

# COINTER PDVS 2020

II CONGRESSO INTERNACIONAL DAS CIÊNCIAS DA SAÚDE

Edição 100% virtual | 02 a 05 de dezembro

## ESTUDO DA INTERFERÊNCIA BIOLÓGICA ENTRE DERMATÓFITOS E LEVEDURAS EM ONICOMICOSSES

## ESTUDIO DE INTERFERENCIA BIOLÓGICA ENTRE DERMATOFITAS Y LEVADURAS EN ONICOMICOSIS

## STUDY OF BIOLOGICAL INTERFERENCE BETWEEN DERMATOPHYTES AND YEAST IN ONYCHOMYCOSIS

Apresentação: Comunicação Oral

Thiago Henrique Lemes<sup>1</sup>; Taiza Maschio-Lima<sup>2</sup>; Natalia Seron Brizzotti<sup>3</sup> João Paulo Zen Siqueira<sup>4</sup>; Margarete Teresa Gottardo de Almeida<sup>5</sup>

DOI: <https://doi.org/10.31692/IICOINTERPDVS.0071>

### RESUMO

Onicomicoses, também conhecidas popularmente como micoses em unhas, são infecções fúngicas que afetam o leito ungueal e tecidos adjacentes com hiperqueratose, descoloração e onicolise, causadas por fungos dermatófitos, leveduras e fungos filamentosos não dermatófitos. Dentre esses se destacam como agente etiológico desta micose, os fungos filamentosos do gênero *Microsporum*, *Epidermophyton* e *Trichophyton* e a levedura *Candida albicans*. A interação entre diferentes fungos tem sido objeto de diversos estudos, na qual já foi demonstrado que certas espécies de leveduras podem interferir no crescimento de fungos filamentosos por ação antagonista, com destaque para a produção de substâncias de atividade antifúngica letal. Este estudo tem como objetivo avaliar o potencial antagonista das leveduras *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* em co-cultivo com os fungos filamentosos *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*, sendo esses isolados clínicos provenientes da micoteca do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP. Para isso, inóculos de cada cepa foram preparados e diluídos até 1/128 e posteriormente cruzados entre si. Os inóculos foram introduzidos em co-culturas em três diferentes testes, sendo um em meio sólido (Agar Mueller Hinton) e dois em meios líquido (Caldo Sabouraud Dextrose e RPMI). Todos os resultados apontaram inibição no crescimento dos filamentosos perante as leveduras. O antagonismo aqui descrito leva a propor novos procedimentos para a prática clínica, onde o exame micológico direto deve ser considerado e comparado com a cultura.

**Palavras-Chave:** Onicomicoses, Dermatófitos, Leveduras, Interação antagonista.

<sup>1</sup> Mestre em Microbiologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, th.lemes@unesp.br

<sup>2</sup> Mestre em Microbiologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, taiza.m.lima@unesp.br

<sup>3</sup> Mestre em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, bionath@hotmail.com

<sup>4</sup> Doutor em Biomedicina, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, jpzensiqueira@yahoo.com.br

<sup>5</sup> Doutora em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, margarete@famerp.br



### RESUMEN

Las onicomicosis, también conocidas popularmente como micosis ungueales, son infecciones fúngicas que afectan el lecho ungueal y tejidos adyacentes con hiperqueratosis, decoloración y onicólisis, causadas por hongos dermatofitos, levaduras y hongos filamentosos no dermatofitos. Entre los que destacan como agente etiológico de esta micosis, los hongos filamentosos del género *Microsporium*, *Epidermophyton* y *Trichophyton* y la levadura *Candida albicans*. La interacción entre diferentes hongos ha sido objeto de varios estudios, en los que ya se ha demostrado que determinadas especies de levaduras pueden interferir en el crecimiento de hongos filamentosos por acción antagonista, con énfasis en la producción de sustancias con actividad antifúngica letal. Este estudio tiene como objetivo evaluar el potencial antagonista de las levaduras *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Candida tropicalis* en co-cultivo con los hongos filamentosos *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*, estos aislados provenientes de la biblioteca del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP. Para ello, se prepararon inoculantes de cada cepa y se diluyeron a 1/128 y luego se cruzaron entre sí. Los inóculos se introdujeron en co-cultivos en tres pruebas diferentes, una en medio sólido (Agar Mueller Hinton) y dos en medio líquido (Broth Sabouraud Dextrose y RPMI). Todos los resultados mostraron inhibición en el crecimiento de filamentos en relación a las levaduras. El antagonismo aquí descrito conduce a la propuesta de nuevos procedimientos para la práctica clínica, donde se debe considerar el examen micológico directo y compararlo con el cultivo.

**Palabras Clave:** Onicomicosis, Dermatofitos, Levaduras, Interacción antagonista.

### ABSTRACT

Onychomycoses, also popularly known as nail mycoses, are fungal infections that affect the nail bed and adjacent tissues with hyperkeratosis, discoloration and onycholysis, caused by dermatophyte fungi, yeasts and non-dermatophyte filamentous fungi. Among those that stand out as the etiological agent of this mycosis, the filamentous fungi of the genus *Microsporium*, *Epidermophyton* and *Trichophyton* and the yeast *Candida albicans*. The interaction between different fungi has been the subject of several studies, in which it has been shown that certain species of yeasts can interfere with the growth of filamentous fungi by antagonistic action, with emphasis on the production of substances with lethal antifungal activity. This study aims to evaluate the antagonistic potential of yeasts *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* in co-cultivation with the filamentous fungi *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*, these isolates coming from the library of the Microbiology Laboratory of the Faculty of Medicine of São José do Rio Preto - FAMERP. For this, inoculants from each strain were prepared and diluted to 1/128 and then crossed with each other. Inocula were introduced into co-cultures in three different tests, one in solid medium (Agar Mueller Hinton) and two in liquid medium (Broth Sabouraud Dextrose and RPMI). All results showed inhibition in the growth of filaments in relation to yeasts. The antagonism described here leads to the proposal of new procedures for clinical practice, where the direct mycological examination must be considered and compared with the culture.

**Keywords:** Onychomycosis, Dermatophytes, Yeasts, Antagonistic interaction.

## INTRODUÇÃO

Onicomicoses são infecções de unhas causadas por fungos dermatófitos, leveduras e fungos filamentosos não dermatófitos, que correspondem a 50% de todas as desordens de unhas e 30% de todas as infecções fúngicas cutâneas (GUPTA, VERSTEEG, SHEAR, 2017). Estima-se que sua prevalência seja de até 10% na população mundial (MARAKI, MAVROMANOLAKI, 2016), já no Brasil um estudo indica índice de até 28% na população atendida pelo sistema de saúde (CHIACCHIO et al., 2013). Além do aspecto estético, configuram grave problema saúde pública por gerar custos aos serviços de saúde, ocasionar a perda de produtividade dos indivíduos acometidos (VLAHOVIC, 2016) com impacto psicossocial negativo associado ao desconforto e baixa autoestima (GUPTA, MAYS, 2018).

As onicomicoses afetam o leito ungueal e tecidos adjacentes, com hiperqueratose, descoloração e onicolise (GUPTA, FOLEY, 2018), na qual seus principais agentes etiológicos são dermatófitos, seguidos por leveduras do gênero *Candida* spp. e fungos filamentosos não dermatófitos. Porém, a prevalência de gênero e espécie difere de acordo com a região e o período estudado (CHADEGANIPOUR, MOHAMMADI, 2016; KUTLUBAY et al., 2016).

Os dermatófitos correspondem a 90% dos casos de onicomicoses e são classificados em três gêneros: *Microsporum*, *Epidermophyton* e *Trichophyton*. Esses podem ser divididos, de acordo com seu habitat primário, em antropofílicos, zoofílicos e geofílicos; sendo os dermatófitos antropofílicos os responsáveis pela maioria dos casos humanos de dermatofitoses, seguidos por espécies zoofílicas (DIDEHDAR et al., 2016).

As espécies *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* correspondem aos principais agentes responsáveis pelas onicomicoses (SURENDRAN et al., 2014; VASCONCELLOS et al., 2013). Durante o processo infeccioso os dermatófitos são capazes de remodelar o metabolismo dos tecidos, superar os mecanismos de defesa do hospedeiro e produzir enzimas hidrolíticas como elastases, proteases, lipases para captação de nutrientes (DE AGUIAR PERES et al., 2010; MARTINEZ-ROSSI, PERES, ROSSI, 2017).

Leveduras do gênero *Candida* spp. são componentes naturais da microbiota do corpo humano, entretanto no desequilíbrio patógeno-hospedeiro, podem causar infecções graves. O progresso no campo micológico tem reconhecido espécies de *Candida* spp. como agentes etiológicos de onicomicoses, com variações de perfis epidemiológicos dependentes da localização geográfica (KHOSRAVI et al., 2013; SURYAWANSHI et al., 2017). As espécies *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* se destacam dentre as leveduras causadoras de onicomicoses. Contudo, as espécies *C. glabrata*, *C. guilliermondii* e *C. krusei* tem sido

## UMA ESTUDO DA INTERFERÊNCIA BIOLÓGICA

associadas a essas infecções (FENG et al, 2015; TORRES-GUERRERO, ARENAS, 2017).

A terapêutica das onicomicoses consiste em tratamento tópico, sistêmico ou cirúrgico e depende do tipo clínico de manifestação, da severidade do comprometimento e do número de unhas afetadas. A combinação do tratamento sistêmico e tópico garantem maior sucesso na taxa de cura (LUSIANA; REICHL, MULLER-GOYMANN, 2013; WIZNIA et al., 2017). Para o tratamento sistêmico, os principais antifúngicos utilizados são a terbinafina, o fluconazol e o itraconazol. Apesar de maior taxa de sucesso na terapêutica, o uso prolongado desses fármacos acarreta potenciais efeitos colaterais, incluindo danos hepatotóxicos. Esses fatores contribuem para baixa adesão ao tratamento e reincidência da infecção, além do surgimento de organismos resistentes (TOSTI; ELEWSKI, 2016).

A interação entre diferentes fungos tem sido objeto de diversos estudos, demonstrado que algumas espécies de leveduras podem interferir no crescimento de fungos filamentosos por ação antagonista. Assim, já é conhecido que leveduras antagonistas podem reduzir o crescimento de fungos filamentosos tanto em condições *in vitro* como em condições de armazenamento em larga escala (BRASCH et al, 2013; COELHO et al., 2011), principalmente através da liberação de substâncias de atividade antifúngica letal (VITAL et al., 2002). Contudo, os mecanismos de interações entre leveduras e dermatófitos em onicomicoses são escassos de estudos. O conhecimento desses mecanismos é fundamental para a descoberta de novas moléculas antifúngicas que podem contribuir promissora em novas abordagens terapêuticas contra fungos causadores de onicomicoses.

## FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

As onicomicoses são infecções de difícil controle, causam grande morbidade na população mundial afetando sua qualidade de vida e gerando gastos ao sistema de saúde. Por não ser doença de notificação compulsória, seus números epidemiológicos de incidência podem ser subestimados. Adicionalmente, o envelhecimento da população global caracteriza risco para aumento dessas infecções, uma vez que configura fator predisponente para sua ocorrência.

Em estudos da literatura, o diagnóstico laboratorial de onicomicose revela a mudança de etiologia como agente causal, e, em outras situações, a concomitância de organismos durante o estágio de infecção. Em análise prévia do nosso grupo de pesquisa, foi observado no exame direto, preparado a partir de amostra clínica acrescida da solução KOH a 10% e visualizada em microscopia óptica, dois tipos morfológicos distintos de fungo: levedura e filamento. Contudo,

na cultura realizada com a mesma amostra clínica, houve crescimento apenas da levedura.

Este episódio levou ao questionamento da possibilidade de interação entre esses microrganismos, que poderiam inibir outras espécies presentes no sítio de infecção ungueal, na qual este evento compromete a análise laboratorial, levando ao um diagnóstico incompleto que pode influenciar negativamente a terapia.

Falhas no diagnóstico e terapêutica dessas infecções causam danos irreversíveis a placa ungueal e contribuem para o surgimento de microrganismos resistentes aos antifúngicos convencionais. Essa mudança no perfil de susceptibilidade antimicrobiana tem ocasionado doenças fúngicas de difíceis controles e acabam contribuindo para a natureza recalcitrante das onicomicoses.

Considerando as altas taxas de recorrência de onicomicose, o desenvolvimento de novos antifúngicos é um desafio para o novo século, uma vez que a maioria dos fungos patógenos compartilham os mesmos processos bioquímicos e biológicos fundamentais com o hospedeiro. Esse fato contribui para que moléculas tóxicas para fungos acabem se tornando tóxicas também para células humanas. Diante disso, faz-se necessário então conhecer os mecanismos de interação entre as espécies para o aprimoramento dos métodos de diagnóstico e terapêutica, com a descoberta de novas moléculas que possam abrir novas linhas de atuação antimicrobiana para o controle e tratamento de infecções das unhas.

## METODOLOGIA

Trata-se de um estudo experimental *in vitro* realizado a partir de amostras fúngicas pertencentes à coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP, na qual foram realizados três testes de antagonismo microbiano utilizando linhagens de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*.

Ao primeiro teste, o inóculo de *C. parapsilosis* preparado previamente baseando-se na escala 2 de MacFarland, foi semeado com swab em oito direções em duas placas contendo Agar Müeller Hinton (Oxoid, Basingstoke, Hants, UK). Após a semeadura, fragmentos de colônias de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*, de aproximadamente 7 mm<sup>2</sup> e 5 mm<sup>2</sup>, respectivamente, foram colocadas sobre a superfície do Agar na qual a levedura foi semeada previamente. Duas placas controles foram separadas para avaliação do crescimento dos microrganismos isoladamente, sem leveduras. Todas as placas foram incubadas em estufa a 35 °C e as leituras

## UMA ESTUDO DA INTERFERÊNCIA BIOLÓGICA

foram realizadas em intervalos de 72 horas.

Para o segundo teste, 5 mL de inóculos de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*, foram preparados em frascos de vidro contendo Caldo Sabouraud Dextrose (Oxoid, Basingstoke, Hants, UK). Todos os inóculos foram padronizados ao espectrofotômetro obedecendo-se o intervalo de 42% a 52% de transmitância - comprimento de onda de 490 nm. Foram separadas duas placas de poliestireno com 96 poços de fundo chato, sendo a primeira utilizada para diluição dos inóculos (a partir da concentração 100% [Puro] até 1/128) e a segunda, para posterior cruzamento destas diluições, ou seja, cruzou-se a maior concentração da linhagem de filamentosos com a menor concentração da cepa de levedura e, assim sucessivamente até as concentrações das diluições se inverterem. (Figura 1).

**Figura 01:** Teste de antagonismo de leveduras *Candida albicans* (Ca), *Candida parapsilosis* (Cp), *Candida tropicalis* (Ct) contra cepas de fungos filamentosos *Trichophyton rubrum* (Tr) e *Trichophyton mentagrophytes* (Tm) em diversas diluições.

Puro	Tr	Tr	Tr	Tr	Tm	Tm	Tm
X	X	X	X	X	X	X	X
1/128	Tm	Ca	Cp	Ct	Ca	Cp	Ct
1/2	Tr	Tr	Tr	Tr	Tm	Tm	Tm
X	X	X	X	X	X	X	X
1/64	Tm	Ca	Cp	Ct	Ca	Cp	Ct
1/4	Tr	Tr	Tr	Tr	Tm	Tm	Tm
X	X	X	X	X	X	X	X
1/32	Tm	Ca	Cp	Ct	Ca	Cp	Ct
1/8	Tr	Tr	Tr	Tr	Tm	Tm	Tm
X	X	X	X	X	X	X	X
1/16	Tm	Ca	Cp	Ct	Ca	Cp	Ct
1/16	Tr	Tr	Tr	Tr	Tm	Tm	Tm
X	X	X	X	X	X	X	X
1/8	Tm	Ca	Cp	Ct	Ca	Cp	Ct
1/32	Tr	Tr	Tr	Tr	Tm	Tm	Tm
X	X	X	X	X	X	X	X
1/4	Tm	Ca	Cp	Ct	Ca	Cp	Ct
1/64	Tr	Tr	Tr	Tr	Tm	Tm	Tm
X	X	X	X	X	X	X	X
1/2	Tm	Ca	Cp	Ct	Ca	Cp	Ct
1/128	Tr	Tr	Tr	Tr	Tm	Tm	Tm
X	X	X	X	X	X	X	X
PURO	Tm	Ca	Cp	Ct	Ca	Cp	Ct

As placas foram incubadas a 35 °C por 24h. Após esse período, todas as diluições foram semeadas em placa de Agar Sabouraud Dextrose (Oxoid, Basingstoke, Hants, UK), com leitura realizada em 72 horas.

Para o terceiro teste, os inóculos de leveduras foram preparados tomando-se como referencial o método de microdiluição segundo as recomendações do documento M27-S4 da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI,2012), com modificações. As leveduras foram cultivadas em placas de Agar Sabouraud Dextrose à 32 °C por 24 horas, após este período as mesmas foram suspensas em solução salina estéril e o inóculo comparado a escala 0,5 de MacFarland e ajustadas em espectrofotômetro entre 85-95% de transmitância a 530 nm, o que correspondeu à 1,5 a  $5 \times 10^6$  UFC/mL. Em seguida, foi realizada uma diluição 1:10 em Caldo Sabouraud Dextrose obtendo-se um inóculo com concentração de 1 a  $5 \times 10^5$  UFC/mL, a qual foi utilizada no teste.

As cepas de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* foram repicadas em Agar Batata (Oxoid, Basingstoke, Hants, UK), e armazenadas durante 10 dias a 35 °C. O método de preparação do inóculo usado nesse caso seguiu as recomendações do documento M38 – A2 da CLSI (2008), com modificações pela substituição do meio RPMI 1640 a 2% de glicose por Caldo Sabouraud Dextrose com 2% de glicose.

Após a preparação dos inóculos realizou-se a diluição de todas as cepas na razão 2 com início puro até 1/128. As diluições foram feitas como realizado no segundo teste. Após esta etapa, os tubos foram armazenados a 30 °C e plaqueados em meio Agar Sabouraud Dextrose nos tempos: 72 horas, 1, 2, 3 e 4 semanas de contato. A cada semana foi adicionado 1 mL de Caldo Sabouraud Dextrose em todos os tubos. A leitura das placas que foram semeadas foi realizada a cada 3 dias durante um período de 15 dias.

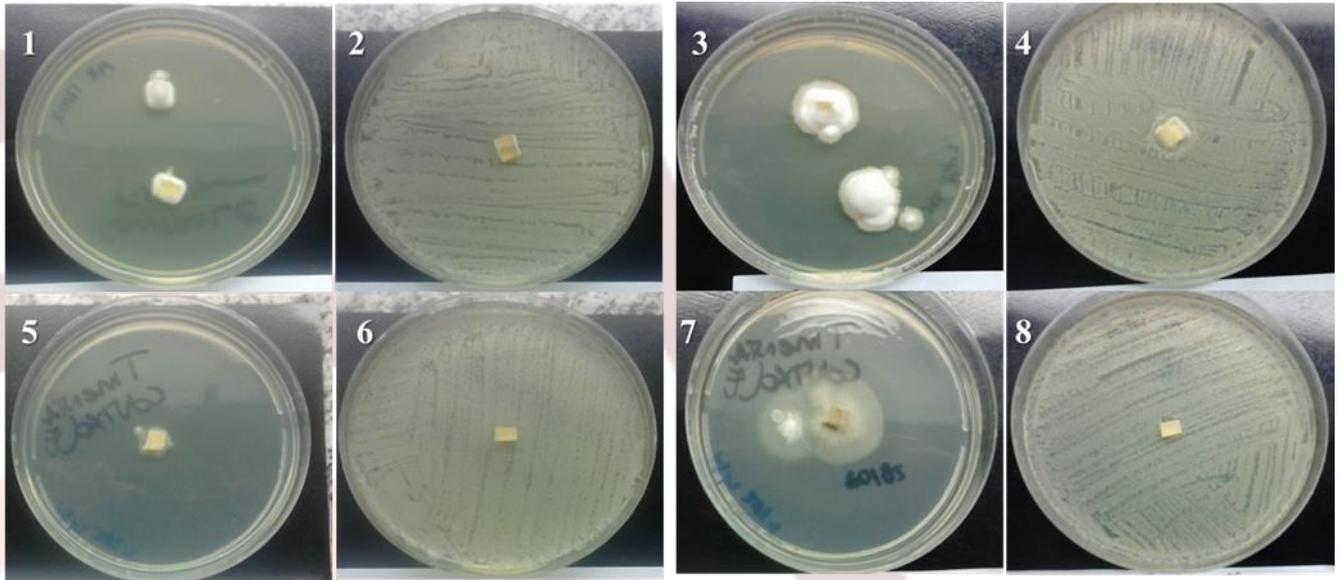
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro teste notou-se o crescimento significativo das colônias controle, enquanto as linhagens de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* em contato com *C. parapsilosis* não se desenvolveram (Figura 2). Nas placas de co-cultura de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* com *C. parapsilosis*, o tamanho das colônias foram respectivamente 7 mm<sup>2</sup> e 5 mm<sup>2</sup>. O grupo controle de *T. rubrum* teve crescimento micelial de 7 mm<sup>2</sup> do primeiro dia de inoculação para 22 mm<sup>2</sup>, enquanto *T. mentagrophytes* de 5 mm<sup>2</sup> para 27 mm<sup>2</sup> no décimo quinto dia de leitura (Gráfico 1). Essas placas foram observadas no microscópio óptico comum e estereoscópico (Figura 3). O crescimento maior de *T. mentagrophytes* em comparação a *T. rubrum* nas placas controles, pode ser explicado por sua alta atividade proteolítica, um importante fator de virulência que lhe confere vantagem para seu rápido crescimento micelial (PAKSHIR et al., 2017; RAHEEM et

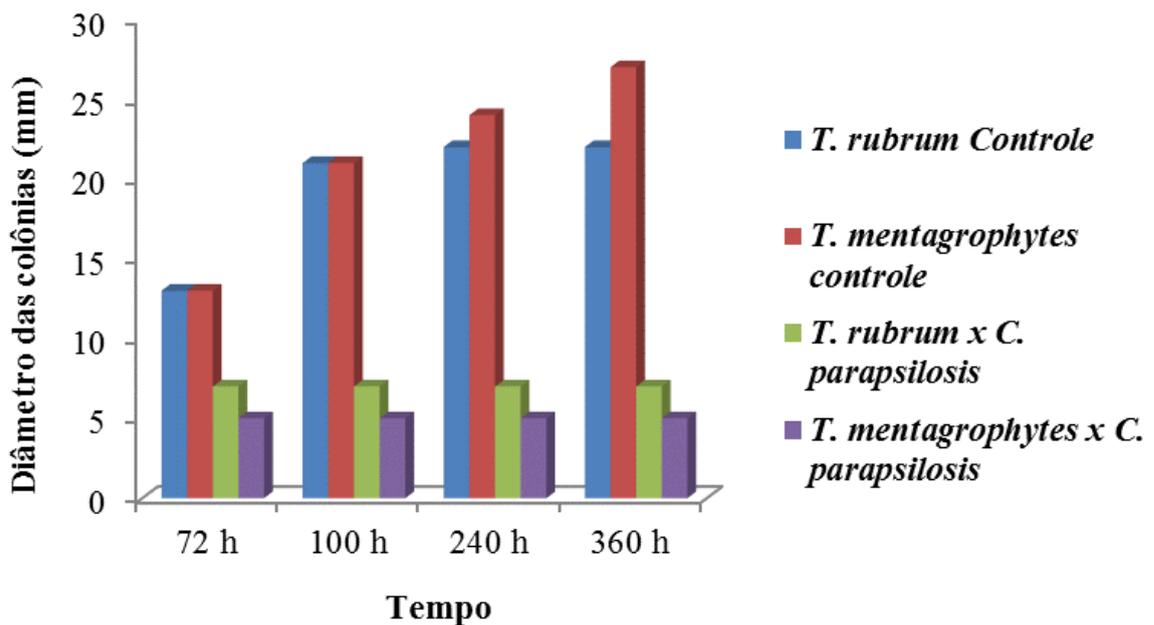
## UMA ESTUDO DA INTERFERÊNCIA BIOLÓGICA

al., 2013; YUE et al., 2015).

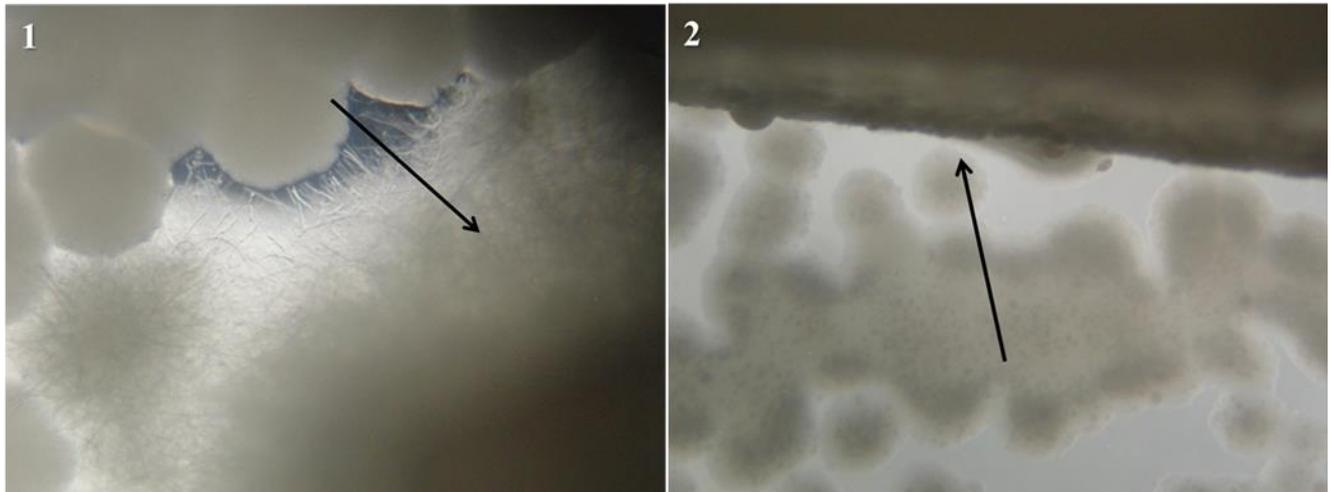
**Figura 02:** Efeito inibitório entre levedura e fungo filamentososo. 1 e 5: Placas controles de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* sem a levedura (leitura em 72 horas): 2 e 6, linhagens de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* em contato com *C. parapsilosis* (leitura em 72 horas): 3 e 7, Colônias de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* em meio sem levedura (leitura em 12 dias): e 4 e 8 em contato com *C. parapsilosis* (leitura em 12 dias).



**Gráfico 01:** Crescimento das colônias de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* controles com e sem contato com *C. parapsilosis*.

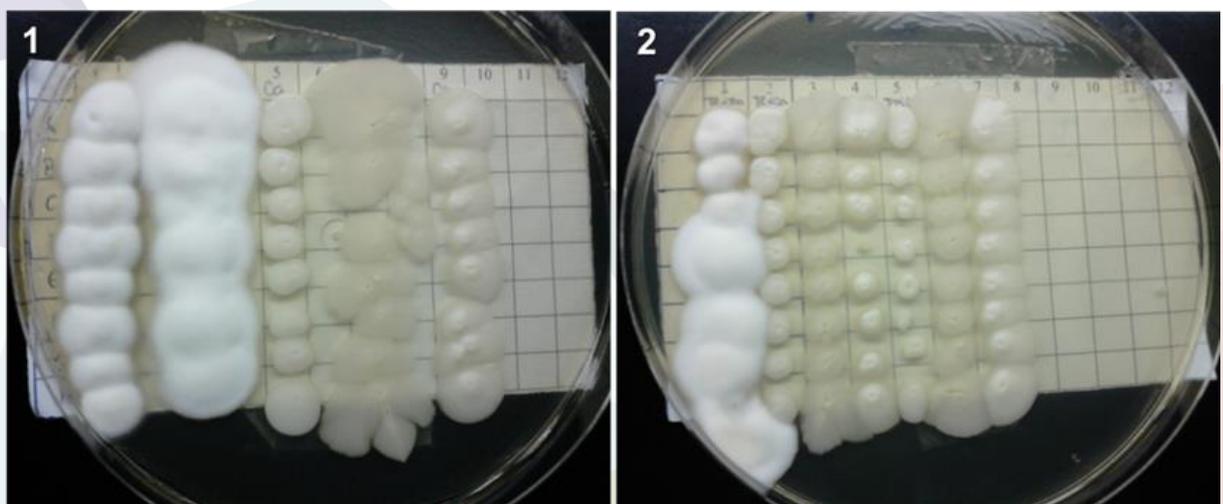


**Figura 03:** Fotografia revelando efeito inibitório entre *C. parapsilosis* e dermatófitos (flecha). 1; Imagem de microscópio estereoscópico de contato entre *T. rubrum* e levedura : 2 Colônia de *T. mentagrophytes* em contato com *C. parapsilosis*, microscópio óptico comum, objetiva 40x.



No segundo teste realizado com microdiluições cruzadas e plaqueadas, foi observado o crescimento significativo apenas de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* e inibição do crescimento das colônias de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* quando associados (Figura 4).

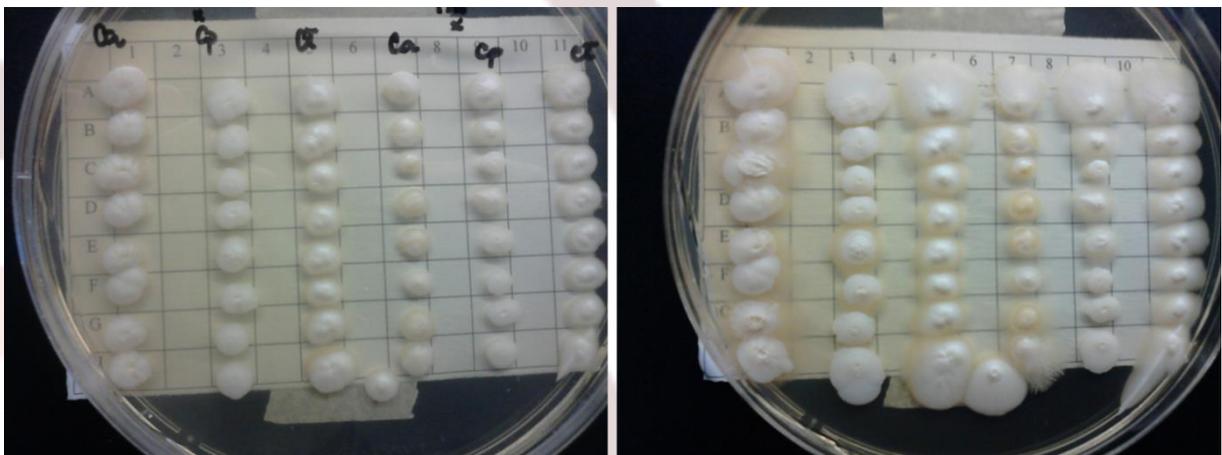
**Figura 04:** Resultados do plaqueamento das microdiluições do segundo teste. 1: Placa Controle da esquerda para a direita *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*. 2: placa do cruzamento das microdiluições, *T. rubrum* x *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* x *C. albicans*, *T. rubrum* x *C. parapsilosis*, *T. rubrum* x *C. tropicalis*, *T. mentagrophytes* x *C. albicans*, *T. mentagrophytes* x *C. parapsilosis* e *T. mentagrophytes* x *C. tropicalis*.



## UMA ESTUDO DA INTERFERÊNCIA BIOLÓGICA

No terceiro teste observou-se que *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* não se desenvolveu em nenhuma das diluições, mesmo naquela em que sua concentração estava maior que a da levedura (Figura 5).

**Figura 5:** Plaqueamento das diluições em contato *T. rubrum* x *C. albicans*, *T. rubrum* x *C. parapsilosis*, *T. rubrum* x *C. tropicalis*, *T. mentagrophytes* x *C. albicans*, *T. mentagrophytes* x *C. parapsilosis* e *T. mentagrophytes* x *C. tropicalis*. 1: plaqueamento com 72 horas de leitura 1.1: após 15 dias.



Em onicomicoses, estudos na literatura indicam a mudança de etiologia do agente causal, e em outras situações, a concomitância de organismos durante o estágio de infecção (HALL, 2011; KHOSRAVI et al., 2013; MOUBASHER, ABDEL-SATER, SOLIMAN, 2017; SURYAWANSHI et al., 2017). As leveduras do gênero *Candida*, apesar de pertencerem a microbiota normal humana, nos últimos anos vêm ganhando destaque como agentes etiológicos de onicomicoses (SINGAL, KHANNA, 2011; SUBRAMANYA et al., 2016; ZICCARDI et al., 2015). A principal espécie de relevância clínica nas infecções de unha é *Candida albicans*, porém, *Candida parapsilosis* e *C. tropicalis* tem surgido como patógeno emergente (ABARZÚA-ARAYA et al., 2014).

No diagnóstico laboratorial de onicomicoses é frequente a presença de leveduras e filamentos no exame direto com desenvolvimento de apenas um dos microrganismos em cultura. Nesse sentido, Vasconcellos e colaboradores (2013) ressaltam que essa divergência pode ser explicada por fatores como a distribuição do fungo nas lesões, coleta inadequada, facilidade de contaminação por outros microrganismos do ambiente e à microbiota bacteriana, dificultando a identificação do verdadeiro agente causador. Porém, sabe-se que leveduras

antagonistas podem reduzir o crescimento de fungos filamentosos, o que também pode apontar para o fenômeno de interação antagônica entre as espécies.

Coelho et al (2011) realizaram testes sobre o potencial antagônico de leveduras contra *Penicillium expansum*, onde foi observado que, das 44 espécies testadas, 20 apresentavam potencial antagônico contra o filamentosos. Estudos conduzidos por Brasch et al (2013) demonstraram a presença de compostos voláteis liberados por *C. albicans* exercendo efeito inibitório contra *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Microsporum canis* e *Epidermophyton floccosum*. Dentre esses compostos, destaca-se o farnesol, um álcool sesquiterpeno responsável pela regulação da morfogênese e densidade populacional. No entanto, a ação desse composto não se limita apenas a *C. albicans*, exibindo inibição no crescimento, indução de apoptose e danos ao citoesqueleto sobre diversos microrganismos (INOUE, TOGASHI, HAMASHIMA, 2016; MONTEIRO et al., 2017; RIEKHOF, NICKERSON, 2017). Apesar da produção desse composto ser bem descrito para *C. albicans*, pouco se sabe sobre a produção por outras espécies, incluindo *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*.

O correto diagnóstico laboratorial do agente etiológico permite a indicação da terapêutica apropriada além de ser fundamental para seu sucesso (KOZEL; WICKES, 2014). A interação entre leveduras e dermatófitos aqui descrita pode comprometer esse diagnóstico, acarretar falhas na terapêutica e conseqüentemente o surgimento de patógenos resistentes ao escasso arsenal antifúngico existente.

Os microrganismos são capazes de responder ao ambiente em que estão inseridos com respostas fisiológicas como mecanismo de defesa e tolerância. Uma variedade de metabólitos é gerada por múltiplos estímulos e vias de sinalização complexa. Estudos apontam a ação desses compostos sobre outros microrganismos, inibindo o crescimento, esporulação e até formação de biofilmes (ALBUQUERQUE et al., 2014; PAKSHIR et al., 2017). No presente estudo, não foi realizado a análise de metabólitos durante o crescimento em meio sólido ou líquido, estudos adicionais devem ser conduzidos para que se tenha a confirmação de que tal composto seja o responsável pela inibição aqui descrita.

## CONCLUSÕES

A inibição do crescimento dos filamentosos em contato com as leveduras é fato observado pela presente investigação. Até o momento, nenhum estudo seguiu o protocolo de investigação aqui descrito, onde, a partir de observação clínica da infecção de unha quando de etiologia mista, apenas um dos organismos crescia em cultura. O antagonismo aqui descrito

leva a propor novos procedimentos para a prática clínica. Estudos adicionais devem ser conduzidos para identificação e isolamento dos produtos de metabolismo presentes nessa interação para a descoberta de novas abordagens terapêuticas no controle das onicomicoses.

### REFERÊNCIAS

ABARZÚA-ARAYA, A. et al. *Candida parapsilosis* and *Candida guilliermondii*: emerging pathogens in nail candidiasis. **Indian Journal of Dermatology**, v. 59, n. 1, p. 24, 2014.

ALBUQUERQUE, P. et al. Quorum sensing-mediated , cell density-dependent regulation of growth and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **mBio**, v. 5, n. 1, p. 1–15, 2014.

BRASCH, J. et al. Acyclic sesquiterpenes released by *Candida albicans* inhibit growth of dermatophytes. **Medical mycology**, v. 52, p. 46–55, 2013.

CHADEGANIPOUR, M.; MOHAMMADI, R. Causative agents of onychomycosis: a 7-year study. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 30, n. 6, 2016.

CHIACCHIO, N. et al. An observational and descriptive study of the epidemiology of and therapeutic approach to onychomycosis in dermatology offices in Brazil. **Annals of Brazilian Dermatology**, v. 88, supl. 1, p. 3-11, 2013.

CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard-Second Edition. CLSI document M38-A2. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**; 2008.

CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth International Supplement. CLSI document M27-S4. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**; 2012.

COELHO, A. R. et al. Evaluation of potential antagonism in yeasts, seeking biocontrol of spoilage by *Penicillium expansum*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 4, p. 1879-1892, 2011.

DE AGUIAR PERES, N. T. et al. Dermatofitos: Interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. **Annals of Brazilian Dermatology**, v. 85, n. 5, p. 657–667, 2010.

DIDEHDAR, M. et al. Caractérisation des dermatophytes cliniquement importants dans le nord de l'Iran en utilisant la PCR-RFLP de la région ITS. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 26, n. 4, p. 345-350, 2016.

FENG, X. et al. Molecular identification of *Candida* species isolated from onychomycosis in Shanghai, China. **Mycopathologia**, v. 180, n. 5, p. 365-371, 2015.

GUPTA, A. K.; VERSTEEG, S. G.; SHEAR, N. H. Onychomycosis in the 21st century: an update on diagnosis, epidemiology, and treatment. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 21, n. 6, p. 525-539, 2017.

GUPTA, A. K.; FOLEY, K. A. Evidence for biofilms in onychomycosis. *Giornale italiano di dermatologia e venereologia: organo ufficiale, Società italiana di dermatologia e sifilografia*, v. 154, n. 1, p. 50-55, 2018.

GUPTA, A. K.; MAYS, R. R. The impact of onychomycosis on quality of life: a systematic review of the available literature. *Skin Appendage Disorders*, v. 1, p. 1–9, 2018.

HALL, G. S. Interactions of yeasts, moulds, and antifungal agents: how to detect resistance. *Springer Science & Business Media*, p. 151-158, 2011.

INOUE, Y.; TOGASHI, N.; HAMASHIMA, H. Farnesol-induced disruption of the *Staphylococcus aureus* cytoplasmic membrane. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 39, n. 5, p. 653–6, 2016.

KHOSRAVI, A. R. et al. Yeasts as important agents of onychomycosis: in vitro activity of Propolis against yeasts isolated from patients with nail infection. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, v. 19, n. 1, p. 57–62, 2013.

KOZEL, T. R.; WICKES, B. Fungal Diagnostics. *Cold Spring Harb Perspect Med*, v. a019299, p. 1–14, 2014.

KUTLUBAY, Z. et al. Acral manifestations of fungal infections. *Clinics in Dermatology*, p. 28–39, 2016.

MARAKI, S.; MAVROMANOLAKI, V. E. Epidemiology of onychomycosis in Crete, Greece: a 12-year study. *Mycoses*, v. 59, n. 12, p. 798–802, 2016.

MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERES, N. T. A.; ROSSI, A. pathogenesis of dermatophytosis: sensing the host tissue. *Mycopathologia*, v. 182, n. 1, 2017.

MONTEIRO, D. R. et al. Antifungal activity of tyrosol and farnesol used in combination against *Candida* species in the planktonic state or forming biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, v. 123, n. 2, p. 392–400, 2017.

MOUBASHER, A. H.; ABDEL-SATER, M. A.; SOLIMAN, Z. Incidence and biodiversity of yeasts, dermatophytes and non-dermatophytes in superficial skin infections in Assiut, Egypt. *Journal of Medical Mycology*, v. 27, n. 2, p. 166–179, 2017.

LUSIANA; REICHL, S.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Infected nail plate model made of human hair keratin for evaluating the efficacy of different topical antifungal formulations against *Trichophyton rubrum* in vitro. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 84, n. 3, 2013.

PAKSHIR, K. et al. Proteolytic activity and cooperative hemolytic effect of dermatophytes with different species of bacteria. *Current Medical Mycology*, v. 2, n. 4, p. 9–14, 2017.

RAHEEM, A. R. et al. Comparative study of keratinolytic activities of dermatophytes in various keratin substrates. *Virology & Mycology*, v. 2, n. 3, p. 3–5, 2013.

RIEKHOF, W. R.; NICKERSON, K. W. Quorum sensing in *Candida albicans*: farnesol versus

farnesoic acid. **FEBS Letters**, v. 591, n. 12, p. 1637–1640, 2017.

SINGAL, A.; KHANNA, D. Onychomycosis: diagnosis and management. **Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology**, v. 77, n. 6, p. 659, 2011.

SUBRAMANYA, S. H. et al. Case Report Onychomycosis due to *Candida parapsilosis* in a child with ventricular septal defect : an unusual predisposition. **Case Rep Pediatr**, 7026068 p. 5–8, 2016.

SURENDRAN, K. et al. A clinical and mycological study of dermatophytic infections. **Indian Journal of Dermatology**, v. 59, n. 3, p. 262, 2014.

SURYAWANSHI, R. S. et al. Onychomycosis: dermatophytes to yeasts: an experience in and around Mumbai, Maharashtra, India. **International Journal of Research in Medical Sciences**, v. 5, n. 5, p. 1959, 2017.

TOSTI, A.; ELEWSKI, B. E. Onychomycosis: Practical Approaches to Minimize Relapse and Recurrence. **Skin Appendage Disorders**, v. 2, n. 1–2, p. 83–87, 2016.

TORRES-GUERRERO, E.; ARENAS, R. **Candida onychomycosis**. In *Onychomycosis*. Springer, Cham: Elsevier, 2017.

VASCONCELLOS, C. et al. Identification of fungi species in the onychomycosis of institutionalized elderly. **Annals of Brazilian Dermatology**, v. 88, n. 3, p. 377–380, 2013.

VITAL, M. J. S. et al. Mycocinogenic yeasts isolated from Amazon soils of the Maracá Ecological Station, Roraima-Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 3, 2002.

VLAHOVIC, T. C. Onychomycosis: evaluation, treatment options, managing recurrence, and patient outcomes. **Clinics in Podiatric Medicine and Surgery**, v. 33, n. 3, p. 305-18, 2016.

YUE, X. et al. An ultrastructural study of *Trichophyton rubrum* induced onychomycosis. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, p. 532–540, 2015.

ZICCARDI, M. et al. *Candida parapsilosis* (sensu lato) isolated from hospitals located in the Southeast of Brazil: Species distribution, antifungal susceptibility and virulence attributes. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 305, n. 8, p. 848–859, 2015.

WIZNIA, L. E. et al. A Clinical Review of Laser and Light Therapy for Nail Psoriasis and Onychomycosis. **Dermatologic Surgery**, v. 43, n. 2, p. 161-172, 2017.