

John Verrinder Veasey ^{a,b,*},
Renata Diniz Jacques Gonçalves ^c,
Guilherme Camargo Julio Valinoto ^b,
Gustavo de Sá Menezes Carvalho ^b,
Giovanna Azevedo Celestrino ^d,
Ana Paula Carvalho Reis ^d,
Ana Paula Cordeiro Lima ^e,
Antonio Charlys da Costa ^f,
Marcia de Souza Carvalho Melhem ^d,
Gil Benard ^d e Maria Gloria Teixeira Sousa ^d

^a Clínica de Dermatologia, Hospital da Santa Casa de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

^b Disciplina de Dermatologia, Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

^c Clínica Privada, Piracicaba, Brasil

^d Laboratório de Micologia Médica, Divisão de Dermatologia Clínica, Instituto de Medicina Tropical, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

^e Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

^f Laboratório de Virologia, Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

* Autor para correspondência.

E-mail: johnvveasey@gmail.com (J.V. Veasey).

Recebido em 29 de novembro de 2024; aceito em 15 de janeiro de 2025

<https://doi.org/10.1016/j.abdp.2025.02.001>

2666-2752/ © 2025 Publicado por Elsevier España, S.L.U. em nome de Sociedade Brasileira de Dermatologia. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Caracterização *in vitro* de biofilme produzido por *Fusarium oxysporum*, um agente de onicomicose^{☆☆}

Prezado Editor,

Onicomicose causada por fungos não dermatófitos, como *Fusarium* spp., é mais prevalente do que se pensava anteriormente, especialmente em climas mais quentes.¹ Além disso, a onicomicose tem sido atualmente atribuída a fungos que se organizam em forma de biofilme.² O biofilme é uma comunidade microbiana complexa, altamente aderida à unha e cercada por matriz que fornece proteção e resistência antifúngica.^{2,3}

O grupo de pesquisa dos autores tem estudado o gênero *Fusarium* spp. como agente de onicomicose em hospedeiros imunocompetentes. Foi relatada sua alta prevalência na região estudada, e foram estabelecidos critérios clínicos e laboratoriais para esse gênero como agente causal de onicomicose, determinando o perfil de suscetibilidade aos antifúngicos sistêmicos mais comumente usados no Brasil.⁴ Posteriormente, os autores provaram que *Fusarium* spp. usa a queratina ungueal como fonte única de nutrientes,⁵ e foram iniciados estudos sobre a etiopatogenia da onicomicose causada por *Fusarium* com base em modelo *ex vivo* usando fragmentos de unha humana estéril.³

Mais recentemente, foi relatado pelos autores, pela primeira vez, que *Fusarium oxysporum* é capaz de formar biofilme na unha humana como única fonte nutricional.^{6,7} Também foi descrita molécula orgânica volátil 2-etil-1-hexanol (2EH) como componente de *quorum sensing* capaz de modular tal biofilme.⁸ Essas descobertas foram relevantes para confirmar a etiopatogenia da onicomicose por *Fusarium*. Entretanto, não revelaram as características próprias do biofilme formado sob suporte nutricional. Assim, o presente estudo teve como objetivo caracterizar a formação de biofilme *in vitro* de

F. oxysporum, avaliando sua capacidade natural, durante sete dias, com disponibilidade controlada de nutrientes.

Este estudo foi conduzido com *F. oxysporum* CMRP2925 isolado de um caso de onicomicose descrito anteriormente.⁴ O isolado foi reativado para confirmar sua pureza e identificação, antes dos ensaios, e foi cultivado em meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA; DifcoTM, MI, EUA) por sete dias a 25°C. Os biofilmes foram preparados de acordo com Galletti et al.,⁹ com algumas modificações. Suspensão contendo 1×10^7 conídios mL⁻¹ foi preparada em meio RPMI 1640 (Gibco, NY, EUA), com L-glutamina, bicarbonato de sódio, ácido 3-(N-morfolino)propanossulfônico 0,165 M (pH 7,2) e glicose a 2%. Essa suspensão foi colocada em placas de microtitulação de fundo plano de 96 poços e incubada a 35°C em agitador a 110 rev min⁻¹, por sete dias. A cada 24 horas, o meio de cultura era renovado removendo 100 µL do líquido antigo e adicionando o mesmo volume de RPMI fresco. Durante os sete dias, os biofilmes foram avaliados sob diferentes aspectos, como descrito anteriormente.^{6,9} Resumidamente, a viabilidade celular foi avaliada pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), quantificação da biomassa total por violeta cristal, atividade metabólica pelo ensaio de redução do sal de tetrazólio, 2,3-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-([fenilamino]carbonil)-2H hidróxido de tetrazólio (XTT), caracterização da matriz extracelular (MEC) e observação da estrutura do biofilme por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

No geral, as características do biofilme foram semelhantes, traçando paralelo entre maior suporte nutricional com RPMI e apenas tecido ungueal.⁶ Em ambas as situações, foi possível mostrar que o terceiro e quarto dias foram críticos. Em meio rico e pH neutro, o número de UFC permaneceu constante em todos os momentos (fig. 1A), desde o primeiro dia, com aumento da atividade metabólica no terceiro dia, estabilizando-se a partir desse momento. Perfil semelhante foi encontrado para proteínas e ácidos nucleicos. Curiosamente, os polissacarídeos foram significativamente consumidos até o terceiro dia, continuando a declinar gradualmente até o sétimo dia. Por outro lado, utilizando tecido ungueal como fonte nutricional, observou-se aumento de UFC até o terceiro dia, alta atividade metabólica apenas no quarto dia, enquanto o aumento de proteínas e carboidratos ocorreu tardiamente, corroborando os resultados dos ácidos nucleicos.⁶ Essas diferenças podem ser atribuídas à disponibilidade de nutrientes, com renovação diária do meio RPMI (alimento à vontade), e ao fato de que no tecido ungueal (alimento restrito), o próprio fungo necessitou de período de adaptação.

Além disso, foi observado aumento progressivo na quantidade de biomassa (fig. 1B) entre o primeiro e o terceiro dias, seguido de estabilidade, o que parece estar associado ao consumo de polissacarídeos (fig. 2), componente fundamental durante o desenvolvimento

DOI do artigo original: <https://doi.org/10.1016/j.abdp.2024.11.005>

[☆] Como citar este artigo: Barros ILE, Veiga FF, Estivalet Svidzinski TI. *In vitro* characterization of biofilm produced by *Fusarium oxysporum*, an onychomycosis agent. An Bras Dermatol. 2025;100:560–3.

^{☆☆} Trabalho realizado na Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil.

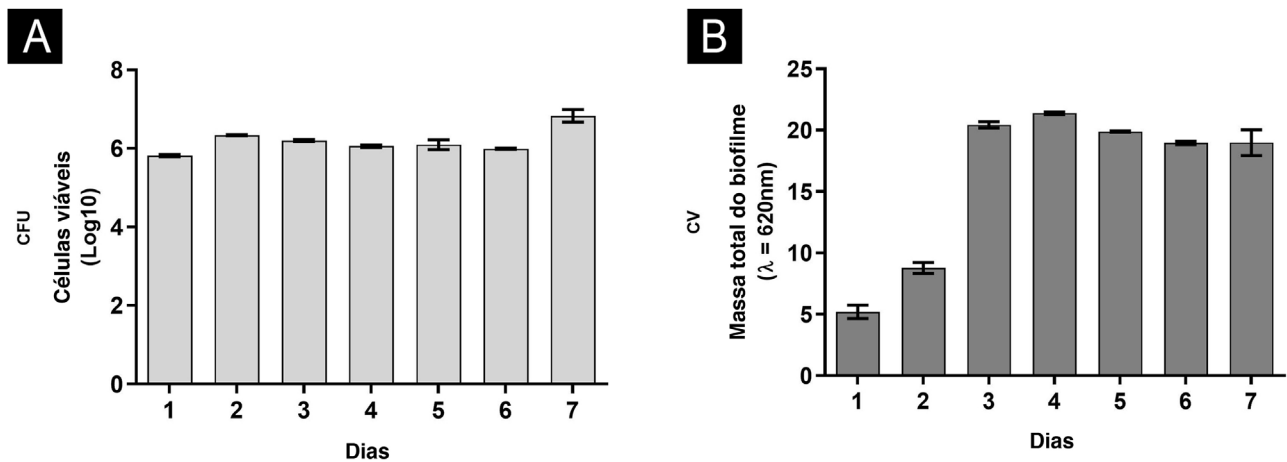


Figura 1 Caracterização do biofilme produzido por *Fusarium oxysporum* em placas de poliestireno de fundo plano de um a sete dias, em meio RPMI. (A) Número de células viáveis pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). (B) Massa total do biofilme pela coloração cristal violeta (CV).

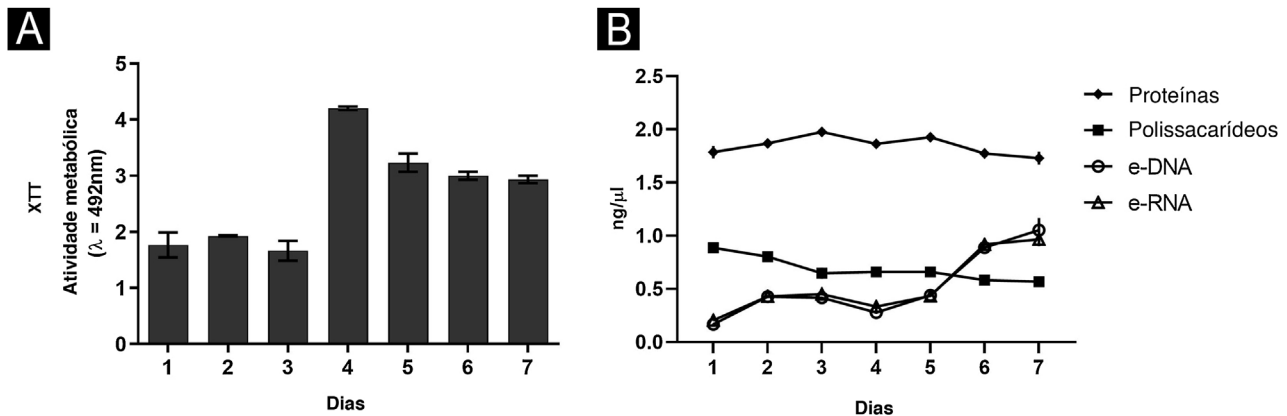


Figura 2 Caracterização do biofilme produzido por *Fusarium oxysporum* em placas de poliestireno de fundo plano de um a sete dias, em meio RPMI. (A) Atividade metabólica por redução de XTT. (B) Quantificação da matriz extracelular (MEC): proteínas, polissacarídeos, DNA e RNA extracelular.

e manutenção do biofilme. Levando-se em consideração que as UFC permaneceram estáveis, esse aumento foi atribuído à grande produção de MEC, em ambiente rico. O aumento da atividade metabólica (fig. 2) reflete-se na síntese de proteínas e ácidos nucleicos, principalmente eRNA. A produção de proteínas parece ser crucial no processo de formação do biofilme e suporte de todo o sistema.^{6,10} Essa ideia é reforçada pelos altos níveis de XTT e eDNA, a partir do quarto dia, uma vez que esse ácido nucleico é necessário em atividades que demandam energia celular, como a construção de um biofilme maduro.¹⁰ A estrutura do biofilme começou pela formação de monocamada celular e, em sete dias, foi observada estrutura tridimensional altamente complexa (figs. 3A e B).

Assim, é lógico supor que a capacidade do *F. oxysporum* de produzir biofilme seja intrínseca. O suporte nutricional parece apenas facilitar as primeiras horas de sua formação, além de favorecer a produção de maior quantidade de componentes bioquímicos associados à maturação e estabilidade do biofilme. Portanto, a presente experiência chama a atenção para as habilidades naturais desse fungo, antes restritas ao interesse ambiental, agrícola e animal. Provavelmente, a seleção natural induzida por pesticidas facilitou sua adaptação aos tecidos humanos. Os autores conseguiram mostrar que seu potencial de virulência (aqui a eficiência na produção de biofilme) é mantido independentemente da adição de suporte nutricional. Esse comportamento, portanto, permite considerar o gênero *Fusarium* spp. patógeno primário de interesse em Dermatologia.

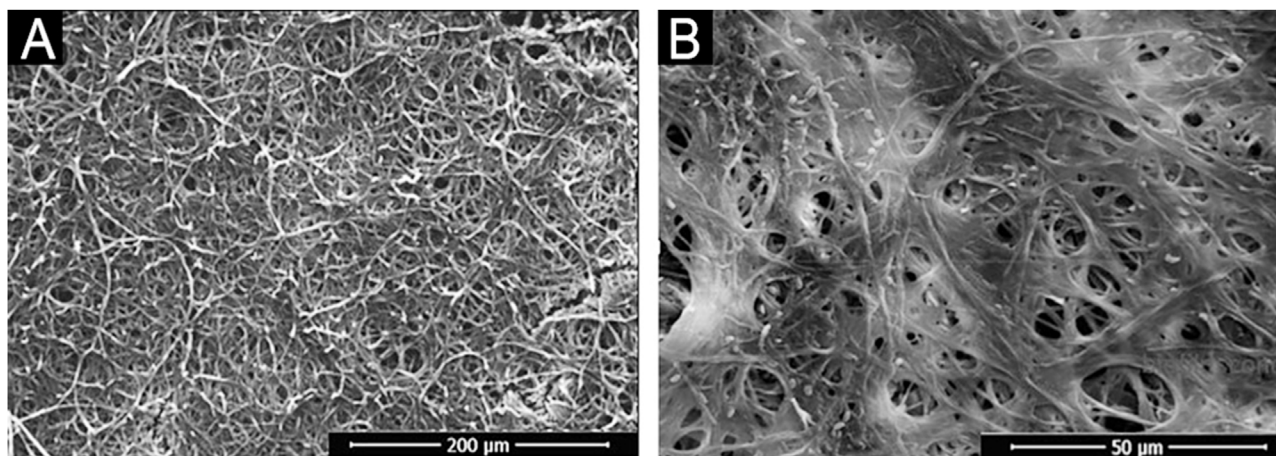


Figura 3 Ilustração de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da estrutura do biofilme de *Fusarium oxysporum* de quatro dias. (A) Detalhe da organização estrutural do biofilme, o entrelaçamento e a compactação das hifas (500×). (B) Maior aumento, mostrando a matriz extracelular produzida (2.000×).

Suporte financeiro

Este trabalho recebeu suporte financeiro parcial da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) (Código Financeiro 001, por meio de bolsa concedida a ILEB); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil (Processo número 3128262023-0 concedido a TIES) e INCT-CERBC, 2022, Processo número 406645/2022-1.

Contribuição dos autores

Terezinha Inez Estivalet Svidzinski: Concepção e planejamento do estudo; planejamento e revisão dos experimentos.

Isabella Letícia Esteves Barros: Concepção e planejamento do estudo e planejamento dos experimentos; realização dos experimentos e análise dos dados; elaboração e redação do manuscrito.

Flávia Franco Veiga: Realização dos experimentos e análise dos dados.

Conflito de interesses

Nenhum.

Referências

- Gupta AK, Stec N, Summerbell RC, Shear NH, Piguet V, Tosti A, et al. Onychomycosis: a review. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2020;34:1972–90.
- Gupta AK, Daigle D, Carviel JL. The role of biofilms in onychomycosis. *J Am Acad Dermatol*. 2016;74:1241–6.
- Veiga FF, de Castro-Hoshino LV, Sato F, Bombassaro A, Vicente VA, Mendes V, et al. *Fusarium oxysporum* is an onychomycosis etiopathogenic agent. *Future Microbiol*. 2018;13:1745–56.
- Guilhermetti E, Takahachi G, Shinobu CS, Svidzinski TI. *Fusarium* spp. as agents of onychomycosis in immunocompetent hosts. *Int J Dermatol*. 2007;46:822–6.
- Galletti J, Negri M, Grassi FL, Kioshima-Cotica ÉS, Svidzinski TI. *Fusarium* spp. is able to grow and invade healthy human nails as a single source of nutrients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34:1767–72.
- Veiga FF, de Castro-Hoshino LV, Sato F, Baesso ML, Silva S, Negri M, et al. Characterization of a biofilm formed by *Fusarium oxysporum* on the human nails. *Int J Dermatol*. 2022;61:191–8.
- Veiga FF, de Castro-Hoshino LV, Rezende PST, Baesso ML, Svidzinski TIE. Insights on the etiopathogenesis of onychomycosis by dermatophyte, yeast and non-dermatophyte mould in ex vivo model. *Exp Dermatol*. 2022;31:1810–4.
- Veiga FF, Marcomini EK, Salvador A, Chiavelli LUR, Barros ILE, de Castro LV, et al. Detection of 2-ethyl-1-hexanol and its modulating effect in biofilm of *Fusarium oxysporum*. *Mol Microbiol*. 2024;122:630–42.
- Galletti J, Tobaldini-Valerio FK, Silva S, Kioshima ÉS, Trierveiler-Pereira L, Bruschi M, et al. Antibiofilm activity of propolis extract on *Fusarium* species from onychomycosis. *Future Microbiol*. 2017;12:1311–21.
- Karygianni L, Ren Z, Koo H, Thurnheer T. Biofilm matrixome: extracellular components in structured microbial communities. *Trends Microbiol*. 2020;28:668–81.

Isabella Letícia Esteves Barros  ^{a,b},

Flávia Franco Veiga  ^{a,b}

e Terezinha Inez Estivalet Svidzinski  ^{a,b,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil

^b Laboratório de Micologia Médica, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil

* Autor para correspondência.

E-mails: tiesvidzinski@uem.br,

terezinha.svidzinski@gmail.com (T.I. Estivalet Svidzinski).

Recebido em 17 de outubro de 2024; aceito em 6 de novembro de 2024

<https://doi.org/10.1016/j.abdp.2025.04.011>

2666-2752/ © 2025 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/>).

Infecção tuberculosa latente em pacientes com psoríase em uso de imunobiológicos: estudo observacional^{☆,☆☆}



Prezado Editor,

Os imunobiológicos são terapia cada vez mais importante no contexto das doenças inflamatórias, principalmente na dermatologia, com inúmeros medicamentos aprovados.^{1,2} Entretanto, o uso desses agentes está associado a efeitos imunossupressores e, consequentemente, aumenta o risco de reativação de infecções latentes, como a tuberculose (TB).²

Diretrizes recentes recomendam a realização de triagem para TB antes do início do tratamento com qualquer agente imunobiológico, utilizando o teste tuberculínico (TT) ou o ensaio de liberação de interferon-gama (IGRA, do inglês *interferon-gamma release assay*), e deve ser repetido anualmente em pacientes de alto risco. Nos pacientes que não são considerados de alto risco, essa triagem é particularmente importante para aqueles que recebem agentes anti-fator de necrose tumoral (TNF).³ Apesar da recomendação, isso não é feito com frequência na prática. O objetivo do presente estudo foi avaliar a prevalência de infecção por TB (avaliada por TT) em pacientes recebendo terapia imunobiológica para psoríase.

Este estudo foi realizado no Hospital Regional de Presidente Prudente, SP, Brasil, e foi iniciado após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Oeste Paulista (Protocolo: 65581122.0.0000.5515 – 18 de dezembro de 2023); apenas aqueles que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido foram incluídos. Foram incluídos pacientes com 18 anos ou mais, com diagnóstico de psoríase, que estavam em uso de imunobiológicos há pelo menos seis meses e que haviam realizado TT antes do início do tratamento. Foram excluídos pacientes com doenças imunossupressoras ou histórico de TB.

O resultado do TT foi considerado negativo quando não houve formação de induração ou se esta foi <5 mm. A presença de induração com diâmetro ≥ 5 mm quando o TT anterior foi 0 ou um aumento de 10 mm ou mais em relação ao valor do TT anterior, quando positivo, foi considerado indicativo de resultado positivo. Esses valores foram utilizados com base nas diretrizes do Ministério da Saúde do Brasil.^{4,5} Embora o IGRA seja um teste com maior especificidade no diagnóstico da infecção latente por tuberculose

(ILTB), ele tem alto custo e atualmente está disponível no Brasil pelo Sistema Único de Saúde (SUS) apenas para algumas condições selecionadas.⁶

Foram avaliados 85 pacientes com psoríase. Os imunobiológicos utilizados foram agentes anti-interleucina (IL) (77,6%), com 25 pacientes em uso de ustekinumabe, 30 em uso de secukinumabe e 11 em uso de risankizumabe, e agentes anti-TNF (22,4%), com 18 pacientes em uso de adalimumabe e um paciente em uso de etanercepte. Em 46 pacientes (63%) houve uso concomitante de metotrexato. A [tabela 1](#) apresenta as características demográficas e clínicas dos pacientes com psoríase. A [tabela 2](#) apresenta os dados sobre as características dos pacientes com resultados positivos para o segundo TT. Não foram observadas associações estatisticamente significantes para nenhuma das características avaliadas.

O segundo TT foi positivo, com diagnóstico de ILTB em 10 pacientes (11,7%), dos quais nove usavam um agente anti-IL (cinco secukinumabe, três ustekinumabe e um risankizumabe) e apenas um paciente usava um agente anti-TNF (adalimumabe). Apesar de a maior prevalência de ILTB ser observada em pacientes em uso de anti-ILs, não houve significância estatística, provavelmente porque a grande maioria dos pacientes incluídos no estudo estava em uso de anti-ILs. Esse resultado é semelhante ao observado em outro estudo também realizado no Brasil com pacientes reumatológicos em uso de anti-TNF, no qual o TT tornou-se positivo em 12,3% dos pacientes.⁷

Entre os 10 pacientes que apresentaram resultado positivo no segundo TT, oito apresentaram resultado negativo no primeiro TT, sugerindo que eles podem ter adquirido a infecção durante o uso de imunobiológicos. Isso provavelmente se deve ao fato de que a região onde o estudo foi realizado apresenta alta taxa de prevalência de TB. Entre os nove pacientes positivos que usaram anti-ILs, quatro já haviam usado um agente anti-TNF (um infliximabe e três adalimumabe), o que torna impossível inferir qual medicamento foi responsável pela positividade ou se isso ocorreu em virtude da soma dos efeitos das duas terapias. É importante enfatizar que nenhum dos pacientes desenvolveu TB ativa.

O TT tem certas limitações e pode apresentar resultados falso-positivos em virtude da vacinação com BCG e da exposição a micobactérias não tuberculosas. Os efeitos da vacinação com BCG nos resultados do TT são menores após 15 anos. Portanto, um teste fortemente positivo, com induração ≥ 15 mm, tem maior chance de indicar infecção tuberculosa do que ser observado em decorrência da vacina.⁸ Como a vacina BCG no Brasil é administrada no primeiro ano de vida e os pacientes incluídos neste estudo tinham mais de 18 anos, a positividade observada no TT deve ser entendida como infecção tuberculosa latente real. Além disso, a maioria dos pacientes apresentou resultados > 15 mm, o que também reforça que a positividade do teste foi decorrente de infecção real. Resultados falso-negativos também podem ocorrer em virtude de problemas com o reagente, a administração ou interpretação imprecisa do teste ou ainda anergia tuberculínica em crianças e pacientes imunocomprometidos, incluindo aqueles que usaram metotrexato.⁵ Entretanto, essas possibilidades foram consideradas remotas, pois os kits PPD foram utilizados dentro do prazo de validade e mantidos em ambiente adequado, o teste foi realizado por profissional treinado e a única causa

DOI do artigo original: <https://doi.org/10.1016/j.abd.2024.09.011>

[☆] Como citar este artigo: Angeluci MB, Abreu MAMM, Lemos ACCE, Roncada EVM, Saito CK, Barbosa FP. Latent tuberculosis infection in patients with psoriasis using immunobiologicals: an observational study. An Bras Dermatol. 2025;100:563–5.

^{☆☆} Trabalho realizado no Departamento de Dermatologia, Hospital Regional de Presidente Prudente, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, SP, Brasil.