Ca^{+2} , O_2 , Mg^{+2} , Na^+ , K^+ , Cl , e os microminerais Fe^{+2} , Zn^- , Cu , Mn , I , Cr , Se e Mo .

De acordo com Bencze (1990) e Robbins (1994) a absorção dos elementos e demais nutrientes ocorre a partir da raiz (região da papila), onde a quantidade absorvida dependerá da concentração instantânea dos fluídos biológicos circundantes (linfa, sangue e fluido extracelular) no folículo piloso. A contaminação exógena do cabelo pode ocorrer através do arraste de substâncias externas (poeira, fumaça, cosméticos, suor, sebo provenientes das glândulas sebáceas e ecrinas que lançam seus produtos sobre a epiderme) e pela água, uma vez que o cabelo é hidrófilo. Os elementos traços presentes na água poderão fixar-se à queratina ou em alguns casos específicos à membrana da célula (BENCZE, 1990; SACHS, 1997).

A presença de determinado elemento no cabelo indica que houve absorção e exposição do indivíduo a este elemento, mas é difícil diferenciar entre exposição exógena e endógena, uma vez que a queratina pode combinar-se com elementos de ambas as fontes de contaminação (BENCZE, 1990; CHATT, 1998). Atualmente a determinação de elementos traços na fibra capilar é utilizada para avaliar a exposição a elementos tóxicos, como metais pesados, e estimar o estado nutricional de pacientes que sofrem algum tipo de doença ou ainda a presença de nódulos de origem fúngica, a exemplo da piedra preta (WOOWIEC et al., 2013).

3.2 . Piedra preta

A piedra preta descrita como uma tricopatia ou infecção fúngica, tem como agente etiológico o *P. hortae*, um fungo capaz de produzir nódulos escuros denominados de ascostroma, cujo interior se encontram numerosos ascos e ascósporos. Podem ser visualizados na extensão do fio do cabelo e se apresentam sensível à palpação, como uma massa endurecida de células fúngicas aderidas aos fios capilares (FIGUERAS e GUARRO, 1997; SIDRIM e ROCHA, 2004).

Historicamente, diversos foram os relatos que culminaram no surgimento dessa referida micose. Acreditava-se que essa doença tenha sido introduzida na América do Sul, através de migrações pré-colombianas de indígenas oriundos da Oceania, e posteriormente, disseminando-se para outras regiões como Venezuela, Argentina, Paraguai e Uruguai (FISCHMAN, 1965; COIMBRA e SANTOS, 1990).

Segundo Fischman (1973), a doença foi descrita inicialmente em primatas, incluindo o homem, entretanto, casos de ocorrência em outros mamíferos já tinham sido reportados anteriormente. Curiosamente, o nome dado a essa micose é derivado da palavra em espanhol (piedra), a qual ocorre preferencialmente em regiões tropicais, e particularmente, na América do Sul, onde de acordo com o referido autor, a população tem hábito do uso de cosméticos oleosos, os quais aliados às condições do ambiente (clima quente e úmido) favorecem o aparecimento e crescimento do fungo (DE ALMEIDA et al, 1991; DE HOOG, 2000).

De acordo com De ALMEIDA et al, (1991) a piedra preta, em algumas tribos indígenas, é conhecida como “Quirana”, que em língua tupi significa “coisa semelhante com piolho de cabeça”. De acordo com Horta (1911), o termo piedra corresponde à denominação popular dada à referida micose na Colômbia, pelo fato dessa tricopatia ter sido observada com certa frequência nas cidades de Cauco e Medellín. Posteriormente, outras denominações propostas por Lacaz (2002), foram empregadas para designar essa micose, como tinea nodosa, tricomucose nodosa e tricomucose nodular.

Os estudos iniciais a respeito da piedra preta começaram primeiramente com as pesquisas de Horta em 1911, onde diferenciou claramente o agente etiológico da piedra preta, da variedade branca e levou em consideração que o fungo que causava a piedra preta era uma espécie de *Trichosporon*, mais tarde, sendo nomeado *T. hortae* (HORTA, 1911; BRUMPT, 1913; FIGUERAS e GUARRO, 2000). Assim, duas variedades de pedras são consideradas, a saber, piedra branca, causada por espécies de *Trichosporon* e piedra preta, causada tipicamente pelo *P. hortae*, assim denominado logo após a observação dos ascósporos localizados no interior dos nódulos (AREIA-LEÃO, 1941; COIMBRA e SANTOS, 1990; FIGUERAS e GUARRO, 2000; GUPTA et al., 2003).

Godinho em 1906 descreveu o primeiro caso brasileiro de infecção pela piedra preta, a qual tinha ocorrido em meados de 1896. Posteriormente, outros casos foram relatados nos estados do Ceará (MAGALHÃES, 1906; 1957, MUNIZ e VALLADARES, 1917), Pernambuco (HORTA, 1911, SAMPAIO, 1913; TORRES, 1915), Bahia (MOSES, 1917), Minas Gerais (MAGALHÃES e NEVES, 1926), Mato Grosso e Guanabara (PEREIRA,

1930a e 1930b), Rio de Janeiro (PENA, 1931a; 1931b; MIRANDA, 1932), São Paulo e Rio Grande do Sul (MAGALHÃES, 1926; 1957).

Em estudos desenvolvidos por Mackinnon e Shoutten (1942), o autor relacionou o aparecimento da piedra preta com o hábito de tomar banho em rios nas regiões endêmicas, particularmente no Suriname. O próprio, se auto infectou demonstrando que este fungo encontra-se amplamente distribuído no ambiente e que qualquer pessoa estava susceptível a adquiri-lo.

Rodriguez (1960) verificou que casos de piedra preta eram comumente encontrados no litoral do Equador, principalmente em regiões localizadas nas zonas tropicais, onde o clima e as condições atmosféricas apresentavam-se elevadas. Nesse estudo, observaram que as mulheres e as crianças eram as mais acometidas pela micose, porém não sabiam o porquê de tal incidência ocorrer apenas com esse grupo.

Fischman (1965) reportou essa micose como sendo endêmica em Manaus (Brasil), pelo fato dessa região apresentar um clima ameno com temperatura em torno dos 26°C e umidade elevada, o que favorecia o desenvolvimento e a viabilidade do fungo por longos períodos de tempo. Em outro estudo, Fischman (1973) ao examinar indivíduos infectados com a piedra preta verificou que a doença era endêmica entre os índios brasileiros que viviam ao norte da região Centro-Oeste do Mato Grosso, no Parque Nacional do Xingú; e constatou que índios de ambos os gêneros também se encontravam infectados. Estudos realizados por Pereira Júnior et al. (1982) confirmaram a endemia naquela região, uma vez que estudaram um grupo de indígenas que também habitavam esse parque.

Coimbra et al. (1989), afirmaram que a epidemiologia e ecologia dessa micose, contudo ainda é pouco conhecida, considerou onde observaram que grupos indígenas vizinhos convivendo com pessoas com piedra preta, não demonstraram nenhum tipo de contaminação entre eles. Esses dados, para outros autores, implicam a necessidade de mais estudos e pesquisas sobre essa doença, para elucidar as características ecológicas e epidemiológicas dessa infecção fúngica.

Paixão et al. (2001), descreveram um caso incomum de uma paciente de 69 anos de idade que apresentou lesões clínicas compatíveis com piedra preta (nódulo negros e rígidos no fio capilar), porém no diagnóstico laboratorial micológico, o resultado foi conclusivo para piedra branca. Nesse estudo, o fungo foi identificado como *T. inkin*, todavia, os pesquisadores não sabiam explicar o porquê esse fungo produzia pigmentação escura, mimetizando episódios de piedra preta; além de, enfatizar a importância da realização do diagnóstico

micológico, baseado no exame direto e cultura para identificação do agente etiológico, e, por conseguinte, facilitando a conclusão do diagnóstico.

Kanitakis et al. (2006) analisaram também um caso incomum de mimetismo de infecção de piedra. Nesse caso, paciente do sexo masculino, 27 anos, oriundo da França apareceu com numerosos nódulos enegrecidos ao longo do cabelo e com todas as características compatíveis com piedra preta. Porém, ao isolar o agente etiológico em meio de cultura, este foi identificado como *T. asahii*, divergindo completamente da clínica observada. Nesse caso, segundo os autores, provavelmente houve uma contaminação da amostra, o que dificultou o isolamento e crescimento do *P. hortae* no meio de cultura e posterior identificação.

Em trabalhos mais recentes, Cardona et al. (2013) relataram um caso de piedra preta em mulher idosa, de 72 anos de idade, a qual habitava a zona urbana no centro da Colômbia. Nesse estudo, os autores levaram em consideração as questões climáticas elevadas, como calor e umidade da região, como condições que favorecia o desenvolvimento e a propagação dessa espécie de fungo.

Em pesquisa realizada por Desai e Nadkarni (2013), estes observaram uma condição extremamente rara de infecção mista, ou seja, a associação pelos dois tipos de piedras (branca e preta) em mulher jovem mulçumana. Nesse relato de caso, a paciente apresentava características compatíveis para os dois tipos de piedra e tal infecção foi confirmada através da realização do diagnóstico laboratorial micológico a partir dos cabelos infectados, onde foram visualizados numerosos nódulos de colorações e consistências variadas. Os autores mencionaram outro ponto importante observado, a paciente mantinha o hábito de usar diariamente um turbante, mesmo com os cabelos úmidos, e que isso poderia vir a facilitar o desenvolvimento e consequente infecção por fungos agentes das piedras branca e preta, ou seja, espécies de *Trichosporon* e *P. hortae* respectivamente.

Chávez-López et al. (2014) curiosamente, obtiveram um achado raro e acidental de piedra preta em peruca de cabelo humano, armazenada durante dois anos em ambiente fechado a beira mar de uma praia do México. Nesse trabalho, os autores também consideraram as condições climáticas da região como o fator primordial para o aparecimento dessa micose, visto que o material guardado, estava exposto a temperaturas elevadas e umidade superior a 95%. A confirmação da doença foi constatada, devido à

visualização das estruturas fúngicas ao exame direto e o isolamento e crescimento do fungo em meio de cultura.

3.3 . *Piedraia hortae*

Inicialmente, a primeira espécie encontrada como agente etiológico da piedra preta, considerada uma feohifomicose, foi descrito como sendo um fungo pertencente ao gênero *Trichosporon* sp., porém, com os estudos mais avançados acerca do tipo de estrutura de reprodução presente nesse fungo, descobriu-se que o mesmo fazia parte do gênero *Piedraia*, o qual foi criado por Da Fonseca e Area-Leão em 1928.

Segundo Boedijn (1959), sete espécies de *Piedraia* foram descritas, dentre as quais podemos destacar *P. hortae*, descoberto por (Brumpt) Da Fonseca e Area-Leão, em 1928; *P. paraguayensis* por Delamaree Gatti Bull em 1928; *P. sarmentoi*, por Pereira em 1929; *P. venezuelensis* por Brumpt e Langeron, 1934; *P. surinamensis* por Dodge em 1935; *P. colombiana* por Dodge em 1935 e *P. javanica* descoberto por Boedijn e Verbunt em 1938. Porém, apenas o *P. horte* e *P. javanica* foram implicados na causa de piedra preta.

Ciferriet et al.(1956) observaram que o parasitismo exercido pelo *P. javanica* e *P. hortae* apresentavam características semelhantes, o que dificultava a diferenciação de ambos, impedindo a identificação da espécie fúngica. Entretanto, em estudos mais aprofundados sobre a morfologia, constataram que apresentavam diferenças no tamanho e espessura dos ascosporos, uma vez que o *P. javanica* apresentava $20-60 \times 4-12 \mu\text{m}$ e *P. hortae* $37-55 \times 30-10 \mu\text{m}$.

Van Uden et al. (1963) em seguida, observaram e descreveram um surto de casos de piedra preta em pelos de vários mamíferos que habitavam a África Central, ocasionados por uma nova espécie, o qual denominou de *P. quintanillai*. Todavia, apenas o *P. hortae* vem sendo descrito como o principal e único agente causador da piedra preta.

A posição taxonômica do *P. hortae* é descrita como um fungo pertencente ao Filo Ascomycota, Subfilo Pezizomycotina, Classe Dothideomycetes, Subclasse Dothideomycetidae, Ordem Capnodiales, Família *Piedraiaceae* (Index fungorum, 2013). Esse fungo apresenta hifas e conídios melanizados, configurando uma coloração enegrecida; além de, habitar nichos ecológicos diferentes, sendo então isolado de diversos substratos como água, solo e restos de vegetais em decomposição (FIGUERAS e GUARRO, 1997; DE HOOG et al., 2000; BONIFAZ et al., 2010).

De acordo com Figueras e Guarro (1997), as estruturas de reprodução desenvolvidas pelo *P. hortae* são denominada de ascosporos, a qual é uma característica inerente à espécie, fazendo com que esse fungo seja classificado como sendo um Ascomycota. Ainda, segundo Hernández-Molina et al. (1998), no filo Ascomycota, a fusão dos núcleos não ocorre diretamente e as células dicarióticas se estendem para a formação das hifas ascógenas. Estas células, por sua vez, se convertem em ascos e ocorre a divisão meiótica. Em seguida, ocorre a conjugação nuclear e a divisão reducional, onde usualmente os ascos conterão oito ascosporos haploides no seu interior.

Além da estrutura de reprodução sexuada, que é uma característica inerente ao *P. hortae*, outro fator importante relacionado aos fungos demáceos, é a capacidade de produzir *in vivo* e *in vitro* o pigmento melanina, que fornece à coloração enegrecida as estruturas fúngicas, diferenciando do padrão dos fungos hialinos (ALVIANO et al., 1991; LANGFELDER et al., 2003).

Segundo os estudos de Polak (1990) e Hamilton e Gomes (2002), a melanina é formada por diversos polímeros multifuncionais, de alto peso molecular, formados a partir da polimerização oxidativa de compostos fenólicos. Nos fungos, a síntese da melanina apresenta diversos precursores naturais, dentre os quais, a via da DOPA-melanina e a DHN-melanina são as mais importantes. A primeira via tem como substrato inicial o aminoácido dihidroxifenilalanina (DOPA) e a segunda, o acetato, que se transforma em dihidroxinaftaleno (DHN), devido a uma série de reações enzimáticas.

A melanina, para alguns autores, se caracteriza como um fator de virulência, deixando o fungo mais resistente aos mecanismos de defesa do hospedeiro, e desta forma, ao uso de antifúngicos. O fato é relacionado à capacidade desse pigmento de sequestrar os radicais reativos do oxigênio (NO^2 ; NO), os quais são importantes na resolução da resposta inflamatória (ROZENTAL et al., 1994 e 1996; RIBEIRO et al., 2005).

Em relação às características macroscópicas do *P. hortae*, autores descrevem como de crescimento lento nos meios de cultivo usuais (Sabouraud Dextrose Ágar ou Babata Dextrose Agar) a temperatura de 25°C, desenvolvendo colônia cônica, aderente ao meio, pequena, de coloração variando do marrom-escuro ao negro. O centro da colônia é glabra quando jovem, formando gradativamente micélio aéreo, curto e marrom – oliváceo. O pigmento vermelho ferrugem pode ser notado no meio de cultura (VÁZQUEZ-GONZÁLEZ et al., 2013).

Na microscopia, entretanto, podem se observar hifas septadas de parede espessa, com células irregulares, dilatadas e às vezes, clamidoconídios. Ainda, ascos com ascósporos também podem ser formados a depender do tempo de maturação do fungo. Todavia, no exame microscópico do cabelo infectado, revela ao lado do estroma fuliginoso (ascostroma) a presença de ascos, com oito ascósporos fusiformes, escoleósporos, ciliados ou com extensão fusiforme (HORTA, 1911).

Segundo Viegas (1943), ao realizar uma pesquisa com fio de cabelo humano, na cidade de Campinas, São Paulo, observou que os peritécios formados *in vitro*, eram idênticos aos visualizados nos cabelos coletados, onde em cada peritécio foi encontrado ascos e ascósporos bem desenvolvidos. Porém, estudos mais recentes sobre as estruturas de reprodução, designam que o termo peritécio entrou em desuso para denominar tal estrutura encontrada na piedra preta. Assim, o termo considerado mais adequado para a referida estrutura reprodutiva passou a ser denominado ascostroma (KENDRICK, 2000).

3.4. Aspectos Ultraestruturais do *Piedraia hortae*

Castro et al (1987) realizaram um estudo de microscopia eletrônica de varredura associado ao EDX (Energy-dispersive X-rayspectroscopy), onde analisaram tanto as características ultraestruturais da fibra capilar acometida pelo *P. hortae*, na fase de parasitismo, quanto os constituintes químicos encontrados nessas estruturas. Observaram que algumas áreas do cabelo foram rompidas, devido à colonização inicial do fungo; o que proporcionou um estudo mais detalhado da morfologia do *P. hortae*. Na microscopia eletrônica de varredura, foram visualizados ascósporos poliédricos, arredondados ou ovalados, medindo de 2,0 a 3,5 μm , as quais eram unidas por material cementante, denominado pseudoparênquima.

Figueras e Guarro (1997; 2000) afirmam que a invasão inicial do cabelo humano pelo *P. hortae* ocorre através da produção de hifas, que se aderem firmemente e corroem as cutículas da fibra capilar. Esse mecanismo de destruição da queratina do cabelo se deve principalmente a ação de enzimas específicas que atuam diretamente na degradação da queratina. Em adição, esses autores também analisaram a ultraestrutura dos nódulos formados e constataram a presença de uma massa sólida, a qual possivelmente seria formada por estruturas produzidas pelo metabolismo do fungo.

Ainda, de acordo com Castro et al. (1987), este evento relacionado com a lise da queratina pode ocorrer por diferentes espécies de fungos que produzem queratinases, incluindo espécies envolvidas em casos de feohifomicoses, como ceratites, onicomioses, cromomicoses e entre outras.

3.5. Diagnóstico laboratorial micológico

O diagnóstico micológico laboratorial da piedra preta é confirmado pela observação direta dos nódulos demáceos presentes na região extrafolicular do fio capilar, com a presença dos seus elementos fúngicos característicos. Contudo, é indispensável à identificação do agente etiológico ao nível de espécie, e para este fim é utilizado como critério à observação dos aspectos morfofisiológicos do fungo, como as características macroscópicas e microscópicas (FIGUERAS e GUARRO, 2000; MORALES-CARDONA et al., 2013).

Para a análise, o material clínico obtido dos fios capilares pode ser corado com Giemsa, Wright e PAS ou preparados com solução clarificante de hidróxido de potássio (KOH) de 10% a 40% para observação a microscopia direta do cabelo parasitado. Para o isolamento e identificação do agente etiológico é necessário a realização da cultura do material em meios de cultivo específicos para obtenção das colônias (VÁZQUEZ-GONZÁLEZ et al., 2013).

3.4. Tratamento da piedra preta

O tratamento mais eficaz preconizado pela Academia Americana de Dermatologia envolve a tricotomia total dos cabelos afetados. Todavia, esta forma de tratamento não é aceite pelos acometidos, sobretudo pelas mulheres por razões estéticas. Também são utilizadas aplicações tópicas a base de antifúngicos, apesar de não apresentarem um resultado satisfatório por não possibilitarem a cura total, mas apenas parcial (KHANDPUR e REDDY, 2002; SAXENA et al., 2012).

Brandt e Warnock. (2003) reportaram que o uso de terbinafine oral (250mg/dia) por seis semanas obteve sucesso em alguns casos específicos de infecção pelo *P. hortae*. Porém, os autores relatam que o maior problema é a “recidiva”, independentemente do tratamento utilizado.

Segundo Taj-Aldeen et al. (2004), a utilização de econazol e cetoconazol de uso tópico com aplicações diárias apresenta bons resultados. Todavia, Youker et al. (2003), observaram

que a doença responde apenas casualmente a este tipo de tratamento. Em episódios de infecção fúngica associada a bactérias, os autores têm aconselhado o uso de medicamentos antibacteriano, a fim de conter inicialmente a proliferação bacteriana e em seguida, tratar o fungo.

Em um trabalho realizado por Mariath et al. (2006), um óleo extraído do cravo-da-índia (*Eugenia aromatica B.*) foi testado frente a fungos filamentosos e leveduras, devido a suas propriedades antifúngicas. Nessa pesquisa, observou-se que na utilização do óleo, ocorreram 100% de inibição das cepas dos fungos demáceos testados, demonstrando a importância desses óleos essenciais na produção de fármacos eficazes no tratamento de doenças microbianas, principalmente as de etiologias fúngicas.

Vázquez-González et al. (2013), relataram que o tratamento da piedra preta depende da apresentação clínica da doença. Nas micoses superficiais é indicado o uso de imidazólicos. Todavia, segundo estes autores, o *P. hortae* tem apresentado resistência ao uso do fluconazol e dos imidazólicos.

3.7. Fungos demáceos agentes de Feohifomicoses

Segundo Revankar et al. (2002) o termo “ feohifomicose” foi utilizado pela primeira vez por Ajello em 1974, para designar infecções causadas por fungos demáceos ou pigmentados que contém melanina na parede celular, e estruturas como células leveduriformes, pseudo-hifas e hifas demáceas dilatadas e distorcidas. São fungos cosmopolitas, os quais podem ser isolados de vários substratos como solo, madeira, restos de vegetais e estão implicados em episódios de micoses superficiais, subcutâneas, sistêmicas e oportunistas, a depender da condição imunológica do paciente.

A feohifomicose superficial é causada por fungos demáceos que apresentam a capacidade de penetrar nas camadas superficiais do extrato córneo da pele (camada de queratina), sem, no entanto, provocar resposta inflamatória no hospedeiro acometido. Diferentemente do acometimento cutâneo, onde o fungo invade a camada córnea da epiderme, causando lesão tecidual e processo inflamatório local. A feohifomicose sistêmica é resultado da inalação de propágulos por hospedeiro imunocompetente, conseqüentemente iniciada por lesão pulmonar e, posteriormente, disseminação por via hematogênica. Na condição oportunista, a infecção fúngica ocorre em hospedeiro imunocomprometidos, pode ser resultado da inoculação ou de inalação do agente etiológico, com posterior disseminação

hematogênica a um ou vários órgãos e, ainda, sistemas (GIRALDI et al., 2003; FERREIRO et al., 2007).

Os agentes de feohifomicoses são representados por várias espécies de fungos demáceos, pertencentes aos gêneros *Wangiella*, *Alternaria*, *Exophiala*, *Phialophora*, *Bipolaris*, *Phaeoannellomyces*, *Aureobasidium*, *Curvularia*, *Cladosporium* e *Cladophialophora* (ROSSETTO et al., 2010; FRASQUET-ARTÉS et al., 2014). Segundo a literatura, esses fungos vêm sendo isolados em diversas doenças, principalmente na cromomicose, onicomicoses, otites, ceratites micóticas, micetomas, micoses sistêmicas e oportunistas e raramente em micose superficial (BRANDT e WARNOCK, 2003; FALAHATI et al., 2014). Porém, não há relatos na literatura de que fungos demáceos, exceto o *P. hortae*, possa ser agente etiológico da pedra preta.

Diante deste cenário, o diagnóstico laboratorial micológico surge como um poderoso aliado no processo de identificação dos agentes etiológicos nessas infecções, facilitando na escolha da melhor alternativa de tratamento e convergindo para a cura do paciente.

4. OBJETIVO

4.1. Objetivo geral

Avaliar ‘*in vitro*’ a capacidade de formação de nódulos na porção extrafolicular do fio capilar por fungos demáceos semelhantes ao *Piedraia hortae* e analisar as ultraestruturas.

4.2. Objetivos específicos

- Selecionar fungos demáceos quanto aos aspectos taxonômicos e ultraestruturais;
- Induzir *in vitro* a formação de nódulos por *Piedraia hortae* e outros fungos demáceos;
- Avaliar período de formação dos nódulos;
- Realizar retrocultivos dos fungos demáceos isolados dos fios de cabelos parasitados;
- Determinar os estágios de parasitismo quanto a capacidade de formar nódulos;
- Caracterizar quanto as ultraestruturas os nódulos formados pelos fungos demáceos.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Aspectos Éticos

Esta pesquisa foi submetida para análise ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos 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, a qual preconiza sobre a ética da pesquisa envolvendo seres humanos, e garante a privacidade do sujeito envolvido na pesquisa. Atendendo aos critérios estabelecidos, os dados obtidos ficarão arquivados, à responsabilidade do pesquisador, pelo período mínimo de cinco anos.

5.2. Área de estudo

O trabalho foi realizado no Laboratório de Micologia Médica do Departamento de Micologia, do Centro de Ciências Biológicas – CCB, da Universidade Federal de Pernambuco e no CETENE.

5.3. Tipo de estudo

O estudo foi do tipo experimental, onde foram utilizados fungos estocados da Coleção de Cultura Micoteca URM/UFPE, preservados sob óleo mineral (SHERF, 1943).

5.4. Seleção dos fungos utilizados para os ensaios *in vitro* da Coleção de Culturas Micoteca URM/UFPE

Da Coleção de Culturas Micoteca URM, Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) foram solicitadas amostras de *Piedraia hortae* e outros isolados de fungos demáceos (taxonomicamente semelhante ao *P. hortae*), para os ensaios *in vitro* de piedra preta, para verificação da capacidade de infectar o fio de cabelo humano. As culturas fornecidas pela Micoteca URM foram repicadas para caldo glicosado (para estimular o crescimento fúngico) e em seguida

mantidas a temperatura ambiente (28 °C+/- 2 C) por um período de 10 dias para verificação da viabilidade das mesmas.

Após a visualização do crescimento, as culturas foram inoculadas no centro da superfície do meio Ágar Batata Dextrose (BDA), suplementados com tiamina (enriquecimento do meio de cultura) para posterior revisão taxonômica. Os isolados selecionados para o referido estudo, foram os fungos pertencentes ao filo Ascomycota.

5.5. Revisão taxonômica e identificação das culturas

As amostras fornecidas pela Coleção de Culturas Micoteca URM foram revisadas taxonomicamente através da observação das características morfofisiológicas de acordo com a metodologia proposta por De Hoog, 2000, Ficher e Cook, 2001, Lacaz, 2002.

5.5.1. Características macroscópicas

As características macroscópicas das culturas observadas foram o crescimento, diâmetro da colônia, consistência, relevo (cerebriformes, rugosas, apiculadas, crateriformes), borda (franjada), textura (algodonosa, velutinada, pulverulenta, penugentas ou furfuráceas) e coloração do verso e reverso da colônia.

5.5.2. Características microscópicas

Para a observação das características microscópicas dos fungos, um fragmento da colônia, cultivado em meio BDA, foi retirado e colocado entre lâmina e lamínula com adição de corante, azul de Aman (lactofenolcotton-blue), para visualização das estruturas fúngicas para posterior confirmação taxonômica. Foram observados os tamanhos dos conídios ou esporos, quantidades de septos, morfologia das leveduras (globosas, redondas ou ovalares), espessura das hifas, arranjo das hifas e formação de estruturas de ornamentação.

5.6. Modelo de infecção *in vitro*

A infecção *in vitro* do fio capilar foi adaptado de Macedo et al. (2005). Fios de cabelo humano oriundos de criança do sexo feminino e desprovidos de tratamento químico foram cortados com aproximados 2,0 cm de comprimento e pesados 0,05g em balança analítica. O material foi acondicionado em placas de Petri de maneira homogênea e, esterilizados em autoclave. Os cabelos foram inoculados em SDA para constatação do controle de esterilização.

Foram preparadas suspensões dos isolados dos fungos demáceos em 2,0 ml de água destilada esterilizada, ajustada para concentração final de 10^6 células/mL. Em seguida, vertidos separadamente 0,5 mL de cada suspensão sobre os fios de cabelo contidos nas placas de Petri e mantidas a temperatura de 28°C e 37°C. O experimento foi acompanhado através de observações macroscópicas e microscópicas dos cabelos durante 40 dias, e observados em intervalo de 5 dias.

A avaliação do processo de infecção foi realizada através da preparação de lâminas de vidro contendo os cabelos infectados e sobre estes, adicionado solução aquosa a 20% de Hidróxido de Potássio (KOH), posteriormente, analisado em microscópio óptico, para a constatação do processo de infecção (Figura 1).

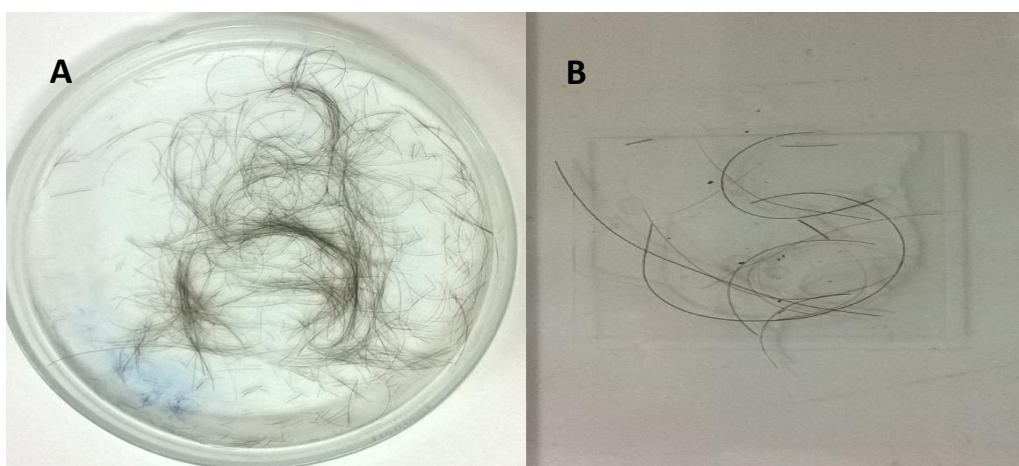


Figura 1: A: Placa de Petri contendo a suspensão fúngica com os fios de cabelos. B: Lâminas clarificadas com KOH a 20%, para avaliação do processo de infecção.

5.7. Determinação dos fatores de patogenicidade

5.7.1. Crescimento a 37°C

Para o crescimento a 37°C, as amostras foram incubadas em meio BDA durante sete dias e o processo de crescimento e germinação foi monitorado diariamente, para observar se os fungos possuíam a capacidade de se desenvolver a 37°C.

5.7.2. Detecção da atividade queratinolítica

Na verificação da atividade queratinolítica foram utilizados os métodos de Vanbreusegham (1952), English (1969). Os mesmos fios de cabelo humano do doador, isentos de coloração artificial e processos químicos, foram cortados com aproximadamente 2,0 cm de comprimento e pesados 0.05g em balança analítica sendo acondicionados em placas de Petri e posteriormente esterilizadas.

Em seguida, foram preparadas suspensões dos fungos isolados em 2,0 ml de água destilada esterilizada, em uma concentração final de 10^6 células/mL, sendo estas vertidas nas respectivas placas de Petri. As placas foram feitas em duplicata, mantendo-se uma placa a 28°C e outra a 37°C. Também foram realizados testes controle, utilizando-se as placas de Petri contendo cabelo esterilizado umedecido com água destilada também esterilizada e estes, inoculado sem meio ágar Sabouraud dextrose, e submetidos às mesmas condições de temperatura.

Nos intervalos de cinco dias, foram realizadas observações macroscópicas e microscópicas das placas. Ao término do 40º dia, foram preparadas diversas lâminas utilizando-se hidróxido de potássio a 20% (KOH), com o objetivo de verificar a ação do fungo sobre o fio capilar, como a formação de órgãos de perfuração *in vitro*, características comum a alguns grupos de fungos, através da remoção de fios de cabelo de cada extremidade da placa de Petri. Além da realização da atividade queratinolítica, os fios de cabelo foram semeados em placas com meio de cultura BDA, para reobtenção dos respectivos fungos isolados (retro-cultivo). Assim, os cabelos parasitados, que apresentaram a formação de possíveis nódulos, foram levados para a realização da microscopia eletrônica de varredura (MEV), para obtenção das imagens evidenciando as características ultraestruturais das amostras.

5.8. Microscopia eletrônica de varredura e EDX (Energy-dispersive X-ray spectroscopy)

Para as análises ultraestruturais dos cabelos parasitados e dos possíveis nódulos formados, foi utilizada a metodologia proposta por Duarte et al. (2003) adaptada, onde utilizou-se um microscópio eletrônico de varredura, da marca FEI (Quanta 200 FEG) para obtenção das imagens. Essa técnica de microscopia possibilita investigar a superfície de amostras com ampliações da ordem de centenas de milhares de vezes. Além disso, permite a realização de microanálises por espectroscopia de energia dispersiva por difração de raios-X (EDS ou EDX), que possibilita a identificação e mapeamento dos elementos químicos presentes no material analisado.

A fundamentação da técnica é que um feixe de elétrons varre a superfície da amostra e sua interação com o material analisado gera diversos tipos de sinais que são utilizados para a formação de imagens ou análise da composição da amostra. A análise foi baseada na imagem e composição das amostras em relação à morfologia e topografia, e a composição química dos elementos constituintes dos nódulos (FIGUERAS e GUARRO, 1997; CORBARI et al., 2008).

Para a realização das imagens, o material biológico foi fixado (tampão cacodilato de sódio 0,1M com Glutaraldeído a 2,5%) por 12 horas a 4°C e após esta etapa, foi feita uma lavagem do material com tampão cacodilato de sódio a 0,2M (3x por 10 minutos). Em seguida, as amostras foram pós-fixadas com ósmio a 50% em tampão cacodilato de sódio durante uma hora. Com o término desta etapa, foi retirado o pós-fixador através da lavagem com água destilada durante 10 minutos e as amostras foram desidratadas pela imersão em acetona com concentrações seriadas (30, 50, 70, 90 e 100%), secas em evaporador rotativo e submetidas ao ponto crítico. As amostras (fio capilar) foram montadas em stubs e metalizados através do bombardeamento com ouro. As micrografias foram obtidas com o auxílio de um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), que possui três modos operacionais de vácuo: alto vácuo; baixo vácuo e modo ambiental. O MEV está equipado com espectrômetro de dispersão de energia (EDS ou EDX), o qual trabalha simultaneamente com as imagens obtidas. Por meio deste espectro, foi possível obter os picos dos principais elementos químicos presente nas amostras infectadas e não infectadas.

O equipamento opera com uma voltagem 200 V a 30 kV possuindo uma corrente do feixe maior do que 100 nA. O aumento encontra-se na ordem de 12 vezes a 1.000.000x em alto e baixo vácuo. As imagens obtidas na visualização pelo MEV foram transferidas para o computador utilizando um software específico, onde as mesmas foram obtidas em uma escala de ampliação variando de 750X até 24.000X de aumento de acordo com a necessidade de observação das estruturas (Figura 2).

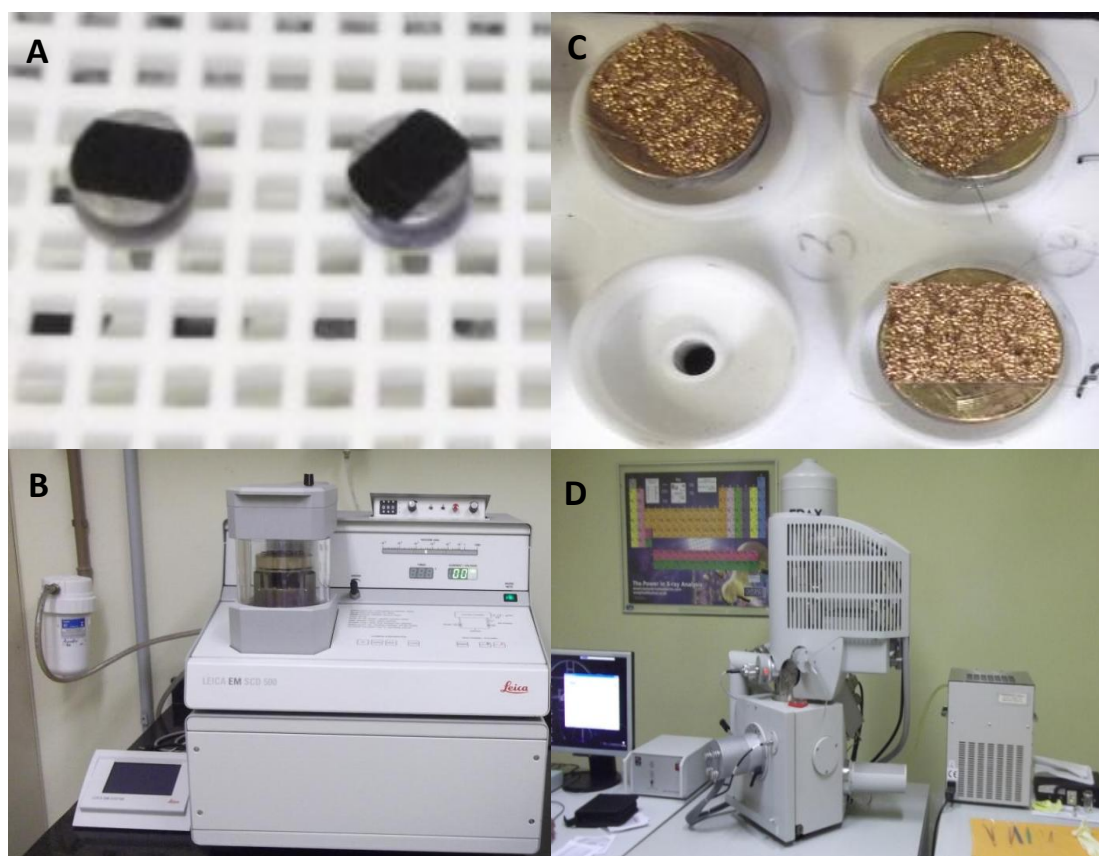


Figura 2: Microscopia eletrônica de varredura (MEV + EDX). A: Montagem do cabelo nos stubs. B e C: Metalização da amostra. D) Processamento do material metalizado no equipamento para obtenção das imagens.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Isolados de fungos demáceos

Foram obtidos onze isolados de fungos demáceos, sendo dez da Coleção de Cultura Micoteca URM, UFPE, os quais estavam preservados sob óleo mineral e posteriormente

semeados em meio BDA para estimulação do crescimento; e um isolado proveniente do Laboratório de Micologia Médica. Os isolados apresentaram diferenças quanto ao tempo de estocagem e substratos de origem, como mostra a tabela 1.

Dos onze isolados obtidos e avaliados, dez apresentaram-se viáveis nas condições de manutenção. Apenas um isolado de origem clínica de infecção do fio capilar, correspondendo ao *P. hortae*, URM 2245, não foi capaz de crescer no meio de cultivo BDA, até o 10º dia. Curiosamente, o fato desta cepa não ter se desenvolvido pode estar relacionado ao tempo de estocagem e ao método de preservação utilizado, o qual, não foi ideal para manter a viabilidade deste isolado. Além do mais, esta espécie é relatada como de difícil crescimento, *in vitro*, sendo a piedra preta comumente diagnosticada pelo exame direto do fio de cabelo parasitado (FIGUERAS e GUARRO, 2000; CHÁVEZ-LÓPEZ et al., 2014).

Além do mais, o não desenvolvimento do *P. hortae* pode estar relacionado com as exigências nutricionais que o fungo necessita para manter sua viabilidade. Possivelmente, aminoácidos como biotina e tiamina, são fundamentais para manutenção do seu metabolismo e consequentemente, reativação. Todavia, mesmo sem ter conseguido reproduzir o fungo no meio de cultura, amostras de fios de cabelo parasitados, oriundos do Laboratório de Micologia Médica, foram utilizados para visualização das estruturas que compõem os nódulos, como ascos e ascósporos.

Os isolados pertencentes às demais espécies não mostraram diferença, embora tenham divergido no tempo de preservação, sendo o mais antigo, mantido em óleo mineral desde 1978 e o mais recente desde 2013. Esta constatação demonstra que o tempo de estocagem não interfere na viabilidade das espécies avaliadas, indicando que esse método se mostrou eficiente nos fungos demáceos independente do substrato de origem de onde foram obtidos.

Segundo Neufeld e Sarquis. (2003), a técnica de preservação em óleo mineral, ainda é um método eficiente para a estocagem tanto de leveduras, quanto de fungos filamentosos. É utilizada rotineiramente, devido a fácil aplicação, baixo custo e adequada estocagem. Esses autores avaliaram a taxa de viabilidade e o percentual de recuperação por grupos de fungos mantidos em óleo mineral estéril à temperatura ambiente (28°C +/-2°C), por um período máximo de 38 anos. Como resultado, verificaram que 80% dos fungos demáceos apresentaram uma ótima taxa de viabilidade e a longevidade das culturas preservadas oscilou entre 1 e 20 anos. Resultados semelhantes foram encontrados por Maciel e Mota, (2007) que verificaram que o tempo de estocagem para alguns fungos filamentosos pode ser de até 53 anos.

Diogo et al. (2005), entretanto, afirmaram que o método de Castellani, ou seja, preservação em água destilada, ainda é mais vantajoso, pelo fato de apresentar baixos custos e também a viabilidade das cepas, bem como a capacidade de esporulação. Ainda, Rodrigues et al. (1992), que também citam como ideal o método de Castellani, afirmam ser mais vantajoso, porque em adição, apresentam a capacidade de evitar o pleomorfismo das amostras, devido aos repiques sucessivos.

Tabela 1. Linhagens dos fungos obtidos da Coleção de Cultura da Micoteca URM, UFPE.

Espécie	Número da Linhagem	Ano de Depósito	Substrato/Hospedeiro
<i>Piedra hortae</i>	2245	1981	Pelo
<i>Cladosporium carrionii</i>	5109	2005	Biópsia de tecido
<i>Curvularia pallescens</i>	5833	2008	Solo
<i>Curvularia lunata</i>	6059	2009	Endofítico
<i>Alternaria alternata</i>	5642	2007	Endofítico
<i>Alternaria tenuissima</i>	5696	2007	Mamona
<i>Cladophialophora devriessi</i>	6297	2011	Escarro
<i>Exophiala dermatitidis</i>	970	2013	Biópsia de tecido
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	6922	2013	Canino
<i>Cladosporium tenuissimum</i>	3334	2007	Solo
<i>Phialophora pedrosoi</i>	2481	1978	Fragmento de pele

6.2. Revisão taxonômica dos isolados

6.2.1. Características morfológicas

Os isolados testados foram semeados em meio de cultivo BDA, para estimular crescimento das colônias. Todos os isolados foram capazes de crescer na temperatura

ambiente (28°C +/- 2°C) e a 37°C, o que facilitou o estudo das características morfológicas de cada espécie, onde foram levadas em consideração a coloração das colônias (verso e reverso), o tamanho, o aspecto e o crescimento de cada fungo. Segundo De Hoog, (2000) e Lacaz, (2002), estas são as principais características que devem ser observadas, além dos aspectos micromorfológicos (microscopia direta e microscopia eletrônica) e das necessidades nutricionais de cada espécie analisada.

Em relação à temperatura de crescimento dos fungos, no nosso trabalho, não observamos nenhuma diferença entre o tempo de crescimento quando expostos a ambas as temperaturas. Para alguns autores, os fungos filamentosos se desenvolvem melhor quando expostos em temperatura ambiente (28°C +/- 2°C). Porém, sabe-se que, algumas espécies de fungos necessitam tanto da temperatura ambiente, quanto a 37°C para realizar a termoconversão de suas estruturas da fase filamentosa para a fase leveduriforme e vice-versa, caracterizando como um fator de virulência (ISA-ISA et al., 2012).

De acordo com Lopes-Bezerra et al. (2006), esporotricose, paracoccidioidomicose, histoplasmosse e coccidioidomicose, são ocasionadas por fungos que apresentam essa característica dimófica, contribuindo no potencial de virulência desses agentes, consequentemente na piora clínica do paciente. Ainda, fatores como aeração, CO₂, PH, fontes de carbono também podem influenciar nessa transição morfológica, no entanto, a temperatura é o fator determinante desse dimorfismo.

6.2.2 Descrição das espécies

***Exophyala dermatitidis* (Kano) De Hoog, 1977.**

Levedura negra, cuja posição taxonômica pertence ao Filo Ascomycota, Subfilo Pezizomycotina, Classe Eurotiomycetes, Subclasse Chaetothyriomycetidae, Ordem Chaetothyriales, Família Herpotrichiellaceae. Na identificação do agente etiológico, as características macro e microscopias são observadas. Crescem bem em SDA e BDA. Na macroscopia, os fungos apresentam colônias planas, levemente mucoide e coloração difusa, variando do marrom ao negro-oliváceo e crescimento relativamente rápido, em média de 4 a 5 dias. A microscopia da cultura pode ser visualizada numerosas células de leveduras globosas ou ovulares e hifas espessas, septadas e ramificadas, às vezes clamidoconídios podem ser agrupados em torno das células conidiógenas ou conidióforos (Figura 3).

Considerado um fungo contaminante de ambiente, visto que pode ser isolado de qualquer local, porém, quando se trata de pacientes imunocomprometidos, esse microrganismo se comporta como um patógeno causador de micose oportunista (LI et al., 2009). Relatos apontam esse fungo como importante agente de infecções sistêmicas em pacientes graves, principalmente aqueles internados em unidades de terapia intensiva (UTI) (CHALKIAS et al., 2014). Segundo Lacaz (2002), a *E. dermatitidis* foi relatada na literatura como agente causador da cromomicose na ilha de Madagascar.

Raramente esse fungo está implicado em episódios de infecções superficiais, entretanto em um trabalho realizado por Falahati et al. (2014), os autores relataram um caso inédito de onicomicose ocasionado por *Exophiala dermatitidis*, em paciente iraniana, de 54 anos. Curiosamente, a paciente não apresentava histórico de doenças de base ou imunodeficiências, divergindo do padrão comumente observado de micose oportunista. A confirmação taxonômica do agente etiológico foi realizada através da análise das características morfofisiológicas e análise molecular.

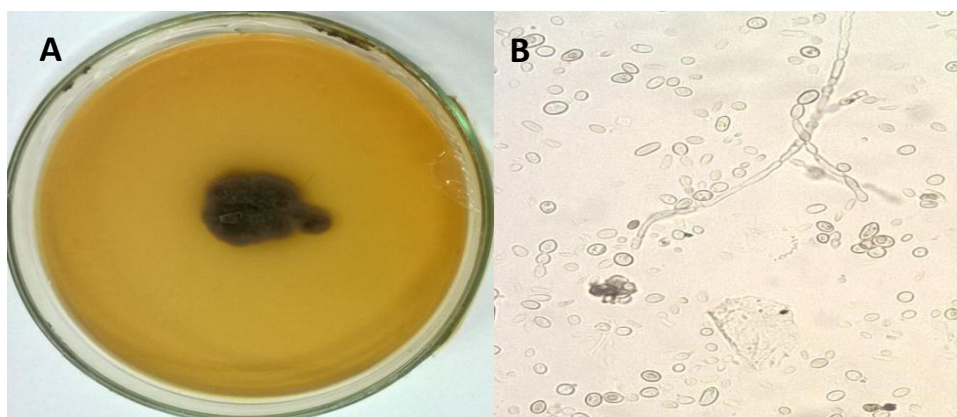


Figura 3: Macro e microscopia da colônia de *Exophiala dermatitidis* em BDA. A: Colônias de aspecto mucóide e pigmentação demácea. B: Micromorfologia da cultura evidenciando hifas ramificadas e septadas e células de leveduras ovais.

***Cladosporium cladosporiíde* (Fresen) G.A. De Vries, 1952.**

Fungo filamentoso e demáceo, cuja posição taxonômica pertence ao Filo Ascomycota, Subfilo Pezizomycotina, Classe Dothideomycetes, Subclasse Dothideomycetidae, Ordem Capnodiales, Família Cladosporiaceae. Crescem bem em meio de cultura BDA. Na macroscopia observamos colônias em expansão, com aspecto aveludado, coloração verde

oliva variando para o marrom. Apresentam crescimento lento, em média de 7-10 dias. Na microscopia, os conidióforos podem variar de tamanho, entre 350 μ de comprimento por 2-6 μ de largura, com ramificação lateral ou terminal. Cadeias de conídios com coloração marrom claro. Conídio elipsoidal, em forma de limão, medindo cerca de 3-6 μ , podendo apresentar parede lisa ou verrucosa, também marrom claro que podem ser facilmente desprendidos (Figura 4).

São considerados contaminantes naturais do ambiente, podendo ser isolado em qualquer local. Todavia, essa espécie de *Cladosporium* vem sendo relatada como agente etiológico de feohifomicose cutânea e subcutânea, principalmente em pacientes que apresentam algum tipo de imunodeficiência (GUGNANI e OKEKE, 2000; VIEIRA et al., 2001). Em um trabalho realizado por Bordoloi et al. (2015), *C. cladosporioides* foi isolado como agente etiológico em episódios de cromoblastomicose, o qual foi responsável por 6 casos, dos 15 encontrados de micose subcutânea acometendo pacientes imunocompetentes. Entretanto, não há relatos do *C. cladosporioides* como agente etiológico de micose superficial.

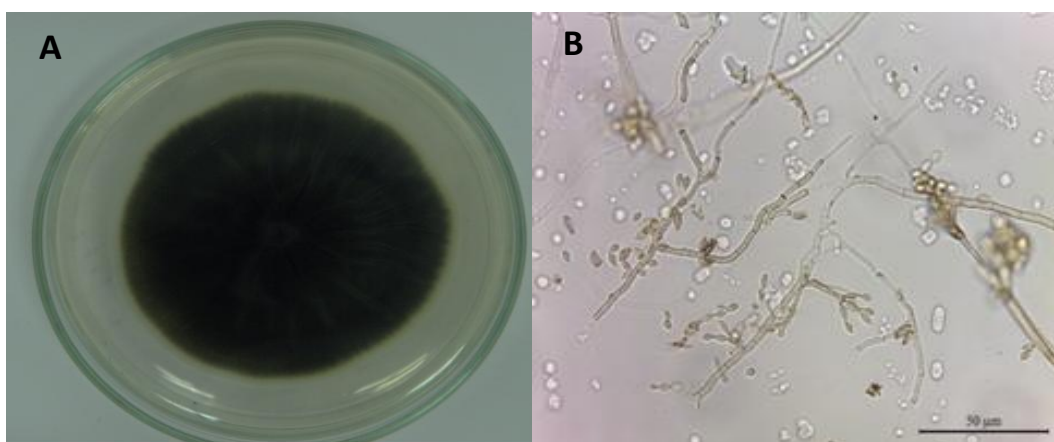


Figura 4: Macro e microscopia do *Cladosporium cladosporioides*. A: Colônia demácia, extensa e com aspecto aveludado. B: Numerosas hifas demáceas, septadas e ramificadas. Conídios em forma de “limão”.

***Cladosporium tenuissimum* (Cooke), 1878.**

Fungo filamentoso cuja posição taxonômica pertence ao Filo Ascomycota, Subfilo Pezizomycotina, Classe Dothideomycetes, Subclasse Dothideomycetidae, Ordem Capnodiales, Família Cladosporiaceae. Crescem bem em meio de cultura BDA. Na macroscopia apresentam colônias em extensão, aspecto aveludado, coloração variando do

cinza-esverdeado ao verde oliva, dependendo da idade da colônia, e crescimento lento em média de 7-10 dias. Na microscopia, os conidióforos quando presentes, são eretos e de coloração marrom claro. Os conídios são secos, com formato elipsoidal medindo cerca de 2-5 μ , coloração variando do marrom claro ao marrom escuro e parede com aspecto verrucoso (Figura 5).

São considerados contaminantes naturais do ambiente, sendo a maioria saprofítica ou fitopatôgenos. De acordo com De Hoog (1983) e Gugnani e Okeke (2000) raramente estão implicados como agentes etiológicos de infecções fúngicas em seres humanos, principalmente nas micoses oportunistas.

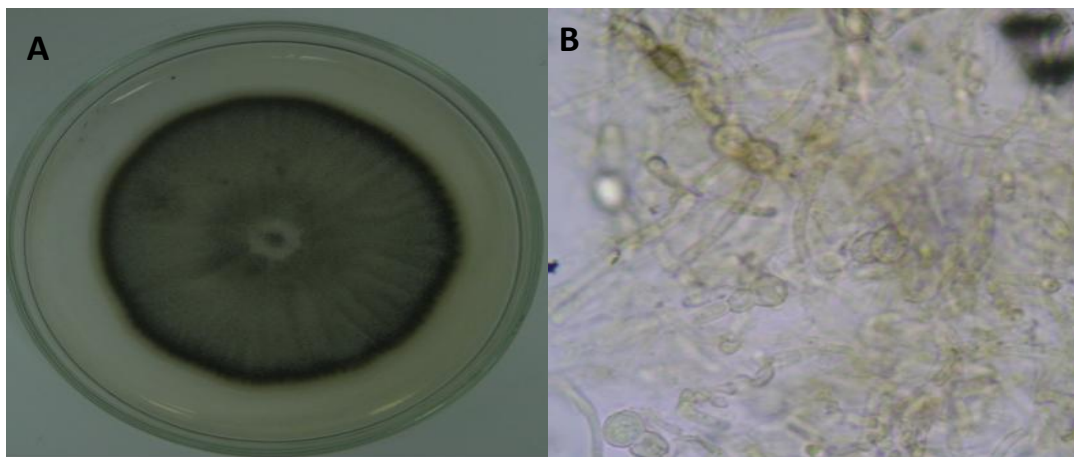


Figura 5: Aspectos macro e microscópico do *Cladosporium tenuissimum*. A: Colônia extensa com aspecto aveludado e coloração verde oliva. B: Hifas demáceas, septadas, ramificadas e conídios em cadeias.

***Cladosporium carrionii* (Trejos), 1954.**

Fungo demáceo, cuja posição taxonômica pertence ao Filo Ascomycota, Subfilo Pezizomycotina, Classe Dothideomycetes, Subclasse Dothideomycetidae, Ordem Capnodiales, Família Cladosporiaceae. Crescem bem em BDA. Na macroscopia, apresentam colônias moderadamente expansivas, com aspecto pulverulento e coloração verde-oliva. Nas características microscópicas, apresentam hifas eretas e ramificadas, coloração marrom esverdeada com cadeias de conídios apical. Os conídios apresentam coloração marrom claro, de parede lisa ou levemente verrucosa, formato variando de limoniforme ao fusiforme cerca de 4-6 μ (Figura 6).

São fungos contaminantes de ambiente, porém junto com espécies de *Fonsecaea* e *Phialophora verrucosa*, é comumente encontrado como agente etiológico de micose subcutânea, como cromoblastomicoses, a qual é caracterizada pela penetração do fungo através da implantação traumática na pele (ALMEIDA et al., 2014; MITTAL et al., 2014).

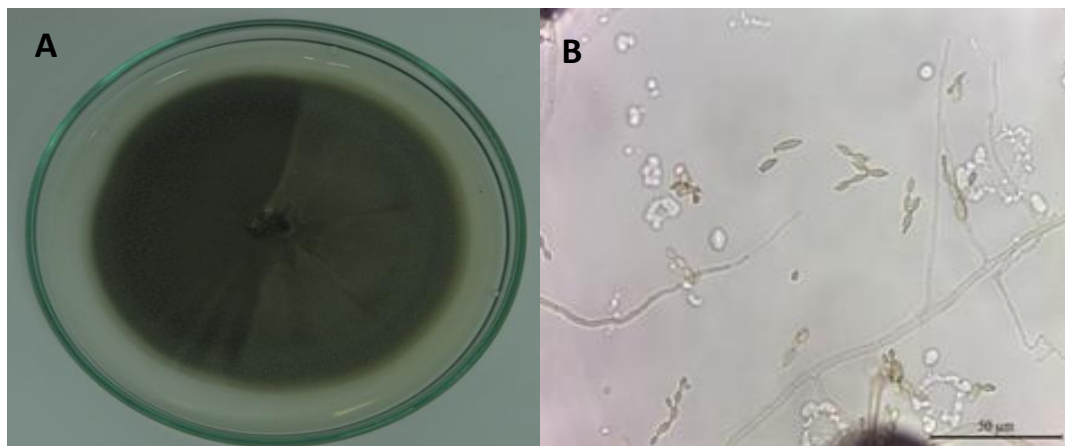


Figura 6: Aspectos macro e microscópico do *Cladosporium carrioni*. A: Colônia extensa com aspecto pulverulento e coloração verde oliva. B: Hifas demáceas, septadas e conídios com aspecto limoniforme.

***Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn, 1933.**

Apresenta uma posição taxonômica pertence ao Filo Ascomycota, Subfilo Pezizomycotina, Classe Dothideomycetes, Subclasse Pleosporomycetidae, Ordem Pleosporales, Família Pleosporaceae. Fungo que se desenvolve bem em meio de cultivo BDA. Apresentam na macroscopia colônias expandidas, negra, de aspecto penugento e micélio aéreo facilmente visível ao olho humano. Apresentam crescimento relativamente rápido, em média de 3-5 dias. Na microscopia, observamos hifas demáceas e septadas, com conidióforos eretos e não ramificados e flexíveis na parte apical. Os conídios apresentam parede lisa, de coloração marrom, em forma de clava, os quais medem cerca de 21-31 x 8-12 µ e geralmente com 3 septos (Figura 7).

O gênero *Curvularia* sp. está também relacionado com fungos contaminantes do ambiente, os quais na grande maioria são saprofíticos de plantas. São espécies que raramente estão envolvidas em episódios de feohifomicoses, mas a depender da situação imunológica do hospedeiro, este fungo pode se comportar como um verdadeiro patógeno causador de micoses oportunistas, ocasionando principalmente ceratite micótica (BRANDT e WARNOCK 2003;

HOFFMANN et al., 2011). Um caso raro foi descrito por Gunathilake et al. (2014), onde foi isolado *C. lunata* no grão negro do eumicetoma, em paciente de 54 anos imunocompetente. A identificação do agente foi realizada através da biópsia do nódulo do pé e isolamento do agente etiológico em meio de cultura.

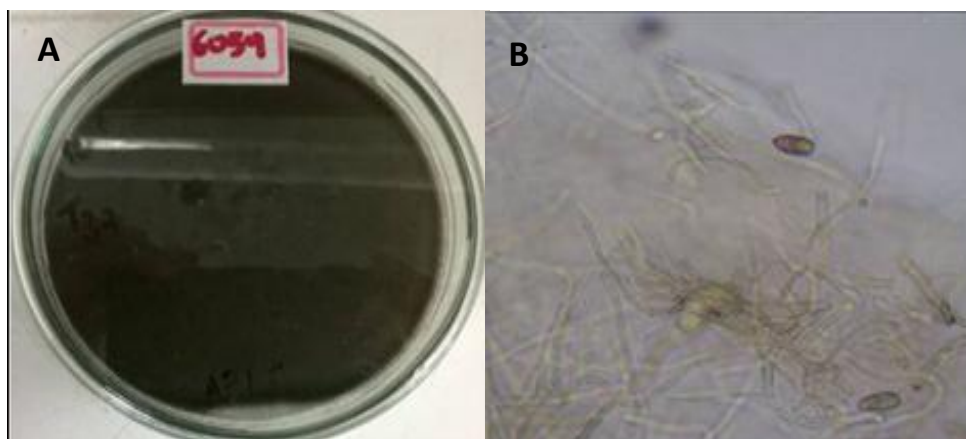


Figura 7: Aspectos macro e microscópico da *Curvularia lunata*. A: Colônia extensa, negra e aspecto penugento. B: Hifas demáceas e septadas; conídios de coloração marrom claro e septados.

***Curvularia pallescens* (Tsuda & Ueyama), 1983.**

Apresenta uma posição taxonômica pertence ao Filo Ascomycota, Subfilo Pezizomycotina, Classe Dothideomycetes, Subclasse Pleosporomycetidae, Ordem Pleosporales, Família Pleosporaceae. Fungo que se desenvolve bem em meio de cultivo BDA e apresenta rápido crescimento em média de 3-5 dias. Na macroscopia, desenvolvem colônias baixas e espalhadas, de aspecto lanoso no centro, coloração variando do cinza ao negro e micélio aéreo facilmente visível. Na microscopia, observamos hifas demáceas e septadas, com conidióforos simples, raramente ramificado, coloração marrom-claro e medindo cerca de 5-6 μ . Conídios de parede lisa, marrom-claro, morfologia elipsoidal ou fusiforme e geralmente com 3 septos e medindo cerca de 17-32 X 7-12 μ . (Figura 8).

Fungo comumente encontrado no ambiente, sendo a maioria saprofítica e fitopatógenos. Raramente esta espécie é relatada como agente etiológico de feohifomicoses, porém se tratando de pacientes imunocomprometidos, esse fungo pode apresentar comportamento oportunista (REVANKAR et al., 2002). Segundo Alvares et al. (2011), *C. pallescens* vem sendo isolada em episódios de sinusite alérgica, comprometimento pulmonar

e no sistema nervoso central, além de infecções disseminadas. Entretanto, não há relatos desse fungo como agente de micoses superficiais.

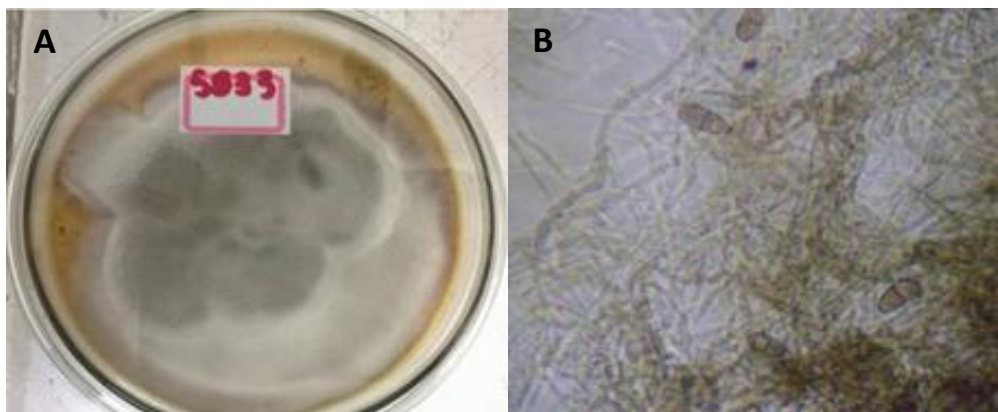


Figura 8: Macro e microscopia da colônia de *Curvularia pallescens*. A: Colônia com aspecto de “lã”, extensa e coloração cinza. B: Hifas enegrecidas, ramificadas e septadas, conídios marrom claro com 2 ou 3 septos.

***Alternaria alternata* (Fr.) Keissl, 1912.**

Apresenta posição taxonômica pertence ao Filo Ascomycota, Subfilo Pezizomycotina, Classe Dothideomycetes, Subclasse Pleosporomycetidae, Ordem Pleosporales, Família Pleosporaceae. Crescem rapidamente (2-4 dias) em meio de cultivo BDA. Na macroscopia da cultura, as colônias são expandidas, coloração que pode variar do cinza ao verde oliva e aspecto pulverulento. Na microscopia evidenciam-se hifas escuras e septadas, conidióforos geralmente sem ramificação. Conídios grandes (23-56 x 8-17 μ) e em cadeias, em forma de clava ou elipsoidal, septação muriforme ou transversais (Figura 9).

São fungos cosmopolita, contaminantes de ambiente e principalmente decompositor de vegetais, estes, vem sendo isolados em casos de feohifomicose, principalmente infecções oculares (ceratites) (ZAHRA et al., 2002).

Segundo Brandt e Warnock (2003), essa espécie é mais comumente encontrada em infecções em indivíduos imunocomprometidos, causando principalmente infecções nos seios paranasais. Raro é o aparecimento desse fungo em micose superficial. Todavia, Gianni et al. (1997), relataram um caso de feohifomicose ungueal por *A. alternata* em paciente agricultor, 75 anos e imunocompetente, o qual apresentava unhas distróficas e enegrecidas. A

identificação do agente etiológico ocorreu pela microscopia direta do fragmento de unha e isolamento do fungo em meio SDA.

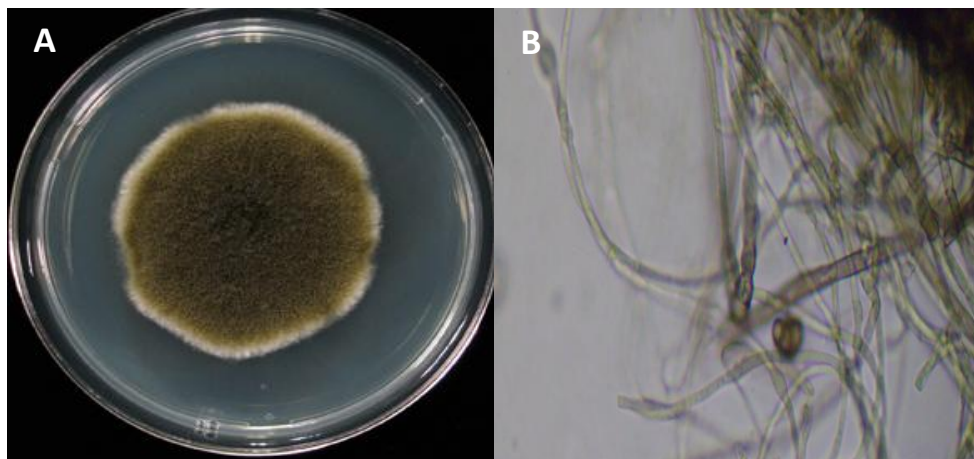


Figura 9: Aspectos macro e microscópicos da cultura de *Alternaria alternata*. A: Colônia com aspecto pulverulento e coloração verde oliva. B: Hifas demáceas e septadas, conídios em forma de clava e coloração marrom clara.

***Alternaria tenuissima* (Kunze) Wiltshire, 1933.**

Fungo cuja taxonômica pertence ao Filo Ascomycota, Subfilo Pezizomycotina, Classe Dothideomycetes, Subclasse Pleosporomycetidae, Ordem Pleosporales, Família Pleosporaceae. Crescem bem em meio de cultura BDA. Na macroscopia, apresentam rápido crescimento, em torno de 2-4 dias, aspecto aveludado e coloração negra. Na microscopia, conidióforos podem ser visualizados isolados ou em grupos, simples ou ramificados, reto ou flexível, de parede lisa e coloração marrom clara. Conídios não ramificados, podendo ser retos ou levemente curvados, marrom claro, parede lisa ou levemente verrucoso, geralmente com septos transversais ou longitudinais medindo 22-95 x 9-19 μ (Figura 10).

Espécie cosmopolita, podendo ser isolado de qualquer ambiente. Frequentemente são relatados como patógenos de plantas, e esporadicamente, ocasionando infecção fúngica no ser humano, a não ser em indivíduos que apresentam alguma doença de base. Ceratites e infecções nos seios paranasais são os episódios mais comuns ocasionados por espécie de *Alternaria* em pacientes imunocomprometidos.

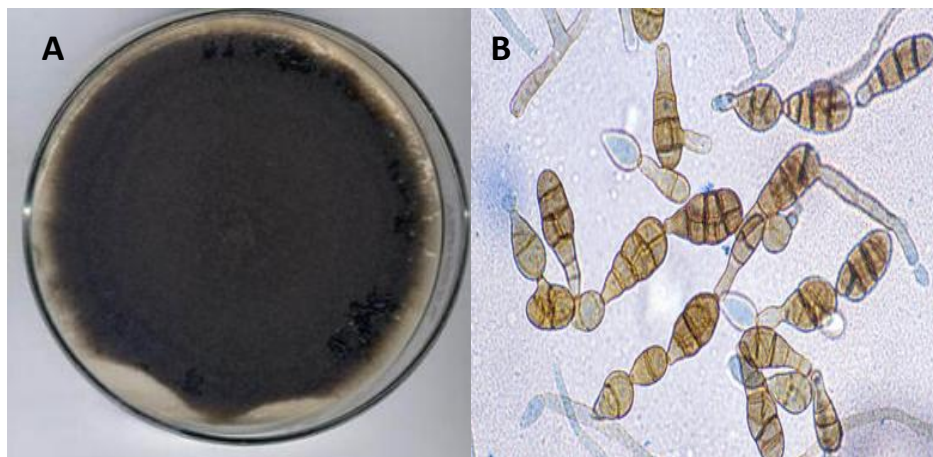


Figura 10: Aspectos macro e microscópicos da cultura de *Alternaria tenuissima*. A: Colônia negra com aspecto aveludado. B: Hifas demáceas e conídios com septação transversal e longitudinal.

***Phialophora pedrosoi* (Brumpt) Redaelli & Cif, 1941.**

Apresenta posição taxonômica pertence ao Filo Ascomycota, Subfilo Pezizomycotina, Classe Eurotiomycetes, Subclasse Chaetothyriomycetidae, Ordem Chaetothyriale, Família Herpotrichiellaceae. Crescem em meio de cultura BDA, desenvolvendo colônias grandes, aveludadas e coloração verde oliva. Na microscopia, as células conidiogênica são verdes claras, apresentando ramificação frouxa, cilíndrica e denticulos proeminentes. Os conídios são oliváceos, formando cadeias pequenas, com parede lisa e em forma de funil, medindo cerca de 3-5 x 1,5-2 μ . Fiálides de coloração marrom clara. Células de leveduras podem ser produzidas quando submetido a Ph baixo (Figura 11).

P. pedrosoi é um dos principais agentes etiológicos da cromomicose, além de já ter sido reportado em episódios de disseminação hematogênica, ceratites micótica e sinusite nos seios paranasais. Não é comum este fungo como agente de micose superficial, entretanto, Shweta et al. (2014) relataram um caso atípico de onicomicose em paciente do sexo masculino, 34 anos, imunocompetente e com lesões enegrecidas na lâmina ungueal. A confirmação da etiologia da micose foi constatada pelo exame direto de fragmentos de unha, bem como, o isolamento do fungo em meio de cultura SDA.

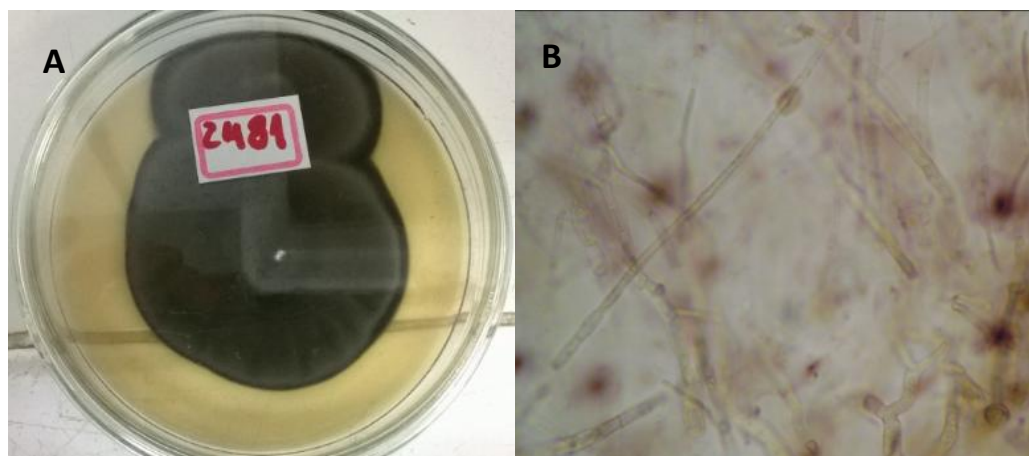


Figura 11: Macroscopia e microscopia da cultura de *Phialophora pedrosoi*. A: Colônia com aspecto aveludado e coloração verde oliva. B: Hifas demáceas, septadas e ramificadas.

***Cladophialophora devriessi* (De Hoog), 2005.**

Posição taxonômica pertence ao Filo Ascomycota, Subfilo Pezizomycotina, Classe Eurotiomycetes, Subclasse Chaetothyriomycetidae, Ordem Chaetothyriale, Família Herpotrichiellaceae. Crescem lentamente em meio de cultura BDA. Na macroscopia desenvolvem colônias planas, algodonosa e coloração preta-olivácea. Na microscopia, podem ser visualizadas hifas enegrecidas, septadas e ramificadas. Conidióforos bem diferenciados e ramificados, medindo cerca de 10 μ e podendo conter até 6 conídios. Conídios em forma de limão e parede lisa, levemente dentilhado e coloração marrom claro (Figura 12).

Fungo filamentoso e demáceo, amplamente distribuído na natureza. Na grande maioria, podem ser agentes de feohifomicose subcutâneas, ocorrendo em boa parte dos casos em indivíduos imunocompetente (Brandt e Warnock, 2003). Segundo Kondo et al (2005), algumas espécies já foram isoladas como agente etiológico causador da cromomicose.

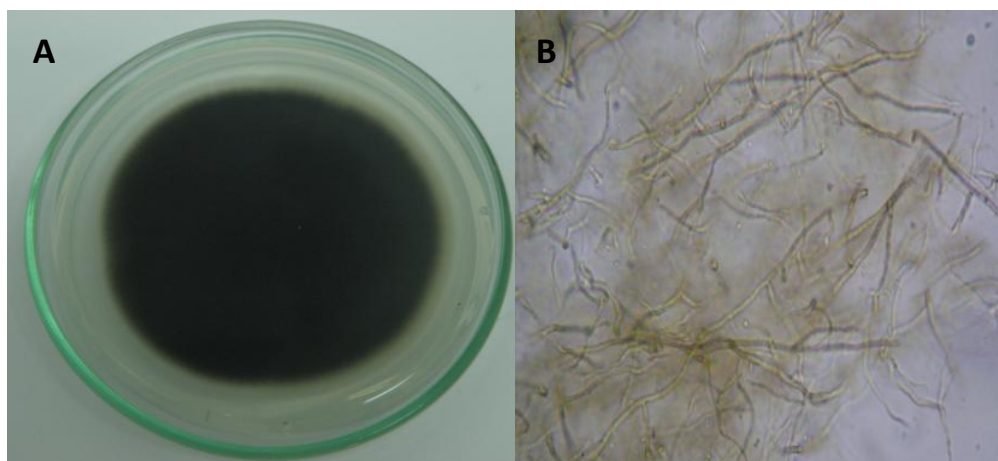


Figura 12: Aspectos macro e microscópicos da cultura de *Cladophialophora devriessi*. A: Colônia negra e algodonha. B: Hifas demáceas, septadas e ramificadas.

***Piedraia hortae* (Horta e Fonseca & Leão), 1928.**

Taxonomicamente pertencente ao Filo Ascomycota, Subfilo Pezizomycotina, Classe Dothideomycetes, Subclasse Dothideomycetidae, Ordem Capnodiales, Família *Piedraiaceae*. É agente etiológico da pedra preta. Apresenta crescimento lento, em média de 7-10 dias, as colônias possuem aspecto aveludado e coloração que pode variar entre o marrom ao preto esverdeado. Na microscopia, podem ser visualizadas hifas demáceas e às vezes clamidósporos podem ser encontrados. Entretanto, na microscopia dos nódulos maduros, podem ser encontrados ascus, que aparecem como favos de mel, contendo entre 2 a 8 ascosporos em seu interior (Figura 13).

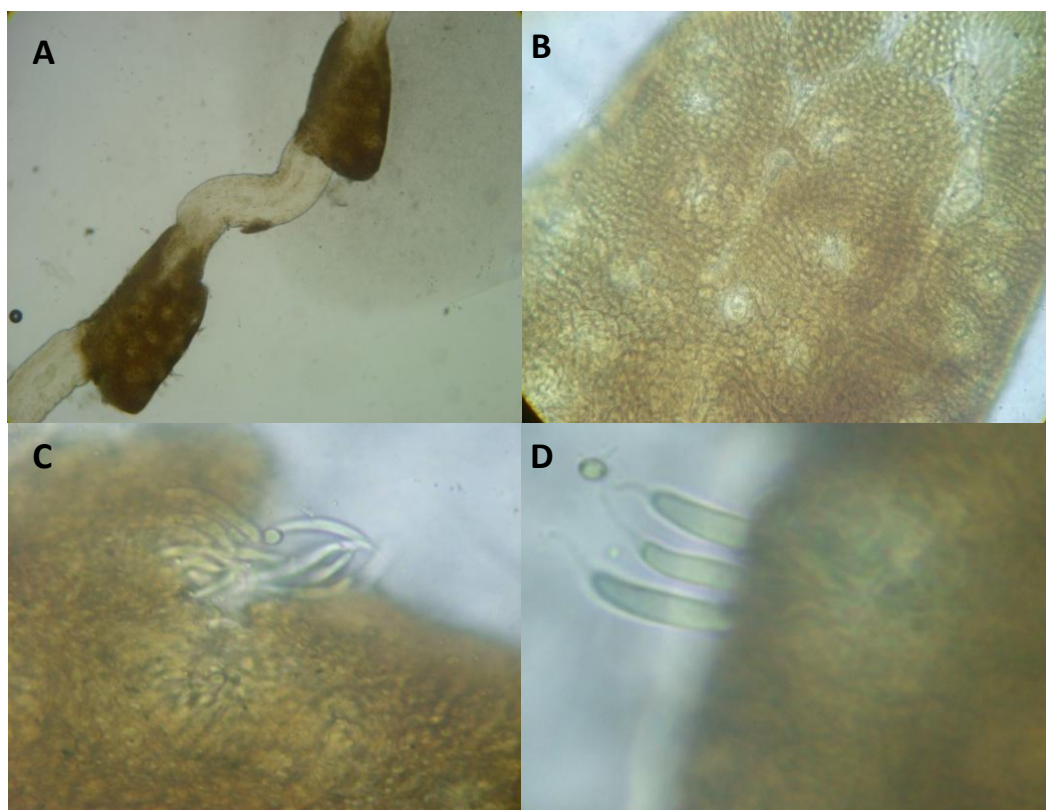


Figura 13: Característica morfológica do *Piedraia hortae*. A: Nódulo fixado na porção extrafolicular do cabelo. B: Numerosos ascos, localizados no interior do nódulo. C: Esmagamento do nódulo, evidenciando os ascosporos. D: Ascosporos em formato fusiforme.

6.3. Resultados obtidos pela Microscopia Eletrônica de Varredura e EDX

6.3.1. Característica morfológica do cabelo (Controle)

Na microscopia eletrônica de varredura do fio de cabelo, não observamos nenhum comprometimento que pudesse interferir nas análises subsequentes, ou seja, o cabelo estava íntegro e não apresentava nenhum dano na parte externa do mesmo.

A fotomicrografia do cabelo mostrou que as camadas cuticulares estavam bem delimitadas e preservadas, observando a endocutícula, epicutícula e exocutícula, com as escamas em padrão uniforme, se assemelhando a um “tapete”, devido ao formato retilíneo do fio capilar (Figura 14). Esses dados corroboram com o referido na literatura, de acordo com Smith e Swift, (2002) e Buffoli et al. (2013), ao explicar a morfologia do cabelo em condições normais. Assim o processo de esterilização não alterou nenhuma estrutura da

fibra capilar, mantendo-a com as mesmas características morfológicas antes da esterilização.

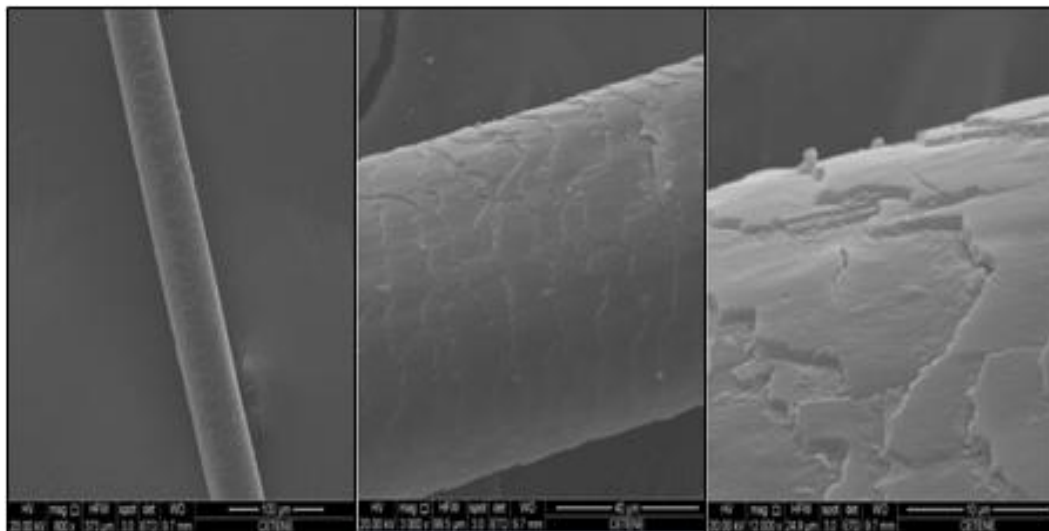


Figura 14: Microscopia eletrônica de varredura do fio de cabelo, evidenciando as camadas cuticulares e seu aspecto em forma de “tapete”. (Aumento 750X; 1500X; 3000X).

O resultado da espectroscopia de massa por difração de raios-X (EDX) mostrou que não houve alteração em relação aos componentes químicos presente no cabelo antes e depois do processo de esterilização. Os elementos encontrados em maiores quantidades foram o enxofre (S) e carbono (C), seguido do oxigênio (O) e alumínio (Al). O ouro (Au) e o ósmio (Os) não apresentaram pico de significância na análise, devido ao fato de sua presença estar relacionada ao processo de metalização da amostra, se tratando apenas de um “contaminante externo”(Figura 15).

A presença ou ausência de determinado elemento químico na amostra pode ser variável, a depender de numerosos fatores ao qual o cabelo foi submetido. Pozebon et al. (1999), denomina o fio capilar de “dosímetro biológico”, pois, indica onde o indivíduo foi exposto a produto químico ou droga, se há algum tipo de carência nutricional ou até mesmo contaminação de ambiente. Nosso trabalho apresentou resultados semelhantes aos obtidos por Figueras e Guarro (1997), sendo o enxofre, o principal elemento químico presente no cabelo. Provavelmente, esse elevado teor de enxofre se deve aos compostos sulfurados presente na estrutura capilar, principalmente na região do córtex.

Whiting e Dallas. (1987) realizaram um estudo analisando as principais alterações estruturais do cabelo, e constataram que estas modificações podem ser de natureza congênita

ou adquirida, e que na grande maioria das vezes pode indicar alguma doença. Curiosamente, esses dados se assemelham com os achados de Pozebon et al. (1999), ao afirmarem que desordens metabólicas, deficiência de ferro, exposição a substâncias tóxicas e deficiência de colágeno, refletem em possíveis anormalidades de cunho capilar.

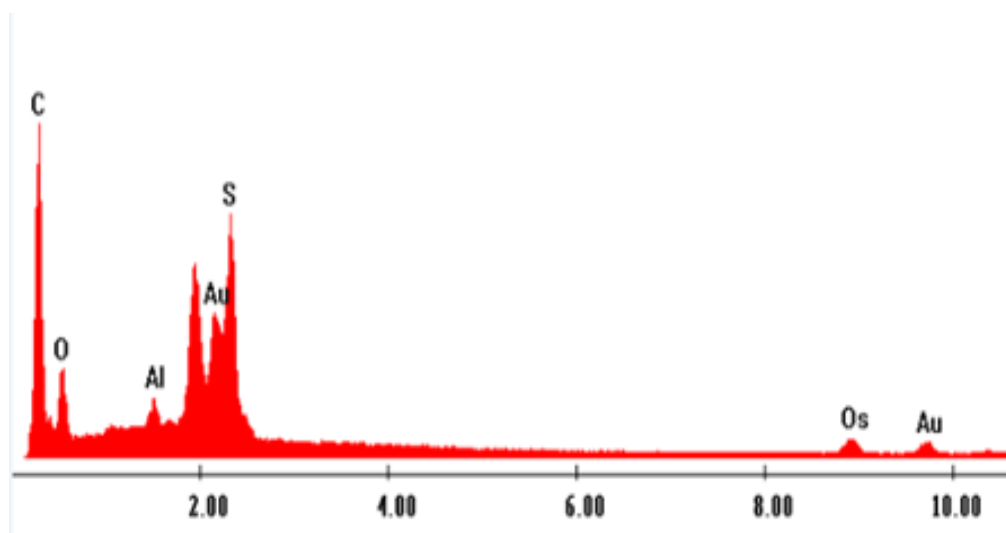


Figura 15: EDX dos elementos químicos C, S, O e Al, encontrados na análise do fio capilar.

6.3.2. Característica morfológica dos fungos

As fotomicrografias das espécies fúngicas testadas, evidenciaram numerosas células de leveduras ovalares, conídios e filamentos micelianos. Porém, não houve características que pudessem diferenciar algumas espécies na microscopia eletrônica de varredura, visto que a maioria se apresentou como um emaranhado de hifas. Na análise da espectroscopia de massa por raios-X, os elementos químicos encontrados foram ouro (Au), devido ao processo de contaminação externa pela metalização da amostra, seguido carbono (C), enxofre (S), sódio (Na) e cloro (Cl) (Figura 16). Todavia, a presença desses constituintes nas amostras pode estar relacionada com as características nutricionais dos fungos, afim de, manter sua viabilidade. Diferentemente foram os resultados alcançados por Figueras e Guarro (1997), onde observaram na análise do espécime fúngico, elementos como alumínio, silício, fosforo,

cloro, potássio, ferro, enxofre e cálcio em elevadas quantidades, possivelmente minerais necessários para a manutenção do metabolismo fúngico.

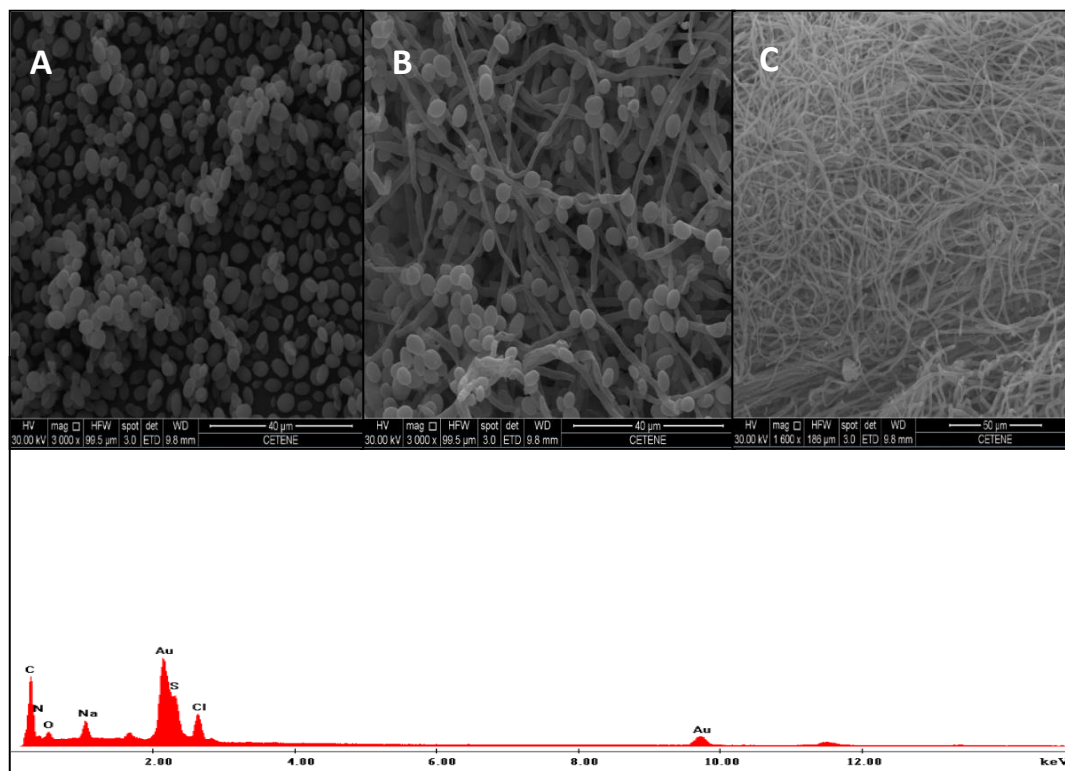


Figura 16: Microscopia eletrônica de varredura das estruturas fúngicas. A: Numerosas células de leveduras com morfologia variada; B: Células de leveduras e hifas; C: Emaranhado de numerosos filamentos micelianos.

6.4. Avaliação da capacidade de formação de nódulos *in vitro*

Desse modo, foi pensado realizar um modelo de infecção *in vitro* para pedra preta que mimetizasse como ocorre o processo de formação dos nódulos, *in vivo*; utilizando fungos que nunca foram relatados na literatura como possíveis agentes etiológicos dessa micose, e assim, estudar as principais características da doença. Sabe-se, que é uma micose pouco estudada e escassa são as referências bibliográficas acerca dessa infecção fúngica. Para isto, foram utilizadas suspensões de células fúngicas, fios de cabelos devidamente esterilizados em placas de Petri, temperaturas ideais para realização (28° C e 37°C) e manutenção do experimento.

Inicialmente, as placas contendo o material não foram hidratadas ao longo ao processo de infecção, de modo que dez dias após a realização do mesmo, não havia a presença de umidade dentro das placas. Diante disto, após o período de quarenta dias, mediante as devidas

observações periódicas, obtivemos como resultados que todos os isolados testados, apresentaram comportamentos diferentes frente ao cabelo. Alguns apenas demonstraram uma leve colonização, enquanto que outros, de fato, apresentaram um forte potencial de parasitismo, formando um nódulo semelhante ao da piedra preta (Tabela 2).

A piedra preta é uma feohifomicose superficial causada pelo *P. hortae*, o qual é capaz de formar nódulos enrijecidos ao longo do fio capilar. Pode ocorrer tanto no sexo masculino quanto no feminino, em qualquer faixa etária. É uma micose rara e altamente contagiosa, porém fora das áreas endêmicas, sua propagação não é tão comum (DE HOOG, 1998; FIGUERAS e GUARRO, 2000; SAXENA et al., 2012).

Tabela 2: Processo de colonização, infecção e formação dos nódulos.

Espécie	Isolado	Colonização	Infecção	Nódulo
<i>Piedraia hortae</i>	2245	Sim	Sim	Sim
<i>Cladosporium carrioni</i>	5109	Sim	Não	Não
<i>Curvularia pallescens</i>	5833	Sim	Não	Não
<i>Curvularia lunata</i>	6059	Sim	Não	Não
<i>Alternaria alternata</i>	5642	Sim	Não	Não
<i>Alternaria tenuissima</i>	5696	Sim	Não	Não
<i>Cladophialophora devriesii</i>	6297	Sim	Não	Não
<i>Exophiala dermatitidis</i>	970	Sim	Sim	Sim
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	6922	Sim	Não	Não
<i>Cladosporium tenuissimum</i>	3334	Sim	Sim	Sim
<i>Phialophora pedrosoi</i>	2481	Sim	Não	Não

A umidade não exerceu nenhuma influência na formação dos nódulos. Foi possível constatar que, este, não é um fator significativo para o desenvolvimento da piedra preta, ou

seja, o fungo necessita de outros fatores para causar a doença. Esses dados vão de encontro aos achados da literatura, já que trabalhos de Fischman (1973), Bonifaz et al. (2010), Desai et al. (2013) e Cardona et al. (2013), mostraram que ambientes úmidos facilitam a propagação e disseminação do fungo, aliado aos aspectos de higiene e o uso de cosméticos a base de óleos.

A probabilidade de se adquirir piedra negra através de banhos de rio em áreas endêmicas tem sido questionada por alguns autores (Fischman, 1973; Pereira Júnior et al., (1982). Provavelmente, há essa possibilidade de infecção, visto que o *P. hortae* é um fungo cosmopolita, podendo ser isolado de qualquer ambiente, inclusive na água, sendo esta um possível veículo de contaminação.

Observou-se que em relação às temperaturas testadas, as placas com os cabelos infectados que foram mantidos em temperatura ambiente (28°C +/- 2°C) apresentaram um maior acometimento do fio capilar do que as placas expostas a 37°C, onde, estas, demonstraram apenas uma colonização parcial na porção extrafolicular do cabelo.

Possivelmente, esse maior parasitismo pode estar relacionado com as características de algumas espécies de fungos, dentre eles o *P. hortae*, o qual, segundo a literatura, apresenta uma maior viabilidade quando colocado em temperatura ambiente (28°C +/- 2°C). Esses dados se assemelham aos estudos de Rodriguez, (1960) e Fischman, (1973), onde citam que esse fungo é facilmente encontrado em climas que apresentam temperaturas médias entre 25°C a 28°C, o que facilitaria o seu desenvolvimento e propagação.

Em relação às características dos nódulos formados, estes foram de tamanho pequeno e apresentavam coloração marrom e geralmente aderido ao fio de cabelo, porém a depender do atrito sofrido, se desprendiam facilmente. Continham numerosas estruturas fúngicas bastante agrupadas em forma de pirâmide ou grupamento de hifas e material proveniente do metabolismo fúngico, formando o que alguns autores denominam de pseudoparênquima ou material cementante (Castro et al., 1987).

Esses dados se aproximam com os achados em nosso trabalho, onde o isolado 970 (*E. dermatitidis*), apresentou a formação de uma estrutura homogênea e irregular, aparentemente parecendo um pseudoparênquima, o qual possivelmente foi originado do metabolismo celular do fungo (Figura 17). Para Figueras e Guarro. (1997), o material cementante extracelular produzido pelo *P. hortae*, seria provavelmente uma mistura de moléculas de glicosaminoglicanas, como as glicoproteínas e proteoglicanos, as quais se assemelham as outras substâncias identificadas em variedades de animais e tecidas vegetais.

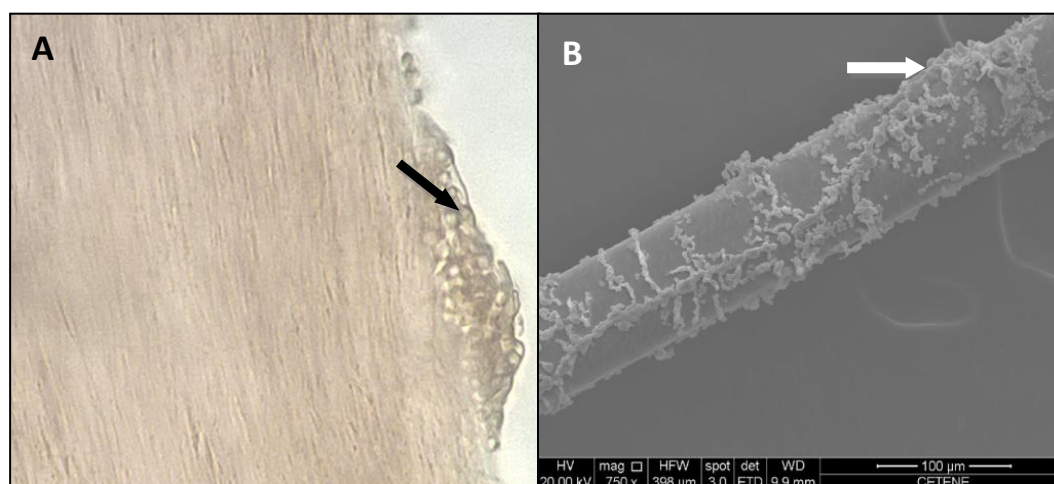


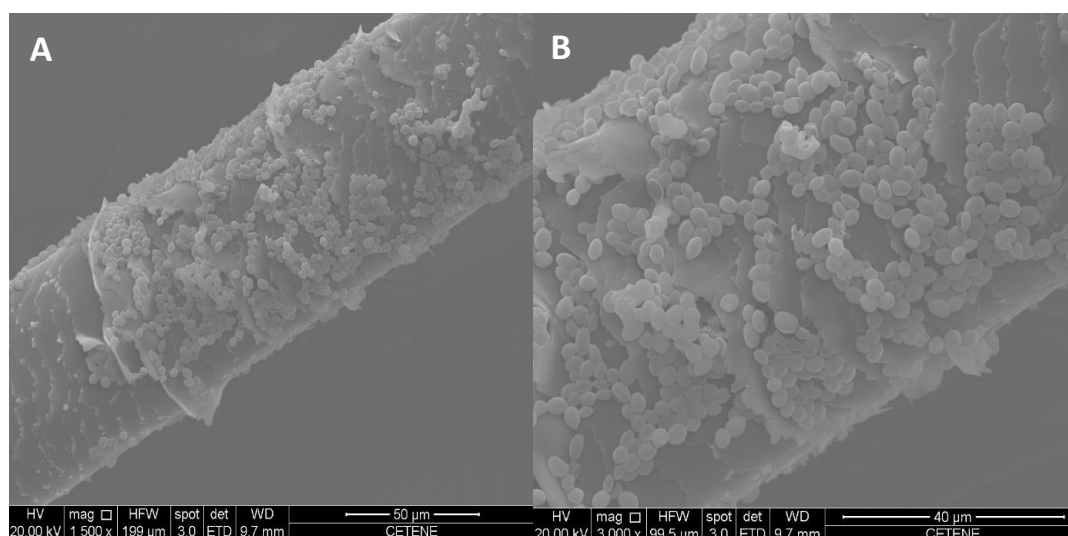
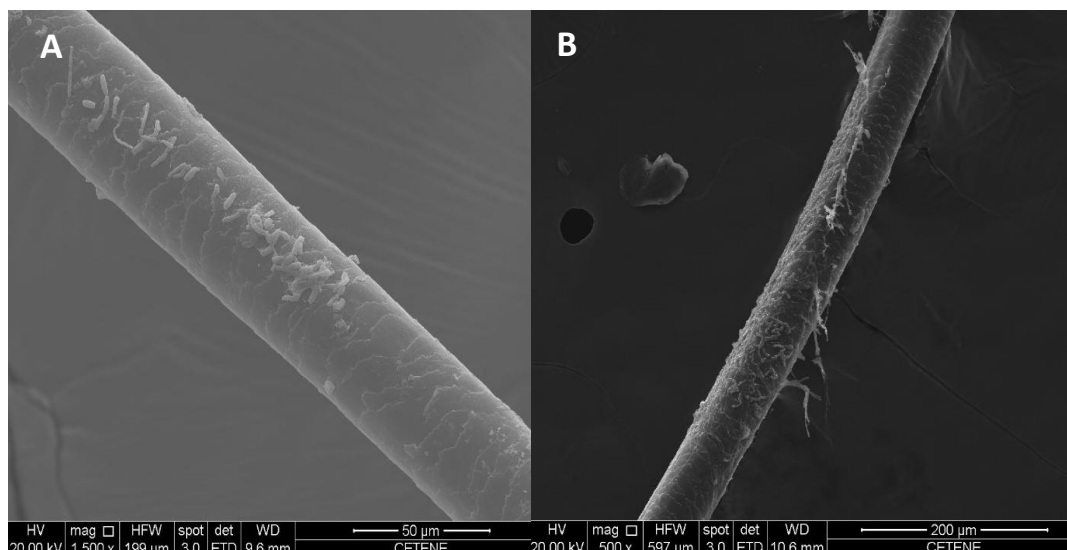
Figura 17: Formação inicial do nódulo de *Exophiala dermatitidis*. A: Observar o aglomerado de leveduras localizadas na região lateral do cabelo (microscopia ótica). B) Emaranhado de células fúngicas formando uma estrutura semelhante ao pseudoparênquima. (Aumento 750X).

Dos dez isolados testados no processo de infecção, apenas dois (970 e 3334) foram capazes de mimetizar a formação de uma estrutura semelhante aos nódulos da pedra preta. Porém, os nódulos não continham as principais características que os classificam como os da doença, que são a formação de ascostroma, formados por ascos e ascosporos em seu interior; caracterizando o tipo de reprodução do fungo. No caso dos isolados, estes não apresentavam a formação dessas estruturas, mostrando apenas que eram formados basicamente de aglomerado de leveduras e hifas. Os outros oito isolados (5109, 5833, 6059, 5642, 5696, 6297, 6922, 2481) apenas demonstraram uma colonização, sem trazer maiores danos ao cabelo (Figura 18).

Na literatura, não há relatos que comprovem que fungos demáceos sejam capazes de produzir nódulos de pedra preta, assim como o parasitismo do *P. hortae*. Possivelmente, esses isolados apresentam um potencial de colonizar ou infectar o fio capilar, podendo acometer apenas a superfície ou destruir as camadas cuticulares.

O forte parasitismo no cabelo foi demonstrado por *E. dermatitidis* (970), através do potencial infeccioso bastante elevado, chegando a comprometer e degradar as estruturas cuticulares do fio de cabelo e fragiliza-lo, como mostrado na figura 19. Esse fungo provavelmente apresenta a capacidade de produzir algum tipo de queratinase, devido à agressividade observada na invasão das cutículas e quiçá, na região do córtex. Curiosamente, esses dados são similares aos de Figueras e Guarro, (2000), Cardona et al. (2013) e Chávez-

López et al. (2014) onde observaram o aspecto queratinolítico do *P. hortae*, visto sua capacidade de se aderir, penetrar e degradar completamente a queratina presente nessa região.



A capacidade de *E. dermatitidis* de formar nódulos semelhantes ao da pedra preta, foi verificada e determinada, contudo, em parasitismo, não foram visualizadas as estruturas de reprodução sexuada, como ascostroma, ascos e ascosporos. Todavia, o isolado (3334) obteve

um processo de infecção mais suave de início, não chegando a comprometê-lo e sim, apenas iniciando uma colonização parcial ao longo do cabelo. Nesse caso, observou-se que no exame direto e na microscopia eletrônica de varredura, os cabelos estavam colonizados principalmente por formas micelianas. Porém ao longo dos dias, verificou a formação de uma pequena massa fúngica, localizada na porção extrafolicular do cabelo, se assemelhando ao nódulo. Não foi observada a degradação da queratina (Figura 20).

O processo de infecção ocorreu de forma lenta e gradativa, visto que para a tentativa de formação dos nódulos, o fungo, em situação de privação nutricional total, tenha que obter sua fonte de sobrevivência apenas do fio de cabelo. O processo de formação do nódulo foi de aproximadamente 40 dias, até que as estruturas fúngicas se aderissem completamente ao fio de cabelo e ali, causasse o parasitismo. Esses dados se contrapõem com os obtidos por Cardona et al. (2013), onde para eles o processo de infecção e formação dos nódulos ocorre de maneira rápida e continua, seguindo o crescimento do cabelo.

Para alguns autores como Figueras e Guarro, (2000) e Colombo et al. (2011) algumas características como imunodeficiências (AIDS) e transmissão via sexual, não são fatores relacionados ao surgimento da piedra preta, visto que apenas o *P. hortae* é responsável por ocasionar a doença. Porém, não sabemos ao certo se estas condições podem estar implicadas no agravamento desse quadro. Sabe-se apenas que, o uso compartilhado de objetos pessoais, podem sim servir como uma fonte de transmissão e disseminação desse fungo (DESAI et al., 2013).

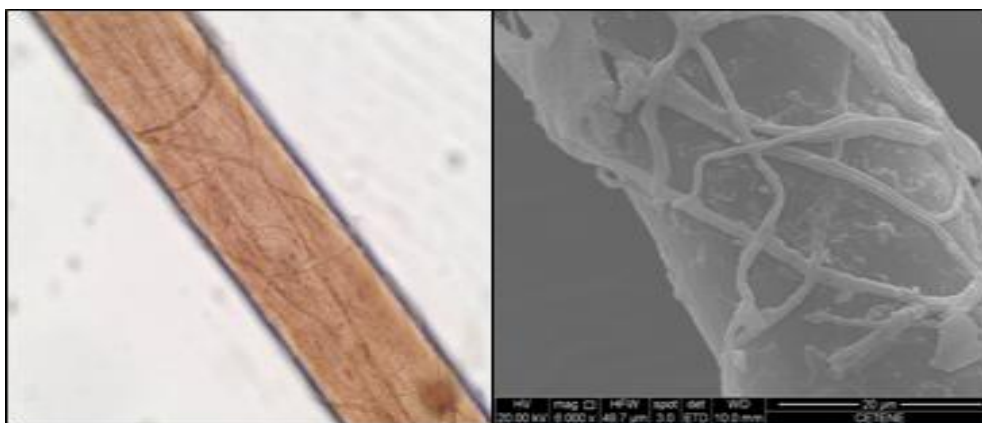


Figura 20: Processo de infecção gradativo do fio capilar pelo *Cladosporium tenuissimum* (3334).

6.5. Patogenia da Piedra preta

Com o objetivo de descrever o processo de formação dos nódulos, a infecção foi caracterizada em quatro estágios: (I) Adesão, (II) Colonização, (III) Parasitismo e (IV) Nódulo. Inicialmente, para que a infecção se desencadeie se faz necessário que os fios dos cabelos entrem em contato com as estruturas fúngicas presente na placa. Quando isto acontece, o fungo pode crescer absorvendo apenas os nutrientes presentes no cabelo, e desse modo, mantendo sua viabilidade. Com o avanço do processo de adesão, os fungos vão se proliferando e colonizando todo o eixo do cabelo. Os propágulos infectantes aderidos a este substrato podem ser representados tanto por leveduras quanto por filamentos micelianos a depender da espécie observada.

No terceiro estágio, à medida que a infecção avançou o fungo preencheu toda a porção extrafolicular do cabelo, caracterizando um elevado potencial de parasitismo. Nesta etapa da infecção, ainda podem ser diferenciadas os limites de uma célula a outra. No último estágio, houve a formação de um nódulo maduro e compacto. Neste ponto, os limites de uma célula a outra não puderam ser distinguidos, como se houvesse sido excretado um material extracelular que envolveu toda a periferia do nódulo, o qual podemos denominar de pseudoparênquima (Figura 21).

Desse modo, o agrupamento e manutenção das estruturas fúngicas unidas, possivelmente é ocasionado pela secreção de um material extracelular, produzido pelo fungo (Magalhães et al., 2008). Essa capacidade de liberar substâncias extracelulares, provenientes do metabolismo, não é exclusiva apenas ao agente etiológico da piedra preta, podendo ser visualizada também nos casos de tricopatias ocasionadas pela piedra branca (FIGUERAS e GUARRO, 2000). O fungo *P. hortae* produz um material semelhante, sendo esse material secretado, o possível responsável pela manutenção da integridade e conformação do nódulo e por garantir a permanência da cronicidade da infecção, mesmo em condições adversas ao qual foi exposto (FIGUERAS e GUARRO, 1997; 2000).

Em adição, para confirmar que os cabelos foram infectados pelas espécies fúngicas testadas, foi realizado o retro-cultivo dos fios em meio de cultivo BDA. Ao redor dos cabelos inoculados, desenvolveram-se colônias fúngicas demáceas, mostrando que o fungo ainda estava causando parasitismo. Deste modo, foi realizada a taxonomia para confirmação da identidade fúngica, sendo correspondente com a autenticação realizada anteriormente.

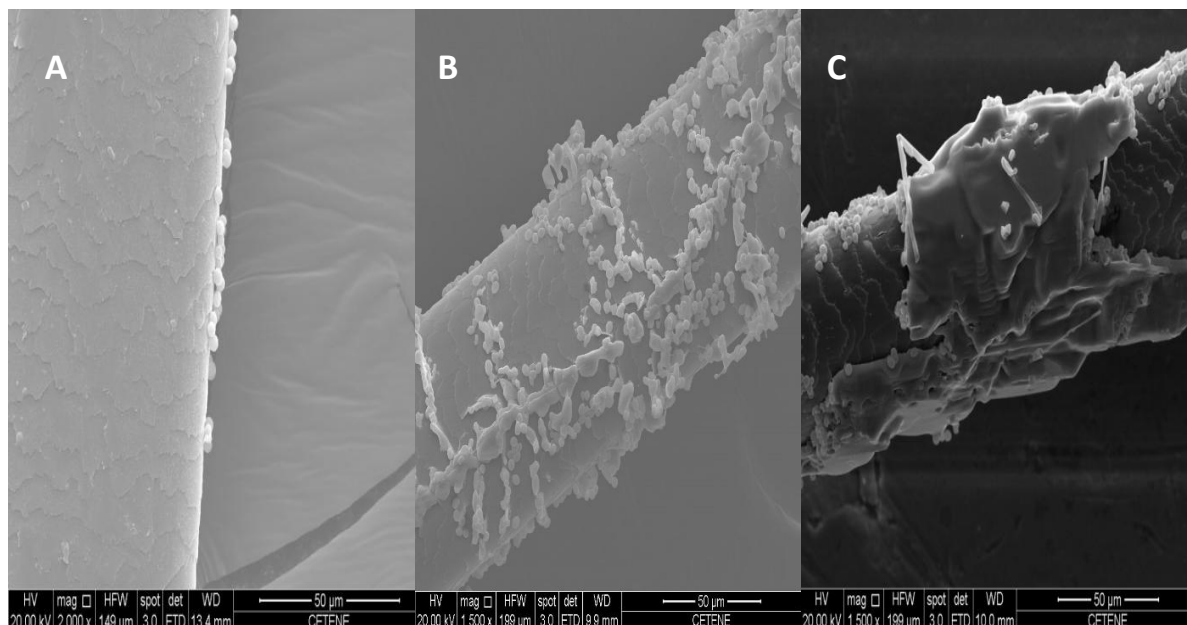


Figura 21: A, B e C: Microscopia eletrônica de varredura mostrando as etapas de infecção do fio capilar. (Aumento de 750X; 1500X; 3000X).

Assim, técnicas que visam analisar a presença dos elementos químicos em amostras biológicas têm sido empregadas no estudo de vários microrganismos, com o intuito de determinar as etapas de formação das partículas minerais e sua importância nas fisiológicas (FIGUERAS e GUARRO, 1997; CORBARI et al., 2008).

De acordo com Figueras e Guarro, (1997), os elementos químicos como fósforo, enxofre e cálcio estão presentes na composição dos nódulos, devido à capacidade da melanina de sequestrar esses íons e por sua vez, formarem mucopolissacarídeos (proteoglicanos). Assim, possivelmente esses elementos químicos são os responsáveis pela natureza rígida dos nódulos de pedra preta, juntamente com o material extracelular, os quais atuam como um “cimento” que teria a função de manter o pseudoparênquima compacto, além de proteger das agressões ambientais. O nódulo de pedra preta atua como uma estrutura de resistência que se desenvolve lentamente, de modo que pequenas quantidades de nutrientes garantem a sobrevivência do agente etiológico.

Contrariamente ao observado na pedra branca, onde provavelmente a consistência mucilaginosa dos nódulos da pedra branca possa estar relacionada com a baixa concentração

desses elementos no pseudoparênquima dos nódulos. Diante do observado, podemos supor que a matrix extracelular apresenta uma fundamental importância quanto à capacidade de formação dos nódulos, tanto da piedra preta, quanto da piedra branca. Todavia, essa substância é depositada de maneira gradativa na porção extrafolicular do cabelo, de modo que quanto mais desenvolvido for o nódulo, mais perceptível é a presença desse material. A matriz extracelular, por si só, possivelmente seja a responsável por manter a integridade do nódulo. Deste modo, estudos futuros sobre a constituição desse pseudoparênquima, se fazem necessários para se conhecer a natureza e sua importância na patogenicidade dos nódulos do *P. hortae*.

6.6. *Exophiala dermatitidis*: um possível agente de piedra preta?

O envolvimento de outros fungos como possíveis agentes etiológicos da piedra preta ainda é desconhecido. Contudo, relatos na literatura mostrou um possível envolvimento do *Trichosporon ovoides* (Saxena et al., 2012) e do *T. asahii* (Kanitakis et al., 2006), como prováveis causadores dessa micose. Porém, essa informação não condiz com a piedra preta, principalmente devido às características inerentes ao tipo de reprodução dessa espécie.

Dentre os fungos utilizados para a realização dos testes *in vitro*, *Exophiala dermatitidis*, foi o único capaz de simular a formação de nódulo demáceo similar ao da piedra preta bem como seu aspecto queratinolítico. Esse fungo apresentou ótimas condições de crescimento e boa aderência ao fio de cabelo, de modo que as células se proliferaram rapidamente formando novas estruturas, e assim, infectando o cabelo por completo.

Dessa forma, o processo de infecção ocorreu de maneira rápida, de modo que as estruturas semelhantes ao nódulo puderam ser vistas em aproximadamente no 30º dia do início da infecção dos cabelos. Esse fungo de início apresentou apenas uma leve colonização do fio capilar, porém, na última semana, a mesma demonstrou um elevado potencial de infecção, comprometendo toda a estrutura da fibra. No exame direto utilizando KOH, foram visualizadas numerosas células globosas e ovaladas, bem agrupadas e aderidas em todo o eixo do cabelo e que se desprendiam facilmente dependendo do atrito (Figura 22).

Ao evoluir da infecção, ocorreu a degradação da queratina do cabelo, invasão e destruição das camadas de cutícula, favorecendo ainda mais a sua penetração e fixação. Por fim, houve a formação de uma massa sólida, a qual foi gerada pelo metabolismo celular do

fungo, dando origem a uma estrutura que apresentava um aspecto homogêneo, de modo que não foi possível diferenciar os limites entre as células ali presentes (Figura 23).

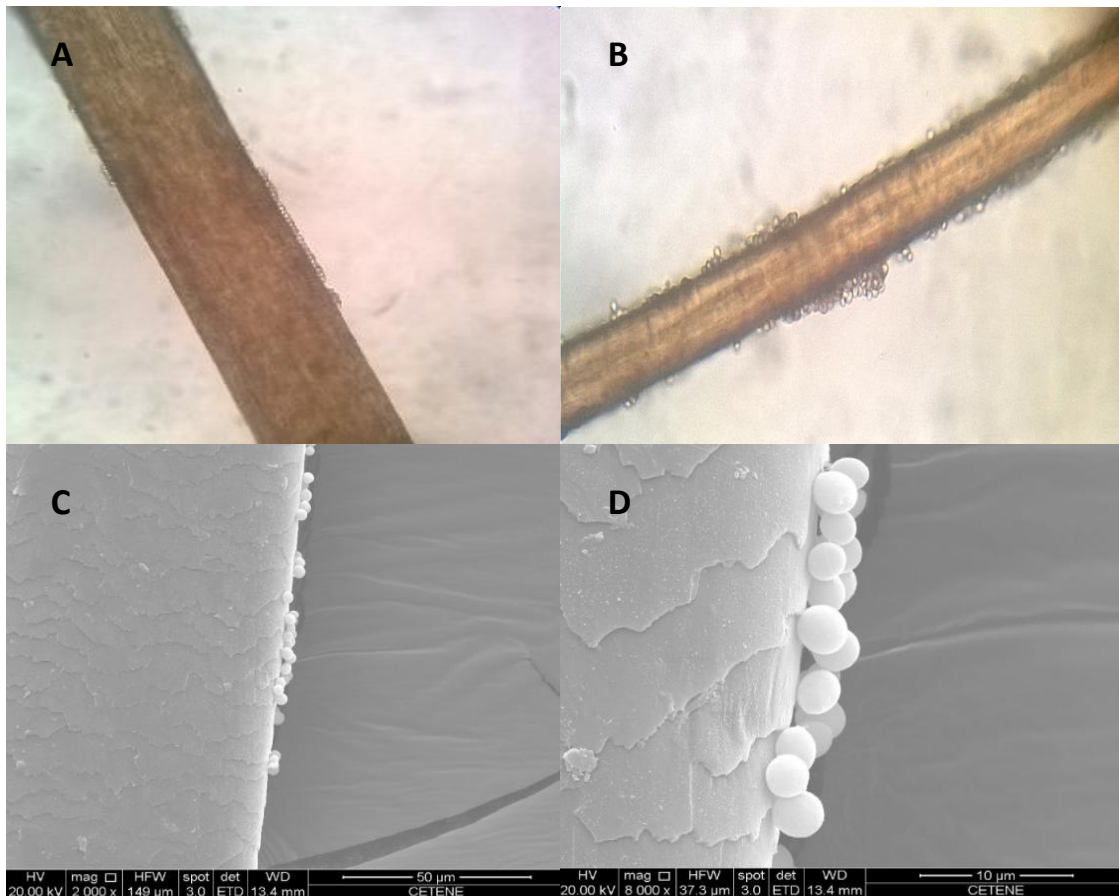


Figura 22: A e B: Microscopia óptica do cabelo mostrando o estágio inicial de infecção do cabelo. C e D: Micrografia evidenciando o estágio inicial bem como a morfologia das estruturas fúngicas. (Aumento 750X; 3000X).

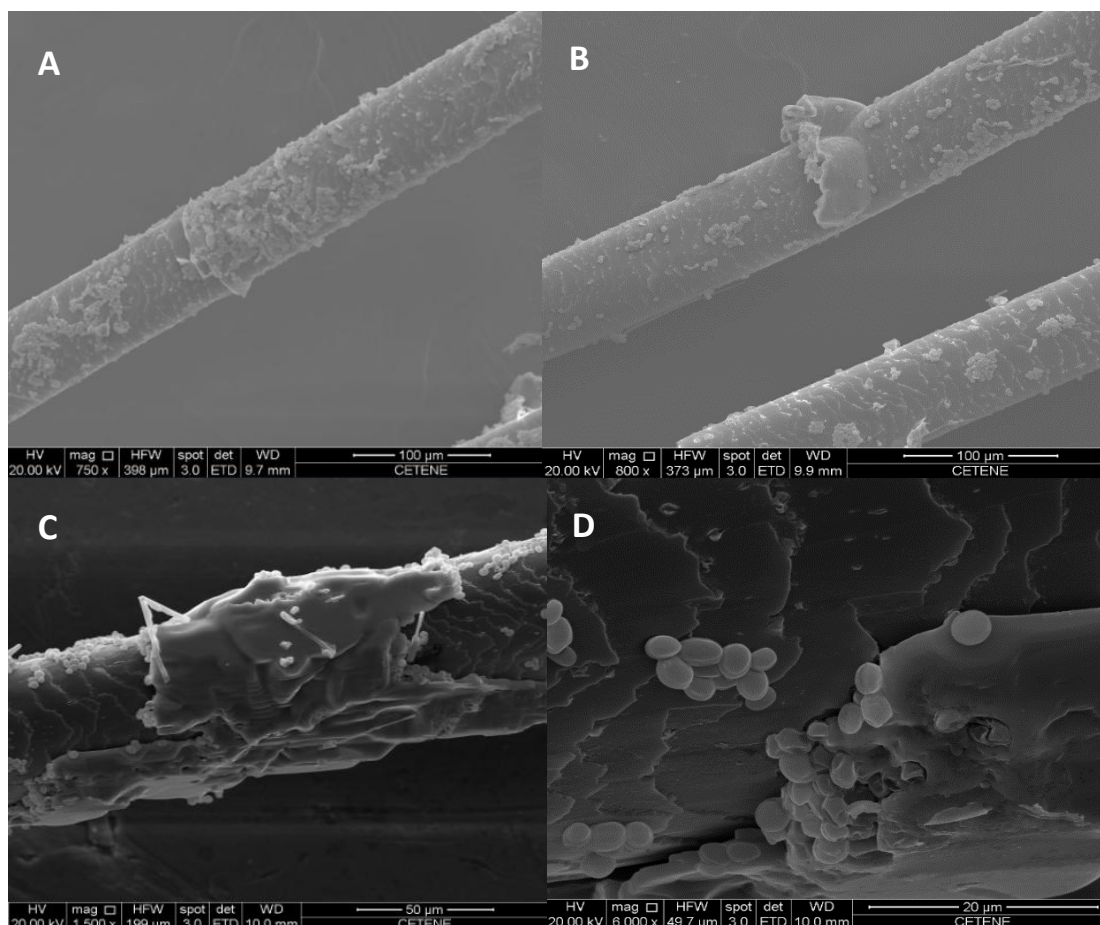


Figura 23: A, B, C E D: Microscopia eletrônica de varredura mostrando os estágios de infecção pela *Exophiala dermatitidis*. (Aumento 750X; 800X; 1500X; 3000X).

Uma característica interessante sobre esse fungo, é que por ser uma levedura cosmopolita, ou seja, pode ser encontrada em qualquer ambiente, não há relatos na literatura da *E. dermatitidis* causando tricomicoses. Entretanto, em um trabalho recente realizado por Falahati et al. (2014), apontam o primeiro caso raro de onicomicose causado por uma levedura negra, *E. dermatitidis*, sendo confirmada sua etiologia pelas características morfológicas e análise molecular. Dessa forma, mostrando a capacidade queratinofílica e mais ainda, queratinolítica desse microrganismo.

Curiosamente, um trabalho realizado por Falahati et al. (2014), mostra através da análise de um gráfico pizza, as principais localizações das infecções fúngicas causadas por espécies de *Exophiala* nos Estados Unidos. Nessa análise, menos de 0,5% das infecções correspondem a micoses superficiais, enquanto que aproximadamente 40% são representadas pelas micoses profundas ou sistêmicas.

7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados alcançados, concluímos que:

- O aparecimento dos nódulos de piedra preta possui um caráter crônico;
- O *Piedraia hortae* é o único agente etiológico da piedra preta, sendo que outros fungos demáceos podem ser agentes de tricomycose experimental;
- É necessária a realização do exame direto e cultura para determinar o agente etiológico desta micose;
- O tempo de estocagem e o método de preservação não foram fatores determinantes que influenciaram na viabilidade dos isolados;
- A umidade e outras condições previamente levantadas como fatores predisponentes para o aparecimento da piedra preta, não possuem relações diretas com o desenvolvimento desta micose;
- O enxofre foi o elemento químico presente em maior quantidade na composição do fio capilar;
- *Exophiala dermatitidis* e *Cladosporium tenuissimum* possuem potencial de colonizar e infectar o fio capilar;
- *Exophiala dermatitidis* apresenta expressiva capacidade de invasão e destruição da fibra capilar, além da produção de queratinase, culminando na degradação parcial das camadas cuticulares, visualizadas pela microscopia eletrônica de varredura;
- O material cementante ou pseudoparênquima, que é secretado por algumas espécies de fungos, inclusive o *P. hortae*, é o principal responsável por manter a integridade e viabilidade do estroma dos nódulos.
- A reativação do *Piedraia hortae*, em meio de cultura, não foi possível. É provável que esse fungo precise de meio diferenciado para se desenvolver.

REFERÊNCIAS

- ABELL, E. Embryology and anatomy of the hair follicle. In: Olsen EA, editor. Disorders of hair growth. New York: McGraw Hill; pp. 1-19. 1994.
- ALMEIDA, A.P.M.; GOMES, N.M.F.; DE ALMEIDA, L.M.; DE ALMEIDA, J.L.M. Cromomicose: relato de caso e revisão da literatura. *Rev Soc Bras Clin Med*;12(1):69-71. 2014.
- ALVAREZ, V.C.; GUELFAND, L.; PIDONE, J.C.; SOLOAGA, R.; ONTIVERO, P.; MARGARI A., *et al.* Rinosinusitis alérgica fúngica causada por *Curvularia* SP. *Ver Ibero am Micol*, 28, pp. 104–106. 2011.
- ALVIANO, C. S., ROZENTAL S., DE SOUZA, W.; ANGLUSTER, J e TRAVASSOS, L. R. Characterization of *Fonsecaea pedrosoi* melanin. *J Gen Microbiol.* v.137, p. 837-844. 1991.
- AMY, S.; CHENG, M.D; SUSAN, J. BAYLISS, M.D. The genetics of hair shaft disorders. *Journal American Academy of Dermatology, Inc.* doi:10.1016/j.jaad.04.002. 2008.
- ARÊA-LEÃO, A.E. Considerações sobre os *Thallosporados*. O gênero *Trichosporon*, “*Trichosporon minor*” n. sp. Produtor da pedra axillar. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 35, (4). 1941.
- BENCZE, K. What contribution can be made to biological monitoring by hair analysis? *Anal. Chem.* v. 337, issue 867- 876. 1990.
- BOEDIJIN, K.B. On Black And White Piedra. 1959.
- BONIFAZ, A.; GÓMES-DAZA, F.; PAREDES, V.; PONCE, RM. Tinea versicolor, tinea nigra, white piedra and black piedra. *Clinics in dermatology*; 28, 140-145, 2010.
- BORDOLOI, P.; NATH, R.; BORGOHAIN, M.; HUDA, M.M.; BARUA, S.; DUTTA, D.; SAIKIA, L. Subcutaneous Mycoses: An Aetiological Study of 15 Cases in a Tertiary Care Hospital at Dibrugarh, Assam, Northeast India. *Mycopathologia*. DOI 10.1007/s11046-015-9861-x. 2015.
- BRANDT, M.E., WARNOCK, D.W. Epidemiology, clinical manifestations and therapy of infections caused by dematiaceous fungi. *J Chemother.* 15 Suppl 2:36-47.2003.
- BRUMPT, E.; LANGERON, M. Considerations sur de L’ Amerique du Sud, à l’occasion d’un casprovenant du Venezuela. Description d’une espece nouvelle Piedra venezuelensis. *Ann. Parasit. Hum. Comp.*, 12:134-161, 1934.
- BRUMPT E. Précis de Parasitologie. Paris, Masson, 1913.
- BUFFOLI, B.; RINALDI, F.; LABANCA, M.; SORBELLINI, E.; TRINK, A.; GUANZIROLI, E.; REZZANI, R.; RODELLA, L. F. The human hair: from anatomy to physiology. *International Journal of Dermatology*, 53; 31-41. 2013.
- CASTRO, R.M., JAEGER, R.G.; TALHARI, S.; ARAÚJO, N.S. Piedra negra: Estudo de seu agente etiológico em microscopia eletrônica de varredura. *Rev. Inst. med. trop. São Paulo.* 29 (4), 251-252. 1987.

CARDONA, C.A.M.; RAMIREZ, A.O.J.; HORTUA, C.V.; FIGUEIROA, C.T. Piedra negra y Piedra blanca: aspectos diferenciales. *Infectio*; 17(2), 106-110; 2013.

CHALKIAS, C.D.; ALONSO, J.D.; LEVINE, M.T. Emerging pathogen in immunocompromised hosts: *Exophiala dermatitidis* mycosis in graft-versus-host disease. *Transpl. Infect. Dis.* 16: 616–620. 2014.

CHATT, A.; KATZ, S.A. Hair analysis, applications in the biomedical and environmental Science, VCH Publishers, New York, 1998.

CHÁVEZ-LÓPEZ, G.; ESTRADA, R.; ESTRADA, G.; BONIFAZ, A. Piedra negra, una curiosidade micológica. *Dermatol Rev Mex.*; 58:482-484. 2014.

CIFERRI, R.; BATISTA, A.; SYLVIO CAMPOS, CH. Taxonomy of *Piedraia hortae* and systematic position of the *Piedraiaceae* family. University of Recife, Brazil. Institute of Mycology, Publication no. 45, 9 p. 1956.

COIMBRA, J.R.; CARLOS, E.A.; SANTOS, R.V. Inexistência de infecção por *Piedraia hortae* entre o grupo indígena suruí, Rondônia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 23(2): 125,1990.

COIMBRA, J.R.; CARLOS, E.A.; SANTOS, R.V. Black piedra among the Zoró Indians from Amazônia (Brazil). *Mycopathologia* 107: 57-60, 1989.

COLOMBO, A.L.; PADOVAN, A.C.B.; CHAVES, G.M. Current knowledge of *Trichosporon* spp. and Trichosporonosis. *American Society for Microbiology.* 24: 682-700. 2011.

CORBARI, L.; CAMBON-BONAVITA, M. A.; LONG, G. J.; GRANDJEAN, F. ZBINDEN; GAILL, F.M; COMPERE, P. Iron oxide deposits associated with the ectosymbiotic bacteria in the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*. *Biogeosciences*, 5, 1295–1310, 2008.

DE HOOG. G.S.; GUÉHO, E. Agents of white piedra, black piedra and tinea nigra. In: Collier L, Balows A, Sussman M (Eds.) *Topley & Wilson's Microbiology and microbial infections*. vol. 4: Medical mycology. Ajello L, Hay RJ (Eds.) London, Publ Arnold 191-197. 1998.

DE HOOG. G.S. On the potentially pathogenic dematiaceous hyphomycetes. *Fungi pathogenic for humans and animals (in three parts)*. Part A. *Biology* pp. 149-216. 1983.

DE HOOG, G. S. *Atlas of clinical fungi*. 2ª ed. p. 203, 2000.

DE OLIVEIRA, J.C. *Micologia médica*. Rio de Janeiro, Apoio Control lab, 1999.

DESAI, D.H.; NADKARNI, N.J. Piedra: an ethnicity-related trichosis? *International Journal of Dermatology*. doi.: 10.1111/j.1365-4632.2012.05722. 2013.

DE ALMEIDA, H.L.; SALEBIAN, A.; RIVITTI, E.A. Ultrastructure of black piedra. *Mycoses*, volume: 34. Issue: 11-12, pages: 447-451, 1991.

DIOGO, H.C.; SARPIERI, A.; PIRES, M.C. Preservação de fungos em água destilada. *Na Anais Dermatol.* 80(6):591-4. 2005.

DUARTE, L.C.; JUCHEM, P.L.; PULZ, G.M.; BRUM, T.M.M.; CHODUR, N.; LICCARDO, A.; FISCHER, A.C.; ACAUAN, R.B. Aplicações de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e sistema de energia dispersiva no estudo de gemas: exemplos brasileiros. *Pesquisa em geociências*, 30(2):3-15. 2003.

ENGLISH, M.P. Destruction of hair by *Chrysosporium keratinophilum*. *Transactions of British Mycological Society*. 52; 247-255. 1969.

FALAHATI, M.; GHASEMI, Z.; ZAINI, F.; FARAHYAR, S.; NAJAFZADEH, M.J.; ASSADI, M.; REZAEI-MATEHKOLAEI, A.; DOLATABADI, S.; KEISARI, M.K.; MEIS, J.F. The first case of onychomycosis due to *Exophiala dermatitidis* in Iran: Molecular identification and Antifungal Susceptibility. *Bull. Env. Pharmacol. Life Sci.*, Vol 3 (5): 125-129. 2014.

FERREIRO, L.; SPANAMBERG, A.; BORBA, M.R.; SANCHES, M.E.; ROEHE, C.; SANTURIO, J.M.; CHERMETTE, R. Phaeohyphomycosis: an emerging animal fungal infection. *Acta Scientia e Veterinariae*. 35(Supl2): s239-s241. 2007.

FIGUERAS, M.J.; GUARRO, J.; ZAROR, L. New findings in Black piedra infection. *J.med.vet.mycol.*35:1-6. 1996.

FIGUERAS, M.J.; GUARRO, J.; ZAROR, L. Ultrastructural aspects of hair digestion in black piedra infection. *Journal of medical and veterinary mycology*. Volume: 35 issue:1 pages. 1-6 published. 1997.

FIGUERAS, M.J.; GUARRO, J. X- Ray microanalysis of black piedra. *Antoine van Leeuwenhoek*. 72: 275-28. 1997.

FIGUERAS, M.J.; GUARRO, J. Ultrastructural aspects of the keratinolytic activity of piedra. *Rev. Ibero. Amer. Micol.* 2000.

FISCHMAN, O. Black piedra among Brazilian Indians. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 15(2): 103-106. 1973.

FISCHMAN, O. Black piedra in Brazil. A contribution to study in Manaus (state of Amazonas). *Institute of Parasitology and Mycology*, 1965.

FISCHER, F.; COOK, N. *Micologia fundamentos e diagnósticos*. Rio de Janeiro. Reviter. 2001.

FONSECA, A. L. *Piedraia hortai* (BRUMPT). 1928.

FLESCH, P. *Physiology and biochemistry of the skin* S. Rothman. Ed. Chicago Press, Chicago. P. 601-661. 1945.

FRASQUET-ARTÉS, J.S.; PEMÁNA, J.; MARINO BLANES, B.; HERNÁNDEZ-PORTO, A.; CANOC, J.; JIMÉNEZ-HERRERODY, E.; LÓPEZ-HONTANGASA, J.L. Revisión Feohifomicosis cerebral: descripción de un caso y revisión de la literatura. *RevIberoamMicol.* 31(3):197–202. 2014.

GIANNI, C.; CERRI, A.; CROSTI, C. Ungual phaeohyphomycosis caused by *Alternaria alternata*. *MYCOSES* 40, 219-221. 1997.

GIRALDI, S.; PAROLIM, L.; BERTOOGNA, M.J.; ABBAGE, K.T.; OLIVEIRA, V.C. Tinea nigra: six cases in Parana state. An. Bras. Dermatol, Rio de Janeiro, 78(5):593-600. 2003.

GODINHO, V. Um caso de Piedra. Revista med. 9: 149-150. 1906.

GUGNANI, H.C.; OKEKE, C.N. Physiological characteristics of environmental isolates of pathogenic dematiaceous fungi. Mycoses, 32 (2)78-83. 2000.

GUNATHILAKE, A. P.; PERERA, B. G.; SIRIMANNA, C. *Curvularia lunata*: A rare cause of black-grain eumycetoma. Journal de Mycologie Médicale; 24, 158—160. 2014.

GUPTA. A.K.; FRCP; CHAUDHRY, M; ELEWSKI, B. Tinea corporis, tinea cruris, tinea nigra and piedra. Dermatol. Clin. 21, 395—400. 2003.

HAMILTON, A. J.; GOMES, B. L. Melanin in fungal pathogens. J. Med. Microbial, v. 51, p 189-192. 2002.

HERNÁNDEZ-MOLINA, J.M.; GARCÍA-MARTOS, P. Aislamiento de teleomorfos de muestras clínicas. Rev Iberoam Micol. 15: 235-242. 1998.

HOFFMANN, C.C.; DANUCALOV, I.P.; PURIM, K.S.M.; QUEIROZ-TELLES, F. Infections caused by dematiaceous fungi and their anatomoclinical correlations. An Bras Dermatol. 86(1):138-41. 2011.

HORTA, P. Sobre uma nova forma de piedra. Mem.inst. Osv. Cruz. 3: 86- 107, PL.col. 5-6. 1911.

ISA-ISA, R.; GARCÍA, C.; ISA, M.; ARENAS, R. Subcutaneous phaeohyphomycosis (mycotic cyst). Clinics in Dermatology. 30, 425—431. 2012.

JONES, L.N.; SIMON, M.; WATTS, N.R.; BOOY, F.P.; STEVEN, A.C., PARRY, D.A.D. Intermediate filament structure: hard á-keratin. Biophysical Chemistry, 68, 83-93. 1997.

KANITAKIS, J.; PERSAT, F.; PIENS, M.A.; PICOT, S.; CLAUD, A. Black piedra: report of a French case associated with *Trichosporon asahii*. International Journal of Dermatology, 45, 1238—1240. 2006.

KHANDPUR, S.; SUMAN, M.; REDDY, B.S. Comparative efficacy of various treatment regimens for androgenic alopecia in men. J. Dermatol. 29(8): 489-98. 2002.

KONDO, M.; HIRUMA, M.; NISHIOKA, Y.; MAYUZUMI, N.; MOCHIDA, K.; IKEDA, S.; OGAWA, H. A case of chromomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* and a review of reported cases of dematiaceous fungal infection in Japan. Mycoses, 48, 221—225. 2005.

KRZYŚCIAK, P.M.; PINDYCKA-PIASZCZYŃSKA, M.; PIASZCZYŃSKI. Chromoblastomycosis. Postępy Dermatol Alergol. 31(5):310-21. 2014.

LACAZ et al. Tratado de Micologia médica. São Paulo, Editora Sarvier. 2002.

- LANGFELDER, K.; STREIBEL, M.; JAHN, B.; HAASE, G.; BRAKHAGE, A.A. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genet. Biol.* v. 38, n. 2, p. 143-58. 2003.
- LI, D.M.; LI, R.Y.; DE HOOG, G. S.; SUDHADHAM, M.; WANG, D.L. Fatal *Exophiala* infections in China, with a report of seven cases. *Mycoses* 54, e136–e142. 2009.
- LIMA, E. C. E SILVA, C. L. C. Cabelo como Matriz Analítica Alternativa para a determinação de drogas de abuso. *NewsLab*.82; 156-169. 2007.
- LOPES-BEZERRA, L. M.; SCHUBACH, A.; COSTA, R.O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* (2006) 78(2): 293-308.
- 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 a possible a ethiological agent of tinea capitis. *Brazilian Journal of Microbiology*. 36: 36-37. 2005.
- MACIEL, M.H.C.; MOTTA, C. M.S. Viabilidade, confirmação taxonômica de isolados de espécies do grupo *Aspergillus niger* preservados sob óleo mineral na Micoteca URM e caracterização genética por pcr-fingerprinting. XV Congresso de Iniciação Científica da UFPE, 2007.
- MACKINNON, J.E.; SHOUTTEN, G.B. Investigaciones sobre las enfermedades de los cabellos denominadas “pedras”. *Arch. Soc. Biol.* (Montevideo). 10: 227-266.1942.
- MAGALHÃES, A. R.; MONDINO, S. S. B.; SILVA, M.; NISHIKAWA, M. M. Morphological and biochemical characterization of the a etiologial agents of white piedra. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. Vol. 103, n. 8: p. 786-790. 2008.
- MAGALHÃES, O. Ensaio de micologia. *Mem. Inst. Oswaldo Ceuz*, 55: 1-15. 1957.
- MAGALHÃES, O.; NEVES, A. Ensaio de micologia. *Mem. Inst. Oswaldo Ceuz*, 19: 254-281. 1926.
- MAGALHÃES, P.S. Uma novidade de pthologia indígena. Um caso autrochotone de “Piedra”. *Rev. Med.*, 9: 105-106. 1906.
- MARIATH, I.R.; LIMA, I.O.; LIMA, E.O.; BATISTA, L.M. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Eugenia aromatica* B. contra fungos dematiáceos. *Rev. Bras. Farm.*, 87(3). 2006.
- MIRANDA, W. Dermatomycoses observadas em Pernambuco. Tese à Fac. Med, Unvi. Recife. 1932.
- MITTAL, A.; AGARWAL, N.; GUPTA, L.K.; KHARE, A.K. Chromoblastomycosis from a Non-endemic Area and Response to Itraconazole. *Indian J Dermatol.* Nov-Dec; 59(6): 606–608. 2014.
- MORALES CARDONA, C. A.; RAMIREZ, A. O. J.; HORTÚA, C. V.; FIGUEROA, C. T. Piedra negra y Piedra blanca: Aspectos diferenciales. *Infectio*.17 (2); 106-110. 2013.
- MOSES, A. “Piedra”. *Rev. Soc. Brasil Ciências*. 1: 67-73. 1917.

MÜLLER, E.; LOEFFLER, W. Manual para naturalistas y médicos. Ediciones Omega, S.A. Barcelona. 1976.

MUNIZ, G.; VALLADARES, P. A ‘‘Piedra’’ na Bahia. Rev. Med. 10:163-165. 1917.

NEUFELD, P. M.; SARQUIS, M. I.M. Preservação em laboratório de fungos filamentosos pelo método do óleo mineral. Rev. bras. anal. clin; 35(3):147-150. 2003.

ONIFADE, A.A.; AL-SANE, N.A.; AL-MUSALLAM, A.A., AL-ZARBAN, S. Potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. Biores Technol, 66, pp. 1–11. 1998.

PATEL, A.K.; PATEL, K. K., DARJI, P., SINGH, R.; SHIVAPRAKASH M, R., CHAKRABARTI, A. *Exophiala dermatitidis* endocarditis on native aortic valve in a post renal transplant patient and review of literature on E. dermatitidis infections. Mycoses, 2013, 56, 365–372. 2013.

PAIXAO, G.C.; DIOGENES, M.J.N.; RAMOS, F.O.; ROCHA, M.F.G.; SALVINO, L.K.B.; SIDRIM, J.J.C. A Patient With Clinical Lesion of Black Piedra and Mycological Diagnosis of White Piedra. Clinical Microbiology Newsletter 23:7. 2001.

PASSAWATER, R. A.; CRANTON, E. M. Trace Elements, Hair Analysis and Nutrition, Keats publishing Inc., New Cannan, CT, USA, 1993.

PENA, R. Sobre as formas brasileira de piedra no cabelo. Rer. Med. Cir. Brasil. 39: 217-235. 1931a.

PENA, R. Sur les champignons producteurs de la piedras au Brésil. C.R.Soc.Biol 3: 1073-1073. 1931b.

PEREIRA, F.M.J. Culturas do gênero *Piedraia*, O da Fonseca e Arêa-Leão. Ver. Cursos. 16:118-128. 1930a.

PEREIRA, F.M.J. Cultura da piedra brasileira (*Piedraia sarmentoi*). Rev. Med. Cir. Brasil. 38:49-52. 1930b.

PEREIRA JÚNIOR, A.C. et al. Dermatoses observadas nas enfermarias de dermatologia do Hospital Universitário. Universidade Federal do Rio de Janeiro em 3 anos. Na. bras. Dermatol. 57:9-10, 1982.

POZEBON, D.; DRESSLER, V. L.; CURTIUS, A. J. Análise de cabelo: uma revisão dos procedimentos para a determinação de elementos traço e aplicações. Química Nova. 22(6): p. 838-846. 1999.

POLAK A. Melanin as a virulence factor in pathogenic fungi. Mycoses. v. 33, n. 5, p. 215-24. 1990.

REVANKAR, S.G.; PATTERSON, J.E.; SUTTON, D.A.; PULLEN, R; RINALDI, M.G. New Insights in Medical Mycology. Clinical Infectious Diseases. 34:467–76. 2002.

RIBEIRO, S.M.R; QUEIROZ, J.H; PELUZO, M.C.G; COSTA, N.M.B; MATTA, S.L.P; QUEIROZ, M.E.L.R. A formação e os efeitos das espécies reativas do oxigênio no meio biológico. Biosci. J. Uberlândia, v. 21, n.3, p. 133-149. 2005.

ROBBINS, C.R.; Chemical and Physical Behavior of Human Hair, 3^a ed. Springer-Verlag, New York. 1994.

RODRIGUES, E.G.; LÍRIO, V.S.; LACAZ, C.S. Preservação de fungos e actinomicetos de interesse médico em água destilada. Rev. Inst.Med.Trop. São Paulo; 34(2): 159-165, 1992.

RODRIGUEZ, M.J.D. Piedra En Ecuador. Departamento de Medicina Tropical, Sección Micología, Instituto. 1960.

ROZENTAL, S., ALVIANO, C.S; DE SOUZA, W. The in vitro susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* to activated macrophages. Mycopathologia. V. 126, n. 2, p. 85-91. 1994.

ROZENTAL, S.; ALVIANO, C.S; DE SOUZA, W. Fine structure and cytochemical study of the interaction between *Fonsecaea pedrosoi* and rat polymorphonuclear leukocyte. J. Med. Vet. Mycol. v. 34, p. 323-330. 1996.

SAMPAIO, P. Um caso de ‘piedra’. Norte Med. 1:66. 1913.

SACHS, H. History of Hair Analysis. Forensic Science International, 84: 7-16. 1997.

SAXENA, S.; UNİYAL, V R.; BHATT.P. Inhibitory Effect of Essential Oils against *Trichosporon ovoides* causing Piedra Hair Infection. Brazilian Journal Of Microbiology. 1347-1354. 2012.

SHWETA, B.; ARCHANA, A; NUPUR, G. An unusual case of onychomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi*. Aplo medicine. 2014.

SHERF, A. F. A Method for maintaining *Phytophthora* in culture for long periods without transfer. Phytopathology. 33:330-332, 1943.

SMITH, J.R.; SWITH, J.A. Lamellar subcomponents of the cuticular cell membrane complex of mammalian keratin fibres show friction and hardness contrast. Journal of Microscopy. 206:182-193. 2002.

SPERLING, L.C. Hair anatomy for the clinician. J Am Acad Dermatol; 25(1 Pt 1):1-17. 1991.

TAJ-ALDEEN, S.J.; AL-ANSARI, H.I.; BOEKHOUT, T.; THEELEN, B. Co-isolation of *Trichosporon inkin* and *Candida parapsilosis* from a scalp white piedra case Medical Mycology. 42:87-92. 2004.

TORRES, O. Considerações sobre a piedra, acompanhadas de algumas observações e seu tratamento. Gazeta. Med. Bahia. 46:531-542. 1915.

VANBREUSEGHAN, R. Technique biologique pour l'étude des dermatophytes du Sol. Ann. Soc. belge Méd. Trop., 32: 173-176. 1952.

VAN UDEN, N.; BARROS-MACHADO, de A.; CASTELLO-BRANCO, R. On Black piedra in central African mammals caused by the ascomycete *Piedraia quintanillae*. Rev. Biol. 3: 271-276, Lisboa. 1963.

VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, D.; PERUSQUÍA-ORTIZ, A. M.; HUNDEIKER, M.; BONIFAZ, A. Opportunistic yeast infections: candidiasis, cryptococcosis, trichosporonosis and geotrichosis. *Journal of the Germany Society of Dermatology*. 381-394. 2013.

VELASCO, M. V. R.; DIAS, T. C. S.; FREITAS, A. Z.; JÚNIOR, N. D. V.; PINTO, C. A. S. O.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Hair fiber characteristics and methods to evaluate hair physical and mechanical properties. 45(1): 153-162. 2009.

VIDAL-CROS, A., VIVIANI, F., LABESSE, G., BOCARA, M., GAUDRY, M. Polyhydroxynaphthalene reductase involved in melanin biosynthesis in *Magnaporthe grisea*. *Eur. J. Biochem*. 219: 985–992. 1994.

VIEGAS, A. P. Notas sobre três fungos brasileiros. *Piedraia hortae* Bragantia (Campinas), 3,3: 37 – 44. 1943.

VIEIRA, M.R.; MILHEIRO, A.; PACHECO, F.A. Phaeohyphomycosis due to *Cladosporium cladosporioides*. *Med. Mycol*, 39 (1): 135-137. 2001.

WHITING, D. A.; DALLAS, M.D. Structural abnormalities of the hair shaft. *Journal of the American academy of dermatology*. Vol.16 number. 1987.

WOŁOWIEC, P.; MICHALAK, I.; CHOJNACKA, K.; MIKULEWICZ, M. Hair analysis in health assessment. *Clinica Chimica Acta*. 419, 139–171. 2013.

YOUKER, S. R.; ANDREOZZI, R. J.; APPELBAUM, P.C.; CREDITO, K.; MILLER JJ. White piedra: further evidence of a synergistic infection. *J Am Acad Dermatol*. 49: 746-749. 2003

ZAHRA, L. V.; MALLIA, D.; HARDI, J. G.; BEZZINA, A.; FENECH, T. Case Report. Keratomycosis due to *Alternaria alternata* in a diabetic patient. *Mycoses* 45, 512–514. 2002.

ANEXOS

ANEXO 1.: PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

ANEXO 2: CARTA DE ANUÊNCIA