UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA

DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Biofilmes monoespécie e mistos de *Trichophyton* e *Staphylococcus*: influência de nutrientes e presença de células *persisters*

JENYFFIE ARAUJO BELIZARIO

Orientadora: Prof.ª Dra. Maria José Soares Mendes Giannini

Coorientadora: Prof.ª Dra. Regina Helena Pires

Araraquara

2023

JENYFFIE ARAUJO BELIZARIO

Biofilmes monoespécie e mistos de *Trichophyton* e *Staphylococcus*: influência de nutrientes e presença de células *persisters*

Dissertação apresentada ao Programa de Pos-Graduação em Biociências e Biotecnologias Aplicadas a Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof Dra. Maria José Soares Mendes Giannini Coorientadora: Prof. Dra. Regina Helena Pires

Araraquara, SP

2023

Belizario, Jenyffie Araujo.
B431b Biofilmes monoespécie e mistos de *Trichophyton* e *Staphylococcus*: influência de nutrientes e presença de células persisters / Jenyffie Araujo Belizario. – Araraquara: [S.n.], 2023.
113 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de pesquisa: Micologia.

Orientadora: Maria José Soares Mendes Giannini.
Coorientadora: Regina Helena Pires.

1. Dermatófito. 2. Bactéria. 3. Biofilme misto. 4. *T. rubrum*. 5. Interação microbiana. 6. Células persistentes. I. Giannini, Maria José Soares Mendes, orient. II. Pires, Regina Helena, coorient. III. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Biofilmes monoespécie e mistos de Thichophyton e Staphylococcus: influência de nutrientes e formação de celulas persisters.

AUTORA: JENYFFIE ARAUJO BELIZARIO
ORIENTADORA: MARIA JOSÉ SOARES MENDES GIANNINI
COORIENTADORA: REGINA HELENA PIRES GONÇALVES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências, área de conhecimento: Micologia pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARIA JOSÉ SOARES MENDES GIANNINI (Participaçao Virtual)
Departamento de Analises Clinicas / Faculdade de Ciencias Farmaceuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Profa. Dra. MÁRCIA DE SOUZA CARVALHO MELHEM (Participaçao Virtual)
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. SANDRO ROGÉRIO DE ALMEIDA (Participaçao Virtual)
Departamento de de Análises Clínicas e Toxicológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Araraquara, 28 de abril de 2023

“Se olhe, se valorize e se permita errar. Se dê de presente a chance de pelo menos tentar. Se o “se” for bem usado, o impossível sonhado pode se realizar.” - Braúlio Bessa.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Ivanete e Douglas e às minhas irmãs Steffanie e Daffinie. Muito obrigada por terem acreditado no meu "se" e me ajudado a realizar.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por ter me dado a chance de concretizar mais um desafio em minha vida, por ter me dado chão e fé nos momentos mais difíceis e por ter me mostrado que os Seus propósitos são maiores que os meus. Obrigada Mãe Aparecida, por ter me acalmado e acalentado com o Teu Manto Sagrado. Gratidão por tudo que deu errado e me permitiu evoluir.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – código de financiamento 88887.600613/2021-00.

Agradeço á Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) – processo nº 2021/ 03805-6 pela concessão da minha bolsa de Mestrado.

Ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia (CAPES 7), por todo aprendizado e estímulo oferecido que auxiliaram na minha formação.

A minha orientadora Profa. Dra. Maria José S. M. Giannini por ter me aceito como aluna, por abrir as portas do seu laboratório e sempre estar disposta e me ajudar no que fosse preciso. Agradeço imensamente por ter me ajudado a superar minhas dificuldades com paciência e compreensão, além de ter me desafiado a ser uma profissional melhor. Levarei para sempre os ensinamentos e a referência de pesquisadora exemplar que a senhora é.

A minha coorientadora, Prof. Dra. Regina Helena Pires, por ter me supervisionado desde a graduação com o TCC e me oferecido a oportunidade de tentar a bolsa de Mestrado em uns dos programas mais bem conceituados do país. Você me desafiou e confiou no meu potencial desde o início. Te agradeço imensamente por tudo, pelos áudios e discussões no WhatsApp, mesmo distante fisicamente, as suas orientações foram essenciais na minha trajetória.

A Prof. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida, por coordenar junto com a Prof. Maria José todos os alunos do Núcleo de Proteômica e me acolher como “aluna postiça”, me apoiando e mostrando caminhos que auxiliaram na minha formação por todos esses anos.

A todos do laboratório de Micologia que estiveram comigo desde o início, desde quando eu achava que não daria conta de tudo e que nunca deixaram de estender a mão. Carol Barcelos, Niura Bila, Carol Vaso, Rô e a nossa vizinha Marisa Polesi, vocês foram mais do que colegas de laboratório, foram minhas amigas, parceiras e conselheiras. Muito obrigada por todo o aprendizado, discussões, conversas, cafés, risadas e choros, eu nunca deixarei de dedicar grande parte da minha formação durante esses anos a vocês. Se não estivessem ali eu não seria quem eu sou hoje. “Quem tem amigo tem tudo”, que bom que eu tive vocês.

A todos do laboratório de Proteômica por terem compartilhado conhecimento e boas risadas em todas as reuniões de laboratório. Em especial, Matheus, Ligia, Ana Karla, Will, Kelvin, Samanta, Angélica, Kaila, Ana Carolina, Thiago, Fernando, Claudinha e Paulo, vocês também fazem parte do meu desenvolvimento profissional. Muito obrigada. Estendo também os agradecimentos à Laís e a Margani que estiveram presente no laboratório no período final do meu mestrado. Obrigada pela parceria e colaboração com os animais alternativos.

Ao meu namorado (Gabriel) por ter me aguentado durante esse período (guerreiro). Te agradeço por todo apoio, paciência, ombro amigo e por horas e horas de desabafos por ligação. Você me incentiva a ser uma pessoa melhor a cada dia. Muito obrigada, meu bem.

As minhas avós (Luzia e Iracema), muito obrigada por me sustentarem em orações. Minha admiração, respeito e amor por vocês é eterno.

Por último, mas não menos importante, a minha família, mãe (Ivanete), pai (Douglas), irmãs (Steffanie e Daffinie), sobrinhas (Luísa e Helena), sobrinho (Heitor) e cunhados (Caio e Dayvison). Sem vocês eu não teria a educação, caráter e a sabedoria que tenho hoje. Muito obrigada por terem me dado apoio e segurança desde os meus 14 anos quando sai de casa. Sempre busquei o melhor, mesmo que isso me custasse ficar longe de casa. Nunca tive medo porque sabia que vocês estariam ali para me ajudar caso fosse preciso e me receber de braços abertos em todos os finais de semana de visita. As frases ditas pelo meu pai “Estuda para ser alguém na vida” e “Nunca dependa de ninguém” levei sempre comigo e foram combustível para muitos momentos de fraqueza. Obrigada, família. Eu amo vocês!

RESUMO

Dermatófitos são fungos causadores de dermatofitose, doença fúngica que afeta os tecidos queratinizados e, a associação de fungos dermatófitos com bactérias tende a provocar um quadro infeccioso exacerbado e de difícil tratamento. Ambos os microrganismos podem formar biofilmes e a disponibilidade de nutrientes pode influenciar a capacidade de adesão e a arquitetura destes. Além disso, a resistência microbiológica e clínica dos dermatófitos pode estar associada não apenas à formação de biofilmes, mas também à presença de células persistentes (células *persisters*), as quais poderiam contribuir para o surgimento de infecções recalcitrantes, crônicas. Neste cenário, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a formação de biofilme misto entre *Trichophyton rubrum* e *Staphylococcus aureus* ou *Staphylococcus epidermidis* em diferentes meios de cultura. Adicionalmente, foi avaliada a presença de células persistentes nos biofilmes monoespécie. Os biofilmes foram formados em diferentes tempos de incubação, meios de cultura e quantificados pelas metodologias do cristal violeta (biomassa), atividade metabólica (redução do sal de tetrazólio) e por metodologia de plaqueamento em ágar (unidades formadoras de colônia). Estes foram fotodocumentados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia confocal de varredura a laser (CLSM). A determinação da presença de células persistentes foi realizada por ensaio de UFC após exposição à antimicrobianos. As comunidades sésseis apresentaram maior produção de biomassa e de células metabolicamente ativas em meio *Brain Heart Infusion* (BHI) comparativamente ao *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640) e caldo Muller-Hinton (MHI). Ambas as espécies bacterianas, quando combinadas com *T. rubrum*, foram capazes de formar biofilmes maduros em 72h nos três meios de cultura avaliados; no entanto, diferenças foram observadas entre as populações. A maior quantidade de biomassa e atividade metabólica foi presenciada quando o inóculo bacteriano foi adicionado ao biofilme fúngico nos tempos finais de formação. O ensaio de UFC mostrou que o desenvolvimento de *T. rubrum*, nos biofilmes mistos, foi dependente do tempo de adição da bactéria ao biofilme fúngico em formação e, a falta de pré-adesão do dermatófito prejudicou diretamente na evolução do biofilme. As eletromicrografias dos biofilmes monoespécie de *T. rubrum* mostraram uma extensa rede de hifas robustas e entrelaçadas, enquanto uma vasta quantidade de cocos aglomerados foi observada nos biofilmes de *Staphylococcus* spp. Quando combinados, o predomínio de *T. rubrum* ou *Staphylococcus* spp. foi dependente da condição de interação, sendo que as comunidades bacterianas prevaleceram nos tempos iniciais, não sendo possível observar de forma confiável a presença de estruturas do dermatófito; já nos tempos finais, a comunidade fúngica mostrou-se dominante no biofilme. Dados de CLSM mostraram que o biofilme de *T. rubrum* apresentou uma espessura de 363 μm, com hifas septadas, entrelaçadas e bem desenvolvidas enquanto os biofilmes de *S. aureus* (177 μm) e *S. epidermidis* (178 μm), demonstraram ampla quantidade de cocos por toda extensão do campo. Nos biofilmes mistos, as espessuras dos biofilmes nas condições de interação finais assemelharam-se ao biofilme monoespécie de *T. rubrum*, especialmente quando associado à *S. epidermidis* (369 μm). Nos tempos iniciais, no entanto, constatou-se escassas hifas com formas e tamanhos irregulares. O estudo da presença de células persistentes nos biofilmes sugeriu que a falha terapêutica com antibióticos em infecções crônicas pode estar relacionada a presença da subpopulação e que desempenha um papel significativo na tolerância do biofilme, sendo necessário selecionar antimicrobianos eficazes e em concentrações não tóxicas para garantir o sucesso no tratamento destas infecções. O conhecimento da interação entre *T. rubrum* e espécies de estafilococos bem como a avaliação da presença de células persistentes em biofilmes de *T. rubrum* são inéditos e podem contribuir para o avanço do conhecimento da resposta imunológica do hospedeiro, da resistência aos antimicrobianos e progressão da doença, além de subsidiar novos alvos terapêuticos.

Palavras-chave: dermatófito, bactéria, biofilme misto, *T. rubrum*, interação microbiana, células persistentes.

ABSTRACT

Dermatophytes are fungi that cause dermatophytosis, a fungal disease that affects keratinized tissues, and the association of dermatophyte fungi with bacteria tends to cause an exacerbated infectious condition that is difficult to treat. Both microorganisms can form biofilms, and the availability of nutrients can influence their adhesion capacity and architecture. Furthermore, dermatophytes' microbiological and clinical resistance may be associated not only with the biofilm formation but also with the persistent cells (persister cells) presence, which could contribute to the emergence of chronic, recalcitrant infections. In this scenario, the study objective was to characterize the formation of a mixed biofilm between *Trichophyton rubrum* and *Staphylococcus aureus* or *Staphylococcus epidermidis* in different culture media. The presence of persistent cells in these biofilms alone will also be evaluated. Biofilms were formed at different incubation times and culture media and quantified by crystal violet (biomass) and metabolic activity (tetrazolium salt reduction) methodologies. Colony Forming Units (CFU) were determined by agar plating methodology. Biofilms were also photo-documented by scanning electron microscopy (SEM) and confocal laser scanning microscopy (CLSM). The presence of persistent cells was determined by UFC test after exposure to antimicrobials. Microbial communities showed higher production of biomass and metabolically active cells in *Brain Heart Infusion* (BHI) medium compared to *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640) and Muller-Hinton Broth (MHI). Both bacterial species, when combined with *T. rubrum*, were able to form mature biofilms in 72h in the three tested media; however, differences between populations were observed. A more significant amount of biomass and metabolic activity was observed when the bacterial inoculum was added to the fungal biofilm in the final stages of formation. The CFU assay showed that the *T. rubrum* development in mixed biofilms was dependent on the time of addition of the bacteria to the fungal biofilm in formation, and the lack of pre-adhesion directly affected the evolution of the fungus in the biofilm. Electron micrographs of monospecies biofilms of *T. rubrum* showed a coordinated network of robust and intertwined hyphae, while in biofilms of *Staphylococcus* spp., a vast number of agglomerated cocci was observed. When combined, the predominance of *T. rubrum* or *Staphylococcus* spp. depended on the interaction conditions, with bacterial communities prevailing in the early stages, and hyphae was not observed. On the contrary, the fungal community dominated the biofilm in the final stages. CLSM data showed that the *T. rubrum* biofilm had a thickness of 363 μm, with septate, intertwined and well developed, while the biofilms of *S. aureus* (177 μm) and *S. epidermidis* (178 μm) showed an ample number of cocci throughout the field. The thicknesses of the mixed biofilms, under the final interaction conditions, were similar to the *T. rubrum* monospecies biofilm, mainly when associated with *S. epidermidis* (369 μm). However, few hyphae with irregular shapes and sizes were observed in the initial stages. The study of the presence of persistent cells in biofilms suggested that antibiotic therapeutic failure in chronic infections may be related to the presence of this subpopulation and plays a significant role in biofilm tolerance. The selection of effective antimicrobials in non-toxic concentrations is necessary to ensure success in these infections. Knowledge of the interaction between *T. rubrum* and Staphylococcal species and the assessment of persistent cells in these biofilms are unpublished and may contribute to advancing knowledge of the host immune response, antimicrobial resistance, and disease progression, in addition to subsidizing new therapeutic targets.

Keywords: dermatophyte, bacteria, mixed biofilm, *T. rubrum*, microbial interaction, persisters cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação dos seis estágios do desenvolvimento de biofilme de fungos filamentosos conforme proposto por Harding et al. (2009): (I) adsorção, (II) adesão ativa, (III) formação de microcolônias e/ou desenvolvimento de monocamada, (IV) desenvolvimento micelial (V) biofilme maduro e (VI) dispersão de conídios. 28

Figura 2 – Representação esquemática dos estágios do desenvolvimento do biofilme estafilocócico conforme proposto por Michael Otto (2018): (I) fixação inicial, (II) maturação e (III) dispersão.....34

Figura 3 - Quantificação de biomassa pelo ensaio de cristal violeta (CV) e leitura da absorbância a 570 nm dos biofilmes monoespécie de T. rubrum ATCC 28189 (A), S. aureus ATCC 25923 (B) e S. epidermidis ATCC 12228 (C), formados em RPMI-1640, BHI e MHI em diferentes tempos de incubação (24h, 48h, 72h) Significância estatística (* $p < 0,05$ comparação entre RPMI e MHI), (** $p < 0,01$ comparação entre RPMI e MHI) e (*** $p < 0,001$ comparação entre BHI vs MHI e RPMI)..56

Figura 4 - Quantificação de biomassa pelo ensaio de cristal violeta (CV) dos biofilmes mistos constituídos por *T. rubrum* + *S. aureus* em RPMI-1640 (A), *T. rubrum* + *S. aureus* em BHI (B), *T. rubrum* + *S. aureus* em MHI (C) nas diferentes condições testadas de acordo com o esquema 1 (0h, 4h, 24h e 48h) com um tempo total de incubação de 72h. Significâncias estatísticas (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$) foram apontadas. 60

Figura 5 - Quantificação de biomassa pelo ensaio de cristal violeta (CV) dos biofilmes mistos de *T. rubrum* + *S. epidermidis* em RPMI-1640 (A), *T. rubrum* + *S. epidermidis* em BHI (B), *T. rubrum* + *S. epidermidis* em MHI (C) nas diferentes condições testadas de acordo com o esquema 1 (0h, 4h, 24h e 48h) com um tempo total de incubação de 72h. Significância estatística (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$) foram apontadas. 61

Figura 6 - Caracterização da atividade metabólica pelo ensaio de redução do XTT e leitura da absorbância a 490 nm dos biofilmes monoespécie de *T. rubrum* ATCC 28189 (A), *S. aureus* ATCC 25923 (B) e *S. epidermidis* ATCC 12228 (C), formados em RPMI-1640, BHI e MHI em diferentes tempos de incubação (24h, 48h e 72h). Significância estatística (** $p < 0,01$ comparação entre BHI vs RPMI e MHI) e (*** $p < 0,001$ comparação entre BHI e RPMI vs MHI). 65

Figura 7 - Caracterização da atividade metabólica pelo ensaio de redução do XTT dos biofilmes mistos de *T. rubrum* + *S. aureus* em RPMI-1640 (A), T. rubrum + S. aureus em BHI (B), *T. rubrum* + *S. aureus* em MHI (C), nas diferentes condições testadas (0h, 4h, 24h e 48h) com um tempo total de incubação de 72h. Significância estatística (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$) foram apontadas. 67

Figura 8 - Caracterização da atividade metabólica pelo ensaio de redução do XTT dos biofilmes mistos de *T. rubrum* + *S. epidermidis* em RPMI-1640 (A), T. rubrum + S. epidermidis em BHI (B), *T. rubrum* + *S. epidermidis* em MHI (C) das diferentes condições testadas (0h, 4h, 24h e 48h) com um tempo total de incubação de 72h. Significância estatística (* p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001) foram apontadas.....68
Figura 9 - Eletromicrografias dos biofilmes monoespécie de *T. rubrum* ATCC 28189 (**a,b**) e *S. aureus* ATCC 25923 (**c,d**) e biofilmes mistos de *T. rubrum* + *S. aureus* quando adicionados simultaneamente (0h) (**e,f**) e quando formado com a adição das suspensões de *S. aureus* após a pré-adesão (4h) do biofilme de *T. rubrum* **(g,h)**. Todos os biofilmes foram analisados com um tempo total de 72h de incubação. As setas brancas indicam as estruturas na forma de cocos de *S. aureus*. Ampliação de 1000x (primeira linha) e 3000x (segunda linha).....70
Figura 10 - Eletromicrografias dos biofilmes monoespécie de *T. rubrum* ATCC 28189 (**a,b**) e *S. epidermidis* ATCC 12228 (**c,d**) e biofilmes mistos de *T. rubrum* + *S. epidermidis* quando adicionados simultaneamente (0h) (**e,f**) e quando formado com a adição das suspensões de *S. epidermidis* após a pré-adesão do biofilme de *T. rubrum* (4h) **(g,h).** Todos os biofilmes foram analisados com um tempo total de 72h de incubação. As setas brancas indicam as estruturas na forma de cocos de *S. epidermidis.* Ampliação de 1000x (primeira linha) e 3000x (segunda linha). 70
Figura 11 - Eletromicrografias dos biofilmes monoespécie de *T. rubrum* ATCC 28189 (a,b) e *S. aureus* ATCC 25923 (c, d) e biofilmes mistos de *T. rubrum* + *S. aureus* formados após 24h (e, f) e 48h (g, h), de maturação do biofilme de T. rubrum. Todos os biofilmes foram analisados com um tempo total de 72h de incubação. As setas brancas indicam as estruturas na forma de cocos de *S. aureus* e as setas vermelhas indicam as hifas de *T. rubrum.* Ampliação de 1000x (primeira linha) e 3000x (segunda linha). 72
Figura 12 - Eletromicrografias dos biofilmes monoespécie de *T. rubrum* ATCC 28189 **(a, b)** e *S. epidermidis* ATCC 12228 **(c, d)** e biofilmes mistos de *T. rubrum* + *S. epidermidis* formados após 24h **(e, f)** e 48h **(g, h),** de maturação de *T. rubrum*. Todos os biofilmes foram analisados com um tempo total de 72h de incubação. As setas brancas indicam as estruturas na forma de cocos de *S. epidermidis* e as setas vermelhas indicam as hifas de *T. rubrum.* Ampliação de 1000x (primeira linha) e 3000x (segunda linha).....72
Figura 13 - Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL) de *T. rubrum* isoladas em ágar Mycosel de biofilmes de dupla espécie entre *T. rubrum* + *S. aureus* (**A**) e *T. rubrum* + *S. epidermidis* (**B**) comparados com biofilme monoespécie de *T. rubrum* (controle). Todos os biofilmes formados nas diferentes condições propostas (0h, 4h, 24h e 48h) tiveram um tempo total de incubação de 72h. Significância estatística (* p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001) foi apontada.....76

Figura 14 - Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL) de *S. aureus* e *S. epidermidis* isoladas em ágar Manitol de biofilmes de dupla espécie entre *S. aureus* + *T. rubrum* (**A**) e *S. epidermidis* + *T. rubrum* (**B**) comparados com biofilme monoespécie de *S. aureus* e *S. epidermidis* (controle) formados nas diferentes condições propostas (0h, 4h, 24h e 48h) com um tempo total de 72h de incubação. Significância estatística (* p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001). 77
Figura 15 - Imagens de microscopia confocal de varredura a laser dos biofilmes monoespécie de *T. rubrum* ATCC 28189 **(A),** *S. aureus* ATCC 25923 **(B)** e *S. epidermidis* ATCC 12228 **(C)**. Todos os biofilmes foram analisados com um tempo total de 72h de incubação. O dermatófito foi corado com o calcoflúor White (azul) e as bactérias com Syto9 (verde). 79
Figura 16 - Imagens de microscopia confocal de varredura a laser dos biofilmes mistos de *T. rubrum* + *S. aureus* (**A, B, C e D**) em todas as condições de formação propostas (0h, 4h, 24h e 48h). Todos os biofilmes foram analisados com um tempo total de 72h de incubação. O biofilme misto foi corado com Calcofluor White e Syto9.....79
Figura 17 - Imagens de microscopia confocal de varredura a laser dos biofilmes mistos de *T. rubrum* + *S. epidermidis* (**A, B, C e D**) em todas as condições de formação propostas (0h, 4h, 24h e 48h). Todos os biofilmes foram analisados com um tempo total de 72h de incubação. O biofilme misto foi corado com Calcofluor White e Syto9.....80
Figura 18 - Avaliação do efeito da anfotericina B, terbinafina e vancomicina nas células planctônicas de *C. albicans* ATCC 90028 (**A**), *T. rubrum* ATCC 28189 (**B**), *S. aureus* ATCC 25923 (**C**) e *S. epidermidis* ATCC 12228 (**D**) mensurado pelo método de redução de XTT (* p< 0,05; ** p<0,01; ***p<0,001).....74
Figura 19 - Log10 das Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL) da análise populacional de células persistentes em biofilmes de *S. aureus* ATCC 25923 (**A**) e *S. epidermidis* ATCC 12228 (**B**) após a exposição transitória à vancomicina em doses crescentes.....75
Figura 20 - Log10 das Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL) da análise populacional de células persistentes em biofilmes de *C. albicans* ATCC 90028 (**A**) e *T. rubrum* ATCC 28189 (**B**) após a exposição transitória à anfotericina B e terbinafina em doses crescentes.....76

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC – *American Type Culture Collection*

CP- Controle positivo

BHI – *Brain Heart Infusion*

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CLSM - Microscopia confocal de varredura a laser

CP- Controle positivo

h – Horas

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MHI - *Mueller-Hinton Broth*

NaCl – Cloreto de sódio

RPMI-1640 – *Roswell Park Memorial Institute*

UFC – Unidades formadoras de colônia

μg – Microgramas

μL – Microlitros

mL – mililitros

XTT - (2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -5-[carbonilo(fenilamino)]-2H-tetrazólio-hidróxido)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 15
1.1. Dermatófitos 17
1.1.1 Aspectos Históricos e Taxonômicos 17
1.1.2 Epidemiologia e Classificação 19
1.1.3 Patogenese e Características de Virulência 23
1.2 Bactérias do gênero *Staphylococcus* 28
1.2.1 Aspectos Históricos e Taxonômicos 28
1.2.2 Epidemiologia e Classificação 29
1.2.3 Patogenese e Caracteristicas de Virulência 31
1.3 Biofilmes Polimicrobianos 34
1.4 Células Persistentes 37
JUSTIFICATIVA 41
2. OBJETIVOS 43
2.1. Objetivo geral: 43
2.2. Objetivos específicos: 43
3. METODOLOGIA 44
3.1. MICRORGANISMOS 44
3.2. FORMAÇÃO *IN VITRO* DE BIOFILMES MONOESPÉCIE 44
3.3. FORMAÇÃO *IN VITRO* DE BIOFILMES MISTOS 46
3.4. CARACTERIZAÇÃO DOS BIOFILMES 47
3.4.1 Quantificação da biomassa por ensaio de cristal violeta (CV) 47
3.4.2 Determinação da atividade metabólica do biofilme pelo ensaio de redução de XTT 48
3.4.3 Quantificação de biofilmes monoespécies e mistos por contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) em meio seletivo 49
3.4.4 Análise topográfica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) 49
3.4.5 Análise com Microscopia Confocal de Varredura a Laser (CLSM) 50
3.5. DETERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE CÉLULAS PERSISTENTES 51
3.5.1 Cepas fúngicas e bacterianas e condições de crescimento **51**
3.5.2 Preparo e diluição dos fármacos antifúngicos e antibacterianos **52**
3.5.3 Ensaio de sensibilidade das cepas fúngicas e bacterianas na forma planctônica na concentração de 1 x 10^6 cel/mL **52**
3.5.4 Determinação da presença de células persistentes pelo método de plaqueamento em ágar **53**
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA 54

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 55
5. CONCLUSÃO 89
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 91

1. INTRODUÇÃO

As dermatomicoses são infecções fúngicas que acometem a pele e/ou anexos, sendo considerada a doença dermatológica mais frequente em todo o mundo. Estima-se que sua incidência afete mais de um bilhão de pessoas, independente do sexo, raça, cor e idade (BONGOMIN *et al*., 2017; HEIDRICH *et al*., 2015). Podem ser geradas por uma variedade de fungos sendo os dermatófitos e leveduras do gênero *Candida* os mais comuns (SILVA-ROCHA *et al*., 2017; SEGAL; FRENKEL, 2015). Em alguns casos, associação com bactérias pode resultar em um quadro infeccioso de difícil tratamento e cura, especialmente em pacientes que apresentam comorbidades (SITEPU; MUIS; PUTRA, 2018; LIU *et al*., 2019; FRIEDRICH, 2013).

Um aspecto importante relacionado a patogenicidade dos dermatófitos, na interação fungo-hospedeiro, é a capacidade de formação de biofilme. Na literatura, poucos estudos relacionaram os dermatófitos e a formação de biofilmes. As comunidades sésseis apresentam uma organização altamente complexa por expressar propriedades distintas das células planctônicas e por garantir uma conformação espacial ideal que permite-lhes realizar diversas funções como nutrição, excreção, crescimento, comunicação célula-célula (*quorum-sensing*), proteção contra o hospedeiro com maior eficiência, além do aumento da virulência e resistência aos fármacos antifúngicos a partir da regulação de genes da bomba de efluxo, produção de células persistentes, dentre outros (RAMAGE *et al*., 2009; FANNING; MITCHELL, 2012; COSTA-ORLANDI *et al*., 2017; 2016).

Biofilmes polimicrobianos apresentam um papel significativo na saúde e na doença humana e, essas interações entre diferentes reinos e/ou espécies podem ser sinérgicas, neutras ou antagônicas e, podem apresentar manifestações muito mais complexas do que seria esperado em casos de infecções monomicrobianas (ARVANITIS; MYLONAKIS, 2015; GARCIA *et al*., 2020). Comunicações entre diferentes reinos fúngicos com espécies bacterianas são comuns no meio ambiente, podendo estar presentes quando parasitam os seres humanos. Além disso, podem formar biofilmes mistos,

especialmente os patógenos pertencentes ao filo *Ascomycota* que são preditivos de feridas crônicas, que duram mais do que oito semanas para curar (BURKHART; BURKHART; GUPTA, 2002; GRANILLO *et al*., 2015). Dentre as bactérias mais relevantes clinicamente, destaca-se o gênero *Staphylococcus,* pertencentes a microbiota residente dos seres humanos (KONEMANN, 2001). Estão presentes na pele, glândulas, membranas, mucosas nasais e intestinais de indivíduos saudáveis e, em condições normais, apresentam uma relação comensal com o seu hospedeiro (GOULD, 1995; LAKHUNDI *et al.*, 2018).

A pele tem sido considerada um ecossistema complexo e dinâmico, habitado por bactérias, fungos e vírus que vivem em harmonia, genericamente denominados de microbiota. É caracterizada por apresentar diversidade taxonômica, metagenômica e metabólica que varia com os locais distintos do corpo (PERCIVAL *et al*., 2012; CHU *et al.*, 2017), sendo parte integrante do sistema imune inato, formando a primeira linha de defesa contra a infecção microbiana. No entanto, podem interferir no ciclo de vida da infecção ao interagir com patógenos dependendo do estado imunológico do hospedeiro, da predisposição genética, integridade, localização da lesão e da capacidade de interação microrganismo- microrganismo (CHU *et al*., 2017; CHEN; FISCHBACH; BELKAID, 2018; GALLO, 2017). Quando há uma mudança no equilíbrio entre as defesas do organismo ou até mesmo quando há um dano na barreira do extrato córneo, as bactérias presentes na microbiota podem proliferar, alterando seu mecanismo de virulência do estado comensal para patogênico. Casos de infecções polimicrobianas por dermatófitos e bactérias presentes na microbiota, como *Staphylococcus* sp. já foram descritas na literatura (SITEPU; MUIS; PUTRA, 2018; LIU *et al*., 2019; FRIEDRICH, 2013), embora o papel que o biofilme poderia desempenhar nestas infecções concomitantes ainda não foi desvendado.

A associação entre espécies de dermatófitos e de bactérias é encontrada principalmente no desenvolvimento de infecções fúngicas superficiais que se tornam mais agressivas e com alto teor inflamatório devido à erosão e à maceração da pele como é o caso de *tinea pedis*, especialmente o tipo

interdigital, frequentemente envolvendo superinfecção bacteriana e dificultando o tratamento (SITEPU; MUIS; PUTRA, 2018; FRIEDRICH, 2013).

As manifestações clínicas nos casos de dermatofitoses apresentam alta infectividade e taxa de recorrência, o que afeta diretamente na qualidade de vida dos pacientes quando não tratada ou com tratamento impróprio podendo levar à lesões concomitantes e à infecção secundária por bactérias (LARRUSKAIN *et al*., 2005; GUPTA; DAIGLE; CARVIEL, 2016; LIU *et al.*, 2019).

O tratamento das dermatofitoses é baseado no uso de antifúngicos tópicos e sistêmicos (GUPTA; FOLEY; VERSTEEG, 2017; BILA *et al*., 2021). No entanto, alguns autores têm relacionado a formação de biofilmes tanto a resistência à terapia antifúngica (COSTA-ORLANDI *et al*., 2020; PEREIRA, 2021; SEN *et al*., 2020; ROCHA *et al*., 2022) como às altas taxas de recidivas das dermatofitoses, o que por sua vez, poderiam estar relacionadas a presença de células persistentes (WUYTS; VAN DIJCK; HOLTAPPELS, 2018; LEWIS, 2005; CONLON, 2014; FISHER *et al*., 2017), as quais exercem um importante papel em biofilmes, demandando estudos para sua comprovação.

1.1. DERMATÓFITOS

1.1.1 ASPECTOS HISTÓRICOS E TAXONÔMICOS

Dermatófitos são grupo de fungos filamentosos pertencentes à família *Arthrodermataceae*, descritos como um dos microrganismos mais antigos que causam doença em humanos (DE HOOG *et al.*, 2017; HEIDRICH *et al.*, 2015). Denominados fungos queratinolíticos, por apresentarem a capacidade de invadir, colonizar e alimentar-se de tecidos ricos em queratina como pele, pelos e unhas de homens e de animais, por meio de sistemas enzimáticos, provocando doença denominada dermatofitose, popularmente conhecida por “tinha” ou “tinea” (ACHTERMAN; WHITE, 2012; HEIDRICH *et al.,* 2015; MARAKI; MAVROMANOLAKI, 2016).

Segundo Ajello (1974), a primeira referência registrada de uma infecção por dermatófitos se deu por volta de 30 d.C., como uma lesão supurativa no couro cabeludo de um enciclopedista romano

que a descreveu como kerion de Celsus. As várias dermatófitoses da época eram conhecidas como *tinea*, termo usado para "traça de roupa", devido as lesões circulares em forma de anéis assemelhar-se aos buracos em roupas feitos por mariposas (AJELLO, 1974). Somente no século XIX foi estabelecida a etiologia micótica destas infecções a partir da observação de hifas em material clínico, marcando o início do estudo da micologia médica (AJELLO, 1974; ZHAN; LIU, 2017).

Os primeiros relatos de espécies conhecidas hoje como *Microsporum audouiniii*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. schoenleinii* e *T. tonsurans* foram descritos entre os anos de 1840 e 1875, inspirados nos estudos de Robert Remak e David Gruby (GRUBY, 1841; AJELLO, 1974). Posteriormente, com o desenvolvimento do meio de cultura ágar Sabouraud, a identificação de novas espécies de dermatófitos foi alavancada.

Emmons (1934), classificou e distinguiu com base nas características dos seus conídios, sua estrutura vegetativa e seu estado anamorfo/teleomorfo os três principais gêneros de dermatófitos - *Trichophyton*, *Microsporum e Epidermophyton*, representando um importante avanço no conhecimento das dermatofitoses e no desenvolvimento da micologia médica (EMMONS, 1934; WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; DE HOOG *et al.*, 2017). No entanto, a classificação morfológica proposta só foi considerada aceitável para fins diagnósticos quando utilizados isolados frescos, pois a rápida degeneração da cultura dificultava a identificação de características fenotípicas precisas e levava a introdução de numerosas espécies de dermatófitos erroneamente (DE HOOG *et al*., 2017; ZHAN; LIU, 2017).

A classificação taxonômica da diversidade de espécies dermatófiticas foi otimizada na década de 1980 com base na composição molecular do seu material genético (MOCHIZUKI *et al.,* 1996). Desde então, considerando o avanço das técnicas laboratoriais, principalmente as moleculares, constatou-se que os fungos dermatófitos estão em constante evolução devido à sua reprodução, adaptação ao hospedeiro, migração populacional e a condição socioeconômica da população (ZHAN; LIU, 2017). No presente, a árvore taxonômica utilizada para a família *Arthrodermataceae* foi proposta

por de Hoog et al. (2017), a qual manteve os principais gêneros de dermatófitos anteriormente propostos, *Trichophyton, Microsporum* e *Epidermophyton* e acrescentou-se mais seis gêneros: *Nannizzia, Paraphyton, Lophophyton, Arthroderma, Ctenomyces* e *Guarromyces.* Além disso, a classificação proposta por De Hoog et al. (2017) propõe a nomeação *T. interdigitale* para T. *mentagrophytes* var. *interdigitale* e seja aplicada somente para isolados antropofílicos, enquanto *T. mentagrophytes*, anteriormente *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* seja utilizada somente para isolados zoofílicos.

1.1.2 EPIDEMIOLOGIA E CLASSIFICAÇÃO

Os dermatófitos são frequentemente encontrados em países de clima tropical e subtropical e, a frequência de distribuição da doença juntamente com seus agentes etiológicos, varia de acordo com a região geográfica devido às condições de temperatura e umidade que favorecem o seu desenvolvimento (GNAT *et al*., 2021). Além disso, características individuais de cada paciente como idade, sexo, predisposição à doença, atrelado a fatores culturais e característica socioeconômica da população são fatores que contribuem na distribuição da doença (SANGUINO *et al.*, 2019; COSTA-ORLANDI *et al.*, 2017).

Nos últimos anos, numerosos relatos sobre a epidemiologia das dermatofitoses foram realizadas no mundo (DE OLIVEIRA PEREIRA *et al*., 2021; HAVLICKOVA; CZAIKA; FRIEDRICH, 2009; PETRANYUK *et al*., 2022; PETRUCELLI *et al*., 2020; SILVA-ROCHA *et al*., 2017; GNAT *et al*., 2021). Supõe-se que aproximadamente 10% a 15% da população seja infectada por um dermatófito em algum período da sua vida, podendo ser portadores sintomáticos ou assintomáticos da doença (PETRUCELLI *et al*., 2020; PIRES *et al*., 2014). Estes dados reforçam que estas enfermidades são de grande relevância para a saúde pública.

O aumento significativo das práticas de migração populacional, crescimento no turismo, atividades esportivas internacionais, mudanças nas condições socioeconômicas e do estado imunológico do hospedeiro acarretaram o avanço da infecção, no qual espécies que eram menos

comuns de ser encontradas ou restritas a uma determinada localização geográfica passaram a ser isoladas em diversas partes do mundo (CAI *et al.,* 2016; MARAKI; MAVROMANOLAKI, 2016; GNAT *et al*., 2021). Estima-se que 80 a 90% dos casos de onicomicose dos países ocidentais sejam causados por dermatófitos (GUPTA; STEC *et al*., 2019). Um levantamento epidemiológico de mais de 6.000 ocorrências de dermatomicoses no Japão, revelou que cerca de 85,2% dos casos foram causados por dermatófitos (SHIMOYAMA; SEI, 2019). No subcontinente indiano foram relatados surtos com espécies de dermatófitos que apresentaram alta virulência e suscetibilidade reduzida à medicamentos comumente aplicados (BISHNOI *et al*., 2018). Nos países do Sul da Europa, embora grande parte dos casos sejam causados por leveduras, os dermatófitos são responsáveis por 40 a 68% das infecções (GUPTA; STEC *et al*., 2019). No Brasil, dados epidemiológicos demonstraram grande incidência de infecções por dermatófitos. As principais espécies relatadas nas regiões Sul e Sudeste foram *T. rubrum*, seguido por *M. canis* e *T. mentagrophytes*, enquanto na região Nordeste, observou-se prevalência de *T. tonsurans*, *T. rubrum* e *M. canis* (TEIXERA *et al*., 2010; SILVA-ROCHA *et al*., 2017; DE ALBUQUERQUE MARANHÃO *et al*., 2019; PETRUCELLI *et al*., 2020). Clinicamente, as dermatofitoses são classificadas de acordo com os sítios infecciosos, são denominadas, respectivamente, a infecção localizada no cabelo, corpo, face, dobras da virilha, unhas, barba, mãos e pés de *Tinea capitis*, *Tinea corporis*, *Tinea faciei*, *Tinea cruris*, *Tinea unguium* (onicomicose), *Tinea barbae*, *Tinea manuum* e *Tinea pedis* também conhecido como “pé de atleta”. (ACHTERMAN *et al*., 2012; WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995). A *tinea capitis* acomete frequentemente crianças em idade escolar, enquanto as outras *tineas* são mais comuns em adultos (PETRUCELLI *et al*., 2020). A infecção é caracterizada por provocar intensa descamação e alopecias multifocais, por afetar o estrato córneo da pele e anexos, assim como a superfície das mucosas. Já as lesões da pele glabra são circulares, eritematosas e pruriginosas, consequente a ação direta ou de reações de hipersensibilidade ao fungo e/ou seus produtos metabólicos (TORRES *et al*., 2018; DALLA-LANA *et al*., 2016).

Relacionado à transmissão, as dermatofitoses são adquiridas por meio do contato direto com humanos, animais ou objetos contaminados como toalhas, escovas de cabelo, roupas e sapatos (DIAS *et al.,* 2013; DIAZ *et al.,* 2017). Os animais domésticos, especialmente cães e gatos, desempenham um papel importante na disseminação dos dermatófitos por serem uma fonte primária e direta de infecção (BERALDO *et al.,* 2011; SHEINBERG *et al.,* 2017).

De maneira geral, os dermatófitos podem ser classificados conforme seu *habitat* em antropofílicos, zoofílicos e geofílicos (AJELLO *et al*., 1962; GEORG, 1960). Os primeiros acometem principalmente o homem e raramente os animais, caracterizando-se pela transmissão de humano para humano, citando-se *Trichophyton rubrum* e *T. interdigitale* (SANGUINO *et al.,* 2019; HEIDRICH *et al*., 2015). Já espécies zoofílicas infectam principalmente os animais, mas também podem infectar o homem, especialmente crianças e adolescentes, sendo diretamente relacionadas ao contato com animais de companhia como gato, cachorro, porquinho-da-índia e ao trabalho agrícola, prevalecendo *T. mentagrophytes* e *Microsporum canis* (IVASKIENE *et al.,* 2016; MORIELLO, 2004). Por fim, os geofílicos, especialmente *M. gypseum* e *Nannizzia fulva*, são encontrados principalmente no solo, alimentando-se de queratina de pelos, penas, cascos ou outra fonte inanimada, servindo, deste modo, como fonte de infecção para o homem e animais (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; TAGHIPOUR *et al*., 2021).

Trichophyton rubrum é o microrganismo mais constantemente associado às micoses superficiais da pele e unhas, sendo responsável por mais de 80% das infecções (COSTA-ORLANDI *et al*., 2014; ZHAN; LIU, 2017; CELESTRINO *et al.,* 2019). Investigação anterior relatou que algumas cepas de *T. rubrum* possuem alto poder de disseminação em relação a outros dermatófitos, mostrando a prevalência desse microrganismo entre os demais, especialmente em casos de *tinea corporis, pedis, cruris, manuum* e onicomicose (GHANNOUM *et al*., 2013). Outra espécie antropofílica que está sendo cada vez mais comum, em algumas localizações geográficas, é *T. interdigitale*, espécie isolada de casos clínicos de *tinea corporis*, *cruris* e *pedis*, exibindo inflamações

leves e infecções crônicas, além de apresentar resistência elevada aos fármacos convencionais (SINGH *et al*., 2018; HIRUMA *et al*., 2019).

A maior aproximação do homem aos animais de companhia, especialmente cães e gatos, nos últimos anos, levou a um acréscimo no número de casos de *tinea capitis* causados por espécies zoofílicas, designadamente, *T. mentagrophytes, T. verrucosum* e *M. canis*, principalmente em crianças (RODRÍGUEZ-CERDEIRA *et al*., 2021; VEASEY *et al.*, 2017; ZHAN; LIU, 2017). Uma revisão retrospectiva de pacientes de uma clínica em Minnesota, Estados Unidos demonstrou que cerca de 81 crianças na faixa de idade de 1 – 17 anos foram identificadas como positivas para *T. violaceum* e *T. soudanense* (GRIGORYAN *et al*., 2019).

Um levantamento de dados mundiais sobre a incidência de *tinea capitis* nos últimos 20 anos demonstrou que a prevalência da infecção variou globalmente: de 0,4-87,7% na África, 0,2-74,0% na América do Norte, 0,0-91,2% na Ásia Oriental, 0,0-69,0% na Europa Oriental e 2,9-86,4% na Oceania, sendo *M. canis* o agente zoofílico mais comum e *Trichophyton violaceum* e *Trichophyton tonsurans* os agentes antropofílicos predominantes (RODRÍGUEZ-CERDEIRA *et al*., 2021). O estudo epidemiológico dePetrucelli et al. (2020), demonstrou que os principais agentes envolvidos são *T. tonsurans*, *T. violaceum*, *T. soudanense* e *M. canis*.

Dentre as doenças ungueais, cerca de 50% das infecções são causadas por dermatófitos, e o seu risco aumenta com a idade, devido aos fatores predisponentes que favorecem a condição (GUPTA; STEC *et al*., 2019). Gupta et al. (2017) ao analisar estudos epidemiológicos publicados em 2016 observaram que a prevalência global da onicomicose foi de 5,5 %, sendo *T. rubrum* o agente causal mais comum. No entanto, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* e *Epidermophyton floccosum* também são frequentemente encontrados, especialmente em homens (DALLA-LANA *et al* 2016).

A terapia antifúngica oral é a base do tratamento das dermatofitoses, embora o tratamento tópico, mecânico e químico, na tentativa do desbridamento e avulsão da unha, por exemplo, também sejam utilizados. A griseofulvina, o fluconazol, o itraconazol e, principalmente, a terbinafina são os

agentes que apresentam maior eficácia em ensaios clínicos (FINCH; WARSHA, 2007; GUPTA; COOPER, 2008; IVASKIENE *et al*., 2016; BHATIA *et al*., 2019). A terbinafina é um agente antifúngico da classe das alilaminas que interfere na síntese do ergosterol pela inibição da esqualeno epoxidase (MCCLELLAN *et al*., 1999); considerado medicamento de primeira linha para o tratamento da dermatofitose devido sua maior eficácia, moderadas taxas de recidiva e custo-efetividade em relação aos outros agentes. No entanto, casos de dermatofitose que apresentaram resistência a terbinafina já foram descritos (APPELT *et al*., 2021; YENIŞEHIRLI *et al*., 2013).

1.1.3 PATOGENESE E CARACTERÍSTICAS DE VIRULÊNCIA

Apesar dos dermatófitos serem incluídos como um dos principais e mais frequentes agentes de micoses superficiais, os mecanismos de patogenicidade na relação fungo-hospedeiro são complexos e ainda não estão bem compreendidos (SARDANA, *et al*., 2021; VERMOUT, *et al*., 2008).

Segundo Sardana et al. (2021), os principais aspectos que devem ser considerados na patogênese das infecções dermatofíticas incluem a espécie de dermatófito envolvida, a defesa inerente do organismo e a resposta imune adaptativa do hospedeiro. Diversos fatores relacionados ao hospedeiro podem propiciar o estabelecimento da dermatofitose. Contudo, os dermatófitos são capazes de exibir fatores de virulência que independem do estado imunológico do hospedeiro, sendo estes, cruciais para que ocorra uma infecção.

A virulência fúngica estabelece a adesão e invasão da pele enquanto a resposta imune do hospedeiro depende de uma interação entre os padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), dos padrões moleculares associados ao dano (DAMP) com os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que juntos, levam a uma resposta diferencial Th (T helper) 1, Th2, Th17 e Treg. As moléculas de superfície para adesão e a secreção de enzimas adesivas são capazes de degradar e metabolizar as moléculas do hospedeiro e garantem sua nutrição, tolerância térmica e dimorfismo, conforme as condições ambientais (SARDANA *et al*., 2021).

O processo de invasão dos tecidos da pele ou unha dependem inicialmente da aderência dos artroconídios à superfície queratinizada por meio de componentes da parede celular do fungo (beta glucanas, mananas e galactomananas) que permitem uma rápida adesão aos tecidos do hospedeiro e à matriz extracelular (KASPEROVA *et al*., 2013; MARTINEZ-ROSSI *et al*., 2017). Além disso, adesinas específicas de carboidrato e projeções fibrilares também têm desempenhado um importante papel durante o processo infeccioso, estando envolvidas nas mudanças na morfologia da colônia, desenvolvimento do corpo de frutificação, na interação célula-célula, na formação de biofilme, entre outros (ESQUENAZI *et al*., 2004; KAUFMAN *et al*., 2007; BITENCOURT *et al*., 2016). Para *Trichophyton* spp, as moléculas adesivas envolvidas incluem o gene sowgp e a dipeptidil-peptidase IV (DppIV) (BALDO *et al*., 2010; MONOD *et al*., 2005).

A aderência é estritamente dependente do tempo, ou seja, quanto maior o tempo de contato do fungo à superfície da pele, maiores são as chances do estabelecimento da infecção (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2017; VERMOUT *et al.,* 2008). Estudos de diferentes autores relatam que a máxima aderência de artroconídios de *Trichophyton* spp. pode variar de 3 a 6 horas (ALJABRE *et al.,* 1992; ZURITA; HAY, 1987) chegando até 12 horas para *T. mentagrophytes* (DUEK *et al*., 2004).

Após o processo de adesão, os artroconídios germinam e as hifas invadem rapidamente o estrato córneo para impedir que sejam eliminadas com a descamação celular, que ocorre dentro de 3-4 horas (SARDANA *et al*., 2021). Durante sua invasão na camada epidérmica, os dermatófitos secretam lipases, ceramidades, enzimas proteolíticas como queratinases, metaloproteases e serino proteases em resposta a componentes da matriz extracelular epidérmica, como a rede de queratina, digerindo em oligopeptídeos ou aminoácidos que servem de suprimento nutricional para o fungo (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2017; MENDEZ-TOVAR, 2010; VERMOUT *et al*., 2008).

A estrutura alvo para infecção e proliferação de dermatófitos no estrato córneo da epiderme é a citoqueratina presente na pele, cabelos e unhas a qual é degradada pela queratinase fúngica. Atividade queratolítica de *T. rubrum, T. interdigitale, M. canis e M. gypseum* foi avaliada e em temperaturas

entre 30–40°C, em meio levemente alcalino (pH: 7,0–8,0), *Trichophyton* spp. produziu elevada atividade de queratinase, o que explica a adaptação de determinadas espécies do gênero à superfície da pele humana (SHARMA *et al*., 2012).

Para entender a patogênese da dermatofitose é essencial o conhecimento dos genes e das proteínas que eles codificam (ou enzimas), visto que algumas particularidades podem não estar presentes em todos os patógenos (MARTINEZ *et al*., 2012).

Os queratinócitos são as primeiras células do hospedeiro a serem infectadas (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2017; VERMOUT *et al.*, 2008; SHIRAKI *et al*., 2006) e expressam diferentes perfis de citocinas em resposta à espécie de dermatófito envolvida. Espécies antropofílicas como *Trichophyton rubrum* e *T. interdigitale* são capazes de subverter a resposta imune via mananas, secretando interleucinas com potencial imunossupressor, induzindo a resposta inflamatória limitada e favorecendo o desenvolvimento de doença crônica. Já espécies zoofílicas ou geofílicas são mais facilmente eliminadas devido a uma resposta imune rápida sendo, geralmente, infecções agudas e com alto teor inflamatório (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2017; MENDEZ-TOVAR, 2010; VERMOUT *et al.*, 2008; SARDANA *et al*., 2021).

Portanto, ao considerar estas condições, o estado fisiológico do hospedeiro passa a ser relevante na patogênese dos dermatófitos. Em pacientes imunocomprometidos ou imunossuprimidos, as proteases secretadas pelos dermatófitos podem degradar componentes de camadas mais profundas, como a elastina da derme, levando à um quadro mais severo de infecção (KAUFMAN *et al.*, 2007).

As moléculas de detecção de quórum (QSMs) também são fatores importantes na patogenicidade, formação de biofilme e morfogênese de fungos (COSTA-ORLANDI *et al.*, 2017; PADDER; PRASAD; SHAH, 2018; WONGSUK; PUMEESAT; LUPLERTLOP, 2016). Inicialmente, o sistema QS era exclusivo de certas bactérias; no entanto, o farnesol foi descrito em *C. albicans* (HORNBY et al., 2001). As células microbianas, quando vivem juntas, precisam se comunicar umas com as outras e, para isso, alguns fungos leveduriformes e filamentosos secretam QSMs como o

farnesol, tirosol, feniletanol e triptofol que podem afetar os comportamentos celulares, como a morfogênese fúngica, desenvolvimento de biofilme, disseminação e estabelecimento de sítios distais de infecção, expressão de genes de virulência, controle da competição de nutrientes entre outros (ALEM *et al*., 2006; RAMAGE *et al.*, 2005; WONGSUK; PUMEESAT; LUPLERTLOP, 2016).

Como citado anteriormente, outro aspecto relevante associado a patogenicidade dos dermatófitos, na interação fungo-hospedeiro, é a capacidade de formação de biofilme. O fenômeno garante que a eficácia de antifúngicos envolvidos no tratamento das dermatofitoses seja diminuída e que as taxas de recaída ou reinfecção sejam elevadas (SIGURGEIRSSON *et al*., 1999; GUPTA; DAIGLE; CARVIEL, 2016; SINGH *et al*., 2018). Fato que pode estar associado à presença de células persistentes, demandando estudos para sua comprovação.

Biofilmes são comunidades de células que se aderem umas às outras, à um substrato biológico ou artificial, incorporadas a uma matriz extracelular polimérica que os próprios microrganismos produzem (DONLAN, 2002). São descritos como a principal forma de crescimento microbiano garantindo uma conformação espacial ideal para a absorção de nutrientes, excreção de metabólitos, proteção e resistência às drogas antifúngicas, comunicação célula-célula (*quórum-sensing*), além de expressarem propriedades distintas das células planctônicas e contribuírem para o desenvolvimento da infecção a partir da regulação de genes da bomba de efluxo, produção de células persistentes, dentre outros (FANNING; MITCHELL, 2012; RAMAGE *et al.,* 2012).

A matriz extracelular pode ser considerada o componente mais importante do biofilme. Os componentes da matriz incluem células microbianas, polissacarídeos, água e produtos celulares excretados (RAMAGE *et al*., 2012). Exerce a função de barreira de proteção contra células do hospedeiro, prevenindo a penetração de fármacos e contribuindo, portanto, para a resistência do biofilme, além de contribuir com as forças coesivas e adesivas na estabilidade mecânica do biofilme mantendo as células unidas e ligadas à superfície (MITCHELL *et al*., 2016) .

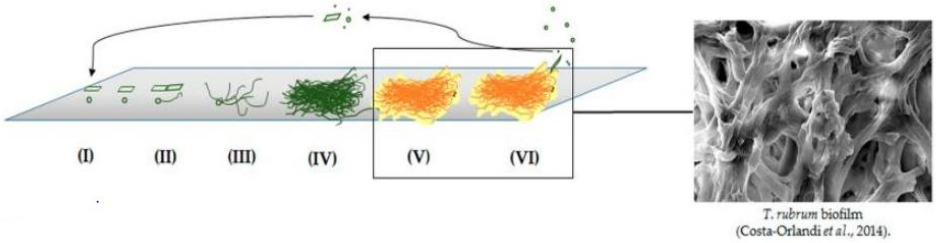
Na literatura, poucos estudos relacionam os dermatófitos e a formação de biofilmes. Esta habilidade foi descrita por Costa-Orlandi et al. (2014), que caracterizaram pela primeira vez a formação de biofilme *in vitro* por duas espécies de dermatófitos antropofílicos mais prevalentes no mundo, *T. rubrum e T. mentagrophytes* (COSTA-ORLANDI et al., 2014)(COSTA-ORLANDI et al., 2014). Porém, há mais de vinte anos esta capacidade foi hipotetizada por Burkhart; Burkhart & Gupta, (2002) que relacionaram os dermatofitomas, formados nas onicomicoses refratárias, aos biofilmes. Dessa maneira, despertou-se o interesse na investigação da formação de biofilmes por dermatófitos, inclusive por nosso grupo de pesquisa, que caracterizou a formação sob diferentes condições de cultivo, interações, fontes de nutrientes e possibilidades de tratamento (GARCIA *et al.,* 2020; BILA *et al.,* 2021).

Danielli et al. (2017), elucidaram a capacidade de formação de biofilme *in vitro* de outra espécie dermatofítica extremamente importante - *M. canis.* Posteriormente estudos mais aprofundados foram realizados por Billa (2022), mostrando que este fungo é capaz de formar biofilme maduro *in vitro* em 96 horas nos meios *Brain Herat Infusion* (BHI), F-12 *Nutrient Mixture* (HAM-F12), *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) e *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) (dados não publicados). Embora muitas cepas de dermatófitos tenham demonstrado formar biofilmes em condições experimentais e no tecido ungueal ex-vivo, sua existência nas lesões *in vivo* ainda não foram demonstradas (COSTA-ORLANDI *et al*., 2014; BRILHANTE *et al*., 2018).

O processo de formação de biofilme de fungos filamentosos envolve seis etapas: (I) adsorção de propágulos, (II) adesão ativa, (III) formação de microcolônias, (IV) maturação inicial, (V) maturação final e (VI) fase de dispersão ou planctônica (Fig. 1). Resumidamente, a partir do momento em que os esporos ou outros propágulos como fragmentos de hifas entram em contato com a superfície, as adesinas e outras estruturas reprodutivas são secretadas; há o alongamento apical e as hifas começam a se ramificar explorado o substrato e tornando-se invasivas, a partir de então inicia-se a produção de matriz extracelular que contribui para a estabilidade do biofilme mantendo as células unidas e

“coladas” à superfície. A fase em que a matriz envolve as redes de hifas e, estas tornam-se compactas, marca o início da maturação que só é completada quando os corpos de frutificação são formados. Após a maturação final do biofilme, os esporos e fragmentos de conídios e/ou hifas se desprendem e podem agir como novos propágulos e iniciar um novo ciclo (HARDING *et al*., 2009).

Figura 1 – Representação dos seis estágios do desenvolvimento de biofilme de fungos filamentosos conforme proposto por Harding et al. (2009): (I) adsorção, (II) adesão ativa, (III) formação de microcolônias e/ou desenvolvimento de monocamada, (IV) desenvolvimento micelial (V) biofilme maduro e (VI) dispersão de conídios.



Fonte: (HARDING *et al*., 2009; COSTA-ORLANDI *et al.*, 2017).

1.2 BACTÉRIAS DO GÊNERO *Staphylococcus*

1.2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS E TAXONÔMICOS

O gênero *Staphylococcus* foi identificado pela primeira vez por um cirurgião escocês Sir Alexander Ogston em 1880 em um abscesso de membro inferior, mais precisamente na articulação do joelho, como um fluído purulento repleto de microrganismos aglomerados, semelhantes à cachos de uva e os chamou de *Staphylococcus* (do grego *staphylos* “uva” e *kokkos* “baga ou semente”). A descrição do organismo se deu a partir de observações clínicas e estudos laboratoriais, onde após a injeção de pus, advindos de abscessos agudos, em cobaias e camundongos, novos abscessos se formavam, seguidos por sinais de septicemia, destacando a relevância e o papel da doença estafilocócica (OGSTON, 1881; NEWSON, 2008).

Pouco tempo depois, em 1884, o médico alemão Friedrich Julius Rosenbach diferenciou a partir da cor das colônias as principais bactérias do gênero *Staphylococcus*: *S. aureus* (do latim *aurum*, ouro)

e *S. albus* (do latim, branco) que posteriormente foi renomeado como *S. epidermidis* em virtude da sua onipresença na pele humana (ROSENBACH, 1884). Devido a capacidade de patogenicidade em cobaias, outras espécies foram descritas (ANDREWES; GORDON, 1907). Na época, os diferentes conceitos de espécie atrelado as limitações de ferramentas de identificação levaram à classificações baseadas no diagnóstico clínico entre espécie patogênica e não patogênica (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014).

O gênero *Staphylococcus* foi subdividido em mais de 60 espécies e subespécies baseado em análises filogenéticas e moleculares por LAMERS et al. (2012). No presente, foram descritas e validadas mais de 50 espécies (PARTE, 2018). Clinicamente, as manifestações clínicas, a categorização entre os isolados produtores da enzima coagulase (coagulase positiva CoPS) ou não produtores (coagulase negativa CoNS) e demais provas fisiológicas (catalase, fermentação de manitol, crescimento em meio com 7,5% de cloreto de sódio, entre outros) ainda são constantemente utilizados na diferenciação dos estafilococos (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014). No entanto, a identificação precisa dos isolados em nível de espécie ainda é deficitária na maior parte dos estudos, especialmente entre aquelas que foram descobertas nos últimos anos por não fazerem parte dos testes de diagnóstico de rotina (KOSECKA-STROJEK *et al*., 2019).

1.2.2 EPIDEMIOLOGIA E CLASSIFICAÇÃO

Considerando a colonização e infecção dos estafilococos pode-se dizer que devido a sua alta frequência em todo o mundo ocasionando diversas doenças com diferentes manifestações são, no presente, um problema desafiador para clínicos e microbiologistas (LISOWSKA-ŁYSIAK *et al.*, 2021). A infecção é classificada pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) como uma ameaça grave à saúde, levando à 11.000 mortes por ano (CDC 2013; LEWIS *et al.*, 2018).

Algumas enfermidades e condições sociais são fatores predisponentes para a colonização estafilocócica. Dentre os mais frequentes incluem indivíduos com doenças predisponentes, pacientes imunocomprometidos ou que fazem uso de imunossupressores, portadores do vírus da

imunodeficiência humana (HIV), recém-nascidos, idosos, pacientes com feridas crônicas, indivíduos em baixas condições socioeconômicas, entre outros (BOUCHER *et al.*, 2008; LOWY, 1998; TURNER *et al.*, 2019).

As distintas espécies do gênero estão diretamente relacionadas a uma variedade de doenças gastrointestinais, respiratórias e ósseas que podem atingir a corrente sanguínea e evoluir para endocardite e síndrome do choque tóxico. Além disso, em ambientes hospitalares, a bacteremia pode estar associada a inoculação por seringas ou implantação direta com dispositivos médicos, ao uso de cateteres e dispositivos protéticos e podem entrar nos tecidos do hospedeiro por lesões preexistentes (REDDY *et al.*, 2017; TONG *et al.*, 2015; LAKHUNDI *et al.*, 2018). Outras infecções consideradas menos graves são as infecções de pele e tecidos moles, como por exemplo, os abscessos cutâneos, furúnculos, carbúnculos, e infecções de feridas. Essas manifestações clínicas geralmente não são consideradas fatais, mas podem progredir consideravelmente e são frequentemente relacionadas à alta morbidade e dor (MCCAIG *et al.*, 2006).

S. aureus, dentre as espécies do gênero, é o patógeno mais comum nos seres humanos (WERTHEIM *et al.*, 2005). São responsáveis por diversas infecções em distintas localizações corporais. Considerando a pele, podem causar foliculite, furúnculos, impetigo, mastite, síndrome da pele escaldada, além de infecções secundárias em feridas preexistentes (ZHU, 2018). Em geral, mesmo *S. aureus* sendo um dos primeiros patógenos descritos, não é surpreendente que foi e ainda é uma das causas mais comuns de infecções em humanos, principalmente devido ao notável nível de aquisição de resistência contra múltiplas classes de antibióticos, entre os quais, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina/oxacilina (MRSA) são clinicamente os mais relevantes, sendo responsáveis por infecções com alta incidência em diversas partes do mundo (TURNER *et al.*, 2019; DIEKEMA *et al.*, 2019; ECDC, 2017).

Na microbiologia clínica o objetivo principal é distinguir *S. aureus* entre outros estafilococos por meio da prova da coagulase e, dentre os coagulase-negativos, *S. epidermidis* é responsável por

causar o maior número de infecções, especialmente em ambientes hospitalares (ROGERS; FEY; RUPP, 2009; SALGUEIRO *et al.*, 2019).

S. epidermidis são onipresentes na pele e mucosas humanas, predominantemente em áreas úmidas como axilas, áreas inguinal e perineal, intertrigo digital, cabeça e narinas anteriores (OTTO, 2009; CHEN *et al.*, 2018; BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014). No entanto, mesmo que seja considerado um microrganismos comensal e, historicamente ser classificado como menos ou não patogênico, por apresentar relação benigna com o seu hospedeiro, dentre os coagulase-negativos causam o maior número de infecções sendo considerado um patógeno oportunista de alto risco (NAMVAR *et al.*, 2014).

Nas últimas duas décadas o amplo uso de dispositivos médicos atrelado ao uso indiscriminado de antibióticos de amplo espectro, especialmente agentes β-lactâmicos associados à fatores predisponentes dos pacientes, contribuíram para o aumento progressivo destas infecções (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014). A espécie está frequentemente associada a infecções hospitalares, principalmente à dispositivos médicos de implantes como próteses, cateteres intravenosos e enxertos vasculares. Essas infecções raramente evoluem para fatalidade, porém, por conta da alta frequência de *S. epidermidis* na microbiota da pele humana, bem como, diversos fatores associados a virulência, tornam o tratamento e o controle da infecção na maioria das vezes, difícil (OTTO, 2009; CDC, 2004; NAMVAR *et al.*, 2014).

1.2.3 PATOGENESE E CARACTERISTICAS DE VIRULÊNCIA

Bactérias estafilocócicas apresentam uma vasta capacidade de infectar hospedeiros humanos por meio de diferentes mecanismos de patogenicidade que garantem a adesão, invasão, destruição do tecido, persistência e evasão dos mecanismos de imunidade do hospedeiro. A expressão destes diferentes fatores de virulência envolvidos na colonização asseguram a patogenicidade de *Staphylococcus* spp. Além disso, como citado anteriormente, bactérias estafilocócicas podem apresentar uma ampla resistência aos antibióticos, especialmente à meticilina/oxacilina e, mais

recentemente, à vancomicina, sendo considerada uma das mais importantes problemáticas do gênero visto que a vancomicina é considerada um antibiótico de último recurso contra estas infecções (LISOWSKA-ŁYSIAK *et al.,* 2021; NAMVAR *et al.,* 2014; AHMED; BAPTISTE, 2018). Sua patogênese envolve uma série de proteínas extracelulares, formação de biofilmes e componentes da parede celular coordenados em diferentes fases da infecção (LISOWSKA-ŁYSIAK *et al.*, 2021).

A capacidade de infecção não é semelhante para todas as espécies do gênero; em geral cepas coagulase-negativas apresentam níveis mais baixos de virulência do que as coagulase-positivas (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014). *S. aureus* frequentemente exibe um grande arsenal de toxinas e enzimas que podem atingir determinadas células do hospedeiro, manipular a resposta imune inata e adaptativa e degradar junções intercelulares. Importantes enzimas de *S. aureus* são as serino proteases e metaloproteases que acarretam uma fraca resposta imunológica do hospedeiro, destruição do tecido epitelial e contribuem para a proliferação da espécie (LISOWSKA-ŁYSIAK *et al*., 2021; OLIVEIRA; BORGES; SIMÕES, 2018). No entanto, foi comprovado com base no sequenciamento de genoma completo de diferentes cepas, que a espécie *S. epidermidis* também secreta toxinas e enzimas como proteases, lipases, hemolisinas e enterotoxinas que são importantes para a evasão imune de *S. epidermidis* e para causar doença crônica (ARGEMI *et al*., 2019).

Outro fator de virulência significativo do gênero é a formação de biofilme, controlado por vários sistemas reguladores que integram o estágio fisiológico da célula, sendo considerado um mecanismo fundamental para a sobrevivência e resistência no hospedeiro e à vários grupos de antibióticos pois, uma vez estabelecidos, são recalcitrantes ao tratamento e à resposta do hospedeiro (ARCHER et al., 2011; SCHILCHER; HORSWILL, 2020). Biofilmes estafilocócicos são abundantemente conhecidos, caracterizados predominantemente pela investigação *in vitro* e *in vivo* a partir de modelos de infecção, afim de obter um maior conhecimento dos mecanismos envolvidos na infecção relacionados ao biofilme humano (OTTO, 2018; PAHARIK; HORSWILL, 2016) .

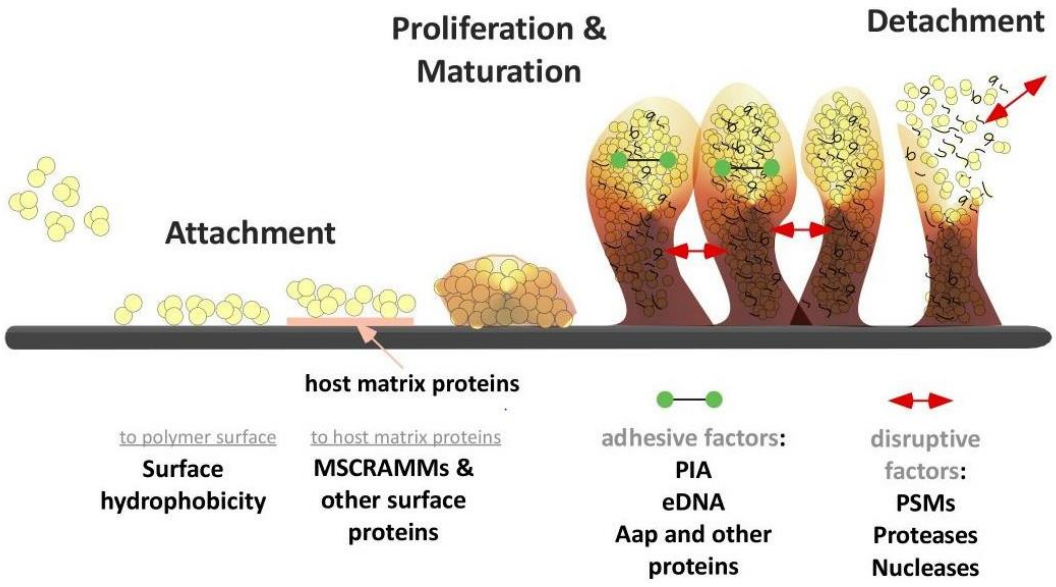
Muitas definições são usadas para biofilmes de *Staphylococcus* sp por diferentes autores. A maioria define como uma comunidade de colônias bacterianas aderidas umas às outras, à superfície do hospedeiro ou à uma superfície biótica ou abiótica, cercadas por substâncias de matriz exopolimérica, autoproduzida, constituída principalmente de polissacarídeos, proteínas, DNA extracelular e lipídios, cuja função é proteger o biofilme de fatores ambientais externos (OTTO, 2018). Comparada ao crescimento planctônico, células em biofilme apresentam características de fenótipo, metabolismo, transcrição gênica e produção de proteínas distinta, o que reflete na dificuldade de erradicar as infecções associadas ao biofilme (RESCH *et al.*, 2005; YAO; STURDEVANT; OTTO, 2005; OTTO, 2018).

O sistema regulador mais bem estudado na formação de biofilmes estafilocócicos é o *Quórum sensing* detector de genes acessórios (Agr), mecanismo de comunicação célula-célula que coordena o comportamento celular e controla os processos implicados na formação do biofilme (OTTO, 2018). Um dos mais importantes papéis do sistema é regular a produção de proteases e modulinas (PSMs) que estão envolvidas na maturação e desmontagem do biofilme de *S. aureus* e *S. epidermidis*, garantindo a dispersão e colonização secundária (NOVICK; GEISINGER, 2008; LISTER; HORSWILL, 2014; LE *et al.*, 2019). Toxinas com efeitos pró-inflamatórios, também reguladas por Agr apresentam expressão reduzida em biofilmes e como consequência atenuam a inflamação e a resposta imune inata do hospedeiro (VUONG *et al*., 2004; OTTO, 2018).

O modelo tradicional do ciclo de vida de biofilmes bacterianos envolve pelo menos três etapas: (I) fixação inicial, (II) maturação e (III) dispersão. Na primeira fase, há a adesão inicial a uma superfície biótica ou abiótica que envolve adesinas bacterianas específicas incluindo ácidos teicóicos de parede (WTAs), com propriedades de aderir à superfície hospedeira por meio de interações hidrofóbicas construindo microcolônias na superfície. O processo de proliferação e maturação do biofilme é mediado pela adesão célula-célula acompanhado pela produção de componentes da matriz (adesina intercelular polissacarídica – PIA, eDNA e proteínas), no qual as estruturas tridimensionais

em formato de torre são formadas. A dispersão final é mediada por fatores disruptivos (PSMs e proteases) que fragmentam as células do biofilme para iniciarem um novo ciclo (OTTO, 2018; PAHARIK; HORSWILL, 2016; SCHILCHER; HORSWILL, 2020). Dois novos estágios denominadas de fase de multiplicação e êxodo que ocorrem após a fixação inicial e antes da fase de maturação também já foram identificados, no entanto são menos relatados pelos autores (MOORMEIER *et al*., 2014). Os estágios de desenvolvimento de biofilme, baseado no modelo clássico, estão descritos na Figura 2.

Figura 2 – Representação esquemática dos estágios do desenvolvimento do biofilme estafilocócico conforme proposto por Michael Otto (2018): (I) fixação inicial, (II) maturação e (III) dispersão.



Fonte: (OTTO, 2018).

1.3 BIOFILMES POLIMICROBIANOS

A formação de biofilme pelos microrganismos infectantes pode apresentar-se de maneira monoespécie mas, também podem envolver espécies e reinos distintos sendo cada vez mais reconhecidos em patologias humanas. Do ponto de vista microbiológico clinico, infecções bacterio-fúngicas, bacterianas interespécies e fúngicas interespécies produzidas na forma de biofilmes multiespécie são muito mais difíceis de erradicar do que aquelas causadas por microrganismos em biofilmes monoespécie, acarretando em infecções mais recalcitrantes ao tratamento (RØDER;

SØRENSEN; BURMØLLE, 2016; RUIZ-SORRIBAS *et al.,* 2021; KULSHRESTHA; GUPTA, 2022). Além de poderem apresentar maiores taxas de mortalidade *in vivo* (PETERS; NOVERRA, 2013) e maior citotoxicidade *in vitro* (DE CARVALHO DIAS *et al.,* 2017). Isso significa que o estudo de biofilmes polimicrobianos requer abordagens mais complexas e avançadas para testar novas estratégias terapêuticas.

As interações interespécies em biofilmes propiciam funções e capacidades complexas para os microrganismos residentes, alterando sua função, fisiologia e microambiente. Diversas vantagens às células residentes podem ser encontradas nestas interações, refletindo na maior tolerância aos agentes antimicrobianos, comunicação e produção de novos genótipos e o aumento da virulência nas infecções eventos que são de importância significativa na saúde humana (BURMØLLE *et al.*, 2014; COSTA-ORLANDI *et al.,* 2017; RØDER; SØRENSEN; BURMØLLE, 2016). O sinergismo (quando a presença de um microrganismo favorece o crescimento e desenvolvimento de outro), o antagonismo (quando há competição por nutrientes e/ou inibição do crescimento por produtos secretados no meio por ambos microrganismos), e, por fim, o comensalismo (quando a interação tem efeito benéfico em uma população e neutro em outra), são alguns dos distintos comportamentos que podem ser encontrados nas interações complexas entre as comunidades microbianas (LIU *et al.,* 2019).

Biofilmes multiespécie compostos por bactérias e fungos são relativamente comuns pois ambos comumente colonizam superfícies humanas. São frequentemente observadas no trato urinário, cavidade bucal, feridas e dispositivos abióticos como cateteres e próteses, bem como em ambientes naturais como solos e corpos de água, podendo potencializar a infecção e induzir ao quadro crônico (COSTA-ORLANDI *et al*., 2017; 2022; GABRILSKA; RUMBAUGH, 2015). Estas interações podem ser físicas, por via de moléculas secretadas ou por reflexo de alterações na resposta imune do hospedeiro tornando-as ainda mais preocupantes quando encontradas em indivíduos imunocomprometidos (ARVANITIS; MYLONAKIS, 2015).

Dentre as infecções polimicrobianas causadas por bactérias e fungos, a levedura *Candida* spp. desempenha um importante papel devido a capacidade de apresentar dupla morfologia. Como exemplo, alguns estudos demonstraram que a interação entre *Candida* spp. e estreptococos são mutualísticas e acabam potencializando a virulência dos membros individuais. Xu et al., (2014) identificaram uma sinergia patogênica entre bactérias comensais bucais e *C. albicans*, demonstrando que *Streptococcus oralis* pode aumentar a formação de biofilme e a patogenicidade da levedura (XU *et al*., 2014). Em contraste, outras bactérias como os lactobacilos são conhecidas por antagonizar *C. albicans* (FÖRSTER *et al.,* 2016). Modelos de estudo *in vitro* de interações mistas entre *C. albicans* e *S. aureus* apresentaram maior citotoxicidade do que quando um único patógeno está presente (DE CARVALHO DIAS *et al.,* 2017). A infecção polimicrobiana dessas mesmas espécies levou a um aumento da taxa de mortalidade *in vivo* usando modelo murino de peritonite (PETERS; NOVERRA, 2013). Recentemente, nosso grupo descobriu que as interações polimicrobianas entre algumas das espécies mais prevalentes em casos de dermatomicoses como *C. albicans*/*C. parapsilosis* e *T. rubrum* foram antagônicas. A presença do dermatófito aparentemente inibiu a filamentação de *C. albicans* e o desenvolvimento de *C. parapsilosis,* fatores importantes para a virulência (GARCIA *et al.*, 2020).

A diversidade de interações entre comunidades polimicrobianas também foi encontrada na associação de dermatófitos e bactérias. Na forma planctônica, em casos de *tinea pedis* e onicomicoses, a associação bacterio-fúngica tornou o tratamento da doença mais difícil (LIU *et al.,* 2019). Tais interações entre espécies podem permitir que as bactérias se beneficiem da proteção de produtos fúngicos secretados, como por exemplo, os exopolissacarídeos, os quais podem lhes conferir uma maior tolerância aos antibióticos (KONG *et al*., 2016; KONG; TSUI; KUCHARÍKOVÁ, 2017).

Contudo, o estudo de biofilmes polimicrobianos torna-se desafiador devido à sua complexidade, heterogeneidade e resistência a antimicrobianos que podem trazer inúmeras complicações aos pacientes.

1.4 CÉLULAS PERSISTENTES

Sabe-se que bactérias, fungos e diversos outros microrganismos dispõe de mecanismos para a garantia da sua sobrevivência à exposição a tratamentos antimicrobianos. Processos reconhecidos incluem a resistência/multirresistência e a tolerância à antibióticos (BALABAN *et al.,* 2019). No entanto, outro fenômeno pelos quais bactérias/ fungos asseguram sua permanência é o desenvolvimento de células persistentes (persisters), que embora em culturas fúngicas seja considerada uma área da pesquisa mais recente quando comparado com as bactérias, as células persistentes vêm ganhando mais destaque e reconhecimento (BIGGER, 1944; LAFLEUR *et al.,* 2006; LEWIS, 2010; WOOD *et al.,* 2013; YANG *et al*., 2016; CORDEIRO *et al*., 2021).

Vários fatores podem resultar na falha do tratamento e os isolados resistentes não são apenas capazes de sobreviver a altas concentrações de fármacos antifúngicos, mas também são capazes de crescer em sua presença. Por outro lado, as células fúngicas podem apresentar tolerância a um medicamento antifúngico. A tolerância é definida como a sobrevivência após uma exposição transitória a altas concentrações de um agente fungicida acima da concentração inibitória mínima (CIM) e como resultado, leva mais tempo para um agente fungicida matar as células. Finalmente, as células fúngicas podem ocorrer como biofilmes, geralmente associados ao aumento da resistência contra agentes antifúngicos e fatores imunológicos do hospedeiro. Várias razões têm sido propostas para a alta resistência dos biofilmes aos agentes antifúngicos, incluindo o sequestro de fármacos por componentes da matriz, a regulação positiva das bombas de efluxo e a presença de células persistentes tolerantes a múltiplas drogas. Células persistentes são um caso especializado de tolerância (DELARZE; SANGLARD, 2015).

Células persistentes referem-se à uma subpopulação de células metabolicamente inativas em culturas bacterianas/fúngicas, capazes de sobreviver à exposição transitória a altas concentrações de antimicrobianos, sem serem resistentes podendo permanecer em estado latente dentro do biofilme por longos períodos de tempo (BALABAN *et al.,* 2019; LAFLEUR *et al.,* 2006). São reconhecidas como

uma das principais causas de falhas no tratamento e infecções recorrentes, o que sugere que sua ocorrência esteja diretamente relacionada à recalcitrância destas infecções, visto que a resposta heterogênea da população persistente sucede a eliminação da carga microbiana por antibióticos de progressão mais lenta (WUYTS; VAN DIJCK; HOLTAPPELS, 2018).

É conhecido que as células que residem dentro de um biofilme encontram baixa disponibilidade de oxigênio e nutrientes, resultando em baixa atividade metabólica celular e queda nos níveis de ATP intracelular; estas células compartilham semelhança fisiológica com células persistentes (SCHILCHER; HORSWILL, 2020).

A primeira evidência destas células surgiu há mais de 70 anos, mas somente mais tarde o mecanismo de sua formação foi desvendado (WUYTS; VAN DIJCK; HOLTAPPELS, 2018). Joseph Bigger (1944) mostrou que *S. aureus* produziu células metabólicas persistentes ao observar que uma pequena proporção de bactérias se comportou de maneira distinta do restante da população pós tratamento com penicilina e, além disso, retomaram a sua divisão após a remoção da droga, mantendo a sua susceptibilidade (BIGGER, 1944).

Desde então, estas células têm sido extensivamente investigadas em bactérias pós exposição à diversos antimicrobianos bactericidas, apresentando um importante papel nestas culturas (FISHER; GOLLAN; HELAINE, 2017; YANG *et al*., 2016). Os antibióticos dependem de um alvo ativo para exercer suas propriedades bactericidas, dentre eles, a vancomicina, glicopeptídeo inibidor da síntese da parede celular, é utilizado para o isolamento de células persistentes bacterianas (YANG *et al*., 2016; SINGH *et al*., 2009; SHAPIRO *et al*., 2011).

Até o momento, a subpopulação de persistentes bacterianos foram bem descritos contra as principais classes de antibióticos em *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Mycobacterium tuberculosis*, importantes patógenos humanos (DE GROOTE *et al.*, 2009; CONLON, 2014; YANG *et al*., 2016; KEREN *et al.*, 2011). E desde então, os conhecimentos sobre o mecanismo molecular e a compreensão do papel das células persistentes em

infecções bacterianas têm sido amplamente discutidos (FISHER; GOLLAN; HELAINE, 2017; MICHIELS *et al.*, 2016; WAINWRIGHT *et al.*, 2021). No entanto, pouco se conhece sobre células persistentes em fungos. Até a presente data, as células persistentes de biofilmes fúngicos têm sido estudadas principalmente em biofilmes de *Candida* spp. (GALDIERO *et al*., 2020; LI *et al.*, 2015; YE *et al*., 2022).

LaFleur et al. (2006), identificaram pela primeira vez a presença de células persistentes em biofilmes de *C. albicans* após a exposição à dois microbicidas, a anfotericina B, um antifúngico poliênico e clorexidina, antisséptico antibacteriano. Bojsen et al. (2016), verificaram a presença de células persistentes em biofilmes e em crescimento planctônico de *Saccharomyces cerevisiae* frente à anfotericina B. Recentemente, também foram demonstradas em biofilmes de *Trichosporon* spp (CORDEIRO *et al*., 2021). Em biofilmes de dermatófitos, no entanto, essas células ainda não foram descritas mas são hipotetizadas por nosso grupo e por Brilhante et al., (2018), principalmente em casos de onicomicose, em que se verifica diversos relatos de recalcitrância e recidivas, podendo levar 12 a 18 meses para a cura completa da infecção dependendo do tipo de tratamento (FINCH; WARSHAW, 2007; GUPTA; DAIGLE; CARVIEL, 2016; SINGH *et al*., 2018).

Diversas discussões sobre as maneiras de se gerar células persistentes em uma cultura ainda existem; não se conhece se há um único mecanismo molecular associado ou vários mecanismos moleculares específicos. Estudos para sua investigação e melhores estratégias terapêuticas para sua erradicação se tornam necessários (FISHER; GOLLAN; HELAINE, 2017). Ademais, pode haver uma forte variação na quantidade destas células nos biofilmes devido ao alto grau de heterogeneidade dos microrganismos ou ao tipo de substrato (WUYTS; VAN DIJCK; HOLTAPPELS, 2018; RADZIKOWSKI; SCHRAMKE; HEINEMANN, 2017).

As abordagens terapêuticas em desenvolvimento incluem a combinação de antibióticos com agentes que inibem a formação de biofilmes, bem como a utilização de terapias que visam especificamente as células persistentes em biofilmes (FELIX *et al*., 2022; MAO *et al*., 2023). A

compreensão do papel das células persistentes em biofilmes é importante para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de infecções crônicas e persistentes.

JUSTIFICATIVA

As infecções fúngicas são negligenciadas do ponto de vista social e político. No entanto, estas afetam mais de um bilhão de pessoas, resultando em altas taxas de morbidade, mortalidade e estigmas sociais (RODRIGUES; NOSANCHUK, 2020; GNAT *et al*., 2021). Estima-se que as infecções fúngicas superficiais afetem cerca de 20 a 25% da população mundial e o desconforto gerado e as altas taxas de recalcitrância são fatores importantes para novas investigações sobre o assunto. Embora tenham sido vistos avanços no conhecimento dos mecanismos de patogenicidade das dermatofitoses/dermatomicoses, a alta prevalência dessas infecções mostra que alguns aspectos ainda não estão totalmente esclarecidos (SEGAL; FRENKEL, 2015; RODRIGUES; NOSANCHUK, 2020; DALLA-LANA, 2016).

É conhecido que a formação de biofilmes por fungos filamentosos oferece vantagens específicas aos organismos sendo diretamente relacionado ao aumento de virulência e evasão de condições estressantes seja por agentes antimicrobianos ou pela própria defesa do hospedeiro (VILA; ROZENTAL, 2016). Não há um meio de cultura padronizado para a geração de biofilmes fúngicos ou bacterianos, embora seja conhecido que a escolha do meio de desenvolvimento pode afetar nas suas características (KUCHARÍKOVÁ *et al*., 2011; WIJESINGHE *et al*., 2019). Diferentes métodos terapêuticos na erradicação de biofilmes dermatofíticos já foram testados por nosso grupo (BILA *et al*., 2021; COSTA-ORLANDI *et al*., 2020), no entanto, não foi evidenciado o importante papel que as células persistentes poderiam desempenhar na tolerância destes biofilmes aos compostos fungicidas. A presença da subpopulação em biofilmes de dermatófitos foi suposta por Brilhante et al., (2018) e Costa-Orlandi et al., (2016), principalmente em casos de onicomicoses, no entanto, até a presente data não foi identificada.

Biofilmes polimicrobianos apresentam extrema relevância para a saúde humana e, diferentemente das infecções monomicrobianas, podem apresentar manifestações que demandam tratamentos muito mais complexos (ARVANITIS; MYLONAKIS, 2015; GARCIA *et al*., 2020). As

comunicações entre patógenos fúngicos com espécies bacterianas são comuns no meio ambiente, e podem estar presentes quando parasitam os seres humanos. A microbiota residente da pele apresenta composição distinta em cada região, a disbiose microbiana pode afetar na ocorrência e no desenvolvimento de diversas doenças, por ser colonizada por muitos microrganismos em sua superfície que podem apresentar mecanismos de patogenicidade preocupantes, no entanto, ainda há uma desatenção no papel que a interação entre os microrganismos presentes na microbiota com os patógenos externos podem desempenhar nos diferentes estágios da infecção (LIU *et al.*, 2019; SITEPU; MUIS; PUTRA, 2018). A associação de dermatófitos e bactérias, mais precisamente entre os gêneros *Trichophyton* e *Staphylococcus* foram descritos em casos de *tinea pedis* e onicomicoses, indicando que cepas bacterianas podem participar do desenvolvimento destas manifestações, tornando a terapia mais complexa (BURKHART; BURKHART; GUPTA, 2002; LIU *et al*., 2019; SITEPU; MUIS; PUTRA, 2018; FRIEDRICH, 2013). Tais infecções apresentam alta propagação e taxa de recorrência, o que afeta negativamente na qualidade de vida e no bem-estar dos pacientes e que poderia estar associado à formação de biofilmes mistos.

Dessa maneira, o estudo de biofilmes mono ou polimicrobianos e a pesquisa de células persistentes em biofilmes fúngicos apresenta-se como uma temática desafiadora no campo da saúde pública, demandando estudos para sua comprovação e auxiliando trabalhos futuros na busca por distintas possibilidades terapêuticas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

- Avaliar a capacidade de formação de biofilmes de *Trichophyton rubrum* em associação com *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis* sob diferentes condições de desenvolvimento bem como verificar a presença de células persistentes nos biofilmes monoespécie após exposição à antimicrobianos específicos.

2.2. Objetivos específicos:

- Avaliar a capacidade de formação *in vitro* de biofilme misto de *T. rubrum* ATCC 28189 com *S. aureus* ATCC 25923 e *T. rubrum* ATCC 28189 com *S. epidermidis* ATCC 12228 nos meios de cultura RPMI -1640, BHI e caldo Mueller-Hinton (MHI).
- Avaliar a capacidade de formação *in vitro* de biofilme misto de *T. rubrum* ATCC 28189 com *S. aureus* ATCC 25923 e *T. rubrum* ATCC 28189 com *S. epidermidis* ATCC 12228 em quatro diferentes tempos de formação (0h, 4h, 24h e 48h).
- Quantificar a biomassa (cristal violeta), a atividade metabólica (sal tetrazólico XTT) e a viabilidade celular (unidades formadoras de colônias – UFC) dos biofilmes formados nos diferentes tempos e meios de cultura.
- Obter e analisar as topografias dos biofilmes monoespécie e mistos por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e confocal de varredura a laser (CLSM).
- Determinar e quantificar a presença de células persistentes por plaqueamento em ágar, após exposição dos biofilmes monoespécie bacterianos à vancomicina e dos biofilmes fúngicos à terbinafina.

3. METODOLOGIA

3.1. MICRORGANISMOS

Para a realização desse trabalho, foi utilizada a cepa *T. rubrum* ATCC 28189 pertencente a micoteca do Laboratório de Micologia e do Núcleo de Proteômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, SP, mantidos em método de conservação *Castellani* e as cepas *Staphylococcus epidermidis* INCQS 00016 (ATCC 12228) e *Staphylococcus aureus* INCQS 00015 (ATCC 25923) cedidas pela Fundação Osvaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ mantidas em caldo BHI com glicerol a -20ºC. O dermatófito foi cultivado em ágar Sabouraud e incubado a 28ºC por 7 a 15 dias. Em seguida, a cepa foi cultivada em ágar extrato de malte e mantida a 25ºC por 7 dias ou até a esporulação (COSTA-ORLANDI *et al*., 2014; GARCIA *et al*., 2020; COSTA-ORLANDI *et al*., 2020). As bactérias foram semeadas em *Typtone Soya Agar* (TSA) a 37ºC e incubados por uma noite no momento dos ensaios.

3.2. FORMAÇÃO *IN VITRO* DE BIOFILMES MONOESPÉCIE

Os biofilmes de *T. rubrum* ATCC 28189 e das bactérias *S. epidermidis* ATCC 12228 e *S. aureus* ATCC 25923 foram formados conforme previamente publicado por Costa-Orlandi et al., (2014) e Fraiha et al. (2019), com modificações. Para isto, foram utilizados três meios de cultura: *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 com L-glutamina, glicose e sem bicarbonato de sódio, tamponado com ácido morfolino propânosulfônico (MOPS-*Sigma-Aldrich*), caldo *Brain Heart Infusion Broth* (BHI – *Kasvi*) e caldo Mueller Hinton (MHI) uma vez que a qualidade e a quantidade de nutrientes disponíveis nos meios de cultura podem influenciar na morfologia, fisiologia e densidade das células em biofilme, o que destaca a fundamental importância na seleção adequada de um meio de cultura na formação de biofilmes (SERRANO-FUJARTE *et al*., 2015; WIJESINGHE *et al*., 2019; CHEONG *et al*., 2021).

Para a formação de biofilme monoespécie de *T. rubrum*, após seu subcultivo em ágar extrato de malte por 7 a 15 dias, os conídios foram descolados com auxílio de uma alça estéril e o inóculo inicial foi preparado em 5 mL de solução salina (0,85%). O sobrenadante foi colocado em tubos cônicos e deixados em repouso por 15-20 min para permitir que as hifas assentassem e os microconídios permanecessem no sobrenadante. Em seguida, após a contagem dos microconídios em Câmera de Neubauer, a suspensão foi ajustada em solução salina estéril para o alcance da concentração final de 1×10^{6} células/ mL para a etapa de pré-adesão. Cerca de 1000 μL e 200 μL de inóculo ajustado, foram adicionados às placas (*Kasvi*) de 24 (para a microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal de varredura a laser) e 96 poços (para os demais testes), respectivamente. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37ºC por quatro horas sem agitação para a pré-adesão do biofilme; o sobrenadante foi removido cuidadosamente e os biofilmes, lavados com solução salina para a remoção de células não aderentes. Em seguida foi acrescentado aos poços 1000 μL e 200 μL de meio RPMI-1640, BHI e MHI. As placas foram novamente incubadas nas mesmas condições de temperatura por até 72h.

Para o desenvolvimento de biofilme de *S. aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC 12228 monoespécie, as cepas foram inicialmente subcultivadas em ágar TSA e incubadas durante a noite a 37ºC. Após o período de incubação, uma alçada da bactéria foi adicionada em 5 mL de solução salina (0,85%) e agitada em vórtex. Após a contagem das células bacterianas, o inóculo final foi ajustado em 1×10^{8} células/mL nos meios de cultura correspondentes, RPMI-1640, BHI e MHI. Em seguida, as suspensões foram adicionadas às placas de 24 e 96 poços (*Kasvi*) na concentração de 1000 μL e 200 μL, respectivamente, e incubados a 37ºC por até 72 h, para assemelhar ao tempo de maturação do biofilme de *T. rubrum*.

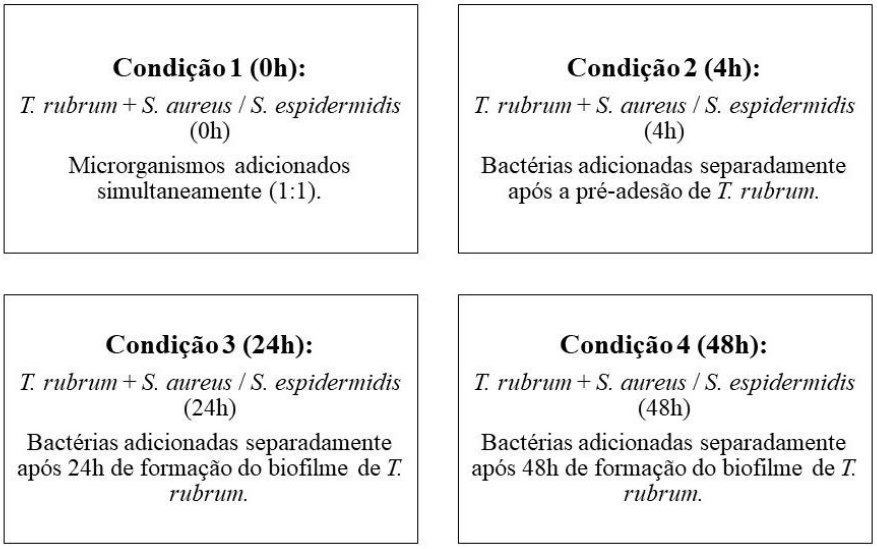
A cinética de formação do biofilme monoespécie de *T. rubrum* e dos biofilmes das bactérias *S. aureus* e *S. epidermidis* foi avaliada nos tempos de 24 h, 48 h e 72 h nos diferentes meios de cultura para posterior comparação e análise em relação aos biofilmes mistos.

3.3. FORMAÇÃO *IN VITRO* DE BIOFILMES MISTOS

Para a realização da formação dos biofilmes mistos, foram preparadas suspensões fúngicas e bacterianas separadamente, como descrito no item 3.2. O inóculo bacteriano de *S. aureus* e *S. epidermidis* foi adicionado ao inóculo fúngico em diferentes tempos de formação do biofilme: 0 h, 4 h, 24 h e 48 h. Todos os biofilmes mistos tiveram um tempo total de incubação de 72h a 37ºC, que é o período total de maturação de *T. rubrum* em biofilmes conforme determinado em estudos anteriores (GARCIA *et al*., 2020; COSTA-ORLANDI *et al*., 2014).

O esquema 1 resume as condições de formação dos biofilmes mistos. O inóculo bacteriano foi adicionado (**1**) no mesmo momento que foi colocado a suspensão de *T. rubrum* (0 h); (**2**) após a fase inicial de adesão de *T. rubrum* (4 h); (**3**) após 24 h de formação do biofilme de *T. rubrum* e (**4**) após 48 h de formação de *T. rubrum*. Os biofilmes mistos foram formados nos meios RPMI-1640, BHI e MHI e incubados até 72 h.

Esquema 1 – Formação dos biofilmes mistos nas diferentes condições propostas: (1) *T. rubrum* + *S. aureus* / *S. epidermidis* (0h), (2) *T. rubrum* + *S. aureus* / *S. epidermidis* (4h), (3) *T. rubrum* + *S. aureus* / *S. epidermidis* (24h), (4) *T. rubrum* + *S. aureus* / *S. epidermidis* (48h). Para a realização dos ensaios todos os meios foram testados (RPMI-1640, BHI e MHI) e os biofilmes mistos tiveram um tempo total de incubação de 72h.



3.4. CARACTERIZAÇÃO DOS BIOFILMES

3.4.1 Quantificação da biomassa por ensaio de cristal violeta (CV)

O cristal violeta (CV) é um corante usualmente utilizado na quantificação da biomassa de biofilme bacteriano e fúngico (COSTA-ORLANDI *et al*., 2014; XU *et al*., 2018). Apresenta a capacidade de corar células viáveis e mortas, além da matriz extracelular, a qual apresenta afinidade por polissacarídeos de sua composição e por moléculas superficiais da célula com carga negativa (PEETERS; NELIS; COENYE, 2008; XU *et al*., 2016).

O teste de quantificação de biomassa foi realizado conforme proposto por Marcos-Zambrano et al. (2014). Foram quantificados os biofilmes monoespécie formados após 24 h, 48 h e 72 h de incubação nas placas de 96 poços e, os mistos, formados conforme a adição de inóculo de *Staphylococcus* spp. ao biofilme de *T. rubrum* em 0, 4, 24 e 48 h de incubação permanecendo a incubação até um tempo total de 72 h. Os poços foram lavados cuidadosamente duas vezes com solução

salina tamponada com fosfato – *phosphate buffered saline* – PBS e 200 μL de metanol foram adicionados a cada poço durante 15 min. Decorrido esse tempo, o metanol foi aspirado e as placas secaram a 28ºC. Seguiu-se a adição de 200 μL de solução aquosa de cristal violeta 0,1% em cada poço a qual permaneceu por 20 min. O sobrenadante resultante foi aspirado e, os biofilmes, lavados com água destilada, até que o excesso de corante fosse removido. Por fim, ácido acético a 33% foi adicionado e determinou-se as densidades óticas com auxílio de leitor de microplacas (Biotek Epoch 2) em um comprimento de onda de 570 nm. As leituras foram feitas em colaboração com o grupo de pesquisa da Dra. Carla Raquel Fontana, Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, SP. Os valores de absorbância resultantes foram diretamente proporcionais à quantidade de biomassa do biofilme (MARCOS-ZAMBRANO *et al*., 2014).

3.4.2 Determinação da atividade metabólica do biofilme pelo ensaio de redução de XTT

A atividade metabólica dos biofilmes monoespécie e mistos foram quantificadas pelo teste de redução do 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -5-[carbonilo (fenilamino)]-2H-tetrazólio-hidróxido – XTT. O método de quantificação pelo ensaio de redução de XTT é considerado um método fácil e tecnologicamente avançado quando comparado com CV, resazurina, fluorocromo Syto 9 e diacetato de fluoresceína (VANDECANDELAERE; VAN ACKER; COENYE, 2016) e tem sido amplamente utilizado em estudos de atividades antibiofilme bacteriano e fúngico (ANJUM; SIM; NG, 2018; CHATRATH *et al.*, 2019; COSTA-ORLANDI *et al.*, 2017). O XTT é um sal amarelo que é reduzido a formazan – laranja, solúvel em água, por células metabolicamente ativas por meio de enzimas mitocondriais. A atividade metabólica é proporcional à produção de formazan e a intensidade da cor é diretamente relacionada à viabilidade celular medida em leitor de microplacas a 490 nm (COSTA-ORLANDI *et al*., 2014; MARTINEZ; CASADEVALL, 2007).

Para os ensaios, foram preparadas soluções-estoque de XTT (1 mg de sal/mL PBS) e menadiona (1mM em PBS). Os biofilmes foram formados nas placas de 96 poços nas diferentes

condições e meios de cultura pré-determinados. Posteriormente, os sobrenadantes foram removidos e as células foram lavadas com PBS estéril. Em seguida, foram adicionados 50 µL de solução de XTT juntamente com 4 µL de solução de menadiona aos poços das placas contendo o biofilme e incubadas a 37ºC protegidas da luz por três horas. A viabilidade célular foi medida a 490 nm no leitor de microplacas pertencente ao Núcleo de Proteomica da FCFAr.

3.4.3 Quantificação de biofilmes monoespécies e mistos por contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) em meio seletivo

As UFC/mL dos biofilmes formados entre *T. rubrum + S. aureus* e *T. rubrum + S. epidermidis* em todas as condições propostas foram contadas em meios seletivos para cada microrganismo e, a contagem obtida com os biofilmes monoespécie foi utilizada como controle. Após a formação dos biofilmes em placas de 96 poços, o sobrenadante foi aspirado, seguido da adição de 200 µL de PBS estéril e raspagem dos fundos dos poços, para destacar os biofilmes, com o auxílio de ponteiras estéreis. O conteúdo do poço foi transferido para microtubos de 1,5 mL e agitado em vórtex por ao menos cinco minutos para dispersão das células do biofilme. Diluições em série foram realizadas em PBS e alíquotas de 10 µL do conteúdo diluído foram semeadas em placas de Petri de 90 x 15 mm e espalhadas com auxílio de esferas de vidro estéreis em ágar Mycosel (para isolamento de *T. rubum*) e ágar Manitol (para o isolamento de *S. aureus* e *S. epidermidis*). As placas de ágar Mycosel foram incubadas a 28 ºC por até 14 dias e as placas de ágar manitol a 37 ºC por até 48 h para enumeração das UFC/mL (DOS SANTOS et al., 2016; GARCIA et al., 2020).

3.4.4 Análise topográfica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As topografias dos biofilmes mistos estabelecidas nas quatro situações experimentais foram analisadas e comparadas com os biofilmes monoespécie após 72 h de incubação. Resumidamente, os biofilmes formados no fundo das placas de 24 poços foram lavados com PBS estéril e fixados com 800 µL de solução de glutaraldeído a 2,5% (Sigma-Aldrich) incubando-se as placas sob refrigeração

a 4ºC por 1h. Posteriormente, as placas foram lavadas ao menos duas vezes com água destilada estéril e as amostras foram desidratadas com concentrações crescentes de álcool etílico a partir de 50% até 100% de etanol absoluto, à temperatura ambiente para desidratação. A seguir, o fundo da placa onde continha as amostras foi cortado com ajuda de um bisturi, montadas em cilindros de alumínio com prata (*stubs*) e colocadas em metalizador de alto vácuo (Denton Vacuum Desk V, Jeol USA) para o revestimento com ouro. As topografias dos biofilmes foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM-6610LV), localizado na Faculdade de Odontologia, UNESP, Araraquara, SP.

3.4.5 Análise com Microscopia Confocal de Varredura a Laser (CLSM)

Para caracterizar os biofilmes foram realizados ensaios de CLSM, preparando-se soluções de fluorocromo Calcofluor White (Thermo Fisher Scientific) e SYTO™ 9 485/498 (Thermo Fisher Scientific), conforme recomendações dos fabricantes. O fluoróforo *Calcofluor White* apresenta alta sensibilidade e especificidade à quitina da parede celular fúngica, corando-a em azul (DENNY *et al.*, 2020). Já para verificação e caracterização dos biofilmes monoespécie e mistos de *S. aureus* e *S. epidermidis* foi utilizado o marcador Syto9 que se liga ao DNA de células viáveis, pode se difundir através de membranas bacterianas intactas fornecendo, indiretamente, informações sobre a biomassa total do biofilme florescendo em verde (PEETERS; NELIS; COENYE, 2008). Embora este último marcador também seja capaz de corar o dermatófito, a coloração com *Calcofluor White* garante a especificidade da massa fúngica e a possível observação distinta das cepas.

Os fluorocromos foram gentilmente cedidos pela Prof. Dra. Paula Aboud Barbugli, Faculdade de Odontologia, UNESP, Araraquara, SP. Os biofilmes monoespécie e mistos foram formados sobre lamínulas de vidro redondas, 13 mm de diâmetro, estéreis, em placas de 24 poços em todas as condições testadas. As imagens foram analisadas e editadas no software Zen Blue 3.6 e no Image J.

A preparação das amostras seguiu os protocolos descritos por Bila et al. (2021) e Bonvicini et al. (2021). Após o período de incubação (37ºC, 72 h), o sobrenadante foi removido cuidadosamente e as placas foram centrifugadas e lavadas com PBS para retirada de células não aderentes das lamínulas.

Foi adicionado 1 mL de paraformaldeído a 4% e as placas incubadas a 4 ºC *overnight*. Após este período, as placas foram centrifugadas, lavadas ao menos 1 vez com PBS e protegidas da luz para adição dos fluoróforos. Alíquotas de 200 μL de solução de calcofluor foi adicionado aos poços por 30 min a 37ºC. Terminado o tempo de incubação, as placas foram centrifugadas, lavadas duas vezes com PBS para a remoção do excesso de corante. Posteriormente, 200 μL da solução de SYTO 9 foi adicionado aos poços e incubados por 1 hora em temperatura ambiente. O excesso de corante foi removido centrifugando com PBS e as lamínulas foram retiradas dos poços com cautela com o auxílio de agulha e pinça para que fossem vertidas sob 4 μL de *Fluoromount-G (Sigma-Aldrich)*, anteriormente depositado sobre lâminas de microscopia para observação em microscópio de fluorescência confocal (*Carl Zeiss LSM 800* com *Airyscan*), pertencente a Faculdade de Odontologia, UNESP, Araraquara, SP. As análises foram realizadas com o auxílio do software *Zen Blue 3.2* (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

3.5. DETERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE CÉLULAS PERSISTENTES

3.5.1 Cepas fúngicas e bacterianas e condições de crescimento

Para determinação da presença de células persistentes nos biofilmes de *T. rubrum*, a cepa de *C. albicans* ATCC 90028 foi incluída como controle de isolamento, visto que células persistentes em biofilmes de *C. albicans* já foram devidamente descritas (LAFLEUR *et al.*, 2006; DA SILVA et al., 2021; GALDIERO et al., 2020). A levedura foi cultivada em ágar Sabouraud Dextrose (Difco, BD biosciences) à 35 °C por 24 – 48 h, enquanto *T. rubrum*, *S. aureus* e *S. epidermidis* foram mantidas conforme já descrito no item 3.1. Para os ensaios, suspensões celulares padronizadas a 1 x 10^6 células/ mL (dermatófitos e *C. albicans*) e 1 x 10^8 células/ mL (*Staphylococcus* spp) foram utilizadas as quais foram obtidas a partir da cultura de 7 dias, 24h e overnight, respectivamente.

Para analisar a presença das células persistentes nos biofilmes fúngicos foram utilizados os protocolos propostos por LaFleur et al. (2006) e por Brucker et al. (2016) e, para o isolamento nos biofilmes bacterianos a metodologia descrita por YANG et al. (2016).

3.5.2 Preparo e diluição dos fármacos antifúngicos e antibacterianos

Os fármacos, terbinafina, vancomicina e anfotericina B adquiridos da *Sigma-Aldrich* foram utilizados nos experimentos para o isolamento de células persistentes de *T. rubrum*, *S. aureus*/ *S. epidermidis* e *C. albicans*, respectivamente. As soluções estoques foram preparadas considerando sua solubilidade e pureza e mantidas a -80ºC até o momento dos ensaios. As soluções de trabalho foram preparadas em tubos Falcon estéreis, em meio BHI, em diferentes intervalos de concentração e colocadas nos poços das placas correspondentes. Embora os Caldo Mueller-Hinton e RPMI-1640 sejam o meio de cultura padrão para os testes de sensibilidade a antibióticos e antifúngicos seguiu-se os experimentos em meio BHI por ser eleito o melhor meio para o desenvolvimento dos biofilmes, de acordo com os resultados encontrados nesse estudo.

Para o teste de sensibilidade das células planctônicas dos fungos dermatófitos e de *C. albicans* na concentração de $1x10^6$ cel/ mL, a terbinafina e a anfotericina B foram testadas em intervalos de concentração de 32 a 0,06 µg/mL. Para *S. aureus* e S. *epidermidis* na concentração de $1x10^8$ cel/mL a concentração de vancomicina aplicada foi de 256 a 0,5 µg/mL.

Para a determinação da presença das células persistentes nos biofilmes, a concentração de 80 – 2560 µg/mL foi utilizada para terbinafina e 2,5 – 160 µg/mL para anfotericina B. Para *S. epidermidis* a concentração de vancomicina testada foi de 32 – 2048 µg/mL e, para *S. aureus* de 256 – 8192 µg/mL.

3.5.3 Ensaio de suscetibilidade das cepas fúngicas e bacterianas na forma planctônica na concentração de 1 x 10^6 cel/mL e 1 x 10^8 cel/mL

Além de avaliar a ação dos antifúngicos e antibacterianos nos biofilmes maduros na determinação das células persistentes por UFC (veja abaixo), foi realizado o ensaio de sensibilidade das

cepas na forma planctônica na mesma concentração usada para a formação dos biofilmes ($1x10^6$ cel/mL para *T. rubrum* e *C. albicans*) e ($1x10^8$ cel/mL para *S. aureus* e *S. epidermidis*) (BILA *et al*., 2021). Em resumo, 100 μL das soluções de trabalho dos compostos foram preparadas em BHI e dispensados nos poços da microplaca. Em seguida, 100 μL das suspensões fúngicas e bacterianas foram acrescentadas aos mesmos poços. A leitura das placas foi feita após a incubação a 37ºC por até 24 h para *S. aureus* e *S. epidermidis*, 24/48 h para *C. albicans* e 72 h para *T. rubrum* por meio do ensaio de redução do XTT afim de quantificar a redução da atividade metabólica das células. As concentrações dos antimicrobianos que inibiram 50% e 80% da atividade metabólica em comparação ao controle sem tratamento foram definidas como CIM50 e CIM80, respectivamente.

3.5.4 Determinação da presença de células persistentes pelo método de plaqueamento em ágar

A determinação das UFC/mL visou evidenciar a presença da subpopulação microbiana que foi capaz de sobreviver à exposição transitória à altas concentrações de antimicrobianos.

Os biofilmes de *T. rubrum*, *S. aureus* e *S. epidermidis* foram formados conforme descrito nos itens anteriores e, para *C. albicans* foi desenvolvido o protocolo proposto por Garcia et al. (2020). Todos os biofilmes foram formados em meio BHI. Após a maturação, os biofilmes foram lavados com PBS e suspensões de terbinafina, anfotericina B e vancomicina foram preparadas nas concentrações pré-determinadas de acordo com os resultados dos ensaios de sensibilidade das células planctônicas na concentração $1x10^6$ cel/mL e $1x10^8$ cel/mL e distribuídas nos poços. Para *T. rubrum* e *C. albicans* a concentração aplicada foi 10xCIM80 das células planctônicas. Para *S. aureus* e *S. epidermidis* foram empregadas concentrações crescentes a partir do CIM80 das células planctônicas. Após o tratamento, para evitar a transferência de antibióticos para a placa, os quais poderiam impedir a recuperação das células viáveis, o sobrenadante foi descartado e os poços foram lavados com PBS estéril. Em seguida, os biofilmes foram raspados firmemente, ressuspendidos por pipetagem vigorosa, transferidos para microtubos e agitados em vórtex em velocidade alta por ao menos 2 min, a fim de desprender as células do biofilme. Cerca de 100 μL das suspensões foram diluídas em série com PBS e um volume de 10/ 20

µl foi plaqueado em meios de cultura específicos (Mycosel para *T. rubrum*, Sabouraud para *C. albicans* e TSA para *S. aureus* e *S. epidermidis*). Em alguns casos, um maior volume da suspensão (100 µL) foi espalhada diretamente nas placas para aumentar a taxa de detecção. A contagem de células sobreviventes foi realizada em até 72h de incubação para S. *aureus*, *S. epidermidis* e C. *albicans* a 37ºC e por até 14 dias para T. *rubrum* a 28ºC para otimizar a recuperação de células persistentes. A taxa de sobrevivência em relação ao controle sem tratamento foi expressa em log UFC/mL (BRUCKER *et al*., 2016; YANG *et al*., 2016; LA FLEUR *et al*., 2006; CORDEIRO *et al*., 2021). Todos os ensaios foram realizados em triplicata, em dois experimentos independentes.

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os dados paramétricos obtidos, foi utilizado o teste ANOVA *one-way* seguido do teste de Bonferroni como pós-teste. Valores de p inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$). Para análise, foi utilizado o Software GraphPad Prism 5.0 (Inc, San Diego, CA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Formação de biofilme monoespécie e misto de *T. rubrum/S. aureus* ou *S. epidermidis*

4.1.1 Quantificação de biomassa dos biofilmes monoespécie por ensaio de cristal violeta

A quantificação da biomassa dos biofilmes formados por *T. rubrum*, *S. aureus* e *S. epidermidis*, nos diferentes meios de cultura, foi avaliada após a incubação por até 72 h. Os resultados dos ensaios estão representados na **Figura 3.** A seleção dos meios utilizados no estudo se deu devido ao RPMI-1640 ser utilizado em estudos de biofilmes fúngicos (PIERCE *et al*., 2008; ROSATO *et al*., 2013; COSTA-ORLANDI *et al*., 2014); BHI, em estudos de biofilmes mistos constituídos de leveduras e bactérias (GULATI *et al*., 2018; KART *et al*., 2014) e, o caldo Mueller-Hinton, utilizado em estudos de atividade antibacteriana pela metodologia de microdiluição em caldo e na formação de biofilmes bacterianos (CLSI, 2015; REYNOSO *et al*., 2019; CHEN *et al*., 2020).

Os dados obtidos demonstraram que *T. rubrum* e as bactérias *S. aureus* e *S. epidermidis* formaram biofilme nos três meios de cultura testados (RPMI-1640, BHI, MHI) com algumas variações na quantidade de biomassa formada.

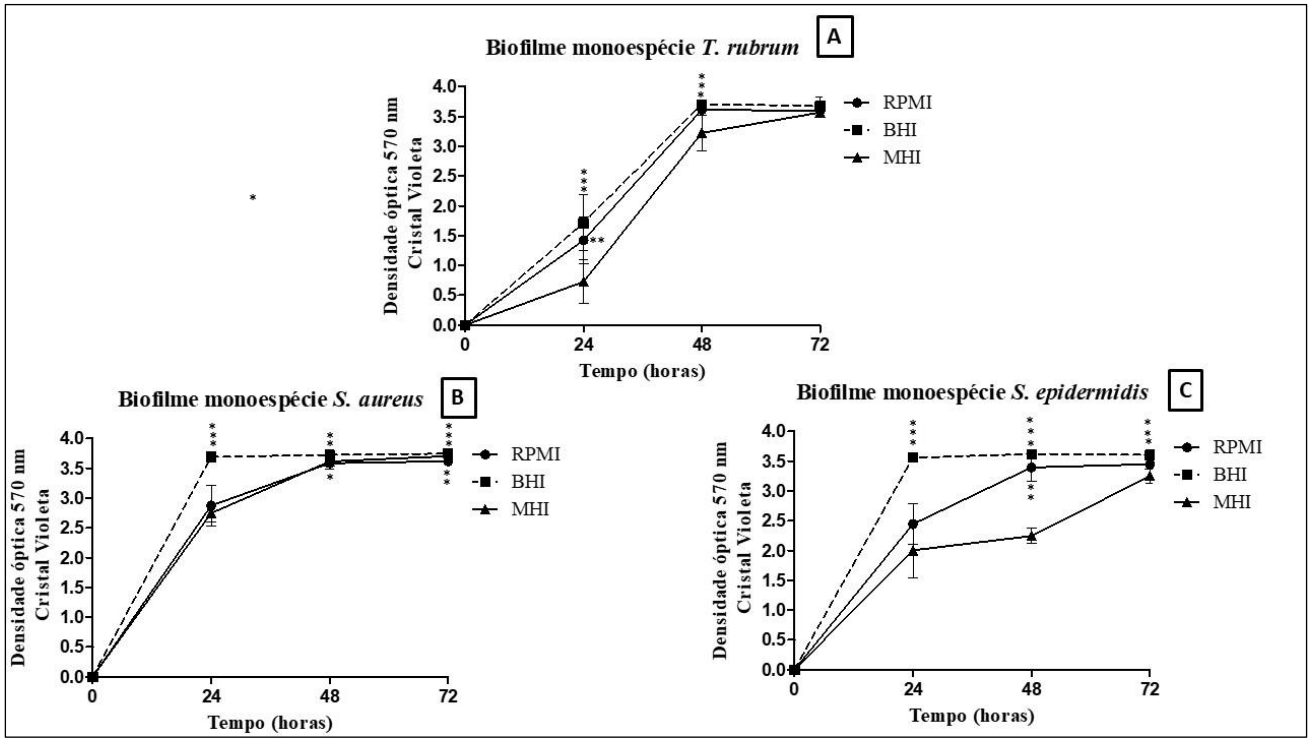
O biofilme monoespécie de *T. rubrum* **(Fig. 3A),** nos meios RPMI-1640 e BHI mostraram um crescimento exponencial até 48h seguido da formação de um *plateau* ao atingir a maturação (72h). Nesses meios também se notou maior massa de biofilme quando comparados com MHI ($p < 0,001$). Essa diferença também foi observada com 24h de incubação, porém com menor relevância entre RPMI-1640 e MHI ($p < 0,01$). No entanto, no período de 72h, não foram observadas diferenças significativas entre os meios testados ($p > 0,05$).

Para os biofilmes de *S. aureus* ATCC 25923 **(Fig. 3B),** a biomassa obtida apresentou quantidades elevadas nas primeiras 24h em todos os meios de cultura, embora a biomassa formada no meio BHI foi maior comparativamente ao meio RPMI-1640 e MHI ($p < 0,001$). Resultado similar ocorreu após 48h de incubação, contudo, com menor significância entre os meios RPMI-1640 e BHI

($p < 0,01$) e entre o meio BHI e MHI ($p < 0,05$). Ao atingir 72h de incubação, o meio RPMI-1640 proporcionou menor quantidade de biomassa quando comparado com BHI ($p < 0,001$) e com MHI ($p < 0,01$).

Em *S. epidermidis* ATCC 12228 **(Fig. 3C)**, a quantificação de massa de biofilme pelo corante cristal violeta (CV) demonstrou que com 24h de formação, o meio BHI estimulou uma maior produção de biomassa nos biofilmes quando comparado com RPMI-1640 e MHI ($p < 0,001$). Essa diferença diminuiu entre BHI e RPMI-1640 quando a incubação atingiu 48h ($p < 0,01$), porém, o meio MHI teve menor capacidade para formação de biomassa quando comparado com os outros dois meios de cultura ($p < 0,001$). Assim como *S. aureus*, nos biofilmes de *S. epidermidis* com 72h de incubação, o meio BHI proporcionou, novamente, maior quantidade de biomassa quando comparado com RPMI-1640 e com MHI ($p < 0,001$).

Figura 3 - Quantificação de biomassa pelo ensaio de cristal violeta (CV) após leitura da absorbância a 570 nm dos biofilmes monoespécie de *T. rubrum* ATCC 28189 (A), *S. aureus* ATCC 25923 (B) e *S. epidermidis* ATCC 12228 (C), formados em RPMI-1640, BHI e MHI em diferentes tempos de incubação (24h, 48h, 72h). Significância estatística (* $p < 0,05$ comparação entre RPMI e MHI), (** $p < 0,01$ comparação entre RPMI e MHI) e (*** $p < 0,001$ comparação entre BHI vs MHI e RPMI).



Todos os meios de cultura permitiram a formação dos biofilmes, mas o meio BHI proporcionou um melhor desenvolvimento de biomassa nos tempos de formação para *T. rubrum* (desde 24h até 72h). Nas primeiras 24h, observou-se um pico nos biofilmes de *Staphylococcus* spp., o qual se manteve constante até o final das 72h, principalmente em BHI.

Estudos *in vitro* relatam o uso de diversos meios de cultura, substratos e técnicas para elucidar a qualidade, quantidade de nutrientes e variações de pH no desenvolvimento dos biofilmes. Propriedades estruturais de superfície, mecanismos de adesão, sobrevivência e amadurecimento podem ser afetados em decorrência das condições ambientais em que os biofilmes sobrevivem (KUCHARÍKOVÁ *et al*., 2011; ZERAIK; NITSCHKE, 2012). No caso de biofilmes mistos, ainda deve ser considerado o compartilhamento e a taxa de uso de nutrientes por cada espécie (THEIN *et al*., 2009).

O caldo BHI é considerado um meio complexo, rico e nutritivo, composto por uma infusão de tecido cerebral e cardíaco oriundos de diferentes animais, variando sua composição em cada lote, além de apresentar em sua formulação peptona, glicose, cloreto de sódio e fosfato dissódico. Esses componentes fornecem um ambiente adequado para o crescimento de microrganismos exigentes e não exigentes (CLEARE *et al*., 2020; GONÇALVES *et al*., 2020). O resultado desse estudo corrobora com aqueles observados na literatura. Wijesinghe et al. (2019), avaliaram a influência de quatro meios de cultura no crescimento planctônico, na adesão e na formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Os autores relataram que o meio BHI revelou-se o mais benéfico para o crescimento de ambas as espécies quando comparado com RPMI-1640 e Luria-Bertani (WIJESINGHE *et al*., 2019). Costa-Orlandi et al. (2014), exploraram a influência de BHI, RPMI-1640 e DMEM no desenvolvimento dos biofilmes de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*, demonstrando que o meio BHI estimulou a produção de um biofilme robusto com abundante matriz extracelular. Similarmente, nossos resultados demonstraram que os biofilmes de dermatófitos e bactérias, formados

em caldo BHI, apresentaram abundante biomassa, com valores mais elevados que os obtidos com os meios RPMI-1640 e MHI, especialmente para *Staphylococcus* spp.

O RPMI-1640 é o meio de cultura padrão, preconizado pelo *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI) para o estudo *in vitro* de células planctônicas fúngicas em ensaios de sensibilidade aos antifúngicos (M38-A2) (CLSI, 2008), considerado também o meio mais adequado para garantir o crescimento fúngico (ARENDRUP *et al.*, 2021). Contém o agente redutor glutationa e altas concentrações de aminoácidos, vitaminas, inositol e colina; porém é um meio limitado em ferro, componente essencial para processos fisiológicos bacterianos e fúngicos (CLEARE *et al.*, 2020; CAZA; KRONSTAD, 2013). Suplementar o meio com glicose e manter o pH superior a 6 contribui para aumentar e preservar uma biomassa estável ao longo do tempo (RUIZ-SORRIBAS *et al.*, 2021).

O meio RPMI-1640 é considerado o ideal para o desenvolvimento de biofilmes fúngicos, Costa-Orlandi et al. (2014), demonstraram que RPMI-1640 provou ser adequado para o desenvolvimento do biofilme de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*. Nossos resultados constataram que, embora o meio tenha favorecido o desenvolvimento dos biofilmes monoespécie, eles mostraram-se menos robustos quando comparados ao BHI, especialmente os biofilmes de *Staphylococcus* spp.

Finalmente, o caldo Mueller Hinton é o meio recomendado para testes de atividade antibacteriana pela metodologia de microdiluição em caldo (CLSI M07-A10, 2015), embora já tenha sido utilizado para teste de sensibilidade antifúngica de isolados clínicos filamentosos quando suplementado com glicose (PINTO *et al*., 2014) e, sem suplementação, contra isolados de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* (INTRA *et al*., 2019). Sua composição inclui extrato de carne bovina, hidrolisado ácido de caseína e amido. O extrato de carne bovina e a caseína fornecem nitrogênio, vitaminas, carbono, aminoácidos, enxofre e outros nutrientes essenciais para os microrganismos (REYNOSO *et al*., 2019).

Na literatura, biofilmes de dermatófitos ainda não foram caracterizados em caldo MHI; em contrapartida, para biofilmes de *Staphylococcus* spp., é bastante citado e tem demonstrado bom

desenvolvimento. A formação de biofilmes de *S. aureus* foi comparada em dois meios nutritivos, caldo tríptico de soja (TS) e nutriente (N) e não foi observada significância estatística na biomassa do biofilme (REYNOSO *et al*., 2019). Nossos resultados corroboram com o citado estudo relativamente ao biofilme de *S. aureus*, porém, contrasta com os encontrados para os biofilmes de *S. epidermidis.* Para o último microrganismo, biofilmes formados no caldo MHI demonstraram menor valor de biomassa comparativamente à obtida com BHI ou com RPMI-1640. Encontro semelhante ocorreu também com *T. rubrum*, evidenciando que o MHI fornece menor biomassa para estes biofilmes.

4.1.2 Quantificação de biomassa dos biofilmes mistos por ensaio de cristal violeta

Os resultados da quantificação da biomassa dos biofilmes mistos formados em diferentes condições (0h, 4h, 24h e 48h) foram demonstrados para *T. rubrum* + *S. aureus* em RPMI-1640, BHI e MHI **(Figs. 4 A, B, C)** e *T. rubrum* + *S. epidermidis* em RPMI-1640, BHI e MHI **(Figs. 5 A, B, C)** respectivamente. Assim como no biofilme monoespécie, foram realizados ao menos três experimentos independentes e os resultados foram expressos em triplicata com média e desvio padrão (DP). Todos os biofilmes mistos tiveram um tempo total de incubação de 72h a 37ºC, período no qual foi quantificada a biomassa pelo ensaio de CV.

Figura 4 - Quantificação de biomassa pelo ensaio de cristal violeta (CV) dos biofilmes mistos constituídos por *T. rubrum* + *S. aureus* em RPMI-1640 (A), *T. rubrum* + *S. aureus* em BHI (B), *T. rubrum* + *S. aureus* em MHI (C) nas diferentes condições testadas de acordo com o esquema 1 (0h, 4h, 24h e 48h) com um tempo total de incubação de 72h. Significâncias estatísticas (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$) foram apontadas.

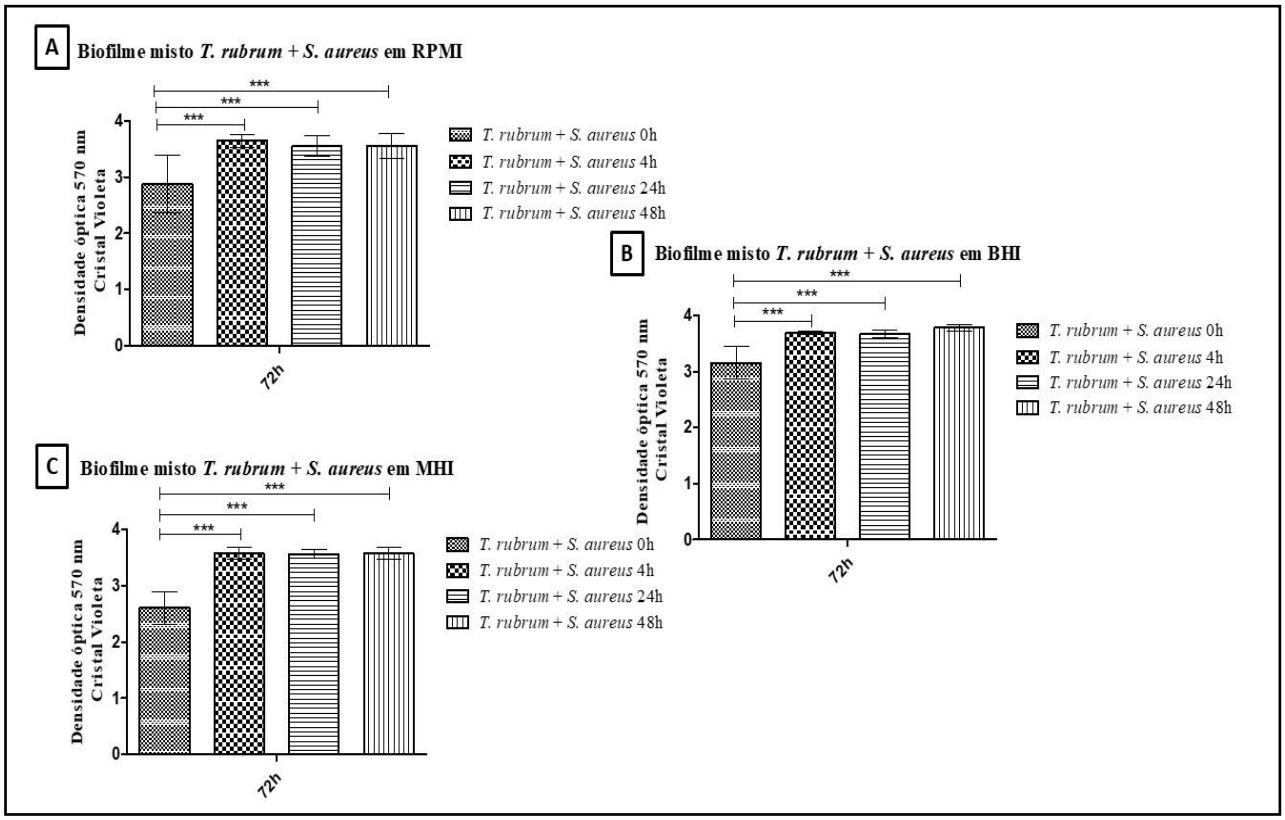
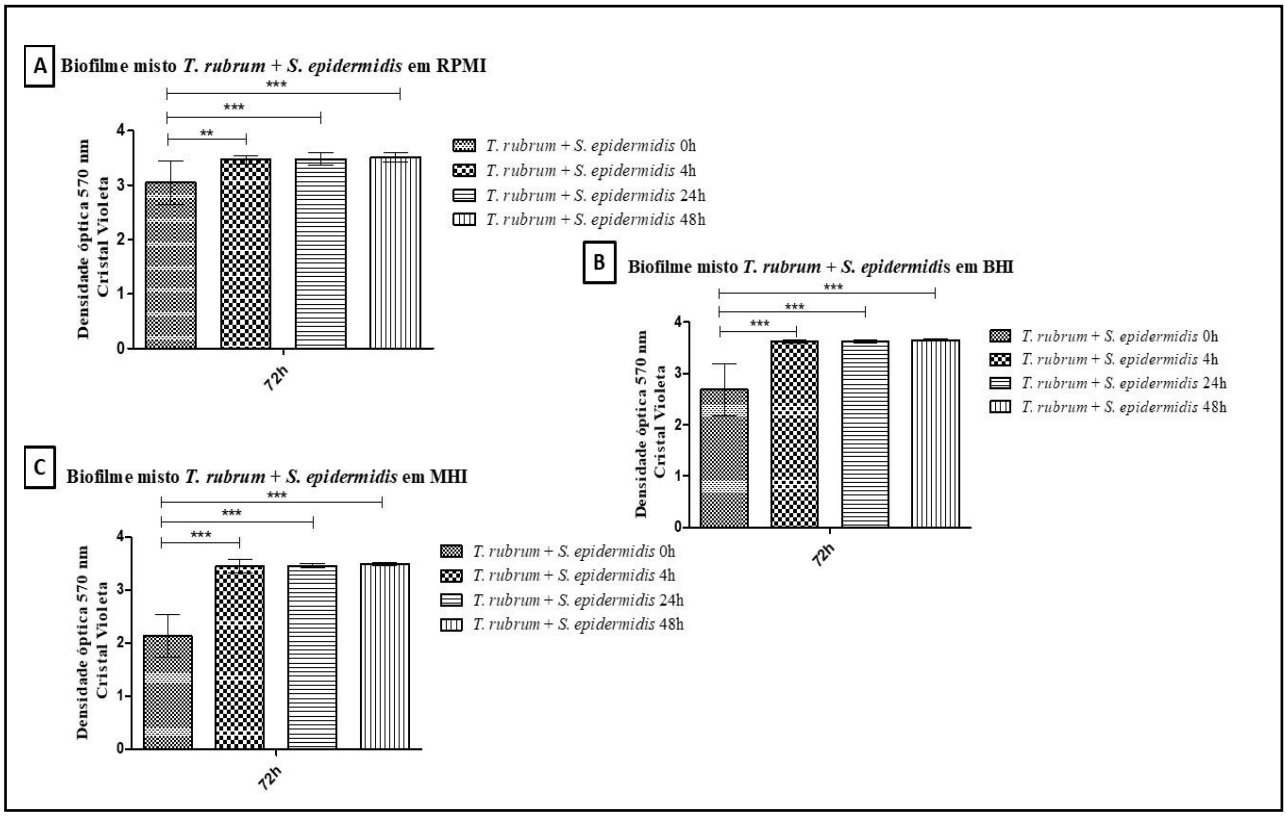


Figura 5 - Quantificação de biomassa pelo ensaio de cristal violeta (CV) dos biofilmes mistos de *T. rubrum* + *S. epidermidis* em RPMI-1640 (A), *T. rubrum* + *S. epidermidis* em BHI (B), *T. rubrum* + *S. epidermidis* em MHI (C) nas diferentes condições testadas de acordo com o esquema 1 (0h, 4h, 24h e 48h) com um tempo total de incubação de 72h. Significância estatística (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$) foram apontadas.



A observação da influência dos meios de cultura no desenvolvimento dos biofilmes mistos formados em diferentes tempos demonstrou que todos os meios proporcionaram o progresso de biomassa ao final das 72h, porém, com diferenças estatísticas entre as condições testadas.

A análise do biofilme misto entre *T. rubrum* + *S. aureus* em RPMI-1640, BHI e MHI **(Figs. 4 A, B, C)** demonstrou que na condição em que os microrganismos são colocados simultaneamente (0h), a quantificação da biomassa foi significativamente inferior quando comparada com 4h, 24h e 48h ($p < 0,001$), principalmente nos biofilmes formados em caldo MHI. O mesmo ocorreu nos biofilmes entre *T. rubrum* + *S. epidermidis* **(Figs. 5 A, B, C)**. De maneira geral, os biofilmes mistos formados em caldo MHI foram os que menos se desenvolveram quando comparados aos demais. Nas condições pós a pré-adesão, 24h e 48h, as diferenças não foram consideradas significativas. Tan et al. (2017),

demonstraram que em biofilmes mistos, constituídos de bactérias e leveduras, o meio RPMI-1640 mostra-se menos nutritivo quando comparado com BHI e *Tryptic Soy Broth* (TAN; LEONHARD; SCHNEIDER-STICKLER, 2017). De fato, quando comparamos as formulações nutricionais de BHI e RPMI-1640, o último mostra-se um pouco menos nutritivo, porém, a escassez de nutrientes é ainda maior quando comparada ao MHI. Contudo, a comparação dos resultados obtidos com os biofilmes monoespécie (controle) de *T. rubrum* **(Fig. 3A)**, *S. aureus* **(Fig. 3B)** e *S. epidermidis* **(Fig. 3C)** com os mistos nos diferentes meios **(Figs. 4 e 5)**, confirmam a influência da escassez de nutrientes proporcionada pelo MHI.

Embora não tenha sido quantificada a biomassa com 0h e 4h nos biofilmes monoespécie bacteriano, a mesma manteve-se em fase exponencial nas primeiras 24h, seguido de leve aumento na biomassa em 48h nos meios RPMI-1640 e MHI e atingindo o platô com 72h; isto sugere que nos biofilmes mistos entre *T. rubrum* e *Staphylococcus* spp. a biomassa bacteriana permaneceu elevada em todas as condições em que foi adicionada ao biofilme fúngico até o final das 72h.

Situação distinta ocorreu quando comparados os biofilmes mistos **(Figs. 4 e 5)** com o de *T. rubrum* monoespécie **(Fig. 3A)**. Apesar de não ter sido quantificada a biomassa sem a pré-adesão (0h) e após a pré-adesão (4h), nas primeiras 24h de incubação, a quantidade de biomassa já foi escassa, diferentemente do que acontece nos biofilmes mistos, que apresentaram resultados elevados nestas condições.

Populações bacterianas coordenam seu comportamento de maneira dependente da densidade populacional a partir do seu sistema *quórum sensing* de comunicação que desempenha um papel em vários mecanismos e permite a produção de moléculas sinalizadoras e seu posterior acumulo no meio (SCHILCHER; HORSWILL, 2020). Em biofilmes fúngicos, o sistema de comunicação também é importante durante o desenvolvimento do biofilme e no processo infeccioso, especialmente na disseminação e morfogênese celular. Ramage et al. (2002), demonstraram que o farnesol, uma molécula de detecção de quórum, pode comprometer a estrutura do biofilme de *C. albicans*, inibindo

o desenvolvimento de hifas durante a fase inicial de formação do biofilme (RAMAGE *et al*., 2002). Nossos resultados sugerem que, na formação dos biofilmes mistos, os tempos iniciais de 0 h, 4 h e 24 h são de predomínio bacteriano e que essa superioridade foi possivelmente devido a sua velocidade de replicação/crescimento ser mais rápida que a do dermatófito e, consequentemente, atingir primeiro a maturação. Como observado nos biofilmes monoespécie, com 48 h de incubação, tanto *T. rubrum* quanto *S. aureus* e *S. epidermidis* apresentaram valores de biomassa elevados, portanto, sugere-se uma interação positiva entre as comunidades nos biofilmes mistos com a presença de células fúngicas e bacterianas neste período. Estes resultados puderam ser analisados e mais bem discutidos com a análise da atividade metabólica por XTT e análise topográfica por MEV.

A formação de biofilme *in vitro* é dependente da adesão e do tempo de incubação, para ambos os microrganismos, sugerindo uma regulação positiva dos genes formadores de biofilmes. Considerando o tempo 0 h no qual os dois microrganismos foram adicionados simultaneamente, o biofilme misto demonstrou uma menor biomassa nos três meios de cultura em comparação as demais condições. Isso, pode estar relacionado a falta de pré-adesão do biofilme fúngico e, até mesmo, pela competição de nutrientes e locais de adesão entre ambos os microrganismos. Segundo Costa-Orlandi et al. (2017), a formação do biofilme de dermatófitos consiste em um processo coordenado que envolve etapas para sua formação. O estágio de adesão tem sido considerado essencial para o desenvolvimento do biofilme (GARCIA *et al*., 2020) e um e um pré-requisito para a colonização no tecido do hospedeiro e consequente estabelecimento da infecção (ZURITA; HAY, 1987; BALDO *et al*., 2012; HO *et al*., 2020; CIESIELSKA; STACZEK, 2021), uma vez que neste período, os conídios e fragmentos de hifas, entram em contato com a superfície e as adesinas começam a ser secretadas pelos artroconídios e se ligam ao estrato córneo do hospedeiro. Segundo Zurita e Hay (1987) a adesão de fungos dermatófitos é dependente do tempo e ocorre entre 3 e 4 h.

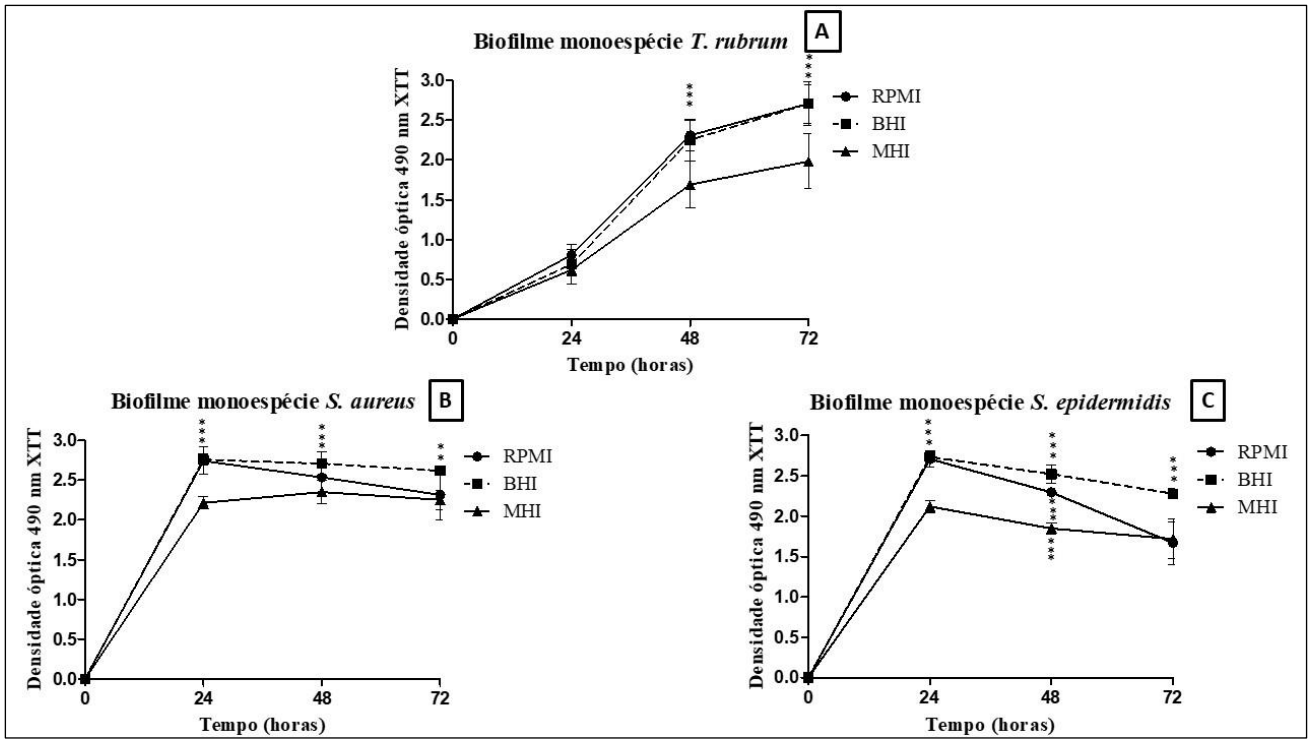
Em um modelo de placa ungueal, a aderência e germinação de artroconídios de *T. mentagrophytes* foi observada após 6 h de inoculação; o crescimento de hifas, no entanto, só foi

observado 10 h depois (RASHID; SCOTT; RICHARDSON, 1995). Em outro estudo, com modelos *ex vivo* de cortes de pele humana, o tempo necessário para a adesão e germinação foi ainda maior (DUEK *et al*., 2004). De acordo com Ciesielska & Staczek., (2021) existem genes que são responsáveis por promover condições indutoras de adesão a superfície do hospedeiro em resposta a diferentes fontes nutricionais. Além do mais, o processo de pré-adesão pode beneficiar o desenvolvimento de espécies em biofilmes mistos. Garcia et al. (2020), demonstraram que a pré-adesão de *T. rubrum* favoreceu o desenvolvimento das hifas do dermatófito nos biofilmes mistos, estabelecidos entre *T. rubrum* e *Candida albicans*/*Candida parapsilosis*, enfatizando que o processo é de extrema importância para a expansão do biofilme e implantação da infecção.

4.1.3 Determinação da atividade metabólica dos biofilmes monoespécie pelo ensaio de redução do XTT

A cinética das atividades metabólicas dos biofilmes formados pelas cepas de *T. rubrum*, *S. aureus* e *S. epidermidis* frente aos diferentes meios de cultura testados estão demonstrados nas **Figuras 6 A, B e C**. Os resultados corroboram com os observados no ensaio de CV. As cepas foram capazes de formar biofilme em todos os três meios de cultura testados e o meio BHI foi o que proporcionou uma maior atividade metabólica dos biofilmes bacterianos e igualou-se à do RPMI-1640 no biofilme fúngico. As comunidades monoespécies formadas por *T. rubrum* apresentaram um padrão de crescimento exponencial até as 72 h **(Fig. 6A)**; já as atividades metabólicas de *S. aureus* e *S. epidermidis* apresentaram um crescimento acentuado da atividade nas primeiras 24h, seguido de um platô e ligeiro declínio até as 72h **(Figs. 6 B e C)**, como esperado.

Figura 6 - Caracterização da atividade metabólica pelo ensaio de redução do XTT e leitura da absorbância a 490 nm dos biofilmes monoespécie de *T. rubrum* ATCC 28189 (A), *S. aureus* ATCC 25923 (B) e *S. epidermidis* ATCC 12228 (C), formados em RPMI-1640, BHI e MHI em diferentes tempos de incubação (24h, 48h e 72h). Significância estatística (** p < 0,01 comparação entre BHI vs RPMI e MHI) e (*** p < 0,001 comparação entre BHI e RPMI vs MHI).



Os resultados da quantificação da atividade metabólica do biofilme de *T. rubrum* mostraram que a quantidade de células metabolicamente ativas aumentou substancialmente até 72 h, com um pico de crescimento após 24 h em todos os meios testados **(Fig. 6A)**. Ao comparar os três meios, as comunidades formadas em MHI foram significativamente inferiores as atividades das células no meio BHI e RPMI-1640 (p < 0,001) no período de 48 h e 72 h de incubação. Os meios BHI e RPMI-1640 tiveram resultados semelhantes quanto ao aumento da atividade metabólica do biofilme, sem diferenças estatísticas observadas.

No biofilme de *S. aureus* **(Fig. 6B)**, o meio BHI e RPMI-1640 estimularam maior atividade metabólica dos biofilmes em 24 h quando comparado ao meio MHI (p < 0,001). No entanto, com 48 h as atividades metabólicas das comunidades formadas decaíram, especialmente em RPMI-1640 e mantiveram-se constantes em BHI e MHI (p < 0,001). Finalmente, com 72 h, observou-se um platô

nos meios MHI e BHI e uma diminuição da atividade metabólica em RPMI-1640 equiparando ao MHI e menores, comparativamente, ao meio BHI ($p < 0,01$).

Por fim, no biofilme de *S. epidermidis,* a atividade metabólica começou a diminuir após 24 h de incubação em todos os meios de cultura **(Fig. 6C)**. A comparação entre os meios demonstrou diferenças consideráveis, principalmente em relação ao MHI com os demais meios no período de 24 e 48 h ($p < 0,001$). Com 72 h, a comparação entre MHI e RPMI-1640 não apresentou diferença estatística; no entanto, quando comparados com o meio BHI, houve diferença ($p < 0,001$).

De modo geral, a cinética de formação destas comunidades e, consequentemente, a quantidade de células metabolicamente ativas é mais tardia em biofilmes fúngicos quando comparados à cinética de formação bacteriana. Biofilmes de *Staphylococcus* spp. apresentam um crescimento de células exponencial nas primeiras horas de incubação. Recentemente, foi analisado o tempo de curso da formação de biofilme *in vitro* com o meio sal manitol e com o meio de plasma humano em duas cepas de *S. aureus,* no qual os autores puderam detectar crescimento bacteriano em momentos precoces da formação. O estudo evidenciou a partir da intensidade de bioluminecência, imagens de MEV e análises de qRT-PCR 16S rRNA, que a cinética de formação do biofilme começou via aderência bacteriana imediata a superfície, no momento em que foi colocado o inóculo (0 h) e a 3 h; a partir de então, a formação de biofilme atingiu um pico de crescimento variando de 6 h a 9 h a depender da cepa (SUTIPORNPALANGKUL; NISHITANI; SCHWARZ, 2021). Em estudo prévio de biofilmes de *T. rubrum*, a quantificação da atividade metabólica pôde ser medida a partir de 3 h e apresentou pequenos aumentos em 12 a 24 h. O crescimento significativo só ocorreu a partir das 24 h, sendo 48 h e 72 h os períodos em que a atividade metabólica apresentou crescimento exponencial (COSTA-ORLANDI et al., 2014).

4.1.4 Determinação da atividade metabólica dos biofilmes mistos pelo ensaio de redução do XTT

Os resultados da cinética das atividades metabólicas dos biofilmes mistos formados indicaram que os três meios de cultura foram eficientes na maioria das condições avaliadas **(Figs. 7 e 8)**. E, mais

uma vez, o BHI proporcionou maior atividade metabólica, tanto nos biofilmes constituídos de *T. rubrum* + *S. aureus* **(Fig. 7B)**, quanto nos de *T. rubrum* + *S. epidermidis* **(Fig. 8B)**. Independente do tempo de formação dos biofilmes mistos (0 h, 4 h, 24 h e 48 h), as células permaneceram viáveis, com absorbâncias elevadas. A atividade metabólica dos biofilmes mistos foi comparada à obtida nos biofilmes monoespécie.

Figura 7 - Caracterização da atividade metabólica pelo ensaio de redução do XTT dos biofilmes mistos de *T. rubrum* + *S. aureus* em RPMI-1640 (A), *T. rubrum* + *S. aureus* em BHI (B), *T. rubrum* + *S. aureus* em MHI (C), nas diferentes condições testadas (0h, 4h, 24h e 48h) com um tempo total de incubação de 72h. Significância estatística (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$) foram apontadas.

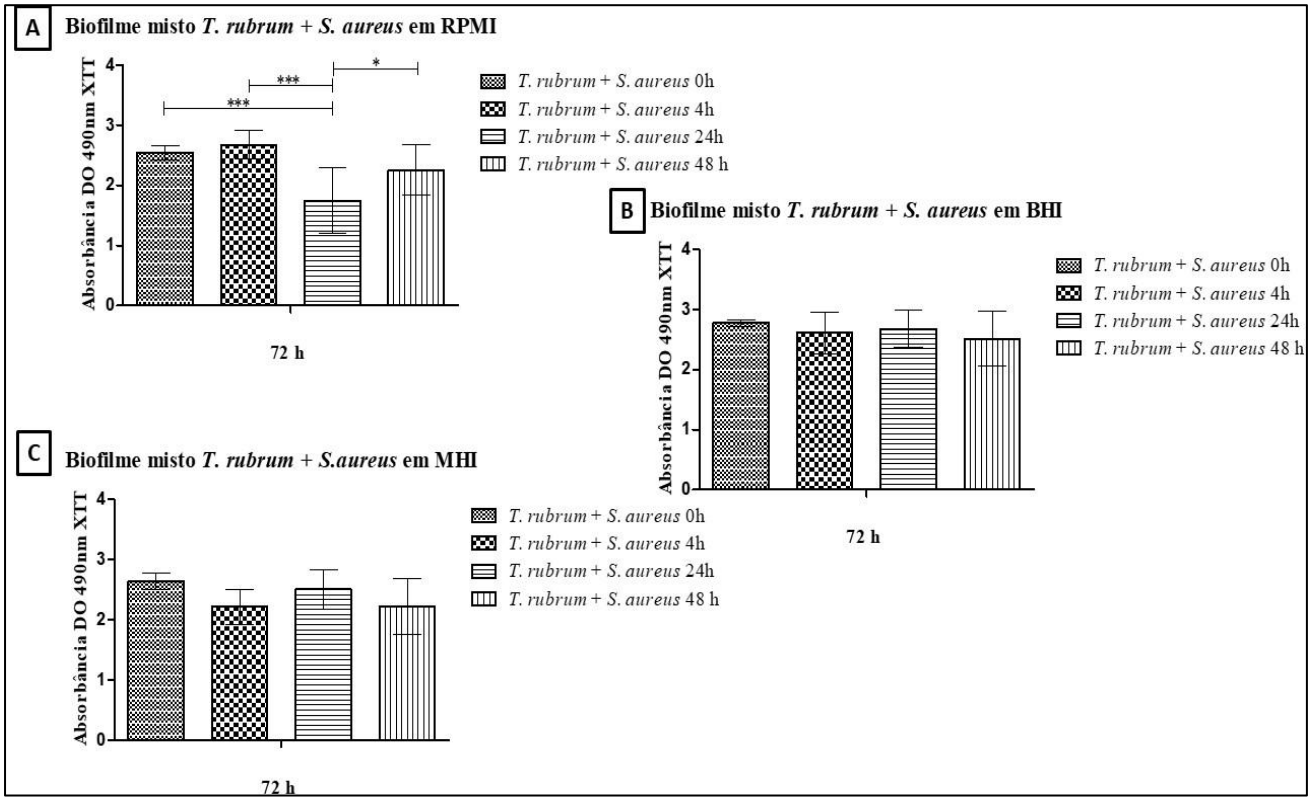
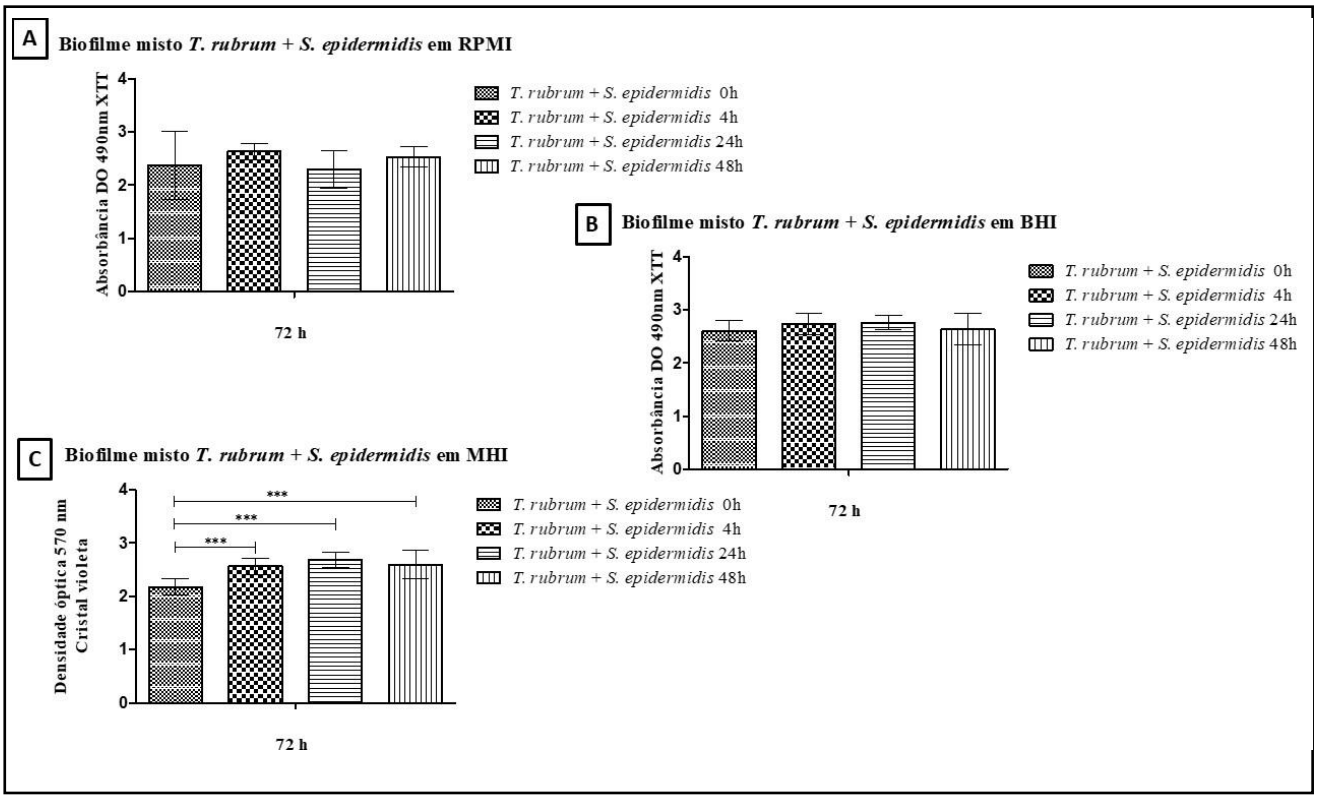


Figura 8 - Caracterização da atividade metabólica pelo ensaio de redução do XTT dos biofilmes mistos de *T. rubrum* + *S. epidermidis* em RPMI-1640 (A), *T. rubrum* + *S. epidermidis* em BHI (B), *T. rubrum* + *S. epidermidis* em MHI (C) das diferentes condições testadas (0h, 4h, 24h e 48h) com um tempo total de incubação de 72h. Significância estatística (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$) foram apontadas.



Comparando as distintas condições de formação, diferenças estatísticas foram observadas entre o biofilme de *T. rubrum* + *S. aureus* em RPMI-1640 **(Fig. 7A)** e entre *T. rubrum* + *S. epidermidis* em MHI **(Fig. 8C).** Quando *S. aureus* foi adicionado ao biofilme de *T. rubrum*, após 24 h da sua formação, a atividade metabólica foi significativamente inferior às condições 0 h e 4 h ($p < 0,001$) e 48 h ($p < 0,05$) **(Fig. 7A)**. Em *T. rubrum* + *S. epidermidis*, a condição em que os inóculos bacteriano e fúngico foram adicionados simultaneamente (0 h) em meio MHI, a atividade metabólica foi inferior às demais condições (4 h, 24 h e 48 h) ($p < 0,001$) **(Fig. 8C)**.

Como observado no biofilme monoespécie de *S. aureus* e *S. epidermidis* ambos apresentam um pico de atividade metabólica com 24 h de incubação seguido de um ligeiro decaimento até o final das 72 h **(Figs. 6B e C)**. Portanto, independente das condições em que as bactérias foram adicionadas ao inóculo fúngico no biofilme misto, suas atividades metabólicas elevam-se nos primeiros períodos e

permanecem estáveis até o final da incubação em 72 h. Um comportamento distinto ocorreu com *T. rubrum*. Como dito anteriormente, nos tempos iniciais da formação de biofilme propostos (0 h, 4 h e 24 h), a taxa de crescimento fúngico foi escassa e os resultados demonstraram valores de atividade metabólica relativamente baixos, enquanto o crescimento bacteriano encontrou-se em fase exponencial neste período. Portanto, a hipótese da prevalência de *S. aureus* e *S. epidermidis* nos biofilmes mistos formados em 0 h, 4 h e 24 h manteve-se e pôde ser confirmada nas topografias dos biofilmes.

4.1.5 Observação e caracterização topográfica dos biofilmes monoespécie e mistos por Microscopia Eletrônica de Varredura

Para agregar consistência aos resultados dos ensaios de redução do XTT e CV nos biofilmes de *T. rubrum* e das bactérias *S. aureus* e *S. epidermidis* tanto monoespécie quanto mistos, foi conduzida a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Embasado nos resultados dos ensaios anteriores, o meio de cultura BHI estimulou os biofilmes monoespécie e mistos à maior produção de biomassa e maior atividade metabólica. Dessa maneira, elegeu-se este meio para os ensaios de MEV.

As topografias dos biofilmes mistos de *T. rubrum* + *S. aureus* e *T. rubrum* + *S. epidermidis* estabelecidas nas quatro situações experimentais foram analisadas e comparadas com biofilmes monoespécie com ampliação de 1000x a 3000x **(Figs. 09 a 12)**. As análises microscópicas foram realizadas em duplicata em dois experimentos independentes.

Figura 9 - Eletromicrografias dos biofilmes monoespécie de *T. rubrum* ATCC 28189 (**a, b**) e *S. aureus* ATCC 25923 (**c, d**) e biofilmes mistos de *T. rubrum* + *S. aureus* quando adicionados simultaneamente (0 h) (**e, f**) e quando formado com a adição das suspensões de *S. aureus* após a pré-adesão (4 h) do biofilme de *T. rubrum* **(g, h)**. Todos os biofilmes foram analisados com um tempo total de 72 h de incubação. As setas brancas indicam as estruturas na forma de cocos de *S. aureus* e as setas vermelhas indicam as hifas de *T. rubrum*. Ampliação de 1000x (primeira linha) e 3000x (segunda linha).

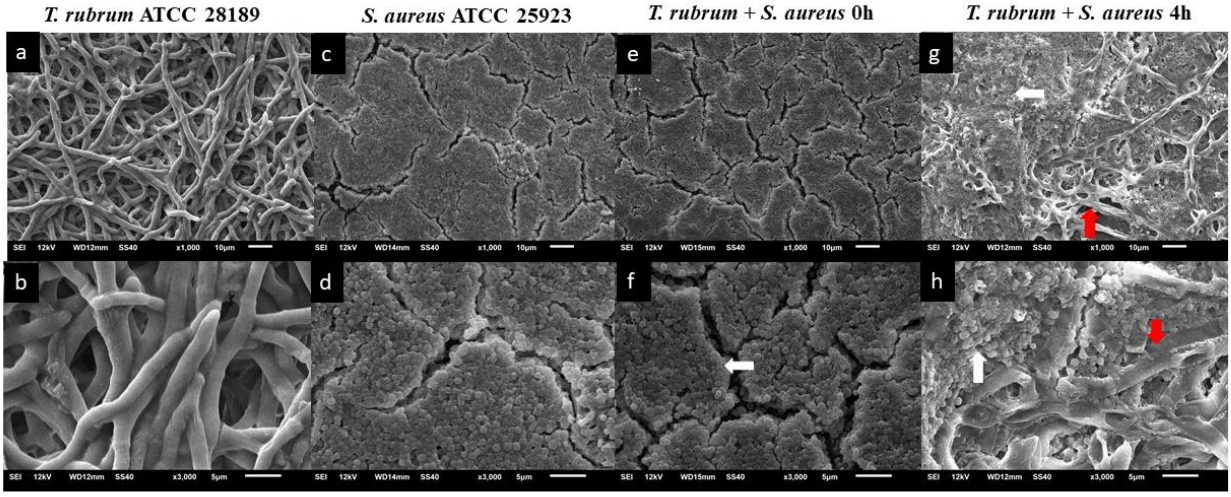
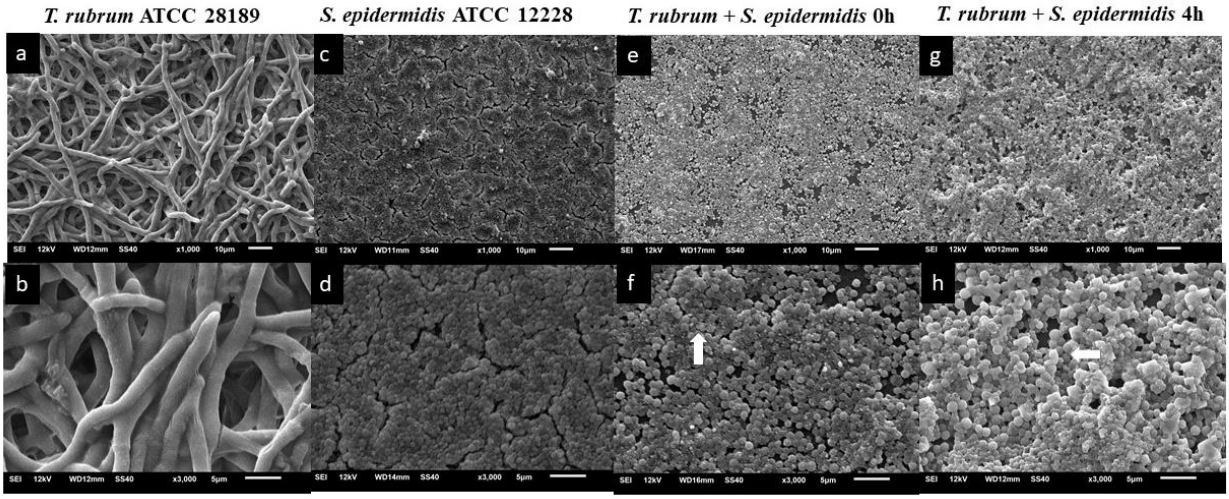


Figura 10 - Eletromicrografias dos biofilmes monoespécie de *T. rubrum* ATCC 28189 (**a,b**) e *S. epidermidis* ATCC 12228 (**c,d**) e biofilmes mistos de *T. rubrum* + *S. epidermidis* quando adicionados simultaneamente (0h) (**e,f**) e quando formado com a adição das suspensões de *S. epidermidis* após a pré-adesão do biofilme de *T. rubrum* (4h) **(g,h).** Todos os biofilmes foram analisados com um tempo total de 72h de incubação. As setas brancas indicam as estruturas na forma de cocos de *S. epidermidis.* Ampliação de 1000x (primeira linha) e 3000x (segunda linha).



As eletromicrografias dos biofilmes monoespécie de *T. rubrum* evidenciam uma densa rede de hifas alongadas por toda a extensão do biofilme, cobertas por um denso material polissacarídeo (**Figs. 9 e 10 - a, b**). Considerando os biofilmes de *S. aureus* (**Fig. 9 – c, d**), as imagens mostram uma massa celular densa, uniforme e organizadas em torno de uma matriz polimérica que garante a união das células bacterianas. Quando as suspensões de *T. rubrum* e *S. aureus* foram colocadas simultaneamente para a formação do biofilme misto (**Fig. 09- e, f**) não foi possível observar a presença de hifas formadas pelo dermatófito nas imagens topográficas. No entanto, uma grande quantidade de células na forma de cocos (representados pelas setas brancas) foi observada, sugerindo que nesta condição de interação entre os microrganismos a falta de pré-adesão de *T. rubrum* afetou o seu desenvolvimento e garantiu a predominância de *S. aureus*, confirmando a hipótese descrita nos ensaios anteriores (XTT e CV) da prevalência de *S. aureus* em relação a *T. rubrum* nas primeiras horas de formação do biofilme misto. No entanto, quando as suspensões foram adicionadas após 4 h de pré-adesão do dermatófito (**Fig. 9 - g, h**) alguns campos das eletromicrografias evidenciaram a presença de hifas alongadas com numerosos cocos sobrepostos demonstrando o importante papel da pré-adesão para o desenvolvimento do biofilme fúngico.

No biofilme misto entre *T. rubrum* e *S. epidermidis* resultados semelhantes foram encontrados (**Fig. 10**). Assim como no biofilme de *S. aureus*, o biofilme de *S. epidermidis* apresentou uma massa celular uniforme, organizada e densa, cobertas por uma matriz de exopolissacarídeos que garante a união das células bacterianas (**Fig. 10 - c, d**). A condição em que a suspensão bacteriana foi adicionada simultaneamente ao *T. rubrum* (0 h) (**Fig. 10 - e, f**) mostrou grande quantidade de células bacterianas aderidas e organizadas (representadas pelas setas brancas) que novamente prevaleceram em relação a *T. rubrum*, não sendo possível observar de forma confiável a presença de hifas. A mesma situação também ocorreu na condição em que a suspensão bacteriana foi adicionada após 4 h de pré-adesão e diferentemente do biofilme com *S. aureus* não foi possível identificar a presença de hifas em todos os experimentos realizados (**Fig. 10 - g, h**).

Figura 11 - Eletromicrografias dos biofilmes monoespécie de *T. rubrum* ATCC 28189 (a,b) e *S. aureus* ATCC 25923 (c, d) e biofilmes mistos de *T. rubrum* + *S. aureus* formados após 24h (e, f) e 48h (g, h), de maturação do biofilme de *T. rubrum*. Todos os biofilmes foram analisados com um tempo total de 72h de incubação. As setas brancas indicam as estruturas na forma de cocos de *S. aureus* e as setas vermelhas indicam as hifas de *T. rubrum.* Ampliação de 1000x (primeira linha) e 3000x (segunda linha).

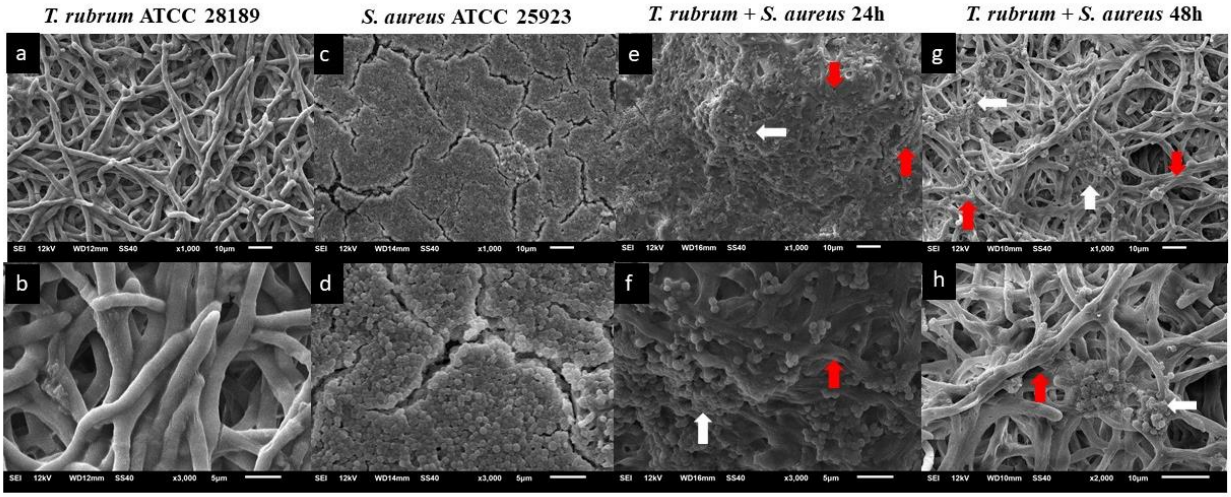
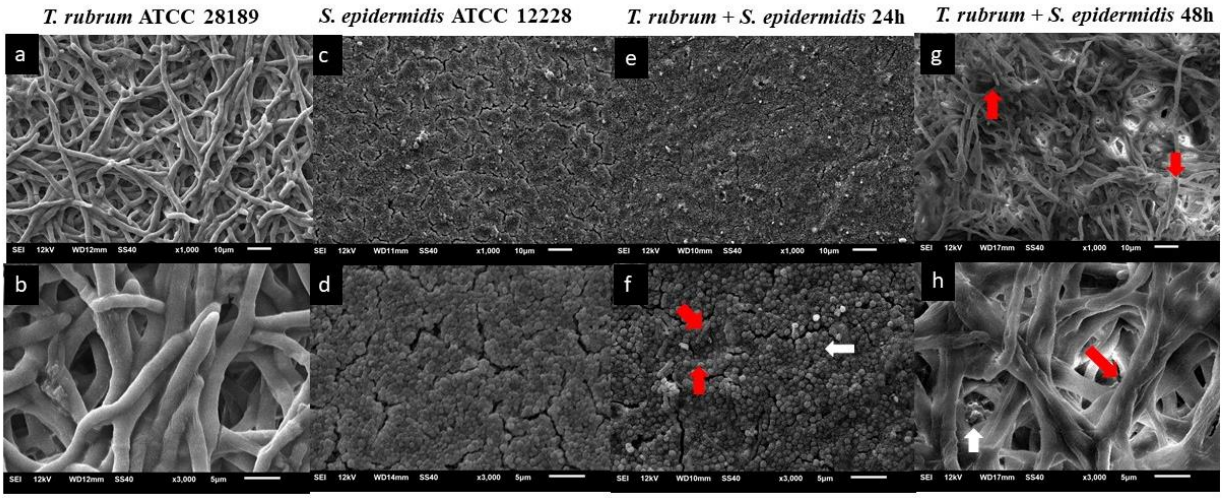


Figura 12 - Eletromicrografias dos biofilmes monoespécie de *T. rubrum* ATCC 28189 **(a, b)** e *S. epidermidis* ATCC 12228 **(c, d)** e biofilmes mistos de *T. rubrum* + *S. epidermidis* formados após 24h **(e, f)** e 48h **(g, h),** de maturação de *T. rubrum*. Todos os biofilmes foram analisados com um tempo total de 72h de incubação. As setas brancas indicam as estruturas na forma de cocos de *S. epidermidis* e as setas vermelhas indicam as hifas de *T. rubrum.* Ampliação de 1000x (primeira linha) e 3000x (segunda linha).



As topografias das interações fungo-bactéria nas condições de formação finais (24 h e 48 h) são descritas nas **Figs 11 e 12**. A condição em que a suspensão de *S. aureus* foi adicionada após 24 h

de formação do biofilme de *T. rubrum* (**Fig. 11 - e, f**) mostrou a presença de hifas, de aspecto consideravelmente denso e com uma biomassa robusta. Assim como na interação de 4 h uma quantidade razoável de cocos aglomerados (setas brancas) aparece sobre as hifas de *T. rubrum* (setas vermelhas). No entanto, bem mais dispersos do que o controle (monoespécie), sugerindo que a interação com a prevalência de *T. rubrum* afetou os mecanismos de adesão célula/célula e célula/matriz de *S. aureus.* Outro fato intrigante foi a observação de que mesmo sem superfície para o seu crescimento e desenvolvimento completo, por conta da prevalência de *T. rubrum* nesta condição, algumas células bacterianas foram capazes de aderir às hifas dos dermatófitos, utilizando-as como arcabouço e crescendo sobre elas. Já na última condição experimental, na qual a bactéria foi adicionada ao biofilme de *T. rubrum* após 48 h de incubação (**Fig. 11 - g, h**) evidenciou-se a presença de hifas, recobertas por densa matriz, semelhante ao controle (setas vermelhas) e, em contrapartida, uma mínima quantidade de cocos de *S. aureus* aderidos (setas brancas), sugerindo o predomínio do dermatófito nesta condição.

Por fim, na **Fig. 12**, as eletromicrografias da interação entre *T. rubrum* e *S. epidermidis* nas condições de 24 h (**Fig. 12 - e, f**) mostraram que as hifas de *T. rubrum* estavam pouco desenvolvidas e escassas, sendo quase impossível de observá-las (setas vermelhas), diferentemente do que aconteceu no biofilme monoespécie (**Fig. 12 - a, b**). No entanto, uma grande quantidade de cocos de *S. epidermidis* foi demonstrada, embora bem mais dispersas, em arranjos simples (seta branca) e com pouca matriz exopolimérica. Na última condição, na qual, a suspensão de *S. epidermidis* foi adicionada ao biofilme fúngico com 48 h de formação, poucas células bacterianas foram observadas no campo da imagem (**Fig. 12 - g, h**). Em contraste, *T. rubrum* apresentou um biofilme praticamente estabelecido, com predomínio de hifas quando comparados aos cocos, porém pouco desenvolvidas, com aspecto colapsado, com o material polissacarídeo fino, diferente daquele observado no biofilme monoespécie de *T. rubrum* (**Fig. 12 - a, b**).

Os métodos de quantificação (XTT e CV) com complementação da análise topográfica (MEV) possibilitou uma melhor observação da interação fungo-bactéria em cada condição de formação de biofilme proposta. Ao observarmos o metabolismo de ambos, *Staphylococcus* spp. apresenta velocidade de replicação/crescimento muito mais veloz, quando comparada ao crescimento de *T. rubrum*, além de atingirem a maturação bem antes das 72 h necessárias para o dermatófito. Embora a incubação ocorra até o final das 72 h em todas as condições, provavelmente a competição por nutrientes e locais de adesão entre os microrganismos nos tempos iniciais prejudica o desenvolvimento e o estabelecimento do biofilme de *T. rubrum*. Além disso, neste período, a interação antagônica *in vitro* promovida por parte de *S. aureus* e *S. epidermidis* com o dermatófito pode ser decorrente de produtos secretados no meio por parte das bactérias. Dados similares foram relatados para biofilmes mistos entre espécies de *Candid*a spp. e *T. rubrum* (GARCIA et al., 2020).

Os biofilmes mistos entre *T. rubrum* + *S. aureus* e *T. rubrum* + *S. epidermidis*, especialmente nas condições iniciais formaram uma rede densa de cocos aglomerados bem evidenciados, assemelhando-se a estruturas tridimensionais, o que sugere que a interação com *T. rubrum* não prejudicou o desenvolvimento do biofilme maduro de ambas as espécies bacterianas, esses dados poderão ser mais bem observados nas imagens de CLSM. Biofilmes de *Staphylococcus* não são caracterizados por desenvolver-se uniformemente na superfície. A síntese dos componentes da matriz extracelular permite que as células proliferem e amadureçam em estruturas tridimensionais com grande quantidade de polissacarídeos, mediado pela adesão célula-célula e componentes da matriz, apresentando estruturas semelhantes a torres, importantes para a patogenia dos biofilmes (MOORMEIER et al., 2014; SCHILCHER; HORSWILL, 2020). As estruturas tridimensionais foram descritas anteriormente por Costerton et al. (1995), e se desenvolvem intercaladas por canais de fluido, moldadas por inúmeras enzimas e moléculas que podem degradar ou interromper a matriz do biofilme (SCHILCHER; HORSWILL, 2020).

A abundância de *S. aureus* e *S. epidermidis* no presente estudo está de acordo com a literatura para biofilmes de dupla-espécie, entre *S. aureus* e *C. albicans* (KONG *et al*., 2016) e de três espécies, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *C. albicans* (KART *et al*., 2014) e *S. aureus, Escherichia coli* e *Candida albicans* (RUIZ-SORRIBAS *et al*., 2021).

O fato das células bacterianas, nas condições finais, apresentarem a capacidade de aderir às hifas dos dermatófitos e usá-las como superfície para o crescimento também foi observado por Peters et al. (2012) e De Brucker et al. (2015) em biofilmes mistos de *S. aureus* + *C. albicans* e *E. coli* + *C. albicans*, respectivamente. Essa interação pode permitir que as células bacterianas se privilegiem dos produtos fúngicos secretados além de conferir tolerância a antibióticos (KONG *et al*., 2017). Embora o desenho experimental utilizado nos biofilmes mistos não permita discernir a origem da matriz, sabe-se que a matriz de mucopolissacarídeos é característica do biofilme de *T. rubrum* e *Staphylococcus* spp. e contribui para a sua estruturação e proteção.

4.1.6 Quantificação de biofilmes monoespécie e mistos pelo método de plaqueamento em ágar em meio seletivo

Para esses ensaios, o desenvolvimento dos biofilmes mistos também foi realizado em meio BHI. Seguiu-se o plaqueamento em meios distintos; placas de Petri com ágar Mycosel foram empregadas para obtenção das colônias de *T. rubrum*, e a contagem de colônias obtidas para os biofilmes monoespécie, incubados até 72 h, foram utilizadas como controle. A contagem de UFC das cepas bacterianas nos biofilmes mistos foi feita em placas contendo o meio ágar sal Manitol e, também, foi comparada com biofilmes monoespécie após 72 h de incubação. Neste estudo, a quantificação de UFC foi utilizada para complementar os ensaios colorimétricos anteriores bem como a observação topográfica por MEV. Os resultados estão demonstrados nas **Figs 13 e 14**.

Figura 13 - Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL) de *T. rubrum* isoladas em ágar Mycosel de biofilmes de dupla espécie entre *T. rubrum* + *S. aureus* (**A**) e *T. rubrum* + *S. epidermidis* (**B**) comparados com biofilme monoespécie de *T. rubrum* (controle). Todos os biofilmes formados nas diferentes condições propostas (0h, 4h, 24h e 48h) tiveram um tempo total de incubação de 72h. Significância estatística (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$) foi apontada.

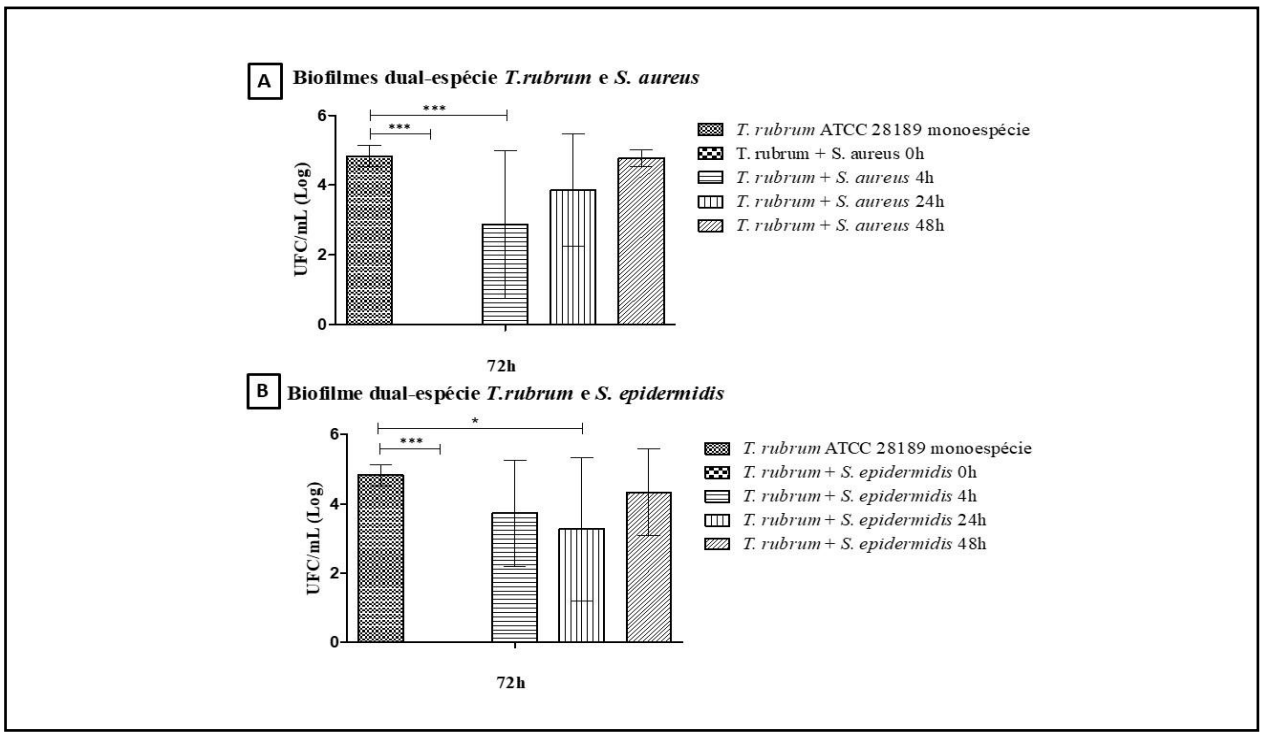
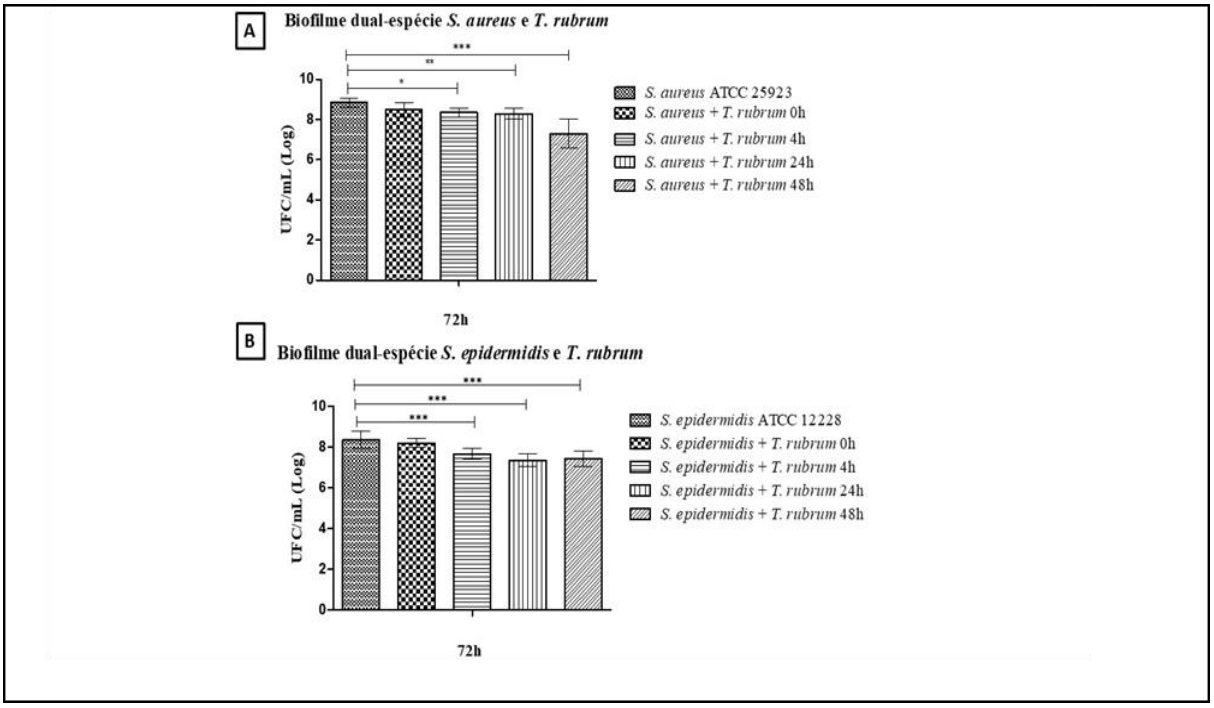


Figura 14 - Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL) de *S. aureus* e *S. epidermidis* isoladas em ágar Manitol de biofilmes de dupla espécie entre *S. aureus* + *T. rubrum* (**A**) e *S. epidermidis* + *T. rubrum* (**B**) comparados com biofilme monoespécie de *S. aureus* e *S. epidermidis* (controle) formados nas diferentes condições propostas (0h, 4h, 24h e 48h) com um tempo total de 72h de incubação. Significância estatística (* p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001) foi apontada.



A determinação das UFC/mL, apesar de ser considerada uma técnica trabalhosa, é um método acurado para isolar diretamente os distintos microrganismos dentro do biofilme polimicrobiano, sendo que a utilização de meios de cultura específicos para cada organismo contribuem para a eficácia do ensaio (DOS SANTOS *et al*., 2016). Muitos autores descrevem o uso do método para caracterizar seus biofilmes (GARCIA *et al*., 2020; YADAV *et al*., 2017).

Conjuntamente, os dados mostraram que quando *S. aureus* e *S. epidermidis* foram adicionadas aos biofilmes com 48 h, o número de UFC/mL de *T. rubrum* foi semelhante ao biofilme monoespécie, no entanto, nas condições em que as bactérias foram adicionadas nos tempos iniciais do biofilme (0 h, 4 h e 24 h), as cargas fúngicas foram consideravelmente inferiores ao monoespécie, obtendo uma relação antagônica no crescimento e confirmando a dificuldade no desenvolvimento de *T. rubrum*, seja pela diferença entre os metabolismos na velocidade de replicação, pela competição por nutrientes e

locais de adesão ou por possíveis produtos secretados por *Staphylococcus* spp., já supostos nos ensaios anteriores.

Relações sinérgicas, antagônicas ou neutras podem ser encontradas em biofilmes mistos e, geralmente, as interações cooperativas entre duas espécies são as mais preocupantes em termos de saúde humana (BURMØLLE et al., 2014; DOS SANTOS et al., 2016). Resultados semelhantes ao nosso estudo foram relatados por Garcia et al. (2020), onde não foi possível quantificar a carga fúngica do dermatófito nos biofilmes entre *C. albicans* e *T. rubrum* (1:1). Em contraste, quando cultivados na mesma condição com *C. parapsilosis* foi possível isolá-lo (GARCIA *et al.*, 2020).

Os resultados da quantificação dos biofilmes de *Staphylococcus* spp. (**Fig. 14)** demonstram que em todas as condições do biofilme misto de *T. rubrum* + *S. aureus* **(Fig. 14A)** e *T. rubrum* + *S. epidermidis* **(Fig. 14B)** foi possível quantificar a carga bacteriana, porém com diferenças estatísticas em relação ao controle.

A interação de *S. aureus* com *T. rubrum* **(Fig. 14A)** apresentou diferenças estatísticas nas condições em que a bactéria foi adicionada após a pré-adesão de *T. rubrum* 4 h ($p < 0,05$), após 24 h ($p < 0,01$) e após 48 h ($p < 0,001$). A interação de *T. rubrum* com *S. aureus* exibiu resultados mais significativos quando *T. rubrum* está atingindo a maturação, indicando que a prevalência do dermatófito nesta condição prejudicou o número de colônias bacterianas. Resultado semelhante foi observado com o biofilme dupla espécie entre *S. epidermidis* e *T. rubrum* **(Fig. 14B)**. Não houve diferenças estatísticas em relação ao controle de *S. epidermidis* na condição (0 h), porém, apresentou grande significância em todas as outras condições estudadas (4 h, 24 h e 48 h) ($p <0,001$). Portanto, conclui-se que a interação entre os microrganismos, principalmente nos tempos finais, culminou na diminuição, em partes, do crescimento de *S. aureus e S. epidermidis*. O estabelecimento do biofilme de *T. rubrum* com 48 h prejudicou o desenvolvimento de *Staphylococcus* spp. Estes resultados reforçam àqueles encontrados nos ensaios colorimétricos e, principalmente, o da MEV.

4.1.7 Observação e caracterização dos biofilmes monoespécie e mistos por Microscopia Confocal de Varredura a Laser

As imagens obtidas na microscopia confocal com os fluoróforos *Calcofluor White* e *Syto 9* estão mostradas nas **Figs 15 a 17**.

Figura 15 - Imagens de microscopia confocal de varredura a laser dos biofilmes monoespécie de *T. rubrum* ATCC 28189 **(A),** *S. aureus* ATCC 25923 **(B)** e *S. epidermidis* ATCC 12228 **(C)**. Todos os biofilmes foram analisados com um tempo total de 72h de incubação. O dermatófito foi corado com o calcoflúor White (azul) e as bactérias com Syto9 (verde).

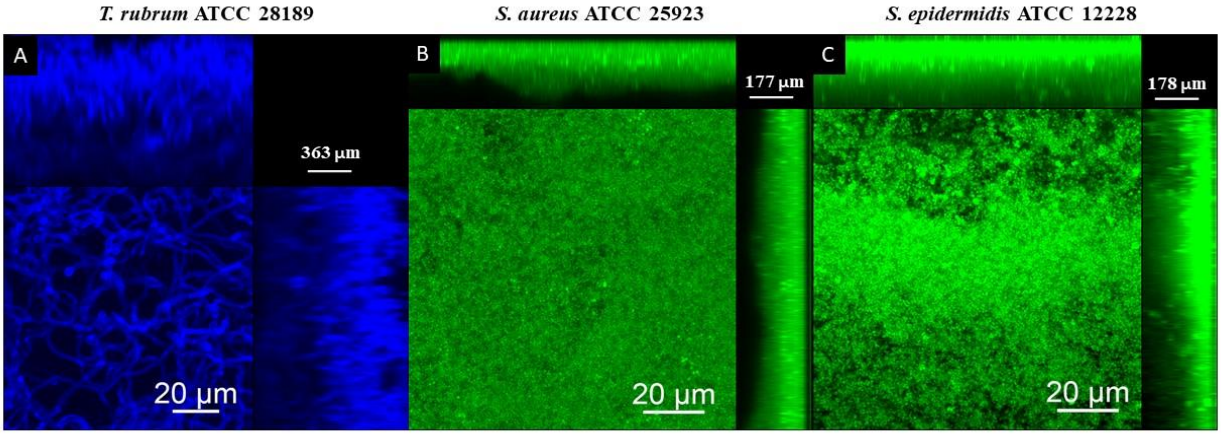


Figura 16 - Imagens de microscopia confocal de varredura a laser dos biofilmes mistos de *T. rubrum* + *S. aureus* (**A, B, C e D**) em todas as condições de formação propostas (0h, 4h, 24h e 48h). Todos os biofilmes foram analisados com um tempo total de 72h de incubação. O biofilme misto foi corado com Calcofluor White e Syto9.

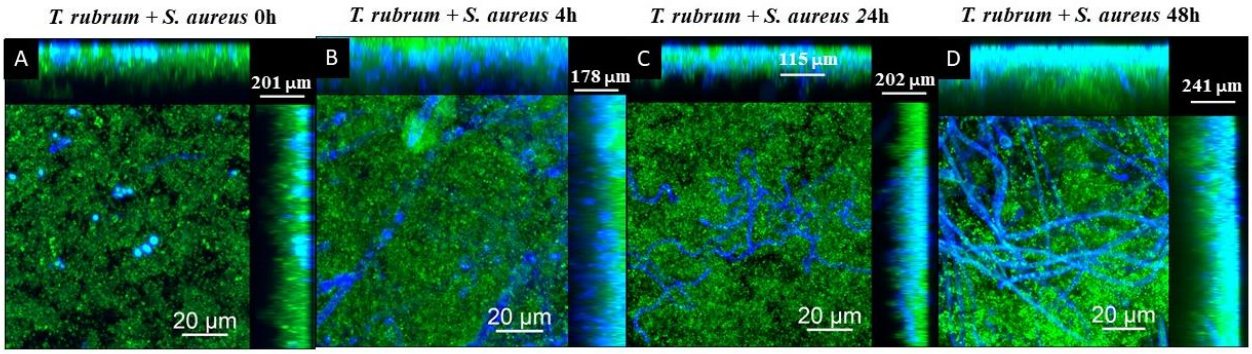
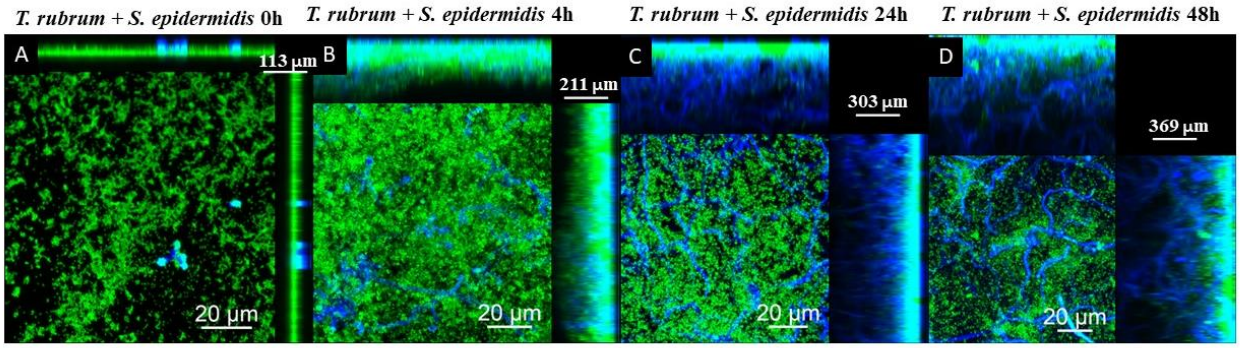


Figura 17 - Imagens de microscopia confocal de varredura a laser dos biofilmes mistos de *T. rubrum* + *S. epidermidis* (**A, B, C e D**) em todas as condições de formação propostas (0h, 4h, 24h e 48h). Todos os biofilmes foram analisados com um tempo total de 72h de incubação. O biofilme misto foi corado com Calcofluor White e Syto9.



As imagens dos biofilmes mistos confirmam os resultados encontrados nos ensaios anteriores. Houve uma forte inibição do crescimento do fungo nos tempos iniciais de formação com ambas as cepas bacterianas, apresentando hifas com forma e tamanhos irregulares. Além disso, a densidade do biofilme foi consideravelmente menor. Vale ressaltar que apenas uma hifa foi observada na interação em que foram adicionados simultaneamente com *S. aureus* e nenhuma na interação com *S. epidermidis* **(Figs. 16 e 17A),** o que reafirma o dano causado pela falta de adesão no biofilme fúngico. Os resultados corroboram com os achados de Garcia et al. (2020), em que a etapa de pré-adesão favoreceu o desenvolvimento das hifas dos dermatófitos nos biofilmes mistos com espécies de *Candida*.

Posteriormente, nas 24 h e 48 h de formação, maior massa fúngica foi observada, com hifas consideravelmente desenvolvidas e alongadas, especialmente em 48 h, porém, em menor quantidade quando comparadas ao biofilme monoespécie. Também foi possível observar numerosos estafilococos sobre às hifas e/ou componentes da matriz extracelular de *T. rubrum* **(Figs. 16 e 17C e D)**. As espessuras dos biofilmes nestas condições assemelham-se às de *T. rubrum* monoespécie, especialmente na interação com *S. epidermidis* que apresentou densidade de 369 µm.

As análises de CLSM são utilizadas, em sua maioria, para observar o efeito do dano morfológico de compostos antimicrobianos contra biofilmes (ZHANG et al., 2022; SEN *et al*., 2020). Poucos estudos relacionam o uso da técnica com a caracterização dos biofilmes de dermatófitos; Costa-

Orlandi et al. (2014) ao analisar biofilmes maduros de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* com CLSM encontrou espessuras inferiores às encontradas nesse estudo. Para *T. rubrum*, a densidade das células do biofilme corado com concanavalina A conjugado com Alexa Fluor 488 e FUN 1 foi de 249,67 μm (COSTA-ORLANDI *et al*., 2014), em nossos resultados, espessura dos biofilmes monoespécie de *T. rubrum* foi de 363 μm.

A análise por CLSM da estrutura do biofilme de duas espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase negativos formados em TSB corados com aglutinina de gérmen de trigo apresentou espessuras menores que 30 μm (FREDHEIM *et al*., 2009) o que também difere das espessuras encontradas nesse estudo, de 177 μm e 178 μm para *S. aureus* e *S. epidermidis*, respectivamente. Confirmando que os biofilmes formados foram consideravelmente robustos e bem desenvolvidos.

Dessa maneira, os achados deste estudo alavancaram os conhecimentos do grupo na temática biofilmes mistos dermatófitos-bactérias e subsidiam projetos em desenvolvimento. O uso de diferentes métodos quantitativos e qualitativos é de extrema importância para uma melhor compreensão e análise de interação entre microrganismos, devido à diferença entre os volumes das matrizes sintetizadas entre os distintos microrganismos (RUIZ-SORRIBAS et al., 2021).

4.2. Determinação e quantificação da presença de células persistentes

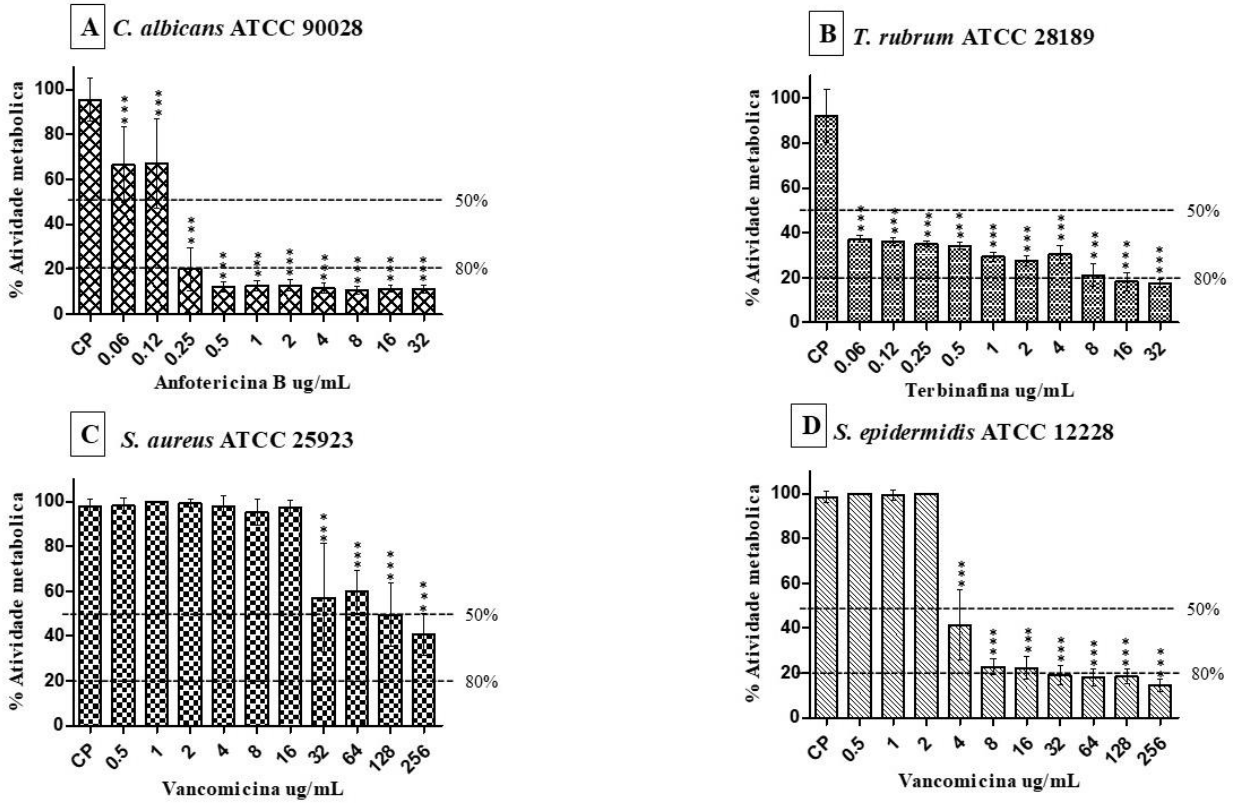
4.2.1 Ensaio de sensibilidade das cepas fúngicas e bacterianas na forma planctônica na concentração de 1 X 10^6 cel/mL.

Para avaliar a presença de células persistentes nos biofilmes bacterianos e fúngicos, inicialmente foi verificado o efeito da terbinafina, anfotericina B e vancomicina nas células planctônicas de *T. rubrum* e *C. albicans*, na concentração de 1 x 10^6 cel/mL (**Fig 18 A, B**), e *S. aureus* e *S. epidermidis* na concentração de 1 x 10^8 cel/mL (**Figs 18 C, D**). O ensaio de sensibilidade das cepas na forma planctônica na mesma concentração usada para a formação dos biofilmes foi realizado inicialmente para que fosse determinada a concentração inicial necessária para avaliar a presença das

células persistentes por ensaio de UFC. A viabilidade celular contra diferentes concentrações dos fármacos foi avaliada pelo método de redução do XTT. Os resultados encontrados nas células planctônicas fúngicas mostram que a maior parte das células são susceptíveis em concentrações consideravelmente baixas de antibióticos enquanto para *S. aureus* e *S. epidermidis* uma maior dose do fármaco foi necessária para diminuir a viabilidade celular.

A anfotericina B reduziu a atividade metabólica das células planctônicas de *C. albicans* a partir da concentração de 0.25 µg/mL (**Fig 18A**). A atividade metabólica de *T. rubrum* caiu significativamente nas primeiras concentrações, no entanto, uma redução de 80% só foi observada na concentração de 8 µg/mL de terbinafina (**Fig 18B**). Para *S. aureus*, reduções de 80% da atividade metabólica quando comparada ao controle não foram observadas com as concentrações testadas; a redução de 50% só ocorreu a partir da concentração de 128 µg/mL (**Fig 18C**). Diferentemente, *S. epidermidis*, apresentou inibição da atividade metabólica em 80% na dose de 32 µg/mL de vancomicina (**Fig 18D**).

Figura 18 – Avaliação do efeito da anfotericina B, terbinafina e vancomicina nas células planctônicas de *C. albicans* ATCC 90028 (**A**), *T. rubrum* ATCC 28189 (**B**), *S. aureus* ATCC 25923 (**C**) e *S. epidermidis* ATCC 12228 (**D**) mensurado pelo método de redução de XTT (* p< 0,05; ** p<0,01; ***p<0,001).



4.2.2 Determinação da presença de células persistentes por ensaio de unidades formadoras de colônia (UFC)

A partir das concentrações que inibiram em 80% ou 50% o crescimento das células do biofilme, obteve-se a concentração necessária (10xCIM para biofilmes fúngicos e concentrações crescentes a partir da CIM 80% para biofilmes bacterianos) para o preparo da solução de trabalho dos fármacos que seriam avaliados contra os biofilmes visando quantificar a presença das células persistentes pelo método de plaqueamento em ágar (BRUCKER *et al*., 2016; YANG *et al*., 2016; LA FLEUR *et al.*, 2006; CORDEIRO *et al*., 2021). Para *C. albicans* a dose de anfotericina B utilizada foi de 2,5-160 µg/mL, para *T. rubrum* 80-2560 µg/mL de terbinafina, para *S. epidermidis* 32-2048 µg/mL e para *S. aureus* 128-8192 µg/mL.

Os resultados foram plotados em Log $_{10}$ de UFC/mL contra a concentração do antibiótico e estão representados na **Figura 19** para *S. aureus* e *S. epidermidis* e na **Figura 20** para *C. albicans* e *T. rubrum.* Foram incluídos aos ensaios os controles positivos dos biofilmes no qual foram dispensados volumes de 10 µL da suspensão de células do biofilme sem tratamento, diluídas em séries em PBS.

Figura 19 – Log10 das Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL) da análise populacional de células persistentes em biofilmes de *S. aureus* ATCC 25923 (**A**) e *S. epidermidis* ATCC 12228 (**B**) após a exposição transitória à vancomicina (µg/mL) em doses crescentes.

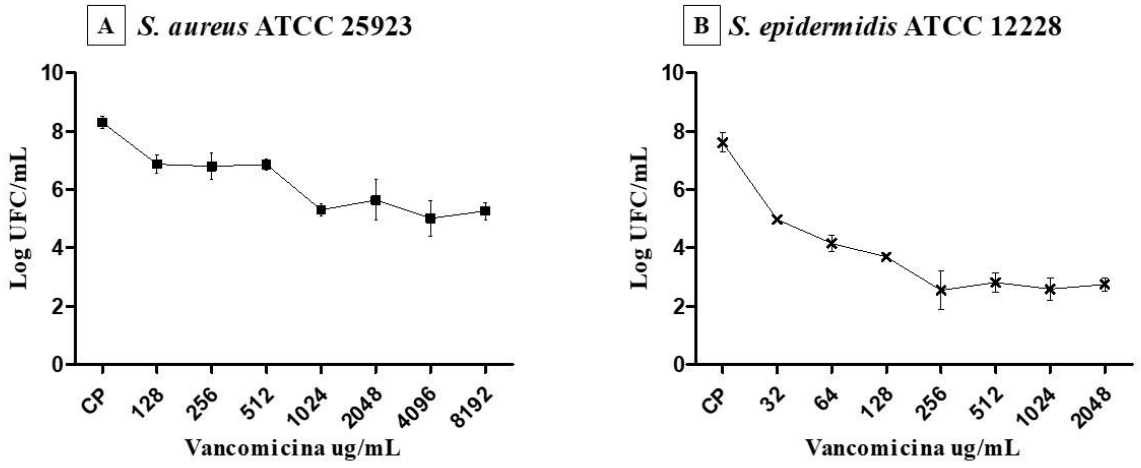
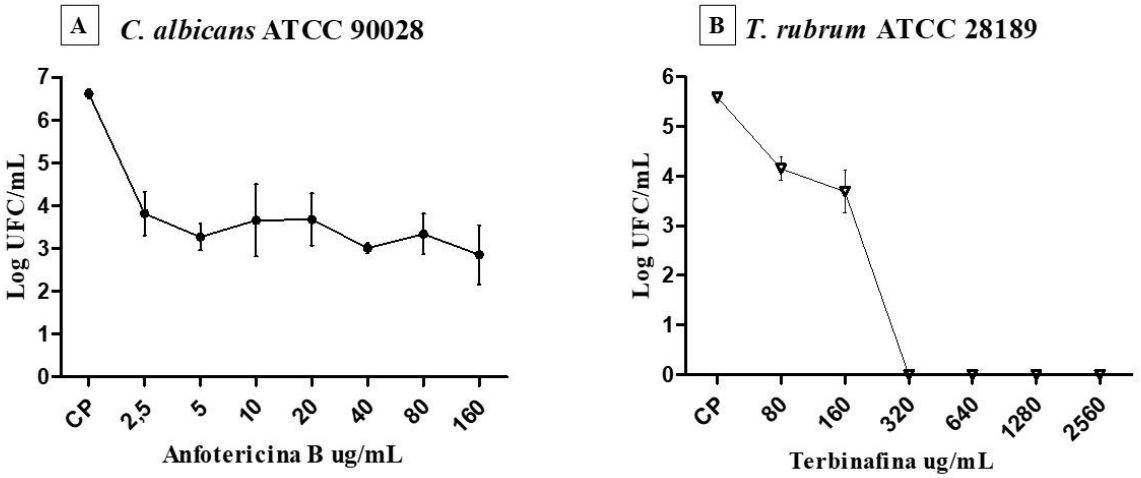


Figura 20 – Log10 das Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL) da análise populacional de células persistentes em biofilmes de *C. albicans* ATCC 90028 (**A**) e *T. rubrum* ATCC 28189 (**B**) após a exposição transitória à anfotericina B e terbinafina (µg/mL) em doses crescentes.



A análise da população de células dos biofilmes bacterianos expostos a concentrações crescentes de vancomicina sugeriu que existem frações de células com distintas respostas ao antibiótico. A primeira fração corresponde as células sensíveis (normais) e representou a maior parte da população que foi prontamente erradicada após a adição do composto antimicrobiano em concentrações mínimas próximas ao CIM80 para células planctônicas. A segunda fração correspondeu a uma pequena quantidade de células que ainda foi capaz de formar colônias, mesmo após a exposição a concentrações crescentes do antibiótico por 48 h, representando, portanto, a fração persistente. Diferenças estatisticamente significativas foram observadas entre as diferentes concentrações do fármaco com o controle livre de tratamento (CP) ($p < 0,001$).

Para *S. aureus* (**Fig.19A**), a média do número de células persistentes nas concentrações acima de 1024 µg/mL foi de ≈ 1,7 x 10^5 UFC/mL (Log 5,23), o que compreende a 0,08 % do número total de UFC/mL do controle sem tratamento (2,1 x 10^8 UFC/mL). Para *S. epidermidis*, a partir da concentração de 256 µg/mL a contagem da fração de persistentes foi de ≈ 5,4 x 10^2 UFC/mL, o que representou cerca de 0,001% do número total de UFC/mL do controle sem tratamento (5,1 x 10^7 UFC/mL).

Diante dos resultados, foi verificado que o número de células não aumentou após à exposição ao antimicrobiano e sim exibiu um platô ou uma diminuição consideravelmente lenta a medida em que a dose de vancomicina aumentava, tais resultados representam uma curva de morte bifásica, característica das células persistentes (BALABAN *et al*., 2004; 2019).

Yang e colaboradores (2016), ao aumentar o tempo de exposição à vancomicina por 48 h afim de selecionar as células dormentes em biofilmes e erradicar as células tolerantes na concentração de 2048 mg/L, demonstrou que somente 1,8% e 4,6% da população de célula persistente de duas cepas de *S. epidermidis* sobreviveram ao desafio de vancomicina. Em nossos resultados, os biofilmes foram expostos a um tempo de incubação de 48 h em todas as concentrações, sugerindo que também isolamos células dormentes dentre as frações, especialmente nas concentrações mais altas.

A subpopulação dormente representa uma pequena parte da população bacteriana que mantém um estado de não divisão, garantido pela regulação negativa de genes de biossíntese e, portanto, não é morta por agentes bactericidas que necessitam de um alvo ativo para exercer suas propriedades (JÕERS; KALDALU; TENSON, 2010; FISHER; GOLLAN; HELAINE, 2017; LEWIS 2005; YANG *et al*., 2016). Os autores sugerem que células dormentes são encontradas somente no modo de crescimento de biofilme e que esta condição garante a presença de mais células persistentes do que em culturas planctônicas e, portanto, exercem um importante papel na tolerância a altas concentrações de antibióticos. Além disso, a incubação prolongada pode aumentar as chances de atingir as células persistentes na dormência, o que impediria que estas células pudessem estabelecer uma nova população quando o antibiótico fosse removido.

Embora o número de células viáveis não tenha aumentado após o desafio com a vancomicina, o que caracterizaria a resistência das cepas, estudos mais aprofundados para determinar se as células persistentes isoladas neste estudo não são geneticamente resistentes aos antibióticos deverão ser realizados futuramente a partir da análise da sua susceptibilidade por técnica de microdiluição, visto que diferentemente dos mutantes resistentes, as células persistentes permanecem sensíveis aos antibióticos e apresentam o mesmo MIC de suas culturas parentais. Além disso, a diferenciação das células persistentes com células normais sobreviventes que poderiam estar protegidas contra a ação de agentes bactericidas também deve ser investigada, visto que a tolerância a medicamentos em biofilmes bacterianos pode ser favorecida por diferentes fatores e não unicamente pela presença de células persistentes, contudo, a própria presença de substâncias exopoliméricas, enzimas hidrolíticas e fatores relacionados à comunicação célula-célula (quórum sensing) poderiam proteger as células não persistentes da atividade bactericida (STEWART, 2002). A identificação precisa exige que estes fatores relacionados a tolerância do biofilme sejam separados das células individuais (YANG *et al*., 2016). Em nossos experimentos, após a exposição dos biofilmes aos antimicrobianos as células foram

raspadas rigorosamente, pipetadas e vortexadas com objetivo de obter as células únicas de biofilme, o que pode ter diminuído a interferência destes fatores, no entanto, necessita investigação.

Para biofilmes de *C. albicans* formados e tratados em BHI (**Fig. 20A**), a contagem de UFC/mL demonstrou um padrão de morte bifásico pela presença de células viáveis capazes de sobreviver a exposição por doses maiores de 100 µg/mL de AmB, a média do número de células persistentes na concentração de 160 µg/mL foi de 6,03 x 10^3 UFC/mL, o que corresponde a ≈ 0,14% do número total de células do controle sem tratamento (4,2 x 10^6 UFC/mL). Resumidamente, logo após a maturação e exposição dos biofilmes com doses de 2,5 – 160 µg/mL, uma grande proporção de células foi prontamente morta nas concentrações iniciais, indicando a fração sensível ao antifúngico. No entanto, à medida que a concentração da anfotericina crescia, uma proporção de células permanecia viável no biofilme, caracterizando a fração persistente. Diferenças estatisticamente significativas foram observadas quando comparadas ao controle de crescimento livre de fármacos ($p < 0,001$).

Considerando, por fim, o biofilme de *T. rubrum* (**Fig. 20B**), a contagem de UFC/mL do controle positivo livre de tratamento apresentou em média 3,91 x 10^5 UFC/mL. Quando o biofilme foi exposto a concentrações crescentes de terbinafina, grande parte das células viáveis foram erradicadas, sobrevivendo cerca de 6,76 x 10^3 UFC/mL, o que corresponde a aproximadamente 1,72% do valor absoluto das UFC/mL do controle. Embora o biofilme tenha apresentado células viáveis na concentração de 160 µg/mL não foi observado um platô na curva de sobrevivência e sim uma morte prolongada das células do biofilme. Quando expostos a doses maiores que 160 µg/mL, não foi possível quantificar colônias de *T. rubrum*. Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas quando comparadas o Log UFC/mL das células do controle com as demais concentrações ($p < 0,001$) e as UFC/mL das concentrações de 80 µg/mL e 160 µg/mL com as concentrações excedentes ($p < 0,001$).

Segundo estudos anteriores, as células que sobrevivem a uma exposição de 100 µg/ mL de anfotericina B compreendem as células persistentes. Geralmente, essa subpopulação equivale a uma

média inferior a 1% da população total (LAFLEUR *et al*., 2006; CORDEIRO *et al*., 2021; GALDIERO *et al*., 2020). Em nossos resultados, os biofilmes de *C. albicans* ATCC 90028 e de *T. rubrum* ATCC 28189 desenvolvidos em BHI produziram células persistentes, apresentando células tolerantes na maior concentração do fármaco (160 µg/mL) além do padrão de morte bifásico no qual o número de UFC/mL da curva dose-resposta não aumentou com a exposição dos antifúngicos e sim exibiu um platô para biofilmes de *C. albicans* e uma diminuição para *T. rubrum* à medida em que a dose crescia, o que corrobora com os resultados da literatura e confirma a eficiência da técnica para a detecção.

Características da virulência das células persistentes fúngicas ainda não estão completamente compreendidas, no entanto, os antifúngicos disponíveis apresentam baixa atividade contra biofilmes e células persistentes, o que exige que a atenção de profissionais e pesquisadores seja redobrada na busca por medicamentos mais eficazes (GALDIERO *et al*., 2020). A anfotericina B é conhecida como um agente antifúngico "padrão ouro", apresenta atividade na membrana plasmática, ligando-se ao ergosterol, comprometendo sua integridade com a formação de poros (GALLIS et al., 1990) é caracterizada por erradicar as células fúngicas independente dos estágios de crescimento, passando a ser a escolha ideal para isolar e detectar as células persistentes, além disso, a resistência adquirida à anfotericina B é extremamente rara, o que torna improvável que estas células sejam mutantes (LAFLEUR *et al*., 2006). Algumas espécies de *Candida* na forma planctônica não produzem células persistentes tolerantes a este composto em fase exponencial ou estacionária. Contudo, em biofilmes, a taxa de detecção da subpopulação é aumentada, mas não é uma exceção, visto que em comunidades sésseis de algumas espécies a subpopulação é ausente e, portanto, não deve ser considerada a única responsável pela resistência em biofilmes (AL-DHAHERI; DOUGLAS, 2008).

A terbinafina é uma alilamina que apresenta como alvo a esqualeno epoxidase na via de biossíntese do ergosterol, sendo o medicamento sistêmico amplamente utilizado no tratamento das dermatofitoses devido ao seu amplo espectro, às altas taxas de cura e baixas interações medicamentosas (MCCLELLAN *et al*., 1999; GUPTA; SAUDER; SHEAR, 1994; LIPNER; SCHER,

2019). Em casos de onicomicose por dermatófitos, por exemplo, a terbinafina é administrada em associação à um antifúngico tópico, no entanto, a taxa de recorrência da infecção ungueal ainda é alta, especialmente em pacientes com fatores de risco (SCHER; BARAN, 2003; KO et al., 2011), o que pode estar relacionado a presença de células persistentes. Em biofilmes de *T. rubrum*, a presença dessa subpopulação ainda não havia sido descrita; nossos resultados são os pioneiros no isolamento e subsidiam ensaios futuros para melhor caracterizá-las a fim de compreender a regulação genética associada ao desenvolvimento de células persistentes nestes biofilmes.

5. CONCLUSÃO

Em resumo, este estudo fornece dados inéditos relacionados à capacidade de formação de biofilmes polimicrobianos *in vitro* entre bactérias e dermatófito. As interações entre as comunidades formadas por diferentes microrganismos de maneira mista apresentaram características alteradas dependentes da condição de formação e disponibilidade de nutrientes, exibindo propriedades distintas daquelas observadas nos biofilmes monoespécie. Diferentes condições de cultivo mostraram ter um grande impacto no desenvolvimento dos biofilmes, sendo o meio BHI o que proporcionou biofilmes enriquecidos em biomassa, atividade metabólica e desenvolvimento de hifas comparativamente ao RPMI-1640 e MHI. Algumas características dos biofilmes polimicrobianos indicaram que há o predomínio da bactéria sobre o fungo nas condições iniciais de formação (0 h, 4 h, 24 h) diferentemente do que ocorre nas condições de 48 h, onde se verifica um domínio de *T. rubrum*. Sabe-se que as interações entre diferentes reinos e/ou espécies dentro de um biofilme passam a ser ainda mais complicadas na interação com o hospedeiro, a complexidade que pode ser encontrada nos locais de infecção é pouco mimetizada quando utilizado modelos *in vitro* de biofilmes polimicrobianos, embora sejam necessários para a compreensão inicial do processo. O uso de modelos *in vivo* fornece informações necessárias e mais precisas sobre a influência que alguns fatores podem exercer e, consequentemente, afetar na formação do biofilme, além da identificação e caracterização da

expressão de genes e proteínas envolvidas na formação destes biofilmes que também ajudariam a compreender melhor a complexidade desses sistemas. A análise populacional das células de biofilme no presente estudo sugeriu que a falha terapêutica com antibióticos e antifúngicos em infecções crônicas e recorrentes pode estar relacionada a presença das células persistentes e que esta subpopulação desempenha um papel significativo na tolerância do biofilme sendo necessário abordagens terapêuticas alternativas afim de selecionar antibióticos e antifúngicos eficazes e em concentrações aplicáveis para garantir o sucesso no tratamento de infecções relacionados aos biofilmes, além de aumentar o tempo de exposição e concentração dos antibióticos em infecções relacionadas à biofilmes. Embora os resultados encontrados no presente estudo sejam de extrema relevância clínica, estudos mais aprofundados serão necessários para confirmação do fenótipo de células persistentes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHTERMAN, R. R.; WHITE, T. C. Dermatophyte virulence factors: identifying and analyzing genes that may contribute to chronic or acute skin infections. **International journal of microbiology**, v. 2012, 2012.

AHMED, M. O.; BAPTISTE, K. E. Vancomycin-Resistant Enterococci: A Review of Antimicrobial Resistance Mechanisms and Perspectives of Human and Animal Health. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 5, p. 590–606, 2018.

AJELLO, L. Natural history of the dermatophytes and related fungi. **Mycopathologia et Mycologia Applicata**, v. 53, n. 1–4, p. 93–110, 1974.

AL-DHAHERI, R. S.; DOUGLAS, L. J. Absence of amphotericin B-tolerant persister cells in biofilms of some Candida species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 5, p. 1884–1887, 2008.

ALEM, M. A. S. et al. Production of tyrosol by Candida albicans biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 10, p. 1770–1779, 2006.

ALJABRE, S. H. M. et al. Germination of trichophyton mentagrophytes on human stratum corneum in vitro. **Medical Mycology**, v. 30, n. 2, p. 145–152, 1992.

ALONSO, B. et al. Comparison of the XTT and resazurin assays for quantification of the metabolic activity of Staphylococcus aureus biofilm. **Journal of Microbiological Methods**, v. 139, n. March, p. 135–137, 2017.

ANDREWES, F. W.; GORDON, M. H. Report on the biological characters of the staphylococci pathogenic for man. **35th Annual Report of the Local Government Board**, Bd 1905-6. APP. B. H.M. Stationery Office, p. 543-60, 1907.

ANJUM, A.; SIM, C. H.; NG, S. F. Hydrogels Containing Antibiofilm and Antimicrobial Agents Beneficial for Biofilm-Associated Wound Infection: Formulation Characterizations and In vitro Study. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 3, p. 1219–1230, 2018.

APPELT, L. et al. Terbinafine-resistant dermatophytoses and onychomycosis due to Trichophyton rubrum. **Hautarzt**, v. 72, n. 10, p. 868-877, 2021.

ARCHER, N. K. et al. Staphylococcus aureus biofilms: Properties, regulation and roles in human disease. **Virulence**, v. 2, n. 5, p. 445–459, 2011.

ARENDRUP, M. C. et al. How to: perform antifungal susceptibility testing of microconidia-forming dermatophytes following the new reference EUCAST method E.Def 11.0, exemplified by Trichophyton. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 27, n. 1, p. 55–60, 2021.

ARGEMI, X. et al. Coagulase-negative staphylococci pathogenomics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 5, p. 1–19, 2019.

ARVANITIS, M.; MYLONAKIS, E. Fungal-bacterial interactions and their relevance in health. **Cellular Microbiology**, v. 17, n. 10, p. 1442–1446, 2015.

BALABAN, N. Q. et al. Bacterial persistence as a phenotypic switch. **Science**, v. 305, n. 5690, p. 1622–1625, 2004.

BALABAN, N. Q. et al. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 7, p. 441–448, 2019.

BALDO, A. et al. Mechanisms of skin adherence and invasion by dermatophytes. **Mycoses**, v. 55, n. 3, p. 218–223, 2012.

BALDO, A. et al. Secreted subtilisin Sub3 from Microsporumcanis is required for adherence to but not for invasion of the epidermis. **Br J Dermatol**, v. 162, p. 990-997, 2010.

BECKER, K.; HEILMANN, C.; PETERS, G. Coagulase-negative staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 870–926, 2014.

BERALDO, R.M.; GASPAROTO, A.K.; SIQUEIRA A.M.; DIAS A.L.T. Dermatophytes in household cats and dogs. **Rev. Bras. Ciênc. Vet,** v. 18, n. 2/3, p. 85-91, 2011.

BHATIA, A.; KANISH, B.; BADYAL, DK.; KATE, P.; CHOUDHARY, S. Efficacy of oral terbinafine versus itraconazole in treatment of dermatophytic infection of skin - A prospective, randomized comparative study. **Indian J Pharmacol**. v. 51, n. 2, p. 116-119, 2019.

BIGGER, J. W. Treatment of Staphylococcal Infections With Penicillin By Intermittent Sterilisation. **The Lancet**, v. 244, n. 6320, p. 497–500, 1944.

BILA, N. M. et al. 2-Hydroxychalcone as a Potent Compound and Photosensitizer Against Dermatophyte Biofilms. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, n. May, p. 1–15, 2021.

BILA, N.M. **Avaliação do efeito da 2-chalcona mediada pela terapia fotodinâmica nos biofilmes mono e dual-espécies de Candida spp. e dermatófitos e mecanismos de interação desses microrganismos no biofilme misto, 2022**. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia

Aplicadas à Farmácia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Disponível em: http://hdl.handle.net/11449/236085.

BISHNOI, A.; VINAY, K.; DOGRA, S. Emergence of recalcitrant dermatophytosis in India. **Lancet Infect Dis**, v. 18, p. 250-251, 2018.

BITENCOURT, T. A. et al. Transcription profile of Trichophyton rubrum conidia grown on keratin reveals the induction of an adhesin-like protein gene with a tandem repeat pattern. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, p. 1–14, 2016.

BOJSEN, R. et al. A common mechanism involving the TORC1 pathway can lead to amphotericin B-persistence in biofilm and planktonic Saccharomyces cerevisiae populations. **Scientific Reports**, v. 6, n. October 2015, p. 1–10, 2016.

BONGOMIN, F.; GAGO, S.; OLADELE, R.O.; DENNING, D.W. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. **J Fungi** (Basel), v, 3, n, 4, p. 57, 2017.

BONVICINI, F. et al. Improved eradication efficacy of a combination of newly identified antimicrobial agents in C. albicans and S. aureus mixed-species biofilm. **Research in Microbiology**, v. 172, n. 6, 2021.

BOUCHER, H. W.; COREY, G. R. Epidemiology of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus INFECTIONS. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. Suppl 5, p. s344–s349, 2008.

BRILHANTE, R.S. et al. In vitro activity of azole derivatives and griseofulvin against planktonic and biofilm growth of clinical isolates of dermatophytes. **Mycoses**, v. 61, p.449–454, 2018.

BRUCKER, K. DE et al. Chapter 6 Protocol for Determination of the Persister Subpopulation in Candida Albicans Biofilms. **Bacterial Persistence: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, v. 1333, p. 67–72, 2016.

BURKHART, C. N.; BURKHART, C. G.; GUPTA, A. K. Dermatophytoma: Recalcitrance to treatment because of existence of fungal biofilm. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 47, n. 4, p. 629–631, 2002.

BURMØLLE, M. et al. Interactions in multispecies biofilms: Do they actually matter? **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 2, p. 84–91, 2014.

CAI, W. et al. Epidemiology of Superficial Fungal Infections in Guangdong, Southern China: A Retrospective Study from 2004 to 2014. **Mycopathologia**, v. 181, n. 5–6, p. 387–395, 2016

CAZA, M.; KRONSTAD, J. W. Shared and distinct mechanisms of iron acquisition by bacterial and fungal pathogens of humans. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, n. November, p. 1–23, 2013.

CDC. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. **American Journal of Infection Control**, v. 32, n. 8, p. 470–485, 2004. https://www.cdc.gov/nhsn/pdfs/datastat/nnis_2004.pdf.

CELESTRINO, G.A.; REIS, A.P.C.; CRIADO, P.R.; BERNARD, G.; SOUSA, M.G.T. Trichophyton rubrum Elicits Phagocytic and Pro-inflammatory Responses in Human Monocytes Through Toll-Like Receptor 2. **Microbiol**., v 10, p. 2589, 2019.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC. (U.S.). Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. U.S Department of Health & Human Services for Disease Control Preention. CDC Stacks Public Health Publications. https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf.

CHATRATH, A. et al. In vitro anti-biofilm activities of citral and thymol against Candida tropicalis. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 1, 2019.

CHEN, Y. E.; FISCHBACH, M. A., BELKAID, Y. Skin microbiota–host interactions. **Nature**, v. 553, n. 7689, p. 427–436, 2018.

CHEN, X. et al. Influence of biofilm growth age, media, antibiotic concentration and exposure time on Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa biofilm removal in vitro. **BMC Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 1–11, 2020.

CHEONG, J.Z.A.; JOHNSON, C. J.; WAN, H.; LIU, A.; KERNIEN, J. F.; GIBSON, A. L. F.; NETT, J. E.; KALAN, L. R. Priority effects dictate community structure and alter virulence of fungal-bacterial biofilms. **ISME J**., v. 15, p. 2012–2027, 2021.

CHU, D., MA, J., PRINCE, A. et al. Maturation of the infant microbiome community structure and function across multiple body sites and in relation to mode of delivery. **Nat Med**., v. 23, p. 314–326, 2017.

CIESIELSKA, A.; STĄCZEK, P. Selection and validation of reference genes for qPCR in the human dermatophyte Trichophyton rubrum exposed to different carbon sources which promote adhesion-inducing conditions. **Mycoses**, v. 64, n. 3, p. 300–308, 2021.

CLEARE, L. G.; ZAMITH, D.; HEYMAN, H. M.; et al. Media Matters! Alterations in the loading and release of Histoplasma capsulatum extracellular vesicles in response to different nutritional milieus. **Cell Microbiol**, v. 22, n. 9, 2020.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard. 10th. ed. CLSI document M07-A10. Waine, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015. https://clsi.org/media/1632/m07a10_sample.pdf.

CLSI. Reference Method for Broth Diluition Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. Approved Standard. 2nd. ed. CLSI document M38-A2. Waine, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008. https://clsi.org/media/1455/m38a2_sample.pdf.

CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standard. 4th. ed. CLSI document M27-A4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017. https://clsi.org/media/1897/m27ed4_sample.pdf.

CONLON, B. P. Staphylococcus aureus chronic and relapsing infections: Evidence of a role for persister cells: An investigation of persister cells, their formation and their role in S. aureus disease. **BioEssays**, v. 36, n. 10, p. 991–996, 2014.

CORDEIRO, R. DE A. et al. Trichosporon asahii and Trichosporon inkin Biofilms Produce Antifungal-Tolerant Persister Cells. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, n. April, p. 1–9, 2021.

COSTA-ORLANDI, C. B. et al. Fungal biofilms and polymicrobial diseases. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 2, p. 1–24, 2017.

COSTA-ORLANDI, C. B. et al. In vitro characterization of Trichophyton rubrum and T. mentagrophytes biofilms. **Biofouling**, v. 30, n. 6, p. 719–727, 2014.

COSTA-ORLANDI, C. B. et al. Incorporation of Nonyl 3,4-Dihydroxybenzoate Into Nanostructured Lipid Systems: Effective Alternative for Maintaining Anti-Dermatophytic and Antibiofilm Activities and Reducing Toxicity at High Concentrations. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. June, p. 1–14, 2020.

COSTERTON, J. W. Overview of microbial biofilms. **Journal of Industrial Microbiology**. v. 15, p. 137-140, 1995.

DA SILVA, M. A. et al. Oxidative Imbalance in Candida tropicalis Biofilms and Its Relation With Persister Cells. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. February, p. 1–14, 2021.

DALLA LANA, D. F.; BATISTA, B. G.; ALVES, S. H.; FUENTEFRIA, A. M. Dermatofitoses: agentes etiológicos, formas clínicas, terapêutica e novas perspectivas de tratamento. **Clin. Biomed. Res**., v. 36, n. 4, p.230-241, 2016.

DANIELLI, L. J. et. al. Biofilm formation by *Microsporum canis*. Clinical Microbiology and Infection, v. 23, n. 12, p. 941-942, 2017.

DAVISON, F. D.; MACKENZIE, D. W. R.; OWEN, R. J. Deoxyribonucleic Acid Base Compositions of Mycoplasma. **Journal of General Microbiology**, n. 118, p. 465–470, 1980.

DE ALBUQUERQUE MARANNHÃO, F.C.; OLIVEIRA-JÚNIOR, J. B.; DOS SANTOS ARAÚJO, M.A., SILVA, D.M.W. Mycoses in northeastern Brazil: Epidemiology and prevalence of fungal species in 8 years of retrospective analysis in Alagoas. **Braz. J. Microbiol**, v. 50, p. 969-978, 2019.

DE BRUCKER, K. et al. Fungal β-1,3-Glucan Increases Ofloxacin Tolerance of Escherichia coli in a Polymicrobial E. coli/Candida albicans Biofilm. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 6, p. 3052–3058, 2015.

DE CARVALHO DIAS, K. et al. Soluble factors from biofilm of Candida albicans and Staphylococcus aureus promote cell death and inflammatory response. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 1–9, 2017.

DE GROOTE, V. N. et al. Novel persistence genes in Pseudomonas aeruginosa identified by high-throughput screening. **FEMS Microbiology Letters**, v. 297, n. 1, p. 73–79, 2009.

DE HOOG, G. S. et al. Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 182, p. 5–31, 2017.

DE OLIVEIRA PEREIRA, F. et al. The prevalence of dermatophytoses in Brazil: a systematic review. **J Med Microbiol**, v. 70, n. 3, 2021.

DELARZE, E.; SANGLARD, D. Defining the frontiers between antifungal resistance, tolerance and the concept of persistence. **Drug Resistance Updates**, v. 23, p. 12–19, 2015.

DIAS, M. F. R. G.; BERNARDES-FILHO, F.; QUARESMA-SANTOS, M. V. P.; AMORIM, A. G. F.; SCHECHTMAN, R. C.; AZULAY, D. R. Treatment of superficial mycoses: review - part II. **An. Bras. Dermatol.,** v. 88, n. 6, p. 937-944, 2013.

DÍAZ, M. G.; SANABRIA, L. S.; AGUILAR, G.; ARAUJO, P.; PEREIRA, J.; PLANOS, J. F. Isolamento de *Microsporum canis* e *Microsporum gypseum* em gatos assintomáticos da área metropolitana de Assunção-Paraguai. **Rev. Nac**., v. 9, n .2, p. 12-19, 2017.

DIEKEMA, D. J. et al. Twenty-year trends in antimicrobial susceptibilities among Staphylococcus aureus from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 6, n. Suppl 1, p. S47–S53, 2019.

DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 881-890, 2002.

DOS SANTOS, J. D. et al. Mixed biofilms formed by C. albicans and non-albicans species: a study of microbial interactions. **Brazilian Oral Research**, v. 30, n. 1, p. 1–8, 2016.

DUEK, L. et al. The pathogenesis of dermatophyte infections in human skin sections. **Journal of Infection**, v. 48, n. 2, p. 175–180, 2004.

EMMONS, C. W. Dermatophytes: Natural grouping based on the form of the spores and accessory organs. **Archives of Dermatology and Syphilology**, v. 30, n. 3, p. 337–362, 1934.

ESQUENAZI, D. et al. The influence of surface carbohydrates during in vitro infection of mammalian cells by the dermatophyte Trichophyton rubrum. **Research in Microbiology**, v. 155, n. 3, p. 144–153, 2004.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. **Summary of the latest data on antibiotic resistance in the European Union**. Stockholm: EDCD, November, 2017. https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AMR-surveillance-EARS-Net-2017.pdf.

FANNING, S.; MITCHELL, A. P. Fungal biofilms. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 4, p. 1–4, 2012.

FAWAY, É.; CAMBIER, L.; MIGNON, B.; POUMAY, Y.; LAMBERT DE ROUVROIT, C. Modeling dermatophytosis in reconstructed human epidermis: A new tool to study infection mechanisms and to test antifungal agents. **Med Mycol**., v. 55, n. 5, p.485-494, 2016.

FELIX, L. O. et al. In Vitro and In Vivo Bactericidal and Antibiofilm Efficacy of Alpha Mangostin Against Staphylococcus aureus Persister Cells. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, n. July, p. 1–14, 2022.

FERGUSON, L.; FULLER, L. C. Spectrum and burden of dermatophytes in children. **Journal of Infection**, v. 74, p. S54–S60, 2017.

FINCH, J.; WARSHAW, E. Toenail onychomycosis : current. **Dermatologic Therapy**, v. 20, n. 16, p. 31–46, 2007.

FISHER, R. A.; GOLLAN, B.; HELAINE, S. Persistent bacterial infections and persister cells. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 8, p. 453–464, 2017.

FÖRSTER, T. M. et al. Enemies and brothers in arms: Candida albicans and gram-positive bacteria. **Cellular Microbiology**, v. 18, n. 12, p. 1709–1715, 2016.

FRAIHA, R. O.; PEREIRA, A. P. R.; BRITO, E. C. A.; BORGES, C. L.; PARENTE, A. F. A.; PERDOMO, R. T. et al. Stress conditions in the host induce persister cells and influence biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* RP62A. **Rev. Soc. Bras. Med**. **Trop**., v. 52, p. e20180001, 2019.

FREDHEIM, E. G. A. et al. Biofilm formation by staphylococcus haemolyticus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 1172–1180, 2009.

FRIEDRICH, M. Inflammatory tinea pedis with bacterial superinfection effectively treated with isoconazole nitrate and diflucortolone valerate combination therapy. **Mycoses**, v. 56, n. Suppl. 1, p. 23–25, 2013.

GABRILSKA, R. A.; RUMBAUGH, K. P. Biofilm models of polymicrobial infection. **Future Microbiology**, v. 10, n. 12, p. 1997–2015, 2015.

GALDIERO, E. et al. Eradication of Candida albicans persister cell biofilm by the membranotropic peptide gH625. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2020.

GALLIS, H. A.; DREW, R. H.; PICKARD, W. W. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. **Rev. Infect. Dis**, v. 12, p. 308-329, 1990.

GALLO, R. L. Human skin is the largest epithelial surface for interaction with microbes. **The journal of investigative dermatology**, v. 137, n. 6, p. 1213–1214, 2017.

GARCIA, L. M. et al. A Two-Way Road: Antagonistic Interaction Between Dual-Species Biofilms Formed by Candida albicans/Candida parapsilosis and Trichophyton rubrum. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, Artigo 1980, p. 1-5, September 4, 2020.

GEORG, L. K. Epidemiology of the dermatophytoses: sources of infection, modes of transmission and epidemicity. **Ann. N. Y. Acad. Sci**. v. 89, p. 69– 77, 1960.

GHANNOUM, M.A.; MUKHERJEE, P.K.; WARSHAW, E.M.; EVANS, S.; KORMAN, N.J.; TAVAKKOL, A. Molecular analysis of dermatophytes suggests spread of infection among hosehold members. **Cútis**., v. 91, p. 237-245, 2013.

GNAT, S.; LAGOWSKI, D.; NOWAKIEWICZ, A.; DYLAG, M. A global view on fungal infections in humans and animals: infections caused by dimorphic fungi and dermatophytoses. **J Appl Microbiol**, v. 131, n. 16, p. 2688-2704, 2021.

GONÇALVES, L. N. C. et al. Biofilm Formation by Histoplasma capsulatum in Different Culture Media and Oxygen Atmospheres. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. July, p. 1–12, 2020.

GOULD D, CHAMBERLAINE, A. *Staphylococcus aureus*: a review of the literature. **J Clin Nurs**, n. 4, p. 5–12, 1995.

GRANILLO, A. R. *et al*. Antibiosis interaction of *Staphylococccus aureus* on *Aspergillus fumigatus* assessed *in vitro* by mixed biofilm formation. **BMC Microbiology**, v. 15, p. 33, 2015.

GRIGORYAN, K. V. et al. Pediatric tinea capitis caused by Trichophyton violaceum and Trichophyton soudanense in Rochester, Minnesota, United States. **International Journal of Dermatology**, v. 58, n. 8, p. 912–915, 2019.

GRUBY, D. Mémoire sur une végétation qui constitue la vraie teigne. **C R Acad Sci**, v. 13, p. 72–5, 1841.

GULATI, M.; LOHSE, M.B.; ENNIS, C.L.; GONZALEZ, R.E.; PERRY, A.M.; BAPAT, P. et al. In vitro culturing and screening of Candida albicans biofilms. **Curr. Protoc. Microbiol**., v. 50, n.1, p. e60, 2018.

GUPTA, A. K.; COOPER, E. A. Update in antifungal therapy of dermatophytosis. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5–6, p. 353–367, 2008.

GUPTA, A. K.; DAIGLE, D.; CARVIEL, J. L. The role of biofilms in onychomycosis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 74, n. 6, p. 1241–1246, 2016.

GUPTA, A. K.; FOLEY, K. A.; VERSTEEG, S. G. New Antifungal Agents and New Formulations Against Dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 182, n. 1-2, 127–141, 2017 a.

GUPTA, A. K.; SAUDER, D. N.; SHEAR, N. H. Antifungal agents: An overview. Part II. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 30, n. 6, p. 911–933, 1994.

GUPTA, A. K.; STEC, N. Emerging drugs for the treatment of onychomycosis. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 24, n. 4, p. 213–220, 2019.

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 b.

HARDING, M. W. et al. Can filamentous fungi form biofilms? **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 11, p. 475–480, 2009.

HAVLICKOVA, B.; CZAIKA, V. A.; FRIEDRICH, M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide (Mycoses (2008) 51, SUPPL. 4, (2-15)). **Mycoses**, v. 52, n. 1, p. 95, 2009.

HAY, R. et al. Skin Diseases. In: JAMISON, D.T; BREMAN, J. G; MEASHAM, A.R, et al. (Editor). **Disease Control Priorities in Developing Countries.** 2nd ed. Oxford: University Press, 2006. Chapter 37, p. 707–722. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11728/.

HEIDRICH, D. et al. Dermatophytosis: A 16-year retrospective study in a metropolitan area in southern Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 8, p. 865–871, 2015.

HIRUMA, J. et al. Terbinafine-resistant strain of Trichophyton interdigitale strain isolated from a tinea pedis patient. **J Dermatol**, v. 46, n. 4. p. 351-353, 2019.

HO, F. K. H.; DELGADO-CHARRO, M. B.; BOLHUIS, A. Evaluation of an Explanted Porcine Skin Model to Investigate Infection with the Dermatophyte Trichophyton rubrum. **Mycopathologia**, v. 185, n. 2, p. 233–243, 2020.

HORNBY, J. M. et al. Quorum Sensing in the Dimorphic Fungus Candida albicans Is Mediated by Farnesol. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 2982–2992, 2001.

INTRA, J. et al. In Vitro Activity of Antifungal Drugs Against Trichophyton rubrum and Trichophyton mentagrophytes spp. by E-Test Method and Non-supplemented Mueller–Hinton Agar Plates. **Mycopathologia**, v. 184, n. 4, p. 517–523, 2019.

IVASKIENE M.; MATUSEVICIUS, A. P.; GRIGONIS, A.; ZAMOKAS, G.; BABICKAITE, L. Efficacy of topical therapy with newly developed terbinafine and econazole formulations in the treatment of dermatophytosis in cats. **Pol. J. Vet. Sci**., v. 19, n. 3, p. 535–543, 2016.

JÕERS, A.; KALDALU, N.; TENSON, T. The frequency of persisters in Escherichia coli reflects the kinetics of awakening from dormancy. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 13, p. 3379–3384, 2010.

KART, D. et al. Activity of disinfectants against multispecies biofilms formed by Staphylococcus aureus, Candida albicans and Pseudomonas aeruginosa. **Biofouling**, v. 30, n. 3, p. 377–383, 2014.

KASPEROVA, A.; KUNERT, J.; RASKA, M. The possible role of dermatophyte cysteine dioxygenase in keratin degradation. **Med Mycol,** v. 51, p. 449–54, 2013.

KAUFMAN, G. et al. Infection stages of the dermatophyte pathogen Trichophyton: Microscopic characterization and proteolytic enzymes. **Medical Mycology**, v. 45, n. 2, p. 149–155, 2007.

KEREN, I. et al. Characterization and transcriptome analysis of mycobacterium tuberculosis persisters. **mBio**, v. 2, n. 3, p. 3–12, 2011.

KO, J. Y. et al. Cure rate, duration required for complete cure and recurrence rate of onychomycosis according to clinical factors in Korean patients. **Mycoses**, v. 54, n. 5, p. 384–388, 2011.

KONEMAN, E. et al. **Diagnóstico microbiológico.** 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap. 11, parte 1.

KONG, E. F. et al. Commensal Protection of Staphylococcus aureus against Antimicrobials by Candida albicans Biofilm Matrix. **American Society for Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 1–12, 2016.

KONG, E. F.; TSUI, C.; KUCHARÍKOVÁ, S. Modulation of Staphylococcus aureus Candida albicans Quorum Sensing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 12, p. 1–14, 2017.

KOSECKA-STROJEK, M. et al. Development and Validation of a Reference Data Set for Assigning Staphylococcus Species Based on Next-Generation Sequencing of the 16S-23S rRNA Region. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. August, p. 1–19, 2019.

KUCHARÍKOVÁ, S. et al. Detailed comparison of Candida albicans and Candida glabrata biofilms under different conditions and their susceptibility to caspofungin and anidulafungin. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 9, p. 1261–1269, 2011.

KULSHRESTHA, A.; GUPTA, P. Polymicrobial interaction in biofilm: mechanistic insights. **Pathogens and Disease,** v. 80, n. 1, ftac010, 2022. https://doi.org/10.1093/femspd/ftac010.

LAFLEUR, M. D.; KUMAMOTO, C. A.; LEWIS, K. Candida albicans biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 11, p. 3839–3846, 2006.

LAKHUNDI, S.; ZHANG, K. Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. **Clinical microbiology reviews**, v. 31, n. 4, p. 1–103, 2018.

LAMERS, R. P.; MUTHUKRISHNAN, G.; CASTOE, T. A. et al. Phylogenetic relationships among Staphylococcus species and refinement of cluster groups based on multilocus data. **BMC Evol Biol**, v. 12, p. 171, 2012.

LARRUSKAIN, J.; PIÑEIRO, L.; IDIGORAS, P.; PÉREZ-TRALLERO, Dermatophytosis with concurrent lesions in distant locations. Prognostic and therapeutic significance]. **Enferm Infecc Microbiol Clin**. v. 23, n. 4, p.191-3, 2005.

LE, K. Y. et al. Role of Phenol-Soluble Modulins in Staphylococcus epidermidis Biofilm Formation and Infection of Indwelling Medical Devices. **Journal of Molecular Biology**, v. 431, n. 16, p. 3015–3027, 2019.

LEWIS, K. Persister cells and the riddle of biofilm survival. **Biochemistry** (Moscow), v. 70, n. 2, p. 267-274, 2005.

LEWIS, K. Persister cells. **Annual Review of Microbiology**, v. 64, p. 357–372, 2010.

LEWIS, P. O. et al. Treatment strategies for persistent methicillin-resistant Staphylococcus aureus bacteraemia**. Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 43, n. 5, p. 614-625, 2018.

LI, P. et al. Delicate metabolic control and coordinated stress response critically determine antifungal tolerance of Candida albicans biofilm persisters. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 6101–6112, 2015.

LIPNER, S. R.; SCHER, R. K. Onychomycosis: Treatment and prevention of recurrence. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 80, n. 4, p. 853–867, 2019.

LISOWSKA-ŁYSIAK, K. et al. Epidemiology and pathogenesis of staphylococcus bloodstream infections in humans: A review. **Polish Journal of Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 13–23, 2021.

LISTER, J. L.; HORSWILL, A. R. Staphylococcus aureus biofilms: Recent developments in biofilm dispersal. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, n. DEC, p. 1–9, 2014.

LIU, X. et al. Characterization of Skin Microbiome in Tinea Pedis. **Indian Journal of Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 422–427, 2019.

LOWY, F. Staphylococcus aureus infections. **New England Journal of Medicine**, v. 339, p. 520–532, 1998.

MARAKI, S.; MAVROMANOLAKI, V. E. Epidemiology of dermatophytoses in crete, greece: A 5-year survey. **Medical Mycology Journal**, v. 57, n. 4, p. E69–E75, 2016.

MARCOS-ZAMBRANO, L.J.; ESCRIBANO, P.; BOUZA, E.; GUINEA, J. Production of biofilm by Candida and non-Candida spp. Isolates causing fungemia: comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points. **Int. J. Med.Microbiol.,** v. 304, p. 1192-1198, 2014.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Cryptococcus neoformans biofilm formation depends on surface support and carbon source and reduces fungal cell susceptibility to heat, cold, and UV light. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 14, p. 4592–4601, 2007.

MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERES, N. T. A.; ROSSI, A. Pathogenesis of Dermatophytosis : Sensing the Host Tissue. **Mycopathologia**, v. 182, n. 1, p. 215–227, 2017.

MCCAIG, L. F. et al. Staphylococcus aureus-associated skin and soft tissue infections in ambulatory care. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 11, p. 1715–1723, 2006.

MCCLELLAN, KJ.; WISEMAN, LR.; MARKHAM, A. Terbinafine. An update of its use in superficial mycoses. **Drugs**. v. 58, n. 1, p. 179-202, 1999.

MENDEZ-TOVAR, L. J. Pathogenesis of dermatophytosis and tinea versicolor. **Clinics in Dermatology**, v. 28, n. 2, p. 185–189, 2010.

MICHIELS, J. E. et al. Molecular mechanisms and clinical implications of bacterial persistence. **Drug Resistance Updates**, v. 29, p. 76–89, 2016.

MITCHELL, KAITCHELL, F.; ZARNOWSKI, R.; ANDES, D. R. The Extracellular Matrix of Fungal Biofilms. **Advs Exp. Medicine, Biology-Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health**, v. 931, p. 21–35, 2016.

MOCHIZUKI, T. et al. Minipreparation ot total cellular DNA is useful as an alternative molecular marker of mitochondrial DNA for the identification of Trichophyton mentagrophytes and T. rubrum. **Mycoses**, v. 39, p. 31–35, 1996.

MONOD, M. et al. Aminopeptidases and dipeptidyl-peptidases secreted by the dermatophyte Trichophyton rubrum. **Microbiology**, v. 15, p. 145-155, 2005.

MOORMEIER, D. E. et al. Temporal and stochastic control of staphylococcus aureus biofilm development. **mBio**, v. 5, n. 5, p. 1–12, 2014.

MORIELLO, K. A. Treatment of dermatophytosis in dogs and cats: an update. **Veterinary Dermatology**, v. 52, n. 15, p. 99–107, 2004.

NAMVAR, A. E. et al. Clinical characteristics of Staphylococcus epidermidis: a systematic review. **GMS hygiene and infection control**, v. 9, n. 3, p. Doc23, 2014.

NEWSOM, S. W. B. Ogston's coccus. **Journal of Hospital Infection**, v. 70, n. 4, p. 369–372, 2008.

NOVICK, R. P.; GEISINGER, E. Quorum sensing in staphylococci. **Annual Review of Genetics**, v. 42, p. 541–564, September, 2008.

OGSTON, A. Report upon micro-organisms in surgical diseases. **British Medical Journal**, v. 1, n. 1054, p. 369–377, 1881.

OLIVEIRA, D.; BORGES, A.; SIMÕES, M. Staphylococcus aureus toxins and their molecular activity in infectious diseases. **Toxins**, v. 10, n. 6, 256, 2018. https://doi.org/10.3390/toxins10060252.

OTTO, M. Staphylococcal biofilms. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 4, p. 139–148, 2018.

OTTO, M. Staphylococcus epidermidis - The "accidental" pathogen**. Nature Reviews Microbiology**, v.7, n. 8, p. 555–567, 2009. https://doi.org/10.1038/nrmicro2182.

PADDER, S. A.; PRASAD, R.; SHAH, A. H. Quorum sensing: A less known mode of communication among fungi. **Microbiological Research**, v. 210, n. February, p. 51–58, 2018.

PAHARIK, A. E.; HORSWILL, A. R. The staphylococcal biofilm: Adhesins, regulation, and host response. **Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens**, v. 4, n. 2, p. 529–566, 2016.

PARTE, A. C. LPSN - List of prokaryotic names with standing in nomenclature (Bacterio.net), 20 years on. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 1825–1829, 2018.

PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 72, n. 2, p. 157–165, 2008.

PERCIVAL, S. L. et al. Microbiology of the skin and the role of biofilms in infection. **International Wound Journal**, v. 9, n. 1, p. 14–32, 2012.

PEREIRA, F. D. O. A review of recent research on antifungal agents against dermatophyte biofilms. **Medical Mycology**, v. 59, n. 4, p. 313–326, 2021.

PETERS, B. M. et al. Efficacy of ethanol against Candida albicans and Staphylococcus aureus polymicrobial biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 74–82, 2013.

PETERS, B. M. et al. Staphylococcus aureus adherence to Candida albicans hyphae is mediated by the hyphal adhesin Als3p. **Microbiology** (United Kingdom), v. 158, n. 12, p. 2975–2986, 2012.

PETERS, B. M.; NOVERRA, M. C. Candida albicans-staphylococcus aureus polymicrobial peritonitis modulates host innate immunity. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 6, p. 2178–2189, 2013.

PETRANYUK, A. et al. Factors influencing epidemiology of dermatomycoses at Gdansk, Poland and Grodno, Belarus. **Advances in Dermatology and Allergology**, v. 39, n. 4, p. 788–792, 2022.

PETRUCELLI, M. F. et al. Epidemiology and Diagnostic Perspectives of Dermatophytoses. **J Fungi** (Basel), v. 6, n. 4, p. 310, 2020.

PIERCE, C. G. et al. A simple and reproducible 96 well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nat Protoc**, v. 3, n. 9, p. 1494–1500, 2008.

PINTO, E. et al. Evaluation of Etest Performed in Mueller–Hinton Agar Supplemented with Glucose for Antifungal Susceptibility Testing of Clinical Isolates of Filamentous Fungi. **Mycopathologia**, v. 177, n. 3–4, p. 157–166, 2014.

PIRES, C. A. A. et al. Clinical, epidemiological, and therapeutic profile of dermatophytosis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 2, p. 259–264, 2014.

RADZIKOWSKI, J. L.; SCHRAMKE, H.; HEINEMANN, M. Bacterial persistence from a system-level perspective. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 46, p. 98–105, 2017.

RAMAGE, G. et al. Candida Biofilms- an Update.pdf. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 4, p. 633–638, 2005.

RAMAGE, G. et al. Fungal biofilm resistance. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, 528521, 2012. https://doi.org/10.1155/2012/528521.

RAMAGE, G. et al. Ramage 2002 - CA BF Farnesol-time dependent effect.pdf. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 11, p. 5459–5463, 2002.

RAMAGE, G.; MOWAT, E.; JONES, B.; WILLIAMS, C.; LOPEZ-RIBOT, J. Current understanding of fungal biofilms. **Crit. Rev. Microbiol**., v. 35, p. 340–355, 2009.

RASHID, A.; SCOTT, E.; RICHARDSON, M. D. Early events in the invasion of the human nail plate by Trichophyton mentagrophytes. **British Journal of Dermatology**, v. 133, n. 6, p. 932–940, 1995.

REDDY, P. N.; SRIRAMA, K.; DIRISALA, V. R. An Update on Clinical Burden, Diagnostic Tools, and Therapeutic Options of Staphylococcus aureus . **Infectious Diseases: Research and Treatment**, v. 10, p. 117991611770399, 2017.

RESCH, A. et al. Differential gene expression profiling of Staphylococcus aureus cultivated under biofilm and planktonic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 2663–2676, 2005.

REYNOSO, E. et al. Photodynamic inactivation to prevent and disrupt Staphylococcus aureus biofilm under different media conditions. **Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine**, v. 35, n. 5, p. 322–331, 2019.

ROCHA, C. H. L. et al. Synergism between the Antidepressant Sertraline and Caspofungin as an Approach to Minimise the Virulence and Resistance in the Dermatophyte Trichophyton rubrum. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 8, 815, 2022. https://doi.org/10.3390/jof8080815.

RØDER, H. L.; SØRENSEN, S. J.; BURMØLLE, M. Studying Bacterial Multispecies Biofilms: Where to Start? **Trends in Microbiology**, v. 24, n. 6, p. 503–513, 2016.

RODRIGUES, M.L.; NOSANCHUK, J.D. Fungal diseases as neglected pathogens: A wake-up call to public health officials. **PLoS Negl Trop**, v. 14, n. 2, p. 1-9, 2020.

RODRÍGUES-CERDEIRA, C. et al. A systematic review of worldwide data on tinea capitis: analysis of the last 20 years. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 35, n. 4, p. 844-883, 2021.

ROGERS, K. L.; FEY, P. D.; RUPP, M. E. Coagulase-Negative Staphylococcal Infections. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 23, n. 1, p. 73–98, 2009.

ROSATO, A.; PIARULLI, M.; SCHIAVONE, B. et al. In vitro effectiveness of anidulafungin against Candida sp. biofilms. **J Antibiot**. v. 66, p. 701–704, 2013.

ROSENBACH, Friedrich Julius, 1842-1923. **Microorganisms in the Wound Infections Diseases of Man**. (Mikro-organismen bei den Wund-Infections-Krankheiten des Menschen). Wiesbaden: J.F. 1884. Disponível em: https://wellcomecollection.org/works/xvar7vnm. (Royal college of Surgeons of England).

RUIZ-SORRIBAS, A. et al. In vitro polymicrobial inter-kingdom three-species biofilm model: influence of hyphae on biofilm formation and bacterial physiology. **Biofouling**, v. 37, n. 5, p. 481–493, 2021.

SALGUEIRO, V. C. et al. High rate of neonates colonized by methicillin-resistant Staphylococcus species in an Intensive Care Unit. **Journal of infection in developing countries**, v. 13, n. 9, p. 810–816, 2019.

SANGUINO, T. C.; JARROS, I. C; NEGRI, M. Ocorrência de dermatofitoses em pacientes do *Sistema Único de Saúde.* An. Bras. Dermatol., v .94, n.3, p.293-297, 2019.

SARDANA, K.; GUPTA, A.; MATHACHAN, S.R. Immunopathogenesis of Dermatophytoses and Factors Leading to Recalcitrant Infections**. Indian Dermatol Online J**, v. 12, n. 3, p. 389-399, 2021.

SCHER, R. K.; BARAN, R. Onychomycosis in clinical practice: Factors contributing to recurrence. **British Journal of Dermatology, Supplement**, v. 149, n. 65, p. 5–9, 2003.

SCHILCHER, K.; HORSWILL, A. R. Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 84, n. 3, p. 1–36, 2020.

SEGAL, E.; FRENKEL, M. Dermatophyte infections in environmental contexts. **Research in Microbiology**, v. 166, n. 7, p. 564–569, 2015.

SEN, S. et al. Rhamnolipid exhibits anti-biofilm activity against the dermatophytic fungi Trichophyton rubrum and Trichophyton mentagrophytes. **Biotechnology Reports**, v. 27, p. e00516, 2020.

SERRANO-FUJARTE, I.; LÓPEZ-ROMERO, E.; REYNA-LÓPEZ, G.E.; MARTÍNEZ-GÁMEZ, M.A.; VEGA-GONZÁLEZ, A.; CUÉLLAR-CRUZ, M. Influence of culture media on biofilm formation by Candida species and response of sessile cells to antifungals and oxidative stress. **Biomed Res Int**., v. 2015, p. 783639, 2015.

SHAPIRO, J. A.; NGUYEN, V. L.; CHAMBERLAIN, N. R. Evidence for persisters in Staphylococcus epidermidis RP62a planktonic cultures and biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 7, p. 950–960, 2011.

SHARMA, A.; CHANDRA, S.; SHARMA, M. Difference in keratinase activity of dermatophytes at different environmental conditions is an attribute of adaptation to parasitism. **Mycoses**, v. 55, p. 410-5, 2012.

SHEINBERG, G.; ROMERO, C.; HEREDIA, R.; CASAS, D.; GALICIA, E. Dermatophytes from a zoonotic point of view. **Int. J. Curr. Adv. Res**, v. 6, n. 1, p.1856-1861, 2017.

SHIMOYAMA, H. SEI, Y. 2016 Epidemiological Survey of Dermatomycoses in Japan. **Med Mycol J**, v. 60, n. 3, p. 75-82, 2019.

SHIRAKI, Y. *et al*. Cytokine secretion profiles of human keratinocytes during *Trichophyton tonsurans* and *Arthroderma benhamiae* infections. **Journal of Medical Microbiology,** v. 55, n. 9, p. 1175–1185, 2006.

SIGURGEIRSSON, B. et al. L.I.ON. Study: Efficacy and tolerability of continuous terbinafine (Lamisil®) compared to intermittent itraconazole in the treatment of toenail onychomycosis. **British Journal of Dermatology, Supplement**, v. 141, n. 56, p. 5–14, 1999.

SILVA-ROCHA, W. P. *et al*. Epidemiology and fungal species distribution of superficial mycoses in Northeast Brazil. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 27, n. 1, p. 57–64, 2017.

SINGH, A. et al. High terbinafine resistance in Trichophyton interdigitale isolates in Delhi, India harbouring mutations in the squalene epoxidase gene. **Mycoses**, v. 61, n. 7, p. 477–484, 2018.

SINGH, R. et al. Role of persisters and small-colony variants in antibiotic resistance of planktonic and biofilm-associated Staphylococcus aureus: An in vitro study. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 8, p. 1067–1073, 2009.

SITEPU, E. H.; MUIS, K.; PUTRA, I. B. Dermatophytes and bacterial superinfectives in tinea pedis patients at Haji Adam Malik Central Hospital, Medan-Indonesia. **Bali Medical Journal**, v. 7, n. 2, p. 452–456, 2018.

STEWART, P. S. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 292, n. 2, p. 107–113, 2002.

SUTIPORNPALANGKUL, W.; NISHITANI, K.; SCHWARZ, E. M. Quantitative flow chamber system for evaluating in vitro biofilms and the kinetics of S. aureus biofilm formation in human plasma media. **BMC Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 1–12, 2021.

TAGHIPOUR, S. et al. Diversity of geophilic dermatophytes species in the soils of iran; the significant preponderance of nannizzia fulva. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 5, p. 1–10, 2021.

TAN, Y.; LEONHARD, M.; SCHNEIDER-STICKLER, B. Evaluation of culture conditions for mixed biofilm formation with clinically isolated non-albicans Candida species and Staphylococcus epidermidis on silicone. **Microbial Pathogenesis**, v. 112, n. October, p. 215–220, 2017.

TEXERA, N.; PERES, D. A.; ROSSI, A. Dermatófitos: Interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. **An. Bras. Dermatol**, v. 85, p. 657-667, 2010.

THEIN, Z. M. et al. Community lifestyle of Candida in mixed biofilms: A mini review. **Mycoses**, v. 52, n. 6, p. 467–475, 2009.

TONG, S. Y. C. et al. Staphylococcus aureus infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 603–661, 2015.

TORRES, M. E.L.M.; HERCULANO, P. N.; LIMA, M.L.F.; SOARES, P. T.; SIQUEIRA, A.B.S.; SOUZA-MOTTA, C. M. et al. Isolamento e perfil enzimático de cães e gatos com dermatofitose atendidos em hospitais veterinários do Recife, Pernambuco. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 38, n. 5, p. 930-934, 2018.

TURNER, N. et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: an overview of basic and clinical research. **Nat Rev Microbiol**, v. 17, n. 4, p. 203–218, 2019.

VANDECANDELAERE, I.; VAN ACKER, H.; COENYE, T. A microplate-based system as in vitro model of biofilm growth and quantification. **Methods in Molecular Biology**, v. 1333, p. 53–66, 2016.

VEASEY, J. V. et al. Epidemiological profile of tinea capitis in São Paulo City. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 92, n. 2, p. 283–284, 2017.

VERMOUT, S. et al. Pathogenesis of dermatophytosis. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5–6, p. 267–275, 2008.

VILA, T. V. M.; ROZENTAL, S. Biofilm Formation as a Pathogenicity Factor of Medically Important Fungi. **Fungal Pathogenicity**, p. 1–24, 2016.

VUONG, C. et al. Increased colonization of indwelling medical devices by quorum-sensing mutants of Staphylococcus epidermidis in vivo. **Journal of Infectious Diseases**, v. 190, n. 8, p. 1498–1505, 2004.

WEITZMAN I; SUMMERBELL, R. The Dermatophytes. **Clinical Microbiology Reviews.**, v. 8, n. 2, p. 240–259, 1995.

WERTHEIM, H. F. L. et al. The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections. **Lancet Infectious Diseases**, v. 5, n. 12, p. 751–762, 2005.

WIJESINGHE, G. DILHARI, A. GAYANI, B. KOTTEGODA, N. et al,. Influence of Laboratory Culture Media on in vitro Growth, Adhesion, and Biofilm Formation of Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus. **Med Princ Pract**, v. 28, n. 1, p, 28-35, 2019.

WIJESINGHE, G. et al. Influence of Laboratory Culture Media on in vitro Growth, Adhesion, and Biofilm Formation of Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus. **Medical Principles and Practice**, v. 28, n. 1, p. 28–35, 2019.

WONGSUK, T.; PUMEESAT, P.; LUPLERTLOP, N. Fungal quorum sensing molecules: Role in fungal morphogenesis and pathogenicity. **Journal of Basic Microbiology**, v. 56, n. 5, p. 440–447, 2016.

WOOD, T. K.; KNABEL, S. J.; KWAN, B. W. Bacterial persister cell formation and dormancy. **Appl Environ Microbiol**, v. 79, n. 23, p. 7116-21, 2013.

WUYTS, J.; VAN DIJCK, P.; HOLTAPPELS, M. Fungal persister cells: The basis for recalcitrant infections? **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 10, p. 1–14, 2018.

XU, H. et al. Streptococcal co-infection augments candida pathogenicity by amplifying the mucosal inflammatory response. **Cellular Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 214–231, 2014.

XU, K. et al. Activity of coumarin against Candida albicans biofilms. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 29, n. 1, 28-34, 2018. doi: 10.1016/j.mycmed.2018.12.003.

XU, Z. et al. Crystal Violet and XTT Assays on Staphylococcus aureus Biofilm Quantification. **Current Microbiology**, v. 73, n. 4, p. 474–482, 2016.

YADAV, M. K. et al. In vitro multi-species biofilms of methicillin-resistant Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa and their host interaction during in vivo colonization of an otitis media rat model. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. Apr, p. 1–21, 2017.

YANG, S.; HAY, I.; CAMERON, D. et al. Antibiotic regimen based on population analysis of residing persister cells eradicates Staphylococcus epidermidis biofilms. **Sci. Rep.,** v. 5, p. 18578, 2016.

YAO, Y.; STURDEVANT, D. E.; OTTO, M. Genomewide analysis of gene expression in Staphylococcus epidermidis biofilms: Insights into the pathophysiology of S. epidermidis biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilms. **Journal of Infectious Diseases**, v. 191, n. 2, p. 289–298, 2005.

YENIŞEHIRLI, G. et al. In vitro activities of antifungal drugs against dermatophytes isolated in Tokat, Turkey. **International Journal of Dermatology**, v. 52, n. 12, p. 1557–1560, 2013.

ZERAIK, A. E.; NITSCHKE, M. Influence of Growth Media and Temperature on Bacterial Adhesion to Polystyrene Surfaces. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v. 55, n. 4, p. 569–576, july-August, 2012.

ZHAN, P.; LIU, W. The Changing Face of Dermatophytic Infections Worldwide. **Mycopathologia**, v. 182, n. 1–2, p. 77–86, 2017.

ZHANG, Z. et al. Preparation, Characterization, and Staphylococcus aureus Biofilm Elimination Effect of Baicalein-Loaded β-Cyclodextrin-Grafted Chitosan Nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 17, p. 5287–5302, November, 2022.

ZHU, L. A Review of Staphylococcus aureus and the Emergence of Drug-Resistant Problem. **Advances in Microbiology**, v. 8, n. 1, January 2018.

ZURITA, J.; HAY, R. J. Adherence of dermatophyte microconidia and arthroconidia to human keratinocytes in vitro. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 89, n. 5, p. 529–534, 1987.