



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**  
**PROGRAMA DE MICROBIOLOGIA MÉDICA**

**EDMILSON EMANUEL MONTEIRO CORREIA**

**BIOFILME DE DERMATÓFITOS *IN VITRO* E *EX VIVO*:**  
**FORMAÇÃO, ARQUITETURA E SENSIBILIDADE**

**FORTALEZA-CEARÁ**

**2016**

EDMILSON EMANUEL MONTEIRO CORREIA

**BIOFILME DE DERMATÓFITOS *IN VITRO* E *EX VIVO*:  
FORMAÇÃO, ARQUITETURA E SENSIBILIDADE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica Humana e Animal, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Área de concentração: Ciências Biológicas III

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante.

Co-orientador: Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim – UFC

FORTALEZA-CEARÁ

2016

EDMILSON EMANUEL MONTEIRO CORREIA

**BIOFILME DE DERMATÓFITOS *IN VITRO* E *EX VIVO*:  
FORMAÇÃO, ARQUITETURA E SENSIBILIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Microbiologia Médica.

Área de concentração: Ciências Biológicas  
III

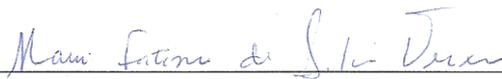
Aprovada em: 01/12/2016.

BANCA EXAMINADORA



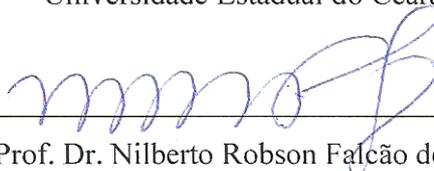
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Fátima da Silva Teixeira

Universidade Estadual do Ceará (UECE)



Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento

Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

C847b Correia, Edmilson Emanuel Monteiro.  
Biofilme de dermatófitos in vitro e ex vivo: formação, arquitetura e sensibilidade / Edmilson Emanuel Monteiro Correia. – 2016.  
87 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2016.  
Orientação: Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante.  
Coorientação: Profa. Dra. José Júlio Costa Sidrim.

1. Dermatófitos. 2. Biofilmes. 3. Sensibilidade. 4. In vitro. 5. Ex vivo. I. Título.

CDD 616.9

---

## DEDICATÓRIA

Ao Deus trino, criador de todas as coisas, visíveis e  
invisíveis, em quem encontro força.

À minha mãe Paula, por ter sido, a minha melhor professora e  
por ter sacrificado os seus sonhos para que os meus se tornassem  
realidade.

Aos meus amados irmãos de sangue e de fé, por confiarem sempre em mim.

Aos meus professores...

“Ser professor é professar a fé  
e a certeza de que tudo terá valido a pena  
se o aluno se sentir feliz pelo que aprendeu  
com você e pelo que ele lhe ensinou...

Ser professor é consumir horas e horas  
pensando em cada detalhe daquela aula,  
que mesmo ocorrendo todos os dias,  
é sempre única e original...

Ser professor é entrar cansado numa  
sala de aula e, diante da reação da turma,  
transformar o cansaço numa aventura  
maravilhosa de ensinar e aprender...

Ser professor é importar-se com o outro  
numa dimensão de quem cultiva  
uma planta muito rara que necessita  
de atenção, amor e cuidado.

Ser professor é ter a capacidade de  
sair de cena, sem sair do espetáculo.

Ser professor é apontar caminhos,  
Mas deixar que o aluno caminhe  
com seus próprios pés...”

(Autor desconhecido)

Tudo isso terá senso somente se o professor não ignorar o fato de ele ser um eterno aluno.

## AGRADECIMENTOS

Saber reconhecer as ações boas que alguém faz por nós é a pura essência da gratidão. A tradição me obriga a entrar no difícil exercício dos agradecimentos. Na verdade, não vejo dificuldades em expressar a minha gratidão às pessoas nas quais encontrei apoio/auxílio, pessoas que fizeram de tudo para que eu me sentisse “*like home*”, mesmo estando longe de casa. Se calhar, a minha dificuldade está relacionada ao fato de não querer esquecer ninguém, ou à sensação de estar deixando para trás uma outra “família”. Por isso, agradeço de forma espontânea a todos aqueles cujo nome não aparece nestas páginas e que, de uma forma ou de outra, nelas se reconheçam.

Há algum tempo imerso num mar de dúvidas, resolvi deixar de lado por um tempo a minha atuação profissional como farmacêutico e passar mais um período na universidade, desta feita para obter o título de mestre em Microbiologia Médica. Admito que foi uma caminhada difícil, no qual errei e aprendi a ser humilde para corrigir os erros e provar ter a “capacidade” requerida para trilhar essa caminhada. Agradeço a todos que permitiram a minha aceitação, e que de um modo ou outro me mostraram que o conhecimento pode não ter limites para aqueles que buscam conhecer sempre mais. Com certeza sem vocês o caminho teria sido bem diferente. Muito obrigado!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ, pelo apoio financeiro.

De modo especial, à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, a quem serei eternamente grato pela oportunidade que me deu, por me integrar no seu grupo de pesquisa sob sua orientação, pela confiança que em mim depositou desde o início, apoio incondicional que muito elevou os meus conhecimentos científicos, por ter transmitido seu vasto conhecimento com humildade e paciência, incentivos constantes, sentido de responsabilidade que me incutiu em todas as fases do projeto, amizade, e sobretudo pelo carinho e admiração que eu adquiri por ela ao longo desse período aqui.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Débora Castelo Branco pelo constante apoio na execução deste trabalho, ensinamento, amabilidade, disponibilidade, e pelo incentivo à continuação da minha formação científica.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rossana Cordeiro pelo incentivo, pelas críticas construtivas, e por despertar com seus ensinamentos, meu interesse pela microbiologia, por se esforçar para tirar o melhor de cada um.

Ao Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha, pela amabilidade, pela preocupação constante com o meu bem-estar e realização do meu projeto, por sua paciência, por sua imensa dedicação e orientação na correção dos artigos científicos.

Ao Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim, pela oportunidade de trabalhar no Centro Especializado em Micologia Médica, pelos valores morais e de ética na pesquisa transmitidos, de forma despercebida, pela co-orientação, e por ter me instigado sempre a obter o máximo de conhecimento que eu poder.

Ao Dr. Lucas Pereira de Alencar e à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Francisca Jakelyne de Farias Marques, por terem aceite o convite para fazerem parte da banca de qualificação, pelos ajustes, ideias e correções que permitiram melhorar de forma considerável a apresentação desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento e à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Fátima da Silva Teixeira, por terem aceite o convite para fazerem parte da banca de defesa do mestrado, pelas considerações e correções que não de fazer, de forma a melhorar a qualidade do trabalho apresentado.

Aos diversos professores do programa que, ao longo dessa rica formação, com os seus respectivos “*savoir-faire*”, me permitiram evoluir, amar e almejar retribuir um dia, ensinando à disciplina aos outros.

À secretária do programa de pós-graduação em Microbiologia Médica, Carol Soares, pelo carinho, pela amizade e pronta disponibilidade em me ajudar sempre que eu precisasse.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica (PPGMM), da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará.

Ao laboratório da Central Analítica da UFC no campus do Pici pela ajuda na construção das imagens utilizadas nesse trabalho.

À técnica do laboratório Terezinha de Jesus Rodrigues, pelo carinho, pelos ensinamentos preciosos na rotina, por me lembrar a minha “*african queen*”.

Aos colegas do CEMM (Glautemberg, Ewerton, Felipe, Lucilene, Vandberg, Jaime, Lívia, Kleybson, Gleiciane, Lucas Pereira, Silviane, Giovana, David, Jamile, Lana, Chryster, Fábio, Yago, Thalita, Patrícia, Raquel, Ana luiza, Géssica...) pela amizade sincera e coleguismo, pelo aprendizado, pelos momentos de descontração e companheirismo durante essa caminhada. Sempre se fizeram presentes nos momentos em que eu precisava e não mediram esforços para me ajudar na conclusão do meu mestrado. Por serem pessoas ímpares que me permitiram crescer e evoluir como humano e pesquisador nesse extenso universo da pesquisa científica. Eu não poderia deixar de falar de Rosana Serpa e Jonathas Sales, pessoas de uma força e coração sem tamanhos que se fizeram grandes companheiros e com quem eu

pude sempre contar. Tony, obrigado por me fazer sorrir mesmo quando eu pareço não ter motivo para tal. Vocês não são especiais por me terem conhecido. O são por essência. Devo parte dessa vitória a vocês.

Gláucia Morgana Guedes Melo, há pessoas que marcam a nossa vida, que abrem nossos olhos de modo irreversível sobre os horizontes da vida e transformam à nossa maneira de ver o mundo. Você foi uma dessas pessoas! Os seus ensinamentos foram muito além dos conteúdos dos experimentos. Tive aprendizados importantes para a vida. Você soube despertar a minha admiração de um modo único, e se tornou uma inspiração para mim, você é uma verdadeira mestra. Muito obrigado por ter sido “*El Hiba Samā*: “enviada dos céus”, por ter tido sempre “um minuto” para mim, por me ter literalmente segurado a mão e ensinado a fazer os experimentos, pela sua dedicação, paciência, pelas correções dos trabalhos. Tenha certeza de que tudo o que aprendi, levarei por toda a vida. A ti, toda a minha gratidão e carinho!

À minha família pela forma como me inculcaram a alegria de viver, a vontade de fazer tudo o melhor possível, a saber reconhecer os meus limites, a respeitar e lidar com as diferenças, e a confiança necessária para realizar os meus sonhos. Espero que esta etapa, que agora termino, possa, de alguma forma, retribuir e compensar todo o carinho, apoio e dedicação que, constantemente, me oferecem.

Aos irmãos na fé por todo o amor e carinho que compartilharam comigo, sempre com uma palavra de incentivo e apoio, compartilhando comigo os momentos bons e ruins. Pela incansável luta de joelhos, compreensão e, sobretudo, paciência, que contribuíram para que fosse possível a concretização deste objetivo.

“Tell me and I forget,  
teach me and I may remember, involve me and I learn.”

Benjamin Franklin.

## RESUMO

Os micro-organismos quando se apresentam em biofilme expressam propriedades distintas de quando estão na forma planctônica. Uma dessas propriedades é uma maior tolerância aos agentes antimicrobianos. O objetivo deste estudo foi avaliar a formação biofilmes de dermatófitos *in vitro* e *ex vivo*, em lamínulas de poliestireno e fragmentos de unha, respectivamente, bem como a sua sensibilidade a três agentes antifúngicos (itraconazol, voriconazol e griseofulvina) na forma plantônica e em biofilmes. Para tal, num primeiro momento, foram utilizadas 26 cepas isoladas de espécimes clínicos de origem humana e animal: *Trichophyton rubrum* (4) *Trichophyton tonsurans* (6), *Trichophyton mentagrophytes* (3), *Microsporum gypseum* (3) e *Microsporum canis* (10). Os biofilmes foram, inicialmente, formados em placas de microdiluição, e as cepas foram classificadas, pela quantidade de biomassa, como não formadoras (2/26), fracas (7/26), moderada (1/26) e fortes formadoras de biofilme (16/26). Em seguida, cepas fortes formadoras de biofilmes foram escolhidas, sendo uma de cada espécie, para formação de biofilmes em lamínulas e fragmentos de unha, para análises pela microscopia óptica, confocal e eletrônica de varredura, posteriormente. As análises demonstraram que todas as espécies formaram biofilmes *in vitro* e *ex vivo*, com densidade e arquitetura distintas. *M. gypseum* e *M. canis* produziram biofilmes com maior e menor quantidade de biomassa, respectivamente. Em um segundo momento, conforme as preconizações do documento M38-A2 do CLSI, foram determinadas as concentrações inibitória mínima (CIMs) das três drogas contra as 26 cepas de dermatófitos, na forma plantônica. Os valores CIMs variaram entre 0,00195-0,25 µg/ml para itraconazol; 0,00195-0,125 para voriconazol e <0,0039-4 µg/ml para griseofulvina. Posteriormente foram formados biofilmes, em placas de microdiluição, que foram tratados com as mesmas drogas, nos valores de CIM, 10 x CIM e 50 x CIM. A viabilidade celular dos biofilmes foi quantificada utilizando o ensaio colorimétrico XTT. Para reduzir de forma significativa a atividade metabólica dos biofilmes (P<0,05) foi necessário usar 50 x CIM, para as três drogas. Estes estudo pode contribuir para melhorar a compreensão da fisiopatologia do microrganismo e tolerância ou resistência ao tratamento.

**Palavras-chave:** Dermatófitos. Biofilmes. Sensibilidade. *In vitro*. *Ex vivo*.

## ABSTRACT

The microorganisms when presented in biofilm express properties different from when they are in the planktonic form. One of these properties is a higher resistance to antimicrobial agents. The aim of this study was to evaluate the formation of dermatophytes' biofilms in *in vitro* and *ex vivo* assay performed in polystyrene coverslip and nail fragments, respectively, and their susceptibility to three antifungal agents (itraconazole, voriconazole and griseofulvin) in planktonics and biofilm forms. To this end, at first, they were used 26 strains isolated from clinical specimens of human and animal: *Trichophyton rubrum* (4) *Trichophyton tonsurans* (6), *Trichophyton mentagrophytes* (3), *Microsporum gypseum* (3) e *Microsporum canis* (10). The biofilms were initially formed in microdilution plates, and the strains were classified by the amount of biomass as non producers (2/26), weak (7/26), moderate (1/26) and strong biofilm producers (16/26). Then, strains, strong producers of biofilms, were chosen, one of each species, to biofilm formation in coverslip Thermanox<sup>®</sup> and nail fragments for later analysis by optical, confocal and scanning electron microscopy. The analyzes demonstrated that all species formed biofilms *in vitro* and *ex vivo*, with different density and architecture. *M. gypseum* and *M. canis* produced biofilms with higher and lower amounts of biomass, respectively. At a second step, according to the recommendations of the CLSI M38-A2 protocol, the minimum inhibitory concentration (MIC) values for the three antifungal agents against these 26 strains were determined, in the planktonic form. MICs values ranged from 0.00195-0.25 µg/ml for itraconazol, 0.00195-0.125 for voriconazole and <0.0039-4 µg / ml for griseofulvin. Subsequently, biofilms were formed, in microdilution plates and treated with the same drugs, in MIC, 10 x MIC and 50 x MIC values. The cell viability of the biofilms was quantified using the XTT colorimetric assay. In order to significantly reduce the metabolic activity of biofilms (P <0.05), 50 x MIC was required, for the three drugs. This study may contribute to improve the understanding of the pathophysiology of the microorganism and tolerance or resistance to treatment.

**Keywords:** Dermatophytes. Biofilms. Susceptibility. *In vitro*. *Ex vivo*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Macromorfologia e micromorfologia das colônias de <i>T. rubrum</i> .....	22
Figura 2. Macromorfologia e micromorfologia das colônias de <i>T. tonsurans</i> .....	23
Figura 3. Macromorfologia e micromorfologia de <i>T. mentagrophytes</i> .....	23
Figura 4. Macromorfologia e micromorfologia de <i>M. canis</i> .....	24
Figura 5. Macromorfologia e micromorfologia de <i>M. gypseum</i> .....	24
Figura 6. Modelo de formação de biofilmes em fungos filamentosos .....	31
Figura 7. Formação de biofilme em modelo <i>ex vivo</i> . (Fonte: CEMM) .....	45
Figura 8. Formação de biofilme em lamínulas para análises microscópicas.....	48
Figura 9. Quantificação da biomassa por cristal violeta.....	52
Figura 10. Biofilme de dermatófitos, formados em lamínulas de Thermanox® e fragmentos de unhas, analisados por diferentes técnicas microscópicas. ....	55
Figura 11. Valores das absorbâncias representativas para a inibição da atividade metabólica dos biofilmes de dermatófitos .....	59

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição das espécies de dermatófitos segundo os gêneros.....	21
Tabela 2. Espécies de dermatófitos utilizados para a formação de biofilme e testes de sensibilidade. ....	42
Tabela 3. Distribuição das cepas de dermatófitos segundo sítio de isolamento e capacidade de formação de biofilme.....	51
Tabela 4. Os valores mínimos e máximos para os parâmetros estruturais dos biofilmes de dermatófitos, quantificados pela análise da microscopia confocal, obtidos pela COMSTAT2. ....	53
Tabela 5. Distribuição das cepas de dermatófitos por origem, capacidade formadora de biofilme e perfil de sensibilidade antifúngica diante itraconazol, voriconazol e griseofulvina.....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC – *American Type Culture Collection*

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

DMSO – Dimetilsulfóxido

DO – Densidade óptica

ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

et al. - E outros

KOH- Hidróxido de Potássio

MALDI-TOF - *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight*

MEV- Microscopia eletrônica de varredura

MOPS - Ácido 3-(N-morfolina) propanossulfônico

CIM – Concentração inibitória mínima

nm – Nanômetro

pH –Potencial hidrogeniônico

PBS – *Phosphate buffered saline*

PCR – Reação em cadeia da polimerase

RFLP - *Restriction Fragment Long Polymorphism*

RPMI 1640 – Meio suplementado (de *Roswell Park Memorial Institute*)

DAS – *Sabouraud Dextrose Agar*

UFC – Unidades formadoras de colônia

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

## LISTA DE SÍMBOLOS

% - Porcentagem

°C - Graus Celsius

® - Marca Registrada

< - Menor que

± - Mais ou menos

# SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO .....	18
2 - REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1. Perspectiva histórica.....	19
2.2. Definição - Taxonomia.....	20
2.3. Gêneros e principais espécies envolvidas.....	21
2.4. Epidemiologia e Ecologia .....	25
2.5. Patogenia e Manifestações clínicas .....	26
2.6. Fatores de virulência .....	28
2.6.1. Biofilme .....	29
2.7. Diagnóstico e identificação laboratorial.....	31
2.7.1. Coleta, transporte e processamento do material clínico.....	32
2.7.2. Diagnóstico laboratorial convencional.....	32
2.7.3. Métodos moleculares de diagnóstico .....	34
2.8. Tratamento.....	35
2.8. Sensibilidade <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	36
3 - JUSTIFICATIVAS .....	39
4 - HIPÓTESES .....	40
5 - OBJETIVOS .....	41
5.1. Objetivo geral .....	41
5.2. Objetivos específicos.....	41
6 - MATERIAL E METODOS .....	42
6.1. Local do estudo .....	42
6.2. Micro-organismos .....	42
6.3. Fragmentos de unha.....	43
6.4. Inóculo.....	43
6.5. Formação de biofilmes .....	44

6.5.1. Ensaio de formação de biofilme <i>in vitro</i> .....	44
6.5.2. Ensaio de formação de biofilme em modelo <i>ex vivo</i> .....	45
6.6. Análise microscópica do biofilme de dermatófitos .....	45
6.7. O ensaio de sensibilidade a antifúngicos.....	48
6.7.1. Drogas .....	48
6.7.2. Ensaio de sensibilidade a antifúngicos dos dermatófitos na forma planctônica .....	48
6.7.3. Ensaio de sensibilidade a antifúngicos dos biofilmes de dermatófitos .....	49
6.8. Análises estatísticas .....	50
7 - RESULTADOS .....	50
7.1. Quantificação da Biomassa .....	50
7.1. Arquitetura dos biofilmes .....	52
7.2. Sensibilidade aos antifúngicos .....	56
7.2.1. Sensibilidade dos dermatófitos na forma plantônicas frente à antifúngicos .	56
7.2.2. Sensibilidade dos biofilmes de dermatófitos aos antifúngicos .....	58
8. DISCUSSÃO .....	60
9. CONCLUSÃO .....	66
10. REFERÊNCIAS.....	67
APENDICE – ARTIGOS ORIGINADOS A PARTIR DO TRABALHO .....	81
ANEXOS .....	82

## 1 - INTRODUÇÃO

Os dermatófitos constituem um grupo especializado de fungos filamentosos, filogeneticamente relacionados entre si, que através de um longo processo evolutivo, se adaptaram para colonizar e invadir os tecidos queratinizados da epiderme e dos fâneros (unhas, pelos e cabelos) de animais e seres humanos, podendo assim desencadear uma variedade de lesões superficiais, geralmente referidas como *tineas* (SIDRIM et al., 2004; CHABASSE, 2008; MOLINA, 2011; SHARMA et al., 2015).

Essas espécies estão distribuídas de forma variada em diferentes países e regiões geográficas devido a fatores ecológicos, socioeconômicos, terapêuticos, e fatores associados aos pacientes (VENA et al., 2012; PONTES et al., 2013). Os dermatófitos representam os maiores agentes causadores de micoses cutâneas, afetando cerca de 25% da população mundial, sendo que 30 a 70% dos adultos são portadores assintomáticos (VENA et al., 2012).

Nas últimas décadas, vários estudos vêm demonstrando que os biofilmes têm um papel preponderante na natureza e na infecção humana (DAVIES, 2003; TRENTIN et al., 2013). De fato, cerca de 65% das infecções humanas envolve micro-organismos, muitas vezes integrados em comunidades que aderem às superfícies ou interfaces, e são envolvidas caracteristicamente por uma densa matriz exo-polissacarídica, nomeadas de biofilmes (FLEMMING; WINGENDER, 2010; VASANTHI et al., 2014). Ainda que a grande maioria dos trabalhos com biofilmes publicados se refiram à biofilmes bacterianos e de leveduras, estudos recentes demonstraram que fungos dimórficos e filamentosos também formam biofilmes (HARDING et al., 2009; PITANGUI et al., 2012; CORDEIRO et al., 2015a, 2015b; BRILHANTE et al., 2015; GAO et al., 2016).

A descrição feita por Burkhart et al. (2002), no caso dos dermatofitomas, leva a crer que os dermatófitos possam estar associados a formação de biofilme *in vivo*, o que justificaria a presença de elementos fúngicos vivos, como hifas e artroconídios, dentro da unha infectada e fortemente aderidos à placa ungueal, que apresentaram simultaneamente dificuldade de remoção cirúrgica e resistência às terapias tradicionais (RAMAGE et al., 2012; TRENTIN et al., 2013). Estudos recentes demonstraram que *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* formaram biofilme *in vitro*, em lamínulas de Thermanox<sup>®</sup> (COSTA-ORLANDI et al., 2014; DOS SANTOS et al., 2015).

## 2 - REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Perspectiva histórica

Historicamente, foi *Aulus Cornelius Celsus*, enciclopedista romano que, por volta do ano 30 D.C., descreveu uma infecção supurativa do couro cabeludo, que veio a ser conhecida como o “*Kerion Celsus*” (ROSENTHAL, 1961; AJELLO, 1974). No entanto o papel de pioneiro, no que concerne a micologia médica especificamente relacionada com doenças humanas, é atribuído à três médicos (Johann L. Schoenlein, Robert Remak e David Gruby) que desvendaram a etiologia fúngica do *Favus*. Robert Remak, em 1837, observou estruturas microscópicas descritas como sendo hifas em crostas da lesão fávica. Schoenlein, em 1839, descreveu a natureza fúngica da doença e o fungo responsável pelo *Favus*. Após ter isolado o agente responsável pelo *favus*, Remak descreveu-o como *Achorion schoenleinii*, em honra ao seu mentor Schoenlein (AJELLO, 1974; WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; SIDRIM et al., 2004; TILLES, 2009).

Para Sabouraud, o crédito da descoberta da natureza fúngica das dermatofitoses pertence a David Gruby (1843), que nos seus trabalhos publicados entre 1841-1844 desvendou a causa e a natureza do *favus*, descrevendo *Microsporum audouinii* como sendo o agente da *tinea capitis* humana, ampliando o conhecimento e contribuindo de maneira decisiva para o estabelecimento do diagnóstico das dermatofitoses (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; GRÄSER et al., 2000; TILLES, 2009).

O gênero *Trichophyton* foi identificado por Malmsten, em 1845, com a descoberta da espécie *T. tonsurans*. *T. rubrum*, inicialmente isolado por Castellani, em 1909, em Colombo, Sri Lanka (antigo Ceilão), é reconhecidamente cosmopolita, mas evidências genéticas sugerem ter origem na África (GRASER et al., 2007; ERROL et al., 2011; INDRANIL, 2015), e que a sua disseminação pela Europa e outros continentes tenha sido por meio de imigrantes africanos e combatentes, após a Segunda Guerra Mundial (GRÄSER et al., 2007).

Por volta de 1910, Raymond Jacques Andrien Sabouraud confeccionou um meio que permitiu o cultivo sistemático dos dermatófitos, introduzindo assim uma riqueza de critérios de diagnóstico adicionais nas características culturais e morfológicas, que permitiram enquadrar os dermatófitos em quatro gêneros: *Achorion*, *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton* (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; SIDRIM et al., 2004; TILLES, 2009). Esse esquema taxonômico definido por Sabouraud foi atualizado por Emmons, em 1934, que estabeleceu a classificação dos dermatófitos sobre as bases da morfologia dos conídios e órgãos acessórios,

reconhecendo apenas três gêneros: *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*. (AJELLO, 1974; WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; SIDRIM et al., 2004; TILLES, 2009).

O conceito de biofilmes em infecções por dermatófitos foi introduzido por Burkhart et al., (2002) que sugeriu que a formação de biofilme pelos dermatófitos poderia explicar a presença de elementos de fungos vivos, tais como hifas e artroconídios, fortemente aderidos à placa da unha, no caso de dermatofitoma. Com base no caso descrito por Burkhart, Costa-Orlandi et al., (2014) demonstraram que *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*, espécies de dermatófitos mais isolados no mundo, e mais associados a onicomicose, formaram biofilme *in vitro*.

## 2.2. Definição - Taxonomia

Os dermatófitos compõem um grupo de fungos altamente relacionados, cuja característica comum é a capacidade de degradar a queratina, proteína complexa que entra na composição da pele e dos pêlos de seres humanos e animais. Taxonomicamente, os dermatófitos estão agrupados no Filo Ascomycota, na ordem Onygenales, classe Ascomycetes, família Arthrodermataceae e gêneros *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton* e *Arthroderma* (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; CHABASSE, 2008; SHARMA et al., 2015).

Estes fungos são classificados, com base nos estágios do ciclo de vida, em teleomórfico e anamórfico (SIMPANYA, 2000; CHABASSE, 2008; SHARMA et al., 2015). O estado teleomórfico é o estágio do ciclo de vida durante o qual se ocorre a reprodução sexuada, observado na natureza, mas raramente observada na prática laboratorial corrente (SIMPANYA, 2000). Qualquer espécie capaz de se reproduzir sexualmente é agrupada no gênero teleomórfico *Arthroderma*. A classificação dos dermatófitos se faz convencionalmente com base na reprodução assexuada ou conidiogênese, também chamada de fase anamórfica, que é a mais comum (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; SIMPANYA, 2000). As espécies que se reproduzem assexuadamente são agrupadas em um dos três gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. A reprodução assexuada ou conidiogênese, pelos dermatófitos, se faz pelo modo tálico. Ou seja, os conídios são formados a partir de elementos preexistentes do talo. Este modo de reprodução é, em si, subdividido em dois tipos: o tipo ártrico, que leva à formação de artroconídios, e o tipo holotálico que conduz à formação de aleuroconídios, chamados microconídios e macroconídios (SIDRIM et al., 2004; SHARMA et al., 2015)

### 2.3. Gêneros e principais espécies envolvidas

De acordo com a classificação feita por Emmons (1934) e revista por Rivalier (1966, *Taxonomie des dermatophytes*), são reconhecidas cerca de 40 espécies, contendo cerca de uma dúzia de espécies patogênicas para o homem (SHARMA et al., 2015). Os gêneros e as espécies mais importantes estão representados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Distribuição das espécies de dermatófitos segundo os gêneros.

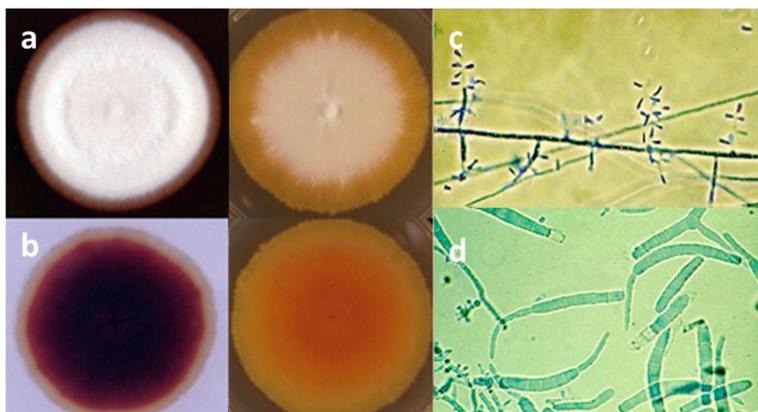
<b><i>Trichophyton spp.</i></b>	<b><i>Microsporium spp.</i></b>	<b><i>Epidermophyton spp.</i></b>
<i>T. rubrum*</i>	<i>M. canis *</i>	<i>E. floccosum*</i>
<i>T. mentagrophytes *</i>	<i>M. gypseum*</i>	<i>E. stockdaleae</i>
<i>T. tonsurans *</i>	<i>M. audouinii*</i>	
<i>T. schoenleinii*</i>	<i>M. amazonicum</i>	
<i>T. verrucosum*</i>	<i>M. boullardii</i>	
<i>T. violaceum*</i>	<i>M. cookei</i>	
<i>T. concentricum</i>	<i>M. ferrugineum</i>	
<i>T. equinum</i>	<i>M. fulvum</i>	
<i>T. eboreum</i>	<i>M. gallinae</i>	
<i>T. erinacei</i>	<i>M. nanum</i>	
<i>T. fischeri</i>	<i>M. praecox</i>	
<i>T. flavescens</i>	<i>M. persicolor</i>	
<i>T. fluviomuniense</i>	<i>M. racemosum</i>	
<i>T. gallinae</i>	<i>M. ripariae</i>	
<i>T. gloriae</i>	<i>M. vanbreuseghemii</i>	
<i>T. gourvilii</i>		
<i>T. kanei</i>		
<i>T. krajdinii</i>		
<i>T. longifusum</i>		
<i>T. megninii</i>		
<i>T. phaseoliforme</i>		
<i>T. quinckeanum</i>		
<i>T. raubitschekii</i>		
<i>T. sarkisorii</i>		

*T. simii*  
*T. soudanense*  
*T. terrestre*  
*T. ajelloi*  
*T. vanbreuseghemii*  
*T. yaoundei*

---

\*Espécies isoladas com maior frequência no homem.

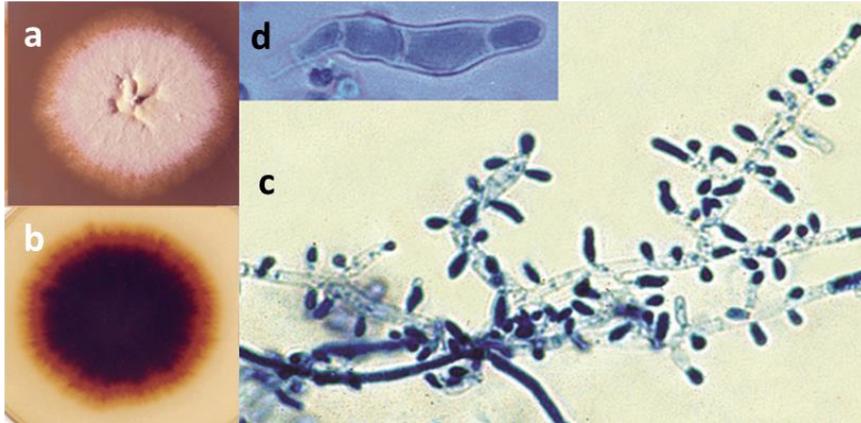
O gênero *Trichophyton* é particularmente importante e complexo. Menos de 10 espécies são reconhecidas responsáveis por casos de dermatofitose humana e animal (MOLINA, 2011; SHARMA et al., 2015). *T. rubrum* (Fig. 2), após cultura de 7-15 dias, apresenta colônias brancas de textura algodonosa (a) ou granular, com reverso apresentando uma coloração vermelha (b) (HRYNCEWICZ-GWÓZDŹ et al., 2011; DUFRESNE, 2014). Microscopicamente, apresenta micronídios que se apresentam regulares e piriformes, em grande quantidade, dispostos em acladium (c). Os macroconídios, presentes eventualmente, são variáveis em número, tamanho e de forma cilíndrica (d) (SIDRIM et al., 2004; DUFRESNE, 2014).



**Figura 1:** Macromorfologia e micromorfologia das colônias de *T. rubrum*. **a.** Colônia, algodonosa branca e colônia granular. **b.** Reverso da colônia avermelhada, com difusão da pigmentação no meio. **c.** Microconídios. **d.** Macroconídios (Fonte: DUFRESNE, 2014).

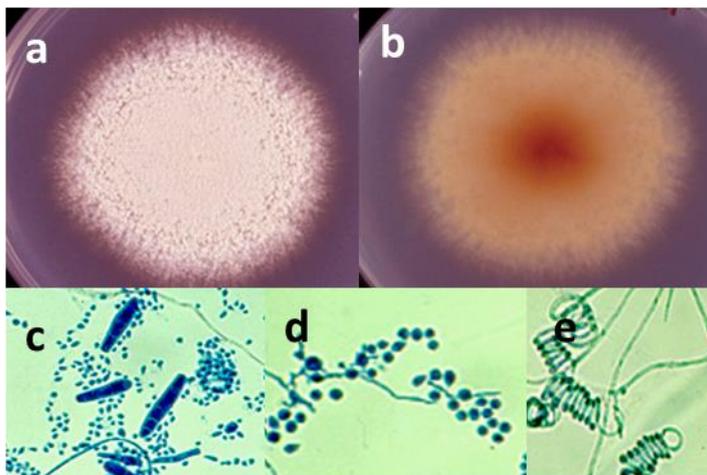
*T. tonsurans* (Fig. 2), após cultura, apresenta colônias planas com elevação central, de textura algodonosa ou granular (a), e coloração variando de branco a amarelo claro e reverso acastanhado (b) (SIDRIM et al., 2004; DUFRESNE, 2014). Microscopicamente, apresenta numerosos microconídios piriformes ou em forma de lágrima (c) e raramente macroconídios

(d), que são em forma de cigarro ou clava com paredes lisas e muitas vezes com formas distorcidas (SIDRIM et al., 2004; DUFRESNE, 2014).



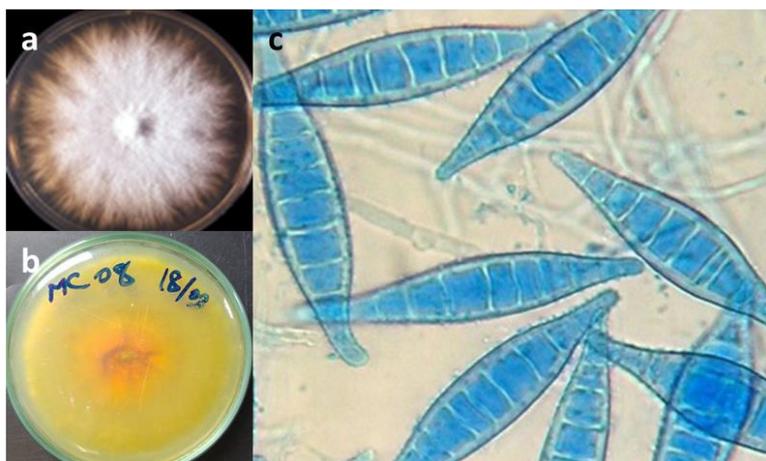
**Figura 2.** Macromorfologia e micromorfologia das colônias de *T. tonsurans*. **a.** Colônia granular de coloração creme. **b.** com reverso acastanhado. **c.** Microconídios em acladium. **d.** Macroconídio distorcido. (Fonte: DUFRESNE, 2014).

*T. mentagrophytes* (Fig. 3) apresenta colônias planas (a), de coloração branca a creme, textura pulverulenta, com reverso pigmentado de marrom (b) (SIDRIM et al., 2004; LEE et al., 2014; OLIVEIRA, 2014). Microscopicamente, se apresenta com raros macroconídios (c) em forma de charutos e de parede fina, presos às hifas. A sua principal característica, no entanto, é a presença de microconídios (d) globosos e agrupados nas ramificações cujo arranjo lembra um cacho de uvas. Podem também ser vistas hifas na forma de espiral (e). (Fig. 4d) (SIDRIM et al., 2004; OLIVEIRA, 2014).



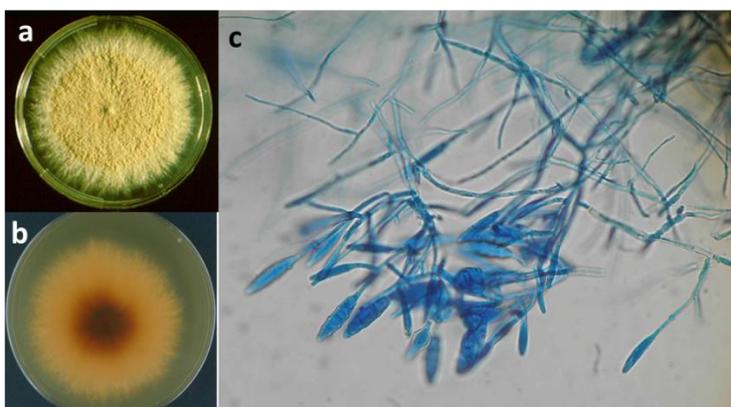
**Figura 3.** Macromorfologia e micromorfologia de *T. mentagrophytes*. **a.** Colônia plana, creme, de textura granular, **b.** Reverso da colônia pigmentado de amarelo- amarronzado. **c.** Macroconídios em forma de charuto. **d.** Microconídios globosos em cachos. **e.** Hifas em gavinha, característico de *T. mentagrophytes*. (Fontes: DUFRESNE, 2014).

*M. canis* (Fig. 4) apresenta colônias com relevo apiculado (a), textura algodonosa e tonalidade branca, com reverso de coloração amarela (b). Microscopicamente, apresenta grande quantidade de macroconídios fusiformes (c) multiseptados (8 a 15 septos) e de paredes espessas, que constituem uma característica marcante desta espécie. Os microconídios, quando estão presentes, são sésseis (SIDRIM et al., 2004; DHIEB et al., 2014).



**Figura 4.** Macromorfologia e micromorfologia de *M. canis*. **a.** Colônia radial, creme, apiculada. **b.** Reverso da colônia pigmentado de amarelo-limão. **c.** Macroconídios de extremidades aguda, e microconídios sésseis. (Fonte: CEMM).

*M. gypseum* (Fig. 6) apresenta colônias macroscopicamente de textura pulverulenta com pigmentação creme. O reverso pode apresentar variações de cores que vão do amarelo ao marrom (b). Microscopicamente, apresentam bastantes macroconídios simétricos (c), de paredes finas, multiseptados, de superfície levemente equinulada, menos fusiformes do que os macroconídios de *M. canis*, pois apresentam a extremidade distal arredondada e pouco microconídios (Fig. 6c) (SIDRIM et al., 2004; MIHALI et al., 2011; OLIVEIRA, 2014).



**Figura 5.** Macromorfologia e micromorfologia de *M. gypseum*. **a.** Colônia radial, pulverulenta de coloração creme. **b.** Reverso da colônia acastanhado. **c.** Macroconídios simétricos. (Fonte: DUFRESNE, 2014).

*Epidermophyton floccosum*, com um crescimento rápido, atinge a maturação em cerca de 4 a 6 dias, macroscopicamente, as colônias apresentam textura penugenta, de coloração amarelo-terrosa. O reverso das colônias tende a acompanhar a coloração do verso. Por vezes o pigmento difunde para o meio de cultura. Microscopicamente, caracteriza-se pela presença de macroconídios de parede fina, com 2 a 5 septos e agrupados em cachos, como cachos de banana, formados sobre 1 ou 2 conidióforos curtos, e pela ausência de microconídios (SIDRIM et al., 2004; OLIVEIRA, 2014; DUFRESNE, 2014).

#### 2.4. Epidemiologia e Ecologia

A distribuição dos dermatófitos varia com a região geográfica e é influenciada por fatores relacionados a população, condições socioeconômicas e fatores relacionados com a área geográfica. De modo geral, as espécies *T. rubrum* e *E. floccosum* distribuem-se mundialmente. Outras encontram-se mais restritas a determinadas áreas, como *M. ferrugineum* na Ásia e África, *T. megninii* na Europa. Em relação à frequência de isolamento, *T. rubrum* é a espécie mais encontrada em todo o mundo, seguido de *T. mentagrophytes* (PIRES et al., 2014; SEGAL; FRENKEL, 2015; SHARMA et al., 2015).

Na maioria dos países europeus, a distribuição mudou significativamente, sob a influência da intensificação de viagens, migração de populações da África e da Ásia. No século passado, *M. audouinii*, *T. schoenleinii*, *T. violaceum*, *T. soudanense* e *T. tonsurans* eram os dermatófitos mais isolados. Porém, gradualmente, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *M. canis* se espalharam, com uma prevalência variável em diversos países. *M. audouinii* que já tinha sido erradicado dos países da Europa, reemergiu em alguns países da Europa, como agente causador de tinea (SEEBACHER et al., 2008; VALARI et al., 2012; NENOFF et al., 2014; ZINK et al., 2014; HAYETTE; SACHELI, 2015)

Na África a prevalência das diversas espécies de dermatófitos é bem diferente da observada nos restantes continentes. De modo geral, *T. violaceum*, seguido de *T. soudanense* e *M. audouinii*, são as espécies mais prevalentes. Espécies como *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* desempenham um papel dominante em alguns locais da região (DHIEB et al., 2014; WARISO et al., 2015; NWEZE; EKE, 2015; COULIBALY et al., 2016). Na Ásia, estudos recentes indicam que *T. rubrum* é a espécie isolada com maior frequência, seguida por *T. mentagrophytes*, *E. floccosum* e *T. tonsurans* (BHATIA; SHARMA, 2014; SEI, 2015; NAGLOT et al., 2015).

No Brasil, conforme relatado por estudos conduzidos na última década, a distribuição de dermatófitos varia conforme a região. Na região norte e nordeste, as pesquisas epidemiológicas demonstraram que *T. rubrum* é o dermatófito mais prevalente, seguido por *T. tonsurans* e *M. canis* (DAMÁZIO et al., 2007; CALADO et al., 2011; CORTEZ et al., 2012). Na região centro-oeste, sul e sudeste, conforme relatado pela literatura, prevalece o *T. rubrum*, seguido de *T. mentagrophytes* e *M. canis*. Entretanto, no estado de Santa Catarina, verificou-se que *T. mentagrophytes* era o mais isolado, seguido de *T. rubrum* (BRILHANTE et al., 2000; SIDRIM et al., 2004; SCHOELER et al., 2010; CALADO et al., 2011).

No que diz respeito a ecologia desses fungos, supostamente, membros dos três grupos ecológicos viviam no solo e eram geralmente incapazes de provocar doenças em animais e humanos (CHABASSE, 2008; GRASER et al., 2008). Então, devido aos fenômenos extrínsecos e intrínsecos se adaptaram às condições do parasitismo em espécies animais e aos homens, e passaram a ser mantidos nestes reservatórios. Essa adaptação ao parasitismo resulta em consequências práticas de ordem epidemiológica, biológica e clínica (CHABASSE, 2008; MOLINA et al., 2011).

## **2.5. Patogenia e Manifestações clínicas**

A patogenicidade, no que diz respeito ao parasita, é a capacidade de usar o hospedeiro, como um meio de crescimento, utilizando todo componente estrutural ou produto de biosíntese que facilita a adesão, a penetração e difusão, ou ajuda na resistência contra as defesas imunitárias inatas, e na evasão das defesas adaptativas imunes (KUROKAWA et al., 1998; CROSS, 2008).

A transmissão pode ser direta pelo contato com animais e humanos ou indireta por pelo contato com objetos (pentes, escovas, lenços, roupas e sapatos) contaminados, ou por contato com terra ou areia, normalmente após trauma cutâneo, contendo artroconídios potencialmente infectantes. A adesão é facilitada por traumas e uso de roupas e sapatos apertados que criam um ambiente favorável para o desenvolvimento do micro-organismo (SIMPANYA, 2000; SIDRIM et al., 2004; CHABASSE, 2008; PERES et al., 2010; MOLINA, 2011).

Após a adesão, o micro-organismo penetra na camada córnea da epiderme crescendo de forma circular e centrífuga, desencadeando, no final de alguns dias, uma lesão vesicular, única clinicamente conhecida como herpes circinado que pode confluir dando origem a placas policíclicas; as lesões das grandes pregas, comumente encontrados em homens praticantes de

esportes aquáticos, começa na parte interna da coxa por uma ou mais máculas pruriginosas, rosa, finamente escamosas, com borda vesiculosa, e que podem se confluir para formarem placas maiores que se estendem da região inguinal até a coxa; lesões interdigitoplantares e palmares que podem ser desidróticas, com muitas vesículas ou, simplesmente descamativa; e *tinea imbricata* ou Tokelau, clinicamente, caracterizada por várias lesões consistindo de círculos escamosos esbranquiçados, concêntricos e de diâmetros variáveis (SIDRIM et al., 2004; ZAITZ et al., 2010; ZARAA et al., 2013).

Os pelos são atacados secundariamente à evolução de uma lesão da pele que apresenta na sua superfície uma grande quantidade de folículos pilosos. Pelo aspecto clínico, podem ser distinguidos a *tinea tonsurante* que, acometendo principalmente crianças na idade escolar, se caracteriza por uma lesão microspórica, ocasionada por dermatófitos do gênero *Microsporum*, fluorescentes à lâmpada de Wood e lesão tricofítica, causada por dermatófitos do gênero *Trichophyton*; *tinea supurativa*, que pode surgir em qualquer idade. Se caracteriza pelo aparecimento de placas arredondadas e pruriginosas cobertas de pústulas que se rompem liberando um pus amarelado, seguido de perda espontânea de cabelo. Essa lesão, também conhecida como “*Kerion de Celse*”; e *tinea fávica*, que se caracteriza por uma lesão com aspecto de uma pequena crosta amarelada friável que cresce e funde assumindo a forma de um godet fávico (massa compacta de micélios), libertando odor de urina de rato (SIDRIM et al., 2004, ZAITZ et al., 2010; ZARAA et al., 2013).

O comprometimento das unhas é secundária à penetração do dermatófitos na camada córnea do *hiponíquium*. A penetração começa preferencialmente pela parte distal da unha. Clinicamente, podem ser distinguidas onicomicose subungueal distal, forma mais frequente, a invasão provoca uma hiperqueratose com branqueamento das unhas; onicomicose subungueal proximal que, geralmente observados em pacientes com (AIDS/SIDA), se caracteriza pelo aparecimento de manchas brancas lúnula, que depois se estendem gradualmente; leuconicomicose superficial que caracteriza pela penetração *in situ* de estruturas fúngicas em direção ao interior ungueal, e se manifesta por pequenas manchas brancas, opacas, com limites claros, que se fundem atingindo gradualmente a superfície da unha; Finalmente, a onicodistrofia que pode ser total pela agravação progressiva das variedades referidas (SIDRIM et al., 2004, ZAITZ et al., 2010; ZARAA et al., 2013).

Além das formas clínicas clássicas descritas anteriormente, são relatadas na literatura, que alguns indivíduos, com déficits imunológicos, podem apresentar, dermatofitose disseminada, multifocal, recorrente, e refratárias aos tratamentos apropriados, considerada crônica; formas profundas como granuloma de Majocchi; e pseudomicetoma dermatofítica ocorrendo. A

imunossupressão, e a corticoterapia local são fatores que contribuem (SIDRIM et al., 2004; ZAITZ et al., 2010; DE SOUSA et al., 2015; WU et al., 2013).

## 2.6. Fatores de virulência

Para compreender a patogênese das dermatofitoses, o conhecimento de vários fatores de virulência envolvidos nos processos de adesão, germinação e invasão de dermatófitos, é essencial. A estrutura dos dermatófitos mais comumente associada ao contágio, são os artroconídios. Estas estruturas, em especial em certas espécies, podem persistir por anos como uma fonte ambiental de contágio, provocando pequenos surtos de dermatofitoses em indivíduos (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; SIDRIM et al., 2004; TAINWALA; SHARMA, 2011; BRONDANI et al., 2016). Essa persistência no ambiente poderia ser justificada pela produção de melanina. Espécies de dermatófitos dos três gêneros, como descrito por Youngchim et al., (2011), produziram melanina ou uma substância similar, *in vitro* e durante a infecção. Com base no que se sabe a respeito da função da melanina como um fator de virulência de outros fungos patogênicos, incluindo *Cryptococcus neoformans*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Aspergillus fumigatus*, este pigmento pode ter uma função semelhante na patogênese das dermatofitoses exercendo um papel importante na proteção desses micro-organismos contra estresses físico e biológico (WANG et al., 1995; TABORDA et al., 2008; ALLAM; EL-ZAHER, 2012).

Após a transmissão e depósito do artroconídio na camada da pele, é necessário que os dermatófitos obtenham nutrientes para seu desenvolvimento e sobrevivência. Para isso, é preciso degradar a queratina em compostos menores, que o fungo possa utilizar como fonte de carbono, nitrogênio, enxofre e fósforo. Várias proteases foram purificadas e caracterizadas em *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *M. canis*, nomeadamente as enzimas queratinolíticas (subtilisinas e metaloproteases) recentemente caracterizadas, cuja produção *in vivo*, foi demonstrada em diferentes hospedeiros infectados com *M. canis* (FERREIRA-NOZAWA et al., 2003; JOUSSON et al., 2004; VENKATESAN et al., 2010; PERES et al., 2010; ZHANG et al., 2013; SINGH et al., 2014). Há hipótese de que a decomposição da queratina seja facilitada pela secreção do composto redutor, sulfito, que pode quebrar as ligações de cisteína-queratina, tornando a queratina disponível para ser decomposto pelas proteases (NENOFF et al., 2013).

Nesse âmbito, as enzimas hidrolíticas produzidas e secretadas possuem especial relevância, pois apresentam relação direta com a patogenicidade dos dermatófitos, considerando que além de participar na aderência, participam na invasão pela penetração de filamentos germinados, afim

de evitar a eliminação do fungo pela descamação (PERES et al., 2010; BALDO et al. 2011; SHARIFZADEH et al. 2016). Ademais, na superfície dos artroconídios de *T. mentagrophytes*, e *T. rubrum*, foram observadas lectinas lhes permitem aderir às células epiteliais por ligação os resíduos de manose e galactose, além de projeções fibrilares longas e curtas durante a fase de adesão e penetração nos corneócitos. Estas projeções fibrilares parecem desempenhar um papel na adesão, ligando os artroconídios aos queratinócitos e aos outros artroconídios. Alguns autores relataram a presença de um material polimérico entre os artroconídios e a célula do estrato córneo, três dias após a infecção, fazendo conexão entre artroconídios adjacentes, além da adesão ao estrato córneo, sugerindo a formação de um complexo de artroconídios mais estável e melhoria na aquisição de substâncias nutritivas. Característico do que conhecemos como biofilme (ALJABRE et al, 1993; RASHID et al, 1995; KAUFMAN et al., 2007; PERES et al., 2010).

### **2.6.1. Biofilme**

A descoberta dos biofilmes mudou a percepção que se tinha acerca do modo de vida dos micro-organismos. Na natureza, como tem sido demonstrado, a maioria dos micro-organismos não existem de forma isolada, como se acreditava, mas sim associados a outros micro-organismos, formando uma comunidade dinâmica, organizada e persistente denominada de biofilme. Essas comunidades proporcionam a sobrevivência a condições adversas, tais como temperaturas extremas a ambientes de extrema acidez e diferentes níveis de umidade (YANG et al. 2009; CAMPOS et al., 2009; JONES et al., 2010; PERCIVAL et al., 2011),

O aumento crescente dos estudos de biofilmes, nas últimas décadas, tem auxiliado na elucidação do papel que este desempenha na medicina humana, sobretudo a sua implicação na cronicidade de algumas doenças. Várias infecções crônicas incluindo pneumonia, infecções do trato urinário e infecções de feridas estão, na maioria das vezes, associadas a formação de biofilme (WOLCOTT; EHRLICH, 2008). Assim, a capacidade de formar biofilmes também pode ser considerada um importante fator de virulência, tendo em conta que cria condições mais favoráveis para a colonização, infecção e evasão, dificultando a erradicação do micro-organismo. Primeiramente, porque as características fenotípicas expressas por células dentro de um biofilme são totalmente diferentes quando as mesmas se apresentam na forma planctônica. Entre essas características se destaca a tolerância aumentada frente as drogas antimicrobianas e maior proteção contra as defesas do hospedeiro (RAMAGE et al., 2012; PERCIVAL et al., 2012). Atualmente, sabe-se que biofilmes demonstram ter uma tolerância a concentrações de

antimicrobianos de 100 a 1.000 vezes maior em relação aos seus homólogos na forma planctônica. Embora os antimicrobianos possam diminuir a quantidade de micro-organismos viáveis no biofilme, o tratamento antimicrobiano não é capaz de erradicar completamente o patógeno, ocorrendo, conseqüentemente, infecções refratárias (DUFOUR et al., 2012).

Os micro-organismos em biofilmes são protegidos, primeiramente, pela matriz exopolimérica que delimita o contacto desses micro-organismos com o ambiente externo, atuando como uma barreira impermeável, dificultando a penetração e difusão de substâncias antimicrobianas, protegendo os micro-organismos no interior do biofilme. (FLEMMING; WINGENDER, 2010). No entanto, a matriz extracelular não é considerada o único mecanismo de proteção para os micro-organismos em biofilme. As células persistentes é outro mecanismo de tolerância aos antimicrobianos. Estas células, como tem sido sugerido, entram num estado de dormência, o que lhes permite sobreviver às condições de estresse e prevenir a morte celular (FLEMMING; WINGENDER, 2010; PERCIVAL et al., 2011).

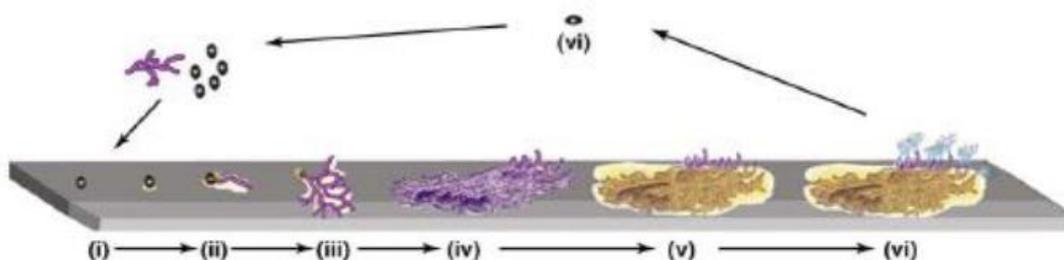
Estudos conduzidos na última década confirmaram, graça ao uso de técnicas diversas, que assim como as bactérias e leveduras, os fungos dimórficos e filamentosos, inclusive dermatófitos, embora pouco falado, também formam biofilmes dependendo da composição do substrato, das condições ambientais e características das cepas envolvidas (PITANGUI et al., 2012; SARDI et al., 2013; MUSZKIETA et al., 2013; COSTA-ORLANDI et al., 2014).

A primeira descrição do papel de biofilmes nas dermatofitoses, feita por Burkhart et al. (2002), leva a crer que a formação de biofilme *in vivo* pelos dermatófitos justificaria a presença de elementos fúngicos vivos, tais como, hifas e artroconídios, fortemente aderidos a placa ungueal, a difícil remoção cirúrgica e resistentes às terapias tradicionais, observados no caso da dermatofitoma. Estudos recentes demonstraram que algumas espécies de dermatófitos apresentaram capacidade de formação de biofilme *in vitro*, em lamínulas de poliestireno (COSTA-ORLANDI et al. 2014; DOS SANTOS et al. 2015). Costa-Orlandi et al., (2014) relataram que *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*, dermatófitos antropofílicos disseminados em todo o mundo, formaram biofilmes *in vitro*, o que poderia estar associado a dificuldade de diagnóstico e tratamento, à sua alta prevalência, e conseqüentemente problemas econômicos acarretados (HAYETTE; SACHELI, 2015). Portanto, é importante conhecer a capacidade dos dermatófitos em produzir biofilme como um fator de virulência.

Harding et al., (2009), proporam um modelo para a formação de biofilme de fungos filamentosos, que inclui seis fases (Fig. 6). Na primeira fase da formação de biofilmes, ocorre a adesão primária, ou adsorção reversível, dos micro-organismos a superfícies bióticas ou abióticas. Na segunda fase, a adesão torna-se irreversível. Na terceira fase, desenvolve-se a

estrutura do biofilme, que é caracterizada pela matriz de EPS. Os dermatófitos possuem lectinas que facilitam a adesão entre os conídios, formando microcolônias, dificultando assim a remoção do biofilme (KAUFMAN et al., 2007). Após o processo de adesão, o biofilme é estabilizado pela produção de matriz exopoliméricas (exopolissacarídios = EPZ) produzidos pelas células em biofilme. Esses polissacarídios facilitam a ligação intercelular, gerando a formação de microcolônias que, por fim, tornam-se protegidas das adversidades do meio em que se encontram (WHITE, 2003). Na quarta fase, o biofilme continua se desenvolvendo, formando mais microcolônias, substâncias poliméricas extracelulares, juntamente, com canais de água que permitem o fornecimento de nutrientes e gases, bem como a remoção de produtos residuais (PERCIVAL et al., 2011). Na quinta fase, o biofilme já é maduro. Finalmente, na sexta fase, ocorre o desprendimento das células do biofilme para a dispersão.

Existem muitos modelos *in vitro* e *ex vivo*, bem definidos quando se trata dos biofilmes formados por leveduras e fungos filamentosos, permitindo uma melhor compreensão da fisiopatologia desses fungos, mas pouco se sabe sobre modelos para formação de biofilmes de dermatófitos (HARDING et al., 2009; VILA et al., 2015). Deste modo, dada a falta de modelos, é de especial interesse a compreensão da capacidade de formação de biofilmes em modelo *ex vivo*, utilizando fragmentos de unhas humano, de modo que estes modelos permitam a interação entre fungo e hospedeiro mais próxima à condição *in vivo*.



**Figura 6.** Modelo de formação de biofilmes em fungos filamentosos. (i) adsorção, (ii) adesão, (iii) formação de microcolônia 1, (iv) formação de microcolônia 2, (v) desenvolvimento do biofilme maduro, (vi) dispersão (Fonte: HARDING et al., 2009).

## 2.7. Diagnóstico e identificação laboratorial

A importância da identificação dos dermatófitos está muitas vezes relacionada a questões epidemiológicas. A identificação segura das espécies de dermatófitos envolvidas na infecção, pode ser útil na compreensão das fontes da infecção que: (1) podem ser transportadores de origem animal, (2) podem estar ligadas a surtos institucionais ou familiares recorrentes, tais

como *T. tonsurans* (3) podem causar epidemias que progridem rapidamente, tais como *M. audouinii* e *T. tonsurans* (4), são geograficamente endêmicas, o que reflete a exposição durante a viagem ou de residência na área de endemicidade ou contato com uma pessoa com tal história; e alvejando medidas preventivas apropriadas, que permitem a quebra do ciclo epidemiológico do microrganismo (SIDRIM et al., 2004; CHABASSE; PIHET, 2008; AHMADI et al., 2015; MOCHIZUKI et al., 2015; OHST et al., 2016).

### **2.7.1. Coleta, transporte e processamento do material clínico**

A coleta deve ser realizada por um especialista (dermatologista ou micologista) treinado, seja tópica ou sistêmica (15 dias se for tópica, e 1 mês se for sistêmica) e após antisepsia rigorosa das lesões com álcool 70%. Tendo em conta a questão do crescimento radial do fungo na lesão na pele glabra, o especialista deve coletar nas bordas das lesões mais recentes, porque são os sítios ativos da infecção. Nas lesões no couro cabeludo os melhores cabelos para selecionar são aqueles que apresentam fluorescência sob a lâmpada de Wood, ou estão quebrados e escamosos. No caso das onicomicoses, fazer uma raspagem vigorosa do lado inferior da extremidade distal da unha e do leito ungueal (SIDRIM et al., 2004; CHABASSE; PIHET, 2008; KAUR et al., 2008; VYZANTIADIS et al., 2012).

### **2.7.2. Diagnóstico laboratorial convencional**

Convencionalmente, os dermatófitos são identificados com base nas características morfológicas macroscópicas (cor, textura e relevo) e microscópicas (tamanho, forma e disposição dos conídios e estruturas de ornamentação) das colônias, e/ou fisiológicas (tempo de crescimento, necessidades vitamínicas, prova de urease e teste de perfuração de pelos) (SIDRIM et al., 2004; CHABASSE; PIHET, 2008; MOLINA, 2011).

#### **2.7.2.1. Exame direto**

O exame direto, feito diretamente com o material biológico, sem fixação ou coloração específica, permite destacar o fungo no seu “estado parasitário” na lesão. Para facilitar a visualização dos elementos fúngicos, as amostras são geralmente clarificadas com hidróxido de potássio (KOH 10-40%) ou hidróxido de sódio (NaOH 10-30%), ao qual pode ser acrescentado um agente acelerador de clarificação (dimetilsulfóxido), ou glicerol a 10% para evitar a

dessecação rápida das lâminas. (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; SIDRIM et al., 2004; CHABASSE; PIHET, 2008).

Em escamas de pele e unhas, o exame microscópico permite observar hifas artroconidiadas, penetrando as células córneas. Para o cabelo e pelo, permite especificar diretamente o tipo de parasitismo em questão e o modo de contágio: humano para o tipo fávico ou *endotrix*, animal para o tipo micróide ou megaspórico, humano ou animal para o tipo microspórico (BRASIL et al., 2003; HOSPENTHAL; RINALDI, 2008; VYZANTIADIS et al., 2012). A microscopia direta é claramente útil no diagnóstico da infecção fúngica, entretanto, é necessário conciliar os resultados da microscopia com o isolamento do organismo em cultura (HOSPENTHAL; RINALDI, 2008; VYZANTIADIS et al., 2012).

#### **2.7.2.2. Isolamento e identificação dos fungos em cultura (exame macroscópico e microscópico)**

O isolamento é feito em meios que permitem o crescimento fúngico, mas que pela presença de antibacterianos por si só ou em combinação com substâncias antifúngicas, inibem o crescimento de bactérias e fungos contaminantes (ágar Sabouraud simples e suplementado com cloranfenicol e cicloeximida). As culturas são incubadas a temperatura ambiente (28°C), e mantidas pelo menos duas semanas (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; SIDRIM et al., 2004; CHABASSE; PIHET, 2008; VYZANTIADIS et al., 2012). Em complemento, outros meios que promovem a frutificação e pigmentação das culturas ou detecção do microrganismo tais como o meio Lactrimel de Borelli, o meio bromocresol púrpura e o meio DTM (Dermatophyte Test Medium) podem ser utilizados (SIDRIM et al., 2004; JAVIER et al., 2012).

#### **2.7.2.3. Testes complementares**

Quando a combinação das características macro e micromorfológicas não forem suficientes para a identificação inequívoca das espécies, deve-se lançar mão de testes complementares, tais como: microcultivo, prova da urease, teste de perfuração de pelo e as provas de requerimentos vitamínicos (SIDRIM et al., 2004; CHABASSE; PIHET, 2008).

O microcultivo, é um método que ao preservar as estruturas fúngicas dos danos que podem ocorrer durante o processo de preparação de uma lâmina, permite observar de perto as características necessárias para a identificação fenotípica precisa a nível de gênero e espécie (SIDRIM et al., 2004; VYZANTIADIS et al., 2012; YEVA et al., 2014).

A capacidade dos dermatófitos para hidrolisar a uréia permite fazer a diferenciação entre *T. mentagrophytes* (hidrolisa a uréia) e *T. rubrum* (não hidrolisa a uréia). A detecção se faz no meio ágar uréia de Christensen. É importante fazer a leitura entre 3-7 dias. Em caso de reação positiva a coloração amarela do meio se torna rosa-escuro. Ademais, a posse da urease, pode ser vantajosa aos dermatófitos de maneiras diferentes, pois permite gerar um microambiente alcalino que pode ser útil para o processo infeccioso ou para o estabelecimento de uma geração secundária de crescimento no local da infecção (SIDRIM et al., 2004; DUFRESNE, 2014; SHARMA et al., 2015).

O teste de perfuração de pelo, apesar de ser um teste que inicialmente era utilizado para diferenciar isolados atípicos de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*, revelou ser útil para a identificação e diferenciação de várias espécies de dermatófitos que não apresentam órgãos perfuradores (SIDRIM et al., 2004; ATES et al., 2008; DUFRESNE, 2014; SHARMA et al., 2015). O meio ágar *Trichophyton*, nomeado de 1-7 (T1: Controle; T2: Inositol; T3: Inositol + tiamina; T4: Tiamina; T5: Ácido nicotínico; T6: Controle de nitrato de amônio; T7: Histidina), permitem uma identificação presuntiva de espécies de *Trichophyton*, com base nos seus requirements específicos em vitaminas e aminoácidos que eles não sintetizam (SIDRIM et al., 2004; CHABASSE; PIHET, 2008; DUFRESNE, 2014).

### 2.7.3. Métodos moleculares de diagnóstico

Vários métodos moleculares têm sido desenvolvidos para superar a falta de sensibilidade e especificidade de técnicas convencionais para a identificação de dermatófitos com base em critérios fenotípicos (GHERBAWY; VOIGT, 2008; KO et al., 2011; BERNHARDT et al., 2013).

Recentemente, técnicas de PCR- RFLP (*Restriction Fragment Long Polymorphism*) e PCR em tempo real, pela sua excelente precisão e capacidade de análise em larga escala, têm sido aplicados por várias equipes para a detecção e identificação de dermatófitos em amostras. Este método de identificação sensível e específico permite a identificação de dermatófitos em menos de 24 horas otimizando assim o manejo terapêutico dos pacientes (BERGMAN et al., 2013; EMAM; EL-SALAM, 2014).

O MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight*) combina espectrometria de massa e laser. Ao contrário de técnicas de biologia molecular, ele não pode ser feito diretamente na amostra e requer a obtenção de culturas (GRÄSER, 2014).

Embora estes métodos permitem uma melhor detecção e identificação de dermatófitos em amostras em relação a cultura, e em um tempo muito curto, ainda são caros de implementar no laboratório em comparação com métodos convencionais.

## 2.8. Tratamento

Os objetivos do tratamento incluem o alívio dos sintomas, cura clínica, cura micológica e prevenção da transmissão da infecção. A escolha da formulação a ser utilizada depende do hospedeiro e do tipo e extensão das lesões (ADIMIA et al., 2013; GUPTA et al., 2016a).

Nos casos das *tineas*, uma vez que os antifúngicos tópicos não penetram facilmente a haste capilar, a prescrição de um antifúngico oral é essencial. Nesse sentido, a griseofulvina, antifúngico que se distribui até o bulbo piloso se incorporando às células da queratina recém-formadas, pode ser uma escolha terapêutica interessante. Porém, em casos de intolerância a esse medicamento, podem ser utilizados terbinafina ou derivados imidazólicos (itraconazol, voriconazol), que parecem ter perfis de eficácia e segurança idênticos ou superior aos da griseofulvina, permitindo tratamentos de menor duração. As loções ou xampus, contendo um imidazol são indicados para o tratamento em simultâneo (DEVELOUX, 2001; SOBUE et al., 2004; GROVER et al., 2012; ADIMIA et al., 2013; BOLOGNIA et al., 2015; GUPTA et al., 2016b). Nos casos de *tinea* supurativa, deve ser administrado um tratamento anti-inflamatório, para reduzir a inflamação e a formação de cicatrizes, antes do uso de antifúngico. A esses tratamentos, devem ser associadas medidas profiláticas tais como desinfecção de chapéus, capuz, objetos de pentear e remoção de cabelo infectado (ADIMIA et al., 2013; BOLOGNIA et al., 2015; GUPTA et al., 2016c).

Na maioria dos casos de dermatofitoses, nas suas mais variadas formas, o tratamento local é suficiente, com base na utilização de creme ou pomada, sobre a pele glabra. Contudo, tratamentos antifúngicos orais podem ser utilizados dependendo do sítio anatômico acometido e da extensão das lesões. Os tratamentos antifúngicos incluem os imidazóis (itraconazol e voriconazol), a ciclopiroxolamina, a terbinafina e a griseofulvina (DONNELLY; DE PAUW, 2004; SIDRIM et al., 2004; VAN ZUUREN et al., 2015)

A onicomicose é difícil de tratar, em parte, devido ao crescimento lento das unhas. Semelhante as outras formas de dermatofitoses, as opções de tratamento incluem antifúngicos de uso oral e tópico. Os tratamentos orais incluem a griseofulvina, itraconazol, voriconazol e terbinafina, ciclopirox olamina. Os tratamentos tópicos incluem terbinafina sob forma de pomada e ciclopirox sob forma de esmalte (ROSEN; GOLD, 2016; YOSHIKI et al., 2016). Ao

lado destes, outras drogas, nomeadamente a amorolfina, novas moléculas de anéis triazólicos (efinaconazol e luliconazol) e tavaborole, vieram enriquecer o arsenal terapêutico disponível para o tratamento das onícomicoses, trazendo propriedades e potências terapêuticas importantes (ADIMIA et al., 2013; GUPTA et al., 2015; ROSEN; GOLD, 2016).

Nas dermatofitoses crônicas e profundas, o status de imunocomprometidos geralmente justifica o uso da terapia sistêmica. Além do fato de que a infecção fúngica é mais facilmente disseminada. A griseofulvina e terbinafina apresentam o melhor perfil de eficácia/segurança nestes doentes, em comparação com os azólicos (itraconazol ou voriconazol) que muitas vezes apresentam problemas de interação medicamentosa (GUPTA et al., 2015; ROSEN; GOLD, 2016). Vale ressaltar que casos de tolerância e resistência, para as diversas formas de dermatofitoses, foram relatadas na literatura (MARTINEZ-ROSSI et al., 2008; SANGLARD, 2016)

## **2.8. Sensibilidade *in vivo* e *in vitro***

A resistência antifúngica é um fenômeno, relativamente frequente, complexo e de importância médica porque isso poderia levar ao fracasso do tratamento. Pode ser esquematicamente o resultado da resistência chamada "clínica" ou microbiológica, ou ainda componente dos dois (PFALLER, 2012).

A resistência clínica é definida como sendo a persistência ou a progressão de uma infecção, apesar de uma terapia antimicrobiana adequada. Melhor dizendo, é a incapacidade de erradicar uma infecção fúngica, apesar da administração de um agente antifúngico com uma atividade *in vitro* contra o organismo. Essa incapacidade *in vivo* pode ser atribuída a múltiplos fatores associados ao micro-organismo e ao hospedeiro, nomeadamente a utilização ou dosagem inadequada de drogas. Desse modo, o crescimento de cepas resistentes é estimulado, o que pode levar a infecções fúngicas difíceis de tratar. As causas da resistência clínica são várias, incluindo o local de infecção mais ou menos acessível para o antifúngico, ou causas farmacocinéticas (má absorção, interações medicamentosas, etc.) (MARICHAL et al., 1999; TURNIDGE; PATERSON, 2007; PFALLER, 2012; VANDEPUTTE et al., 2012).

A resistência microbiológica, por sua vez, é definida como sendo a não sensibilidade de um fungo a um agente antifúngico, *in vitro*, a concentrações inibitórias mínimas (CIMs) que deveriam inibir o seu crescimento. Esse tipo de resistência inclui a chamada resistência natural ou "intrínseca", tal como a observada com a *Candida krusei*, espécie naturalmente resistente e a referida resistência "adquirida", resultado de uma exposição, muitas vezes, prolongada ao

agente antifúngico dentro de um processo de seleção. A avaliação da sensibilidade *in vitro* das cepas é de particular importância no caso de infecção profunda para prever o sucesso terapêutico. Ela pode ser realizada por diversos métodos como disco de difusão e microdiluição em caldo e comerciais inclusive tais como a técnica Etest® de difusão em agar gelosado. O uso de métodos diversos, pode estar na origem de resultados com discrepâncias importantes observados entre muitas pesquisas (PFALLER, 2012; VANDEPUTTE et al., 2012).

Na tentativa de amenizar ou eliminar estas discrepâncias, a *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) desenvolveu e padronizou uma metodologia reprodutível e exequível para laboratórios de rotina, publicado em 2008 no documento M38-A2 do CLSI. Este documento traz a padronização em relação ao teste de sensibilidade dos fungos filamentosos utilizando o método de diluição em caldo, a percentagem de leitura para as diversas drogas e em relação a leitura para a concentração inibitória mínima (80%) em relação ao crescimento fúngico. Ademais, estes métodos melhoraram a compreensão quanto a distribuição de CIMs das cepas, permitindo estabelecer, em complemento dos dados de correlação *in vitro* / *in vivo*, os limites de interpretação clínica ou valores do Clinical BreakPoint, permitindo prever a falha do tratamento (CLSI, 2008; VANDEPUTTE et al., 2012).

Estudos realizados ao longo dos últimos anos, notificaram um aumento crescente da resistência a drogas antifúngicas comumente utilizadas para o tratamento de infecções em micoses cutâneas, inclusive as causadas por dermatófitos. Mukherjee et al., (2002) encontraram uma cepa de *T. rubrum* exibindo resistência primária à terbinafina. Esse achado foi corroborado por outros estudos que demonstraram que, possivelmente os dermatófitos, em especial *T. rubrum*, utiliza os mesmos mecanismos de resistência utilizados por outros fungos patogênicos para superar a inibição por terbinafina (OSBORNE et al., 2005; MARTINEZ-ROSSI et al., 2008; SANGLARD, 2016). Outro estudo recente relatou caso de resistência de *T. rubrum* e *T. tonsurans* diante da terbinafina (MAJID et al., 2016). Estes acontecimentos motivaram pesquisas em busca de informações sobre o perfil de sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos da rotina clínica, de modo a verificar a existência ou não de resistência por cepas isoladas de materiais clínicos. Gupta et al. (2009) relataram que num estudo realizado com *T. tonsurans* causadores de *tinea capitis*, dos 142 isolados estudados, 3 foram capazes de crescer em ágar dextrose sabouraud contendo 4 vezes o seu CIM griseofulvina, representando ocorrência de resistência. Outros estudos revelaram que 100 cepas de *T. rubrum*, isolados de pacientes com onicomicose, apresentaram valores elevados e grandes variações de CIM diante de fluconazol e itraconazol (SARIFAKIOGLU et al., 2007; AZAMBUJA et al., 2014).

Afim de sobreviverem, os micro-organismos desenvolveram vários mecanismos que lhes permitam responder à pressão seletiva exercida por vários ambientes e desafios competitivos. Entre esses mecanismos se destacam a absorção reduzida do fármaco, aumento do efluxo celular, alterações na interação do fármaco com o alvo, a sobre-expressão da molécula alvo, mutações, a superprodução ou mutação da enzima alvo (OSBORNE et al., 2005; MARTINEZ-ROSSI et al., 2008; VANDEPUTTE et al., 2012; HRYNCEWICZ-GWOZDZ et al. 2013). Outro mecanismo de resistência, que pode estar envolvido, como já foi descrito por Burkhart et al., (2002), é a produção de biofilme pelos dermatófitos. Dentro do biofilme, estrutura complexa e dinâmica, a resistência dos micro-organismos frente aos antifúngicos é consideravelmente aumentada, podendo ser até mil vezes maior, como mostrado com *C. albicans* (MUKHERJEE et al, 2003; LAFLEUR et al., 2006; TOBUDIC et al., 2011)

### 3 - JUSTIFICATIVAS

Nos dias atuais, são diagnosticadas dermatofitoses recorrente e crônica com frequência outrora não observada. Apesar de não colocar em risco a vida dos pacientes, essas infecções causam um desconforto significativo para os pacientes socialmente, emocionalmente e financeiramente. Este estudo justifica-se pela necessidade de compreender melhor o mecanismo envolvido na fisiopatologia desses fungos, utilizando modelos *in vitro* e *ex vivo*, utilizando fragmentos de unha como fonte de queratina, com posterior avaliação do perfil de sensibilidade antifúngica, *in vitro*, tanto na forma planctônica como na forma de biofilmes.

#### **4 - HIPÓTESES**

1. As espécies zoofílicas e geofílicas de dermatófitos são capazes de formar biofilmes *in vitro* e *ex vivo*.
2. Os biofilmes formados pelos dermatófitos apresentam uma baixa sensibilidade aos antifúngicos.

## 5 - OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo geral

Verificar e caracterizar a formação do biofilme *in vitro* e em modelo *ex vivo* pelos dermatófitos, assim como, determinar a sensibilidade dos dermatófitos na forma planctônica e em biofilme.

### 5.2. Objetivos específicos

1. Averiguar a capacidade de formação de biofilme por diferentes espécies de dermatófitos *in vitro* e *ex vivo*.
2. Averiguar a capacidade de formação de biofilme por diferentes espécies de dermatófitos em modelo *ex vivo* (fragmentos de unha)
3. Determinar a sensibilidade dos dermatófitos na forma plantônica frente aos antifúngicos.
4. Determinar a sensibilidade dos biofilmes de dermatófitos frente aos antifúngicos

## 6 - MATERIAL E METODOS

### 6.1. Local do estudo

As pesquisas foram realizadas nos laboratórios do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), da Universidade Federal do Ceará, com participação da Central analítica na obtenção das imagens de microscopia eletrônica de varredura.

### 6.2. Micro-organismos

Neste estudo foram utilizadas 26 cepas clínicas isoladas de uma variedade de espécimes, incluindo raspado de pele, pelo, unha e cabelo, oriundos de humanos (15) e animais (11) com suspeita de dermatofitose, encaminhados por médicos e veterinários da Universidade Federal do Ceará (UFC) e da Universidade Estadual do Ceará (UECE), conforme demonstrado na Tabela 2. Todas as cepas foram cultivadas em ágar dextrose Sabouraud 2% (Difco-Dickinson- USA) adicionado de cloranfenicol 0,1% e em ágar micosel (Difco - Dickinson- USA) e incubadas a 28 °C durante 7 a 15 dias. A identificação das cepas foi realizada com base na observação das características morfológicas macro e microscópicas das colônias, segundo De Hoog et al. (2014).

**Tabela 2.** Espécies de dermatófitos utilizadas para a formação de biofilme e testes de sensibilidade

Cepa	Código da Micoteca	Origem
<i>T. rubrum</i>	05-06-110	Humana
<i>T. rubrum</i>	05-06-111	Humana
<i>T. rubrum</i>	05-06-112	Humana
<i>T. rubrum</i>	05-06-113	Humana
<i>T. tonsurans</i>	05-06-117	Humana
<i>T. tonsurans</i>	05-06-118	Humana
<i>T. tonsurans</i>	05-06-119	Humana
<i>T. tonsurans</i>	05-06-120	Humana
<i>T. tonsurans</i>	05-06-121	Humana
<i>T. tonsurans</i>	05-06-122	Humana
<i>T. mentagrophytes</i>	05-06-114	Animal

<i>T. mentagrophytes</i>	05-06-115	Animal
<i>T. mentagrophytes</i>	05-06-116	Animal
<i>M. gypseum</i>	05-06-133	Animal
<i>M. gypseum</i>	05-06-134	Animal
<i>M. gypseum</i>	05-06-135	Animal
<i>M. canis</i>	05-06-123	Humana
<i>M. canis</i>	05-06-124	Humana
<i>M. canis</i>	05-06-125	Humana
<i>M. canis</i>	05-06-126	Humana
<i>M. canis</i>	05-06-127	Humana
<i>M. canis</i>	05-06-128	Animal
<i>M. canis</i>	05-06-129	Animal
<i>M. canis</i>	05-06-130	Animal
<i>M. canis</i>	05-06-131	Animal
<i>M. canis</i>	05-06-132	Animal

### 6.3. Fragmentos de unha

Fragmentos de unhas saudáveis, cedidos por um membro da equipe do CEMM, foram cortados em fragmentos de aproximadamente 0,5 cm de comprimento e lavados com água destilada para a remoção de toda a sujeira e detritos. Antes do armazenamento foram autoclavados a 121 °C, durante 30 minutos para remover quaisquer contaminantes superficiais que poderiam influenciar os testes. Em seguida, foram mantidos em tubos vedados à temperatura ambiente (28 °C) até o uso.

### 6.4. Inóculo

Os inóculos foram preparados cobrindo as culturas de 7 a 15 dias com cerca de 5ml de solução salina estéril 0,9%, e raspando superfície das colônias com *swabs* estéreis. A mistura resultante foi transferida para tubos estéreis, e deixada decantar durante 5 minutos à temperatura de 28 °C, para sedimentação das hifas. As suspensões de conídios foram coletadas para outros tubos estéreis, tendo o cuidado de transferir unicamente o sobrenadante, sem hifas. Em seguida,

a turbidez dos inóculos foi ajustada segundo a escala 0,5 de McFarland contendo  $\sim 2$  a  $6 \times 10^6$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ , contadas microscópicamente num hemocítmetro.

## **6.5. Formação de biofilmes**

### **6.5.1. Ensaio de formação de biofilme *in vitro***

O ensaio de formação de biofilme em placas de poliestireno foi realizado com base no método descrito por Costa-Orlandi et al. (2014) para *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*. Todas as cepas foram cultivadas em ágar dextrose batata (Difco – Dickinson- USA) com exceção de *T. rubrum* cultivada em ágar aveia, e incubadas a 28 °C durante 7 dias. Os inóculos foram preparados como descrito anteriormente, diluídos em solução salina 0,9% para atingir uma concentração final de  $1 \times 10^6$  UFC (conídios)  $\text{ml}^{-1}$  na placa.

#### **a. Quantificação da biomassa do biofilme formado *in vitro* por cristal violeta (CV)**

A quantificação da biomassa foi feita pela metodologia de ensaio com cristal violeta, conforme a metodologia descrita por Cordeiro et al. (2015a). Foram utilizadas 26 cepas de dermatófitos, referidas na Tabela 2. Os biofilmes foram formados adicionando 200  $\mu\text{l}$  dos inóculos aos poços da placa de 96 poços (Kartel - Switzerland). Para cada cepa o experimento foi realizado em triplicata. Após 3 horas de adesão, os poços foram lavados com 200  $\mu\text{l}$  de salina 0,9% e foram adicionados 200  $\mu\text{l}$  de RPMI 1640 (Sigma - St Louis-USA). Em seguida, a placa foi incubada a 37 °C, sem agitação, durante 72 h, até a maturação do biofilme. Após remoção do meio de cultura, cada poço contendo biofilme formado foi lavado por duas vezes com solução salina 0,9%. Após secagem à temperatura de 28°C, os biofilmes foram fixados com 200  $\mu\text{l}$  de metanol 100% (GQ - Grupo Química, São Paulo, Brasil). Em seguida, os biofilmes foram corados com 200  $\mu\text{l}$  da solução de cristal violeta 0,5% durante 20 min, seguido de duas lavagens com solução salina 0,9% para remover o excesso do corante. Os biofilmes foram descorados pela adição de 200  $\mu\text{l}$  da solução de ácido acético 33% (GQ -Grupo Química, São Paulo, Brasil). Após dissolução completa do cristal violeta ( $\sim 1$  min) pelo ácido acético 33%, a solução de cada poço foi transferida para uma nova placa e, em seguida, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Biotek®) a um comprimento de 630 nm, para avaliar a capacidade formadora de biofilme das diferentes espécies de dermatófitos. Para fins de comparação, os valores de densidade óptica (DO) dos poços não inoculados com o microrganismo e dos poços

inoculados com *Candida albicans* ATCC 10231 foram usados como controle de esterilidade (branco) e positivo, respectivamente. Definiu-se o valor de corte ( $DO_c$ ) para o teste como sendo três desvios padrão acima da média de DO de controle negativo a 630 nm (CORDEIRO et al., 2015a). No final, as cepas foram classificadas como descritas por Cordeiro et al. (2015a), como não formadoras ( $DO \leq DO_c$ ), fracas formadoras ( $DO_c < DO \leq 2 \times DO_c$ ), formadora moderada ( $2 \times DO_c < DO \leq 4 \times DO_c$ ), e fortes formadoras ( $4 \times DO_c < DO$ ). Os resultados obtidos são representativos de três experimentos independentes.

### 6.5.2. Ensaio de formação de biofilme em modelo *ex vivo*

Para esse ensaio, foram utilizadas cinco cepas, uma de cada espécie, forte formadora de biofilme, segundo o critério de classificação descrito no tópico anterior. Numa placa de 24 poços (TPP - Switzerland) foram distribuídos 2 ml de ágar bacteriológico (Difco – Dickinson - USA) em cada poço, e solidificado a temperatura de 28 °C. Posteriormente, os fragmentos estéreis da unha foram adicionados de forma asséptica aos poços contendo o ágar bacteriológico solidificado. Aos poços contendo fragmentos de unha foram adicionados 100  $\mu$ l dos inóculos a  $1 \times 10^6$  UFC  $ml^{-1}$ , e a placa foi incubada a 37°C por 21 dias, equivalente ao período que leva ao aparecimento das lesões, segundo Chabasse (2008). A cada dois dias de intervalo, o ágar foi sendo humidificado pela adição de 50  $\mu$ l de solução salina 0,9% estéril a cada poço contendo os fragmentos de unha (Fig. 7).



**Figura 7.** Formação de biofilme em modelo *ex vivo*. (Fonte: CEMM)

### 6.6. Análise microscópica do biofilme de dermatófitos

Foram utilizadas três técnicas microscópicas para avaliar os biofilmes formados: Microscopia óptica, confocal e eletrônica de varredura. A microscopia óptica para a

visualização da matriz extracelular, a microscopia confocal para a análise quantitativa do coeficiente de rugosidade, espessura, biomassa e relação superfície-volume do biofilme e a microscopia eletrônica de varredura para análise morfológica do biofilme, conforme as metodologias descritas por Castelo-Branco et al. (2015) e Cordeiro et al. (2015b). Todos os testes foram realizados em triplicata.

As cinco cepas, uma de cada espécie, utilizadas para formação de biofilme sobre fragmentos de unha, foram utilizadas para formação de biofilme sobre lamínulas (Thermo Fisher Scientific - New York City - NY). Os biofilmes foram formados, adicionando 1000 µl de inóculo à placa de 24 poços (TPP - Switzerland) contendo lamínulas previamente esterilizadas. A placa foi incubada sem agitação a 37 °C durante 3 h para pré-adesão das células. Após este tempo, o sobrenadante foi cuidadosamente removido dos poços, e os poços foram lavados três vezes com solução salina 0,90% para remoção das células não aderidas. Foram adicionados 1000 µl de meio RPMI 1640 (Sigma - St Louis - USA) aos poços contendo as células aderidas às lamínulas, e a placa foi incubada à 37 °C durante 72 h para formação do biofilme maduro (Fig. 8).

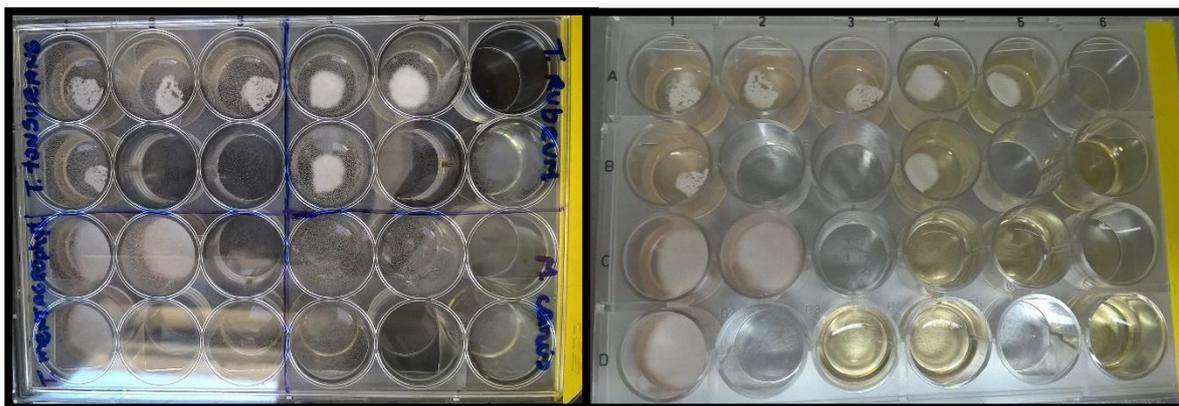
A detecção da matriz extracelular se fez, seguindo um método qualitativo descrito por Castelo-Branco et al. (2015), utilizando o vermelho congo para detecção de polissacarídeos que constituem a fração majoritária da matriz extracelular dos biofilmes. Após a formação do biofilme sobre lamínulas, removeu-se o meio, e o biofilme foi lavado por duas vezes com solução salina 0,9% estéril e fixado com 500 µl de cloreto de cetilpirideno (10 mM) (Sigma - Aldrich - São Paulo - Brasil) por 30 segundos. Após remoção da solução de fixação, as lamínulas foram secadas a temperatura de 28 °C durante 30 minutos, e coradas com 500 µl de uma mistura 2:1 (vol/vol) de solução saturada de vermelho do Congo (Sigma - Aldrich - St Louis - USA) e 10% de Tween 80 (ISOFAR - Rio de Janeiro - Brasil) por 15 minutos. Os poços foram lavados duas vezes com solução salina estéril 0,9% para remover o excesso de corante, e em seguida, as lamínulas de poliestireno foram coradas com carbol de fucsina 10%, por 6 minutos. O conteúdo foi removido e os biofilmes formados em lamínulas foram lavados com solução salina estéril 0,9%. Após secagem a temperatura de 28 °C, as lamínulas foram visualizadas no microscópio óptico OLYMPUS BX41 e câmera OLYMPUS DP71.

Para a análise quantitativa da estrutura, pela microscopia confocal, os biofilmes formados sobre as lamínulas e fragmentos de unha foram processados segundo a metodologia descrita por Castelo-Branco et al. (2015). Os biofilmes foram lavados com solução salina 0,9% e cobertos com 200 µl do corante fluorescente Live/Dead (Invitrogen™ - MA). Após 30 minutos, as lamínulas e os fragmentos de unha nos quais se formaram biofilmes foram observados em

microscópio Confocal Nikon C2, a 488 nm para detecção do fluorocromo Syto9, que identifica células vivas, e a 561nm, e do fluorocromo iodeto de propídeo, que identifica células mortas. Para as análises, imagens tridimensionais foram coletadas de cinco pontos equidistantes do biofilme, a fim de se obterem resultados representativos sobre a amostra. As análises para espessura média, coeficiente de rugosidade, a biomassa total, e a relação superfície-volume (biovolume) foram realizadas, utilizando a ferramenta COMSTAT2 associada ao software ImageJ1.50i (HEYDORN et al., 2000; COLLINS, 2007).

A espessura é definida como a espessura máxima em um determinado local, ignorando poros e vazios dentro do biofilme. A distribuição da espessura pode ser utilizada para calcular uma gama de variáveis, incluindo a rugosidade do biofilme e a espessura média do biofilme. A rugosidade do biofilme fornece uma medida de quanto a espessura do biofilme varia, e é um indicador da heterogeneidade do biofilme. A espessura média do biofilme fornece uma medida do tamanho espacial do biofilme, e é a variável mais comumente usada na literatura de biofilmes. O bio-volume representa o volume total do biofilme, e também fornece uma estimativa da biomassa no biofilme. A relação superfície / volume é a área de superfície dividida pelo bio-volume. A relação superfície / volume reflete qual fração do biofilme está de fato exposta ao fluxo de nutrientes e, portanto, pode indicar como o biofilme se adapta ao ambiente.

Para a análise morfológica, pela microscopia eletrônica de varredura (MEV), os biofilmes formados em lamínulas, em fragmentos de unha foram processados conforme a metodologia descrita por Cordeiro et al. (2015). Os biofilmes foram fixados com 500 µl de solução de glutaraldeído 2,5% (Sigma - Aldrich - St Louis - USA) em tampão cacodilato (0,15M) (Electron Microscopy Sciences –Hatfield - PA), com azul de alcian 0,1% (Sigma - Aldrich - São Paulo - Brasil) que preserva a estrutura dos fungos, *overnight* a 4 °C. Depois, os biofilmes foram lavados com o tampão cacodilato por duas vezes. Após, seguiu-se uma série de desidratações alcoólicas ascendente: 50, 70, 80, 95 e 100% de etanol, repetida duas vezes cada, e por 10 minutos cada desidratação, seguido de secagem por 30 minutos à 28 °C. Após secagem, os biofilmes foram desidratados com hexametildisilazano (Sigma - St Louis - USA) durante 30 minutos e secos dentro de uma estufa a 35 °C, *overnight*. As lamínulas contendo o biofilme formado, e os fragmentos de unha foram recobertos com 10 nm de ouro (Emitech Q150T) e observados em microscópio eletrônico de varredura Quanta FEG 450, em alto vácuo a 20 kV. As imagens foram processadas em *software* Photoshop CC5 (Adobe).



**Figura 8.** Formação de biofilme em lamínulas para análises microscópicas.

## 6.7. O ensaio de sensibilidade a antifúngicos

### 6.7.1. Drogas

As drogas, itraconazol (Sigma - St. Louis-USA), voriconazol (Sigma - St. Louis-USA) e griseofulvina (Sigma - St. Louis-USA), foram dissolvidas em 100% de dimetilsulfóxido (Sigma - St. Louis-USA) em concentrações 100 vezes a maior concentração a ser testada. Em seguida, para o teste de sensibilidade das células em forma plantônica, a partir da solução estoque, foram preparadas, em RPMI 1640, soluções de concentração 4 vezes maior que a concentração a ser testada no primeiro poço, e diluições seriadas foram realizadas do poço 1 ao poço 10. As concentrações finais variaram de 0,125 a 64  $\mu\text{g ml}^{-1}$  para a griseofulvina, e de 0,001 a 0,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  para itraconazol e voriconazol, conforme preconizado pelo documento M38-A2 do CLSI. Para o teste de sensibilidade em biofilmes, as mesmas drogas foram utilizadas nas concentrações correspondentes ao CIM, 10 X CIM e 50 X CIM das células plantônicas.

### 6.7.2. Ensaio de sensibilidade a antifúngicos dos dermatófitos na forma planctônica

O ensaio foi efetuado segundo a técnica de microdiluição em caldo, preconizada pelo protocolo M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), aprovado para teste de sensibilidade aos antifúngicos para fungos filamentosos. Os inóculos das 26 cepas de dermatófitos foram preparados, como descrito anteriormente, e diluídos em meio RPMI 1640 de modo a obter a concentração de  $1 \times 10^3$  UFC.  $\text{ml}^{-1}$  nas placas. Cada poço da placa de microdiluição, contendo 100  $\mu\text{l}$  de droga antifúngica na concentração específica, foi inoculado com uma alíquota de 100  $\mu\text{l}$  destes inóculos. As placas foram incubadas sem agitação a 35 °C

durante 96 horas antes de serem determinados os valores da concentração inibitória mínima (CIM). Cada ensaio foi realizado em duplicata, em dois experimentos em tempos diferentes.

A CIM foi definida como sendo a menor concentração de um agente antifúngico que reduz visualmente 80 % do crescimento do organismo. A leitura foi feita, comparando o crescimento em cada poço com a do controle de crescimento, por dois pesquisadores em momentos diferentes. Como controle foram utilizadas as cepas de *Candida krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019. Para o controle da griseofulvina foi utilizada uma cepa de *T. mentagrophytes* CEMM-05-06-115, durante todo o teste.

### **6.7.3. Ensaio de sensibilidade a antifúngicos dos biofilmes de dermatófitos**

Para a sensibilidade em forma de biofilme foram utilizadas as 24 cepas formadoras de biofilme, conforme os critérios descritos na alínea a) do tópico 6.5.1. As drogas foram diluídas em RPMI nas concentrações correspondentes ao CIM, 10 X CIM e 50 X CIM das células plantônicas. Os biofilmes formados em placas de 96 poços, conforme a metodologia já descrita anteriormente, foram submetidos a tratamento com drogas em concentrações correspondentes ao CIM, 10 X CIM e 50 X CIM. Os poços da coluna 1 e 12 serviram de controle crescimento e controle negativo, respectivamente. Após 96 horas de incubação, os biofilmes foram lavados por duas vezes, com salina 0,9%, para remover as células fracamente aderidas e em seguida foram submetidos ao ensaio colorimétrico de XTT (Sigma - St. Louis-USA), para avaliar a presença de dermatófitos metabolicamente ativos. A metodologia descrita foi baseada no trabalho de Costa-Orlandi et al. (2014).

O sal XTT foi dissolvido em solução fisiológica tampão fosfato (PBS) na concentração final de 1 mg. ml<sup>-1</sup>. A solução foi esterilizada por filtração em membrana com poros de diâmetro de 0,22 µm. Em seguida, a solução de menadiona (Sigma - St. Louis-USA) foi preparada na concentração de 1 mM em etanol e esterilizada por filtração. Em cada poço, contendo o biofilme tratado, 50 µl de XTT e 4 µl de menadiona foram inoculados. Após a incubação no escuro por 3 horas a 37 °C, a totalidade da solução foi transferida para uma nova placa e a mudança colorimétrica da solução foi medida pela leitura no espectrofotômetro (Biotek<sup>®</sup>) a 490 nm. Todos os testes foram realizados em duplicata.

## 6.8. Análises estatísticas

Para a análise comparativa dos dados de absorbância intraespécie e interespécies investigadas, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste post hoc de Dunn para a comparação entre pares. Na comparação entre espécies, considerando os dados das espécies *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* e *M. gypseum*, foi utilizado a ANOVA, seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Para o teste de sensibilidade dos biofilmes, foi utilizada a ANOVA, seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni apenas na comparação entre as concentrações. Para a comparação entre os valores de controle e as concentrações destas drogas foi utilizado o teste não paramétrico de Fisher (teste exato de Fisher), seguido do teste post hoc de Dunn para a comparação entre pares. Em todas as situações, o nível de significância máximo, adotado para conclusões afirmativas, foi de 5%.

## 7 - RESULTADOS

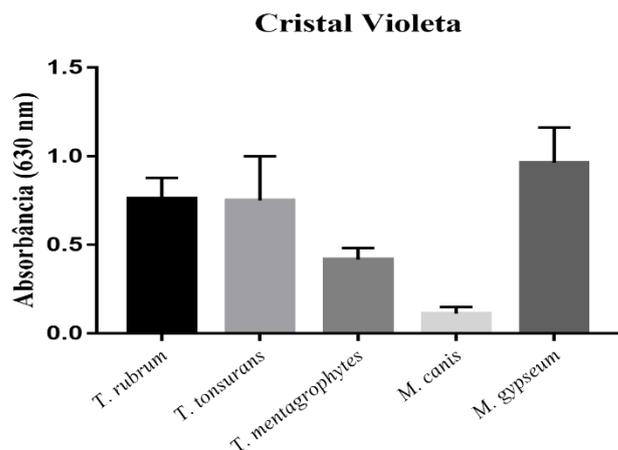
### 7.1. Quantificação da Biomassa

Conforme os valores da biomassa, dentre as 26 cepas de dermatófitos avaliadas neste estudo, 24 produziram biofilmes *in vitro*, e apenas duas cepas de *M. canis* não produziram biofilmes. As cepas foram classificadas como não formadoras (2/26), fracas (7/26), moderada (1/26) e fortes formadoras de biofilme (16/26), como referidas na Tabela 3. Dentre as espécies avaliadas, *M. gypseum*, *T. tonsurans*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *M. canis* produziram respectivamente maior e menor quantidade de biomassa ( $P < 0,05$ ). Além do mais, constatou-se uma variabilidade intra e interespécies com relação à capacidade de produção de biofilme, independente da fonte de isolamento ( $P < 0,05$ ) (Fig. 9).

**Tabela 3.** Distribuição das cepas de dermatófitos segundo sítio de isolamento e capacidade de formação de biofilme.

Espécies	Sítios (n)	DO (Média± dp)	Capacidade de formação de biofilme			
			Não aderente	Fraco	Moderado	Forte
<i>T. rubrum</i>	Unha (2)	0.751± 0.120	-	-	-	4
	Região plantar (2)					
<i>T. tonsurans</i>	Couro cabeludo (4)	0.832± 0.238	-	-	-	6
	Pele (2)					
<i>T. mentagrophytes</i>	Pelo de animal (3)	0.435± 0.059	-	-	-	3
<i>M. canis</i>	Pelo de animal (5)	0.100± 0.039	2	7	1	-
	Couro cabeludo (5)					
<i>M. gypseum</i>	Pelo de animal (3)	0.885± 0.192	-	-	-	3
<b>Total</b>	n= 26					

DO: Densidade Óptica; dp: Desvio padrão



**Figura 9.** Quantificação da biomassa por cristal violeta. Médias das absorbâncias de cada amostra obtidas com o ensaio de CV, em biofilmes formados in vitro por 26 cepas de dermatófitos durante 72h. O valor médio das absorbâncias foi calculado, após três repetições do teste, em triplicata. As barras de erro indicam desvios padrões da amostra em triplicata. De acordo com o critério estabelecido neste trabalho, com exceção de *M. canis*, todas as espécies foram consideradas fortes produtoras de biofilme.

### 7.1. Arquitetura dos biofilmes

Observou-se, pela microscopia óptica, que após 72 h de incubação, os conídios inoculados na placa se proliferaram produzindo hifas que se ramificaram em múltiplas direções, micro e macroconídios, envoltos por uma matriz extracelular rica em exopolissacarídeos corados em rosa pelo vermelho congo, sugerindo a presença de biofilme (Fig. 10, 1A-5A).

No que concerne à arquitetura dos biofilmes formados em lamínulas e fragmentos de unha (1B-5B e 1C-5C), as análises revelaram diferenças nos parâmetros analisados, para os dois modelos ( $P < 0,05$ ). Os biofilmes formados em lamínulas foram mais rugosos para todas as espécies, exceto para *M. canis* ( $P < 0,05$ ). Quanto a espessura, vale realçar que *T. rubrum* (3C), na maioria das vezes implicado em onicomicose, formou um biofilme mais espesso nas unhas, que as demais espécies. *T. tonsurans* formou o biofilmes mais espesso na lamínula (4B), enquanto que *M. canis* (1B e 1C) formou o biofilme menos espesso, em ambos os modelos ( $P < 0,05$ ). Quanto à biomassa, os biofilmes formados em fragmentos de unha apresentaram mais biomassa em relação aos biofilmes formados em lamínulas. A diferença pode estar associada as propriedades das superfícies e diferenças na disponibilidade de nutrientes. A Tabela 4 mostra os resultados das dimensões dos biofilmes de cada espécie.

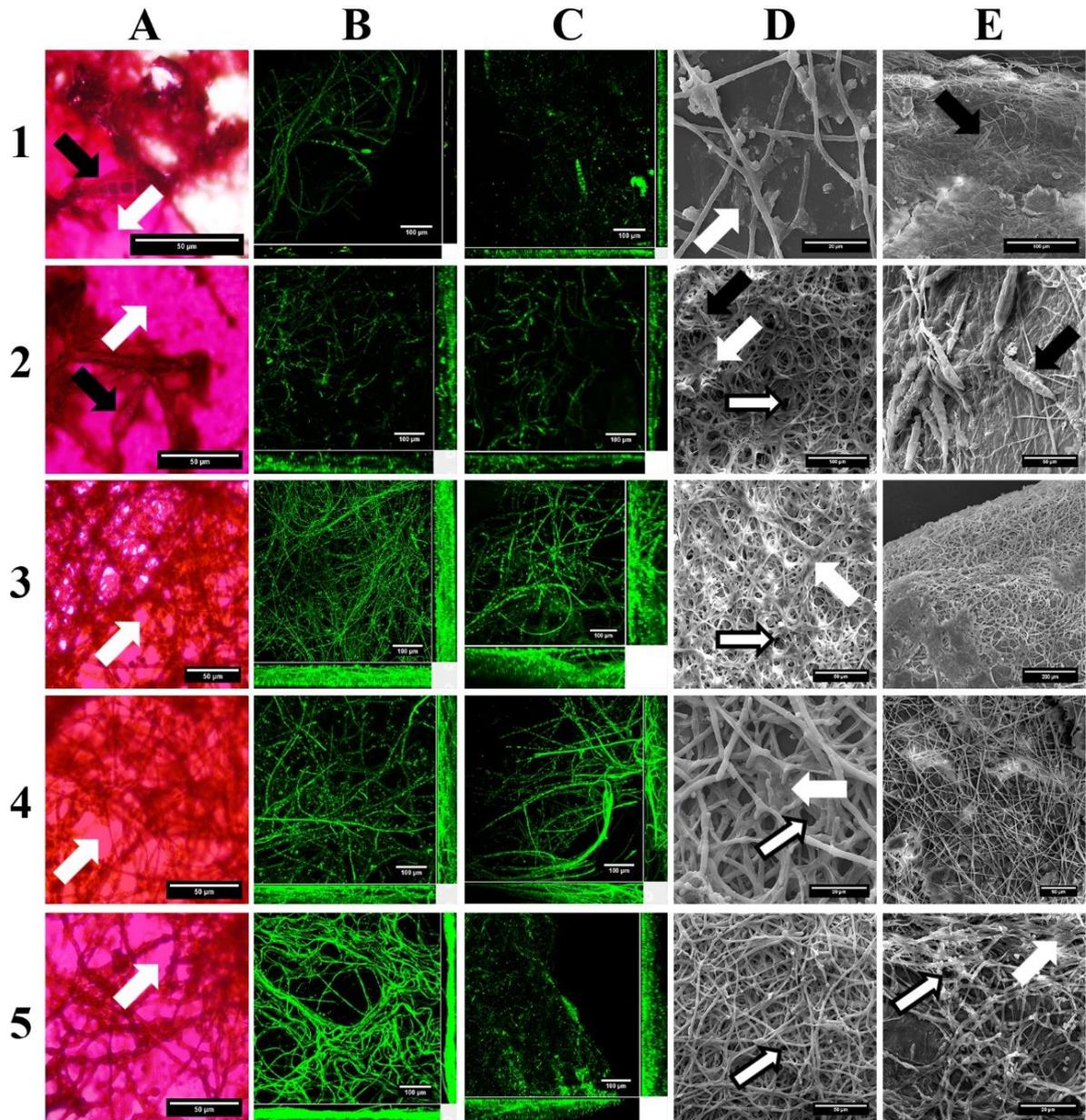
**Tabela 4.** Os valores mínimos e máximos para os parâmetros estruturais dos biofilmes de dermatófitos, quantificados pela análise da microscopia confocal, obtidos pela COMSTAT2.

Parâmetros	Espécies				
	<i>T. rubrum</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. tonsurans</i>	<i>M. gypseum</i>	<i>M. canis</i>
Coeficiente de Rugosidade					
Thermanox®	5,5±0,2	3,9±0,1	2,6±0,2	2,4±0,2	0,7±0,0
Unha	2,2±0,1	1,9±0,7	1,5±0,2	1,8±0,6	1,3±0,1
Biovolume ( $\mu\text{m}^2 \cdot \mu\text{m}^{-3}$ )					
Thermanox®	13,5±2,1	12,6±1,3	8,3±1,3	7,0±1,0	3,5±0,0
Unha	8,1±0,5	7,0±0,1	6,8±0,3	6,4±0,3	4,9±0,2
Espessura Média ( $\mu\text{m}$ )					
Thermanox®	131±34	119±17	141±29	129±20	48±10
Unha	141±9	116±21	117±4	104±12	65±2
Biomassa ( $\mu\text{m}^3 \cdot \mu\text{m}^{-2}$ )					
Thermanox®	110±27	101±14	108±19	97±12	33±10
Unha	158±4	117±3	101±2	113±5	62±6

Os valores indicam médias  $\pm$  desvios-padrão.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) com a sua grande profundidade de foco forneceu imagens tridimensionais dos biofilmes formados na superfície da lamínula e dos fragmentos de unha (1D-5D e 1E e 5E), permitindo uma melhor avaliação quanto a morfologia dos biofilmes. Em relação aos biofilmes formados sobre as lamínulas, a clareza das imagens permitiu observar, em todos os biofilmes, estruturas filamentosas, com presença de matriz extracelular nas regiões entre as hifas dando mais firmeza aos biofilmes (1D - 5D). Os biofilmes apresentaram diferença na organização e morfologia das hifas e conídios. Ademais, observou-se que *M. gypseum*, *T. rubrum* e *T. tonsurans* (2D , 3D e 4D) produziram biofilmes visivelmente mais densos que *M. canis* e *T. mentagrophytes* (1D e 5D), com hifas ramificadas extensivamente formando uma rede micelial. As imagens do MEV revelaram ainda que os biofilmes formados por *M. gypseum* e *T. rubrum* continham abundante matriz extracelular em relação às outras espécies (2D e 3D). Além disso, exibiram uma arquitetura semelhante, apresentando superfície rugosa com canais bem estruturados, definidos por hifas compactadas em torno. No biofilme formado por *T. tonsurans*, os microconídios são vistos aderidos às hifas com septações bem definidas e ramificadas (4D). *M. canis*, nas mesmas condições, formou um biofilme pouco denso, com pouca matriz extracelular (1D).

Com relação a formação de biofilme em fragmentos de unha após três semanas de incubação, observou-se em algumas partes das unhas afetadas, um crescimento massivo dos fungos na superfície da lâmina ungueal. Uma grande parte da superfície da unha se apresentava completamente substituída por elementos fúngicos, com circundante matriz extracelular característico do biofilme (1E - 5E).



**Figura 10.** Biofilme de dermatófitos, formados em lamínulas de Thermanox® e fragmentos de unhas, analisados por diferentes técnicas microscópicas. As cinco espécies analisadas neste estudo estão representadas da seguinte forma: 1. *M. canis*; 2. *M. gypseum*; 3. *T. rubrum*; 4. *T. tonsurans*; 5. *T. mentagrophytes*. A coloração com vermelho Congo é mostrada na coluna A. Estas imagens mostraram macroconídios individuais (1A, 2A, setas pretas) associadas a hifas emaranhadas de hifas (3A, 4A, 5A, filamentos) e matriz extracelular (setas brancas). Ampliação de 400x, escala 50µm. As colunas B e C correspondem a microscopia confocal de biofilmes vivos em lamínulas e fragmentos de unha, respectivamente. Observe as barras laterais das imagens indicando a espessura dos biofilmes. Imagem obtida com laser a 488 nm para a detecção de corante SYTO 9, que identifica células vivas. Ampliação de 400x, escala 100 µm. As colunas D e E correspondem à análise por SEM (alto vácuo a 20 kV) de biofilmes em lamínulas e fragmentos de unha, respectivamente. As setas pretas demonstram estruturas fúngicas; As setas brancas demonstram a matriz exopolimérica do biofilme e as setas brancas esboçadas demonstram os canais do biofilme. Observa-se hifas, matriz extracelular (setas brancas) nas regiões entre as hifas e canais bem definidos (setas esboçadas brancas) em biofilmes de *M. gypseum* (2D), *T. rubrum* (3D), *T. tonsurans* (4D) e *T. mentagrophytes* (5D e 5D). Além disso, observam-se macroconídios (seta preta) incorporados na matriz extracelular dos biofilmes de *M. canis* (1D) e *M. gypseum* (2D e 2D). Ampliações de 5000x (1D), 4000x (4D), 2500x (2D e 5D), 2000x (3D), 1500x (5D), 1000x (1E, 2D, 3E e 4E) e escala 20 µm (1D, 4D e 5E), 50 µm (2E, 3D, 4E e 5D), 100 µm (1E e 2D) e 200 µm (3E). (Fonte: CEMM)

## 7.2. Sensibilidade aos antifúngicos

### 7.2.1. Sensibilidade dos dermatófitos na forma plantônicas frente à antifúngicos

Em geral, os valores de CIM variaram de 0,0019-0,25 µg/ml para itraconazol, de 0,0019-0,125 µg/ml para voriconazol e de 1-4 µg/ml para griseofulvina. Os valores de CIM variaram entre 0.0039-0.0078 µg/ml, 0.0156-0.0312 µg/ml e 0.0078-0.0156 µg/ml para itraconazol, voriconazol e griseofulvina, respectivamente, para *T. rubrum* (4). Os valores de CIM (0.00195-0.0039 µg/ml) para itraconazol e voriconazol foram menores para *T. tonsurans* (6). Em relação à griseofulvina, os valores de CIM variaram de 1-4 µg/ml para *T. tonsurans* e *T. mentagrophytes* (3). Os valores de CIM variaram entre 0.03125-0.0625 µg/ml para itraconazol e voriconazol, para *T. mentagrophytes*. Para *M. gypseum* (3), os valores de CIM para itraconazol (0.03125-0.25 µg/ml), voriconazol (0.03125-0.125 µg/ml) e para a griseofulvina (0.0039-0.00781 µg/ml). Para *M. canis*, os valores de CIM variaram de 0.00195-0.125 µg/ml para itraconazol, de 0.0039-0.0625 µg/ml para voriconazol e de 0.5-2 µg/ml para a griseofulvina. Os valores de CIMs dessas drogas frente aos controles (*C. krusei* e *C. parapsilosis*) ficaram dentro da faixa aceitável para as três drogas testadas, conforme padronizado pelo documento M-38-A2 do CLSI. Vale destacar que alguns valores de CIM, para algumas drogas, foram semelhantes para algumas cepas. Os valores de CIM estão representados na Tabela 5.

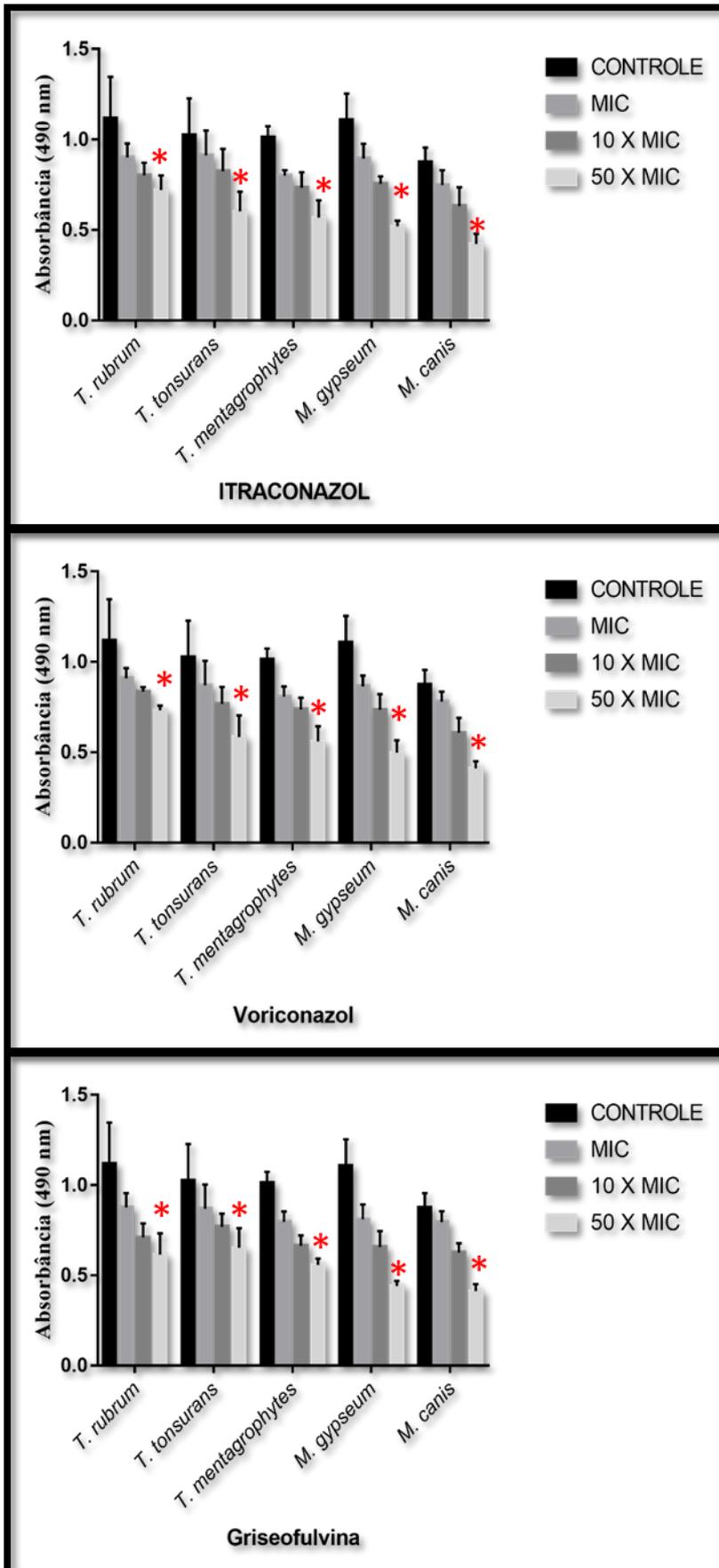
**Tabela 5.** Distribuição das cepas de dermatófitos por origem, capacidade formadora de biofilme e perfil de sensibilidade antifúngica diante itraconazol, voriconazol e griseofulvina.

Cepa	Código da Micoteca	Origem	Produção de biofilme	Concentração inibitória mínima (µg/ml)		
				ITC	VCZ	GRI
<i>T. rubrum</i>	05-06-110	Humana	Forte	0,0039	0,0156	0,0078
<i>T. rubrum</i>	05-06-111	Humana	Forte	0,0078	0,0312	0,0156
<i>T. rubrum</i>	05-06-112	Humana	Forte	0,0078	0,0156	0,0156
<i>T. rubrum</i>	05-06-113	Humana	Forte	0,0078	0,0312	0,0156
<i>T. tonsurans</i>	05-06-117	Humana	Forte	0,0039	0,0039	2
<i>T. tonsurans</i>	05-06-118	Humana	Forte	0,0039	0,0039	1
<i>T. tonsurans</i>	05-06-119	Humana	Forte	0,0019	0,0019	<2
<i>T. tonsurans</i>	05-06-120	Humana	Forte	0,0039	0,0039	2
<i>T. tonsurans</i>	05-06-121	Humana	Forte	0,0019	0,0019	1
<i>T. tonsurans</i>	05-06-122	Humana	Forte	0,0039	0,0039	4
<i>T. mentagrophytes</i>	05-06-114	Animal	Forte	0,0625	< 0,0312	2
<i>T. mentagrophytes</i>	05-06-115	Animal	Forte	0,0312	< 0,0312	1
<i>T. mentagrophytes</i>	05-06-116	Animal	Forte	0,0312	0,0625	4
<i>M. gypseum</i>	05-06-133	Animal	Forte	0,03125	0,125	<0,0039
<i>M. gypseum</i>	05-06-134	Animal	Forte	0,25	0,125	0,0078
<i>M. gypseum</i>	05-06-135	Animal	Forte	0,0312	0,0312	0,0078
<i>M. canis</i>	05-06-123	Humana	Fraco	0,0156	0,0156	0,5
<i>M. canis</i>	05-06-124	Humana	Fraco	0,0019	0,0039	1
<i>M. canis</i>	05-06-125	Humana	Fraco	0,0078	0,0078	0,5
<i>M. canis</i>	05-06-126	Humana	Fraco	0,0156	0,0078	0,5
<i>M. canis</i>	05-06-127	Humana	Fraco	0,0078	0,0039	0,5
<i>M. canis</i>	05-06-128	Animal	Não formou	0,0312	0,0312	1
<i>M. canis</i>	05-06-129	Animal	Fraco	0,0312	0,0312	1
<i>M. canis</i>	05-06-130	Animal	Não formou	0,0312	0,0156	0,5
<i>M. canis</i>	05-06-131	Animal	Moderado	0,1250	0,0625	2
<i>M. canis</i>	05-06-132	Animal	Fraco	0,0156	0,0156	0,5

ITC: itraconazol; VCZ: voriconazol; GRI: griseofulvina.

### 7.2.2. Sensibilidade dos biofilmes de dermatófitos aos antifúngicos

No segundo momento, avaliou-se a sensibilidade das cepas formadoras de biofilme (estudo prévio) frente a três agentes antimicrobianos (ITC, VCZ e GRI) nos valores de CIM, 10 x CIM e 50 x CIM. A atividade metabólica de todos os biofilmes tratados foi reduzida (tal como medido pelo método de XTT), para todos os três grupos de tratamento e concentrações. Vale destacar que, apesar da redução ter sido observada com todas as concentrações, o efeito mais pronunciado ocorreu com o valor de 50 x MIC, que reduziu de forma significativa a atividade metabólica ( $P < 0,05$ ), para as três drogas, em relação ao controle. Os três agentes testados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si. Estes resultados demonstraram que os dermatófitos crescidos sob forma de biofilmes são mais tolerantes aos mesmos agentes antifúngicos do que na forma planctônica. Os gráficos (Fig. 11) mostram os valores das absorbâncias representativas para a inibição da atividade metabólica dos biofilmes de dermatófitos, frente ao itraconazol, voriconazol e griseofulvina, respectivamente.



**Figura 11.** Valores das absorbâncias representativas para a inibição da atividade metabólica dos biofilmes de dermatófitos, para as três drogas avaliadas. Leitura no espectrofotômetro (490 nm).

\* Estatisticamente significativa em comparação com o controle ( $P < 0,05$ ).

## 8. DISCUSSÃO

A formação de biofilme como se sabe hoje, é um fenômeno “universal”, não só na natureza, mas também em infecções humanas, onde parece estar diretamente relacionada à resistência aos ambientes hostis, à imunidade do hospedeiro, aos tratamentos antimicrobianos e a cronicidade das infecções (RAMAGE et al., 2012; GUPTA et al., 2015). Os biofilmes podem ser definidos como sendo comunidades de células sésseis, estruturadas e dinâmicas, caracterizadas pela adesão a superfícies e envoltas por uma matriz exopolimérica produzida pelas células aderidas (RAMAGE et al., 2012).

Estudos anteriores relataram a capacidade de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*, espécies de dermatófitos mais isolados no mundo (HAYETTE; SACHELI, 2015), formarem biofilme *in vitro* (COSTA-ORLANDI et al., 2014, DOS SANTOS et al., 2015). Neste estudo, foi demonstrado que além das espécies de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*, outras espécies de interesse médico, nomeadamente *T. tonsurans*, *M. canis* e *M. gypseum*, foram capazes de formar biofilmes *in vitro* e, em modelo *ex vivo*. Os resultados de formação de biofilme, obtidos pela quantificação da biomassa, observados para *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* neste estudo reforçaram as conclusões do estudo prévio de Costa-Orlandi et al. (2014) que relataram que *T. rubrum* produziu um biofilme com maior quantidade de biomassa em relação ao *T. mentagrophytes*. É importante notar que os isolados de *T. rubrum* e *T. tonsurans*, espécies antropofílicas (BRILHANTE et al., 2004), e *M. gypseum*, espécie geofílica, apresentaram forte capacidade de formação de biofilme. De fato, sabe-se que *T. rubrum* têm sido o agente mais comum de dermatofitoses, sobretudo, em onicomicoses (HAYETTE; SACHELI, 2015). Esse fato se dá, provavelmente, em razão da sua característica antropofílica, que resulta em menor resposta imunológica (VENKATESAN et al., 2010). Entretanto, a habilidade de se associar em biofilmes também permite uma maior proteção do sistema imune (SILVA-DIAS et al., 2015). Assim sendo, a sua forte capacidade de formar biofilme pode ser resultado de sua adaptação aumentada em relação às demais espécies.

Ademais, as análises da estrutura dos biofilmes revelaram que *T. rubrum* formou um biofilme rugoso que, conforme Ning et al. (2013), é um indicativo de um biofilme heterogêneo, tendo provavelmente como característica, um crescimento horizontal em busca de nutrientes, formando muitos canais que permitem maior exposição aos nutrientes. Esse tipo de comportamento reflete nos resultados da biomassa total, tendo esse biofilme, do mesmo modo que *T. tonsurans* e *M. gypseum*, apresentado maiores quantidades de biomassa quando

comparado às outras espécies. Vale destacar que *T. tonsurans* e *T. rubrum* formaram biofilmes bastante espessos nas lamínulas e nos fragmentos de unha, respectivamente, o que poderia estar associado a abundância de matriz exopolimérica que pode acarretar uma maior resistência ao biofilme, pois além de restringir a difusão de substâncias e agentes antimicrobianos, protege fisicamente as células dos componentes do sistema imune (ITO et al., 2009, FLEMMING E WINGENDER, 2010, SILVA-DIAS et al., 2015). Neste contexto, a capacidade de formar biofilmes pode explicar a dificuldade no tratamento de infecções por *T. rubrum*, como é visto nos casos de infecções crônicas (ZAYAS et al., 1996; CORDEIRO et al., 2005).

É importante notar que *T. tonsurans*, outro fungo antropofílico, e *T. mentagrophytes*, fungo zoofílico, formaram biofilmes com aspectos morfológicos semelhantes, para os parâmetros analisados, apresentando visivelmente pouca matriz extracelular, em relação ao *T. rubrum*. *M. gypseum* que é um fungo geofílico causador de dermatofitose em humanos (VENKATESAN et al., 2010) demonstrou também forte capacidade de produção de biofilme. Essa capacidade de formar biofilme pode ser um fator importante para a sobrevivência deste fungo saprófita no ambiente.

As cepas de *M. canis* avaliadas neste estudo foram na sua maioria fracas produtoras de biofilme, sendo que duas cepas foram incapazes de produzir e uma formou um biofilme moderado. A hipótese é que, a razão provável para a diferença na formação de biofilme *in vitro* pelas diferentes espécies de dermatófitos poderia estar relacionada à diferença na adesão celular, influenciada pelas propriedades das superfícies, pela habilidade e tempo de adesão dos dermatófitos (BALDO et al., 2011), pela quantidade e tipo de enzimas produzidas (SHARIFZADEH et al., 2016), ou até mesmo pelas diferenças ecológicas das diferentes espécies.

A adesão é o primeiro contato na interação parasita-hospedeiro, de modo que é crucial para sobrevivência e/ou patogenicidade do microrganismo, inclusive a capacidade de formação de biofilme (BALDO et al., 2011, PRIEGNITZ et al., 2012, SILVA-DIAS et al., 2015). Ela é dependente das características da superfície com a qual ocorre a interação e dos fatores de virulência do próprio microrganismo (UMAMAHESWARI et al., 2016). Nesse sentido, estudos com fungos do gênero *Candida* mostraram que a diferença na capacidade de aderência a materiais inertes observada entre diversas espécies de *Candida* (TROFA et al., 2008, SILVA et al., 2010, 2011; SILVA-DIAS et al., 2015), além de ser um indicativo de provável aderência a células vivas (TROFA et al., 2008), explicaria a razão de algumas espécies colonizarem mais uma região corporal do que outras (SILVA et al., 2010), e ao mesmo tempo a diferença na

formação de biofilme entre microrganismos da mesma espécie (SILVA-DIAS et al., 2015). A importância da adesão na formação de biofilme tem sido estudada tanto em bactérias com em fungos (HORI; MATSUMOTO, 2010; PRIEGNITZ et al., 2012; SILVA-DIAS et al., 2015; DE GROOT et al., 2013), mas pouco se sabe sobre os mecanismos de aderência dos dermatófitos em materiais inertes.

Estudos utilizando modelos *in vitro* e *ex vivo*, demonstraram que a adesão dos artroconídios aos queratinócitos além de ser dependente do tempo é quantitativamente diferente para algumas espécies dos gêneros *Trichophyton* e *Microsporium* (ZURITA; HAY, 1987; BALDO et al., 2011). A exemplo de outros microrganismos, a adesão dos dermatófitos é mediada por interações das adesinas com receptores do hospedeiro e pelo envolvimento de proteases. No estudo recente conduzido por Sharifzadeh et al. (2016), foi demonstrado que os dermatófitos exibem padrões distintos de secreção de proteases. *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *M. gypseum* demonstraram ser secretadores da elastase, enquanto que as cepas de *M. canis* secretam fracamente ou não essa enzima. Esta evidência pode explicar, pelo menos em parte, a baixa produção de biofilmes por *M. canis* observada nesta pesquisa.

Em outra fase deste trabalho, avaliou-se a capacidade de formação de biofilmes em modelo *ex vivo*, em fragmentos de unha, tendo em vista que, a onicomicose, que é uma infecção da unha causada por leveduras e fungos filamentosos não-dermatofíticos, cujo capacidade de formar biofilme já foi demonstrada em vários estudos, é mais comumente causada por dermatófitos (GUPTA et al. 2016a). A utilização de modelo *ex vivo*, que é um meio caminho entre *in vitro* e *in vivo*, em que os tecidos ou órgãos são extraídos de um organismo e colocados em um ambiente artificial para posterior análise e experimentação (LEBEAUX et al., 2013), pode fornecer resultados que melhoram a compreensão de vários aspectos da fisiopatologia do microrganismo (PERES et al., 2016). A possibilidade dessas lesões, no caso dos dermatófitos, estarem associadas a formação de biofilme pode justificar a dificuldade em tratar, e conseqüentemente a persistência da infecção nos casos das onicomicoses dermatofíticas (GUPTA et al., 2016a, 2016c).

As imagens fornecidas pelo MEV permitiram observar que a lâmina ungueal foi severamente danificada pelas hifas, que parecem perfurar e penetrar as camadas superficiais da unha. Estes achados sustentam, em parte, as observações feitas por Burkhart et al. (2002) no caso das dermatofitomas, onde os elementos fúngicos se apresentaram firmemente ligados a placa ungueal, no entanto, sem estarem envolvidos pela matriz extracelular. Neste estudo, porém, observou-se a presença de matriz extracelular envolvendo as estruturas fúngicas,

característico de formação de biofilme, na superfície da unha. Esses achados corroboram com os achados de Peres et al. (2010), que descreveram presença de material exopolimérica envolvendo as estruturas fúngicas, aparecendo após três dias de infecção. Essa diferença de formação de biofilme entre as espécies, observada pela quantificação da biomassa e microscopia confocal foi confirmada pelas imagens fornecidas pelo MEV, que revelaram que *T. rubrum*, *T. tonsurans*, e *M. gypseum* formaram biofilmes com uma estrutura mais densa e compacta em relação às demais espécies avaliadas.

As cinco espécies incluídas no estudo pertencem a três grupos ecológicos distantes. A distância filogenética apesar de apresentar um impacto clínico (CHABASSE, 2008), não parece ter impacto na produção de biofilme. Os resultados aqui apresentados mostraram que, embora, *T. rubrum* e *M. gypseum* sejam ecologicamente distantes, formaram biofilmes que visivelmente compartilham características estruturais similares, como abundante produção de matriz, um biofilme rugoso, com canais bem definidos. O mesmo não se observa no caso de *T. rubrum* e *T. tonsurans*, que embora sejam duas espécies ecologicamente relacionadas, apresentaram diferenças na produção de matriz e na arquitetura dos biofilmes. Assim, provavelmente não há razão para supor que dois organismos relacionados irão se comportar de maneira semelhante durante a formação de biofilme, e do mesmo modo, provavelmente, organismos distantemente relacionados podem produzir biofilmes com características similares. Ademais, apesar de alguns estudos relacionarem a capacidade de formação de biofilmes com o sítio de isolamento (SILVA et al., 2010, MOHANDAS; BALLAL, 2011), não foi o caso neste estudo. Assim, a formação de biofilme pode estar associada a cronicidade e a recalcitrância ao tratamento, observado em muitos casos de dermatofitose, especialmente a onicomicose (BURKHART et al., 2002; GUPTA et al., 2016a, 2016b, 2016c).

Nesse sentido, em segundo momento deste estudo, foi comparada a sensibilidade de biofilmes de isolados clínicos de dermatófitos, determinado pelo ensaio metabólico de XTT, frente ao ITC, VCZ e GRI, cujo os valores CIMs no teste de sensibilidade *in vitro*, na forma planctônica, frente aos mesmos isolados, foram baixos. Apesar da existência, agora, de métodos referência, valores de corte (breakpoints), embora necessários para a interpretação relevante dos CIMs, ainda não foram estabelecidos para as drogas utilizadas no tratamento das dermatofitoses (CLSI M38-A2), de modo que não há critérios disponíveis, permitindo classificar um isolado como sensível ou resistente à essas drogas. Consequentemente, foi necessário comparar os resultados encontrados neste estudo com resultados de estudos

colaborativos presentes na literatura (ADIMI et al., 2013; INDIRA, 2014) que, utilizam o método CLSI M38-A2 para teste de sensibilidade dos dermatófitos.

Este estudo revelou que, em geral, os valores de CIMs (0,0019-0,25µg/ml) para ITC e VCZ frente a isolados clínicos de dermatófitos avaliados, na forma planctônica, foram baixos, o que é consistente com relatos do CLSI-M38-A2. Enquanto que para a GRI os valores de CIMs (0,0039 a 4 µg/ml) foram maiores. Se os pontos de corte tivessem sido estabelecidos para essas drogas, em relação aos dermatófitos, seriam considerados resistentes, todos os isolados cujo valores de CIM > 0,5 µg/ml para ITC e VCZ. Assim, todos os isolados seriam considerados “sensíveis” aos azólicos.

Entre os agentes azólicos testados neste estudo, para a maioria das cepas, os valores de CIM (0,0019-0,25 µg/ml) foram menores para o ITC. Vale destacar que esses valores de CIM para ITC e VCZ foram idênticos em algumas cepas. Os valores de CIM observados neste estudo foram menores do que os valores observados nos estudos conduzidos por Siqueira et al., (2008) e Araújo et al., (2009), no Brasil, e por Adimi et al. (2013), em Tehran. Nos seus resultados, Siqueira et al., (2008) e Araújo et al., (2009) relataram valores de CIM para ITC foram < 0,03-0,25 µg/ml e de 0,034 - 4 µg/ml, respectivamente, para *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*. Adimi et al. (2013), em seu relatório de estudo afirmaram que o itraconazol é potente contra os dermatófitos. Esse relato é corroborado pelos resultados deste estudo, onde o ITC demonstrou melhor eficácia na inibição do crescimento dos dermatófitos, expressando valores de CIM variando de 0.0019-0,25 µg/ml. O mesmo acaba acontecendo, quando se compara os resultados obtidos com o VCZ. Nos relatos de Adimi et al. (2013), os valores de CIM para VCZ variaram de 0.0078-8 µg/ml, enquanto que neste estudo os valores de CIM foram bem menores, variando de 0,0019-0,125 µg/ml. As variações nos valores de CIM podem ser justificadas, em parte, por influência dos requisitos do teste (FERNÁNDEZ-TORRES et al., 2002).

Em relação à GRI, os valores de CIM (0,0039 a 4 µg/ml) foram maiores, em comparação aos azólicos avaliados neste estudo. Conforme relatado pelo CLSI-M38-A2, os valores de CIM para a griseofulvina, na maioria das vezes, são  $\leq 1$  µg/ml. Nessas condições, os isolados de *T. rubrum* e *M. gypseum* cujo os valores de CIM  $\leq 1$  µg/ml, para a GRI seriam “sensíveis”. Vale ressaltar ainda que este último foi a espécie mais “sensível” à GRI, com menores valores de CIM (0,0039-0,00781 µg/ml). Por outro lado, para os isolados de *T. tonsurans* (4), *T. mentagrophytes* (2) e *M. canis* (1) cujo os valores de CIM para a GRI variaram entre 2-4 µg/ml seriam “resistentes”. No estudo feito em 2013, na Turquia, Yenisehirli et al. relataram que, dentre as drogas avaliadas contra algumas espécies de dermatófitos, a GRI demonstrou ser a

menos ativa, apresentando valores de CIM  $\geq 4 \mu\text{g/ml}$  para *T. mentagrophytes*. Esses resultados corroboram, em parte, com os resultados deste estudo, no qual os valores de CIMs da GRI também foram maiores que os azólicos contra *T. mentagrophytes*, variando de 1-4  $\mu\text{g/ml}$ . Contrariamente, ao relatado por Adimi et al. (2013), neste estudo, *M. gypseum* foi mais sensível à GRIS, VCZ e ITC, respectivamente.

Embora a prevalência da resistência aos antifúngicos seja inferior à observada em outros grupos de fungos, a falha clínica e resistência tem sido observada em pacientes tratados com drogas antifúngicas em casos de dermatofitoses (BURKHART et al., 2002; MUKHERJEE et al., 2003; OSBORNE et al., 2006). As recaídas, frequentemente observadas, nas dermatofitoses estão, na maioria das vezes associadas ao uso inapropriado ou interrupção da terapia antifúngica (INDIRA, 2014). Entretanto, como se sabe hoje, para sobreviverem, à figura de outros microorganismos, os dermatófitos desenvolveram mecanismos que lhes permitam responder à pressão seletiva exercida por vários ambientes e desafios competitivos (NIGAM et al., 2015). Alguns estudos relataram que espécies de dermatófitos exibiram resistência aos azólicos, griseofulvina e terbinafina, agentes antifúngicos com atividade substancial nas dermatofitoses, utilizando, provavelmente, mecanismos de resistência utilizados por outros fungos patogênicos (OSBORNE et al., 2005; MARTINEZ-ROSSI et al., 2008; NIGAM et al., 2015; MAJID et al., 2016, GHANNOUM et al., 2016). Outro potencial mecanismo de resistência, que pode estar envolvido, no caso dos dermatófitos, como já foi descrito por Burkhart et al., (2002), é a produção de biofilme.

Vários estudos relataram que a resistência dos biofilmes de *Candida albicans* frente aos azólicos (itraconazol, voriconazol) é particularmente pronunciada, dada a alta tolerância desses, permitindo a sua proliferação mesmo quando expostos a concentrações 1.000 vezes maiores do que as necessárias para inibir as células planctônicas (PAPPAS et al., 2009; NIGAM et al., 2015). Seidler et al. (2008), relataram que *Aspergillus fumigatus* formam biofilmes com sensibilidade reduzida frente ao itraconazol e voriconazol, necessitando de concentrações até 16 vezes maior que o CIM na forma planctônica, para reduzir o crescimento em biofilme. Os biofilmes, como tem sido demonstrado, conferem resistência tanto a imunidade do hospedeiro quanto aos agentes antimicrobianos.

Neste estudo, os resultados do teste de sensibilidade dos biofilmes de dermatófitos frente aos três antifúngicos, sugerem que doses mais elevadas são necessárias para uma melhor penetração dos fármacos nas células fúngicas, e inibição da atividade metabólica. Estes resultados demonstraram que os dermatófitos se apresentando na forma de biofilme são mais

resistentes a esses agentes antifúngicos do que à forma planctônica. É interessante notar que os organismos formadores de biofilme exibiram perfis de resistência uniformes aos diferentes antifúngicos avaliados, necessitando de concentrações de 50 x CIM, para reduzir significativamente a atividade metabólica. Assim, a capacidade dos dermatófitos de aderir ao tecido do hospedeiro e formar biofilme, além de ser um fator importante na sua patogênese, também pode ser um importante mecanismo de resistência às drogas antifúngicas convencionalmente utilizadas no tratamento das dermatofitoses e que por consequência pode estar relacionado disseminação da doença (PERES et al., 2010; JASIM et al., 2016).

## 9. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstram que todas as espécies de dermatófitos avaliadas foram capazes de aderir a superfícies inertes e, em fragmentos de unha formando biofilmes, com densidade e arquitetura diferentes, ou seja com arranjos, canais e matriz em abundância diferente. Essa capacidade de formação está provavelmente associada a fatores específicos de cada espécie, nomeadamente a capacidade de adesão ao substrato, e tipo de superfície. *T. rubrum*, espécie mundialmente mais isolada, sobretudo nos casos de onicomicose, apresentou forte capacidade formadora, produzindo um biofilme rugoso e espesso, sobretudo em fragmentos de unha, o poderia explicar a dificuldade em tratar a micose de unha, provocada por esse fungo. Os resultados dos testes de sensibilidade demonstraram que os dermatófitos se apresentando na forma de biofilme são mais resistentes aos agentes antifúngicos do que à forma planctônica, necessitando de concentrações de 50 x CIM, para reduzir significativamente a atividade metabólica. Diante destas observações, a pesquisa para o desenvolvimento de uma terapia antibiofilme eficaz seria um percurso importante nas investigações futuras em relação às dermatofitoses.

## 10. REFERÊNCIAS

- ADIMI, P.; SEYED, J.H.; MAHMOOD, M.; HOSSEIN, M.; MOHAMMAD, R.Z.; MASOOD, E.; ALI, R.M.; MOHSEN, G.; PARIVASH, K. *In vitro* Activity of 10 Antifungal Agents against 320 Dermatophyte Strains Using Microdilution Method in Tehran. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 537-545, 2013.
- AHMADI, B.; MIRHENDI, H.; SHIDFAR, M.R.; NOURIPOUR-SISAKHT, S.; JALALIZAND, N.; GERAMISHOAR, M.; SHOKOOHI, G.R. A comparative study on morphological versus molecular identification of dermatophyte isolates. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 25, n. 1, p. 29-35, 2015.
- AJELLO, L. Natural history of the dermatophytes and related fungi. **Mycopathologia et mycologia applicata**, v. 53, n. 1, p. 93-110, 1974.
- ALJABRE, S.H.; RICHARDSON M.D.; SCOTT E.M.; SHANKLAND G.S. Germination of *Trichophyton mentagrophytes* on human stratum corneum *in vitro*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 30, p. 145-52, 1992.
- ALJABRE, S.H.; RICHARDSON, M.D.; SCOTT, E.M., RASHID, A.; SHANKLAND, G.S. Adherence of arthroconidia and germlings of anthropophilic and zoophilic varieties of *Trichophyton mentagrophytes* to human corneocytes as an early event in the pathogenesis of dermatophytosis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 18, n. 3, p. 231-235, 1993.
- ALLAM, N.G.; ABD EL-ZAHER, E.H.F. Protective role of *Aspergillus fumigatus* melanina against ultraviolet (UV) irradiation and *Bjerkandera adusta* melanin as a candidate vaccine against systemic candidiasis. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 24, p. 6566-6577, 2012.
- ARAÚJO, C.R.; MIRANDA, K.C.; FERNANDES, O.D.E.F.; SOARES, A.J.; SILVA, M.D.O.R. *In vitro* susceptibility testing of dermatophytes isolated in Goiania, Brazil, against five antifungal agents by broth microdilution method. **Revista do Instituto Medicina Tropical São Paulo**, v. 51, n. 1, p. 9-12, 2009.
- ATES, A.; OZCAN, K.; ILKIT, M. Diagnostic value of morphological, physiological and tests in distinguishing *Trichophyton rubrum* from *Trichophyton mentagrophytes* complex. **Medical Mycology**, v. 46, n. 8, p. 811-822, 2008.
- AZAMBUJA, C.V.; PIMMEL, L.A.; KLAFKE, G.B.; XAVIER, M.O. Onychomycosis: Clinical, mycological and *in vitro* susceptibility testing of isolates of *Trichophyton rubrum*. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 89, n. 4, p. 581-586, 2014.
- BALDO, A.; MONOD, M.; MATHY, A.; CAMBIER, L.; DEFAWEUX, TV.; SYMOENS, F.; ANTOINE, N.; MIGNON, B. Mechanisms of skin adherence and invasion by dermatophytes. **Mycoses**, v. 55, n. 3, p. 218-223, 2012.
- BERGMAN, A.; HEIMER, D.; KONDORI, N.; ENROTH, H. Fast and specific dermatophyte detection by automated DNA extraction and real-time PCR. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 4, p. 205-211, 2013.

BERNHARDT, A.; DE BONI, L.; KRETZSCHMAR, H.A.; TINTELNOT, K. Molecular biological identification of fungal pathogens in FFPE tissue from cases of cephalic mycosis. **Pathologie**, v. 34, n. 6, p. 540-547, 2013.

BHATIA, V.K.; SHARMA, P.C. Epidemiological studies on dermatophytosis in human patients in Himachal Pradesh, India. **Springerplus**, v. 3, n. 2, p. 134, 2014.

BOLOGNIA, J.; JOSEPH, L.; JORIZZO, J.V. **Dermatologia**. 3ed. Elsevier. 2015.

BRASIL, K.W.; PINHEIRO, R.L.; PIMENTEL, I.C. Laboratory diagnosis of superficial and cutaneous mycosis: a comparison of the potassium hydroxide and calcofluor white methods. **Anais brasileiro de dermatologia**, v. 78, n. 5, p. 547-551, 2003.

BRILHANTE, R.S.N.; PAIXÃO, G.C.; SALVINO, L.K.; DIÓGENES, M.J.N.; BANDEIRA, S.P.; ROCHA, M.F.G.; DOS SANTOS, J.B.F.; SIDRIM, J.J.C. Epidemiology and ecology of dermatophytosis in fortaleza city: *Trichophyton tonsurans* as an important emergent pathogen of *tinea capitis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 5, p. 417-425, 2000.

BRILHANTE, R.S.N.; DE LIMA R.A.C.; MARQUES, F.J.F.; SILVA, N.F.; CAETANO, E.P.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; BANDEIRA, T.J.P.G.; MOREIRA, J.L.B.; CORDEIRO, R.A.; MONTEIRO, A.J.; DE CAMARGO, Z.P.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. *Histoplasma capsulatum* in planktonic and biofilm forms: *in vitro* susceptibility to amphotericin B, itraconazole and farnesol. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. 4, p. 394-399, 2015.

BRILHANTE, R.S.N.; CAETANO, E.P.; DE OLIVEIRA, J.S.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; SOUZA, E.R.Y.; PEREIRA, A.L.; CORDEIRO, R.A.; BANDEIRA, T.J.P.G.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Simvastatin inhibits planktonic cells and biofilms of *Candida* and *Cryptococcus* species. **The Brazilian journal of infectious diseases**, v. 19, n. 5, p. 459-465, 2015.

BRONDANI, L.; DÁVILA L.R.B.; BRONDANI, F.M.M.; RODRIGUES, F.M. Pesquisa de fungos dermatófitos queratinofílicos em amostras de areia de praças públicas do município de porto-velho. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, v. 7, n. 1, p. 137-150, 2016.

BURKHART, C.N.; BURKHART, C.G.; GUPTA, A.K. Dermatophytoma: recalcitrance to Treatment because of existence of fungal biofilm. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 47, n. 4, p. 629-31, 2002.

CALADO, N.B.; DE SOUSA, J.F.C.; DINIZ, M.G.; FERNANDES, A.C.; CARDOSO F.J.; ZAROR, L.C.; FERREIRA, M.A.; MILAN, E.P. A 7-year survey of superficial and cutaneous mycoses in a public hospital in Natal, northeast Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1296-1299, 2011.

CAMPOS, V. L.; ESCALANTE, G.; YAÑEZ, J.; ZAROR, C. A.; MONDACA, M. A. Isolation of arsenite-oxidizing bacteria from a natural biofilm associated to volcanic rocks of Atacama desert, Chile. **Journal of Basic Microbiology**, v. 49, p. 93-97, 2009.

CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; RIELLO, G.B.; VASCONCELOS, D.C.; GUEDES, G.M.M.; SERPA, R.; BANDEIRA, T.J.P.G.; MONTEIRO, A.J.; CORDEIRO, R.A.; ROCHA, M.F.G.; SIDRIM, J.J.C.; BRILHANTE, R.S.N. Farnesol increases the susceptibility of *Burkholderia pseudomallei* biofilm to antimicrobials used to treat melioidosis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, n. 3, p. 600-606, 2015.

CHABASSE, D. Les dermatophytes: d'où viennent-ils? Comment sont-ils devenus des parasites? **Journal de mycologie médicale**, v. 18, n. 1, p. 27-35, 2008.

CHABASSE, D.; PIHET, M. Les dermatophytes: les difficultés du diagnostic mycologique. **Revue francophone des laboratoires**, v. 2008, n. 406, p. 29-38, 2008.

CHEPCHIRCHIR, C.B.; NDINYA-ACHOLA, J.O. Dermatophyte infections in primary schoolchildren in kibera slums of nairobi. **East African Medical Journal**, v. 86, n. 2, p. 59-68, 2009.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved standard - Second edition. WAYNE, P.A. **CLSI document M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2008.

COLLINS, T.J. ImageJ for microscopy. **Biotechniques**, v. 43, n. 1, p. 25-30, 2007.

CORDEIRO, R.A.; BRILHANTE, R.S.; ROCHA, M.F.G.; RABENHORSCH, H.B.; MOREIRA, J.L.B.; GRANGEIRO, T.B.; SIDRIM, J.J.C. Antifungal susceptibility and genetic similarity of sequential isolates of *Trichophyton rubrum* from an immunocompetent patient with chronic dermatophytosis. **Clinical and Experimental Dermatology**. 31, n. 1, p. 22-124, 2005.

CORDEIRO, R.A.; DE OLIVEIRA, J.S.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; TEIXEIRA, C.E.; MARQUES, F.J.; BITTENCOURT, P.V.; CARVALHO, V.L.; BANDEIRA, T.J.; BRILHANTE, R.S.; MOREIRA, J.L.; PEREIRA-NETO, W.A.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F. *Candida tropicalis* isolates obtained from veterinary sources show resistance to azoles and produce virulence factors. **Medical Mycology**, v. 53, n. 2, p. 45-152, 2015.

CORDEIRO, R.A.; SERPA, R.; ALEXANDRE, C.F.U.; MARQUES, F.J.F.; MELO, C.V.S.; FRANCO, J.S.; EVANGELISTA, A.J.J.; CAMARGO, Z.P.; BRILHANTE, R.S.N.; ROCHA, M.F.G.; MOREIRA, J.L.B.; BANDEIRA, J.P.G.; SIDRIM, J.J.C. *Trichosporon inkin* biofilms produce extracellular proteases and exhibit resistance to antifungals. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. 11, p. 1277-86, 2015.

CORTEZ, A.C.A.; SOUZA, J.V.B.; SADAHIRO, A.; OLIVEIRA, J.A.A. Frequency and aetiology of dermatophytosis in children age 12 and under in the state of Amazonas, Brazil. **Revista Iberoamericana de Micología**. v. 29, n. 4, p. 223-26, 2012.

COSTA-ORLANDI, C.B.; SARDI, J.C.; SANTOS, C.T.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; MENDES GIANNINI, M.J.S. *In vitro* characterization of *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* Biofilms. **Biofouling**, v. 30, n. 6, p. 719-27, 2014.

COULIBALY, O.; KONE, A.K.; NIARÉ-DOUMBO, S.; GOÏTA, S.; GAUDART, J.; DJIMDÉ, A.A.; PIARROUX, R.; DOUMBO, O.K.; THERA, M.A.; RANQUE, S.

Dermatophytosis among schoolchildren in three eco-climatic zones of Mali. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, e0004675, 2016.

CROSS A.S. What is a virulence factor? **Critical Care**, v. 12, n. 6, p. 196, 2008.

DAMÁZIO, P.M.R.; LACERDA, H.R.; FILHO, A.M.L.; MAGALHÃES, O.M.C.; NEVES, R.P. Epidemiologia, etiologia e formas clínicas das dermatofitoses em Pernambuco, 1995-2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 4, p. 484-86, 2007.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 2, p. 114-122, 2003.

DE GROOT, P.W.J.; BADER, O.; DE BOER, A.D.; WEIG, M.; CHAUHAN, N. “Adhesins in human fungal pathogens: Glue with plenty of stick”. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n; 4, p. 470–481, 2013.

DE HOOG, G.S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUERAS, M.J. The ultimate benchtool for diagnostics. **Atlas of Clinical Fungi, 4nd ed.** Utrecht: Centraal bureau voor Schimmel cultures, 2014.

DE SOUSA; M.G.T.; SANTANA, G.B.; CRIADO, P.R.; BENARD, G. Chronic widespread dermatophytosis due to *Trichophyton rubrum*: A syndrome associated with a *Trichophyton* specific functional defect of phagocytes. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. p. 10–17, 2015.

DEVELOUX, M. Griseofulvin. **Annales de Dermatologie et Venereologie**, v. 128, n. 12, p. 1317-1325, 2001.

DHIEB, I.; FATHALLAH, A.; YAACOUB, A.; SLAMA, F.H.; SAID, M.B.; ZEMNI, R. Multiplex PCR assay for the detection of common dermatophyte nail infections. **Mycoses**, v. 57, n. 1, p. 19-26, 2013.

DONNELLY, J.P.; DE PAUW, B.E. Voriconazole: a new therapeutic agent with an extended spectrum of antifungal activity. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10 n. 1, p. 107-117, 2004.

DOS SANTOS, R.M.; DIAS-SOUZA, M.V. Effectiveness of five antidandruff cosmetic formulations against planktonic cells and biofilms of dermatophytes. **Saudi Journal of Biological Sciences**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.09.033>, 2015.

DUFOUR, D.; LEUNG, V.; LÉVESQUE, C. M.; Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. **Endodontic Topics**, v. 22, p. 2–16, 2012.

DUFRESNE, P. Identification des champignons d'importance médicale. **Stage de laboratoire**, 2014.

EMAM, S.M.A.; ABD EL-SALAM, O.H. Real-time PCR: A rapid and sensitive method for diagnosis of dermatophyte induced onychomycosis, a comparative study. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 52, n. 1 p. 83-90, 2016.

ERROL, R.; SHADOMY, H.J.; MARSHALL, L.G. Fundamental Medical Mycology. **Science**, 648p, 2011.

FERNÁNDEZ-TORRES, B.; CABAÑES, F.J.; CARRILLO-MUÑOZ, A.J.; ESTEBAN, A.; INZA, I.; ABARCA, L.; GUARRO, J. Collaborative evaluation of optimal antifungal susceptibility testing condition for dermatophytes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 11, p. 3999-4003, 2002.

FERREIRA-NOZAWA, M.S.; NOZAWAI, S.R.; MARTINEZ-ROSSI, N.M.; ROSSI, A. The dermatophyte *Trichophyton rubrum* secretes an EDTA-sensitive alkaline phosphatase on high-phosphate medium. **The Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 161-164, 2003.

FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews of Microbiology**, v. 8, p. 623–633, 2010.

GAO, L.; JIANG, S.; SUN, Y.; DENG, M.; WU Q.; LI M.; ZENG, T. Evaluation of the effects of photodynamic therapy alone and combined with standard antifungal therapy on planktonic cells and biofilms of *Fusarium* spp. and *Exophiala* spp. **Frontiers of Microbiology**, v. 7, p. 617, eCollection, 2016.

GHANNOUM, M. Azole resistance in dermatophytes: prevalence and mechanism of Action. **Journal of the American Podiatric Medical Association**, v. 106, n. 1, p. 79-86, 2016.

GHERBAWY, Y.L.; VOIGT, K. Molecular identification of fungi. **Springer Science & Business Media**, 501pp, 2010.

GRÄSER, Y.; DE HOOG, G.S.; KUIJPERS, A.F.A. Recent advances in the molecular taxonomy of dermatophytes. **Revista Iberoamericana de Micología**, 2000a.

GRASER, Y.; FROHLICH, J.; PRESBER, W.; DE HOOG, S. Microsatellite markers reveal geographic population differentiation in *Trichophyton rubrum*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 1058-1065, 2007.

GRASER, Y; JAMES S.; RICHARD S. The new species concept in dermatophytes: a Polyphasic approach. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 239-56, 2008.

GRÄSER, Y. Species identification of dermatophytes by MALDI-TOF MS. **Current Fungal Infection Reports**, v. 8, n. 3, p. 193-197, 2014.

GROVER, C.; ARORA, P.; MANCHANDA, V. Comparative evaluation of griseofulvin, terbinafine and fluconazole in the treatment of *tinea capitis*. **International Journal of Dermatology**, v. 51, n. 4, p. 455-458, 2012.

GUPTA, A.K.; SIMPSON, F.C. Routes of drug delivery into the nail apparatus: Implications for the efficacy of topical nail solutions in onychomycosis. **The Journal of Dermatological Treatment**, v. 18, n. 1, p. 2-4, 2015.

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

GUPTA, P.; SARKAR, S.; DAS, B.; BHATTACHARJEE, S.; TRIBEDI, P. Biofilm, pathogenesis and prevention - a journey to break the wall: a review. **Archives of Microbiology**, v. 198, n. 1, p. 1-15, 2016b.

GUPTA, A.K.; FOLEY, K.A.; VERSTEEG, S.G. New antifungal agents and new formulations against dermatophytes. **Mycopathologia**, 2016c.

HARDING, M.W.; MARQUES, L.L.R.; HOWARD, R.J.; OLSON M.E. Can filamentous fungi form biofilms? **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 11, p. 475-480, 2009.

HAYETE, M.P.; SACHELI, R. Dermatophytosis, Trends in epidemiology and diagnostic approach. **Current Fungal Infection Reports**, v. 9, n. 3, p. 164-179, 2015.

HEYDORN, A. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. **Microbiology**, v. 10, n. 14, p. 2395-2407, 2000.

HORI, K.; MATSUMOTO, S. Bacterial adhesion: From mechanism to control. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 3, p. 424-434, 2010

HOSPENTHAL, D.R.; RINALDI, M.G. Diagnosis and treatment of human mycoses. **Human press**, p.374-379, 2008.

HRYNCEWICZ-GWÓŹDŹ, A.; JAGIELSKI, T.; DOBROWOLSKA, A.; SZEPIETOWSKI, J.C.; BARAN, E. Identification and differentiation of *Trichophyton rubrum* clinical isolates using PCR-RFLP and RAPD methods. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 30, n. 6, p. 727-731, 2011.

HRYNCEWICZ-GWOZDZ A, KALINOWSKA K, PLOMER-NIEZGODA E, BIELECKI J, JAGIELSKI T. Increase in resistance to fluconazole and itraconazole in *Trichophyton rubrum* clinical isolates by sequential passages *in vitro* under drug pressure. **Mycopathologia**, v. 176, n. 1, p. 49-55, 2013.

INDIRA, G. *In vitro* antifungal susceptibility testing of 5 antifungal against dermatophytic species by CLSI (M38-A) microdilution method. **Clinical Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 145, 2014.

INDRANIL S. Veterinary Mycology. **Science**, 648pp, 2015.

ITO, A.; TANIUCHI, A.; MAY, T.; KAWATA, K.; OKABE, S. Increased antibiotic resistance of *Escherichia coli* in mature biofilms. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 12, p. 4093-4100, 2009.

JASIM, S.T.; FLAYYIH, M.T.; HASSAN, A.A.K. Biofilm formation and susceptibility to itraconazole in *Candida albicans*. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 8, p. 1704-1716, 2016.

JAVIER, R.N.; GEROSA, P.E.; DÍAZ O.A.; Onicomycosis: epidemiología, agentes causales y evaluación de los métodos diagnósticos de laboratorio. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 44, n. 1, 2012.

JONES, D. S.; TOBLER, D. J.; SCHAPERDOTH, I.; MAINIERO, M.; MACALADY, J. L. Community structure of subsurface biofilms in the thermal sulfidic caves of acquasanta terme, Italy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 5902–5910, 2010.

JOUSSON, O.; LECHENNE, B.; BONTEMS, O.; CAPOCCIA, S.; MIGNON, B.; BARBLAN, J.; QUANDRONI, M.; MONOD, M. Multiplication of an ancestral gene encoding secreted fungalysin preceded species differentiation in the dermatophytes *Trichophyton* and *Microsporum*. **Microbiology**, v. 150, n. 2, p. 301-310, 2004.

KAUFMAN, G.; HORWITZ, B.A.; DUEK, L.; ULLMAN, Y.; BERDICEVSKY, I. Infection stages of the dermatophyte pathogen *Trichophyton*: microscopic characterization and proteolytic enzymes. **Medical Mycology**, v. 45, p. 149-55, 2007.

KAUR, R.; KASHYAP, B.; BHALLA, P. onychomycosis-epidemiology, diagnosis and management. **Indian journal of medical microbiology**, v. 26, n. 2, p. 108-16, 2008.

KO, K.T.W.; STEPHENSON, S.L.; BAHKALI, A.H.; HYDE, K.D. From morphology to molecular biology: can we use sequence data to identify fungal endophytes? **Fungal Diversity**, v. 50, p. 113-120, 2011.

KUROKAWA, C.S.; SUGIZAKI, M.F.; PERAÇOLI, M.T.S. Virulence factors in fungi of Sstemic mycoses. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 40 n. 3, 1998.

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.

LEBEAUX, D.; CHAUHAN, A.; RENDUELES, O.; BELOIN, C. From *in vitro* to *in vivo* models of bacterial biofilm-related infections. **Pathogens**, v. 2, n. 2, p. 288-356, 2013.

LEE, W.J.; PARK, K.H.; KIM, M.S.; LEE, S.J.; KIM, D.W.; BANG, Y.J.; JUN J.B. Decreasing incidence of *Trichophyton mentagrophytes* in Korea: Analysis of 6,250 cases during the last 21-Year-Period (1992-2012). **Journal of Korean Medical Science**, v. 29, n. 2, p. 272-276, 2014.

MAJID, I.; SHEIKH, G.; KANTH, F.; HAKAK, R. Relapse after oral terbinafine therapy in dermatophytosis: A clinical and mycological study. **Indian Journal of Dermatology**, v. 61, n. 5, p. 529-533, 2016.

MARICHAL, P.; KOYMANS, L.; WILLEMSSENS, S.; BELLENS, D.; VERHASSELT, P.; LUYTEN, W. Contribution of mutations in the cytochrome P450 14-alpha-demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 145, n. 10, p. 2701-2713, 1999.

MARTINEZ-ROSSI, N.M.; PERES, N.T.A.; ROSSI, A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5, p. 369–383, 2008.

MIHALI, C.V.; BURUIANA, A.; TURCUS, V.; COVACI, A.; ARDELEAN, A. Morphological aspects of fruiting bodies in *Microsporum gypseum* on saboureaud's dextrose agar medium. **Annals of the Romanian Society for Cell Biology**, v. 16, n. 2, 2011.

MOCHIZUKI, T.; ANZAWA, K.; SAKATA, Y.; FUJIHIRO, M. Simple identification of *Trichophyton tonsurans* by chlamydospore-like structures produced in culture media. **Journal of Dermatology**, v. 40, n. 12, p. 1027–1032, 2013.

MOCHIZUKI, T.; TAKEDA, K.; ANZAWA, K. Molecular markers useful for epidemiology of dermatophytoses. **Journal of Dermatology**, v. 42, n. 3, p. 232-235, 2015.

MOLINA, A.D. Aspectos clínicos, diagnósticos y terapéuticos de las dermatofitosis. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica.**, v. 29, n. 33, p.33-39, 2011.

MOHANDAS, V.; BALLAL, M. Distribution of *Candida* Species in Different Clinical Samples and Their Virulence: Biofilm Formation, Proteinase and Phospholipase Production: A Study on Hospitalized Patients in Southern India. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 3, n. 1, p. 4-8, 2011.

MUKHERJEE, P.K.; LEIDICH, S.D.; ISHAM, N.; LEITNER, I. RYDER, N.S.; GHANNOUM, M.A. Clinical *Trichophyton rubrum* strain exhibiting primary resistance to terbinafine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 1, p. 82-86, 2003.

MUSZKIETA, L.; BEAUVAIS, A.; PÄHTZ, V.; GIBBONS, J.G.; ANTON LEBERRE, V.; BEAU, R.; SHIBUYA, K.; ROKAS, A.; FRANÇOIS, J.M.; KNIEMEYER, O.; BRAKHAGE, A.A.; LATGÉ, J.P. Investigation of *Aspergillus fumigatus* biofilm formation by various "omics" approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. 13, 2013.

NAGLOT, A.; SHRIMALI, D.D.; NATH, B.K.; GOGOI, H.K.; VEER, V.; CHANDER, TEWARI J.R. Recent trends of dermatophytosis in northeast India (Assam) and interpretation with published studies. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, n. 11, p. 111-120, 2015.

NENOFF, P.; ERHARD, M.; SIMON, J.C.; MUYLOWA, G.K.; HERRMANN, J.; RATAJ, W.; GRÄSER, Y. MALDI-TOF mass spectrometry - a rapid method for the identification of dermatophyte species. **Medical mycology**, v. 51, n. 1, p. 17–24, 2013.

NENOFF, P.; KRÜGER, C.; GINTER-HANSELMAYER, G.; TIETZ, H.J. Dermatophytoses: causative agents, epidemiology and pathogenesis. **Journal der deutschen dermatologischen gesellschaft**, v. 12, n. 3, p. 188-209, 2014.

NIGAM, P.K. Antifungal drugs and resistance: Current concepts. **Our Dermatology Online**, v. 6, n. 2, p. 212-221, 2015.

NING, Y.; HU, X.; LING, J.; DU, Y.; LIU, J.; LIU, H.; PENG, Z. *Candida albicans* survival and biofilm formation under starvation conditions. **International Endodontic Journal**, v. 46, n. 1, p. 62–70, 2013.

NWEZE, E.I., EKE, I. Dermatophytosis in northern Africa. **Mycoses**, v. 59, n. 3, p. 137-144, 2016.

OHST, T.; KUPSCH, C.; GRASER, Y. Detection of common dermatophytes in clinical specimens using a simple quantitative real-time TaqMan polymerase chain reaction assay. **British Journal of Dermatology**, v. 174, n. 3, p. 602–609, 2016.

OLIVEIRA, J.C. Tópicos em micologia médica 4ed. **Rio de Janeiro**, 230pp, 2014.

OSBORNE, C.S.; LEITNER, I.; FAVRE, B.; RYDER, N.S. Amino acid substitution in *Trichophyton rubrum* squalene epoxidase associated with resistance to terbinafine. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 49, n. 7, p. 2840–2844, 2005.

PAPPAS, P.G.; KAUFFMAN, C.A.; ANDES, D.; BENJAMIN, D.K.; CALANDRA, T.F.; EDWARDS, J.E.; FILLER, S.G.; FISHER, J.F.; KULLBERG, B.J.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REBOLI, A.C.; REX, J.H.; WALSH, T.J.; SOBEL, J.D. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the infectious diseases society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 5, p. 503–535, 2009.

PERCIVAL, S. L.; EMANUEL, C.; CUTTING, K. F.; WILLIAMS, D. W. Microbiology of the skin and the role of biofilms in infection. **International Wound Journal**, v. 9, n. 1, p. 14–32, 2012.

PERES, N.T.A.; MARANHÃO, F.C.A.; ROSSI, A.; MARTINEZ-ROSSI, N.M. Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. **Anais brasileiro de dermatologia**, v. 85, n. 5, p. 657–67, 2010.

PERES, N.T.A.; SILVA, L.G.; SANTOS, R.S.; JACOB, T.R.; PERSINOTI, G.F.; ROCHA, L.B.; FALCÃO, J.P.; ROSSI, A.; MARTINEZ-ROSSI, N.M. *In vitro* and *ex vivo* infection models help assess the molecular aspects of the interaction of *Trichophyton rubrum* with the host milieu. **Medical Mycology**, v. 54, n. 4, p. 420–427, 2016.

PFALLER, M.A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **American Journal of Medicine**, v. 125, n. 1, p. 3–13, 2012.

PIRES, C.A.A.; DA CRUZ, N.F.S.; LOBATO, A.M.; DE SOUSA, P.O.; CARNEIRO F.R.O.; MENDES, A.M.D. Clinical, epidemiological, and therapeutic profile of dermatophytosis. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 89, n. 2, p. 259–64, 2014.

PITANGUI, N.S.; SARDI, J.C.; SILVA, J.F.; BENADUCCI, T.; MORAES, S.R.A.; RODRÍGUEZ-ARELLANES, G.; TAYLOR, M.L.; MENDES-GIANNINI, M.J.; FUSCO, A.A.M. Adhesion of *Histoplasma capsulatum* to pneumocytes and biofilm formation on an abiotic surface. **Biofouling**, v. 28, n. 7, p. 711–8, 2012.

PONTES, Z.B.V.S.; OLIVEIRA, A.C.; GUERRA, F.Q.S.; PONTES, L.R.A.; SANTOS, J.P. Distribution of dermatophytes from soils of urban and rural areas of cities of paraíba state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical São paulo**, v. 55, n. 6, p. 377–383, 2013.

PRIEGNITZ, B.E.; WARGENAU, A.; BRANDT, U.; ROHDE, M.; DIETRICH, S.; KWADÉ, A.; KRULL, R.; FLEIBNER, A. The role of initial spore adhesion in pellet and biofilm formation in *Aspergillus niger*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 49, n. 1, p. 30–38, 2012.

RAMAGE, G.; RAJENDRAN, J.; SHERRY, L.; WILLIAMS, C. Fungal biofilm resistance. **International Journal of Microbiology**, v. 2012: p. 521-528, 2012.

RASHID, A.; SCOTT, E.; RICHARDSON, M.D. Early events in the invasion of the human nail plate by *Trichophyton mentagrophytes*. **The British Journal of Dermatology**, v. 133, n. 6, p.932-40, 1995.

ROSEN, T.; GOLD, L.F.S. Antifungal drugs for onychomycosis: Efficacy, safety, and mechanisms of action. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 35, n. 3, 2016,

ROSENTHAL, T. *Aulus Cornelius Celsus*: His contributions to dermatology. **Archives of dermatology**, v. 84, p. 129-134, 1961.

SANGLARD, D. Emerging Threats in antifungal-resistant fungal pathogens. **Frontiers in Medicine**, v. 3, n. 11, 2016.

SARDI, J.C.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; MENDES-GIANNINI, M.J. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 10-24, 2013.

SARIFAKIOGLU, E.; SEÇKIN, D.; DEMIRBILEK, M.; CAN, F. *In vitro* antifungal susceptibility patterns of dermatophyte strains causing *tinea unguium*. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 32, n. 6, p. 675-679, 2007.

SCHOELER, W.P.; KINMON, K. Dermatophyte test medium culture versus mycology laboratory analysis for suspected onychomycosis. A study of 100 cases in a geriatric population. **Journal of American Podiatric Medicine Association**, v. 90, n. 9, p. 450-9, 2000.

SEEBACHER, C.; BOUCHARA, J.P.; MIGNON, B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5, p. 335–352, 2008.

SEGAL, E.; FRENKEL, M. Dermatophyte infections in environmental contexts. **Research in Microbiology**, v. 165, n. 7, p. 564-569, 2015.

SEI, Y. 2011 Epidemiological survey of dermatomycoses in Japan. **Medical Mycology Journal**, v. 56, n. 4, p. 129-135, 2015.

SEIDLER, M.J.; SALVENMOSER, S.; MÜLLER, F.M. *Aspergillus fumigatus* forms biofilms with reduced antifungal drug susceptibility on bronchial epithelial cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 5, p. 4130-4136, 2008.

SHARIFZADEH, A.; SHOKRI, H.; KHOSRAVI, A.R. *In vitro* evaluation of antifungal susceptibility and keratinase, elastase, lipase and DNase activities of different dermatophyte species isolated from clinical specimens in Iran. **Mycose**, v. 59, n. 11, p. 710-719, 2016.

SHARMA, V.; KUMAWAT, T.K.; SHARMA, A.; SETH, R.; CHANDRA, S. Distribution and prevalence of dermatophytes in semi-arid region of india. **Advances in microbiology**, v. 5, n. 2, p. 93-106, 2015.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Micologia médica a luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 388p., 2004.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, DW.; AZEREDO, J. Silicone colonization by non-*Candida albicans* *Candida* species in the presence of urine. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 7, p. 747–754, 2010.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, DW.; AZEREDO, J. Adherence and biofilm formation of non *Candida albicans* *Candida* species. **Trends in microbiology**, v. 19, n. 5, p. 241-247, 2011.

SILVA-DIAS, A.; MIRANDA, I.M.; BRANCO, J.; SOARES, M.M.; VAZ, C.P.; RODRIGUES, A.G. Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: relationship among *Candida* spp. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 205, 2015.

SIMPANYA, M.F. Dermatophytes: their taxonomy, ecology and pathogenicity. Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi. **Bilbao, Spain: asociación española de micrología**, p. 1-12, 2000.

SINGH, I. Extracellular keratinase of some dermatophytes, their teleomorphs and related keratinolytic fungi. **European Journal of Experimental Biology**, v. 4, n. 4, p. 57-60, 2014.

SIQUEIRA, E.R.; FERREIRA, J.C.; PEDROSO, R.S.; LAVRADOR, M.A.; CANDIDO, R.C. Dermatophyte susceptibilities to antifungal azole agents tested in vitro by broth macro and microdilution methods. **Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo**, v. 50, n. 1, p. 1–5, 2008.

SOBUE, S.; SEKIGUCHI, K.; NABESHIMA, T. Intracutaneous distributions of fluconazole, itraconazole, and griseofulvin in guinea pigs and binding to human stratum corneum. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 216–223, 2004.

TABORDA C.P.; DA SILVA, M.B.; NOSANCHUK, J.D.; TRAVASSOS, L.R. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4, p. 331–339, 2008.

TAINWALA, R.A.M.; SHARMA, Y.K. Pathogenesis of dermatophytoses. **Indian Journal of Dermatology**, v. 56, n. 3, p. 259-261, 2011.

TILLES, G. Teignes et teigneux: Histoire médicale et sociale. **Springer**, 164 p., 2009.

TOBUDIC, S.; KRATZER, C.; PRESTERL, E. Azole-resistant *Candida* spp. -emerging pathogens **Mycoses**, v. 55, n1, p. 24-32, 2011.

TROFA, D.; GACSER, A.; NOSANCHUK, J.D. *Candida parapsilosis*, na emerging pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 4, p. 606–625, 2008.

TRENTIN, D.S.; GIORDANI, R.B.; MACEDO, A.J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato, Novo Hamburgo**, v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013.

TURNIDGE, J.; PATERSON, D.L. Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 391-408, 2007.

UMAMAHESWARI, S.; PARAMESWARI, N.; PRASANTH, A.D. Screening of proteolytic activity of dermatophytes on different media. **Asian Journal of Science and Technology**, v. 7, n. 2, pp.2388-2391, 2016.

VALARI, M.A.; AGELIKI, S.B.; THEONI, P.C.; TALIA, K.C.; PANGALI, A.B.; ARABATZIS, M. Cases of *tinea capitis* due to pale isolates of *Trichophyton violaceum* (*Trichophyton glabrum*) in south-east Europe. A challenge to the clinical laboratory. **Medical Mycology Case Reports**, v. 1, n. 1, p. 66–68, 2012.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A.T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, 26pp, 2012.

VAN ZUUREN, E.J.; FEDOROWICZ, Z.; EL-GOHARY, M. Evidence-based topical treatments for *tinea cruris* and *tinea corporis*: a summary of a Cochrane systematic review. **The Brazilian Journal of Dermatology**, v.172, n. 3, p. 616-41, 2015.

VASANTHI, R.; KARTHIKEYAN, D.; JEYA M. Study of biofilm production and antimicrobial resistance pattern of the bacterial isolates from invasive devices. **International Journal of Research in Health Sciences**, v. 2, n. 1, p. 415-424, 2014.

VENA, G.A.; CHIECO, P.; POSA P.; GAROFALO, A.R.; BOSCO, A.; CASSANO, N. Epidemiology of dermatophytoses: retrospective analysis from 2005 to 2010 and comparison with previous data from 1975. **New microbiologica**, v. 35, n. 2, p. 207-213, 2012.

VENKATESAN, G.; RANJITSINGH, A.J.A.; MURUGESAN, A.G.; GOKULSHANKAR, S.; RANJITH, M.S. Is the difference in keratinase activity of dermatophytes to different keratinaceous substrates an attribute of adaptation to parasitism? **Egyptian Dermatology Online Journal**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2010.

VILA, T.V.M.; ROZENTAL, S.; DE SÁ GUIMARÃES, C.M.D. A new model of *in vitro* fungal biofilms formed on human nail fragments allows reliable testing of laser and light therapies against onychomycosis. **Lasers in Medical Sciences**, v. 30, n. 3, p.1031-1039, 2015.

VYZANTIADIS, T.A.A.; JOHNSON, E.M.; KIBBLER, C.C. From the patient to the clinical mycology laboratory: how can we optimise microscopy and culture methods for mould identification? **Journal of clinical pathology**, v. 65, n. 6, p. 475-483, 2012.

WANG Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 8, p. 3131–3136, 1995.

WARISO K.T.; IGUNMA, J.A.; OBORO, I.L. Pattern of dermatophytes isolated in the medical microbiology laboratory of the University of Port Harcourt teaching hospital, Rivers State, Nigeria. **Advances in Microbiology**, v. 5, n. 5, p. 346-350, 2015.

WEITZMAN, I.; SUMMERBELL R.C. The dermatophytes. **Clinical microbiology reviews**, v. 8, n. 2, p. 240-259, 1995.

WHITE, T.C.; MARR, K.A.; BOWDEN, R.A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 2, p. 382-402, 1998.

WHITE, T.C.; OLIVER, B.G.; GRASER, Y.; HENN, M.R. Generating and testing molecular hypotheses in the dermatophytes. **Eukaryotic cell**, v. 7, n. 8, p. 1238-1245, 2008.

WOLCOTT, R. D.; EHRLICH, G. D. Biofilms and Chronic Infections. **JAMA: the journal of the American Medical Association**, v. 299, p. 2682–2684, 2008.

WU, L.C.; SUN, P.L.; CHANG, Y.T. Extensive deep dermatophytosis cause by *Trichophyton rubrum* in a patient with liver cirrhosis and chronic renal failure. **Mycopathologia**, v. 176, n. 5, p. 457-62, 2013.

YANG, J.L.; YANG, R.; WU, D.; YANG, S.Q.; WANG, M.S.; CHENG, A.C. Simple method for detection of superficial fungal infections in asian elephant. **Journal of food, agriculture and environment**, v. 8, n. 2, p. 225-1226, 2010.

YENISEHIRLI, G.; TUNCOGLU, E.; YENISEHIRLI, A.; BULUT, Y. *In vitro* activities of antifungal drugs against dermatophytes isolated in Tokat, Turkey. **International Journal of Dermatology**, v. 52, n. 12, p. 1557–1560, 2013.

YEVA, R.; TETSUHIRO, M.; TOHRU, G.; ANIS, K. Modified slide culture method for faster and easier identification of dermatophytes. **Microbiology indonesia**, v. 8, n. 3, p. 135-139, 2014.

YOSHIKI, M.; SUGIURA, KEITA.; HASHIMOTO, T.; UEDA, A.; KONNO, Y.; TATSUMI Y. Efficacy coefficients determined using nail permeability and antifungal activity in keratin-containing media are useful for predicting clinical efficacies of topical drugs for onychomycosis. **PLoS One**, v. 11, n. 7, e0159661, 2016.

YOUNGCHIM, S.; PORNSUWAN, S.; NOSANCHUK, J.D.; DANKAI, W.; VANITTANAKOM, N. Melanogenesis in dermatophyte species *in vitro* and during infection. **Microbiology**, v. 157, n. 8, p. 2348–2356, 2011.

ZAITZ, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, S., A.; RUIZ, L. R. B.; FRAMIL, V. M. S. Dermatofitoses. **Compêndio de micologia médica. 2ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan**, cap. 15, p. 157-167, 2010.

ZARAA, I.; HAWILO, A.; AOUNALLAH, A.; TROJNET, S.; EL EUCH, D.; MOKNI, M.; OSMAN, A. B. Inflammatory *tinea capitis*: A 12-year study and a review of the literature. **Mycoses**. v. 56, n. 2, p. 110-116, 2013.

ZAYAS, N.; REBELL, G. Chronic dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum*. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 35, n. 3, p. 17-20, 1996.

ZHANG, X.; WANG, Y.; CHI, W.; SHI, Y.; CHEN S.; LIN D.; JIN.Y. Metalloprotease genes of *Trichophyton mentagrophytes* are important for pathogenicity. **Medical Mycology**, v. 52, n. 1, p. 36-45, 2013.

ZINK, A.; PAPANAGIOTOU, V.; TODOROVA, A.; SEIDL, H.P.; NIEDERMEIER, A.; RING, J.; TRIDL-HOFFMANN, C. Outbreak of *Microsporum audouinii* in Munich – the return of infectious fungi in Germany. **Mycoses**, v. 57, n. 12, p. 765–770, 2014.

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

**APENDICE – ARTIGOS ORIGINADOS A PARTIR DO TRABALHO**

*Original Research - Biofouling – Submetido aos 31 de Outubro de 2016*

***In vitro and ex vivo biofilms of dermatophytes: With Highlight to *Trichophyton rubrum****

Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante<sup>a,\*</sup>, Edmilson Emanuel Monteiro Correia<sup>a</sup>, Glaucia Morgana de Melo Guedes<sup>a</sup>, Rosana Serpa<sup>a</sup>, Jonathas Sales de Oliveira<sup>a</sup>, Silviane Praciano Bandeira<sup>a</sup>, Lucas Pereira de Alencar<sup>a</sup>, Ana Raquel Colares de Andrade<sup>a</sup>, Vandbergue Santos Pereira<sup>a</sup>, Felipe Rodrigues Magalhães De Aguiar<sup>a</sup>, Débora de Souza Collares Maia Castelo-Branco<sup>a</sup>, Rossana de Aguiar Cordeiro<sup>a</sup>, Adriana de Queiroz Pinheiro<sup>b</sup>, Lucio Jackson Queiroz Chaves<sup>a</sup>, Waldemiro de Aquino Pereira Neto<sup>a</sup>, José Júlio Costa Sidrim<sup>a</sup>, Marcos Fábio Gadelha Rocha<sup>a,b</sup>.

<sup>a</sup>Specialized Center of Medical Micology, Federal University of Ceará, 1315 Nunes de Melo St, Fortaleza, Brazil. +55 85 33668594.

<sup>b</sup>Postgraduate Program in Veterinary Science, State University of Ceará; 1700 Dr. Silas Munguba Ave, Fortaleza, Brazil. +55 85 31019859.

**\*Corresponding author:** e-mail: [brilhante@ufc.br](mailto:brilhante@ufc.br).

**Abstract**

Biofilms are ecosystems that provide protection and distinct phenotypic characteristics to microorganisms, thus, leading to persistent infections, as observed in some cases of dermatophytosis. Therefore, the aim of this study was to evaluate the *in vitro and ex vivo*, on a nail fragment, biofilm-forming ability of dermatophytes. Initially, four isolates of *Trichophyton rubrum*, six *Trichophyton tonsurans*, three *Trichophyton mentagrophytes*, ten *Microsporum canis*, and three *Microsporum gypseum* were tested. Then, one strain per species presenting the best biofilm production was chosen for further studies. Crystal violet staining and optical, confocal and scanning electron microscopies revealed that all species formed biofilms *in vitro* and *ex vivo* with variable density and architecture. *T. rubrum* produced robust biofilms, with abundant matrix and biomass, while *M. canis* produced the weakest biofilms. This study sheds light on biofilms of different dermatophyte species, which will contribute for better understanding the pathophysiology of dermatophytosis.

**Key-Words:** Dermatophytes; biofilm; *in vitro*; *ex vivo*

## ANEXOS

### 1- MEIOS DE CULTURA

#### 1.1 Ágar Batata

Extrato de Batata 4,0g  
Dextrose 20,0g  
Ágar 15,0g

#### 1.2 Ágar Sabouraud dextrose

Glicose 20,0 g Peptona 10,0 g  
Extrato de levedura 5,0 g  
Ágar 20,0 g  
Água destilada q.s.p. 1000 mL

#### 1.3 Ágar Sabouraud suplementado de cloranfenicol

Peptona de soja 10,0 g/L  
Glicose 10,0 g/L  
Ágar 15,5 g/L  
Cloranfenicol 0,05g/L  
Água destilada q.s.p

#### 1.4 Mycosel

Peptona de soja 10,0 g/L  
Glicose 10,0 g/L  
Ágar 15,5 g/L  
Cloranfenicol 0,05g/L  
Cicloeximida 0,4g/L  
Água destilada q.s.p

#### 1.5 Ágar Oatmeal

Aveia 60,0 g  
Ágar 12,5 g

#### 1.6 Meio RPMI 1640

RPMI 1640 com glutamina e sem bicarbonato de sódio 10,5 g  
Água destilada q.s.p 1000 ml

Adicionar lentamente o pó sob agitação em água destilada e ajustar o pH final para 7,0 utilizando-se solução de MOPS com concentração final de 0,165 mol/L. Completar o volume com água destilada e filtrar em membranas de 0,22 µm de poro, utilizando pressão positiva.

## **2- SOLUÇÕES**

### **2.1 Tampão PBS (*Phosphate Buffered Saline*) acrescido de 0,05% de Tween 20**

Cloreto de sódio - NaCl 8 g  
Cloreto de potássio - KCl 0,2 g  
Fosfato de sódio dibásico - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44 g  
Fosfato de potássio monobásico - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24 g  
Água deionizada 800 mL  
Tween 20 500 µL  
Água destilada 1000 mL

Dissolver todos os sais em 800 mL de água deionizada. Ajustar o pH para 7,4 utilizando solução de ácido clorídrico 1 mol/L e acrescentar 500 µL de Tween 20, em seguida completar para 1000 mL com água destilada.

### **2.2 Solução de cristal violeta 0,3%**

Cristal Violeta em pó 2 g  
Álcool etílico 95% 20 mL  
Oxalato de amônio 0,8 g  
Água destilada 80 mL  
Água destilada estéril 8,5 mL  
Solução A: dissolver 2 g de cristal violeta em 20 mL de álcool etílico 95%  
Solução B: dissolver 0,8 g de oxalato de amônio em 80 mL de água destilada

Misturar as soluções A e B para o preparo da solução-mãe de cristal violeta a 2%. Esterilizar por autoclavação a 121°C por 15 minutos. Para o preparo de 10 mL da solução de cristal violeta a 0,3%, adicionar 1,5 mL da solução-mãe em 8,5 mL de água destilada estéril.

### **2.3 Solução de ácido acético 33%**

Água deionizada 67 mL  
Ácido acético P.A. 33 mL  
Adicionar 33 mL de ácido acético em 67 mL de água deionizada.

### **2.4 Lactofenol azul-algodão**

Ácido láctico 20 g

Fenol 20 g  
Glicerina 20 g  
Azul-algodão 0,05 g  
Água deionizada 20 mL

**2.5 MOPS (ácido 2-[N-morfolino] propanosulfônico)**

MOPS em pó 6,9 g

Dissolver o MOPS em 200 mL de água destilada autoclavada e armazenar na geladeira em garrafa envolvida com papel alumínio.