



ARTIGO ORIGINAL

Piedraia hortae: formação de biofilme e sua importância na patogenia de *pedra nigra* ☆,☆☆

Hiram Larangeira de Almeida Junior ^{a,b,*}, Thales de Moura Assis ^a,
Eduardo Camargo Faria ^a, Luiz Roberto Kramer Costa ^c e Berenice Marques Ibaldo ^c

^a Pós-Graduação em Saúde e Comportamento, Universidade Católica de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil

^b Departamento de Dermatologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil

^c Setor de Micologia, Laboratório Ary Costa, Pelotas, RS, Brasil

Recebido em 14 de novembro de 2023; aceito em 17 de dezembro de 2023

PALAVRAS-CHAVE

Biofilmes;
Microscopia
eletrônica;
Piedraia hortae

Resumo

Fundamentos: Pouco se sabe sobre a ultraestrutura da *Piedraia hortae*.

Objetivo: Examinar colônia de *P. hortae* com microscopia eletrônica de varredura e investigar possíveis contribuições à sua patogenia.

Resultados: Em pequeno aumento, identificam-se dois aspectos distintos na colônia: uma área compactada e outra área filamentosa. O exame da área filamentosa demonstra hifas aderidas por fina substância reticular. Um achado recorrente é a aderência entre os filamentos fúngicos dispostos em paralelo. Em grande aumento, o aspecto microfibrilar aderindo às hifas entre si fica bem evidente. O exame da área compactada mostra hifas embebidas na matriz reticular formando um biofilme; a colônia fica bem aderida. Com grande aumento, pode-se observar que as hifas ficam dentro dessa matriz fibrilar, que tem o mesmo aspecto da substância filamentosa que adere as hifas entre si.

Limitações do estudo: Apenas uma cepa foi examinada.

Conclusões: A formação de biofilme contendo estruturas fúngicas e substância extracelular reticulada é importante na patogênese de *Piedra nigra*.

© 2024 Sociedade Brasileira de Dermatologia. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introdução

Piedra nigra é afecção bem conhecida;¹ junto com *pedra alba*, forma o grupo de duas afecções semelhantes, também denominadas tricomicoses² ou ectotricomicoses,³ nas quais se formam nódulos nas hastas pilares, escuros e claros, respectivamente, sem envolvimento epidérmico.

A *pedra alba* é afecção consequente da colonização de algumas espécies do gênero *Trichosporon*, como *Trichosporon cutaneum*, *Trichosporon ovoides* e *Trichosporon inkin*. Ela ocorre nos pelos da barba, axila e púbis (os cabelos são

DOI referente ao artigo:

<https://doi.org/10.1016/j.abd.2023.12.005>

☆ Como citar este artigo: Almeida Junior HL, Assis TM, Faria EC, Costa LRK, Ibaldo BM. *Piedraia hortae*: biofilm formation and its importance in the pathogenesis of *pedra nigra* (black piedra). An Bras Dermatol. 2024;99. <https://doi.org/10.1016/j.abd.2023.12.005>

☆☆ Trabalho realizado na Universidade Católica de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

* Autor para correspondência.

E-mail: hiramalmeidajr@hotmail.com (H.L. Almeida Junior).

2666-2752/© 2024 Sociedade Brasileira de Dermatologia. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

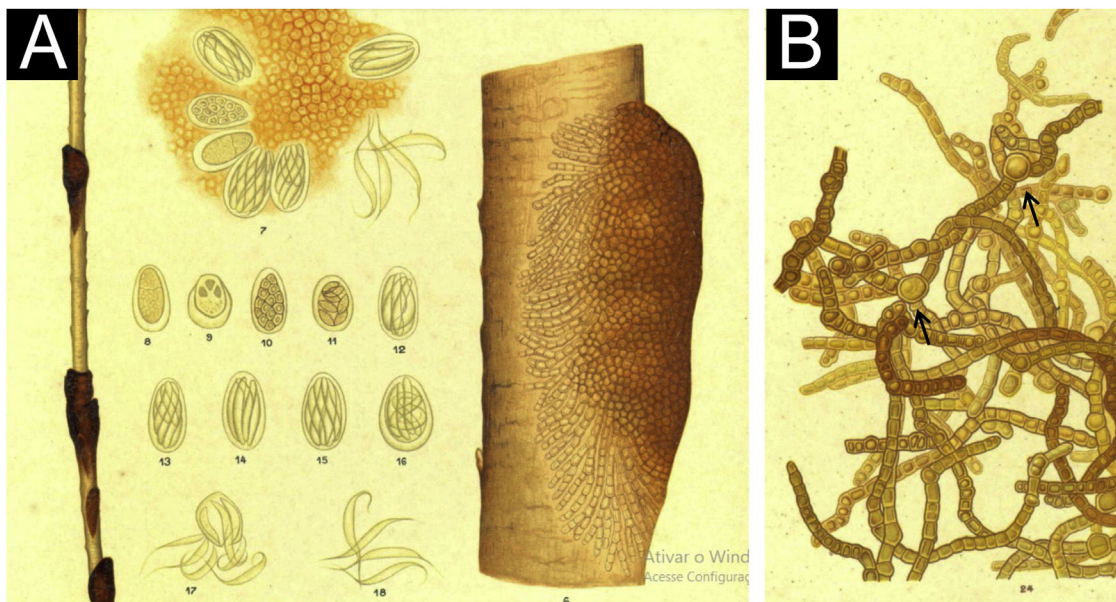


Figura 1 Desenhos da publicação original de 1911. (A) Nódulos escuros na haste pilar e a formação de ascósporos (8 a 18). (B) Aspecto microscópico do agente etiológico com hifas, as quais apresentam dilatações (setas).

menos acometidos), variando de branco a castanho-claro. O gênero *Trichosporon* engloba fungos filamentosos que podem formar biofilmes complexos.

Historicamente, *pedra nigra* foi descrita por Paulo Horta,⁴ o qual discutiu na publicação original a *pedra nostras* da Europa e a *pedra colombica* da América do Sul, ambas causadas por fungos não pigmentados, também chamadas de tricomicose nodular ou tricosporia, pois já se cunhara o gênero *Trichosporum* (na grafia da época).

Nessa publicação, Horta descreveu os casos de dois estudantes do sexo masculino,⁴ jovens, oriundos da Bahia, cujo aspecto clínico era diferente; os nódulos eram escuros (fig. 1A), e as colônias fúngicas eram obtidas a partir desses nódulos. Morfologicamente, o exame do agente mostrava também diferenças, sem as formações de estruturas cocoides leveduriformes descritas com o agente da *pedra alba*. Além de pigmento, as hifas mostravam dilatações (fig. 1B), clamidósporos, bem como ascósporos (observados dentro de uma estrutura sacular) em vários estágios evolutivos (fig. 1A).

A *pedra nigra* é endêmica na América do Sul.⁵⁻⁷ Algumas populações indígenas chegam a ter prevalência de 50%; também há casos descritos na Ásia.^{8,9} *Piedra nigra* afeta comumente o couro cabeludo.

Examinamos com microscopia eletrônica de varredura (MEV), com microscópio Jeol, JSM - 6610LV no Centro de Microscopia da Região Sul (CEME-SUL), da Universidade Federal do Rio Grande, uma colônia de *Piedraia hortae* obtida da micoteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, linhagem 499, com objetivo de descrever sua ultraestrutura.

Resultados

A colônia tem o típico aspecto enegrecido (fig. 2A). O exame de microcultura com microscopia óptica evidenciou as hifas

com as típicas dilatações (fig. 2B). Ascósporos (fig. 2C) também foram visualizados na microscopia óptica, estrutura semelhante ao desenho 10 da figura 1A.

No exame a fresco com hidróxido de potássio, chama a atenção que parte das colônias não se dissolvem, formando grumos amarronzados, os quais são difíceis de focar e examinar pela espessura (fig. 2B).

Com a microscopia eletrônica de varredura em pequenos aumentos, foram identificados dois aspectos distintos da colônia: uma área compactada e uma área filamentosa (fig. 3).

O exame da área filamentosa evidenciou dilatações nas hifas, como vistas na microscopia óptica (fig. 4). O exame detalhado das hifas demonstrou também que elas se encontram aderidas por fina substância reticular (fig. 5). Um achado recorrente é a aderência entre os filamentos fúngicos, com paralelização dos filamentos (fig. 6). Em grandes aumentos, o aspecto microfibrilar aderindo as hifas entre si fica bem evidente (figs. 7 e 8).

O exame da área compactada mostra as hifas embebidas na matriz reticular formando biofilme (fig. 9), ficando a colônia bem aderida. Com grandes aumentos, pode-se observar que as hifas ficam dentro dessa matriz fibrilar (fig. 10), que tem o mesmo aspecto da matriz extracelular que adere as hifas entre si na área filamentosa.

Discussão

Não encontramos relatos de exame ultraestrutural de colônias de *P. hortae*; apenas relatos dos nódulos da afecção foram encontrados. Nesses relatos, é referida substância extracelular cimentante,^{10,11} formadora dos nódulos na haste pilar, juntamente com as hifas e esporos.

Nossos achados demonstram que as estruturas fúngicas produzem substância secretada para o meio extracelular, de aspecto microfibrilar, a qual adere as hifas entre si,

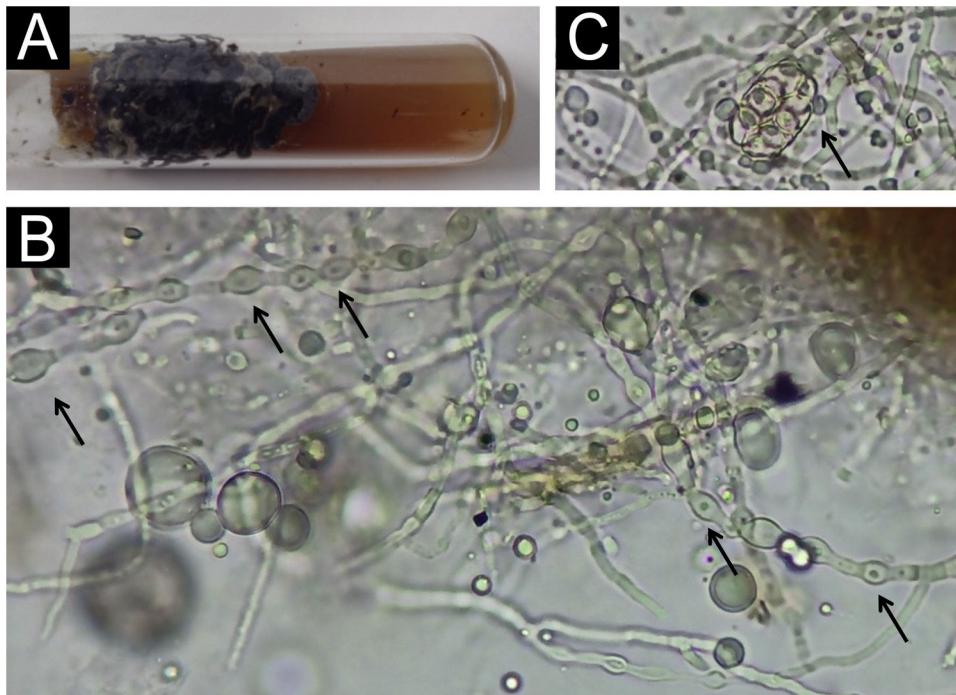


Figura 2 (A) Aspecto enegrecido da colônia. (B) Microscopia óptica - hifas com dilatações (setas); no canto superior direito, observa-se área acastanhada da colônia, que não foi dissolvida. (C) Microscopia óptica - ascósporo inicial (seta).

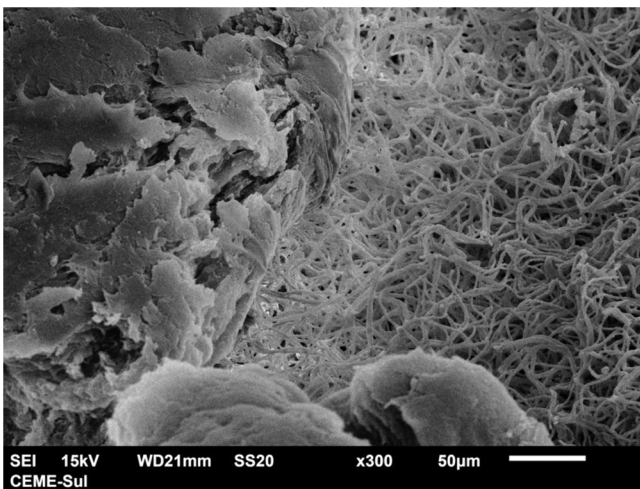


Figura 3 MEV - pequeno aumento com visão geral da colônia com área filamentososa à direita e área compactada à esquerda (300 ×).

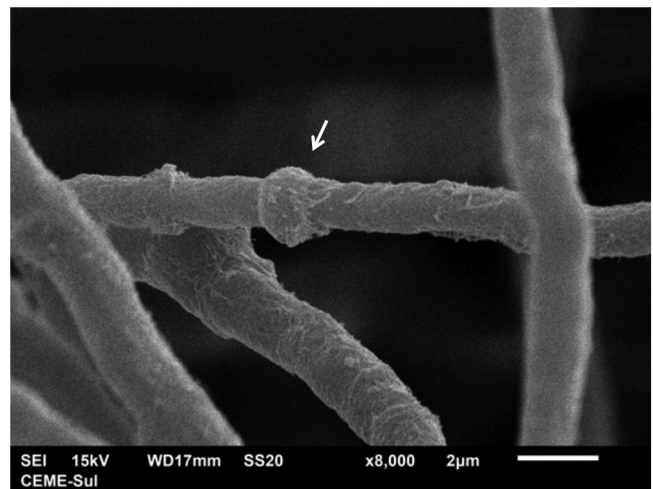


Figura 4 MEV - detalhe de uma dilatação em uma hifa (seta), semelhante às vistas na microscopia óptica (8.000 ×).

e em algumas áreas da colônia (talvez mais antigas) provoca grande compactação, embebendo essas estruturas, formando um biofilme. Não encontramos ascósporos, pois essa técnica examina a superfície da amostra, e os ascósporos são encontrados no interior da colônia ou nódulo da pedra.¹¹

Essa rede fibrilar é o que deve dar resistência e configuração aos nódulos de *pedra*, tornando possível sua ocorrência no ambiente, em parte hostil, das hastes pilares. É possível também que aja como fator de aderência ao cabelo na disseminação da doença. No exame direto com

microscopia óptica, corroborando com essa formação de estruturas resistentes, tem-se certa dificuldade em dissolver as colônias, que aparecem como grumos acastanhados.

O termo biofilme foi utilizado primeiramente na década de 1970, apesar de observação antiga pelos microbiologistas. É definido como matriz extracelular polimérica com os agentes etiológicos embebidos, tendo função de proteção contra radiação ultravioleta, temperaturas e pH extremos, salinidade e pressão nocivas às bactérias; além disso, podem estar envolvidos na resistência a antibióticos.¹² Os biofilmes podem ser formados por polissacarídeos, proteínas ou gorduras.¹² Com a técnica de análise morfológica utilizada

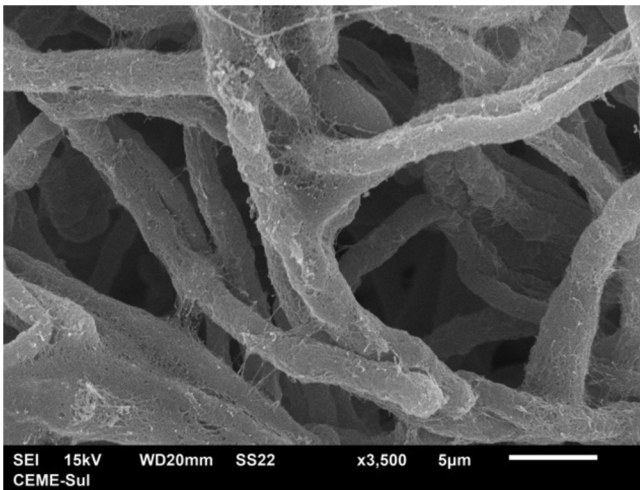


Figura 5 MEV - hifas recobertas com matriz extracelular microfibrilar ($3.500\times$).

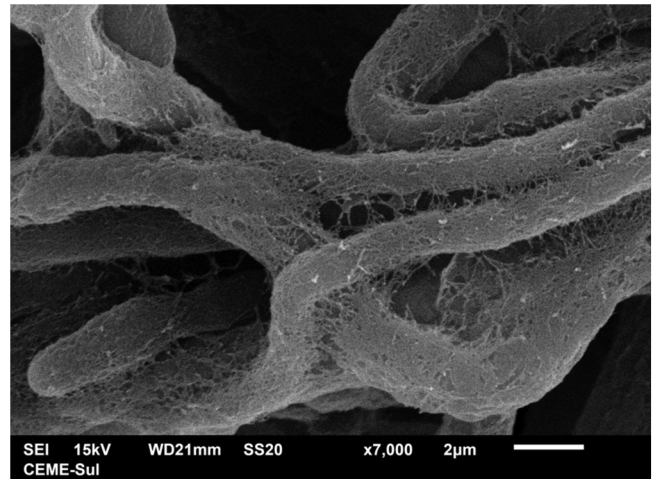


Figura 7 MEV - grande aumento, demonstrando em detalhe a aderência entre as hifas pela matriz reticular ($7.000\times$).

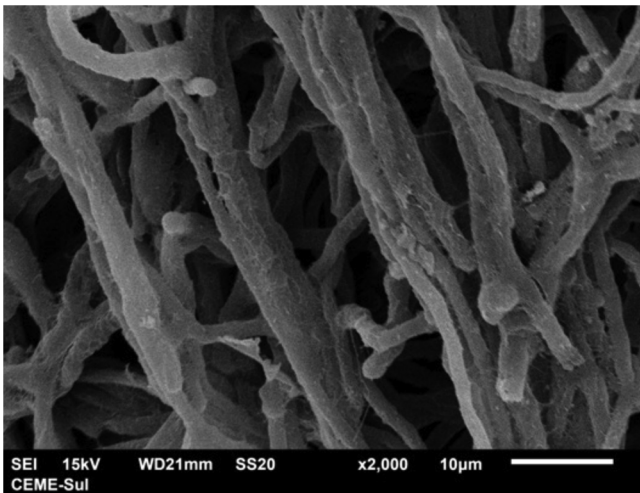


Figura 6 MEV - hifas aderidas e paralelizadas ($2.000\times$ e $4.500\times$).

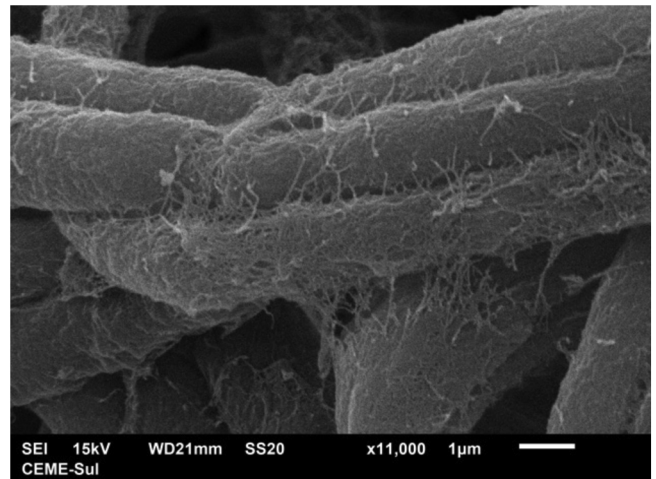


Figura 8 MEV - grande aumento com detalhe da aderência e paralelização das hifas ($11.000\times$).

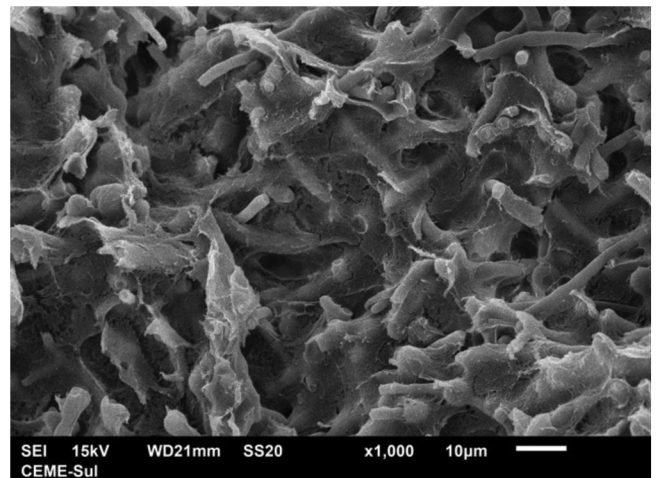
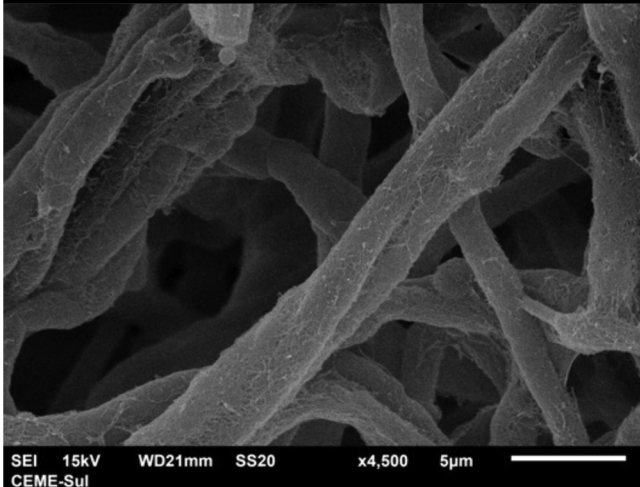


Figura 9 MEV - pequeno aumento da área compactada, demonstrando as estruturas fúngicas embebidas em densa matriz extracelular ($1.000\times$).

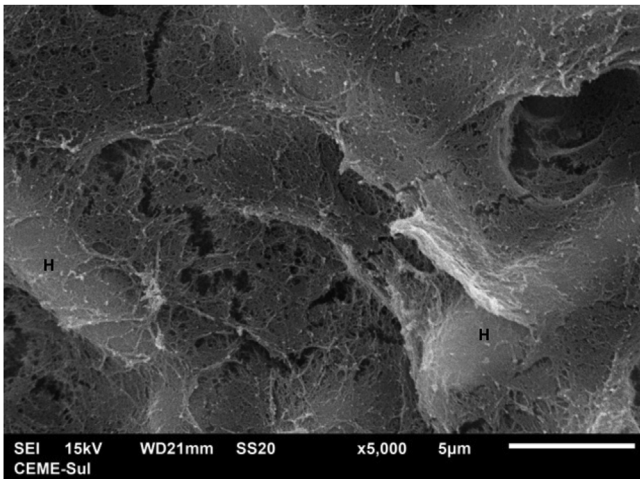


Figura 10 MEV – grande aumento da área compacta, demonstrando as hifas (H) embebidas em matriz microfibrilar (5.000 ×).

neste estudo, não é possível afirmar a composição da matriz documentada.

Fungos também podem produzir biofilmes, já demonstrado em espécies que causam onicomicose, como *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*.^{13,14} Em uma publicação, leve aderência entre as hifas foi descrita com MEV de colônias de *Trichophyton mentagrophytes*, achado bem mais discreto que o aqui relatado de *P. hortae*.¹⁵

Com relação às *pedras*, a formação de biofilmes já foi descrita em várias espécies de *Trichosporon*,^{16,17} e variação interespecies foi encontrada, podendo-se classificá-las em produtoras de biofilmes fracas ou fortes. É possível que cepas com baixa produção de biofilmes não causem *pedra alba*.

Os achados ultraestruturais da colônia de *P. hortae* demonstram que a formação de biofilme pela matriz extracelular secretada pelas hifas possa ser importante na patogênese da *pedra nigra*.

Suporte financeiro

Nenhum.

Contribuição dos autores

Hiram Larangeira de Almeida Jr.: Aprovação da versão final do manuscrito; concepção e planejamento do estudo; elaboração e redação do manuscrito; obtenção, análise e interpretação dos dados; participação efetiva na orientação da pesquisa; participação intelectual em conduta propedêutica e/ou terapêutica de casos estudados; revisão crítica da literatura; revisão crítica do manuscrito.

Thales de Moura Assis: Aprovação da versão final do manuscrito; concepção e planejamento do estudo; elaboração e redação do manuscrito; obtenção, análise e interpretação dos dados; participação intelectual em conduta propedêutica e/ou terapêutica de casos estudados; revisão crítica da literatura; revisão crítica do manuscrito.

Eduardo Camargo Faria: Aprovação da versão final do manuscrito; concepção e planejamento do estudo; elaboração e redação do manuscrito; obtenção, análise e interpretação dos dados; participação intelectual em conduta propedêutica e/ou terapêutica de casos estudados; revisão crítica da literatura; revisão crítica do manuscrito.

Luiz Roberto Kramer Costa: Aprovação da versão final do manuscrito; concepção e planejamento do estudo; elaboração e redação do manuscrito; obtenção, análise e interpretação dos dados; participação intelectual em conduta propedêutica e/ou terapêutica de casos estudados; revisão crítica da literatura; revisão crítica do manuscrito.

Berenice Marques Ibaldo: Aprovação da versão final do manuscrito; concepção e planejamento do estudo; elaboração e redação do manuscrito; obtenção, análise e interpretação dos dados; participação intelectual em conduta propedêutica e/ou terapêutica de casos estudados; revisão crítica da literatura; revisão crítica do manuscrito.

Conflito de interesses

Nenhum.

Agradecimentos

Agradecemos à micoteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - LIM53 e à Viviane Mazo Fávero Gimenes, pelo fornecimento da colônia de *Piedraia hortae*.

Referências

- Diniz LM, De Souza Filho JB. Estudo de 15 casos de pedra branca observados na Grande Vitória (Espírito Santo - Brasil) durante cinco anos. *An Bras Dermatol*. 2005;80:49–52.
- Sentamilselvi G, Janaki C, Murugusundram S. Trichomycoses. *Int J Trichology*. 2009;1:100–7.
- Almeida HL Jr, Rivitti EA. Micoses da haste do pêlo. *Med Cut ILA*. 1996;24:47–50.
- Horta P. Sobre uma nova forma de Piedra. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1911;3:86–107.
- Coimbra Júnior CE, Santos RV. Black piedra among the Zoró Indians from Amazônia (Brazil). *Mycopathologia*. 1989;107:57–60.
- Bechelli LM, Haddad N, Pimenta WP, Pagnano PM, Melchior E Jr, Fregnan RC, et al. Epidemiological survey of skin diseases in schoolchildren living in the Purus Valley (Acre State, Amazonia Brazil). *Dermatologica*. 1981;163:78–93.
- Piquero-Casals J, Sesto-Casals D, Savino-Asprino JS, Rozas-Muñoz E, Mir-Bonafé JF, Morgado-Carrasco D. Black Piedra in an Amerindian girl with Oculocutaneous Albinism type 2. *Dermatol Pract Concept*. 2023;13:e2023165.
- Pavithran K. Black Piedra affecting grey hairs. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 1988;54:318.
- Adam BA, Soo-Hoo TS, Chong KC. Black piedra in West Malaysia. *Australas J Dermatol*. 1977;18:45–7.
- Castro RM, Jaeger RG, Talhari S, de Araújo NS. Black piedra: the study of its etiological agent using scanning electron microscopy. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1987;29:251–2.
- de Almeida Júnior HL, Salebian A, Rivitti EA. Ultrastructure of black piedra. *Mycoses*. 1991;34:447–51.
- Yin W, Wang Y, Liu L, He J. Biofilms: the microbial "Protective clothing" in extreme environments. *Int J Mol Sci*. 2019;20:3423.
- Gupta AK, Foley KA. Evidence for biofilms in onychomycosis. *G Ital Dermatol Venereol*. 2019;154:50–5.

14. Costa-Orlandi CB, Sardi JC, Santos CT, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJ. In vitro characterization of *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* biofilms. *Biofouling*. 2014;30:719–27.
15. Chen B, Sun Y, Zhang J, Chen R, Zhong X, Wu X, et al. *In vitro* evaluation of photodynamic effects against biofilms of dermatophytes involved in onychomycosis. *Front Microbiol*. 2019;10:1228.
16. Iturrieta-González IA, Padovan AC, Bizerra FC, Hahn RC, Colombo AL. Multiple species of *Trichosporon* produce biofilms highly resistant to triazoles and amphotericin B. *PLoS One*. 2014;9:e109553.
17. Wongsuk T, Boonsilp S, Pumeesat P, Homkaew A, Sangsri T, Chongtrakool P. Genotyping, antifungal susceptibility testing, and biofilm formation of *Trichosporon* spp. isolated from urine samples in a University Hospital in Bangkok, Thailand. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2022;69:247–57.