

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **Dissertação** será disponibilizado somente a partir de 28/04/2024.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS
À FARMÁCIA

DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

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

JENYFFIE ARAUJO BELIZARIO

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

Coorientadora: Prof.^a Dra. Regina Helena Pires

Araraquara

2023

JENYFFIE ARAUJO BELIZARIO

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

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

Orientadora: Prof Dra. Maria José Soares Mendes

Giannini Coorientadora: Prof. Dra. Regina Helena

Pires

Araraquara, SP

2023

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

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

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

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

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

CAPES: 33004030081P7

Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Biofilmes monoespécie e mistos de Thichophyton e Staphylococcus: influência de nutrientes e formação de células persistentes.

AUTORA: JENYFFIE ARAUJO BELIZARIO

ORIENTADORA: MARIA JOSÉ SOARES MENDES GIANNINI

COORDINADORA: REGINA HELENA PIRES GONÇALVES

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

Profa. Dra. MARIA JOSÉ SOARES MENDES GIANNINI (Participação Virtual)
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

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

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

Araraquara, 28 de abril de 2023

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

DEDICATÓRIA

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação dos seis estágios do desenvolvimento de biofilme de fungos filamentosos conforme proposto por Harding et al. (2009): (I) adsorção, (II) adesão ativa, (III) formação de microcolônias e/ou desenvolvimento de monocamada, (IV) desenvolvimento micelial (V) biofilme maduro e (VI) dispersão de conídios.	28
Figura 2 – Representação esquemática dos estágios do desenvolvimento do biofilme estafilocócico conforme proposto por Michael Otto (2018): (I) fixação inicial, (II) maturação e (III) dispersão.	34
Figura 3 - Quantificação de biomassa pelo ensaio de cristal violeta (CV) e leitura da absorbância a 570 nm dos biofilmes monoespécie de <i>T. rubrum</i> ATCC 28189 (A), <i>S. aureus</i> ATCC 25923 (B) e <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 (C), formados em RPMI-1640, BHI e MHI em diferentes tempos de incubação (24h, 48h, 72h) Significância estatística (* $p < 0,05$ comparação entre RPMI e MHI), (** $p < 0,01$ comparação entre RPMI e MHI) e (***) $p < 0,001$ comparação entre BHI vs MHI e RPMI)	56
Figura 4 - Quantificação de biomassa pelo ensaio de cristal violeta (CV) dos biofilmes mistos constituídos por <i>T. rubrum</i> + <i>S. aureus</i> em RPMI-1640 (A), <i>T. rubrum</i> + <i>S. aureus</i> em BHI (B), <i>T. rubrum</i> + <i>S. aureus</i> em MHI (C) nas diferentes condições testadas de acordo com o esquema 1 (0h, 4h, 24h e 48h) com um tempo total de incubação de 72h. Significâncias estatísticas (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e ***) $p < 0,001$) foram apontadas.	60
Figura 5 - Quantificação de biomassa pelo ensaio de cristal violeta (CV) dos biofilmes mistos de <i>T. rubrum</i> + <i>S. epidermidis</i> em RPMI-1640 (A), <i>T. rubrum</i> + <i>S. epidermidis</i> em BHI (B), <i>T. rubrum</i> + <i>S. epidermidis</i> em MHI (C) nas diferentes condições testadas de acordo com o esquema 1 (0h, 4h, 24h e 48h) com um tempo total de incubação de 72h. Significância estatística (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e ***) $p < 0,001$) foram apontadas.	61
Figura 6 - Caracterização da atividade metabólica pelo ensaio de redução do XTT e leitura da absorbância a 490 nm dos biofilmes monoespécie de <i>T. rubrum</i> ATCC 28189 (A), <i>S. aureus</i> ATCC 25923 (B) e <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 (C), formados em RPMI-1640, BHI e MHI em diferentes tempos de incubação (24h, 48h e 72h). Significância estatística (** $p < 0,01$ comparação entre BHI vs RPMI e MHI) e (***) $p < 0,001$ comparação entre BHI e RPMI vs MHI).	65
Figura 7 - Caracterização da atividade metabólica pelo ensaio de redução do XTT dos biofilmes mistos de <i>T. rubrum</i> + <i>S. aureus</i> em RPMI-1640 (A), <i>T. rubrum</i> + <i>S. aureus</i> em BHI (B), <i>T. rubrum</i> + <i>S. aureus</i> em MHI (C), nas diferentes condições testadas (0h, 4h, 24h e 48h) com um tempo total de incubação de 72h. Significância estatística (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e ***) $p < 0,001$) foram apontadas.	67

Figura 8 - Caracterização da atividade metabólica pelo ensaio de redução do XTT dos biofilmes mistos de *T. rubrum* + *S. epidermidis* em RPMI-1640 (A), *T. rubrum* + *S. epidermidis* em BHI (B), *T. rubrum* + *S. epidermidis* em MHI (C) das diferentes condições testadas (0h, 4h, 24h e 48h) com um tempo total de incubação de 72h. Significância estatística (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$) foram apontadas.....68

Figura 9 - Eletromicrografias dos biofilmes monoespécie de *T. rubrum* ATCC 28189 (a,b) e *S. aureus* ATCC 25923 (c,d) e biofilmes mistos de *T. rubrum* + *S. aureus* quando adicionados simultaneamente (0h) (e,f) e quando formado com a adição das suspensões de *S. aureus* após a pré-adesão (4h) do biofilme de *T. rubrum* (g,h). Todos os biofilmes foram analisados com um tempo total de 72h de incubação. As setas brancas indicam as estruturas na forma de cocos de *S. aureus*. Ampliação de 1000x (primeira linha) e 3000x (segunda linha).70

Figura 10 - Eletromicrografias dos biofilmes monoespécie de *T. rubrum* ATCC 28189 (a,b) e *S. epidermidis* ATCC 12228 (c,d) e biofilmes mistos de *T. rubrum* + *S. epidermidis* quando adicionados simultaneamente (0h) (e,f) e quando formado com a adição das suspensões de *S. epidermidis* após a pré-adesão do biofilme de *T. rubrum* (4h) (g,h). Todos os biofilmes foram analisados com um tempo total de 72h de incubação. As setas brancas indicam as estruturas na forma de cocos de *S. epidermidis*. Ampliação de 1000x (primeira linha) e 3000x (segunda linha).....70

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

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

Figura 13 - Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL) de *T. rubrum* isoladas em ágar Mycosel de biofilmes de dupla espécie entre *T. rubrum* + *S. aureus* (A) e *T. rubrum* + *S. epidermidis* (B) comparados com biofilme monoespécie de *T. rubrum* (controle). Todos os biofilmes formados nas diferentes condições propostas (0h, 4h, 24h e 48h) tiveram um tempo total de incubação de 72h. Significância estatística (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$) foi apontada.....76

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

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC – *American Type Culture Collection*

CP- Controle positivo

BHI – *Brain Heart Infusion*

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CLSM - Microscopia confocal de varredura a laser

CP- Controle positivo

h – Horas

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MHI - *Mueller-Hinton Broth*

NaCl – Cloreto de sódio

RPMI-1640 – *Roswell Park Memorial Institute*

UFC – Unidades formadoras de colônia

µg – Microgramas

µL – Microlitros

mL – mililitros

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

SUMÁRIO

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

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

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.1. DERMATÓFITOS

1.1.1 ASPECTOS HISTÓRICOS E TAXONÔMICOS

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

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

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

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

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

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

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

1.1.2 EPIDEMIOLOGIA E CLASSIFICAÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.1.3 PATOGENESE E CARACTERÍSTICAS DE VIRULÊNCIA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

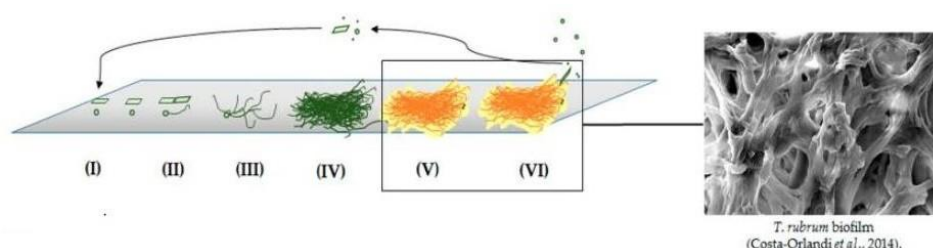
Na literatura, poucos estudos relacionam os dermatófitos e a formação de biofilmes. Esta habilidade foi descrita por Costa-Orlandi et al. (2014), que caracterizaram pela primeira vez a formação de biofilme *in vitro* por duas espécies de dermatófitos antropofílicos mais prevalentes no mundo, *T. rubrum*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

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

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

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

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



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

1.2 BACTÉRIAS DO GÊNERO *Staphylococcus*

1.2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS E TAXONÔMICOS

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

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

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

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

1.2.2 EPIDEMIOLOGIA E CLASSIFICAÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2.3 PATOGENESE E CARACTERISTICAS DE VIRULÊNCIA

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

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

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

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

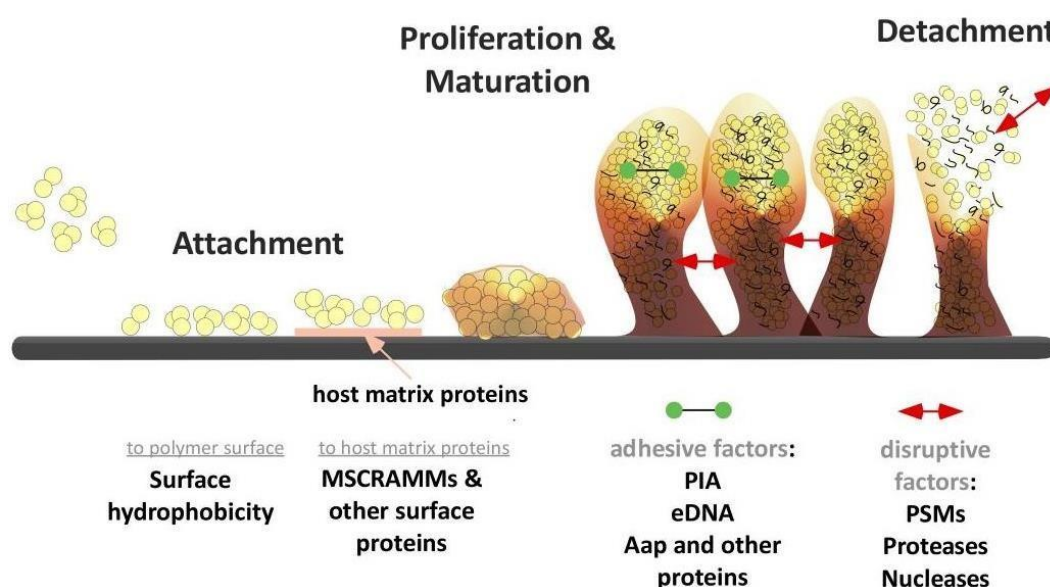
Muitas definições são usadas para biofilmes de *Staphylococcus* sp por diferentes autores. A maioria define como uma comunidade de colônias bacterianas aderidas umas às outras, à superfície do hospedeiro ou à uma superfície biótica ou abiótica, cercadas por substâncias de matriz exopolimérica, autoproduzida,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

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

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

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

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



Fonte: (OTTO, 2018).

1.3 BIOFILMES POLIMICROBIANOS

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

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

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

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

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

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

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

1.4 CÉLULAS PERSISTENTES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5. CONCLUSÃO

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

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

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHTERMAN, R. R.; WHITE, T. C. Dermatophyte virulence factors: identifying and analyzing genes that may contribute to chronic or acute skin infections. **International journal of microbiology**, v. 2012, 2012.
- AHMED, M. O.; BAPTISTE, K. E. Vancomycin-Resistant Enterococci: A Review of Antimicrobial Resistance Mechanisms and Perspectives of Human and Animal Health. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 5, p. 590–606, 2018.
- AJELLO, L. Natural history of the dermatophytes and related fungi. **Mycopathologia et Mycologia Applicata**, v. 53, n. 1–4, p. 93–110, 1974.
- AL-DHAHERI, R. S.; DOUGLAS, L. J. Absence of amphotericin B-tolerant persister cells in biofilms of some *Candida* species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 5, p. 1884–1887, 2008.
- ALEM, M. A. S. et al. Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 10, p. 1770–1779, 2006.
- ALJABRE, S. H. M. et al. Germination of trichophyton mentagrophytes on human stratum corneum in vitro. **Medical Mycology**, v. 30, n. 2, p. 145–152, 1992.
- ALONSO, B. et al. Comparison of the XTT and resazurin assays for quantification of the metabolic activity of *Staphylococcus aureus* biofilm. **Journal of Microbiological Methods**, v. 139, n. March, p. 135–137, 2017.
- ANDREWES, F. W.; GORDON, M. H. Report on the biological characters of the staphylococci pathogenic for man. **35th Annual Report of the Local Government Board**, Bd 1905-6. APP. B. H.M. Stationery Office, p. 543-60, 1907.
- ANJUM, A.; SIM, C. H.; NG, S. F. Hydrogels Containing Antibiofilm and Antimicrobial Agents Beneficial for Biofilm-Associated Wound Infection: Formulation Characterizations and In vitro Study. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 3, p. 1219–1230, 2018.
- APPELT, L. et al. Terbinafine-resistant dermatophytoses and onychomycosis due to *Trichophyton rubrum*. **Hautarzt**, v. 72, n. 10, p. 868-877, 2021.
- ARCHER, N. K. et al. *Staphylococcus aureus* biofilms: Properties, regulation and roles in human disease. **Virulence**, v. 2, n. 5, p. 445–459, 2011.

- ARENDRUP, M. C. et al. How to: perform antifungal susceptibility testing of microconidia-forming dermatophytes following the new reference EUCAST method E.Def 11.0, exemplified by *Trichophyton*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 27, n. 1, p. 55–60, 2021.
- ARGEMI, X. et al. Coagulase-negative staphylococci pathogenomics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 5, p. 1–19, 2019.
- ARVANITIS, M.; MYLONAKIS, E. Fungal-bacterial interactions and their relevance in health. **Cellular Microbiology**, v. 17, n. 10, p. 1442–1446, 2015.
- BALABAN, N. Q. et al. Bacterial persistence as a phenotypic switch. **Science**, v. 305, n. 5690, p. 1622–1625, 2004.
- BALABAN, N. Q. et al. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 7, p. 441–448, 2019.
- BALDO, A. et al. Mechanisms of skin adherence and invasion by dermatophytes. **Mycoses**, v. 55, n. 3, p. 218–223, 2012.
- BALDO, A. et al. Secreted subtilisin Sub3 from *Microsporum canis* is required for adherence to but not for invasion of the epidermis. **Br J Dermatol**, v. 162, p. 990–997, 2010.
- BECKER, K.; HEILMANN, C.; PETERS, G. Coagulase-negative staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 870–926, 2014.
- BERALDO, R.M.; GASPAROTO, A.K.; SIQUEIRA A.M.; DIAS A.L.T. Dermatophytes in household cats and dogs. **Rev. Bras. Ciênc. Vet**, v. 18, n. 2/3, p. 85–91, 2011.
- BHATIA, A.; KANISH, B.; BADYAL, DK.; KATE, P.; CHOUDHARY, S. Efficacy of oral terbinafine versus itraconazole in treatment of dermatophytic infection of skin - A prospective, randomized comparative study. **Indian J Pharmacol**, v. 51, n. 2, p. 116–119, 2019.
- BIGGER, J. W. Treatment of Staphylococcal Infections With Penicillin By Intermittent Sterilisation. **The Lancet**, v. 244, n. 6320, p. 497–500, 1944.
- BILA, N. M. et al. 2-Hydroxychalcone as a Potent Compound and Photosensitizer Against Dermatophyte Biofilms. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, n. May, p. 1–15, 2021.
- BILA, N.M. **Avaliação do efeito da 2-chalcona mediada pela terapia fotodinâmica nos biofilmes mono e dual-espécies de Candida spp. e dermatófitos e mecanismos de interação desses microrganismos no biofilme misto**, 2022. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- DALLA LANA, D. F.; BATISTA, B. G.; ALVES, S. H.; FUENTEFRIA, A. M. Dermatofitoses: agentes etiológicos, formas clínicas, terapêutica e novas perspectivas de tratamento. **Clin. Biomed. Res.**, v. 36, n. 4, p.230-241, 2016.
- DANIELLI, L. J. et. al. Biofilm formation by *Microsporum canis*. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 23, n. 12, p. 941-942, 2017.
- DAVISON, F. D.; MACKENZIE, D. W. R.; OWEN, R. J. Deoxyribonucleic Acid Base Compositions of Mycoplasma. **Journal of General Microbiology**, n. 118, p. 465–470, 1980.
- DE ALBUQUERQUE MARANHÃO, F.C.; OLIVEIRA-JÚNIOR, J. B.; DOS SANTOS ARAÚJO, M.A., SILVA, D.M.W. Mycoses in northeastern Brazil: Epidemiology and prevalence of fungal species in 8 years of retrospective analysis in Alagoas. **Braz. J. Microbiol**, v. 50, p. 969-978, 2019.
- DE BRUCKER, K. et al. Fungal β -1,3-Glucan Increases Ofloxacin Tolerance of Escherichia coli in a Polymicrobial E. coli/Candida albicans Biofilm. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 6, p. 3052–3058, 2015.
- DE CARVALHO DIAS, K. et al. Soluble factors from biofilm of Candida albicans and Staphylococcus aureus promote cell death and inflammatory response. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 1–9, 2017.
- DE GROOTE, V. N. et al. Novel persistence genes in Pseudomonas aeruginosa identified by high-throughput screening. **FEMS Microbiology Letters**, v. 297, n. 1, p. 73–79, 2009.
- DE HOOG, G. S. et al. Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 182, p. 5–31, 2017.
- DE OLIVEIRA PEREIRA, F. et al. The prevalence of dermatophytoses in Brazil: a systematic review. **J Med Microbiol**, v. 70, n. 3, 2021.
- DELARZE, E.; SANGLARD, D. Defining the frontiers between antifungal resistance, tolerance and the concept of persistence. **Drug Resistance Updates**, v. 23, p. 12–19, 2015.
- DIAS, M. F. R. G.; BERNARDES-FILHO, F.; QUARESMA-SANTOS, M. V. P.; AMORIM, A. G. F.; SCHECHTMAN, R. C.; AZULAY, D. R. Treatment of superficial mycoses: review - part II. **An. Bras. Dermatol.**, v. 88, n. 6, p. 937-944, 2013.
- DÍAZ, M. G.; SANABRIA, L. S.; AGUILAR, G.; ARAUJO, P.; PEREIRA, J.; PLANOS, J. F. Isolamento de *Microsporum canis* e *Microsporum gypseum* em gatos assintomáticos da área metropolitana de Assunção-Paraguai. **Rev. Nac.**, v. 9, n. 2, p. 12-19, 2017.

- DIEKEMA, D. J. et al. Twenty-year trends in antimicrobial susceptibilities among *Staphylococcus aureus* from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 6, n. Suppl 1, p. S47–S53, 2019.
- DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 881-890, 2002.
- DOS SANTOS, J. D. et al. Mixed biofilms formed by *C. albicans* and non-*albicans* species: a study of microbial interactions. **Brazilian Oral Research**, v. 30, n. 1, p. 1–8, 2016.
- DUEK, L. et al. The pathogenesis of dermatophyte infections in human skin sections. **Journal of Infection**, v. 48, n. 2, p. 175–180, 2004.
- EMMONS, C. W. Dermatophytes: Natural grouping based on the form of the spores and accessory organs. **Archives of Dermatology and Syphilology**, v. 30, n. 3, p. 337–362, 1934.
- ESQUENAZI, D. et al. The influence of surface carbohydrates during in vitro infection of mammalian cells by the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Research in Microbiology**, v. 155, n. 3, p. 144–153, 2004.
- EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. **Summary of the latest data on antibiotic resistance in the European Union**. Stockholm: ECDC, November, 2017. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AMR-surveillance-EARS-Net-2017.pdf>.
- FANNING, S.; MITCHELL, A. P. Fungal biofilms. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 4, p. 1–4, 2012.
- FAWAY, É.; CAMBIER, L.; MIGNON, B.; POUMAY, Y.; LAMBERT DE ROUVROIT, C. Modeling dermatophytosis in reconstructed human epidermis: A new tool to study infection mechanisms and to test antifungal agents. **Med Mycol.**, v. 55, n. 5, p.485-494, 2016.
- FELIX, L. O. et al. In Vitro and In Vivo Bactericidal and Antibiofilm Efficacy of Alpha Mangostin Against *Staphylococcus aureus* Persister Cells. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, n. July, p. 1–14, 2022.
- FERGUSON, L.; FULLER, L. C. Spectrum and burden of dermatophytes in children. **Journal of Infection**, v. 74, p. S54–S60, 2017.
- FINCH, J.; WARSHAW, E. Toenail onychomycosis : current. **Dermatologic Therapy**, v. 20, n. 16, p. 31–46, 2007.

- FISHER, R. A.; GOLLAN, B.; HELAINE, S. Persistent bacterial infections and persister cells. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 8, p. 453–464, 2017.
- FÖRSTER, T. M. et al. Enemies and brothers in arms: *Candida albicans* and gram-positive bacteria. **Cellular Microbiology**, v. 18, n. 12, p. 1709–1715, 2016.
- FRAIHA, R. O.; PEREIRA, A. P. R.; BRITO, E. C. A.; BORGES, C. L.; PARENTE, A. F. A.; PERDOMO, R. T. et al. Stress conditions in the host induce persister cells and influence biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* RP62A. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 52, p. e20180001, 2019.
- FREDHEIM, E. G. A. et al. Biofilm formation by *Staphylococcus haemolyticus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 1172–1180, 2009.
- FRIEDRICH, M. Inflammatory tinea pedis with bacterial superinfection effectively treated with isoconazole nitrate and diflucortolone valerate combination therapy. **Mycoses**, v. 56, n. Suppl. 1, p. 23–25, 2013.
- GABRILSKA, R. A.; RUMBAUGH, K. P. Biofilm models of polymicrobial infection. **Future Microbiology**, v. 10, n. 12, p. 1997–2015, 2015.
- GALDIERO, E. et al. Eradication of *Candida albicans* persister cell biofilm by the membranotropic peptide gH625. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2020.
- GALLIS, H. A.; DREW, R. H.; PICKARD, W. W. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. **Rev. Infect. Dis**, v. 12, p. 308-329, 1990.
- GALLO, R. L. Human skin is the largest epithelial surface for interaction with microbes. **The journal of investigative dermatology**, v. 137, n. 6, p. 1213–1214, 2017.
- GARCIA, L. M. et al. A Two-Way Road: Antagonistic Interaction Between Dual-Species Biofilms Formed by *Candida albicans*/*Candida parapsilosis* and *Trichophyton rubrum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, Artigo 1980, p. 1-5, September 4, 2020.
- GEORG, L. K. Epidemiology of the dermatophytoses: sources of infection, modes of transmission and epidemicity. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 89, p. 69– 77, 1960.
- GHANNOUM, M.A.; MUKHERJEE, P.K.; WARSHAW, E.M.; EVANS, S.; KORMAN, N.J.; TAVAKKOL, A. Molecular analysis of dermatophytes suggests spread of infection among household members. **Cútis.**, v. 91, p. 237-245, 2013.

- GNAT, S.; LAGOWSKI, D.; NOWAKIEWICZ, A.; DYLAG, M. A global view on fungal infections in humans and animals: infections caused by dimorphic fungi and dermatophytoses. **J Appl Microbiol**, v. 131, n. 16, p. 2688-2704, 2021.
- GONÇALVES, L. N. C. et al. Biofilm Formation by *Histoplasma capsulatum* in Different Culture Media and Oxygen Atmospheres. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. July, p. 1–12, 2020.
- GOULD D, CHAMBERLAINE, A. *Staphylococcus aureus*: a review of the literature. **J Clin Nurs**, n. 4, p. 5–12, 1995.
- GRANILLO, A. R. et al. Antibiosis interaction of *Staphylococcus aureus* on *Aspergillus fumigatus* assessed *in vitro* by mixed biofilm formation. **BMC Microbiology**, v. 15, p. 33, 2015.
- GRIGORYAN, K. V. et al. Pediatric tinea capitis caused by *Trichophyton violaceum* and *Trichophyton soudanense* in Rochester, Minnesota, United States. **International Journal of Dermatology**, v. 58, n. 8, p. 912–915, 2019.
- GRUBY, D. Mémoire sur une végétation qui constitue la vraie teigne. **C R Acad Sci**, v. 13, p. 72–5, 1841.
- GULATI, M.; LOHSE, M.B.; ENNIS, C.L.; GONZALEZ, R.E.; PERRY, A.M.; BAPAT, P. et al. In vitro culturing and screening of *Candida albicans* biofilms. **Curr. Protoc. Microbiol.**, v. 50, n.1, p. e60, 2018.
- GUPTA, A. K.; COOPER, E. A. Update in antifungal therapy of dermatophytosis. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5–6, p. 353–367, 2008.
- GUPTA, A. K.; DAIGLE, D.; CARVIEL, J. L. The role of biofilms in onychomycosis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 74, n. 6, p. 1241–1246, 2016.
- GUPTA, A. K.; FOLEY, K. A.; VERSTEEG, S. G. New Antifungal Agents and New Formulations Against Dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 182, n. 1-2, 127–141, 2017 a.
- GUPTA, A. K.; SAUDER, D. N.; SHEAR, N. H. Antifungal agents: An overview. Part II. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 30, n. 6, p. 911–933, 1994.
- GUPTA, A. K.; STEC, N. Emerging drugs for the treatment of onychomycosis. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 24, n. 4, p. 213–220, 2019.

- GUPTA, A. K.; VERSTEEG, S. G.; SHEAR, N. H. Onychomycosis in the 21st century: An update on diagnosis, epidemiology, and treatment. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 21, n. 6, p. 525–539, 2017 b.
- HARDING, M. W. et al. Can filamentous fungi form biofilms? **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 11, p. 475–480, 2009.
- HAVLICKOVA, B.; CZAİKA, V. A.; FRIEDRICH, M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide (Mycoses (2008) 51, SUPPL. 4, (2-15)). **Mycoses**, v. 52, n. 1, p. 95, 2009.
- HAY, R. et al. Skin Diseases. In: JAMISON, D.T; BREMAN, J. G; MEASHAM, A.R, et al. (Editor). **Disease Control Priorities in Developing Countries**. 2nd ed. Oxford: University Press, 2006. Chapter 37, p. 707–722. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11728/>.
- HEIDRICH, D. et al. Dermatophytosis: A 16-year retrospective study in a metropolitan area in southern Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 8, p. 865–871, 2015.
- HIRUMA, J. et al. Terbinafine-resistant strain of Trichophyton interdigitale strain isolated from a tinea pedis patient. **J Dermatol**, v. 46, n. 4. p. 351-353, 2019.
- HO, F. K. H.; DELGADO-CHARRO, M. B.; BOLHUIS, A. Evaluation of an Explanted Porcine Skin Model to Investigate Infection with the Dermatophyte Trichophyton rubrum. **Mycopathologia**, v. 185, n. 2, p. 233–243, 2020.
- HORNBY, J. M. et al. Quorum Sensing in the Dimorphic Fungus Candida albicans Is Mediated by Farnesol. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 2982–2992, 2001.
- INTRA, J. et al. In Vitro Activity of Antifungal Drugs Against Trichophyton rubrum and Trichophyton mentagrophytes spp. by E-Test Method and Non-supplemented Mueller–Hinton Agar Plates. **Mycopathologia**, v. 184, n. 4, p. 517–523, 2019.
- IVASKIENE M.; MATUSEVICIUS, A. P.; GRIGONIS, A.; ZAMOKAS, G.; BABICKAITE, L. Efficacy of topical therapy with newly developed terbinafine and econazole formulations in the treatment of dermatophytosis in cats. **Pol. J. Vet. Sci.**, v. 19, n. 3, p. 535–543, 2016.
- JÖERS, A.; KALDALU, N.; TENSON, T. The frequency of persisters in Escherichia coli reflects the kinetics of awakening from dormancy. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 13, p. 3379–3384, 2010.
- KART, D. et al. Activity of disinfectants against multispecies biofilms formed by Staphylococcus aureus, Candida albicans and Pseudomonas aeruginosa. **Biofouling**, v. 30, n. 3, p. 377–383, 2014.

- KASPEROVA, A.; KUNERT, J.; RASKA, M. The possible role of dermatophyte cysteine dioxygenase in keratin degradation. **Med Mycol**, v. 51, p. 449–54, 2013.
- KAUFMAN, G. et al. Infection stages of the dermatophyte pathogen *Trichophyton*: Microscopic characterization and proteolytic enzymes. **Medical Mycology**, v. 45, n. 2, p. 149–155, 2007.
- KEREN, I. et al. Characterization and transcriptome analysis of mycobacterium tuberculosis persisters. **mBio**, v. 2, n. 3, p. 3–12, 2011.
- KO, J. Y. et al. Cure rate, duration required for complete cure and recurrence rate of onychomycosis according to clinical factors in Korean patients. **Mycoses**, v. 54, n. 5, p. 384–388, 2011.
- KONEMAN, E. et al. **Diagnóstico microbiológico**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap. 11, parte 1.
- KONG, E. F. et al. Commensal Protection of *Staphylococcus aureus* against Antimicrobials by *Candida albicans* Biofilm Matrix. **American Society for Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 1–12, 2016.
- KONG, E. F.; TSUI, C.; KUCHARÍKOVÁ, S. Modulation of *Staphylococcus aureus* *Candida albicans* Quorum Sensing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 12, p. 1–14, 2017.
- KOSECKA-STROJEK, M. et al. Development and Validation of a Reference Data Set for Assigning *Staphylococcus* Species Based on Next-Generation Sequencing of the 16S-23S rRNA Region. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. August, p. 1–19, 2019.
- KUCHARÍKOVÁ, S. et al. Detailed comparison of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms under different conditions and their susceptibility to caspofungin and anidulafungin. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 9, p. 1261–1269, 2011.
- KULSHRESTHA, A.; GUPTA, P. Polymicrobial interaction in biofilm: mechanistic insights. **Pathogens and Disease**, v. 80, n. 1, ftac010, 2022. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftac010>.
- LAFLEUR, M. D.; KUMAMOTO, C. A.; LEWIS, K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 11, p. 3839–3846, 2006.
- LAKHUNDI, S.; ZHANG, K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. **Clinical microbiology reviews**, v. 31, n. 4, p. 1–103, 2018.

- LAMERS, R. P.; MUTHUKRISHNAN, G.; CASTOE, T. A. et al. Phylogenetic relationships among *Staphylococcus* species and refinement of cluster groups based on multilocus data. **BMC Evol Biol**, v. 12, p. 171, 2012.
- LARRUSKAIN, J.; PIÑEIRO, L.; IDIGORAS, P.; PÉREZ-TRALLERO, [Dermatophytosis with concurrent lesions in distant locations. Prognostic and therapeutic significance]. **Enferm Infecc Microbiol Clin**. v. 23, n. 4, p.191-3, 2005.
- LE, K. Y. et al. Role of Phenol-Soluble Modulins in *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Formation and Infection of Indwelling Medical Devices. **Journal of Molecular Biology**, v. 431, n. 16, p. 3015–3027, 2019.
- LEWIS, K. Persister cells and the riddle of biofilm survival. **Biochemistry** (Moscow), v. 70, n. 2, p. 267-274, 2005.
- LEWIS, K. Persister cells. **Annual Review of Microbiology**, v. 64, p. 357–372, 2010.
- LEWIS, P. O. et al. Treatment strategies for persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 43, n. 5, p. 614-625, 2018.
- LI, P. et al. Delicate metabolic control and coordinated stress response critically determine antifungal tolerance of *Candida albicans* biofilm persisters. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 6101–6112, 2015.
- LIPNER, S. R.; SCHER, R. K. Onychomycosis: Treatment and prevention of recurrence. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 80, n. 4, p. 853–867, 2019.
- LISOWSKA-ŁYSIAK, K. et al. Epidemiology and pathogenesis of staphylococcus bloodstream infections in humans: A review. **Polish Journal of Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 13–23, 2021.
- LISTER, J. L.; HORSWILL, A. R. *Staphylococcus aureus* biofilms: Recent developments in biofilm dispersal. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, n. DEC, p. 1–9, 2014.
- LIU, X. et al. Characterization of Skin Microbiome in Tinea Pedis. **Indian Journal of Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 422–427, 2019.
- LOWY, F. *Staphylococcus aureus* infections. **New England Journal of Medicine**, v. 339, p. 520–532, 1998.
- MARAKI, S.; MAVROMANOLAKI, V. E. Epidemiology of dermatophytoses in crete, greece: A 5-year survey. **Medical Mycology Journal**, v. 57, n. 4, p. E69–E75, 2016.

- MARCOS-ZAMBRANO, L.J.; ESCRIBANO, P.; BOUZA, E.; GUINEA, J. Production of biofilm by *Candida* and non-*Candida* spp. Isolates causing fungemia: comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 304, p. 1192-1198, 2014.
- MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbon source and reduces fungal cell susceptibility to heat, cold, and UV light. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 14, p. 4592–4601, 2007.
- MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERES, N. T. A.; ROSSI, A. Pathogenesis of Dermatophytosis : Sensing the Host Tissue. **Mycopathologia**, v. 182, n. 1, p. 215–227, 2017.
- MCCAIG, L. F. et al. *Staphylococcus aureus*-associated skin and soft tissue infections in ambulatory care. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 11, p. 1715–1723, 2006.
- MCCLELLAN, KJ.; WISEMAN, LR.; MARKHAM, A. Terbinafine. An update of its use in superficial mycoses. **Drugs**. v. 58, n. 1, p. 179-202, 1999.
- MENDEZ-TOVAR, L. J. Pathogenesis of dermatophytosis and tinea versicolor. **Clinics in Dermatology**, v. 28, n. 2, p. 185–189, 2010.
- MICHIELS, J. E. et al. Molecular mechanisms and clinical implications of bacterial persistence. **Drug Resistance Updates**, v. 29, p. 76–89, 2016.
- MITCHELL, KAITCHELL, F.; ZARNOWSKI, R.; ANDES, D. R. The Extracellular Matrix of Fungal Biofilms. **Adv Exp. Medicine, Biology-Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health**, v. 931, p. 21–35, 2016.
- MOCHIZUKI, T. et al. Minipreparation of total cellular DNA is useful as an alternative molecular marker of mitochondrial DNA for the identification of *Trichophyton mentagrophytes* and *T. rubrum*. **Mycoses**, v. 39, p. 31–35, 1996.
- MONOD, M. et al. Aminopeptidases and dipeptidyl-peptidases secreted by the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Microbiology**, v. 15, p. 145-155, 2005.
- MOORMEIER, D. E. et al. Temporal and stochastic control of *staphylococcus aureus* biofilm development. **mBio**, v. 5, n. 5, p. 1–12, 2014.
- MORIELLO, K. A. Treatment of dermatophytosis in dogs and cats: an update. **Veterinary Dermatology**, v. 52, n. 15, p. 99–107, 2004.

- NAMVAR, A. E. et al. Clinical characteristics of *Staphylococcus epidermidis*: a systematic review. **GMS hygiene and infection control**, v. 9, n. 3, p. Doc23, 2014.
- NEWSOM, S. W. B. Ogston's coccus. **Journal of Hospital Infection**, v. 70, n. 4, p. 369–372, 2008.
- NOVICK, R. P.; GEISINGER, E. Quorum sensing in staphylococci. **Annual Review of Genetics**, v. 42, p. 541–564, September, 2008.
- OGSTON, A. Report upon micro-organisms in surgical diseases. **British Medical Journal**, v. 1, n. 1054, p. 369–377, 1881.
- OLIVEIRA, D.; BORGES, A.; SIMÕES, M. *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases. **Toxins**, v. 10, n. 6, 256, 2018. <https://doi.org/10.3390/toxins10060252>.
- OTTO, M. Staphylococcal biofilms. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 4, p. 139–148, 2018.
- OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* - The “accidental” pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v.7, n. 8, p. 555–567, 2009. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2182>.
- PADDER, S. A.; PRASAD, R.; SHAH, A. H. Quorum sensing: A less known mode of communication among fungi. **Microbiological Research**, v. 210, n. February, p. 51–58, 2018.
- PAHARIK, A. E.; HORSWILL, A. R. The staphylococcal biofilm: Adhesins, regulation, and host response. **Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens**, v. 4, n. 2, p. 529–566, 2016.
- PARTE, A. C. LPSN - List of prokaryotic names with standing in nomenclature (Bacterio.net), 20 years on. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 1825–1829, 2018.
- PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 72, n. 2, p. 157–165, 2008.
- PERCIVAL, S. L. et al. Microbiology of the skin and the role of biofilms in infection. **International Wound Journal**, v. 9, n. 1, p. 14–32, 2012.
- PEREIRA, F. D. O. A review of recent research on antifungal agents against dermatophyte biofilms. **Medical Mycology**, v. 59, n. 4, p. 313–326, 2021.
- PETERS, B. M. et al. Efficacy of ethanol against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* polymicrobial biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 74–82, 2013.

- PETERS, B. M. et al. Staphylococcus aureus adherence to Candida albicans hyphae is mediated by the hyphal adhesin Als3p. **Microbiology** (United Kingdom), v. 158, n. 12, p. 2975–2986, 2012.
- PETERS, B. M.; NOVERRA, M. C. Candida albicans-staphylococcus aureus polymicrobial peritonitis modulates host innate immunity. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 6, p. 2178–2189, 2013.
- PETRANYUK, A. et al. Factors influencing epidemiology of dermatomycoses at Gdansk, Poland and Grodno, Belarus. **Advances in Dermatology and Allergology**, v. 39, n. 4, p. 788–792, 2022.
- PETRUCCELLI, M. F. et al. Epidemiology and Diagnostic Perspectives of Dermatophytoses. **J Fungi** (Basel), v. 6, n. 4, p. 310, 2020.
- PIERCE, C. G. et al. A simple and reproducible 96 well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nat Protoc**, v. 3, n. 9, p. 1494–1500, 2008.
- PINTO, E. et al. Evaluation of Etest Performed in Mueller–Hinton Agar Supplemented with Glucose for Antifungal Susceptibility Testing of Clinical Isolates of Filamentous Fungi. **Mycopathologia**, v. 177, n. 3–4, p. 157–166, 2014.
- PIRES, C. A. A. et al. Clinical, epidemiological, and therapeutic profile of dermatophytosis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 2, p. 259–264, 2014.
- RADZIKOWSKI, J. L.; SCHRAMEKE, H.; HEINEMANN, M. Bacterial persistence from a system-level perspective. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 46, p. 98–105, 2017.
- RAMAGE, G. et al. Candida Biofilms- an Update.pdf. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 4, p. 633–638, 2005.
- RAMAGE, G. et al. Fungal biofilm resistance. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, 528521, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/528521>.
- RAMAGE, G. et al. Ramage 2002 - CA BF Farnesol-time dependent effect.pdf. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 11, p. 5459–5463, 2002.
- RAMAGE, G.; MOWAT, E.; JONES, B.; WILLIAMS, C.; LOPEZ-RIBOT, J. Current understanding of fungal biofilms. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 35, p. 340–355, 2009.
- RASHID, A.; SCOTT, E.; RICHARDSON, M. D. Early events in the invasion of the human nail plate by Trichophyton mentagrophytes. **British Journal of Dermatology**, v. 133, n. 6, p. 932–940, 1995.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- SALGUEIRO, V. C. et al. High rate of neonates colonized by methicillin-resistant *Staphylococcus* species in an Intensive Care Unit. **Journal of infection in developing countries**, v. 13, n. 9, p. 810–816, 2019.
- SANGUINO, T. C.; JARROS, I. C; NEGRI, M. Ocorrência de dermatofitoses em pacientes do *Sistema Único de Saúde*. *An. Bras. Dermatol.*, v. 94, n.3, p.293-297, 2019.
- SARDANA, K.; GUPTA, A.; MATHACHAN, S.R. Immunopathogenesis of Dermatophytoses and Factors Leading to Recalcitrant Infections. **Indian Dermatol Online J**, v. 12, n. 3, p. 389-399, 2021.
- SCHER, R. K.; BARAN, R. Onychomycosis in clinical practice: Factors contributing to recurrence. **British Journal of Dermatology, Supplement**, v. 149, n. 65, p. 5–9, 2003.
- SCHILCHER, K.; HORSWILL, A. R. Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 84, n. 3, p. 1–36, 2020.
- SEGAL, E.; FRENKEL, M. Dermatophyte infections in environmental contexts. **Research in Microbiology**, v. 166, n. 7, p. 564–569, 2015.
- SEN, S. et al. Rhamnolipid exhibits anti-biofilm activity against the dermatophytic fungi *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. **Biotechnology Reports**, v. 27, p. e00516, 2020.
- SERRANO-FUJARTE, I.; LÓPEZ-ROMERO, E.; REYNA-LÓPEZ, G.E.; MARTÍNEZ-GÁMEZ, M.A.; VEGA-GONZÁLEZ, A.; CUÉLLAR-CRUZ, M. Influence of culture media on biofilm formation by *Candida* species and response of sessile cells to antifungals and oxidative stress. **Biomed Res Int.**, v. 2015, p. 783639, 2015.
- SHAPIRO, J. A.; NGUYEN, V. L.; CHAMBERLAIN, N. R. Evidence for persisters in *Staphylococcus epidermidis* RP62a planktonic cultures and biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 7, p. 950–960, 2011.
- SHARMA, A.; CHANDRA, S.; SHARMA, M. Difference in keratinase activity of dermatophytes at different environmental conditions is an attribute of adaptation to parasitism. **Mycoses**, v. 55, p. 410–5, 2012.
- SHEINBERG, G.; ROMERO, C.; HEREDIA, R.; CASAS, D.; GALICIA, E. Dermatophytes from a zoonotic point of view. **Int. J. Curr. Adv. Res**, v. 6, n. 1, p.1856-1861, 2017.
- SHIMOYAMA, H. SEI, Y. 2016 Epidemiological Survey of Dermatomycoses in Japan. **Med Mycol J**, v. 60, n. 3, p. 75-82, 2019.

- SHIRAKI, Y. *et al.* Cytokine secretion profiles of human keratinocytes during *Trichophyton tonsurans* and *Arthroderma benhamiae* infections. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 9, p. 1175–1185, 2006.
- SIGURGEIRSSON, B. *et al.* L.I.ON. Study: Efficacy and tolerability of continuous terbinafine (Lamisil®) compared to intermittent itraconazole in the treatment of toenail onychomycosis. **British Journal of Dermatology, Supplement**, v. 141, n. 56, p. 5–14, 1999.
- SILVA-ROCHA, W. P. *et al.* Epidemiology and fungal species distribution of superficial mycoses in Northeast Brazil. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 27, n. 1, p. 57–64, 2017.
- SINGH, A. *et al.* High terbinafine resistance in *Trichophyton interdigitale* isolates in Delhi, India harbouring mutations in the squalene epoxidase gene. **Mycoses**, v. 61, n. 7, p. 477–484, 2018.
- SINGH, R. *et al.* Role of persisters and small-colony variants in antibiotic resistance of planktonic and biofilm-associated *Staphylococcus aureus*: An in vitro study. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 8, p. 1067–1073, 2009.
- SITEPU, E. H.; MUIS, K.; PUTRA, I. B. Dermatophytes and bacterial superinfectives in tinea pedis patients at Haji Adam Malik Central Hospital, Medan-Indonesia. **Bali Medical Journal**, v. 7, n. 2, p. 452–456, 2018.
- STEWART, P. S. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 292, n. 2, p. 107–113, 2002.
- SUTIPORNPALANGKUL, W.; NISHITANI, K.; SCHWARZ, E. M. Quantitative flow chamber system for evaluating in vitro biofilms and the kinetics of *S. aureus* biofilm formation in human plasma media. **BMC Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 1–12, 2021.
- TAGHIPOUR, S. *et al.* Diversity of geophilic dermatophytes species in the soils of iran; the significant preponderance of *nannizzia fulva*. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 5, p. 1–10, 2021.
- TAN, Y.; LEONHARD, M.; SCHNEIDER-STICKLER, B. Evaluation of culture conditions for mixed biofilm formation with clinically isolated non-albicans *Candida* species and *Staphylococcus epidermidis* on silicone. **Microbial Pathogenesis**, v. 112, n. October, p. 215–220, 2017.
- TEXERA, N.; PERES, D. A.; ROSSI, A. Dermatofitos: Interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. **An. Bras. Dermatol**, v. 85, p. 657-667, 2010.

- THEIN, Z. M. et al. Community lifestyle of *Candida* in mixed biofilms: A mini review. **Mycoses**, v. 52, n. 6, p. 467–475, 2009.
- TONG, S. Y. C. et al. *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 603–661, 2015.
- TORRES, M. E.L.M.; HERCULANO, P. N.; LIMA, M.L.F.; SOARES, P. T.; SIQUEIRA, A.B.S.; SOUZA-MOTTA, C. M. et al. Isolamento e perfil enzimático de cães e gatos com dermatofitose atendidos em hospitais veterinários do Recife, Pernambuco. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 38, n. 5, p. 930-934, 2018.
- TURNER, N. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. **Nat Rev Microbiol**, v. 17, n. 4, p. 203–218, 2019.
- VANDECANDELAERE, I.; VAN ACKER, H.; COENYE, T. A microplate-based system as in vitro model of biofilm growth and quantification. **Methods in Molecular Biology**, v. 1333, p. 53–66, 2016.
- VEASEY, J. V. et al. Epidemiological profile of tinea capitis in São Paulo City. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 92, n. 2, p. 283–284, 2017.
- VERMOUT, S. et al. Pathogenesis of dermatophytosis. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5–6, p. 267–275, 2008.
- VILA, T. V. M.; ROZENTAL, S. Biofilm Formation as a Pathogenicity Factor of Medically Important Fungi. **Fungal Pathogenicity**, p. 1–24, 2016.
- VUONG, C. et al. Increased colonization of indwelling medical devices by quorum-sensing mutants of *Staphylococcus epidermidis* in vivo. **Journal of Infectious Diseases**, v. 190, n. 8, p. 1498–1505, 2004.
- WEITZMAN I; SUMMERBELL, R. The Dermatophytes. **Clinical Microbiology Reviews.**, v. 8, n. 2, p. 240–259, 1995.
- WERTHEIM, H. F. L. et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. **Lancet Infectious Diseases**, v. 5, n. 12, p. 751–762, 2005.
- WIJESINGHE, G. DILHARI, A. GAYANI, B. KOTTEGODA, N. et al., Influence of Laboratory Culture Media on in vitro Growth, Adhesion, and Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. **Med Princ Pract**, v. 28, n. 1, p. 28-35, 2019.

- WIJESINGHE, G. et al. Influence of Laboratory Culture Media on in vitro Growth, Adhesion, and Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. **Medical Principles and Practice**, v. 28, n. 1, p. 28–35, 2019.
- WONGSUK, T.; PUMEESEAT, P.; LUPLERTLOP, N. Fungal quorum sensing molecules: Role in fungal morphogenesis and pathogenicity. **Journal of Basic Microbiology**, v. 56, n. 5, p. 440–447, 2016.
- WOOD, T. K.; KNABEL, S. J.; KWAN, B. W. Bacterial persister cell formation and dormancy. **Appl Environ Microbiol**, v. 79, n. 23, p. 7116–21, 2013.
- WUYTS, J.; VAN DIJCK, P.; HOLTAPPELS, M. Fungal persister cells: The basis for recalcitrant infections? **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 10, p. 1–14, 2018.
- XU, H. et al. Streptococcal co-infection augments candida pathogenicity by amplifying the mucosal inflammatory response. **Cellular Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 214–231, 2014.
- XU, K. et al. Activity of coumarin against *Candida albicans* biofilms. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 29, n. 1, p. 28–34, 2018. doi: 10.1016/j.mycmed.2018.12.003.
- XU, Z. et al. Crystal Violet and XTT Assays on *Staphylococcus aureus* Biofilm Quantification. **Current Microbiology**, v. 73, n. 4, p. 474–482, 2016.
- YADAV, M. K. et al. In vitro multi-species biofilms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* and their host interaction during in vivo colonization of an otitis media rat model. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. Apr, p. 1–21, 2017.
- YANG, S.; HAY, I.; CAMERON, D. et al. Antibiotic regimen based on population analysis of residing persister cells eradicates *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Sci. Rep.**, v. 5, p. 18578, 2016.
- YAO, Y.; STURDEVANT, D. E.; OTTO, M. Genomewide analysis of gene expression in *Staphylococcus epidermidis* biofilms: Insights into the pathophysiology of *S. epidermidis* biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilms. **Journal of Infectious Diseases**, v. 191, n. 2, p. 289–298, 2005.
- YENİŞEHİRLİ, G. et al. In vitro activities of antifungal drugs against dermatophytes isolated in Tokat, Turkey. **International Journal of Dermatology**, v. 52, n. 12, p. 1557–1560, 2013.
- ZERAIK, A. E.; NITSCHKE, M. Influence of Growth Media and Temperature on Bacterial Adhesion to Polystyrene Surfaces. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v. 55, n. 4, p. 569–576, july-August, 2012.

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

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

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

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