

## FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Malassezia pachydermatis* ISOLADA DE CÃES COM E SEM OTITE EXTERNA EM ESTUDO *in vitro*

LARA COSTA GRUMANN MICHEL<sup>1</sup>; LUANA PEREIRA RAMIREZ<sup>2</sup>; JULIANA MONTIEL NUNEZ<sup>3</sup>; WELLINGTON DA ROCHA DA SILVA<sup>4</sup>; LIANDRA SCHERER SCHEMEGEL<sup>5</sup>,RENATA OSÓRIO DE FARIA<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – laracmichel@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – luluramirez271@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – julianamontielnunez@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelota – wellingtonondasilva.ws@outlook.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – liandrascherer@gmail.com

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – renataosoriovet@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

As leveduras do gênero *Malassezia* fazem parte da microbiota de cães, gatos e outros animais, colonizando pele e mucosas. Entre elas, *Malassezia pachydermatis* destaca-se por ser lipofílica, mas não estritamente lipodependente, o que lhe permite colonizar diferentes microambientes. Embora normalmente componha a microbiota cutânea e auricular, pode assumir caráter oportunista, estando associada a quadros de dermatite e otite externa em cães e gatos (FIGUEREDO et al., 2012; BRILHANTE et al., 2018; HOBI et al., 2020).

A otite externa é uma enfermidade de alta frequência na clínica de pequenos animais e possui etiologia multifatorial. Além das causas primárias, como dermatite atópica, alergias, distúrbios endócrinos e de queratinização, a doença frequentemente é perpetuada por microrganismos como bactérias e fungos, sobretudo *Malassezia spp.* (ALMEIDA, 2016; SAMAKKHAH et al., 2022). A distinção entre colonização e infecção ativa é essencial para o manejo clínico, pois a simples presença de *Malassezia spp.* nem sempre indica doença instalada, já que a detecção isolada não equivale necessariamente a infecção (PRIPUTNEVICH et al., 2024).

Entre os fatores de virulência relacionados à patogenicidade de *M. pachydermatis*, a formação de biofilme destaca-se por favorecer a persistência do microrganismo, conferir maior tolerância a antifúngicos e dificultar a ação do sistema imune. Estudos prévios já demonstraram sua presença em isolados de animais com dermatite, mas ainda há escassez de análises envolvendo cepas de otite externa.

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo comparar a produção de biofilme *in vitro* por isolados de *M. pachydermatis* provenientes de cães saudáveis e de cães com otite externa (FIGUEREDO et al., 2012; BRILHANTE et al., 2018).

### 2. METODOLOGIA

Neste estudo, foram avaliados oito cães ao total, sendo quatro com diagnóstico de otite externa e quatro hígidos, de idades, sexos e raças variadas. Foi coletado material da orelha direita e esquerda de cada animal, utilizando swab estéril. As amostras foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose suplementado com cloranfenicol e em ágar Sabouraud suplementado com cloranfenicol enriquecido com azeite de oliva, a fim de diferenciar *M. pachydermatis* de espécies

lipodependentes. As placas foram incubadas a 37 °C por cinco dias, e a identificação foi realizada por características macro e micromorfológicas, confirmado-se a espécie pela capacidade de crescimento em meio sem suplementação lipídica.

Colônias jovens foram repicadas em caldo Sabouraud dextrose com cloranfenicol e incubadas por três dias a 37 °C. Em seguida, a suspensão celular foi ajustada para aproximadamente 10<sup>6</sup> UFC/mL por leitura espectrofotométrica. Alíquotas de 150 µL da suspensão foram distribuídas, em triplicata, em placas de 96 poços de fundo chato, separadas em dois grupos: isolados de cães hígidos e isolados de cães com otite externa. Além disso, foram incluídos grupos controle positivo (repetição de um dos pacientes) e controle negativo (meio sem inóculo).

O protocolo para indução e quantificação do biofilme foi adaptado de Figueiredo et al. (2012), com ajustes relacionados ao meio de cultura, incubação e espectrofotometria. As placas foram incubadas por 24 h a 32 °C em agitador orbital (75 rpm) para favorecer a adesão celular. Logo após, o sobrenadante foi removido e substituído por 200 µL de meio fresco, mantendo-se as placas incubadas a 37 °C por quatro dias, com renovação diária do meio de cultura. Ao final, os poços foram lavados duas vezes com PBS (pH 7,2), secos por aproximadamente 45 minutos e corados com 175 µL de cristal violeta a 0,5% por 45 minutos. Em seguida, os poços foram novamente lavados com água destilada estéril, e o corante aderido foi solubilizado com 200 µL de etanol a 95% pelo mesmo período.

A leitura da densidade óptica foi realizada diretamente nos poços em espectrofotômetro a 630 nm, sendo os valores corrigidos pela subtração da média dos controles negativos. Conforme descrito também por Brilhante et al. (2018), todos os ensaios foram realizados em triplicata, e os resultados expressos como média e desvio-padrão. A comparação entre os grupos de cães saudáveis e cães com otite externa foi realizada por meio do teste *t* de Student, adotando-se nível de significância de *p* < 0,05.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, observou-se que isolados provenientes de cães com otite externa apresentaram maior média de absorbância em comparação aos isolados de cães saudáveis (Figura 1). Entretanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa (*p* > 0,05, teste *t* de Student), indicando ausência de correlação direta entre a ocorrência da doença clínica e a intensidade de biofilme produzido.

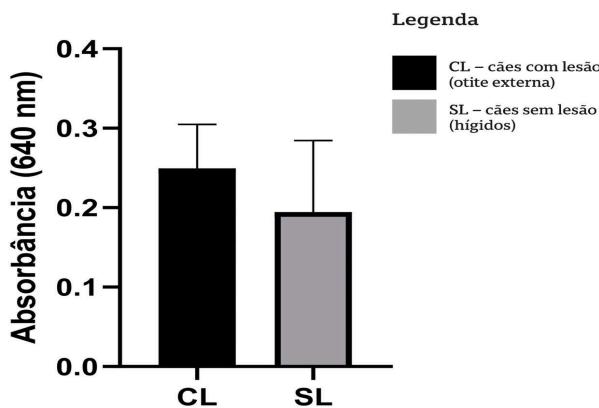


Figura 1: Quantificação média de biofilme por absorbância (640 nm) em *Malassezia pachydermatis* isoladas de cães com lesão (CL) e sem lesão (SL).

Esse achado corrobora os resultados de Figueiredo *et al.* (2012), que também observaram valores médios mais elevados em isolados de cães com lesões cutâneas em relação aos animais saudáveis, mas sem significância estatística. De forma semelhante, Gagana *et al.* (2021) verificaram que todos os isolados de *M. pachydermatis* oriundos de cães com dermatite, otite ou sem lesões aparentes apresentaram capacidade de formar biofilme em intensidades distintas, sem relação direta com o estado clínico do hospedeiro. Em conjunto, esses achados indicam que a formação de biofilme é uma característica própria da espécie, que varia conforme a cepa envolvida, e não um marcador exclusivo da doença, reforçando seu comportamento oportunista.

Ainda que não haja relação direta com o estado clínico do hospedeiro, o biofilme permanece como um dos principais fatores de virulência atribuídos à espécie. Em *Malassezia pachydermatis*, essa capacidade já foi amplamente descrita, sendo observada em 95,2% dos isolados avaliados em estudo anterior (FIGUEREDO *et al.*, 2012). Estruturalmente, o biofilme constitui uma comunidade celular organizada e envolta por matriz extracelular, que garante maior persistência, reduz a eficácia dos antifúngicos e dificulta a ação do sistema imune. Essa barreira polimérica, além de proteger contra agentes antimicrobianos, oculta as células da detecção pelas defesas do hospedeiro, favorecendo a tolerância e a evasão imunológica (MANNAN *et al.*, 2024). Esse estado de tolerância transitória é sustentado por mecanismos como a proteção conferida pela matriz, a liberação de vesículas extracelulares e a presença de células persistentes. Em diferentes condições clínicas, incluindo mucosas, pele, pulmões e infecções auriculares, essa organização já foi descrita, o que reforça sua relevância para a compreensão da otite externa (GOW *et al.*, 2025).

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos indicam que a capacidade de formação de biofilme por *Malassezia pachydermatis* constitui um fator de virulência intrínseco da espécie, independentemente da presença de lesões cutâneas ou do estado imunológico do

hospedeiro. Essa característica reforça seu potencial oportunista e sua relevância clínica em processos de otite externa e outras dermatomicoses. Embora os modelos *in vitro* reproduzam de forma consistente a dinâmica de formação de biofilmes, investigações adicionais em modelos *in vivo* são necessárias para confirmar esses achados e aprofundar a compreensão sobre o papel dessa estrutura na patogênese da levedura.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M. S.; SANTOS, S. B.; MOTA, A. R.; SILVA, L. T. R.; SILVA, L. B. G.; MOTA, R. A. Isolamento microbiológico do canal auditivo de cães saudáveis e com otite externa na região metropolitana de Recife, Pernambuco. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 36, n. 1, p. 29-32, 2016.
- BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. G.; GUEDES, G. M. M.; OLIVEIRA, J. S.; ARAÚJO, G. S.; ESPAÑA, J. D. A.; SALES, J. A.; AGUIAR, L.; PAIVA, M. A. N.; CORDEIRO, R. A.; PEREIRA-NETO, W. A.; PINHEIRO, A. Q.; SIDRIM, J. J. C.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; ROCHA, M. F. G. *Malassezia pachydermatis from animals: Planktonic and biofilm antifungal susceptibility and its virulence arsenal*. *Veterinary Microbiology*, v. 220, p. 47-52, 2018.
- FIGUEREDO, L. A.; CAFARCHIA, C.; DESANTIS, S.; OTRANTO, D. Biofilm formation of *Malassezia pachydermatis* from dogs. *Veterinary Microbiology*, v. 160, n. 1-2, p. 126-131, 2012.
- GAGANA, P. M.; et al. *In vitro* biofilm production and antifungal drug susceptibility of *Malassezia pachydermatis* isolates from dogs. *The Pharma Innovation Journal*, v. 10, n. 12, p. 427-432, 2021.
- GOW, N. A. R.; et al. Fungal biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, v. 23, n. 3, p. 161-178, 2025. DOI: 10.1038/s41579-025-01147-0.
- HOBI, S.; CAFARCHIA, C.; ROMANO, V.; BARRS, V. R. *Malassezia*: zoonotic implications, parallels and differences in colonization and disease in humans and animals. *Pathogens*, v. 9, n. 11, p. 1-20, 2020.
- MANNAN, M.; NABEELA, S.; MISHRA, R.; UPPULURI, P. Host immune response against fungal biofilms. *Current Opinion in Microbiology*, v. 81, p. 102520, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2024.102520>.
- PRIPUTNEVICH, T. V.; GORDEEV, A. B.; SHABANOVA, N. E.; DENISOV, P.; TROFIMOV, D. Y.; BALASHOVA, E. N.; DONNIKOV, A. E.; YAROTSKAYA, E. L.; ZUBKOV, V. V.; SUKHikh, G. T. The underestimated role of major skin commensal *Malassezia furfur* in the development of neonatal invasive fungal infections. *Helion*, v. 10, e38767, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e38767>.
- SAMAKKHAH, S. A.; IRAEE, M. A.; PEYSOKHAN, M.; ZAREH, A.; DANESHVAR, Y.; ENTEZARI, A.; AMINOLESLAMI OSKOUI, S.; AZIZIHA, H.; FARKHAKFAR, A.; KHAMSIYAN, M. G. External otitis associated with atopy disease in dogs: a case-control study. *Acta Scientific Veterinary Sciences*, v. 4, n. 11, p. 01-07, 2022.