



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Campus de Araraquara

LARIANE TEODORO OLIVEIRA

COMPONENTES ESTRUTURAIS DA MATRIZ DO BIOFILME DE *Paracoccidioides*
spp. E SUA INTERAÇÃO COM DIFERENTES MICRORGANISMOS

Araraquara, SP
2020

LARIANE TEODORO OLIVEIRA

**COMPONENTES ESTRUTURAIS DA MATRIZ DO BIOFILME DE *Paracoccidioides*
spp. E SUA INTERAÇÃO COM DIFERENTES MICRORGANISMOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini

Coorientadora: Profa. Dra. Regina Helena Pires

Araraquara, SP

2020

048c Oliveira, Lariane Teodoro.
Componentes estruturais da matriz do biofilme de *Paracoccidioides spp.* e sua interação com diferentes microrganismos / Lariane Teodoro Oliveira. – Araraquara: [S.n.], 2020.
89 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 concentração Micologia.

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

1. Biofilme. 2. Matriz extracelular. 3. *Paracoccidioides spp.* 4. Biofilme dupla-espécie. 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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ESTUDO DOS COMPONENTES ESTRUTURAIS DA MATRIZ DE BIOFILME DE *Paracoccidioides* spp. E SUA INTERAÇÃO COM DIFERENTES MICRORGANISMOS

AUTORA: LARIANE TEODORO OLIVEIRA

ORIENTADORA: MARIA JOSÉ SOARES MENDES GIANNINI

COORIENTADORA: REGINA HELENA PIRES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARIA JOSÉ SOARES MENDES GIANNINI
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Profa. Dra. MARLISE INÊZ KLEIN FURLAN
Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese / Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Prof. Dr. GIL BENARD
Instituto de Medicina Tropical / Universidade de São Paulo

Araraquara, 24 de setembro de 2020

“A verdadeira medida de um homem não se vê na forma como se comporta em momentos de conforto e conveniência, mas em como se mantém em tempos de controvérsia e desafio”.

Martin Luther King

DEDICATÓRIA

A quem esteve presente em todos os momentos durante esta caminhada e são merecedores de todas as minhas conquistas: Deus, meus pais Maria e Anderson, meu noivo Thiago, minha irmã Larissa, meu sobrinho Eduardo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, minha maior e eterna gratidão a Deus pela vida, pelo amor incondicional, pelas oportunidades e por me capacitar durante o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a meus pais Maria Auxiliadora (Dora) e Anderson dos Santos que, em primeiro lugar, me deram uma base sólida e me ensinaram valores essenciais. Fica difícil expressar o quanto são importantes, com certeza toda caminhada só é possível porque tenho o apoio de vocês. Sou grata por não terem poupado esforços para minha educação, por me apoiarem e me incentivar durante a vida, por serem grandes exemplos de humildade, honestidade e perseverança. Amo vocês.

Ao meu noivo, Thiago Rosa, por todo seu amor, apoio, compreensão e paciência (que por sinal foi muita rsrs). Aprendeu o significado de biofilme de tanto me ouvir falar e sempre me incentivou a prosseguir nos momentos difíceis. Seu humor e companheirismo tornaram o meu dia-a-dia mais leve e feliz. Amo você de janeiro a janeiro.

À minha irmã, Larissa Teodoro, minha companheira de vida e de brigas rsrs. Obrigada por todo incentivo, torcida e ajuda em todos os momentos que precisei. Por me acolher em seu lar, juntamente com meu cunhado Renan, nos momentos em que precisava fugir da pressão do mestrado. Obrigada por trazerem ao mundo minha joia preciosa, Eduardo, meu maior amor em forma de afilhado. Aprendo tanto com vocês.

À Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini por me aceitar como orientanda, por abrir as portas do seu laboratório e por acreditar em meu trabalho. Obrigada pela confiança a mim depositada durante toda a realização do mestrado e por me proporcionar desafios que contribuíram muito para meu crescimento profissional e pessoal.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Regina Helena Pires, que tenho imensa admiração e respeito pela sua dedicação incansável à carreira acadêmica. Sou grata por ter conhecido este exemplo de profissional, que não mede esforços para transmitir sua experiência e conhecimento.

À Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida pela colaboração, apoio e disponibilidade em ajudar.

À minha “homemate”, Junya de Lacorte Singulani, companheira de almoço, cafés, fins de semanas e desabafos (que foram muitos rsrs). Sou tão grata pela

oportunidade de te conhecer, sem dúvidas você foi um presente de Deus em minha vida. Obrigada por transmitir todo o seu conhecimento e experiência, por não medir esforços para me fazer o bem, por me ensinar muito sobre a vida acadêmica e por acreditar em mim quando nem eu mesmo acreditava.

À minha confidente profissional e pessoal, Nathália Fregonezi, por todos momentos compartilhados, por estar ao meu lado nos dias difíceis e nos dias de muitas risadas. Você foi essencial durante todo esse processo, passamos por muitas experiências ao longo destes 2 anos, dividindo trabalhos, fluxos (rsrs) e preocupações. Minha gratidão é eterna por todo o seu apoio minha grande amiga, você ocupou um lugar enorme em minha vida!

Ao Kelvin Souza, por todo companheirismo, por todas as discussões de experimentos e também por todos os assuntos aleatórios que tornavam o meu dia mais leve.

À nossa turma de rolês, que inclusive foram os melhores, Marina, Bianca, Francine, Carol. Vocês tornaram todo esse período conturbado mais leve e divertido. Meu imenso obrigada.

Aos mais experientes, que mesmo em pouco tempo me ensinaram tanto, Patrícia (Laranja), Caroline (Panta) e Haroldo.

À Claudia Tavares, pelas conversas, por ser sempre tão prestativa e por me ensinar no InCell. Ao Paulo Cesar, por me ajudar nas dúvidas de proteínas e sempre me socorrer no laboratório.

A todos da Micologia que não foram citados aqui, mas que em algum momento certamente me ajudaram nesta caminhada científica, que contribuíram para o desenvolvimento do meu trabalho e para meu crescimento profissional e pessoal.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP) pelos serviços prestados.

A banca representada pela Profa. Dra. Marlise Inêz Klein Furlan e Prof. Dr Gil Benard pela atenção dispensada na leitura deste trabalho e contribuições.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e, posteriormente, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - processo nº 2018/15877-9) pela bolsa de mestrado concedida. À CAPES/FCT (processo nº 345/13) pela bolsa de doutorado sanduíche concedida.

A todos aqueles que, embora não nomeados, me presentearam com seus inestimáveis apoios em distintos momentos e independente de distância física, o meu reconhecido e carinhoso muito obrigada.

RESUMO

A habilidade de formar biofilme por *Paracoccidioides brasiliensis* ocorre tanto *in vitro* como *in vivo*. A paracoccidioidomicose é uma doença sistêmica que envolve, primariamente, os pulmões e, posteriormente, dissemina-se para outros órgãos e sistemas, incluindo a cavidade bucal. As lesões bucais podem estar associadas a várias bactérias e fungos e a co-agregação de *Paracoccidioides* spp com essas bactérias e fungos ainda não foi demonstrada. Além disso, os princípios básicos da formação de biofilme deste fungo e a sua compreensão molecular e organização estrutural precisam ser mais bem conhecidos, visando melhores abordagens terapêuticas. Assim, o estudo teve como objetivo caracterizar os elementos estruturais da matriz do biofilme monoespécie de *Paracoccidioides* spp., bem como avaliar a interação desse fungo com as bactérias *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus* e com o fungo *Candida albicans* na formação de biofilme. Foram utilizados os isolados *P. brasiliensis* (Pb18), *P. lutzii* (Pb01 e 8334) e *P. restrepiensis* (339 e 192), na fase leveduriforme, avaliando-se a atividade metabólica, a biomassa total e a estrutura tridimensional dos biofilmes. A matriz extracelular dos biofilmes de *Paracoccidioides* spp. foi extraída por sonicação e foram quantificados os polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular (eDNA). Todas as cepas estudadas de *Paracoccidioides* foram capazes de formar biofilme, apresentando valores maiores de atividade metabólica e de biomassa em 144 horas. A matriz do biofilme de *P. brasiliensis* foi similar ao de *P. lutzii*, destacando-se a presença maior de polissacarídeos, seguido de proteínas e de eDNA. Os biofilmes dupla-espécies de *Paracoccidioides* spp. com *S. mutans* e *S. aureus*, de modo geral, mostraram antagonismo evidenciado pelos resultados de biomassa total, atividade metabólica, contagem de colônias e eletromicrografias, os quais mostraram inibição no crescimento dos fungos. Em contraste, a interação de *P. brasiliensis* com *C. albicans* mostrou que os dois microrganismos podem coexistir em um mesmo ambiente, conforme análise *in vitro* e *in vivo* no modelo *Galleria mellonella*. Esses dados ampliam o conhecimento associado à dinâmica de crescimento de biofilme fúngico e pode contribuir para a descoberta de novas estratégias terapêuticas para essas infecções.

Palavras-chave: Biofilme, matriz extracelular, *Paracoccidioides* spp., biofilme dupla-espécie.

ABSTRACT

The ability to form biofilm by *Paracoccidioides brasiliensis* occurs both *in vitro* and *in vivo*. Paracoccidioidomycosis is a systemic disease that primarily involves the lungs and subsequently spreads to other organs and systems, including the oral cavity. Oral lesions can be associated with various bacteria and fungi. The co-aggregation of *Paracoccidioides* spp with these bacteria and fungi has not yet been demonstrated. In addition, the basic principles of biofilm formation of this fungus and its molecular understanding and structural organization need to be better known, aiming at better therapeutic approaches. Thus, the study aimed to characterize the structural elements of the monospecies biofilm matrix of *Paracoccidioides* spp., and evaluate the interaction of this fungus with the bacteria *Streptococcus mutans* and *Staphylococcus aureus* and with the fungus *Candida albicans* in the formation of biofilm. The isolates *P. brasiliensis* (Pb18), *P. lutzii* (Pb01 and 8334), and *P. restrepiensis* (339 and 192) were used in the yeast phase, evaluating the metabolic activity, the total biomass, and the three-dimensional structure of the biofilms. The extracellular matrix of the biofilms of *Paracoccidioides* spp. was extracted by sonication and polysaccharides, proteins, and extracellular DNA (eDNA) were quantified. All studied strains of *Paracoccidioides* were able to form a biofilm, with higher values of metabolic activity and biomass in 144 hours. The biofilm matrix of *P. brasiliensis* was similar to *P. lutzii*, made up of polysaccharides, following proteins, and eDNA. The mixed biofilms of *Paracoccidioides* spp. with the bacteria *S. mutans* and *S. aureus*, in general, showed antagonism evidenced by the results of total biomass, metabolic activity, colony counts, and electromicrographs, which showed inhibition in the growth of fungi. In contrast, the interaction of *P. brasiliensis* with *C. albicans* showed that the two microorganisms could coexist in the same environment, according to *in vitro* and *in vivo* analysis in *Galleria mellonella* model. These data expand the knowledge associated with the growth dynamics of fungal biofilm and can contribute to the discovery of new therapeutic strategies for these infections.

Keywords: Biofilm, extracellular matrix, *P. brasiliensis*, dual-species biofilm.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Quantificação da biomassa total dos biofilmes de <i>P. brasiliensis</i> (Pb18), <i>P. lutzii</i> (Pb01 e 8334) e <i>P. restrepiensis</i> (339 e 192) por meio da metodologia do cristal violeta.....	38
Figura 2.	Quantificação da atividade metabólica dos biofilmes formados por <i>P. brasiliensis</i> (Pb18), <i>P. lutzii</i> (Pb01 e 8334) e <i>P. restrepiensis</i> (339 e 192), por meio do ensaio de redução do XTT.....	38
Figura 3.	Imagens representativas da estrutura dos biofilmes de <i>P. brasiliensis</i> (Pb18), obtidas por microscopia confocal de varredura a laser (CLSM).....	41
Figura 4.	Imagens representativas da estrutura dos biofilmes de <i>P. lutzii</i> (Pb01), obtidas por microscopia confocal de varredura a laser (CLSM).....	42
Figura 5.	Representação gráfica das dosagens do crescimento planctônico em comparação com os biofilmes de <i>P. brasiliensis</i> (Pb18) e <i>P. lutzii</i> (Pb01).....	44
Figura 6.	Quantificação dos biofilmes formados por <i>P. brasiliensis</i> (Pb18) e <i>S. mutans</i> (Sm) mono e dupla-espécies. (A) quantificação das biomassas totais, (B) quantificação da atividade metabólica e (C) contagem de UFC/mL.....	49
Figura 7.	Imagens representativas da estrutura dos biofilmes mono e dupla-espécies de <i>P. brasiliensis</i> e <i>S. mutans</i>	51
Figura 8.	Quantificação dos biofilmes formados por <i>P. lutzii</i> (Pb01) e <i>S. mutans</i> (Sm) mono e dupla-espécies. (A) quantificação das biomassas totais, (B) quantificação da atividade metabólica e (C) contagem de UFC/mL.....	53
Figura 9.	Imagens representativas da estrutura dos biofilmes mono e dupla-espécies de <i>P. lutzii</i> e <i>S. mutans</i>	55
Figura 10.	Quantificação dos biofilmes formados por <i>P. brasiliensis</i> (Pb18) e <i>S. aureus</i> (Sa) mono e dupla-espécies. (A) quantificação das biomassas totais, (B) quantificação da atividade metabólica e (C) contagem de UFC/mL.....	59
Figura 11.	Imagens representativas da estrutura dos biofilmes mono e dupla-espécies de <i>P. brasiliensis</i> e <i>S. aureus</i>	61
Figura 12.	Quantificação dos biofilmes formados por <i>P. lutzii</i> (Pb01) e <i>S. aureus</i> (Sa) mono e dupla-espécies. (A) quantificação das biomassas totais, (B) quantificação da atividade metabólica e (C) contagem de UFC/mL.....	63

Figura 13. Imagens representativas da estrutura dos biofilmes mono e dupla-espécies de <i>P. lutzii</i> e <i>S. aureus</i>	65
Figura 14. Quantificação dos biofilmes formados por <i>P. brasiliensis</i> (Pb18) e <i>C. albicans</i> (Ca) mono e dupla-espécie. (A) quantificação das biomassas totais e (B) quantificação da atividade metabólica.....	69
Figura 15. Contagem de UFC/mL dos biofilmes formados por <i>P. brasiliensis</i> (Pb18) e <i>C. albicans</i> (Ca) mono e dupla-espécies. (A) <i>C. albicans</i> em comparação com as interações e (B) <i>P. brasiliensis</i> em comparação com as interações.....	71
Figura 16. Contagem de UFC/mL dos biofilmes formados por <i>P. brasiliensis</i> (Pb18) e <i>C. albicans</i> (Ca) mono e dupla-espécies. (A) <i>C. albicans</i> em comparação com as interações e (B) <i>P. brasiliensis</i> em comparação com as interações.....	72
Figura 17. Curva de sobrevivência de larvas de <i>Galleria mellonella</i> infectadas com 1×10^6 células/larvas de células planctônicas, biofilmes mono espécie de <i>P. brasiliensis</i> (Pb) e <i>C. albicans</i> e dupla-espécie cultivado após <i>P. brasiliensis</i> (Pb) ter sido adicionado a biofilmes pré-formado de <i>C. albicans</i> (Ca).....	74

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Análise da matriz extracelular dos biofilmes de *P. brasiliensis* (Pb18) e *P. lutzii* (Pb01)..... **45**
- Tabela 2.** pH do meio de cultura gasto em fases distintas de desenvolvimento de biofilmes mono e dupla-espécie de *P. brasiliensis* e *S. mutans*..... **47**
- Tabela 3.** pH do meio de cultura gasto em fases distintas de desenvolvimento de biofilmes mono e dupla-espécie de *P. lutzii* e *S. mutans*..... **52**
- Tabela 4.** pH do meio de cultura gasto em fases distintas de desenvolvimento de biofilmes mono e dupla-espécie de *P. brasiliensis* e *S. aureus*..... **57**
- Tabela 5.** pH do meio de cultura gasto em fases distintas de desenvolvimento de biofilmes mono e dupla-espécie de *P. lutzii* e *S. aureus*..... **62**

LISTA DE ABREVIACOES, SIGLAS E ESTRUTRAS QUÍMICAS

% - Porcentagem

°C - Graus Celsius

µg - Micrograma

µL - Microlitros

µM - Micromolar

ANOVA - Análise de Variância

BHI - gar Brain Heart Infusion

Ca - *Candida albicans*

CFSE - Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester

DNA - cido desoxirribonucleico

EBP - Estradiol binding protein

eDNA - ácido desoxirribonucleico extracelular

FITC - Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester

FKS1 - Gene 1,3-β-D-glucana sintase

g - Gramas

gp43 - Glicoproteína de 43kDa

h - Hora

KCl - Cloreto de potássio

kDa - Kilodalton

KH₂PO₄ - Fosfato monopotássico

L - Litros

mg - Miligrama

min - Minuto

mL - Mililitro

mM - Milimolar

Na₂HPO₄ - Fosfato dissódico

NaCl - Cloreto de sódio

ng - Nanograma

nm - Nanômetro

Pb01 - *Paracoccidioides lutzii*

Pb18 - *Paracoccidioides brasiliensis*

PBS - Solução salina tamponada

PCR - Reação em cadeia da polimerase

pH - Potencial Hidrogeniônico

QS - *Quorum sensing*

RGP - Polissacarídeo glucose-ramnose

s - Segundo

TE - Tampão Tris-HCl EDTA

UFC - Unidade formadora de colônias

UV - Radiação ultravioleta

v - volume

xg - Força relativa máxima

α - Letra grega que significa “alfa”

β - Letra grega que significa “beta”

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. <i>Paracoccidioides</i> spp. e paracoccidioidomicose.....	18
1.2. Fatores de virulência.....	22
1.3. Microbiota e <i>Paracoccidioides</i> spp.....	24
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. OBJETIVO.....	29
3.1. Objetivo geral.....	29
3.2. Objetivos específicos.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1. Microrganismos.....	29
4.2. Preparo do inóculo.....	30
4.3. Ensaio de formação de biofilme.....	30
4.4. Análises quantitativas dos biofilmes mono e dupla-espécies.....	31
4.4.1. Quantificação da biomassa total.....	31
4.4.2. Quantificação da atividade metabólica.....	31
4.4.3. Quantificação de Unidade formadora de colônia (UFC/mL).....	32
4.5. Determinação da estrutura dos biofilmes mono e dupla-espécies...	32
4.5.1. Microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) dos biofilmes mono-espécie de <i>Paracoccidioides</i> spp.....	32
4.5.2. Microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) dos biofilmes dupla-espécies de <i>P. brasiliensis</i> e <i>Candida albicans</i>	33
4.5.3. Análise da estrutura dos biofilmes dupla-espécies de <i>Paracoccidioides</i> spp com as bactérias <i>S. mutans</i> e <i>S. aureus</i> por meio do IN Cell Analyzer 2000.....	34
4.6. Análise da composição da matriz extracelular dos biofilmes mono- espécie de <i>Paracoccidioides</i> spp.....	34
4.6.1. Extração da matriz extracelular.....	34
4.6.2. Determinação do conteúdo total de polissacarídeos.....	34
4.6.3. Dosagem de proteínas.....	35
4.6.4. Dosagem de eDNA.....	35
4.7. Ensaio de sobrevivência usando o modelo <i>Galleria mellonella</i>	35
4.8. Análises estatísticas.....	36

5. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	37
5.1. Caracterização dos biofilmes de diferentes espécies de <i>Paracoccidioides</i> spp.....	37
5.2. Determinação da estrutura do biofilme de <i>Paracoccidioides</i> spp por meio de microscopia confocal de varredura a laser (CLSM).....	39
5.3. Determinação dos componentes da matriz extracelular dos biofilmes de <i>P. brasiliensis</i> e <i>P. lutzii</i>	43
5.4. Interação de <i>Paracoccidioides</i> spp com <i>S. mutans</i> na formação de biofilme.....	46
5.5. Interação de <i>Paracoccidioides</i> spp com <i>S. aureus</i> na formação de biofilme.....	56
5.6. Interação de <i>P. brasiliensis</i> spp com <i>C. albicans</i> na formação de biofilme.....	67
6. CONCLUSÕES.....	76
7. REFERÊNCIAS.....	77

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Paracoccidioides* spp. e paracoccidioidomicose

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica humana, que assume importância clínica cada vez maior, devido ao aumento de prevalência e das taxas de mortalidade. Essa micose é endêmica na área que se estende do México à Argentina, e é causada por *Paracoccidioides* spp. A maioria dos casos, ao redor de 80%, afeta as populações brasileiras das regiões Sul e Sudeste, onde a incidência anual atinge 10 a 30 casos por 1.000.000 habitantes (COUTINHO *et al.*, 2002).

No Brasil, país com maior número de casos notificados, chegando a 3.360 a 5.500 casos por ano entre 1996 a 2006 com 168 mortes, a PMC é uma das micoses com maior taxa de mortalidade (COUTINHO *et al.*, 2002). É a oitava causa de mortalidade entre as doenças infecciosas crônicas, com 1,65 óbitos por 10⁶ habitantes (MARTINEZ, 2015; GIACOMAZZI *et al.*, 2016). O país apresenta áreas endêmicas, divididas segundo o grau de incidência da doença; as regiões sudeste, sul e centro-oeste são descritas como altamente endêmicas; as regiões localizadas ao leste da Amazônia, incluindo os estados do Pará, Maranhão e Tocantins são considerados como moderadamente endêmicas e as regiões do extremo-oeste da Amazônia, o estado de Rondônia e o Nordeste do país apresentam baixa endemicidade (COUTINHO *et al.*, 2002; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006; BOCCA *et al.*, 2013; MARTINEZ, 2015; GIACOMAZZI *et al.*, 2016). No entanto, por ser uma infecção de longo período de latência, média de 15,3 anos, o local de aquisição da PCM, sua real distribuição e diagnóstico são comprometidos (BRUMMER *et al.*, 1993).

Em 1908, o fungo foi isolado pela primeira vez por Adolfo Lutz, a partir de lesões bucais de um de seus pacientes na Santa Casa de São Paulo. As características morfológica e biológica do fungo foram descritas em 1912, por Alfonso Splendore que o denominou de *Zymonema brasiliensis*. Após dezoito anos, em 1930, Floriano Paulo Almeida, propôs o nome de *Paracoccidioides brasiliensis*. O termo paracoccidioidomicose foi instituído em 1971, durante o primeiro simpósio sobre este tema, com a presença de micologistas das Américas, sediada na cidade de Medellín, na Colômbia (LACAZ, 1994).

Estudos por metodologias moleculares (MATUTE *et al.*, 2006; CARRERO *et al.*, 2008), apoiados por estudos proteômicos (ZAMBUZZI-CARVALHO *et al.*, 2009)

revelaram que 65 isolados de *P. brasiliensis* constituíam três linhagens distintas: S1, PS2, PS3 e uma nova espécie. A linhagem S1 incluía isolados do Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela; PS2, do Brasil e Venezuela e PS3, isolados restritos à Colômbia, além da linhagem Pb01, renomeada *P. lutzii* (TEIXEIRA *et al.*, 2009). Estas espécies crípticas foram reclassificadas como *P. americana*, *P. restrepiensis* e *P. venezuelensis* (TURISSINI *et al.*, 2017). Mais recentemente, por meio de estudos moleculares e fenotípicos esse gênero foi classificado em cinco espécies: *P. brasiliensis* (S1), *P. americana* (PS2), *P. restrepiensis* (PS3), *P. venezuelensis* (PS4) e *P. lutzii* (CARRERO *et al.*, 2008; HRYCYK *et al.*, 2018).

Uma característica importante de vários fungos patogênicos é a sua habilidade de alterar sua morfologia da fase filamentosa multicelular para uma unicelular, em resposta a condição do meio ambiente a qual foi exposto ou quando está em contato com tecidos do hospedeiro infectado (SAN-BLAS *et al.*, 2002). Este grupo, inclui fungos filogeneticamente diversos como *Talaromyces marneffe* (recentemente renomeado de *Penicillium marneffe*), *Blastomyces dermatitidis* (teleomorfo *Ajellomyces dermatitidis*), espécies de *Coccidioides* (*C. immitis* e *C. posadasii*), *Histoplasma capsulatum* (teleomorfo *Ajellomyces capsulatum*), *Paracoccidioides* spp e *Sporothrix schenckii* (teleomorfo *Ophiostoma schenckii*) (RAPPEYE *et al.*, 2004; BOYCE; ANDRIANOPOULOS, 2015; VAN DYKE *et al.*, 2019).

Paracoccidioides pertence ao grupo de fungos termodimórficos e apresenta forma miceliar quando exposto a temperatura ambiente (25 °C) e, forma leveduriforme, em temperatura de 37 °C. O dimorfismo possibilita tanto o estabelecimento da infecção em um hospedeiro, quanto a ocupação de diferentes nichos saprobióticos. A principal característica morfológica microscópica de *Paracoccidioides* spp., na fase leveduriforme, é a presença de brotamentos periféricos à célula-mãe, gerando uma estrutura semelhante a uma roda-de-leme; as colônias têm coloração creme com aspecto cerebriforme (MARTINEZ, 2004). As colônias de micélio apresentam, macroscopicamente, coloração branca com micélios aéreos, irregulares e curtos; microscopicamente, notam-se hifas septadas, delgadas e hialinas com raros clamidósporos terminais ou intercalares (MARTINEZ, 2004).

A alteração morfológica de *P. brasiliensis* é acompanhada por extensas modificações na composição da membrana e parece celular (SAN-BLAS; VERNET, 1977; SAN-BLAS *et al.*, 1984). A parede celular na transição micélio-levedura é acompanhada pela modificação do polissacarídeo prevalente β -1-3 glucana (fase

micelial) para α -1-3-glucana (fase leveduriforme), em relação a quantidade e ao arranjo espacial desses polissacarídeos (SAN-BLAS; VERNET, 1977; SAN-BLAS *et al.*, 1984).

Paracoccidioides spp. está presente nos solos de regiões endêmicas, especialmente em áreas de cultivo de café e cana de açúcar (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006; FERREIRA, 2009; BONIFACIO *et al.*, 2015; ARANTES *et al.*, 2016; MARTINEZ, 2017). A infecção ocorre quando, a partir do micélio, conídios ou fragmentos de hifas são dispersos no meio ambiente e, após inalação pelo hospedeiro, estas estruturas se diferenciam em formas características da fase leveduriforme. Esta transição é essencial para o estabelecimento da infecção, no qual o pulmão é o primeiro sítio afetado e caracteriza uma doença de via pulmonar primária. No entanto, as formas leveduriformes podem se espalhar para outros órgãos (LACAZ, 1994).

A predominância da doença clínica é em homens adultos, trabalhadores de zonas rurais e imunossuprimidos (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006; MARTINEZ, 2017). A incidência da PCM no sexo masculino (80 a 90% dos casos) chega em uma relação homem/mulher aproximadamente de 15:1 casos (RESTREPO *et al.*, 1984). Vários estudos sugerem que o mecanismo básico desse processo envolva a regulação hormonal (RESTREPO *et al.*, 1984; SALAZAR *et al.*, 1988). As mulheres contam com a proteção do 17- β -estradiol; esse hormônio se liga à proteína fúngica *estradiol binding protein* (EBP) e bloqueia a transição da fase micelial para a fase leveduriforme, fase parasitaria do fungo (SHANKAR *et al.*, 2011). Adicionalmente, o estradiol afeta a resposta imune, uma vez que foi demonstrado que camundongos fêmeas foram protegidas da infecção por *P. brasiliensis* (PINZAN *et al.*, 2010).

As manifestações da doença podem ser classificadas em forma aguda e crônica. A forma aguda atinge crianças e jovens de ambos os sexos e é caracterizada por causar linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia e lesões cutâneas. Já a forma crônica acomete principalmente adultos do sexo masculino e a manifestação principal é pulmonar, mas pode afetar outros órgãos como, fígado, baço, mucosas, pele e sistema nervoso central (FRANCO *et al.*, 1987; MENDES *et al.*, 2017).

. Embora a via primária de infecção da PCM seja a pulmonar, a doença é frequentemente diagnosticada por manifestações bucais extensas, ulcerativas e

dolorosas correspondendo à forma clínica crônica do tipo multifocal (TOLENTINO *et al.*, 2010; DE ARRUDA *et al.*, 2018).

As diferenças entre as formas clínicas da doença dependem de diversos fatores como sexo, idade, padrão genético, sistema imunológico e quantidade de conídios inalados (FRANCO *et al.*, 1987). Pressupondo que o *habitat* do fungo é o solo, atividades ligadas ao solo como, agricultura, terraplanagem, preparo do solo, corte de árvores e outras, são considerados como fatores de risco, devido ao fato de a maioria dos pacientes relatam ter exercido alguma atividade agrícola (COUTINHO *et al.*, 2002; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006). Além disso, outros prováveis fatores de risco são o tabagismo e o alcoolismo, relatados entre os acometidos pela doença (RESTREPO *et al.*, 2008; MARTINEZ, 2015).

Existem diversas metodologias para o diagnóstico da PCM, baseados nos sintomas clínicos, seguido de exames laboratoriais. O método considerado padrão-ouro é o exame direto do material recolhido de lesões ou de tecidos, no qual é identificado elementos fúngicos de *Paracoccidioides* spp (MENDES-GIANNINI; FUSCO-ALMEIDA, 2013; BENARD; MENDES-GIANNINI, 2014). Além disso, o diagnóstico pode ser feito por testes sorológicos, nos quais a glicoproteína de 43 kDa (gp43) secretada pelo fungo é o principal antígeno detectado no soro dos pacientes infectados pela maioria das espécies (VIDAL *et al.*, 2014). No entanto quando o agente etiológico é *P. lutzii*, outros antígenos precisam ser identificados, pois gp43 é detectada de maneira variável no soro de pacientes (GEGEMBAUER *et al.*, 2014). Devido a essa variabilidade, além de reações cruzadas com outras infecções (DA SILVA *et al.*, 2016), uma alternativa é usar métodos moleculares, como por exemplo, a reação em cadeia da polimerase (PCR) (GOMES *et al.*, 2000; SAN-BLAS *et al.*, 2005; BUITRAGO *et al.*, 2009).

O tratamento da PCM é extremamente longo e pode ocorrer por mais de um ano. Há casos onde o paciente abandona o tratamento e a doença retorna de forma bem mais agressiva e fatal (RESTREPO *et al.*, 2008). Os fármacos utilizados são limitados, devido a maioria apresentar toxicidade. Os pacientes são normalmente tratados com combinação de sulfametaxol/trimetoprim, itraconazol, cetoconazol, fluconazol e anfotericina B. Os antifúngicos estão disponíveis no mercado desde 1950 (RESTREPO *et al.*, 2008; BOCCA *et al.*, 2013; SHIKANAI-YASUDA, 2015; TABORDA *et al.*, 2018).

1.2 Fatores de virulência

Dimorfismo, mudanças na composição da parede celular, produção de metaloproteínas, adesinas, melanina e indiretamente a formação de biofilme têm sido relatados como fatores de virulência do gênero *Paracoccidioides* (MENDES-GIANNINI *et al.*, 2008; SARDI *et al.*, 2015; SCORZONI *et al.*, 2015; CAMACHO; NINO-VEGA, 2017). A presença e o teor de α -glucanas na parede celular de formas leveduriformes de *P. brasiliensis* foi relacionado com a sua virulência (SAN-BLAS; NINO-VEGA, 2008). Metaloproteínas são proteínas que necessitam de um cofator metálico para exercer suas funções catalíticas, regulatórias e estruturais, exercendo um papel importante durante o processo infeccioso de *Paracoccidioides* (TRISTÃO, 2014). Proteínas como a 14-3-3 e enolase atuam como adesinas, desenvolvendo um papel importante durante a infecção por *Paracoccidioides* spp. Estudo prévio mostrou correlação entre a expressão de adesinas e virulência, uma vez que o bloqueio das adesinas 14-3-3 e enolase resultaram em redução na adesão de *Paracoccidioides* spp. às células pulmonares da linhagem A549 (DE OLIVEIRA *et al.*, 2015). Também foi demonstrado que quando havia o bloqueio das adesinas, a taxa de sobrevivência foi maior em camundongos (C57BL/6) e em larvas de *Galleria mellonella* (DE OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Além disso, a produção de melanina, pigmento hidrofóbico de alta massa molecular, geralmente preto ou castanho, auxilia *Paracoccidioides* spp. no escape da resposta imune do hospedeiro, por ser mais resistente à ação dos macrófagos, à radiação ultravioleta (UV) e apresentar uma redução na susceptibilidade aos fármacos antifúngicos, como anfotericina B (NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003; TABORDA *et al.*, 2008; BALTAZAR *et al.*, 2015).

Em 2015, foi descrita a habilidade de *P. brasiliensis* formar biofilme *in vitro* e o aumento na expressão dos genes que codificavam adesinas e enzimas hidrolíticas associadas à formação desses biofilmes (SARDI *et al.*, 2015). Em adição, foi mostrada a formação de biofilme de *P. brasiliensis* *in vitro* em próteses vasculares, resultando em uma rede densa de leveduras cobertas por uma matriz extracelular autoproduzida (CATTANA *et al.*, 2017).

Biofilmes são formas de crescimento de organismos de maneira agregada, associados à superfície biótica ou abiótica, por meio de uma matriz polimérica extracelular produzida pelos próprios microrganismos. Dessa maneira, o biofilme proporciona um ambiente estável, protegido pela superfície do substrato e pela

matriz extracelular, pode desencadear resistência mais elevada aos antimicrobianos, principalmente em função da dificuldade de difusão dos mesmos por meio da matriz, tornando o tratamento das infecções relacionadas ao biofilme desafiador (CHANDRA *et al.*, 2001; MITCHELL *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2017; OSHIRO *et al.*, 2019).

A matriz polimérica extracelular corresponde à 70 a 95% da matéria orgânica da massa do biofilme, de composição heterogênea e complexa composta por quatro classes macromoleculares: proteínas, carboidratos, lipídeos e ácido nucleico (FLEMMING *et al.*, 2000; MITCHELL *et al.*, 2016; BAMFORD *et al.*, 2020). Os estudos sobre matriz têm relatado que esta é montada no meio extracelular, a partir da incorporação de uma diversidade de produtos da comunidade para criação de uma estrutura única (SUTHERLAND, 2001; GARNY *et al.*, 2010; MITCHELL *et al.*, 2015; DESMOND *et al.*, 2018; ZARNOWSKI *et al.*, 2018).

A composição da matriz de *Paracoccidioides* ainda não foi caracterizada, mas a matriz de biofilmes fúngicos, geralmente, apresentam glucanas, mananas e quitina em sua constituição (RAJENDRAN *et al.*, 2014; MITCHELL *et al.*, 2015; RAMIREZ GRANILLO *et al.*, 2015; ZARNOWSKI *et al.*, 2018).

Para *Candida albicans*, as proteínas são responsáveis por aproximadamente 55% da matriz extracelular dos biofilmes (ZARNOWSKI *et al.*, 2014). Várias proteínas e glicoproteínas extraídas da matriz do biofilme de *C. albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* foram identificadas por meio de técnicas proteômicas, algumas associadas à formação do secretoma, embora tenha sido observado predominância de enzimas glicolíticas e proteínas de choque térmico (CHAFFIN *et al.*, 1998; NOMBELA *et al.*, 2006; THOMAS *et al.*, 2006).

Os polissacarídeos constituem um componente importante na maioria das matrizes de biofilme (FLEMMING *et al.*, 2007). Na matriz do biofilme de *C. albicans*, representam aproximadamente 25% de seu peso seco. Arabinose, manose, glicose e xilose constituem os monossacarídeos mais abundantes do total de carboidratos (ZARNOWSKI *et al.*, 2014). Alfa-manana e β -1,6 glucana constituem ao redor de 85% e 14%, respectivamente, dos carboidratos da matriz de *Candida albicans* (MITCHELL *et al.*, 2015) e, o aumento da expressão de β -glucanas na matriz, implica em sequestro de agentes antifúngicos, reduzindo a sensibilidade dos biofilmes de *C. albicans* (NETT *et al.*, 2010; ZARNOWSKI *et al.*, 2018).

Além disso, o uso de técnicas lipidômicas tem permitido identificar diferentes tipos de lipídeos presentes na matriz do biofilme de *C. albicans*, representando aproximadamente 15% do seu peso seco (ZARNOWSKI *et al.*, 2014).

Em conjunto, estudos relatam que existem alguns genes que podem ser mais expressos e importantes durante a produção da parede celular e a formação de biofilme de *C. albicans*, sendo eles especificamente, SMI1, RLM1 e FKS1 (NETT *et al.*, 2010; ARAÚJO *et al.*, 2017).

Outro constituinte da matriz de biofilmes é o ácido desoxirribonucleico extracelular (eDNA), o qual é encontrado no meio extracelular. O mecanismo pelo qual o eDNA é secretado no microambiente do biofilme não é totalmente compreendido. Para bactérias, alguns mecanismos têm sido propostos, tais como lise celular e secreção via vesículas (ALLESEN-HOLM *et al.*, 2006) e para *C. albicans* e *Aspergillus fumigatus* (RAJENDRAN *et al.*, 2014; RAJENDRAN *et al.*, 2016), tem sido sugerido que a lise celular está envolvida nesse processo.

Além disso, o acúmulo de metabólitos tóxicos e a escassez de nutrientes decorrentes da difusão limitada pela matriz, favorece a expressão de enzimas que remodelam a parede celular, liberando nutrientes para a comunidade microbiana, como por exemplo, as quitinases, que ao degradarem a quitina da parede celular, provocam o extravasamento do DNA para o meio exterior (RAJENDRAN *et al.*, 2014). Estudo prévio, relata que a expressão de quitina no biofilme maduro está aumentada e, que a inibição de quitinase, altera o crescimento e a estabilidade de biofilmes de *A. fumigatus* e *C. albicans* (RAJENDRAN *et al.*, 2014).

1.3 Microbiota e *Paracoccidioides spp*

A cavidade bucal é colonizada por diferentes espécies microbianas que geralmente são organizadas em forma de biofilme. Análises do microbioma mostram mais de 700 espécies bacterianas e diversos gêneros e espécies fúngicas (ESCAPA *et al.*, 2018). Em adultos saudáveis várias espécies de *Streptococcus* são prevalentes, embora em pacientes hospitalizados *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Haemophilus influenzae* e *Pseudomonas aeruginosa* tenham sido relatados (MUNRO; GRAP, 2004; RAGHAVENDRAN *et al.*, 2007; TOLENTINO *et al.*, 2010).

A cárie dentária é a condição bucal mais prevalente no mundo associada ao biofilme (KASSEBAUM *et al.*, 2017). *Streptococcus mutans* é um importante

patógeno bucal que está presente na maioria da população humana (BECKER *et al.*, 2002; MITCHELL, 2003), desempenhando um papel fundamental na formação de biofilme na superfície dentária, sendo isolado de biofilmes e lesões de cárie. São bactérias Gram-positivas, agrupadas aos pares ou em cadeias, anaeróbios facultativos e a temperatura de crescimento de 37 °C, em meio ágar Mitis Salivarius, formam colônias pequenas e com bordas irregulares (GOLD *et al.*, 1973). *S. mutans* são classificados em quatro sorotipos (*c*, *e*, *f* e *k*) de acordo com a diferença na composição e nas ligações do polissacarídeo glucose-ramnose (RGP) na parede celular (NAKANO *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2008). O sorotipo *c* de *S. mutans* é o isolado mais prevalente encontrado em humanos (LOESCHE, 1986).

Além disso, *S. mutans* produz ácido e é altamente tolerante a ele; possui sistemas de alta afinidade para assimilação de fontes de carboidratos, e é produtor de glucano e frutano. Os glucanos produzidos por *S. mutans* são os principais componentes do biofilme na superfície dos dentes (BOWEN; KOO, 2011; KLEIN *et al.*, 2012; XIAO *et al.*, 2012), contribuindo dessa forma para o início e progressão de doenças relacionadas com o biofilme, variando desde a severidade da cárie dentária até endocardite bacteriana subaguda (LEMOS; BURNE, 2008). Dessa maneira, formulamos a hipótese de que *S. mutans* pode contribuir com secreção de metabólitos ou proporcionar ligantes para uma possível associação de *Paracoccidioides* spp. no ambiente bucal, possibilitando o estabelecimento de biofilmes.

Outra bactéria encontrada no *habitat* bucal é *S. aureus*, cocos Gram-positivos, em formato de cachos de uva que produzem colônias de coloração amarela em meios ricos em manitol. São anaeróbios facultativos, catalase positivos e não formam esporos (KLOOS, 1997). Esta bactéria é bem estudada em microbiologia e tem grande importância por se relacionar às infecções hospitalares e alimentares (MURRAY *et al.*, 2014). Além disso, *S. aureus* é considerado o patógeno humano de maior relevância entre os estafilococos (MANDELL *et al.*, 1979). Os sítios anatômicos mais estudados para a pesquisa desse microrganismo e, principalmente, das cepas meticilina resistentes são a mucosa nasal e pele; contudo, a cavidade bucal também tem sido objeto de investigação (SMITH *et al.*, 2003), ainda que estes não façam parte da microbiota bucal (SMITH *et al.*, 2001). *S. aureus* possui capacidade de aderir e formar biofilme de múltiplas camadas em tecidos

hospedeiros e em outras superfícies (ANDO *et al.*, 2004). Assim, selecionamos este organismo para estudar uma possível interação com *Paracoccidioides* spp.

Além disso, a redução do fluxo salivar, pelo uso de alguns medicamentos contribui para o aumento da colonização e formação de biofilme na boca (WOLFF; LARSON, 2009; LYNGE PEDERSEN; BELSTROM, 2019), os quais podem ser constituídos por várias espécies ou até mesmo por microrganismos de reinos diferentes (polimicrobianos), sendo bactérias encontradas juntamente com fungos filamentosos ou leveduras. A investigação das interações micróbio-micróbio é essencial para a compreensão das atividades *in vivo* de microrganismos comensais e patogênicos (MANAVATHU *et al.*, 2014; TREJO-HERNANDEZ *et al.*, 2014; JACK *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2015; RAMIREZ GRANILLO *et al.*, 2015). Por exemplo, *S. mutans* estimula a formação de biofilme por *Candida albicans* (BARBOSA *et al.*, 2016), que por outro lado, estimula a produção da matriz extracelular quando associada à esta bactéria, de modo que os biofilmes mistos acumulam mais biomassa e, as células de *S. mutans*, permanecem mais viáveis comparativamente aos biofilmes de uma única espécie *in vitro* (FALSETTA *et al.*, 2014). Em adição, adesão de *C. albicans* às superfícies acrílicas dentárias promovida por *Escherichia coli*, bactéria Gram-negativa foi descrita por Nair e Samaranayake, (1999). Estudos subsequentes, relataram que este coliforme reprimiu significativamente a adesão de *C. albicans* e *C. krusei* em células epiteliais bucais humanas (NAIR *et al.*, 2001; BANDARA *et al.*, 2009).

Candida spp é um fungo comensal encontrado no trato gastrointestinal, na mucosa orofaríngea e vaginal de humanos, capaz de causar infecções nas mucosas sob certas condições, como imunossupressão, radioterapia, antibióticos e corticosteróides (FOTOS *et al.*, 1992; AKPAN; MORGAN, 2002; EPSTEIN *et al.*, 2002; FANGTHAM *et al.*, 2014). *Candida albicans*, é um dos fungos mais abundantes do microbioma bucal (RAMAGE *et al.*, 2004; DONGARI-BAGTZOGLU *et al.*, 2009; MILLSOP; FAZEL, 2016). Há evidências crescentes mostrando a coexistência de *C. albicans* e bactérias bucais, bem como interações com diferentes reinos, que podem afetar tanto a dinâmica do crescimento de biofilme quanto o curso e a gravidade das lesões da mucosa (NEGRINI *et al.*, 2019). Considerando que *Candida* e *Paracoccidioides* podem coexistir na cavidade bucal, ainda não se conhece o impacto dessa interação na formação de biofilme e em seu potencial patogênico. Nossa hipótese é que ambos os fungos podem interagir, impulsionando

o crescimento do biofilme que, por sua vez, poderia levar a exacerbação dos sintomas clínicos.

Assim, em infecções onde podem coexistir mais de um microrganismo, a presença de um destes pode gerar um nicho para que outros microrganismos patogênicos colonizem ou um microrganismo predisponha o hospedeiro à colonização por outros microrganismos, bem como dois ou mais microrganismos não patogênicos juntos podem causar doença (BROGDEN *et al.*, 2005). As interações que ocorrem entre os microrganismos podem ser por diferentes mecanismos físicos e químicos, que incluem moléculas sinalizadoras (*quorum sensing*), produtos metabólicos e componentes celulares, especialmente a matriz extracelular (WRIGHT *et al.*, 2012). Em relação ao *quorum sensing*, é mediado por um sistema de comunicação célula-célula e para tanto, secretam moléculas sinalizadoras, as quais determinam propriedades clinicamente relevantes (por exemplo, aumento de resistência aos antimicrobianos) e controlam suas atividades e comportamentos biológicos. Os fungos secretam farnesol, tirosol, feniletanol e triptofol como moléculas de *quorum sensing* (PELEG *et al.*, 2010). Outro fator que contribui para a interação nesses biofilmes é a matriz extracelular produzida, que beneficia não apenas a célula produtora, mas todas que compõem o biofilme (FALSETTA *et al.*, 2014).

Em adição, o biofilme dental serve de reservatório permanente de microrganismos (MUNRO; GRAP, 2004), e pode desencadear uma resposta inflamatória, ocasionando um aumento significativo na quantidade de imunoglobulinas e de mediadores químicos de inflamação circulantes, trazendo prejuízos, tanto no local, quanto em sítios distantes, e dando suporte a uma relação entre a doença periodontal e doenças sistêmicas (SCANNAPIECO, 2003; MORAIS *et al.*, 2007; BUI *et al.*, 2019). Dessa maneira, pacientes com doenças associadas à PCM ou ao uso de medicamentos, podem ter risco maior de desenvolver processos patológicos mais exacerbados devido ao próprio agente bem como à associação em biofilmes polimicrobianos (MORAIS *et al.*, 2007; PAJU; SCANNAPIECO, 2007; NETT *et al.*, 2010; BOWEN *et al.*, 2018; DIAZ; VALM, 2020). Essa organização funcional que ocorre em locais comuns de infecção polimicrobiana, pode estar associada a exploração de metabólitos, modulação imunológica, otimização de nicho e indução da virulência (PETERS *et al.*, 2012).

Semelhante às diversas enfermidades infecciosas, a PCM persiste, como enfermidade de alta prevalência e morbidade que acomete a população brasileira. Uma das formas clínicas crônicas do tipo multifocal, relativamente frequente da PCM, é a cutâneo-mucosa, caracterizada por lesões da mucosa bucal, gengiva, língua, palato mole e mucosas labial, nasal, faríngea e laríngea (SPOSTO *et al.*, 1994). As lesões da mucosa bucal, da faringe e da laringe são muito comuns e resultam da disseminação hematogênica, a partir do foco primário pulmonar. Na boca, a forma mais comum da PCM é a estomatite moriforme (NOVA *et al.*, 1982), também denominada pápulo-erosiva. Trata-se de estomatite de evolução lenta, ulcerada, com finas granulações vermelhas e múltiplas ao fundo, embora também podem se apresentar sob a forma de ulceração mais profunda. O quadro clínico também inclui dores, sangramento, mobilidade dos dentes, sialorreia e edema. O acometimento da laringe e cordas vocais ocasiona diversos graus de disфонia e mesmo afonia. As lesões iniciais, principalmente na língua podem simular carcinoma. Associadas a estas lesões bucais várias interações podem ocorrer, pois este nicho é muito rico do ponto de vista microbiológico (NOVA *et al.*, 1982).

A recente descoberta da formação de biofilme por *Paracoccidioides* spp, abre novas perspectivas de pesquisa procurando entender as interações nos diferentes nichos onde se pode encontrar o fungo, por exemplo a mucosa bucal.

2. JUSTIFICATIVA

A PCM é enfermidade de alta prevalência e morbidade que acomete a população brasileira. Apesar dos esforços de vários grupos de pesquisa, esta doença ainda tem várias lacunas a serem estudadas. A recente descoberta da formação de biofilme por esse fungo abre novas perspectivas de pesquisa, principalmente, nas interações entre os microrganismos do nicho bucal com intuito de estudar o papel dos determinantes de virulência e os fatores relevantes nas associações fungo-bactéria e fungo-fungo, que podem contribuir para a exacerbação dos sintomas. Portanto, o estudo dessas interações é importante com intuito de desenvolver tratamentos mais adequados que possam circunscrever esse processo infeccioso, evitando efeitos colaterais que levam a alta morbidade.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O estudo tem como objetivo caracterizar o biofilme e os elementos estruturais da matriz de *Paracoccidioides* spp. em monoespécie, assim como avaliar a interação de *Paracoccidioides* com *S. mutans*, *S. aureus* e *C. albicans*.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar biofilmes monoespécies de *P. brasiliensis*, *P. lutzii* e *P. restrepiensis* quanto à produção de biomassa, atividade metabólica e a arquitetura 3D;
- Determinar os polissacarídeos totais, proteínas totais e eDNA em amostras de culturas planctônicas, biofilmes e matriz extracelular dos biofilmes de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*;
- Avaliar a interação de *Paracoccidioides* spp. com as bactérias *S. mutans* e *S. aureus* na formação de biofilme, por meio da determinação de biomassa, atividade metabólica, contagem de unidades formadoras de colônias e imagens estruturais.
- Avaliar a interação de *P. brasiliensis* com *C. albicans* na formação de biofilme, por meio da determinação de biomassa, atividade metabólica, contagem de unidades formadoras de colônias e microscopia eletrônica. Além de sua infectividade por meio do modelo de *Galleria mellonella*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismos

Foram utilizados os isolados *P. brasiliensis* (Pb18), *P. lutzii* (Pb01 e 8334) e *P. restrepiensis* (339 e 192), na fase leveduriforme, obtidos da micoteca do Laboratório de Micologia do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, campus de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP). As cepas foram cultivadas em meio Fava-Netto sólido a 37 °C por 7 dias. Para os biofilmes dupla-espécies, as cepas *S. mutans* (ATCC 700610) e *S. aureus* (ATCC 25923) gentilmente cedidas pela Dra Marlise Furlan da

Faculdade de Odontologia da Unesp foram utilizadas, e cultivadas em meio ágar Brain Heart Infusion (BHI) a 37 °C por 24 horas.

4.2 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado como previamente descrito para a formação de biofilmes de *C. albicans* (JIN *et al.*, 2004). Resumidamente, uma suspensão de *Paracoccidioides* spp. foi preparada em caldo BHI com adição de 1% de glicose. Após lavagem das células com solução salina tamponada (PBS - NaCl – 8.0 g/L, KCl – 0,2 g/L, Na₂HPO₄ – 1,18 g/L e KH₂PO₄ – 0,2 g/L, pH 7,2-7,4) e centrifugação a 2300xg durante 10 minutos, as suspensões foram ajustadas à concentração de 1 x 10⁶ células/mL em meio BHI adicionado de glicose 1%, ajustando-se a contagem de células em câmara de Neubauer. Para *C. albicans* foi realizado repique em ágar Sabouraud por 48 horas. Após o crescimento, foi feita uma suspensão em PBS (pH 7,2-7,4) e ajustado à concentração de 1 x 10⁶ cels/mL em meio BHI após contagem de células em câmara de Neubauer. Para as bactérias, uma suspensão foi preparada em PBS (pH 7,2-7,4) na escala de 0,5 MacFarland (1,8 x 10⁸ UFC/mL) ajustada por espectrofotometria e diluída à 1:100 em meio BHI (1,8 x 10⁶ UFC/mL). Em todos os experimentos, a viabilidade celular dos inóculos dos fungos foi avaliada empregando-se azul de trypan (DO CARMO SILVA *et al.*, 2015).

4.3 Ensaio de formação de biofilme

Uma alíquota de 200 µL do inóculo padronizado de *Paracoccidioides* spp., em BHI suplementado com 1% de glicose, foi adicionada aos poços de placas de microtitulação (96 poços, Kasvi) e incubados a 37 °C por 0-168 horas, sem agitação. A cada 24 horas foi realizada a troca dos meios nos poços das microplacas. Em tempos pré-determinados (24, 48,72, 96, 120, 144 e 168 horas), os biofilmes foram lavados com PBS esterilizado e submetidos aos ensaios específicos. Para o caso de biofilmes dupla-espécies, as cepas *C. albicans* (ATCC 90028), *S. mutans* (ATCC 700610), e *S. aureus* (ATCC 25923) foram utilizadas. Para o crescimento de todos os biofilmes dupla-espécies foi utilizado o meio BHI. Os inóculos foram colocados simultaneamente, adicionando-se 100 µL de suspensão bacteriana ou da levedura (*C. albicans*) e 100 µL da suspensão de *Paracoccidioides* spp. em cada poço da placa de microtitulação de fundo chato de 96 poços (Kasvi) os quais foram incubados à 37 °C nos tempos de 24, 96 e 144 horas para os biofilmes dupla-

espécies de *Paracoccidioides* spp. e bactérias e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas para os biofilmes de *P. brasiliensis* e *C. albicans*. Durante todo o desenvolvimento dos biofilmes, a concentração hidrogeniônica (pH) do meio sobrenadante foi monitorada com o auxílio de papel indicador de pH (pH-Fix 0-14; Macherey-Nagel). Os ensaios foram realizados em triplicata em três ocasiões distintas.

4.4 Análises quantitativas dos biofilmes monoespécie e dupla-espécies

4.4.1 Quantificação da biomassa total

A quantificação da biomassa total dos biofilmes foi determinada baseando-se na capacidade do cristal violeta de penetrar na parede celular dos microrganismos e permanecer retido no citoplasma. Após o crescimento dos biofilmes em microplacas (96 poços), o sobrenadante de cada poço foi aspirado e lavado por duas vezes com PBS. Foram adicionados 200 µL de metanol por poço, os quais foram mantidos por 15 min para fixação e, posteriormente, aspirados e secos por 45 min. Seguiu-se a adição de 200 µL de cristal violeta (CV) 0,1% durante 20 min. Após lavagem com água destilada para remoção de excesso, o CV foi solubilizado com 200 µL de ácido acético 33%. Após 10 min, foi realizada a leitura da absorbância a 570 nm em leitor de microplacas (SHERRY *et al.*, 2014).

4.4.2 Quantificação da atividade metabólica

A cinética de formação de biofilme monoespécie de *P. brasiliensis*, *P. lutzii* e *P. restrepiensis* bem como para os biofilmes dupla-espécies foi obtida com a utilização do ensaio de redução do sal de tetrazólio - XTT (sódio 3´-[1- (fenilaminocarbonil)-3,4-tetrazolium]-bis (4-metoxi-6-nitro) ácido benzeno sulfônico hidratado). A redução do XTT é utilizada para mensurar a viabilidade celular de biofilmes fúngicos por meio da avaliação da atividade metabólica, que promove uma redução intracelular do sal formando um composto denominado formazana, o qual pode ser quantificado pela alteração de cor (laranja). A medição sendo realizada em intervalos de tempo definidos (citados acima) forneceu dados para construção de uma curva cinética da formação de biofilme. Para esses ensaios, uma solução de sal XTT (0,1 mg/mL em PBS) e menadiona (1 mM em etanol; SigmaAldrich, São Paulo, SP., Brasil) foi preparada. Uma alíquota de 100 µL de XTT menadiona foi então adicionada tanto aos biofilmes pré-lavados bem como aos controles. As placas foram incubadas no escuro por 3 h a 37 °C e, a mudança colorimétrica foi medida em leitor de

microplacas a 492 nm. Poços contendo meio de cultura/biofilmes/XTT/menadiona (controle positivo) e poços contendo meio de cultura/XTT/menadiona (controle negativo) foram incluídos (MARTINEZ; CASADEVALL, 2007; SILVA *et al.*, 2010).

4.4.3 Quantificação de Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL)

Após a formação dos biofilmes, em diferentes tempos de incubação (0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h), os poços foram lavados três vezes com PBS (pH 7,2-7,4) para remover células não aderidas. Em seguida, em cada poço foi adicionado 100 μ L de caldo Brain Heart Infusion (BHI); os biofilmes foram raspados e, o conteúdo do poço, transferido individualmente para microtubos contendo 900 μ L de caldo BHI. Os biofilmes foram mecanicamente rompidos por agitação vigorosa por 30 s em vórtex, diluídas em série e plaqueadas em ágar BHI suplementado com 1% de glicose, 5% de filtrado de cultura *P. brasiliensis* 339 e soro fetal bovino 4% para obtenção das contagens de *Paracoccidioides* spp. nos biofilmes monoespécie. Para os biofilmes dupla-espécies, utilizou-se ágar BHI para contagem total dos organismos e placas de BHI acrescidas de 100 mg/mL de cloranfenicol para a contagem de *Paracoccidioides* spp. nas interações com bactérias e, acrescido 0,25 mg/mL de caspofungina, para interações com *C. albicans*. Seguiu-se incubação a 37 °C por 10 dias, 24 h ou 48 h, para *Paracoccidioides* spp., bactérias e *C. albicans*, respectivamente. O número de unidades formadoras de colônias (UFC) fúngicas viáveis foi determinado sob estereomicroscópio e os resultados foram expressos em log UFC/mL. Três experimentos independentes foram realizados com três repetições cada.

4.5 Determinação da estrutura dos biofilmes monoespécies e biofilmes dupla-espécies

4.5.1 Microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) dos biofilmes mono-espécie de *Paracoccidioides* spp.

Nesta etapa, foram empregadas somente as cepas de *P. brasiliensis* (Pb18) e *P. lutzii* (PI01), devido à importância clínica e a incidência dessas espécies no Brasil. Após o crescimento dos biofilmes em placas de 24 poços, o sobrenadante de cada poço foi aspirado e, os biofilmes lavados por três vezes com PBS (pH 7,2-7,4). A primeira marcação foi feita com isotiocianato de fluoresceína (FITC - Fluorescein Isothiocyanate) evidenciando a célula fúngica, adicionando-se 500 μ L de FITC (100

ug/mL, Invitrogen, Life Technologies, Brasil) por poço durante 30 min em temperatura ambiente. Após incubação foi realizada a lavagem por duas vezes com PBS e adicionado 500 µL de SYPRO Ruby (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR) por 20 min, evidenciando o conteúdo proteico da matriz de biofilme. Foi feita a lavagem novamente duas vezes com PBS (pH 7,2-7,4) e adicionado 500 µL de HOECHST (10mM, Invitrogen, Life Technologies, USA) por 30 min para marcação do conteúdo nucleico. Após incubação, os biofilmes foram lavados com PBS e se acrescentou 1 mL de PBS (pH 7,2-7,4) para análise. As análises foram realizadas em microscópio confocal de varredura a laser (Carls Zeiss LSM 800, Germany). Cada campo de visão foi fotografado usando o laser de 405 nm para capturar HOECHST com uma faixa de emissão de até 450 nm, 488 nm para detecção de FITC com uma faixa de emissão de até 540 nm e 280 nm para SYPRO Ruby com uma faixa de emissão até 450 nm. As imagens foram adquiridas pelo software ImageJ 1.51p.

4.5.2 Microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) dos biofilmes dupla-espécies de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Candida albicans*

Inicialmente, as suspensões de *P. brasiliensis* (10^6 células/mL) foram tratadas com Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE, 100 µM/mL, BioChemika), por 30 minutos a 37 ° C. As células dos fungos foram lavadas com PBS e re-suspensas em meio BHI com o mesmo volume inicial para restaurar a concentração do inóculo. Este inóculo foi então incubado com o biofilme pré-formado de *C. albicans* (12h) em placas de 24 poços. Biofilmes monoespécies tanto de *P. brasiliensis* como de *C. albicans* foram cultivados como controle. Após 120 h de crescimento, os poços foram lavados cuidadosamente com PBS esterilizado para remoção das células não aderidas. Os biofilmes foram corados com Calcofluor white (1 g/L; Sigma-Aldrich St. 161 Louis, MO, EUA) por 30 minutos em temperatura ambiente e lavados novamente com PBS. Os biofilmes foram fotografados com uma objetiva de imersão a seco 20x (abertura numérica 1.0) usando um microscópio confocal Zeiss LSM 800. Cada campo de visão foi fotografado usando o laser de 405 nm para capturar calcofluor com uma faixa de emissão de até 450 nm e 488 nm para detecção de CFSE com uma faixa de emissão de até 540 nm.

4.5.3 Análise da estrutura dos biofilmes dupla-espécies de *Paracoccidioides* spp com as bactérias *S. mutans* e *S. aureus* por meio do IN Cell Analyzer 2000

Os biofilmes dupla-espécies de *Paracoccidioides* spp em interação com *S. mutans* e *S. aureus* foram formados em placas de 24 poços incubados por 24 h e 144 h para posterior análise. Após a formação dos biofilmes nos tempos determinados, foi realizada a lavagem com PBS para a retirada de células não aderidas, seguido com adição de 500 uL de SYTO 9 (Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific) 3.34 mM, para marcação das células viáveis (verde), incubados a 37 C por 15 min. Após a incubação, lavou-se 3 vezes com PBS para retirada do marcador. Em seguida, os biofilmes foram corados com Calcofluor white (1 g/L; Sigma-Aldrich St. 161 Louis, MO, EUA) por 30 minutos em temperatura ambiente, para marcação do fungo onde o corante se fixa na quitina presente na parede do fungo e lavados novamente com PBS. As imagens foram adquiridas pelo equipamento IN Cell Analyzer 2000 (Ge Healthcare).

4.6. Análise da composição da matriz extracelular dos biofilmes monoespécie de *Paracoccidioides* spp

4.6.1. Extração da matriz extracelular

Os biofilmes de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* monoespécie foram submetidos à extração da matriz por sonicação, conforme descrito anteriormente por Martins *et al.* (2010), com modificações. Resumidamente, após a formação de biofilme em placas de 24 poços, os biofilmes foram recolhidos e transferidos para tubos cônicos, re-suspensos em 10 mL de água esterilizada e agitados em vórtex por 1 min. Em seguida, foram sonicados por cuba ultrasônica por 20 min, seguido por uma etapa de vortex de 2 min e centrifugados à 1500 xg por 20 min. O sobrenadante foi recuperado e, em seguida, realizadas as análises. Culturas planctônicas foram processadas em paralelo. Após a extração da matriz foi realizada a dosagem de polissacarídeos.

4.6.2 Determinação do conteúdo total de polissacarídeos

O conteúdo de polissacarídeos do biofilme total e da matriz foi determinado seguindo-se o protocolo descrito por Dubois *et al.* (1956). Após a extração da matriz

extracelular, 0,5 mL do extrato foi utilizado, tanto para a matriz quanto para as células planctônicas. A seguir, 12,5 µL de uma solução de fenol (80%) foi adicionado, seguido de 1,25 mL de ácido sulfúrico concentrado e misturados. As amostras ficaram em repouso por 10 minutos e incubadas em banho-maria a 30 ° C durante 20 min, sendo a absorção medida a 485 nm em espectrofotômetro. O teor de polissacarídeos foi calculado usando-se glicose para obtenção da curva padrão (0-200 µg/mL).

4.6.3 Dosagem de proteínas

O conteúdo de proteínas foi quantificado pelo método de Bradford *et al.* (1976). Resumidamente, após a extração da matriz, 5 µL das amostras foram colocados em 250 µL do reagente de Bradford (BioRad), incubados no escuro em temperatura ambiente por 10 min. Após a incubação foi feita a leitura a 595 nm no espectrofotômetro. O teor de proteínas foi calculado usando-se albumina de soro bovino (BSA) para a curva padrão.

4.6.4 Dosagem de eDNA

O eDNA foi extraído como descrito anteriormente (MARTINS *et al.*, 2010) com algumas modificações. Resumidamente, foi adicionado nas amostras de células planctônicas, biofilmes e matriz extracelular, fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25: 24: 1, v/v), vortexado e centrifugado a 1732 xg por 20 min (Sorvall X1R, Thermo Scientific, West Chester, PA, EUA). O sobrenadante foi transferido para outro tubo e se adicionou isopropanol gelado (1: 1) para a precipitação do DNA, seguido de incubação por 1 h em gelo. Após centrifugação a 10 000 xg; 15 min, a 4 ° C, o sedimento foi lavado com etanol gelado a 70%, seco ao ar e re-suspenso em 50 µL de tampão Tris-HCl EDTA (TE) pH 7.0. A concentração de eDNA foi medida determinando-se a absorbância a 260 nm em espectrofotômetro.

4.7 Ensaio de sobrevivência usando o modelo *Galleria mellonella*

O ensaio de sobrevivência foi realizado de acordo com o protocolo prévio (SCORZONI *et al.*, 2015), com algumas modificações. As larvas de *G. mellonella* (Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista - UNESP) com peso corporal variando de 150 a 200 mg foram escolhidas aleatoriamente para

os experimentos. As larvas foram separadas em três grupos de infecção, cada grupo consistindo de 9-10 larvas que foram mantidas em placas de Petri a 37 ° C durante a noite, antes do uso. Para a obtenção das células planctônicas, *C. albicans* foi cultivada em ágar Sabouraud a 25 °C por 48 h e *P. brasiliensis* em caldo BHI suplementado com glicose a 1% a 37 °C e 150 rpm por 72 h. Biofilmes pré-formados de *C. albicans* por 12 h e *P. brasiliensis* por 120 h em uma placa de 24 poços foram rompidos e recolhidos para preparação do inóculo. O inóculo de fungos para células planctônicas ou células de biofilmes foi preparado em PBS e contado em hemocitômetro. Para cada grupo, as larvas foram injetadas com 10 µL de 1×10^6 células/larvas de *C. albicans* ou *P. brasiliensis* (SCORZONI *et al.*, 2015; de BARROS *et al.*, 2018; CHIBEBE JUNIOR *et al.*, 2013) na última pró-pata esquerda usando uma seringa Hamilton de 10 µL. Para avaliar os efeitos da co-infecção, as larvas foram primeiro infectadas com 10 µL de 1×10^6 células/larvas de *C. albicans* na última pró-pata esquerda e subsequentemente infectadas com 10 µL de 1×10^6 células/larvas de *P. brasiliensis* na última pró-pata direita. As larvas de sobrevivência foram monitoradas diariamente por até 7 dias de infecção. As larvas foram consideradas mortas quando não exibiram nenhum movimento em resposta ao toque. As larvas inoculadas com PBS esterilizado foram usadas como controle. Três experimentos independentes foram realizados, resultando em $n = 27-30$ larvas/grupo.

4.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão e comparados pela análise de variância (ANOVA de duas vias) seguida pelo teste de Bonferroni. Os dados de sobrevivência de larvas de *G. mellonella* foram plotados como curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier e comparados usando testes de log-rank. A significância estatística foi considerada quando $p < 0,05$.

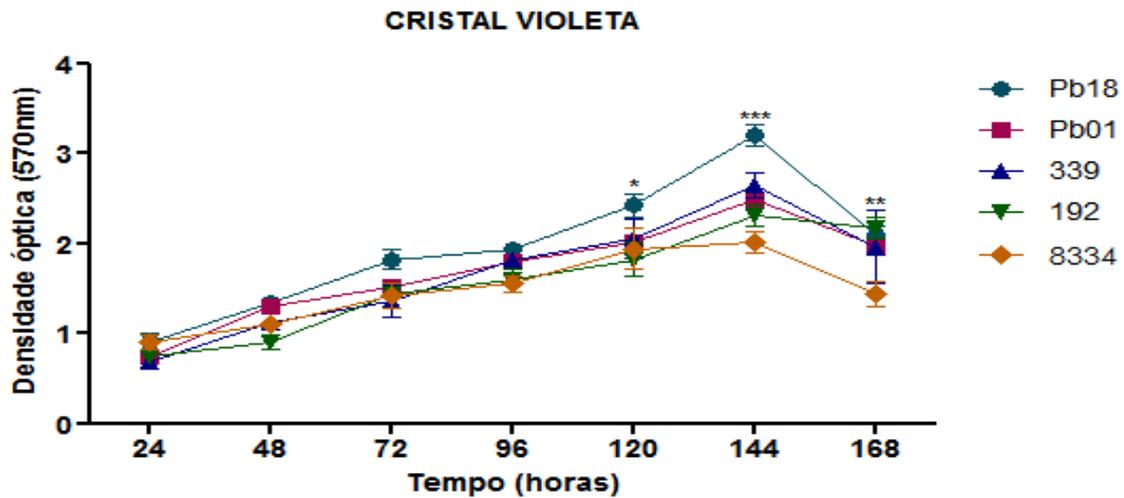
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização dos biofilmes de diferentes espécies de *Paracoccidioides* spp.

A capacidade de formação de biofilme de *P. brasiliensis in vitro*, assim como a atividade metabólica e a estrutura desse biofilme foram estudadas previamente (SARDI *et al.*, 2015). Em 2017, Cattana e colaboradores mostraram a formação de biofilme de *P. brasiliensis* em prótese vascular retirada de um paciente. Entretanto ainda não há estudos de formação de biofilme de outras espécies de *Paracoccidioides*, bem como a sua caracterização e associação entre este fungo e bactérias, ou a associação à *C. albicans*.

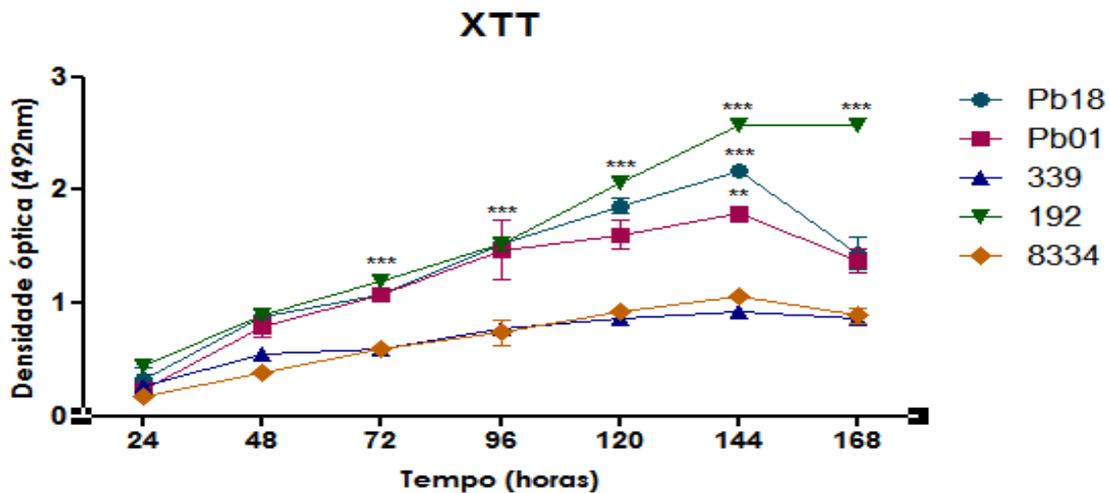
P. brasiliensis (Pb18), *P. lutzii* (01, 8334) e *P. restrepiensis* (339, 192) foram capazes de formar biofilme, com grande quantidade de produção de biomassa (Figura 1) com aumento com o decorrer do tempo. Segundo as análises estatísticas realizadas entre as cepas, houve diferença significativa na formação de biofilme em 120, 144 e 168 horas para a cepa Pb18, quando comparada com as cepas Pb01, Pb8334, Pr339 e 192, mostrando valores significantes de $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente. A maturação dos biofilmes ocorreu no período de 144 horas de incubação, observando-se um aumento significativo da biomassa neste tempo quando comparado aos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas ($p < 0,001$) e a diminuição no tempo de 168 horas, que pode ser explicada como a fase de dispersão dos biofilmes.

Figura 1 – Quantificação da biomassa total dos biofilmes de *P. brasiliensis* (Pb18), *P. lutzii* (Pb01 e 8334) e *P. restrepiensis* (339 e 192).



Leitura da densidade óptica a 570nm. Os resultados foram expressos em média e erro padrão da média, sendo os experimentos realizados em seis réplicas e em três ocasiões diferentes (n=18). ANOVA de 2 vias. *(p<0.05), **(p<0.01) e ***(p<0.001).

Figura 2 – Quantificação da atividade metabólica dos biofilmes formados por *P. brasiliensis* (Pb18), *P. lutzii* (Pb01 e 8334) e *P. restrepiensis* (339 e 192).



Leitura da densidade óptica a 492nm. Os resultados foram expressos em média e erro padrão da média, sendo os experimentos realizados em seis réplicas e em três ocasiões diferentes. Análise ANOVA de 2 vias. ** (p<0,01) e *** (p<0,001).

Pode-se observar na Figura 2 que a atividade metabólica inicial ocorreu após as 24 horas de incubação. *Paracoccidioides* é fungo de crescimento lento e exigente, por esse motivo o primeiro tempo a ser considerado foi de 24 horas, pois estudos prévios mostraram que a formação antes deste tempo foi praticamente nula. No período compreendido entre 24 e 120 horas, houve um aumento significante

dessa atividade para todas as cepas analisadas. No tempo de 144 horas, assim como a biomassa, a atividade metabólica alcançou o valor máximo para todas as cepas e houve diferença significativa ($p < 0,001$) entre estas, com exceção das cepas Pr339 e Pb8334 apresentando $p > 0,05$. Após 144 horas, observou-se queda das leituras, com exceção da cepa 192 em que não se observou mudanças. Após 168 horas os biofilmes podem entrar na fase de dispersão, e assim, a retirada do meio de cultura e lavagem dos biofilmes remove parte da biomassa dispersa. Assim, concluiu-se que 144 horas foi o tempo ideal para a maturação do biofilme da maioria das cepas estudadas, resultado compatível com os descritos por Sardi *et al.*, (2015), que relataram 144 horas como o tempo de maturação do biofilme de *P. brasiliensis*. A nova classificação em relação ao gênero *Paracoccidioides* inclui cinco espécies (CARRERO *et al.*, 2008; HRYCYK *et al.*, 2018), mas como se pode observar nos ensaios de cristal violeta e XTT, aparentemente as cepas estudadas de três diferentes espécies têm comportamento semelhante quanto a capacidade de formar biofilme (biomassa e atividade metabólica).

5.2. Determinação da estrutura do biofilme de *Paracoccidioides* spp por meio de microscopia confocal de varredura a laser (CLSM)

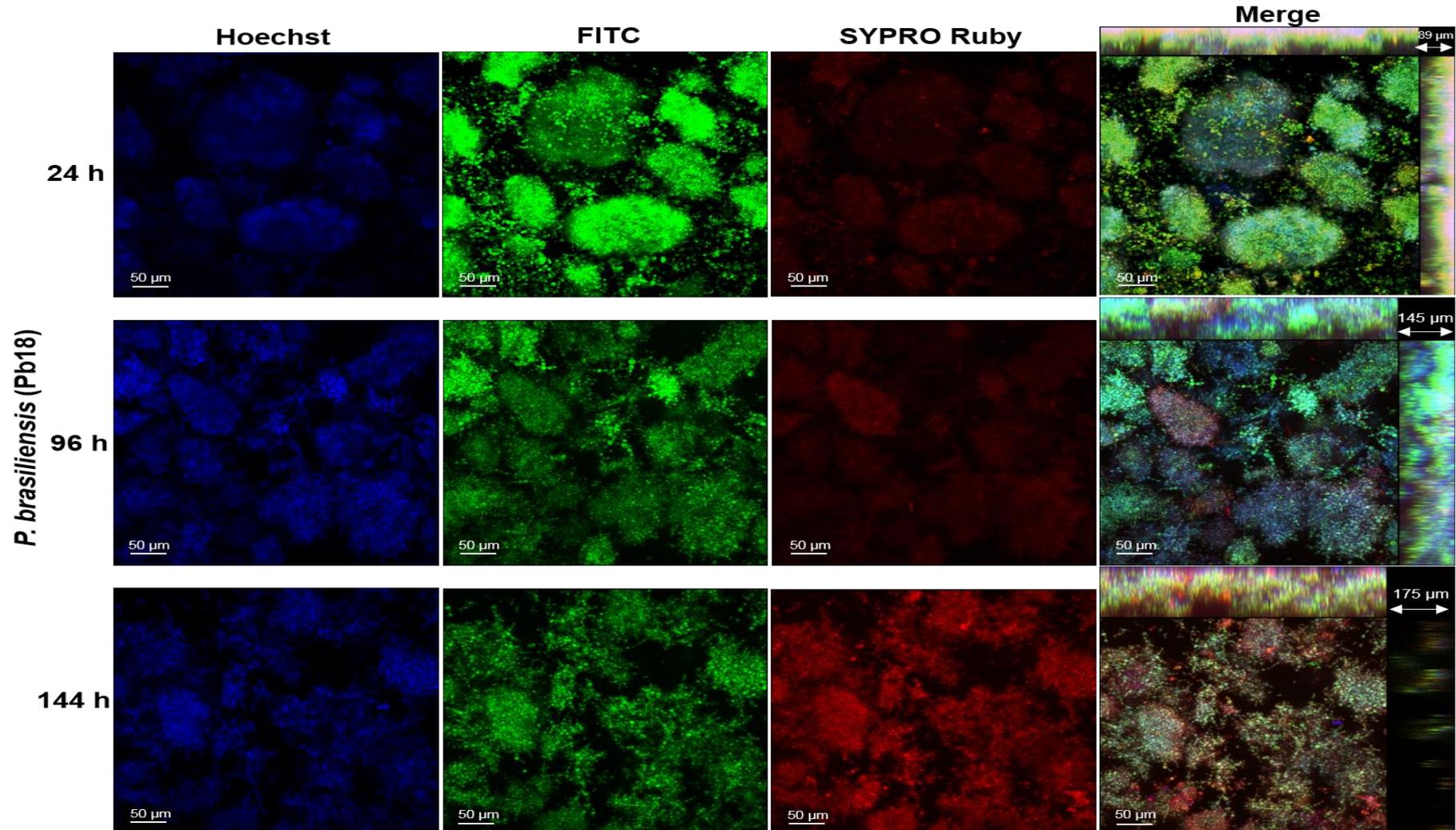
Nos experimentos seguintes, foram avaliadas somente as duas espécies *P. brasiliensis* (Pb18) e *P. lutzii* (PI01). Em nosso estudo foi mostrado, por meio de microscopia confocal de varredura a laser, a estrutura dos biofilmes identificando as células fúngicas. Foi observado um aglomerado de formas leveduriformes indicando a formação de microcolônias e o aumento na espessura de acordo com o decorrer do período de incubação, para ambas as espécies. Foram avaliados dois pontos por poço dos biofilmes e as imagens foram editadas no software ImageJ 1.51p e o ZEN Support Software 4.1. O conteúdo proteico foi mais evidente no biofilme maduro de *P. brasiliensis*, mas em *P. lutzii*, a coloração vermelha ocorre mais intensamente a partir de 96 h da formação do biofilme (Figuras 3 e 4).

As imagens obtidas por microscopia confocal mostram a sobreposição dos três corantes utilizados e indica o corte ortogonal do biofilme em 3D. Os biofilmes, no decorrer dos tempos analisados, aumentaram gradativamente sua espessura, até o tempo total de maturação (144 horas). Na Figura 3, em 24 h, observa-se microcolônias de diferentes tamanhos (algumas maiores e outras médias ou

menores), espaçadas na superfície, e pouco conteúdo proteico na matriz. Já em 96 h, observa-se que o espaçamento entre as microcolônias está reduzido em relação à 24h, e comparável à 144 h. Essa diminuição no espaço pode ser devido à multiplicação das células nas microcolônias e produção de componentes da matriz extracelular (como o conteúdo proteico mostrado e de outros componentes não mostrados) que promovem o crescimento das mesmas. Entretanto, de 96 para 144 h, ocorre um aumento na abundância do conteúdo proteico na matriz extracelular, o que pode ter contribuído para o aumento da espessura desses biofilmes. A Figura 4, mostra que o biofilme de *P. lutzii* (Pb01) apresenta uma espessura menor do que aquela observada para *P. brasiliensis* (Pb18) (Figura 3), e que o aumento com o tempo também foi menos pronunciado, como observado na biomassa quantificada por cristal violeta (Figura 1). Ainda, a distribuição e tamanho das microcolônias é bem diferente entre as duas cepas e isso pode influenciar como essas espécies respondem à intervenções terapêuticas. Em 24 h, *P. lutzii* desenvolve microcolônias muito maiores do que aquelas de *P. brasiliensis*. Em 96 h, o espaçamento entre estas é tomado por microcolônias menores que também parecem ser formadas sobre as microcolônias observadas em 24 h, similar ao que é observado em 144 h.

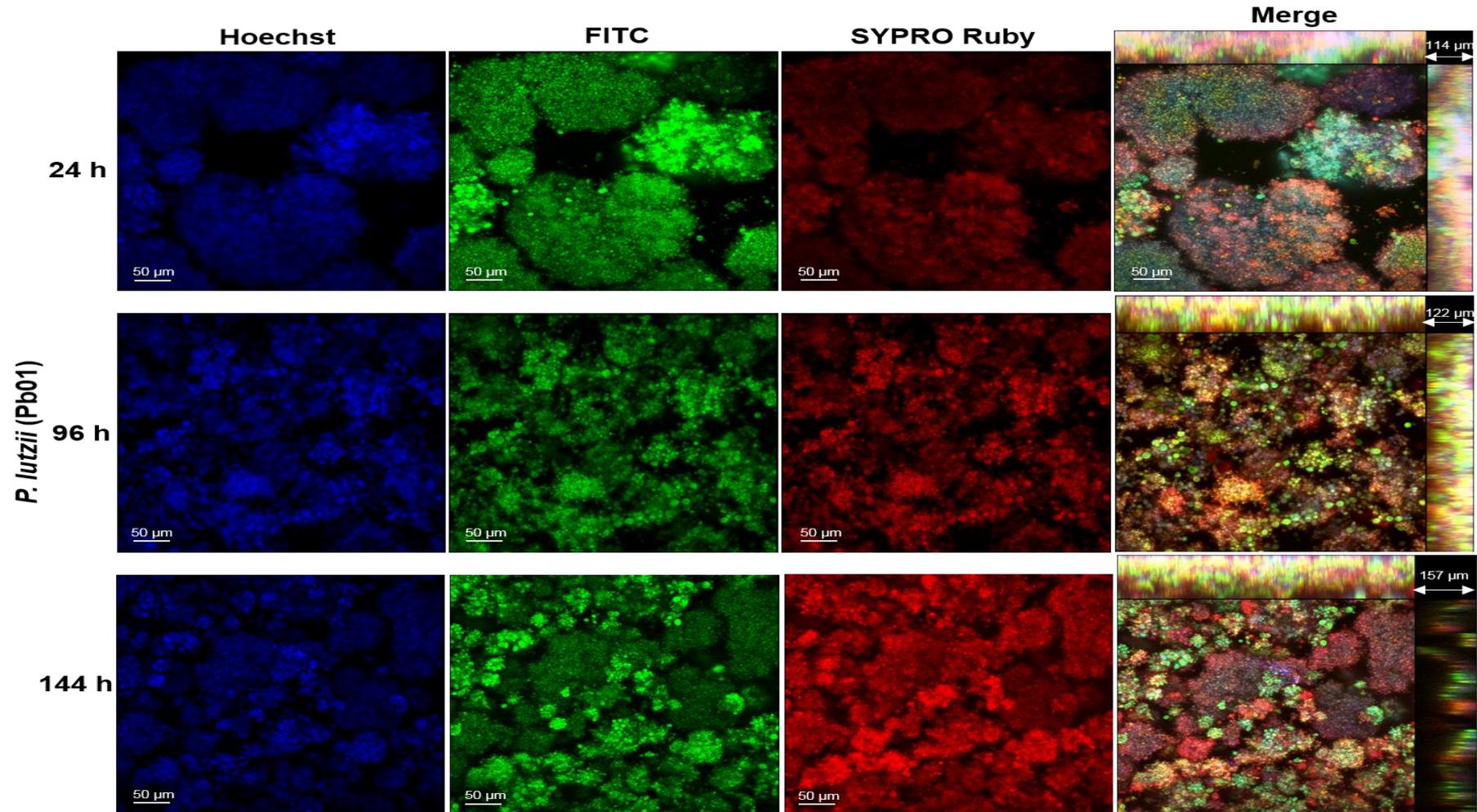
De acordo com a literatura, os biofilmes compartilham várias características comuns como a produção de substâncias poliméricas extracelulares. Os biopolímeros envolvem e imobilizam agregados microbianos, e dão a aparência macroscópica de biofilmes. Em geral, estima-se que os microrganismos sejam responsáveis por menos de 10% do peso seco dos biofilmes, enquanto que a matriz pode ser responsável por mais de 90% (FLEMMING WINGENDER, 2010). A função da matriz inclui adesão, agregação de células microbianas, coesão de biofilme, retenção de água, adsorção de material orgânico e inorgânico, atividade enzimática, fonte de nutrientes, troca de informações genéticas e exportação de componentes celulares (FLEMMING WINGENDER, 2010).

Figura 3 - Imagens representativas da estrutura dos biofilmes de *P. brasiliensis* (Pb18), obtidas por microscopia confocal (CLSM).



O conteúdo nucleico foi marcado com Hoechst (azul), as paredes das células fúngicas foram marcadas com FITC (verde), o conteúdo proteico com SYPRO Ruby (vermelho) emerge-sobreposição. Observa-se a presença de aglomerados característicos de biofilmes dessa espécie (microcolônias).

Figura 4 - Imagens representativas da estrutura dos biofilmes de *P. lutzii* (Pb01), obtidas por microscopia confocal (CLSM).



O conteúdo nucleico foi marcado com Hoechst (azul), as paredes das células fúngicas foram marcadas com FITC (verde), o conteúdo proteico com SYPRO Ruby (vermelho) e merge-sobreposição. Observa-se a presença de aglomerados característicos de biofilmes dessa espécie (microcolônias).

5.3. Determinação dos componentes da matriz extracelular dos biofilmes de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*

Diversos procedimentos físicos e químicos de extração para matriz de biofilme têm sido relatados (AZEREDO *et al.*, 1999; PAN *et al.*, 2010). Nesse estudo, empregamos um protocolo de extração da matriz por métodos físicos que incluíram sonicação, vórtex e centrifugação para separar as células da matriz extracelular (MARTINS *et al.*, 2010). A composição da matriz do biofilme foi analisada por métodos colorimétricos para polissacarídeos, proteína e DNA extracelular.

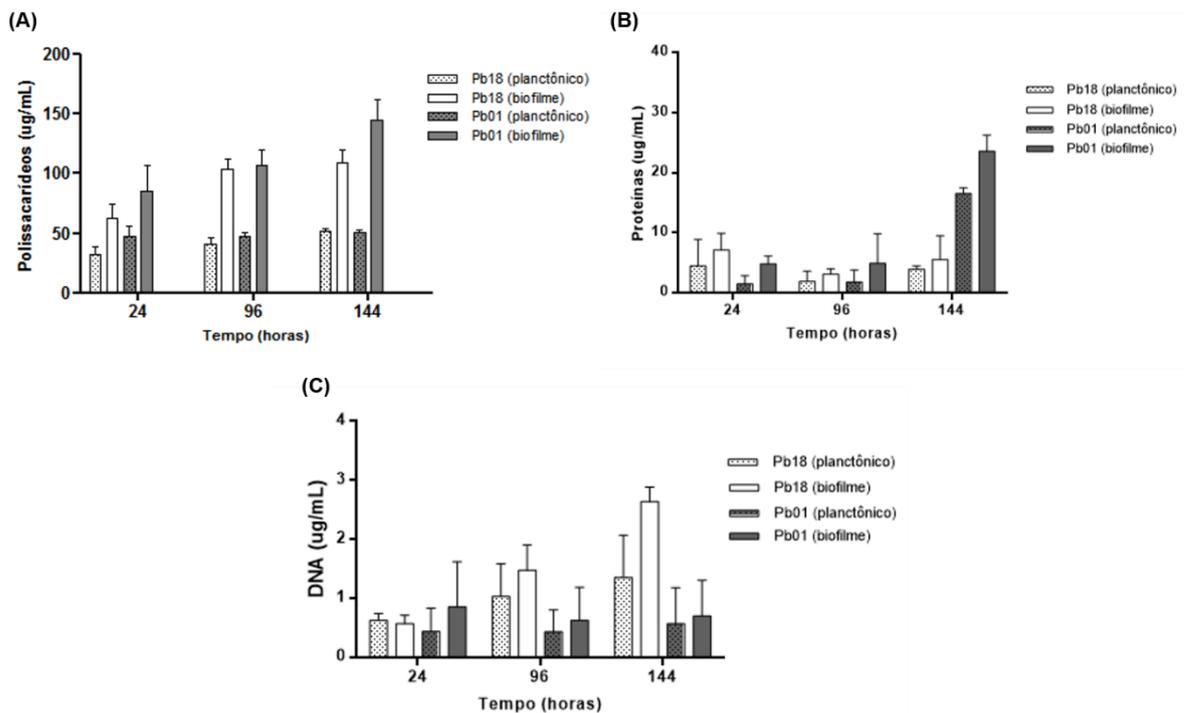
A matriz é autoproduzida no meio extracelular, a partir da incorporação de uma diversidade de produtos da comunidade para criação de uma estrutura única (MITCHELL *et al.*, 2015). Destaca-se que esta composição varia de acordo com a natureza dos microrganismos presentes no biofilme (SILVA *et al.*, 2009).

Os dados quantitativos de polissacarídeos, proteínas e DNA do crescimento planctônico e dos biofilmes de *P. brasiliensis* (Pb18) e *P. lutzii* (Pb01) são mostrados na Figura 5. Verificou-se aumento significativo da produção de polissacarídeos na formação de biofilme quando comparado ao crescimento planctônico, em todos os tempos analisados (24 h $p < 0,05$, 96 h $p < 0,001$ e 144 h $p < 0,001$). No entanto, no crescimento em biofilmes, diferenças em relação as duas espécies de *Paracoccidioides* foram detectadas. Nas primeiras 24h, *P. brasiliensis* (Pb18) produziu maior quantidade de polissacarídeos ($p < 0,01$) que *P. lutzii* (Pb 01) conforme mostra a Figura 5A. No período de 96h, não houve diferença significativa na produção de polissacarídeos por Pb18 ou Pb01 ($p > 0,05$). Em 144 h, Pb01 produziu maior quantidade de polissacarídeos que Pb 18 ($p < 0,01$).

Na dosagem de proteínas (Figura 5B), também se observou um aumento significativo nos biofilmes quando comparados com o crescimento planctônico para as duas cepas em todos os tempos analisados ($p < 0,05$ para 24, 96 e 144 h). *P. brasiliensis* (Pb18) apresentou maior produção de proteínas no tempo de 24 h, com ligeiro declínio em 96 h e, em 144 h, produção equiparável ao período de 24 h ($p < 0,01$). *P. lutzii* (Pb01) não apresentou aumento significativo no período de 24h para 96h ($p > 0,05$), mas aumento expressivo na produção de proteínas em 144 h comparado à produção de 24 h e 96 h ($p < 0,001$), concordando com os resultados observados em microscopia confocal (Figura 4).

A quantidade de DNA (Figura 5C) presente nos biofilmes foi maior quando comparado com as células planctônicas em todos os tempos ($p < 0,01$ para 24 h, 96 h e 144 h), exceto para *P. brasiliensis* no tempo de 24 h ($p > 0,05$) e para *P. lutzii* no tempo de 144 h ($p > 0,05$). *P. brasiliensis* (Pb18) apresentou produção significativa de DNA durante o tempo de amadurecimento do biofilme. *P. lutzii* (Pb01) produziu DNA nas primeiras 24 h, embora a produção observada em 96 h tenha sido equitativa à de 144 h ao de 96 h e pequeno aumento no tempo de 144 h.

Figura 5 – Resultados das quantidades de polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular do crescimento planctônico em comparação com os biofilmes de *P. brasiliensis* (Pb18) e *P. lutzii* (Pb01).



(A) quantidade de polissacarídeos totais dosados pelo método de Dubois, (B) quantidade de proteínas totais dosadas pelo método de Bradford e (C) quantidade de DNA avaliado pelo método de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico. O teor de polissacarídeos foi calculado usando-se a glicose para a curva padrão (0-200 µg/mL) e para proteínas albumina do soro bovino (BSA). Dados expressos como média e desvio padrão, realizados em duplicata em três ocasiões diferentes. Análises por ANOVA de 2 vias.

A composição da matriz extracelular varia de acordo com o microrganismo e pode ser afetada pelo ambiente, mudanças nas condições de crescimento, como quantidade de nutrientes, temperatura e pH. Estudos realizados com *Candida*, demonstraram que há uma alternância na quantidade de polissacarídeos e proteínas na matriz do biofilme de diferentes espécies desse gênero (SILVA *et al.*, 2009).

Geralmente, as matrizes de biofilme de *C. parapsilosis* apresentavam grandes quantidades de carboidratos e quantidades relativamente menores de proteínas. Em contraste, as matrizes de biofilme de cepas de *C. tropicalis* apresentaram concentrações mais baixas de proteínas e carboidratos. Curiosamente, as matrizes de biofilme de *C. glabrata* tinham quantidades relativamente maiores de proteína e carboidratos, em comparação as outras espécies (SILVA *et al.*, 2009). Em adição, Zarnowski *et al.* (2014) relataram que a matriz do biofilme de *C. albicans* é composta por 55% de proteína, 25% de carboidrato, 15% de lipídio e 5% de ácido nucleico. Para *Aspergillus fumigatus*, foi descrito que a matriz do biofilme contém aproximadamente 40% de proteínas, 43% de polissacarídeos e pelo menos 8% de lipídeos (REICHHARDT *et al.*, 2015).

Aqui, investigamos os componentes clássicos da matriz extracelular dos biofilmes de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* (Tabela 1).

Tabela 1: Análise da matriz extracelular dos biofilmes de *P. brasiliensis* (Pb18) e *P. lutzii* (Pb01) na fase de maturação (144 h). Os dados representam a média \pm desvio padrão para três experimentos independentes.

Componente	Composição da matriz extracelular do biofilme (%)	
	<i>P. brasiliensis</i> (Pb18)	<i>P. lutzii</i> (Pb01)
Polissacarídeos	96,9 \pm 25,7	96,2 \pm 16,4
Proteínas	2,7 \pm 1,3	3,5 \pm 1,2
eDNA	0,3 \pm 0,2	0,4 \pm 0,2

Entre os componentes avaliados, os polissacarídeos são responsáveis por aproximadamente 96,9% e 96,2% da matriz de *P. brasiliensis* e de *P. lutzii*, respectivamente, correspondendo a maior quantidade em relação aos demais componentes.

As proteínas são responsáveis por 2,7% e 3,5% da matriz de *P. brasiliensis* e de *P. lutzii*, respectivamente. Diversas proteínas da matriz do biofilme de *C. albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* foram identificadas por meio de técnicas proteômicas, sendo que algumas podem formar parte do secretoma, com predominância de enzimas glicolíticas e proteínas de choque térmico (CHAFFIN *et al.*, 1998; NOMBELA *et al.*, 2006; THOMAS *et al.*, 2006).

Outro componente chave da matriz é o eDNA. Na matriz do biofilme de *P. brasiliensis* foi verificado pequena quantidade de eDNA de aproximadamente 0,3% e para *P. lutzii* de 0,4%. Para *C. albicans*, eDNA foi relatado como fator contribuinte para a integridade estrutural dos biofilmes e com função na resistência aos antifúngicos (MARTINS *et al.*, 2010; SAPAAR *et al.*, 2014).

Ao compararmos as duas espécies de *Paracoccidioides*, em relação aos componentes da matriz extracelular do biofilme, não observamos diferença significativa nos valores.

5.4. Formação de biofilme dupla-espécie por *Paracoccidioides* spp. e *S. mutans*

A interação entre fungos e bactérias em biofilmes mistos tem sido estudada e associada com a secreção de moléculas, mudança no pH do meio e com a proteção contra o sistema imunológico (PELEG *et al.*, 2010; LOBO *et al.*, 2019). Analisou-se a interação de *Paracoccidioides* spp com a bactéria bucal *S. mutans*, visto que paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica que apresenta diversas manifestações clínico patológicas, incluindo manifestações bucais extensas (TOLENTINO *et al.*, 2010; DE ARRUDA *et al.*, 2018). Os resultados da interação de *P. brasiliensis* (Pb18) e *S. mutans* (Sm) estão dispostos na Tabela 2 e nas Figura 6 e 7. Deve-se destacar que o meio de cultura foi trocado a cada 24 h durante todo o período, mantendo a viabilidade dos microrganismos.

Para examinar melhor a implicação do microambiente nos biofilmes, foi mensurado o pH dos sobrenadantes dos biofilmes mono e dupla-espécies de maneira dependente do tempo. Neste contexto, uma redução no valor médio do pH foi observada a partir de 24 h nos biofilmes dupla-espécie de *P. brasiliensis* e *S. mutans*, o qual se manteve 5,0 durante o desenvolvimento (Tabela 2). Biofilme monoespécie de *S. mutans* apresentou comportamento semelhante ao de dupla-espécie, com pH 5,0 nas condições experimentais testadas. Os valores de pH permaneceram neutros (pH 7,0) em todas as fases para o biofilme de *P. brasiliensis* monoespécie. No biofilme de duas espécies, o metabolismo de ambos os microrganismos leva à redução do pH, o que poderia ser explicado pelo metabolismo da sacarose por *S. mutans*. Além disso, *S. mutans* pode facilmente formar microambientes ácidos em biofilme, sendo um importante produtor de exopolissacarídeos para a matriz extracelular (KOO *et al.*, 2003). Mudança de pH

para ácido nos biofilmes duplos, foi similar ao descrito anteriormente na interação entre *C. albicans* e *S. mutans* (LOBO *et al.*, 2019).

Tabela 2: Potencial hidrogeniônico (pH) do sobrenadante em fases distintas de desenvolvimento de biofilmes mono e dupla- espécie de *P. brasiliensis* e *S. mutans*.

pH do meio de cultura durante o desenvolvimento dos biofilmes				
Tempo (horas)	Meio BHI	Pb18	Sm	Pb18 + Sm
0	7,0	7,0	7,0	7,0
24	7,0	7,0	5,0	5,0
96	7,0	7,0	5,0	5,0
144	7,0	7,0	5,0	5,0

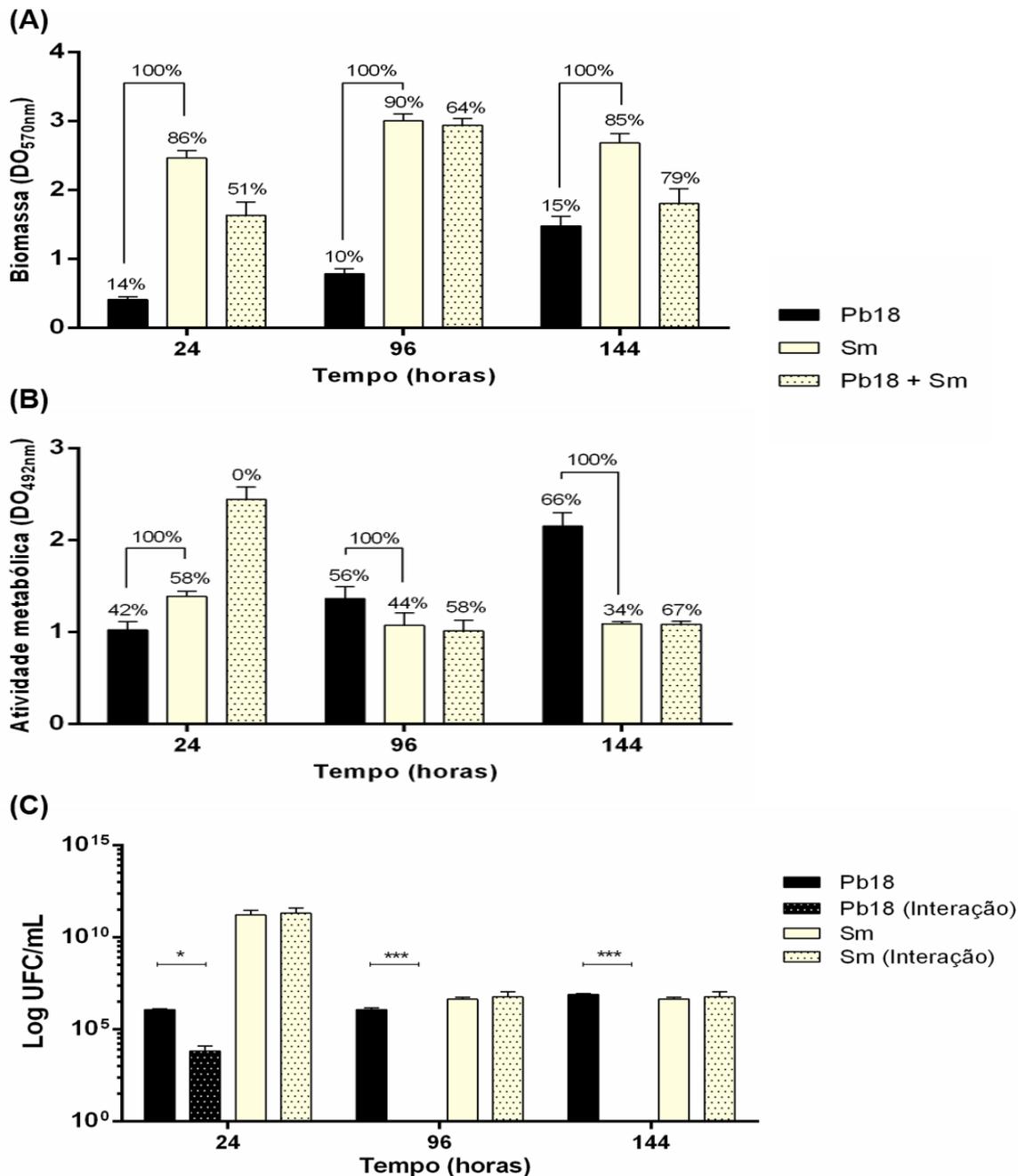
Os dados representam média e desvios padrão (n = 6). Sm: *S. mutans* e Pb18: *P. brasiliensis*. O pH foi medido durante a formação dos biofilmes nos tempos de 0, 24, 96 e 144 h, por meio de papel indicador.

Além da avaliação do pH, os biofilmes mono e dupla-espécies foram caracterizados quanto a biomassa total, a atividade metabólica e a contagem de unidades formadoras de colônias. Os gráficos de biomassa e atividade metabólica descritos a seguir demonstram no seu eixo X os tempos avaliados versus o eixo Y com a densidade óptica. Além disso, as porcentagens relativas dos biofilmes duplos foram calculadas de acordo com a soma dos biofilmes mono espécies e identificada nos gráficos. Assim, os resultados a seguir foram descritos baseados nessas porcentagens para melhor compreensão dos dados obtidos. Em relação a contagem de UFC, o eixo X representa os tempos avaliados versus o eixo Y com valores de log10 e a análise foi realizada por ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni. Esses dados permitiram a comparação de biofilmes *P. brasiliensis* e *S. mutans* monoespécie e na interação durante a formação de biofilme duplo.

A quantificação da biomassa total medida pelo cristal violeta no biofilme dupla-espécie de *P. brasiliensis* e *S. mutans* foi reduzida em 51-79% comparativamente à soma dos controles de biofilme mono espécie em todos os tempos testados (Figura 6A). Esses resultados sugerem que *P. brasiliensis* e *S. mutans* em co-cultivos, a formação de biomassa foi menor que a formada pelas espécies de maneira individual. A atividade metabólica também se mostrou reduzida em 58-67% nos biofilmes duplos nos tempos de 96 e 144 h, respectivamente. No entanto, no tempo de 24 h não houve redução da biomassa (Figura 6B). A quantificação do número de

células microbianas viáveis nos biofilmes mono e dupla-espécie de *P. brasiliensis* e *S. mutans* é mostrada na Figura 6C. Não houve diferença estatisticamente significativa nas contagens de *S. mutans* individual comparado com a interação ($p>0,05$). No entanto, houve diferença significativa para o número de células de *P. brasiliensis* individual quando comparado com a interação com *S. mutans* no tempo de 24 h ($p<0,05$). Nos tempos de 96 e 144 h para *P. brasiliensis* com interação não foi possível a detecção do fungo.

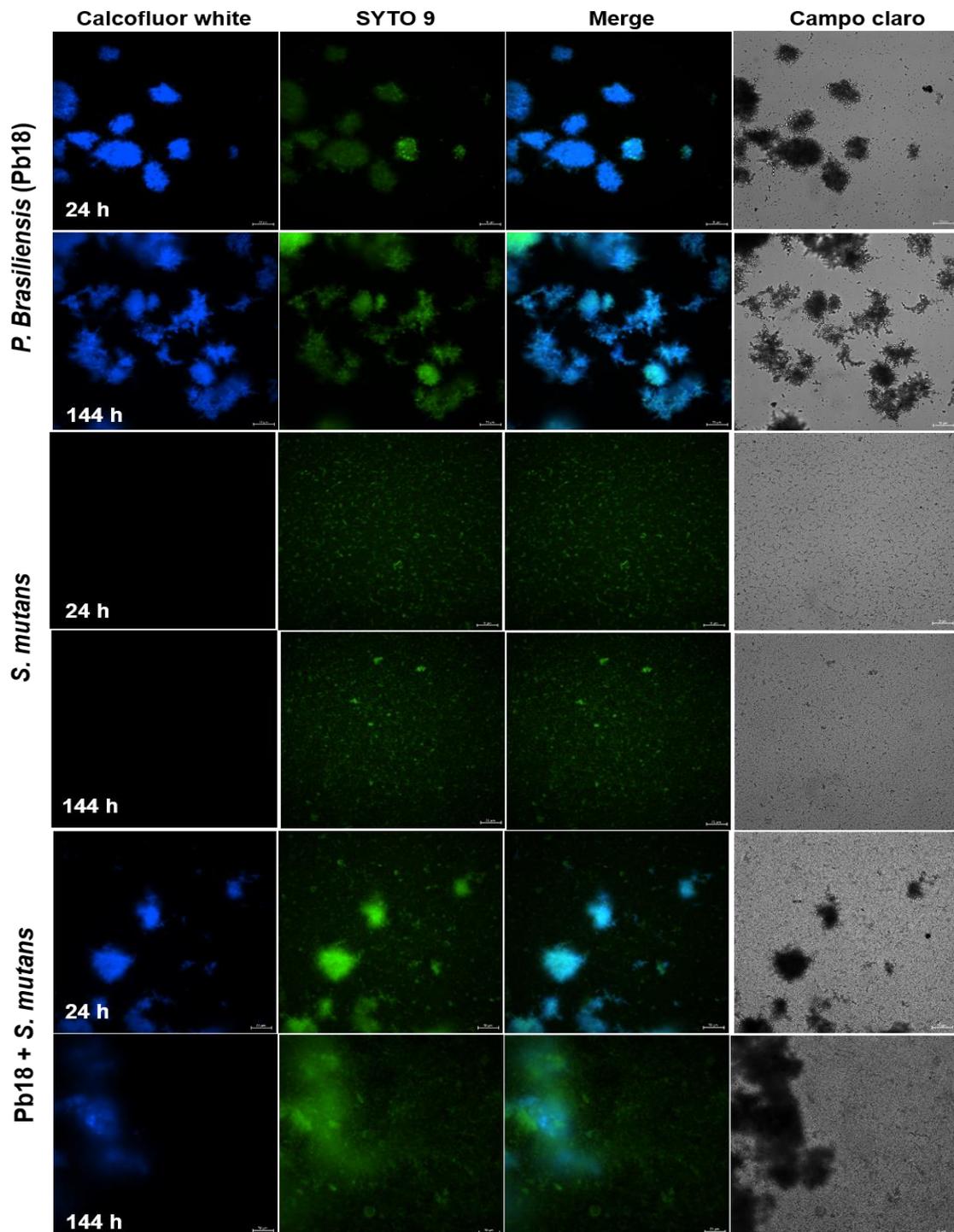
Figura 6 - Quantificação dos biofilmes formados por *P. brasiliensis* (Pb18) e *S. mutans* (Sm) mono e dupla-espécie. (A) quantificação das biomassas totais, (B) quantificação da atividade metabólica, respectivamente pelos métodos de cristal violeta e XTT e (C) contagem de UFC/mL,



(A) e (B) as barras representam as densidades ópticas (DO) obtidas para os biofilmes mono e dupla-espécie. Os resultados foram expressos em média e erro padrão da média. Os experimentos foram realizados em seis réplicas e em três ocasiões diferentes (n=18). Na parte superior de cada barra encontram-se as porcentagens calculadas. A porcentagem do biofilme duplo foi determinada a partir da diferença de sua DO com a somatória das DOs dos biofilmes mono espécie. (C) os resultados foram expressos em média e desvio padrão, sendo os experimentos realizados em duplicata e em três ocasiões diferentes (n=6). A análise foi realizada por ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni. *(p<0,05) e ***(p<0,001).

Para complementação dos dados, imagens representativas foram feitas para mostrar a estrutura dos biofilmes mono e dupla-espécies de *P. brasiliensis* e *S. mutans* (Figura 7). Aqui, o biofilme mono de *P. brasiliensis* apresenta um aglomerado de formas leveduriformes (microcolônias) característico dos biofilmes dessa espécie, com um aumento desses aglomerados no decorrer dos tempos de desenvolvimento. No biofilme monospécie de *S. mutans*, foi possível observar micro colônias emaranhadas de forma homogênea, forrando toda a superfície. Em adição, no biofilme dupla-espécies observamos *S. mutans* de forma homogênea com algumas micro colônias de *P. brasiliensis*. É notório a diminuição de micro colônias do fungo quando colocado em conjunto com a bactéria em comparação com seu crescimento individual. *S. mutans* parece não alterar seu aspecto no biofilme duplo.

Figura 7 – Imagens representativas da estrutura dos biofilmes mono e dupla-espécies de *P. brasiliensis* e *S. mutans*.



Calcofluor white foi utilizado para marcar *P. brasiliensis* (primeira coluna), representado pela cor azul. SYTO 9, utilizado para marcar *S. mutans* (segunda coluna). A terceira coluna representa a sobreposição das duas marcações e, a quarta, imagens do campo claro dos biofilmes.

Os resultados da interação de *P. lutzii* (Pb01) e *S. mutans* (Sm) estão dispostos na Tabela 3 e nas Figuras 8 e 9. Ao se proceder a mensuração do pH dos sobrenadantes dos biofilmes mono e dupla-espécie, observamos que nas primeiras 24 h, não houve alteração em nenhum dos dois casos. Em 96 h, constatou-se redução no valor médio do pH de 7,0 para 5,0 nos biofilmes duplos de *P. lutzii* e *S. mutans*, o qual se manteve até as 144 h de desenvolvimento (Tabela 3). O biofilme monoespécie de *S. mutans* comportou-se de modo semelhante ao duplo, com redução do pH para 5,0 em 96 h e 144 h. Os valores de pH permaneceram neutro (pH 7,0) em todos os tempos para o biofilme de *P. lutzii* monoespécie (Tabela 3).

Tabela 3: Potencial hidrogeniônico (pH) do meio sobrenadante em fases distintas de desenvolvimento de biofilmes mono e dupla-espécie de *P. lutzii* e *S. mutans*.

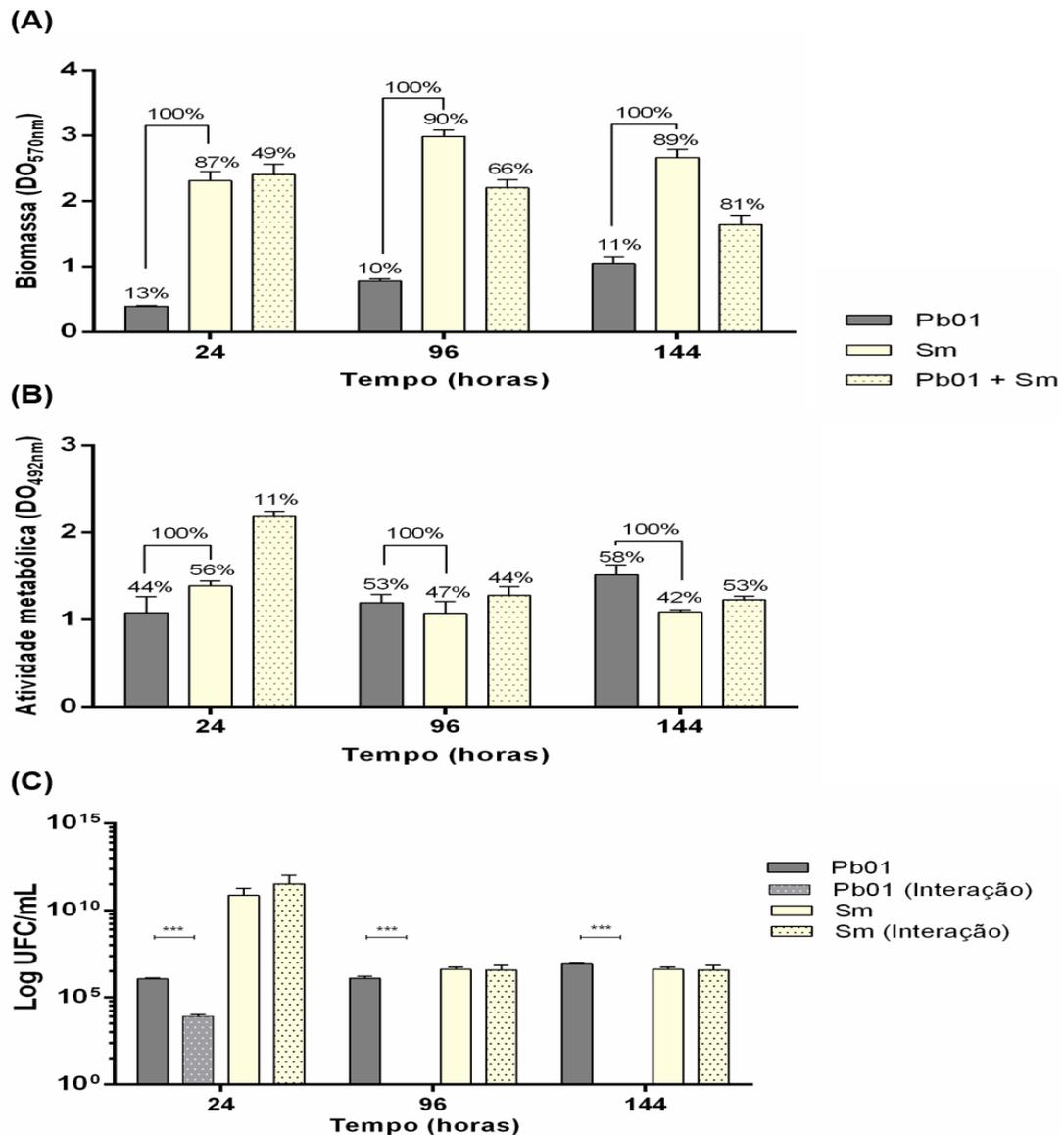
Tempo (horas)	pH do meio de cultura gasto nos biofilmes			
	Meio BHI	Pb01	Sm	Pb01 + Sm
0	7	7	7	7
24	7	7	5	5
96	7	7	5	5
144	7	7	5	5

Os dados representam médias e desvios padrão (n = 6). Sm: *S. mutans* e Pb01: *P. lutzii*. O pH foi medido durante a formação dos biofilmes nos tempos de 0, 24, 96 e 144 h, por meio de papel indicador.

Os resultados obtidos na quantificação da biomassa total da interação entre *P. lutzii* e *S. mutans* estão representados na Figura 8A. A biomassa no biofilme duplo foi reduzida em 49-81% comparativamente à soma dos controles de biofilme mono espécie durante sua formação e desenvolvimento. Esses resultados são semelhantes aos obtidos na interação entre *P. brasiliensis* e *S. mutans*, sugerindo que houve um prejuízo na formação da biomassa no decorrer do tempo de incubação do biofilme duplo. A atividade metabólica mostrou-se com taxa menor de redução (11%) no período inicial do biofilme duplo (Figura 8B). No entanto, essa taxa de redução aumenta em 96 e 144 h, com valores de 44 e 53%, respectivamente. Em relação a quantificação do número de células microbianas viáveis dos biofilmes mono e dupla-espécie de *P. brasiliensis* e *S. mutans* (Figura 8C), houve diferença significativa para os números de *P. lutzii* individual quando comparado à interação com *S. mutans* no tempo de 24 h ($p < 0,001$). Nos tempos de 96 e 144 h, para *P. lutzii*

com interação, não foi possível a detecção do fungo. Não houve diferença significativa nas contagens de *S. mutans* individual comparado com a interação ($p>0,05$).

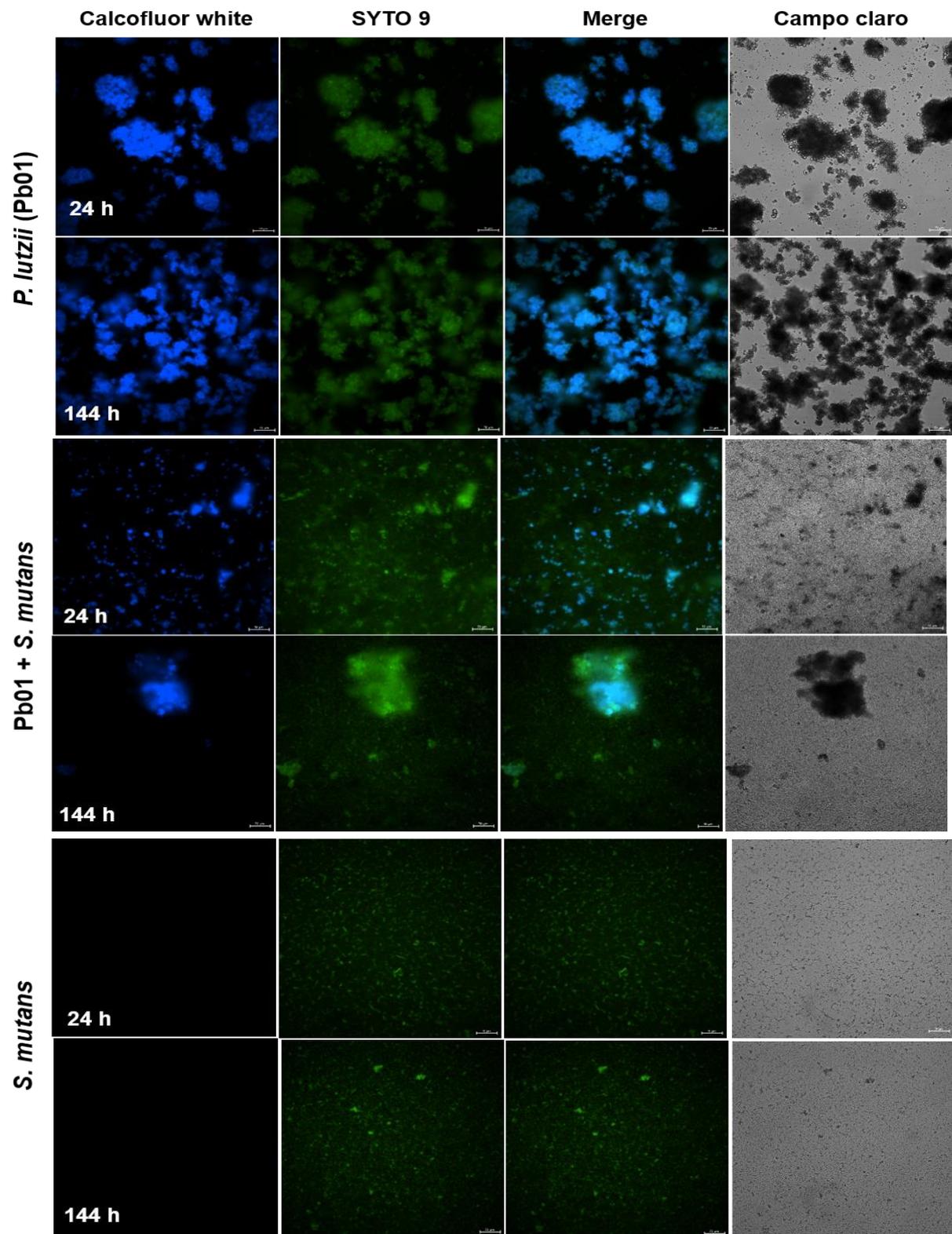
Figura 8 - Quantificação dos biofilmes formados por *P. lutzii* (Pb01) e *S. mutans* (Sm) mono e dupla-espécie. (A) quantificação das biomassas totais, (B) quantificação da atividade metabólica, respectivamente pelos métodos de cristal violeta e XTT e (C) contagem de UFC.



(A) e **(B)** as barras representam as densidades ópticas (DO) dos biofilmes mono e dupla-espécie. Os resultados foram expressos em média e erro padrão da média, sendo os experimentos realizados em seis réplicas em três ocasiões diferentes ($n=18$). Na parte superior de cada barra encontram-se as porcentagens calculadas. A porcentagem do biofilme duplo foi determinada a partir da diferença de sua DO com a somatória das DO dos biofilmes mono espécie. **(C)** os resultados foram expressos em média e desvio padrão, sendo os experimentos realizados em duplicata e em três ocasiões diferentes ($n=6$). A análise foi realizada por ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni. * ($p<0,05$) e *** ($p<0,001$).

Em seguida, imagens representativas foram feitas para mostrar a estrutura dos biofilmes mono e dupla-espécies de *P. lutzii* e *S. mutans* (Figura 9). O biofilme mono de *P. lutzii*, assim como o *P. brasiliensis*, apresentou microcolônias de formas leveduriformes, aspecto característico dos biofilmes dessas espécies, com aumento das mesmas no decorrer do desenvolvimento. No biofilme monoespécie de *S. mutans*, foi possível observar microcolônias emaranhadas de forma homogênea, forrando toda a superfície. Em adição, no biofilme duplo, observamos *S. mutans* aglomerado ao *P. lutzii*, embora, aparentemente, o fungo está em menor quantidade quando comparado ao biofilme monoespécie.

Figura 9 – Imagens representativas da estrutura dos biofilmes mono e dupla-espécies de *P. lutzii* e *S. mutans*.



Calcofluor white para marcar *P. lutzii*, representado pela cor azul (primeira coluna). SYTO 9 utilizado para marcar *S. mutans* (segunda coluna). A terceira coluna representa a sobreposição das duas marcações e, a quarta, o campo claro dos biofilmes.

Os resultados obtidos com as interações de *P. brasiliensis* com *S. mutans* e *P. lutzii* com *S. mutans* mostraram-se semelhantes em todos os aspectos. A redução da biomassa total e da atividade metabólica, juntamente com a inibição no número de colônias e não detecção de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* quando em contato com *S. mutans*, indicam um possível antagonismo entre os microrganismos durante a formação de biofilme. Antagonismo é definido como a ação de qualquer organismo que suprime ou interfere no crescimento normal e na atividade de outro organismo por meio da liberação de metabólitos ou componentes celulares (HAGGAG; MOHAMED, 2007). Com base nesses resultados, inferimos que um produto metabólico secretado por *S. mutans* possa estar inibindo o crescimento de *Paracoccidioides* spp. A mudança do meio de cultura para ácido pode ter dificultado/interferido no crescimento fúngico, afetando a morfogênese e a virulência de *Paracoccidioides* spp.

5.5. Formação de biofilme dupla-espécie por *Paracoccidioides* spp. e *S. aureus*

Nessa etapa do estudo analisamos a interação de *Paracoccidioides* spp com a bactéria *S. aureus*. Os resultados da interação de *P. brasiliensis* (Pb18) e *S. aureus* (Sa) estão dispostos na Tabela 4 e nas Figura 10 e 11. Deve-se destacar que o meio de cultura foi trocado a cada 24 h durante todo o período, mantendo a viabilidade dos microrganismos. O pH dos sobrenadantes dos biofilmes mono e dupla-espécies foram medidos ao longo do tempo de formação dos biofilmes. Houve uma redução no valor médio do pH nos biofilmes duplos de *P. brasiliensis* e *S. aureus* nas primeiras 24 h. No entanto, este valor é alterado para 8,0 em 96 h e 9,0 em 144 h (Tabela 4). O biofilme monoespécie de *S. aureus* apresentou comportamento semelhante ao duplo, com pH 6,0 nas condições iniciais e atingindo o valor de 9,0 no período final de 96 h. Os valores de pH permaneceram neutros (pH 7,0) em todos os tempos para o biofilme de *P. brasiliensis* monoespécie. Isso indica que a bactéria está alterando o pH do meio de cultura durante a formação do biofilme duplo.

Tanto as bactérias como os fungos podem adaptar-se as mudanças que ocorrem nos ambientes e assim sobreviver e causar doenças em diferentes hospedeiros. Essa mudança está relacionada a vários efeitos, e as mudanças no pH são importantes nessa adaptação. Os fungos têm um sistema de detecção-resposta

de pH que permite adaptar sua virulência para se adequar a esta mudança de condições (PRUSKY; YAKOBY, 2003). As bactérias têm capacidade de crescimento em faixa estreita de pH, mas quando presentes em comunidades de biofilme, exibem a capacidade de sobreviver dentro de uma faixa de pH que normalmente seria inibidor do seu crescimento na forma planctônica (PERCIVAL *et al.*, 2014). Os estudos têm mostrado que o aumento do pH contribui para maior produção de biofilme microbianos, particularmente em algumas bactérias (PERCIVAL *et al.*, 2014). O aumento de pH pode exercer efeito para maior atividade das enzimas bacterianas aumentando a propensão à infecção. O pH tem um papel importante na formação do biofilme tanto *in vitro* como *in vivo*. O pH pode afetar a atividade de metaloproteinases e de inibidores da atividade dessas enzimas presentes na matriz do tecido do hospedeiro, atividade dos fibroblastos, proliferação de queratinócitos, proliferação microbiana e respostas imunológicas. Constatou-se também que a mudança de pH afeta o desempenho dos antimicrobianos e, portanto, a sua eficácia em ambientes biológicos pode ser alterada.

Tabela 4: Potencial hidrogeniônico (pH) do meio sobrenadante em fases distintas de desenvolvimento de biofilmes mono e dupla-espécie de *P. brasiliensis* (Pb18) e *S.aureus* (Sa).

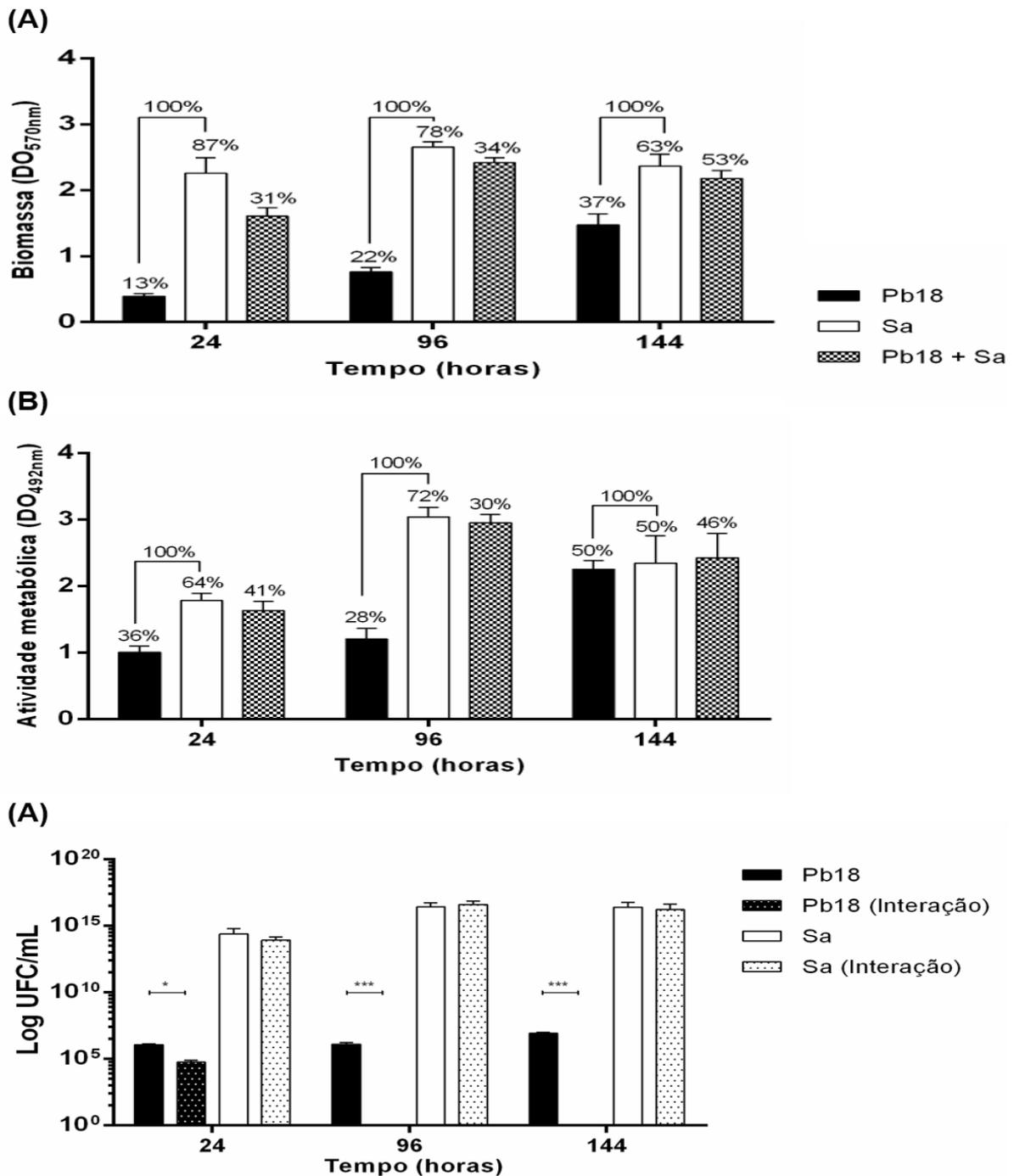
pH do meio de cultura durante o desenvolvimento dos biofilmes				
Tempo (horas)	Meio BHI	Pb18	Sa	Pb18 + Sa
0	7,0	7,0	7,0	7,0
24	7,0	7,0	6,0	6,0
96	7,0	7,0	8,0	8,0
144	7,0	7,0	9,0	9,0

Os dados representam médias e desvios padrão (n = 6). Sa: *S. aureus* e Pb18: *P. brasiliensis*. O pH foi medido durante a formação dos biofilmes nos tempos de 0, 24, 96 e 144 h, por meio de papel indicador.

Na Figura 10A estão dispostos os resultados obtidos na quantificação da biomassa total da interação entre *P. brasiliensis* e *S. aureus*. A biomassa no biofilme duplo foi reduzida em 31-53% comparativamente à soma dos controles de biofilme mono espécie durante os tempos testados. É possível observar que houve prejuízo na formação da biomassa no decorrer do tempo de incubação do biofilme duplo. Esse resultado pode estar relacionado ao aumento de pH, pois pH ácido promovem a formação de biofilme em comparação com pH básico em *S. aureus*, assim como

produz biofilmes mais estáveis em ambientes de pH fisiológicos (LIU *et al.*, 2020). A atividade metabólica mostrou-se reduzida em 41-46% (Figura 10B). Em relação a quantificação do número de unidades formadoras de colônias dos biofilmes mono e dupla-espécie de *P. brasiliensis* e *S. aureus* (Figura 10C), houve diferença significativa para os números de *P. brasiliensis* sozinho quando comparado com a interação com *S. aureus* no tempo de 24 h ($p < 0,001$). Nos tempos de 96 e 144 h para *P. brasiliensis* com interação não foi possível a detecção do fungo. Não houve diferença nas contagens de *S. aureus* sozinho comparado com a interação ($p > 0,05$).

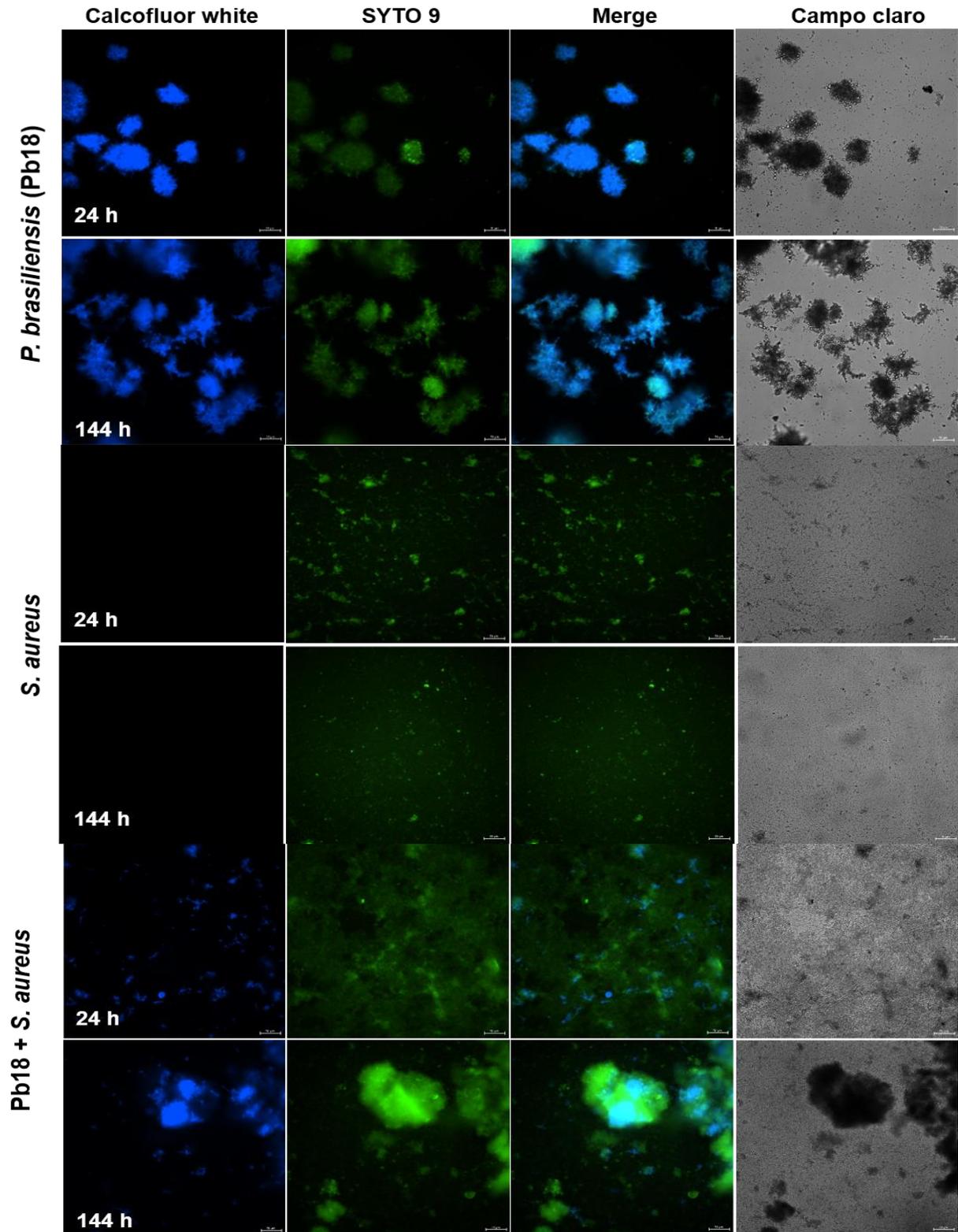
Figura 10 - Quantificação dos biofilmes formados por *P. brasiliensis* (Pb18) e *S. aureus* (Sa) mono e dupla-espécie. (A) quantificação das biomassas totais, (B) quantificação da atividade metabólica e (C) contagem de UFC.



(A) e (B) as barras representam as densidades ópticas (DO) dos biofilmes mono e dupla-espécie. Os resultados foram expressos em média e erro padrão da média, sendo os experimentos realizados em seis réplicas em três ocasiões diferentes (n=18). Na parte superior de cada barra encontram-se as porcentagens calculadas. A porcentagem do biofilme duplo foi determinada a partir da diferença de sua DO com a somatória das DO dos biofilmes mono espécie. (C) os resultados foram expressos em média e desvio padrão, e sendo os experimentos realizados em duplicata e em três ocasiões diferentes (n=6). A análise foi realizada por ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni. *(p<0,05) e ***(p<0,001).

Em adição, imagens representativas mostram a estrutura dos biofilmes mono e dupla-espécies de *P. brasiliensis* e *S. aureus* (Figura 11). O biofilme monoespécie de *P. brasiliensis*, apresentou um aglomerado (microcolônias) de leveduras característico dos biofilmes dessas espécies, com aumento desses aglomerados no decorrer dos tempos de desenvolvimento. No biofilme monoespécie de *S. aureus*, foi possível observar formação de microcolônias compactas. No biofilme duplo observamos *S. aureus* de forma homogênea com alguns aglomerados de *P. brasiliensis*, porém o fungo aparece em menor quantidade quando comparado com o biofilme monospécie.

Figura 11 – Imagens representativas da estrutura dos biofilmes mono e dupla-espécies de *P. brasiliensis* e *S. aureus*.



Calcofluor white para marcar *P. brasiliensis* (primeira coluna), representado pela cor azul. SYTO 9 utilizado para marcar *S. aureus* (segunda coluna). A terceira coluna representa a sobreposição das duas marcações e, a quarta, o campo claro dos biofilmes.

Os resultados da interação de *P. lutzii* e *S. aureus* estão dispostos na Tabela 5 e nas Figuras 12 e 13. Em relação ao pH dos sobrenadantes dos biofilmes mono e dupla-espécie, observamos um comportamento similar ao observado na interação de *P. brasiliensis* com *S. aureus*. Houve uma redução no valor médio do pH em 24 h para 6,0 no biofilme duplo (Tabela 5). No entanto, em 96 e 144 h esse valor altera para 8,0 e 9,0 respectivamente. Biofilme monoespécie de *S. aureus* apresentou comportamento semelhante ao duplo. Os valores de pH permaneceram neutro (pH 7,0) em todos os tempos para o biofilme de *P. lutzii* monoespécie.

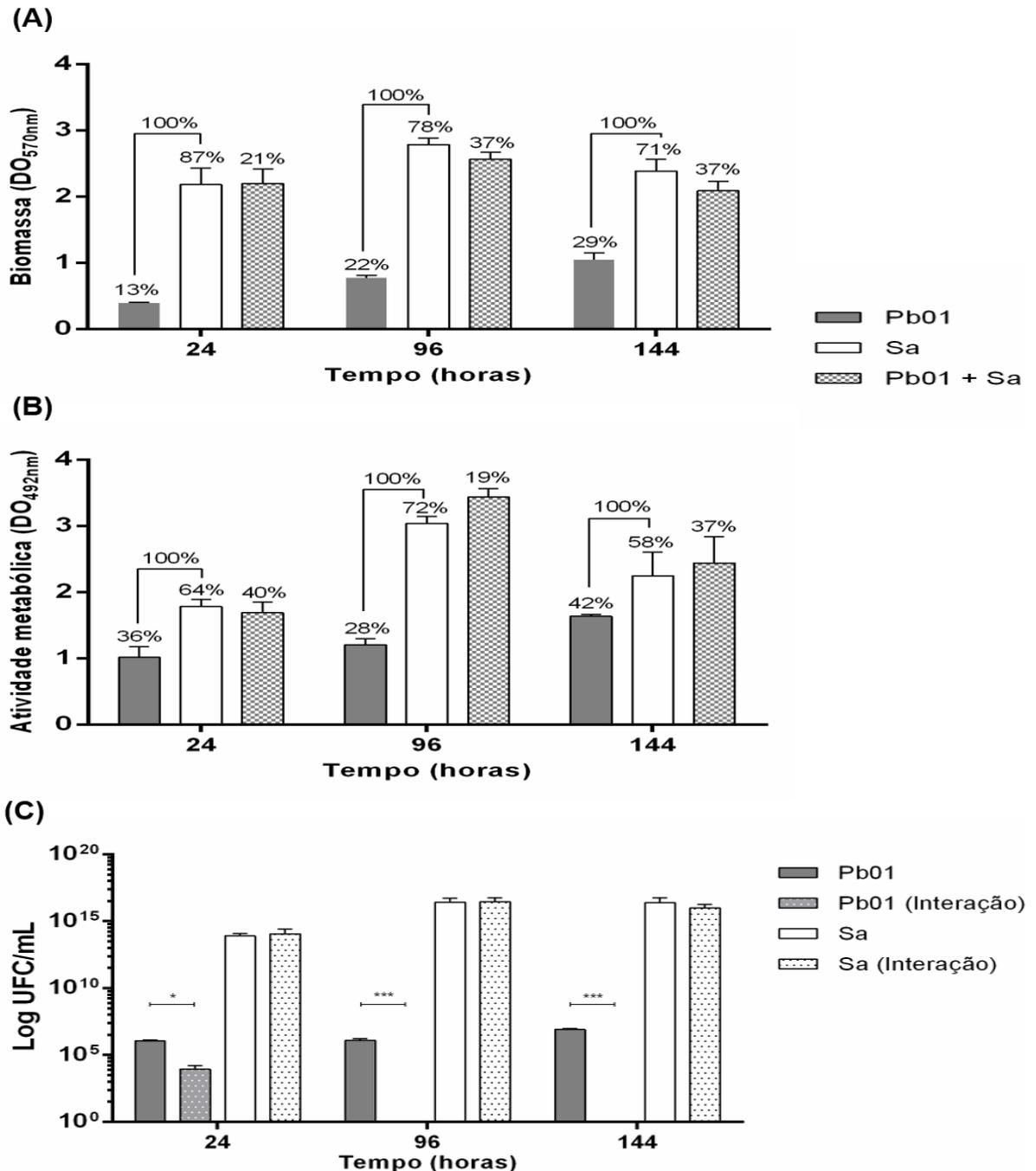
Tabela 5: Potencial hidrogeniônico (pH) do meio sobrenadante em fases distintas de desenvolvimento de biofilmes mono e dupla-espécie de *P. lutzii* (Pb01) e *S.aureus* (Sa).

pH do meio de cultura durante o desenvolvimento dos biofilmes				
Tempo (horas)	Meio BHI	Pb01	Sa	Pb01 + Sa
0	7,0	7,0	7,0	7,0
24	7,0	7,0	6,0	6,0
96	7,0	7,0	8,0	8,0
144	7,0	7,0	9,0	9,0

Os dados representam médias e desvios padrão (n = 6). Sa: *S. aureus* e Pb01: *P. lutzii*. O pH foi medido durante a formação dos biofilmes nos tempos de 0, 24, 96 e 144 h, por meio de papel indicador.

Na interação de *P. lutzii* e *S. aureus* a quantificação da biomassa total medida pelo cristal violeta, foi reduzida em 21-37% comparativamente à soma dos controles de biofilme mono espécie em todos os tempos testados (Figura 12A). A atividade metabólica também se mostrou reduzida em 19-37% nos biofilmes duplos nos tempos testados (Figura 12B). A quantificação do número de células microbianas viáveis dos biofilmes mono e dupla-espécie de *P. lutzii* e *S. aureus* é mostrada na Figura 12C. Não houve diferença nas contagens de *S. aureus* individual comparado à interação ($p > 0,05$). No entanto, houve diferença significativa para os números de *P. lutzii* individual quando comparado à interação com *S. aureus* no tempo de 24 h ($p < 0,05$). Nos tempos de 96 e 144 h, para *P. lutzii* na interação, não foi possível a detecção do fungo.

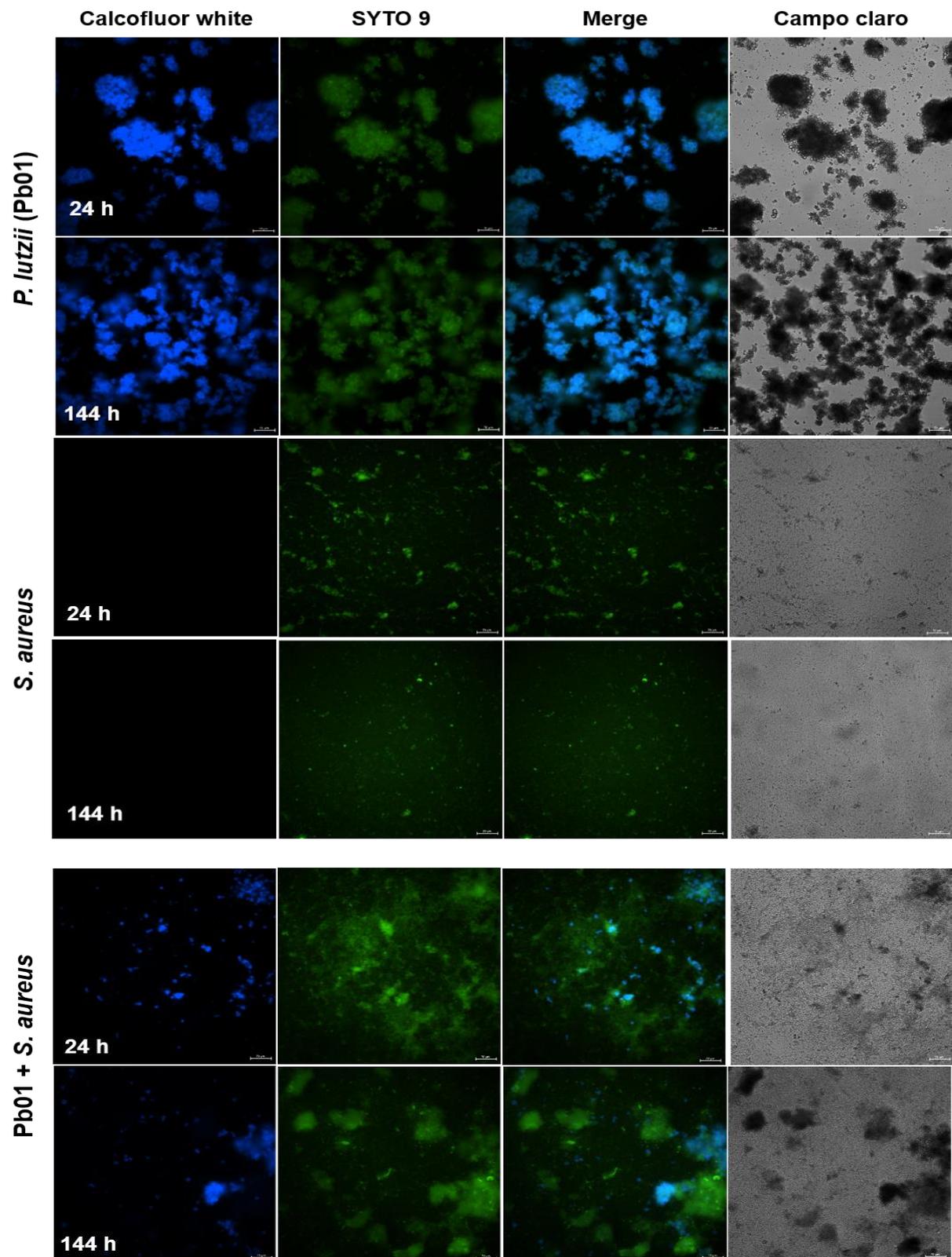
Figura 12 - Quantificação dos biofilmes formados por *P. lutzii* (Pb01) e *S. aureus* (Sa) mono e dupla-espécie. (A) quantificação das biomassas totais, (B) quantificação da atividade metabólica e (C) contagem de UFC.



(A) e (B) as barras representam as densidades ópticas (DO) dos biofilmes mono e dupla-espécie. Os resultados foram expressos em média e erro padrão da média, sendo os experimentos realizados em seis réplicas em três ocasiões diferentes (n=18). Na parte superior de cada barra encontram-se as porcentagens calculadas. A porcentagem do biofilme duplo foi determinada a partir da diferença de sua DO com a somatória das DO dos biofilmes monoespécie. (C) os resultados foram expressos em média e desvio padrão, e sendo os experimentos realizados em duplicata e em três ocasiões diferentes (n=6). A análise foi realizada por ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni. *(p<0,05) e ***(p<0,001).

Imagens representativas foram feitas para mostrar a estrutura dos biofilmes mono e dupla-espécies de *P. lutzii* e *S. aureus* (Figura 13). O biofilme monoespécie de *P. lutzii*, apresentou um aglomerado de leveduras característico dos biofilmes dessas espécies, com um aumento desses aglomerados no decorrer dos tempos de desenvolvimento. No biofilme monoespécie de *S. aureus*, foi possível observar formação de microcolônias compactas. No biofilme duplo, observamos *S. aureus* de forma homogênea com alguns aglomerados de *P. lutzii*, porém o fungo aparece em menor quantidade quando comparado com monoespécie, observado visualmente.

Figura 13 – Imagens representativas da estrutura dos biofilmes mono e dupla-espécies de *P. lutzii* e *S. aureus*.



Calcofluor white para marcar *P. lutzii* (primeira coluna), representado pela cor azul. SYTO 9 utilizado para marcar *S. aureus* (segunda coluna). A terceira coluna representa a sobreposição das duas marcações e, a quarta, o campo claro dos biofilmes.

Nossos resultados demonstram um possível antagonismo entre *Paracoccidioides* spp e *S. aureus*. Relações de antagonismo entre fungo e bactéria foram relatadas na literatura. A conidiação fúngica, a filamentação e a subsequente formação de biofilme de *Aspergillus fumigatus* foram inibidas por *S. aureus* durante a formação de biofilme misto (RAMIREZ GRANILLO *et al.*, 2015). A bactéria limita significativamente o crescimento fúngico, provavelmente por meio do contato célula-célula e por meio da secreção de produtos bacterianos (RAMIREZ GRANILLO *et al.*, 2015). Além disso, em *Cryptococcus neoformans* o co-cultivo com *S. aureus* diminuiu a quantidade de células fúngicas com o tempo de incubação, onde o fungo ficou rodeado de bactéria (SAITO; IKEDA, 2005). Posteriormente, observaram que *S. aureus* também possui alta afinidade para estruturas de *C. neoformans*, que são eventualmente lisadas (SAITO; IKEDA, 2005). Deduziram, dessa forma, que a morte de *C. neoformans* por *S. aureus*, foi causada pela adesão aos polissacarídeos com resíduos de manose, em combinação com a atividade de proteínas como a enzima triosefosfato isomerase que interage com carboidratos fúngicos (IKEDA *et al.*, 2007).

A matriz extracelular dos biofilmes de *S. aureus* contém uma variedade de moléculas que favorecem a adesão, como o polissacarídeo intercelular de adesão (PIA), N-acetil-glucosamina polimérica (PNAG) e componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas de matriz adesiva (MSCRAMM), que são constituintes da superfície microbiana (HARRIS *et al.*, 2002; O'GARA, 2007). É possível que a interação desse grupo de moléculas, presentes na matriz bacteriana, desencadeie uma série de eventos resultando em um efeito antagônico sobre o fungo.

Outra hipótese é que o fungo *Paracoccidioides* spp. não suporte a alteração brusca do meio de cultura, visto que seu crescimento foi inibido após a mudança do pH para básico na interação com *S. aureus* e, como demonstrado anteriormente, seu crescimento também foi inibido em meio ácido na interação com *S. mutans*. No entanto, reconhecemos as limitações dos dados e estudos futuros devem ser realizados para avaliar essa hipótese.

O estudo dos biofilmes polimicrobianos tem aumentado e, na área médica, o papel desempenhado pelos biofilmes nas co-infecções tem sido associado aos fatores de virulência, como produção e secreção de enzimas, proteínas e toxinas, além de processos de adesão, entre outros (BESEMER *et al.*, 2012). Embora grande

parte das pesquisas tenham se concentrado em bactérias, evidências recentes mostram que as interações entre os reinos, nomeadamente, entre os fungos e as bactérias precisam ser levadas em consideração quando se busca uma melhor compreensão dos ecossistemas microbianos que podem estar presentes no corpo humano (XU; DONGARI-BAGTZOGLU, 2015).

5.6. Interação de *P. brasiliensis* spp com *C. albicans* na formação de biofilme

Candida spp, o microrganismo do microbioma oral mais representativo (BERTOLINI; DONGARI-BAGTZOGLU, 2019), é normalmente encontrado na cavidade bucal em níveis compatíveis com a saúde. No entanto, sob certas condições, especialmente aquelas relacionadas à supressão imunológica ou mesmo em neonatos ou idosos, há um aumento de *Candida* na cavidade bucal que acaba levando ao desenvolvimento de infecções oportunistas da mucosa (NICOLATOU-GALITIS *et al.*, 2001; BERTOLINI; DONGARI-BAGTZOGLU, 2019). Nesse contexto, muitos estudos relataram interações bacterianas - *Candida* (inter-reinos) na cavidade bucal e seu papel em doenças bucais, especialmente nas áreas da mucosa (BAENA-MONROY *et al.*, 2005; THEIN *et al.*, 2009; NEGRINI *et al.*, 2019; RODRIGUES *et al.*, 2019).

Considerando que tanto *Candida* quanto *Paracoccidioides* podem coexistir na cavidade oral, o impacto dessa interação fúngico-fúngico na formação do biofilme e seu potencial patogênico ainda são desconhecidos. Portanto, avaliar a dinâmica do biofilme mono e dupla-espécie formados por *P. brasiliensis* e *C. albicans* pode ampliar o conhecimento sobre o mecanismo de infecção da PMC, doença micótica mais importante da América Latina. Segundo nossa revisão bibliográfica, este é o primeiro relato de biofilme formado por esses microrganismos.

Para os testes de quantificação realizamos duas análises (Figura 14), primeiro o biofilme de dupla-espécies foi incubado simultaneamente. Partindo do pressuposto de que *C. albicans* já existe no microambiente bucal, desenvolvemos um segundo grupo de biofilme de dupla-espécies. Neste grupo, adicionamos *P. brasiliensis* em um biofilme pré-formado de *C. albicans*. A comparação dos biofilmes monoespécie

com biofilmes de dupla-espécies foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni.

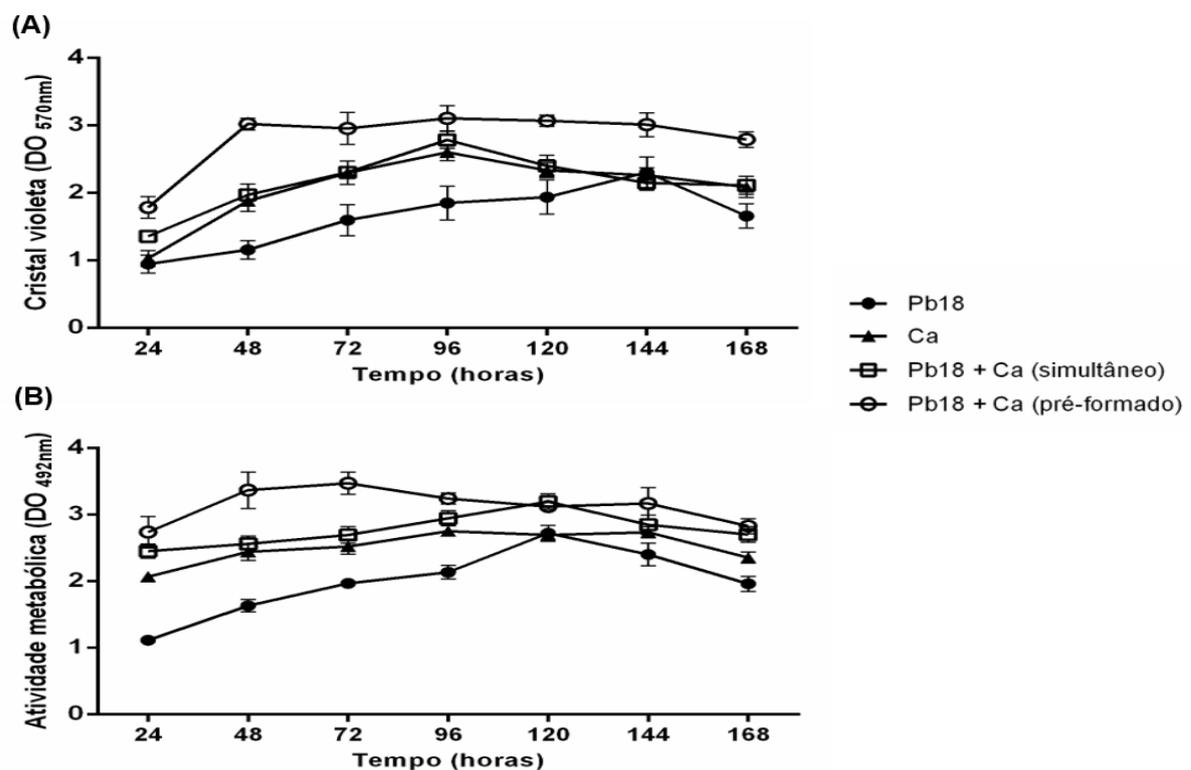
No geral, um aumento na biomassa de todos os biofilmes testados foi observado no período de 24 a 96 h; esse aumento estendeu-se até 144 h no caso do biofilme monoespécie de *P. brasiliensis* (Figura 14A). A biomassa do biofilme formado após *P. brasiliensis* ser adicionado ao biofilme pré-formado de *C. albicans*, foi significativamente maior que a biomassa do biofilme formado em co-cultivo dos organismos, em 48 h de crescimento ($p < 0,05$). A biomassa de biofilme de *P. brasiliensis* monoespécie foi significativamente menor que a biomassa de biofilmes co-cultivados em 48 h ($p < 0,01$), 72 h ($p < 0,05$) e 96 h ($p < 0,001$) e de biofilme dupla-espécie cultivados a partir de *P. brasiliensis* adicionado a biofilmes pré-formados de *C. albicans* em 48 h, 72 h e 96 h ($p < 0,001$) e em 120 h e 168 h ($p < 0,01$). Nenhuma diferença foi encontrada na biomassa de *C. albicans* como um biofilme monoespécie em comparação ao biofilme co-cultivado em todos os períodos analisados, exceto a biomassa em 48 h que foi estatisticamente menor do que a biomassa de biofilme de duas espécies cultivados a partir de *P. brasiliensis* adicionado a biofilmes pré-formados de *C. albicans* ($p < 0,01$).

O biofilme de *P. brasiliensis* apresentou um aumento na atividade metabólica de 24 h até 120 h de crescimento, enquanto o biofilme de *C. albicans* apresentou um aumento em 48 h (Figura 14B). Biofilmes de dupla-espécies apresentaram maior atividade metabólica, principalmente quando *P. brasiliensis* foi adicionado ao biofilme pré-formado de *C. albicans* embora tenha-se constatado uma leve deterioração após 72 h. A atividade metabólica de biofilmes de *P. brasiliensis* foi estatisticamente menor que biofilmes de duas espécies co-cultivados em todos os tempos testados e estatisticamente menor do que biofilme de duas espécies cultivados a partir de *P. brasiliensis* adicionado ao biofilme pré-formado de *C. albicans*, exceto no tempo de 120 h. A atividade metabólica de biofilme co-cultivado foi estatisticamente menor que o biofilme formado pela adição de *P. brasiliensis* ao biofilme pré-formado de *C. albicans* ($p < 0,01$) (Figura 14B).

A biomassa e a atividade metabólica do biofilme foram utilizadas neste estudo para caracterizar a dinâmica de crescimento do biofilme. Com base na quantificação da biomassa, constatamos que os biofilmes monoespécie de *C. albicans* atingiram o estágio de maturação entre 72 a 96 h de acordo com dados anteriores (PIERCE *et al.*, 2010; CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018). *P. brasiliensis* precisou de 144 h para

atingir sua maior biomassa, o que corrobora com os estudos anteriores realizados por Sardi *et al.* (2015). Além disso, o biofilme monoespécie de *C. albicans* apresentou maiores valores de biomassa e atividade metabólica do que os encontrados no biofilme monoespécie de *P. brasiliensis* na maioria dos tempos avaliados. Curiosamente, a dinâmica de crescimento de biofilmes de dupla-espécies foi diferente. O estágio maduro (em termos de biomassa) de biofilmes co-cultivados foi alcançado após 96 h de crescimento, enquanto que o biofilme de dupla-espécies formado após *P. brasiliensis* ser adicionado ao biofilme pré-formado de *C. albicans* atingiu sua maior biomassa em 48 h. Em consonância com o rápido crescimento dos biofilmes de duas espécies, as atividades metabólicas também foram maior do que as dos biofilmes monoespécie, quase em todos os momentos.

Figura 14 - Quantificação dos biofilmes formados por *P. brasiliensis* (Pb18) e *C. albicans* (Ca) mono e dupla-espécie. (A) quantificação das biomassas totais e (B) quantificação da atividade metabólica.

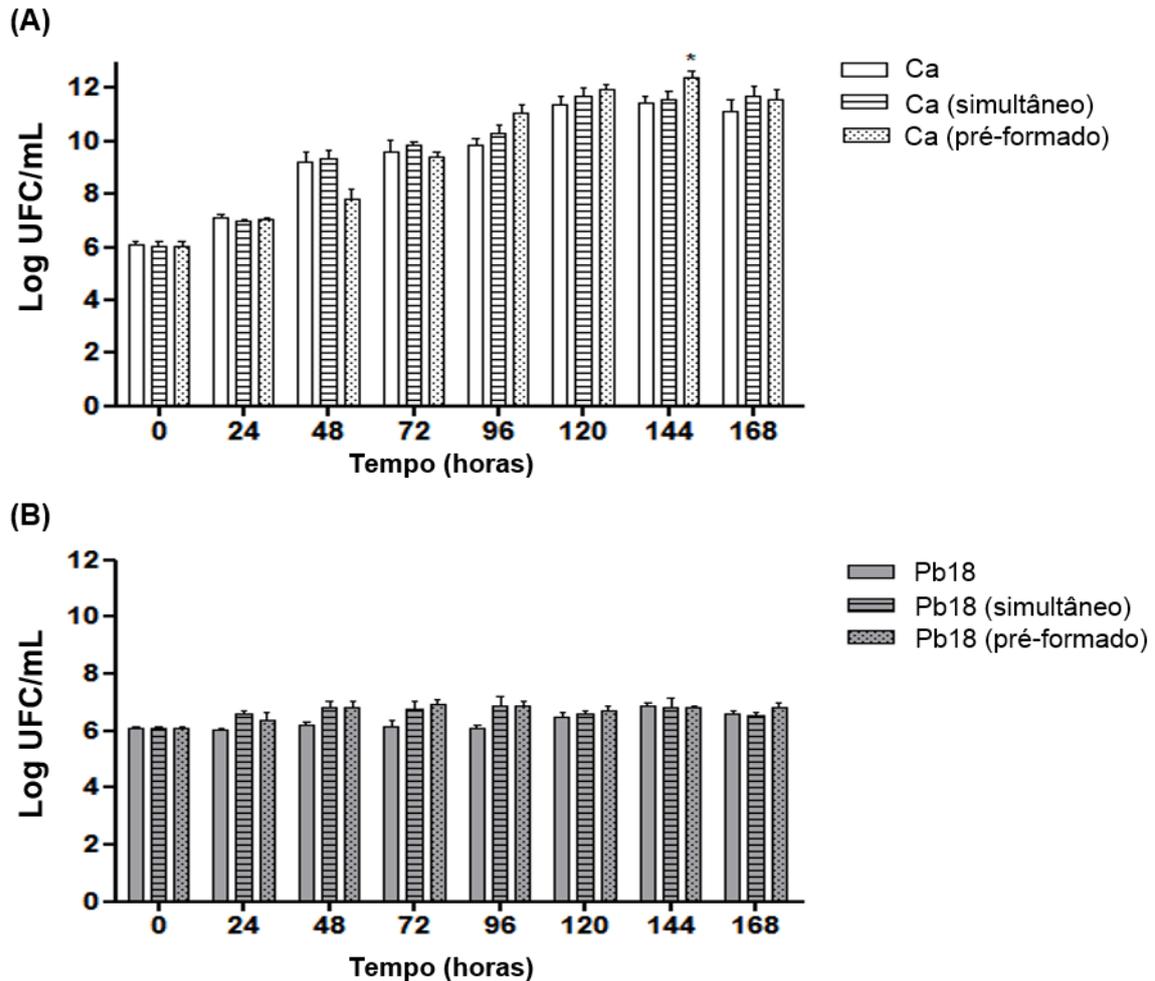


Biofilmes de dupla-espécies co-cultivados e biofilmes de duas espécies formados pela adição de *P. brasiliensis* ao biofilme pré-formado de *C. albicans*. Os resultados foram expressos em média e erro padrão da média, e os experimentos realizados em seis réplicas em três ocasiões diferentes (n=18). As significâncias estatísticas foram calculadas por meio de análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni.

A comparação entre os valores de UFC/mL de *C. albicans* foi semelhante em biofilme mono ou dupla-espécies (Figura 15A). No entanto, os valores de biofilme de duas espécies quando *P. brasiliensis* foi adicionado ao biofilme pré-formado de *C. albicans* foi estatisticamente maior que o biofilme de *C. albicans* em 144 h ($p < 0,001$). Da mesma forma, a comparação entre os valores de UFC/mL de *P. brasiliensis* foi semelhante em biofilme mono ou dupla-espécies (Figura 15B). Não houve diferença significativa nos tempos avaliados, sugerindo que ambos os fungos são capazes de coexistir em biofilmes de duas espécies semelhantes aos formados nas superfícies da mucosa bucal.

O aumento da atividade metabólica, biomassa e UFC, principalmente no biofilme de dupla-espécies cultivados após *P. brasiliensis* ter sido adicionado ao biofilme pré-formado de *C. albicans*, em comparação com biofilme monoespécie de *P. brasiliensis*, pode ter sido devido a sinergismo entre *C. albicans* e *P. brasiliensis*, onde a presença prévia de *C. albicans* poderia fornecer receptores para o estabelecimento do biofilme de *P. brasiliensis*. Previamente foi demonstrado que, *C. albicans* ao se fixar às superfícies, há um aumento de adesão, acompanhado por um aumento significativo na viabilidade celular quando biofilmes dupla-espécies são formados com bactérias (BARTNICKA *et al.*, 2019).

Figura 15 – Contagem de UFC/mL dos biofilmes formados por *P. brasiliensis* (Pb18) e *C. albicans* (Ca) mono e dupla-espécies. (A) *C. albicans* em comparação com as interações e (B) *P. brasiliensis* em comparação com as interações.

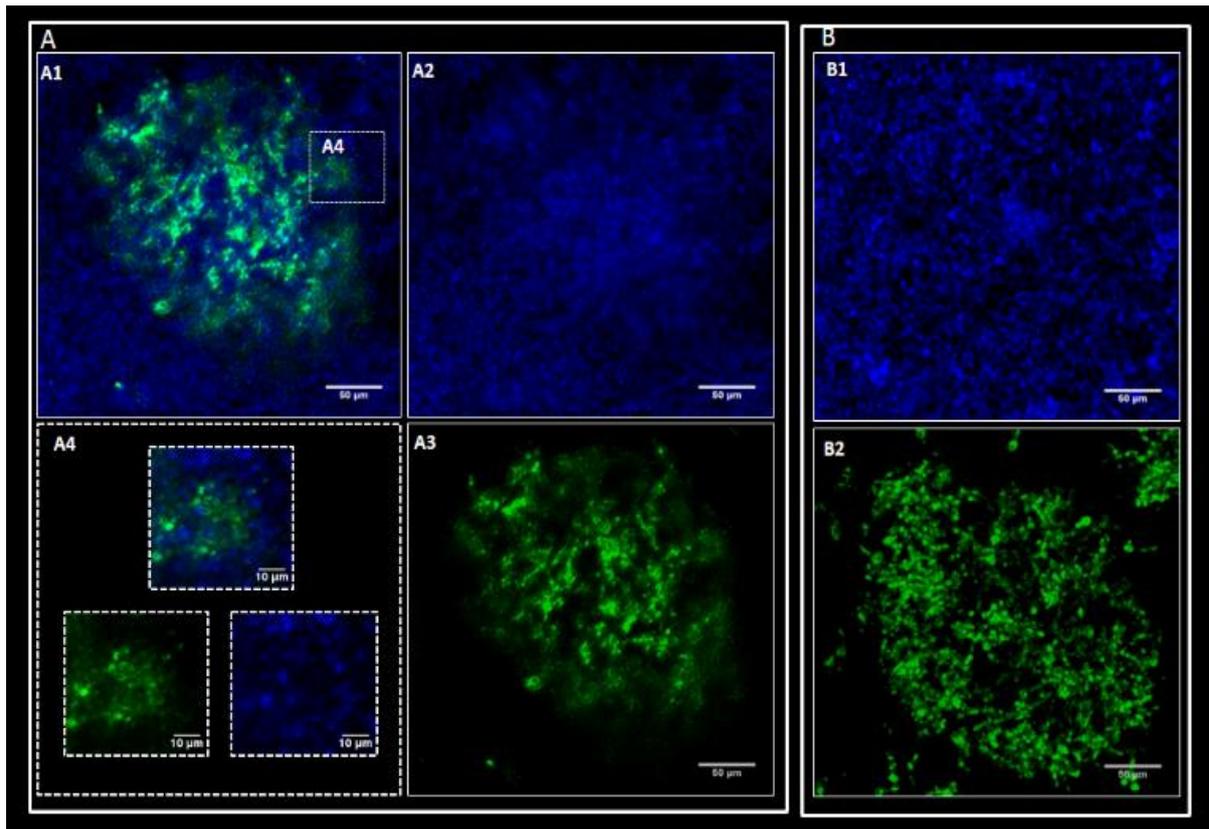


(A) contagem de UFC/mL de *C. albicans* no biofilme monoespécie, em co-cultivo e no biofilme duplo pré-formado. (B) contagem de UFC/mL *P. brasiliensis* em biofilme monoespécie, em co-cultivo e no biofilme duplo pré-formado. Os resultados foram expressos em média e erro padrão da média, sendo os experimentos realizados em seis réplicas e em três ocasiões diferentes (n=18). As significâncias estatísticas foram calculadas por meio de análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do teste de Bonferroni.

Os resultados de quantificação mostraram-se mais promissores para biofilme dupla-espécie em que *P. brasiliensis* foi adicionado ao biofilme pré-formado de *C. albicans*. Além disso, é conhecido que *C. albicans* existe no microambiente bucal o que justificou seguirmos os próximos experimentos apenas com o biofilme formado pela adição *P. brasiliensis* ao biofilme pré-formado de *C. albicans*. Imagens de microscopia confocal foram realizadas para mostrar a estrutura dos biofilmes mono e

dupla-espécies de *P. brasiliensis* e *C. albicans*. *C. albicans* mostrou-se como um biofilme semelhante a um tapete, tanto em mono como em dupla-espécies. Nos biofilmes de duas espécies, *P. brasiliensis* se apresentou como agrupamentos organizados cercados por células de *C. albicans* (Figura 16).

Figura 16 - Imagens representativas de microscopia confocal de biofilmes mono e dupla-espécies de *P. brasiliensis* (PB) e *C. albicans* (CA).



CFSE para marcação de *P. brasiliensis*, representado pela cor verde e calcofluor white para marcação de *C. albicans*, em azul. (A) biofilme de dupla-espécies: sobreposição de CA e PB (A1), CA (A2), PB (A3) e zoom na imagem mostrando a interação das duas espécies (A4); (B) biofilmes monoespécie: CA (B1) e PB (B2).

Galleria mellonella tem se apresentado como um modelo de invertebrado útil para avaliar a virulência de fungos, a resposta imune inata e a eficácia antifúngica devido à facilidade de reprodução em laboratório (FUCHS; MYLONAKIS, 2006). O modelo é especialmente vantajoso no estudo de fungos dimórficos pela possibilidade de as larvas serem mantidas a 37 °C durante os ensaios de sobrevivência, o que representa as condições da fisiologia humana e contribui para a manutenção da fase de levedura de fungos como *Paracoccidioides* spp. (SINGULANI *et al.*, 2018). Mais recentemente, *G. mellonella* foi usada para avaliar a coinfeção entre fungos (ALCAZAR-FUOLI *et al.*, 2015) ou fungos e bactérias

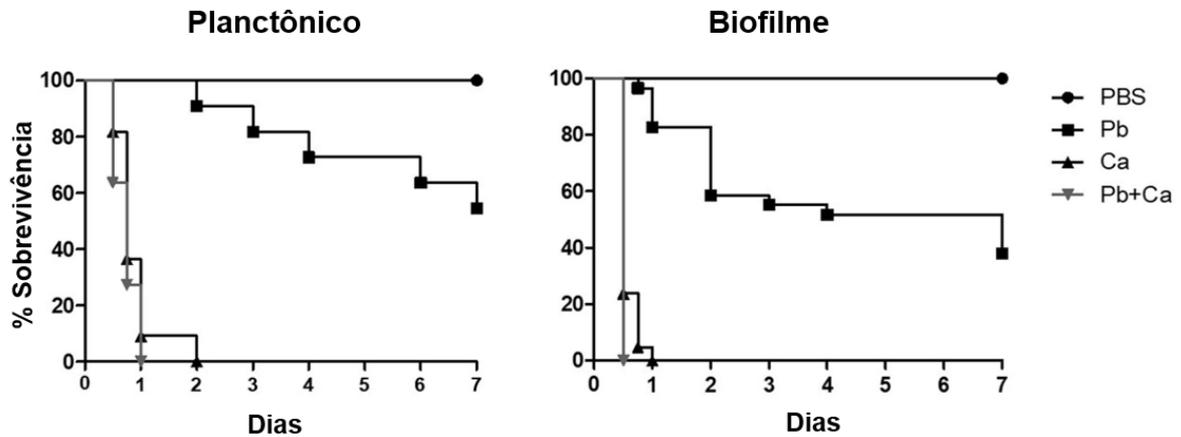
(KEAN *et al.*, 2017; ROSSONI *et al.*, 2017; REECE *et al.*, 2018; SHEEHAN *et al.*, 2020). Além disso, alguns resultados são semelhantes aos encontrados em modelos de mamíferos (SHEEHAN *et al.*, 2020). Usamos o modelo de *G. mellonella* para avaliar a virulência da formação de biofilme de *P. brasiliensis* e *C. albicans* monoespécie e dupla-espécie.

Nós optamos por usar *G. mellonella* para verificar duas hipóteses, a primeira seria se as células provenientes da ruptura dos biofilmes monoespécie são mais virulentas que as células planctônicas. A segunda, seria verificar se a co-infecção causaria maior morte das larvas comparado com a infecção de cada espécie individual.

A patogenicidade das células liberadas dos biofilmes rompidos de *P. brasiliensis* e *C. albicans* e sua coinfecção foram testadas no modelo de *G. mellonella* (Figura 17). Os dados da sobrevivência das larvas foram plotados como curvas de sobrevivência Kaplan-Meier e comparados usando testes de log-rank. Primeiramente, observamos uma diminuição na taxa de sobrevivência das larvas quando infectadas com as células do biofilme mono e dupla-espécies em comparação com suas células planctônicas. Cerca de 55% das larvas estavam vivas no 7º dia quando infectadas com células planctônicas de *P. brasiliensis*, e 38% por sua forma de biofilme. Da mesma forma, as infecções pelos dois fungos na forma planctônica levaram à morte das larvas nas primeiras 24 horas, enquanto na forma de biofilme, 12 horas. Nenhuma larva morreu com a injeção de PBS.

Em segundo lugar, quando comparamos a curva do perfil de larvas infectadas por biofilmes de mono e dupla-espécies com células planctônicas, houve uma diferença significativa entre *P. brasiliensis* e *P. brasiliensis* + *C. albicans* ($p < 0,05$). Por outro lado, a curva de perfil entre *C. albicans* e *P. brasiliensis* + *C. albicans* não apresentou diferença estatística, embora a infecção de duas espécies tenha levado a uma mortalidade mais rápida de larvas em comparação com *C. albicans* (1 dia versus 2 dias). Em terceiro lugar, a comparação de larvas infectadas com células de biofilmes de dupla-espécies mostrou uma diferença significativa entre *P. brasiliensis* ou *C. albicans* e *P. brasiliensis* + *C. albicans* ($p < 0,05$).

Figura 17 - Curva de sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com 1×10^6 células/larvas de células planctônicas, biofilmes mono espécie de *P. brasiliensis* (Pb) e *C. albicans* e dupla-espécie cultivado após *P. brasiliensis* (Pb) ter sido adicionado a biofilmes pré-formado de *C. albicans* (Ca).



Larvas inoculadas com PBS como controle. Os valores são plotados como curvas de sobrevivência Kaplan-Meier e comparados usando testes de log-rank.

Células de biofilmes geralmente exibem fenótipos diferentes em comparação às células planctônicas e estão associadas a uma maior patogenicidade dos microrganismos, incluindo resistência aos mecanismos imunológicos do hospedeiro (MARTINEZ; FRIES, 2010). Nesse aspecto, nossos resultados mostraram que as células liberadas dos biofilmes rompidos aumentaram a virulência de ambos os fungos em relação às suas células planctônicas e, conseqüentemente, diminuíram a taxa de sobrevivência das larvas. Resultados semelhantes foram apresentados para *Cryptococcus neoformans* em um estudo anterior (BENADUCCI *et al.*, 2016). Além disso, a comparação de larvas infectadas com biofilme mono e dupla-espécie apresentou diferença entre *P. brasiliensis* ou *C. albicans* e *P. brasiliensis* + *C. albicans*, especialmente para formação de biofilme. Isso significa que a sobrevivência das larvas em biofilmes de duas espécies foi menor quando comparada à sobrevivência com biofilmes de monoespécies. Assim, nossos resultados com *G. mellonella* são baseados em ensaios *in vitro*, uma vez que biofilmes de duas espécies apresentaram maior biomassa e atividade metabólica e, portanto, foram mais virulentos que biofilmes de monoespécie. Finalmente, nossos dados indicam que a coexistência de *P. brasiliensis* e *C. albicans* pode ocorrer em biofilmes da mucosa oral, usando um modelo *in vivo*. Da mesma forma, quando larvas de *G. mellonella* foram infectadas com *C. albicans* e *S. aureus*, houve

aumento da virulência desses microrganismos e da resistência antifúngica, o que indicou uma interação sinérgica (KEAN *et al.*, 2017).

Em resumo, pode-se argumentar que a dinâmica de crescimento do biofilme de dupla-espécies pode ser afetada pelas diferentes cinéticas de crescimento de *P. brasiliensis* e *C. albicans*. Reconhecemos que a maturidade de biofilmes de monoespécies de *P. brasiliensis* foi alcançada posteriormente em comparação com biofilmes de *C. albicans*. Dessa forma, podemos considerar a contribuição de *C. albicans* para biofilmes de dupla-espécies (em termos de peso seco do biofilme, atividade metabólica do biofilme e infectividade no modelo de *G. mellonella*) ser maior do que *P. brasiliensis*. Isso era esperado em nossas condições testadas, uma vez que tentamos simular uma condição clínica semelhante à pré-existência de *C. albicans* na cavidade oral antes da infecção por *P. brasiliensis*. No entanto, independentemente de qualquer diferença na cinética de crescimento, ambas as cepas foram capazes de coexistir nos biofilmes de dupla-espécies estudadas, sugerindo que uma interação fungo-fungo é provável que ocorra nos locais da mucosa oral. Em adição, um modelo de roedor *in vivo* deve ser adotado em estudos posteriores para avaliar a infectividade desse biofilme de dupla-espécie nas superfícies da mucosa oral e a resposta imune induzida contra esses biofilmes fúngicos.

6. CONCLUSÕES

- Todas as espécies estudadas de *Paracoccidioides* spp. foram capazes de formar biofilme, com produção maior de biomassa e atividade metabólica no tempo de 144 horas e a estrutura dos biofilmes de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* apresentam importante conteúdo proteico, bem como aumento em suas espessuras ao longo do tempo de maturação;
- A matriz extracelular apresentou maior conteúdo de polissacarídeos em sua composição, seguido de proteínas e eDNA em menor quantidade.
- A interação de *Paracoccidioides* e as bactérias *S. mutans* e *S. aureus*, mostrou que houve uma inibição no crescimento dos fungos. Houve concordância nos resultados de biomassa total, atividade metabólica e contagem de UFC/mL.

- A interação de *P. brasiliensis* e *C. albicans*, mostrou que os dois microrganismos podem coexistir no mesmo ambiente. No modelo *in vivo* as células liberadas dos biofilmes rompidos aumentaram a virulência de ambos os fungos em relação às suas células planctônicas e, conseqüentemente, diminuíram a taxa de sobrevivência das larvas de *G. mellonella*.

REFERÊNCIAS

- AKPAN, A.; MORGAN, R. Oral candidiasis. **Postgrad Med J**, v. 78, n. 922, p. 455-9, Aug 2002.
- ALCAZAR-FUOLI, L. *et al.* An alternative host model of a mixed fungal infection by azole susceptible and resistant *Aspergillus* spp strains. **Virulence**, v. 6, n. 4, p. 376-84, 2015.
- ALLESEN-HOLM, M. *et al.* A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. **Molecular microbiology**, v. 59, n. 4, p. 1114-1128, 2006.
- ANDO, E. *et al.* Biofilm formation among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from patients with urinary tract infection. **Acta Med Okayama**, v. 58, n. 4, p. 207-14, Aug 2004.
- ARANTES, T. D. *et al.* Environmental Mapping of *Paracoccidioides* spp. in Brazil Reveals New Clues into Genetic Diversity, Biogeography and Wild Host Association. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 4, p. e0004606, Apr 2016.
- ARAÚJO, D.; HENRIQUES, M.; SILVA, S. Portrait of *Candida* species biofilm regulatory network genes. **Trends in microbiology**, v. 25, n. 1, p. 62-75, 2017.
- AZEREDO, J.; LAZAROVA, V.; OLIVEIRA, R. Methods to extract the exopolymeric matrix from biofilms: a comparative study. **Water science and technology**, v. 39, n. 7, p. 243-250, 1999.
- BAENA-MONROY, T. *et al.* *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 10 Suppl 1, p. E27-39, Apr 1 2005.
- BALTAZAR, L. M. *et al.* Melanin protects *Paracoccidioides brasiliensis* from the effects of antimicrobial photodynamic inhibition and antifungal drugs. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 7, p. 4003-11, Jul 2015.
- BAMFORD, N. C. *et al.* Structural and biochemical characterization of the exopolysaccharide deacetylase Agd3 required for *Aspergillus fumigatus* biofilm formation. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2020.
- BANDARA, H. *et al.* *Escherichia coli* and its lipopolysaccharide modulate in vitro *Candida* biofilm formation. **J Med Microbiol**, v. 58, n. Pt 12, p. 1623-1631, Dec 2009.
- BARBOSA, J. O. *et al.* *Streptococcus mutans* Can Modulate Biofilm Formation and Attenuate the Virulence of *Candida albicans*. **PLoS One**, v. 11, n. 3, p. e0150457, 2016.

- BARTNICKA, D. *et al.* Adhesive protein-mediated cross-talk between *Candida albicans* and *Porphyromonas gingivalis* in dual species biofilm protects the anaerobic bacterium in unfavorable oxic environment. **Sci Rep**, v. 9, n. 1, p. 4376, Mar 13 2019.
- BECKER, M. R. *et al.* Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 3, p. 1001-9, Mar 2002.
- BENADUCCI, T. *et al.* Virulence of *Cryptococcus* sp. Biofilms In Vitro and In Vivo using *Galleria mellonella* as an Alternative Model. **Front Microbiol**, v. 7, p. 290, 2016.
- BENARD, G.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Paracoccidioidomycosis. In: FEIGIN, R.D.; CHERRY, J.D. (Eds). **Textbook of Pediatric Infections Diseases**. 7th. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2014. p. 2780-2795.
- BERTOLINI, M.; DONGARI-BAGTZOGLU, A. The Relationship of *Candida albicans* with the Oral Bacterial Microbiome in Health and Disease. **Adv Exp Med Biol**, v. 1197, p. 69-78, 2019.
- BESEMER, K. *et al.* Unraveling assembly of stream biofilm communities. **ISME J**, v. 6, n. 8, p. 1459-68, Aug 2012.
- BOCCA, A. L. *et al.* Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. **Future Microbiol**, v. 8, n. 9, p. 1177-91, Sep 2013.
- BONIFACIO, B. V. *et al.* Nanostructured lipid system as a strategy to improve the anti-*Candida albicans* activity of Astronium sp. **Int J Nanomedicine**, v. 10, p. 5081-92, 2015.
- BOWEN, W. H. *et al.* Oral Biofilms: Pathogens, Matrix, and Polymicrobial Interactions in Microenvironments. **Trends Microbiol**, v. 26, n. 3, p. 229-242, Mar 2018.
- BOWEN, W. H.; KOO, H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. **Caries Res**, v. 45, n. 1, p. 69-86, 2011.
- BOYCE, K. J.; ANDRIANOPOULOS, A. Fungal dimorphism: the switch from hyphae to yeast is a specialized morphogenetic adaptation allowing colonization of a host. **FEMS Microbiol Rev**, v. 39, n. 6, p. 797-811, Nov 2015.
- BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin Microbiol Rev**, v. 6, n. 2, p. 89-117, Apr 1993.
- BUI, F. Q. *et al.* Association between periodontal pathogens and systemic disease. **Biomed J**, v. 42, n. 1, p. 27-35, Feb 2019.

- BUITRAGO, M. J. *et al.* Utility of real-time PCR for the detection of *Paracoccidioides brasiliensis* DNA in the diagnosis of imported paracoccidioidomycosis. **Med Mycol**, v. 47, n. 8, p. 879-82, Dec 2009.
- CAMACHO, E.; NINO-VEGA, G. A. *Paracoccidioides* Spp.: Virulence Factors and Immune-Evasion Strategies. **Mediators Inflamm**, v. 2017, p. 5313691, 2017.
- CARRERO, L. L. *et al.* New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. **Fungal Genet Biol**, v. 45, n. 5, p. 605-12, May 2008.
- CATTANA, M. E. *et al.* In Vivo *Paracoccidioides* sp. Biofilm on Vascular Prosthesis. **Mycopathologia**, v. 182, n. 7-8, p. 747-749, Aug 2017.
- CAVALHEIRO, M.; TEIXEIRA, M. C. *Candida* Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. **Front Med (Lausanne)**, v. 5, p. 28, 2018.
- CHAFFIN, W. L. *et al.* Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 62, n. 1, p. 130-80, Mar 1998.
- CHANDRA, J. *et al.* Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **J Bacteriol**, v. 183, n. 18, p. 5385-94, Sep 2001.
- COUTINHO, Z. F. *et al.* Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cad Saude Publica**, v. 18, n. 5, p. 1441-54, Sep-Oct 2002.
- DA SILVA, J. F. *et al.* Advances and challenges in paracoccidioidomycosis serology caused by *Paracoccidioides* species complex: an update. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 84, n. 1, p. 87-94, Jan 2016.
- DE ARRUDA, J. A. A. *et al.* A multicentre study of oral paracoccidioidomycosis: Analysis of 320 cases and literature review. **Oral Dis**, v. 24, n. 8, p. 1492-1502, Nov 2018.
- DE OLIVEIRA, H. C. *et al.* Importance of adhesins in virulence of *Paracoccidioides* spp. **Front Microbiol**, v. 6, p. 303, 2015.
- DESMOND, P. *et al.* Linking composition of extracellular polymeric substances (EPS) to the physical structure and hydraulic resistance of membrane biofilms. **Water Res**, v. 132, p. 211-221, Apr 1 2018.
- DIAZ, P. I.; VALM, A. M. Microbial Interactions in Oral Communities Mediate Emergent Biofilm Properties. **J Dent Res**, v. 99, n. 1, p. 18-25, Jan 2020.
- DO CARMO SILVA, L. *et al.* Transcriptome Profile of the Response of *Paracoccidioides* spp. to a Camphene Thiosemicarbazide Derivative. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0130703, 2015.

- DONGARI-BAGTZOGLU, A. *et al.* Characterization of mucosal *Candida albicans* biofilms. **PLoS One**, v. 4, n. 11, p. e7967, Nov 24 2009.
- EPSTEIN, J. B.; GORSKY, M.; CALDWELL, J. Fluconazole mouthrinses for oral candidiasis in postirradiation, transplant, and other patients. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 93, n. 6, p. 671-5, Jun 2002.
- ESCAPA, I. F. *et al.* New insights into human nostril microbiome from the expanded human oral microbiome database (eHOMD): a resource for the microbiome of the human aerodigestive tract. **Msystems**, v. 3, n. 6, 2018.
- FALSETTA, M. L. *et al.* Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. **Infect Immun**, v. 82, n. 5, p. 1968-81, May 2014.
- FANGTHAM, M.; MAGDER, L. S.; PETRI, M. A. Oral candidiasis in systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 23, n. 7, p. 684-90, Jun 2014.
- FERREIRA, M. S. Paracoccidioidomycosis. **Paediatr Respir Rev**, v. 10, n. 4, p. 161-5, Dec 2009.
- FLEMMING, H.-C. *et al.* Cohesiveness in biofilm matrix. **Community structure and cooperation in biofilms**, v. 59, p. 87, 2000.
- FLEMMING, H. C.; NEU, T. R.; WOZNIAK, D. J. The EPS matrix: the "house of biofilm cells". **J Bacteriol**, v. 189, n. 22, p. 7945-7, Nov 2007.
- FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 9, p. 623-33, Sep 2010.
- FOTOS, P. G.; VINCENT, S. D.; HELLSTEIN, J. W. Oral candidosis. Clinical, historical, and therapeutic features of 100 cases. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 74, n. 1, p. 41-9, Jul 1992.
- FRANCO, M. *et al.* Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 20, n. 2, p. 129-32, Apr-Jun 1987.
- FUCHS, B. B.; MYLONAKIS, E. Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. **Curr Opin Microbiol**, v. 9, n. 4, p. 346-51, Aug 2006.
- GARNY, K. *et al.* Combined application of ¹³C NMR spectroscopy and confocal laser scanning microscopy—Investigation on biofilm structure and physico-chemical properties. **Chemical engineering science**, v. 65, n. 16, p. 4691-4700, 2010.
- GEGEMBAUER, G. *et al.* Serology of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 7, p. e2986, Jul 2014.
- GIACOMAZZI, J. *et al.* The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**, v. 59, n. 3, p. 145-50, Mar 2016.

GOLD, O. G.; JORDAN, H. V.; VAN HOUTE, J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. **Arch Oral Biol**, v. 18, n. 11, p. 1357-64, Nov 1973.

GOMES, G. M. *et al.* PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 9, p. 3478-80, Sep 2000.

HAGGAG, W. M.; MOHAMED, H. Biotechnological aspects of microorganisms used in plant biological control. **American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture**, v. 1, n. 1, p. 7-12, 2007.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, n. 2, p. 95-108, Feb 2004.

HARRIS, L. G.; FOSTER, S. J.; RICHARDS, R. G. An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. **Eur Cell Mater**, v. 4, p. 39-60, Dec 31 2002.

HRYCYK, M. F. *et al.* Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*, *P. lutzii* and related species: infection in armadillos, soil occurrence and mycological aspects. **Med Mycol**, v. 56, n. 8, p. 950-962, Nov 1 2018.

HUANG, W. C. *et al.* Chromosomal inversion between *rrn* operons among *Streptococcus mutans* serotype c oral and blood isolates. **J Med Microbiol**, v. 57, n. Pt 2, p. 198-206, Feb 2008.

IKEDA, R. *et al.* Contribution of the mannan backbone of cryptococcal glucuronoxylomannan and a glycolytic enzyme of *Staphylococcus aureus* to contact-mediated killing of *Cryptococcus neoformans*. **J Bacteriol**, v. 189, n. 13, p. 4815-26, Jul 2007.

JACK, A. A. *et al.* *Streptococcus gordonii* comCDE (competence) operon modulates biofilm formation with *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 161, n. Pt 2, p. 411-421, Feb 2015.

JIN, Y. *et al.* Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars. **Arch Oral Biol**, v. 49, n. 10, p. 789-98, Oct 2004.

CALDERON, J. *et al.* PHR1, a pH-regulated gene of *Candida albicans* encoding a glucan-remodelling enzyme, is required for adhesion and invasion. **Microbiology (Reading)**, v. 156, n. 8, p. 2484-2494, Aug 2010.

KASSEBAUM, N. J. *et al.* Global, Regional, and National Prevalence, Incidence, and Disability-Adjusted Life Years for Oral Conditions for 195 Countries, 1990-2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors. **J Dent Res**, v. 96, n. 4, p. 380-387, Apr 2017.

KEAN, R. *et al.* *Candida albicans* Mycofilms Support *Staphylococcus aureus* Colonization and Enhances Miconazole Resistance in Dual-Species Interactions. **Front Microbiol**, v. 8, p. 258, 2017.

KLEIN, M. I. *et al.* *Streptococcus mutans* protein synthesis during mixed-species biofilm development by high-throughput quantitative proteomics. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e45795, 2012.

KLOOS, W. Taxonomy and systematics of staphylococci indigenous to human. In: CROSSLEY, B.; ARCHER, G. L. (Eds). **The staphylococci in human disease**. New York, N.Y: Churchill Livingstone, 1997. p. 113-137.

KOO, H. *et al.* Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. **J Antimicrob Chemother**, v. 52, n. 5, p. 782-9, Nov 2003.

LACAZ, C. S. *Paracoccidioides brasiliensis*: morphology; evolutionary cycle; maintenance during saprophytic life; biology, virulence, taxonomy. In: FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. (Eds). **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. p. 13-25.

LEMOES, J. A.; BURNE, R. A. A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. **Microbiology**, v. 154, n. Pt 11, p. 3247-3255, Nov 2008.

LI, H. *et al.* In vitro interactions between fluconazole and minocycline against mixed cultures of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. **J Microbiol Immunol Infect**, v. 48, n. 6, p. 655-61, Dec 2015.

LOBO, C. I. V. *et al.* Dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* exhibit more biomass and are mutually beneficial compared with single-species biofilms. **J Oral Microbiol**, v. 11, n. 1, p. 1581520, 2019.

LOESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiol Rev**, v. 50, n. 4, p. 353-80, Dec 1986.

LYNGE PEDERSEN, A. M.; BELSTROM, D. The role of natural salivary defences in maintaining a healthy oral microbiota. **J Dent**, v. 80 Suppl 1, p. S3-S12, Jan 2019.

MANAVATHU, E. K.; VAGER, D. L.; VAZQUEZ, J. A. Development and antimicrobial susceptibility studies of in vitro monomicrobial and polymicrobial biofilm models with *Aspergillus fumigatus* and *Pseudomonas aeruginosa*. **BMC Microbiol**, v. 14, p. 53, Mar 3 2014.

MANDELL, G. L.; DOUGLAS JR, R.; BENNETT, J. E. **Principles and practice of infectious diseases**. New York, N.Y.: John Wiley & Sons, 1979. v. 1- 2. ISBN 0471034894.

MARTINEZ, R. Paracoccidioidomicose. In: SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. (Eds). **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2004. p. 202-21.

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. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 14, p. 4592-601, Jul 2007.

MARTINEZ, L. R.; FRIES, B. C. Fungal Biofilms: Relevance in the Setting of Human Disease. **Curr Fungal Infect Rep**, v. 4, n. 4, p. 266-275, Dec 1 2010.

MARTINEZ, R. Epidemiology of Paracoccidioidomycosis. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 57 Suppl 19, p. 11-20, Sep 2015.

MARTINEZ, R. New Trends in Paracoccidioidomycosis Epidemiology. **J Fungi**, (Basel), v. 3, n. 1, p. 1-13, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof3010001>.

MARTINS, M. *et al.* Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms. **Mycopathologia**, v. 169, n. 5, p. 323-31, May 2010.

MATUTE, D. R. *et al.* Microsatellite analysis of three phylogenetic species of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 6, p. 2153-7, Jun 2006.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. "Infecções Fúngicas". In: FERREIRA, A.W.; MORAES, S.L. (Eds). **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

MENDES-GIANNINI, M. J. *et al.* Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: recent advances. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 237-48, Apr-May 2008.

MENDES, R. P. *et al.* Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. **Open Microbiol J**, v. 11, p. 224-282, 2017.

METWALLI, K. H. *et al.* *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, and the human mouth: a sticky situation. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 10, p. e1003616, 2013.

MILLSOP, J. W.; FAZEL, N. Oral candidiasis. **Clin Dermatol**, v. 34, n. 4, p. 487-94, Jul-Aug 2016.

MITCHELL, K. F.; ZARNOWSKI, R.; ANDES, D. R. The extracellular matrix of fungal biofilms. In: IMBERT, C. (Ed.). **Fungal biofilms and related infections**. Switzerland: Springer, 2016. p. 21-35. (Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health v. 3).

MITCHELL, K. F. *et al.* Community participation in biofilm matrix assembly and function. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 13, p. 4092-7, Mar 31 2015.

MITCHELL, T. J. The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. **Nat Rev Microbiol**, v. 1, n. 3, p. 219-30, Dec 2003.

MORAIS, T. *et al.* Pacientes em unidades de terapia intensiva: atuação conjunta dos médicos e dos cirurgiões-dentistas. *In*: SERRANO JR CV, LOTUFO RF, MORAIS TM, MORAES RG, OLIVEIRA MC. (Coords.). **Cardiologia e Odontologia: uma visão integrada**. São Paulo: Santos, 2007. p. 249-70.

MUNRO, C. L.; GRAP, M. J. Oral health and care in the intensive care unit: state of the science. **Am J Crit Care**, v. 13, n. 1, p. 25-33; discussion 34, Jan 2004.

MURRAY, P.; ROSENTHAL, K.; PFALLER, M. cocos grampositivos. *In*: Murray **microbiología médica**. [Internet]. 7^a. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. p. 205.

NAIR, R. G.; ANIL, S.; SAMARANAYAKE, L. P. The effect of oral bacteria on *Candida albicans* germ-tube formation. **APMIS**, v. 109, n. 2, p. 147-54, Feb 2001.

NAIR, R. G.; SAMARANAYAKE, L. P. The effect of oral commensal bacteria on candidal adhesion to human buccal epithelial cells in vitro. **J Med Microbiol**, v. 45, n. 3, p. 179-85, Sep 1996.

NAKANO, K. *et al.* Demonstration of *Streptococcus mutans* with a cell wall polysaccharide specific to a new serotype, k, in the human oral cavity. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 1, p. 198-202, Jan 2004.

NEGRINI, T. C.; KOO, H.; ARTHUR, R. A. *Candida*-Bacterial Biofilms and Host-Microbe Interactions in Oral Diseases. **Adv Exp Med Biol**, v. 1197, p. 119-141, 2019.

NETT, J. E. *et al.* Development and validation of an in vivo *Candida albicans* biofilm denture model. **Infect Immun**, v. 78, n. 9, p. 3650-9, Sep 2010.

NICOLATOU-GALITIS, O. *et al.* Oral pseudomembranous candidiasis, herpes simplex virus-1 infection, and oral mucositis in head and neck cancer patients receiving radiotherapy and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) mouthwash. **J Oral Pathol Med**, v. 30, n. 8, p. 471-80, Sep 2001.

NOBILE, C. J., MITCHELL, A. P. Biofilmes microbianos: e pluribus unum. **Curr Biol** 17. p. R349-R353, 2007.

NOMBELA, C.; GIL, C.; CHAFFIN, W. L. Non-conventional protein secretion in yeast. **Trends Microbiol**, v. 14, n. 1, p. 15-21, Jan 2006.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. **Cell Microbiol**, v. 5, n. 4, p. 203-23, Apr 2003.

NOVA, R.; PAIVA, L.; NEGRO, D. Lesões orofaríngeas. *In*: DEL NEGRO, G.; LACAZ, C.S.; FIORILLO, A. M. **Paracoccidioidomicose, blastomicose sul-americana**. São Paulo: Savier Edusp, 1982. p. 157-160.

O'GARA, J. P. Ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 270, n. 2, p. 179-88, May 2007.

OSHIRO, K. G. N. *et al.* Bioactive Peptides Against Fungal Biofilms. **Front Microbiol**, v. 10, p. 2169, 2019.

PAJU, S.; SCANNAPIECO, F. A. Oral biofilms, periodontitis, and pulmonary infections. **Oral Dis**, v. 13, n. 6, p. 508-12, Nov 2007.

PAN, X. *et al.* A comparison of five extraction methods for extracellular polymeric substances (EPS) from biofilm by using threedimensional excitation-emission matrix (3DEEM) fluorescence spectroscopy. **Water SA**, v. 36, n. 1, 2010.

PELEG, A. Y.; HOGAN, D. A.; MYLONAKIS, E. Medically important bacterial-fungal interactions. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 5, p. 340-9, May 2010.

PIERCE, C. G. *et al.* A 96 well microtiter plate-based method for monitoring formation and antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. **J Vis Exp**, n. 44, Oct 21 2010.

PINZAN, C. F. *et al.* Immunological basis for the gender differences in murine *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **PLoS One**, v. 5, n. 5, p. e10757, May 21 2010.

RAGHAVENDRAN, K.; MYLOTTE, J. M.; SCANNAPIECO, F. A. Nursing home-associated pneumonia, hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: the contribution of dental biofilms and periodontal inflammation. **Periodontol 2000**, v. 44, p. 164-77, 2007.

RAJENDRAN, R. *et al.* Extracellular DNA release confers heterogeneity in *Candida albicans* biofilm formation. **BMC Microbiol**, v. 14, p. 303, Dec 5 2014.

RAJENDRAN, R. *et al.* Biofilm formation is a risk factor for mortality in patients with *Candida albicans* bloodstream infection—Scotland, 2012–2013. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 1, p. 87-93, 2016.

RAMAGE, G. *et al.* Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 98, n. 1, p. 53-9, Jul 2004.

RAMIREZ GRANILLO, A. *et al.* Antibiosis interaction of *Staphylococcus aureus* on *Aspergillus fumigatus* assessed in vitro by mixed biofilm formation. **BMC Microbiol**, v. 15, p. 33, Feb 15 2015.

RAPPLEYE, C. A.; ENGLE, J. T.; GOLDMAN, W. E. RNA interference in *Histoplasma capsulatum* demonstrates a role for alpha-(1,3)-glucan in virulence. **Mol Microbiol**, v. 53, n. 1, p. 153-65, Jul 2004.

REECE, E. *et al.* *Aspergillus fumigatus* Inhibits *Pseudomonas aeruginosa* in Co-culture: Implications of a Mutually Antagonistic Relationship on Virulence and Inflammation in the CF Airway. **Front Microbiol**, v. 9, p. 1205, 2018.

REICHHARDT, C. *et al.* Analysis of the *Aspergillus fumigatus* Biofilm Extracellular Matrix by Solid-State Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. **Eukaryot Cell**, v. 14, n. 11, p. 1064-72, Nov 2015.

RESTREPO, A. *et al.* Pulmonary paracoccidioidomycosis. **Semin Respir Crit Care Med**. v. 29, n. 2, p.182-197, 2008.

RESTREPO, A. *et al.* Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infect Immun**, v. 46, n. 2, p. 346-53, Nov 1984.

RODRIGUES, M. E.; GOMES, F.; RODRIGUES, C. F. *Candida* spp./Bacteria Mixed Biofilms. **J Fungi** (Basel), v. 6, n. 1, Dec 20 2019.

ROSSONI, R. D. *et al.* *Lactobacillus paracasei* modulates the immune system of *Galleria mellonella* and protects against *Candida albicans* infection. **PLoS One**, v. 12, n. 3, p. e0173332, 2017.

SAITO, F.; IKEDA, R. Killing of *Cryptococcus neoformans* by *Staphylococcus aureus*: the role of cryptococcal capsular polysaccharide in the fungal-bacteria interaction. **Med Mycol**, v. 43, n. 7, p. 603-12, Nov 2005.

SALAZAR, M.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infection and immunity**, v. 56, n. 3, p. 711-713, 1988.

SAN-BLAS, G.; NINO-VEGA, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 183, 2008.

SAN-BLAS, G. *et al.* Primers for clinical detection of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 8, p. 4255-7, Aug 2005.

SAN-BLAS, G.; NINO-VEGA, G.; ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med Mycol**, v. 40, n. 3, p. 225-42, Jun 2002.

SAN-BLAS, G. *et al.* Chemical changes in cell wall structure of five strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Sabouraudia**, v. 22, n. 3, p. 255-7, 1984.

SAN-BLAS, G.; VERNET, D. Induction of the synthesis of cell wall alpha-1,3-glucan in the yeastlike form of *Paracoccidioides brasiliensis* strain IVIC Pb9 by fetal calf serum. **Infect Immun**, v. 15, n. 3, p. 897-902, Mar 1977.

SAPAAR, B. *et al.* Effects of extracellular DNA from *Candida albicans* and pneumonia-related pathogens on *Candida* biofilm formation and hyphal transformation. **J Appl Microbiol**, v. 116, n. 6, p. 1531-42, Jun 2014.

SARDI JDE, C. *et al.* In vitro *Paracoccidioides brasiliensis* biofilm and gene expression of adhesins and hydrolytic enzymes. **Virulence**, v. 6, n. 6, p. 642-51, 2015.

SCANNAPIECO, F. A. The relationship between periodontal diseases and respiratory diseases. **Dent. Today**, v. 22, p. 79-83, 2003.

SCORZONI, L. *et al.* Comparison of virulence between *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* using *Galleria mellonella* as a host model. **Virulence**, v. 6, n. 8, p. 766-76, 2015.

SHANKAR, J. *et al.* Hormones and the resistance of women to paracoccidioidomycosis. **Clin Microbiol Rev**, v. 24, n. 2, p. 296-313, Apr 2011.

SHEEHAN, G.; TULLY, L.; KAVANAGH, K. A. *Candida albicans* increases the pathogenicity of *Staphylococcus aureus* during polymicrobial infection of *Galleria mellonella* larvae. **Microbiology**, v. 166, n. 4, p. 375-385, Apr 2020.

SHERRY, L. *et al.* Biofilms formed by *Candida albicans* bloodstream isolates display phenotypic and transcriptional heterogeneity that are associated with resistance and pathogenicity. **BMC Microbiol**, v. 14, p. 182, Jul 5 2014.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. Paracoccidioidomycosis treatment. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, p. 31-37, 2015.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. *et al.* [Guidelines in paracoccidioidomycosis]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 39, n. 3, p. 297-310, May-Jun 2006.

SILVA, S. *et al.* Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. **Med Mycol**, v. 47, n. 7, p. 681-9, Nov 2009.

SILVA, S. *et al.* In vitro biofilm activity of non-*Candida albicans* *Candida* species. **Curr Microbiol**, v. 61, n. 6, p. 534-40, Dec 2010.

SILVA, S. *et al.* *Candida* Species Biofilms' Antifungal Resistance. **J Fungi (Basel)**, v. 3, n. 1, Feb 21 2017.

SINGULANI, J. L. *et al.* Applications of Invertebrate Animal Models to Dimorphic Fungal Infections. **J Fungi (Basel)**, v. 4, n. 4, Oct 19 2018.

SMITH, A.; JACKSON, M.; BAGG, J. The ecology of *Staphylococcus* species in the oral cavity. **Journal of medical microbiology**, v. 50, n. 11, p. 940-946, 2001.

SMITH, A. *et al.* *Staphylococcus aureus* in the oral cavity: a three-year retrospective analysis of clinical laboratory data. **British dental journal**, v. 195, n. 12, p. 701-703, 2003.

SPOSTO, M. R. *et al.* Paracoccidioidomycosis manifesting as oral lesions: clinical, cytological and serological investigation. **J Oral Pathol Med**, v. 23, n. 2, p. 85-7, Feb 1994.

SUTHERLAND, I. W. The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends Microbiol**, v. 9, n. 5, p. 222-7, May 2001.

TABORDA, C. *et al.* *Paracoccidioides* spp. and *Histoplasma capsulatum*: Current and new perspectives for diagnosis and treatment. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 18, n. 15, p. 1333-1348, 2018.

TABORDA, C. P. *et al.* Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 331-9, Apr-May 2008.

TEIXEIRA, M. M. *et al.* Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Mol Phylogenet Evol**, v. 52, n. 2, p. 273-83, Aug 2009.

THEIN, Z. M. *et al.* Community lifestyle of *Candida* in mixed biofilms: a mini review. **Mycoses**, v. 52, n. 6, p. 467-75, Nov 2009.

THOMAS, D. P.; BACHMANN, S. P.; LOPEZ-RIBOT, J. L. Proteomics for the analysis of the *Candida albicans* biofilm lifestyle. **Proteomics**, v. 6, n. 21, p. 5795-804, Nov 2006.

TOLENTINO, E. D. S. *et al.* Manifestações bucais da paracoccidioidomicose: considerações gerais e relato de caso. **RFO UPF**, v. 15, n. 1, p. 71-76, 2010.

TREJO-HERNANDEZ, A. *et al.* Interspecies competition triggers virulence and mutability in *Candida albicans*-*Pseudomonas aeruginosa* mixed biofilms. **ISME J**, v. 8, n. 10, p. 1974-88, Oct 2014.

TRISTÃO, G. B. Identificação de metaloproteínas associadas a cobre, ferro e zinco codificadas pelos genomas de *Paracoccidioides* spp. 2014.

TURISSINI, D. A. *et al.* Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. **Fungal Genet Biol**, v. 106, p. 9-25, Sep 2017.

VAN DYKE, M. C. C.; TEIXEIRA, M. M.; BARKER, B. M. Fantastic yeasts and where to find them: the hidden diversity of dimorphic fungal pathogens. **Curr Opin Microbiol**, v. 52, p. 55-63, Dec 2019.

VIDAL, M. S. *et al.* Serological diagnosis of paracoccidioidomycosis: high rate of inter-laboratorial variability among medical mycology reference centers. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 9, p. e3174, Sep 2014.

WOLFF, M. S.; LARSON, C. The cariogenic dental biofilm: good, bad or just something to control? **Braz Oral Res**, v. 23 Suppl 1, p. 31-8, 2009.

XIAO, J. *et al.* The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 4, p. e1002623, 2012.

XU, H.; DONGARI-BAGTZOGLOU, A. Shaping the oral mycobiota: interactions of opportunistic fungi with oral bacteria and the host. **Curr Opin Microbiol**, v. 26, p. 65-70, Aug 2015.

ZAMBUZZI-CARVALHO, P. F. *et al.* The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb 01 is required in the glyoxylate cycle and in the allantoin degradation pathway. **Sabouraudia**, v. 47, n. 7, p. 734-744. e1, 2009.

ZARNOWSKI, R. *et al.* *Candida albicans* biofilm-induced vesicles confer drug resistance through matrix biogenesis. **PLoS Biol**, v. 16, n. 10, p. e2006872, Oct 2018.

ZARNOWSKI, R. *et al.* Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. **mBio**, v. 5, n. 4, p. e01333-14, Aug 5 2014.