



**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
INSTITUTO BIOMÉDICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS**

ANDRESSA DE JESUS MARQUES

**INIBIÇÃO DE FUNGOS DO GÊNERO *Scedosporium* POR BACTÉRIAS
RELACIONADAS A DOENÇA FIBROSE CÍSTICA**

Niterói, RJ

2020

ANDRESSA DE JESUS MARQUES

**INIBIÇÃO DE FUNGOS DO GÊNERO *Scedosporium* POR BACTÉRIAS
RELACIONADAS A DOENÇA FIBROSE CÍSTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas do Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Micologia

Orientador: Prof^a. Dr^a. Livia Cristina Liporagi Lopes

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Rollin-Pinheiro

Niterói, RJ

2020

ANDRESSA DE JESUS MARQUES

**INIBIÇÃO DE FUNGOS DO GÊNERO *Scedosporium* POR BACTÉRIAS
RELACIONADAS A DOENÇA FIBROSE CÍSTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas do Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Micologia

Aprovada em: ____ de _____ de 2020

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Elisabeth Martins da Silva da Rocha (UFF)

Prof^a. Dr^a. Marcia Ribeiro Pinto da Silva (UFF)

Prof^a. Dr^a. Dirlei Nico (UFRJ)

Niterói, RJ

2020

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais,
Francisco Rodrigues Marques e
Maria José de Jesus Marques

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus por ter me dado oportunidade de ter passado por todas instituições de ensino e conhecido as pessoas que proporcionaram a chegada ao mestrado se tonar real.

Aos meus pais, Francisco Rodrigues Marques e Maria José de Jesus Marques por me apoiarem e me incentivarem. Ao meu irmão, Francisco Andson Marques que mesmo distante sempre me apoiou.

Agradeço enormemente a minha orientadora e amiga Livia Cristina Liporagi Lopes que ha 10 anos me ajuda, apoia, incentiva e inspira na vida acadêmica e pessoal.

Ao meu co-orientador Rodrigo Rollin Pinheiro, pelo incentivo e por todos conhecimentos repassados.

À professora Eliana Barreto Bergter, obrigada pelos anos oferecendo suporte, e me deixar pertencer ao seu laboratório.

Agradeço a todos do laboratório (família) 065.

EPÍGRAFE

“– Quando foi que não tivemos que lutar? – o Poeta ergueu a caneca – Cada dia é uma batalha, mas o sol ainda é grátis para todos!”

As batalhas do Castelo

Domingos Pellegrini

RESUMO

Fibrose Cística (FC) é uma doença hereditária que tem como consequência a não formação ou a má formação dos canais de íon cloreto. Apesar desses canais estarem presentes em diferentes tecidos do corpo, é o pulmão a maior causa de morbidade e mortalidade em pacientes com FC. As infecções primárias são quase sempre bacterianas e com o uso de antibióticos há o surgimento ou evidênciação de infecções fúngicas. A literatura fala sobre a interação entre os micro-organismos, principalmente aqueles que podem ocupar o mesmo sítio. Essas interações podem ser antagônicas ou sinérgicas e há estudos que relatam que *Pseudomonas aeruginosa* é capaz de inibir a viabilidade de fungos como *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*.

Pelo fato de as infecções pulmonares terem grande relevância no quadro dos pacientes com FC, o presente estudo avaliou interações de *Scedosporium boydii* e *Scedosporium apiospermum* com as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacia* que são os principais micro-organismos isolados da região pulmonar dos pacientes acometidos por essa doença. Nas interações de contato direto entre as células fúngicas e bacterianas, tanto em meio sólido quanto em meio líquido, observou-se que *P. aeruginosa* e *B. cepacia* produziram grande efeito inibidor no crescimento dos fungos. Foram realizadas interações sem contato direto e todas espécies bacterianas utilizadas foram capazes de inibir a viabilidade fúngica. Sobrenadantes bacterianos livres de células também foram utilizados para verificar se substâncias produzidas pelas bactérias provocam efeito negativo no crescimento fúngico. Foi observado a partir desse experimento que os sobrenadantes provocam redução da viabilidade fúngica se crescido em concomitância com os fungos, pois os sobrenadantes não se mostraram eficazes na redução quando a biomassa fúngica já estava pré-formada. Para saber mais sobre a composição dos sobrenadantes bacterianos, foram realizadas dosagens de açúcar e proteína, além de extração de lipídio. Esse trabalho teve como objetivo inicial verificar possível interferência do crescimento fúngico quando em contato com células bacterianas. E com base nos resultados obtidos tem como objetivo futuro identificar e caracterizar as moléculas de origem bacteriana.

Palavras chaves: Fibrose cística, gênero *Scedosporium*, bactéria.

ABSTRACT

Cystic Fibrosis (CF) is a hereditary disease that results in a defective chloride channel. Although this channel is part of different organs, the majority of the morbidity and mortality of CF is related with pulmonary conditions. Primary infections are usually bacterial and when treated with antibiotics, yeast infections appear or become more evident. Studies show that different microorganisms can co-inhabit the same environment and the interactions could be synergistic or antagonistic. Some studies show that *Pseudomonas aeruginosa* can reduce *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* viability.

How pulmonary infections have main importance at FC patient life, this study has evaluated interactions between *Scedosporium boydii* and *Scedosporium apiospermum* with *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* that are the main microorganisms isolated from CF airways. Interactions cell-to-cell even in liquid and solid medium show that *P. aeruginosa* and *B. cepacia* was able to reduce fungi viability. Interactions without cell contact were made using a semi permeable membrane, which allows substance changing without direct contact. In these experiments, all bacteria were capable to inhibit fungi growth. Cell extracts from bacterial growth were obtained to know if bacteria produce substances able to reduce fungal viability. These supernatants reduced fungal growth if incubated with fungal cells at the same time, but this effect is not observed in preformed biomass. To discover more about supernatant composition, dosage of sugar, protein and lipid extraction were made. Although none of chemical class could be named to be responsible of reducing fungal viability, it was discovered that most predominant component in bacterial supernatant is protein. This work had an objective to verify possible interference of fungal growth when in contact with bacterial cells. Based on the results obtained, the perspectives are to identify and characterize bacterial molecules.

Key words: Cystic Fibrosis, genus *Scedosporium*, bacteria.

ABREVIACÕES

FC – Fibrose Cística

CFTR – Regulador de Condutância Transmembranar da Fibrose Cística (do inglês “Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator”)

MRSA – *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina (do inglês “Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus*)

HEPA – Detenção de partículas de alta eficiência (do inglês “High Efficiency Particulate Arrestance”)

QS – *Quorum Sensing*

HSLs – Homoserinas Lactonas

PQS – Quinolonas

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês “Reactive Oxygen Species”)

SNR – Espécies Reativas de Nitrogênio

PDB – Caldo de Batata Dextrosado (do inglês “Potato Dextrose Broth”)

PDA – Agar de Batata Dextrosado (do inglês “Potato Dextrose Agar”)

PBS – Tampão Fosfato Salino (do inglês “Phosphate Buffered Saline”)

MIC – Concentração Mínima Inibitória (do inglês “Minimum Inhibitory Concentration”)

DMEM – do inglês “Dulbecco's Modified Eagle Medium”

XTT – do inglês “2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanilide”

TLC – Cromatografia em Camada Fina (do inglês “Thin Layer Chromatography”)

ABPA – Aspergilose Broncopulmonar Alérgica

UV – Ultravioleta

Agr – Gene Regulador Acessório

AHL – N-acil-homoserina lactona

ATCC – American Type Culture Collection

RPM – Rotação por minute

M – Molar

nm – Nanômetro

mL – Microlitro

µm – Micrometro

µg – Micrograma

mg – Miligrama

SEM – do inglês Standard error of the mean

UFC – Unidade formadora de colônia

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

- Figura 1:** Esquema representativo da ação das 6 classes de mutações capazes de originar a patologia da fibrose cística (adaptado de: Cooney *et al.*, 2018).....18
- figura 2:** Esquematisação das interações realizadas entre as células fúngicas e células bacterianas (viáveis, não viáveis ou sobrenadante de cultura das bactérias).....37
- figura 3:** Suscetibilidade fúngica ao voriconazol correlacionando a viabilidade fúngica (eixo y) com a concentração do antifúngico voriconazol (eixo x). É possível observar um decaimento de mais de 50% da viabilidade fúngica a partir da concentração de 1µg/ml tanto para o fungo *S. boydii* (círculo) quanto para o fungo *S. apiospermum* (quadrado).....48
- figura 4:** Na primeira fileira encontram-se os resultados da interação fúngica *S. boydii* com as bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. cepacia* e o antifúngico voriconazol, respectivamente. É possível observar que as bactérias *P. aeruginosa* e *B. cepacia* provocam inibição do crescimento fúngico formando um halo inibitório. Quanto a bactéria *S. aureus* e o antifúngico voriconazol não provocaram influência negativa no crescimento fúngico. A segunda linha apresenta resultados para o fungo *S. apiospermum*. Os resultados obtidos são bem semelhantes aos encontrados para *S. boydii*, porém é observado um halo sutil na placa da interação com *S. aureus*....49
- figura 5:** Viabilidade de *S. boydii* (coluna da esquerda) e *S. apiospermum* (coluna da direita) na ausência (fungo) ou presença (fungo x bactéria) das bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. cepacia*. Após a interação, as células foram incubadas com penicilina-estreptomicina para eliminação das bactérias e a viabilidade fúngica foi avaliada pela técnica de redução de xtt e a leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm.....51
- figura 6:** Interação dos fungos *S. boydii* (a) e *S. apiospermum* (b) com as células bacterianas previamente tratadas com metanol. Como resultado, as bactérias não viáveis não foram capazes de inibir a viabilidade fúngica, quando comparado com o controle, com exceção do fungo *S. apiospermum* que quando desafiado com *S. aureus* apresentou redução da viabilidade. Sa, *S. aureus*. Pa, *P. aeruginosa*. Bc, *B. cepacia*.....53
- figura 7:** Avaliação do peso seco (em mg) da massa fúngica quando em contato com caldo nutriente (condição controle) e em contato com suspensão bacteriana. O

primeiro gráfico mostra que *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. cepacia* quando em contato com os conídios de *S. boydii* reduziram a massa fúngica em comparação com o controle. O segundo gráfico mostra que apenas *P. aeruginosa* não se mostrou capaz de reduzir o peso seco quando em contato com *S. apiospermum*.....54

figura 8: Viabilidade da biomassa fúngica de *S. boydii* e *S. apiospermum* quando desafiados com os sobrenadantes bacterianos de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. cepacia* em diferentes tempos de aquisição (7, 14 e 21 dias). A interação de *S. boydii* com os sobrenadantes de 7, 14 e 21 dias (a, c e f, respectivamente) nos mostra que apenas o sobrenadante de 7 dias de *P. aeruginosa* não foi capaz de diminuir a viabilidade da biomassa fúngica. Nas interações de *S. apiospermum* com os sobrenadantes de 7, 14 e 21 dias (b, d e f, respectivamente), os sobrenadantes de *P. aeruginosa* e *B. cepacia* de 7 dias não produziram efeito inibitório na viabilidade da biomassa fúngica. S.a, *S. aureus*. P.a, *P. aeruginosa*. B.c, *B. cepacia*.....56

figura 9: Viabilidade da biomassa fúngica pré-formada de *S. boydii* e *S. apiospermum* quando desafiados com os sobrenadantes de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. cepacia* em diferentes tempos de aquisição (7, 14 e 21 dias). A interação de *S. boydii* com os sobrenadantes de 7, 14 e 21 dias (a, c e f, respectivamente) mostra que nenhum sobrenadante foi capaz de diminuir a viabilidade da biomassa fúngica. Nas interações de *S. apiospermum* com sobrenadantes de 7, 14 e 21 dias (b, d e f, respectivamente), somente os sobrenadantes de 7 dias e 21 dias produziram efeito inibitório na viabilidade da biomassa fúngica, enquanto apenas o sobrenadante *P. aeruginosa* de 14 dias induziu a inibição da biomassa pré-formada de *S. apiospermum*. S.a, *S. aureus*. P.a, *P. aeruginosa*. B.c, *B. cepacia*.....59

figura 10: Interação de *S. boydii* com os sobrenadantes liofilizados obtidos em diferentes tempos de incubação com diferentes concentrações de proteína do sobrenadante. Gráficos a, b e c - tempo de interação de 4 horas. Gráficos d, e e f de 24 horas e gráficos g, h e j de 48 horas.....60

figura 11: Interação de *S. apiospermum* com sobrenadantes liofilizados obtidos em diferentes tempos de incubação com diferentes concentrações de proteína. Gráficos a, b e c - tempo de interação de 4 horas. Gráficos d, e e f de 24 horas e gráficos g, h e j de 48 horas.....62

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Porcentagem de açúcar e proteína encontrada nos sobrenadantes liofilizados de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. cepacia* livres de células viáveis.....61

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 . Fibrose Cística	17
1.2. Epidemiologia da colonização microbiana em pulmões de pacientes com Fibrose Cística	20
1.2.1. Colonização Bacteriana	22
1.2.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	22
1.2.1.2. Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	22
1.2.1.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
1.2.1.4. <i>Haemophilus influenzae</i>	24
1.2.2. Colonização Fúngica	24
1.2.2.1. <i>Aspergillus</i> spp.	24
1.2.2.2. <i>Candida albicans</i>	25
1.2.2.3. <i>Exophiala dermatitidis</i>	25
1.2.2.4. Gênero <i>Scedosporium</i>	26
1.3. Interações Microbianas no Contexto da FC	28
2. JUSTIFICATIVA	33
3. OBJETIVOS	34
3.1. Objetivo geral	34
3.2. Objetivos específicos	34
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1. Micro-organismos e condições de cultivo	35
4.1.1. Obtenção de conídios	35
4.1.2. Obtenção das culturas bacterianas	36
4.2. Obtenção dos sobrenadantes bacterianos	36
4.3. Interação célula fúngica com célula bacteriana	37

4.3.1. Concentração Mínima Inibitória (MIC)	38
4.3.2. Interação célula-célula em placa de Petri	38
4.3.3. Interação célula-célula em meio líquido	39
4.3.4. Interação célula fúngica com célula bacteriana não viável	40
4.3.5. Interação célula fúngica com célula bacteriana separados por membrana de 0,22 μ m	41
4.3.6. Interação biomassa fúngica com sobrenadante bacteriano	41
4.3.7. Interação biomassa fúngica pré-formada com sobrenadante bacteriano	42
4.3.7 Interação fungo x sobrenadantes bacterianos em diferentes concentrações	43
4.4. Determinação das classes de moléculas presentes nos sobrenadantes bacterianos	44
4.4.1. Dosagem de Proteína	44
4.4.2. Dosagem de açúcar	44
4.5. Extração de moléculas no sobrenadante bacteriano	45
4.5.1. Extração de Lipídio	45
4.5.2. Extração de Açúcar	46
4.6. Análise Estatística	47
5. RESULTADOS	47
5.1. Concentração Mínima Inibitória (MIC)	47
5.2. Interação célula-célula em placa de Petri	48
5.3. Interação célula-célula em meio líquido	49
5.4. Interação célula fúngica com célula bacteriana não viável	52
5.5. Interação célula fúngica com célula bacteriana separados por membrana de 0,22 μ m	53
5.6. Interação biomassa fúngico com sobrenadante bacteriano	54
5.7. Interação biomassa fúngica pré-formada com sobrenadante bacteriano	57

5.8. Interação fungo x sobrenadantes bacterianos em diferentes concentrações	59
5.9. Determinação das classes de moléculas presentes nos sobrenadantes bacterianos	63
5.10. Extração de moléculas nos sobrenadantes bacterianos	63
6. CONCLUSÃO	72
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	73

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fibrose Cística

Fibrose cística (FC) é uma doença genética autossômica recessiva, causada pela mutação de um gene que codifica o Regulador da Condutância Transmembranar da Fibrose Cística (CFTR) no braço longo do cromossomo 7, que funciona como canal de cloreto. Essa doença fatal é a mais comum na população caucasiana, mas pode atingir qualquer etnia (KING *et al.*, 2016) (CORRIVEAU *et al.*, 2018). A maior prevalência ocorre na Europa, América do Norte e Austrália (ELBORN, 2016). Na América do Norte em 2012, havia cerca de 30.000 indivíduos diagnosticados com FC (PARANJAPE *et al.*, 2014). A prevalência é mais baixa em chineses, sendo encontrados na literatura até 2018 apenas 70 pacientes (ZHANG *et al.*, 2020). No Brasil, há uma estimativa de 1 nascido com FC em 7.500 nascidos (ATHANAZIO *et al.*, 2017). O tempo de sobrevivência dos pacientes com FC é de aproximadamente 41 anos (PARANJAPE *et al.*, 2014).

O CFTR está presente em diversos órgãos e causa comorbidades relevantes para paciente com FC, como disfunção das células epiteliais do pâncreas provocando uma insuficiência pancreática e acarretando má absorção de nutrientes, como proteínas e lipídeos. O fato de a doença afetar órgãos como pâncreas é importante no ponto de vista que isso interfere na nutrição do paciente. Essa insuficiência pancreática é tratada com reposição enzimática (ELBORN, 2016). A mutação afeta também órgãos como o fígado, provocando cirrose biliar, glândulas sudoríparas e ducto deferente podendo levar o paciente a infertilidade (ELBORN, 2016).

Já foram identificados 1900 tipos de mutação do gene CFTR, e as mutações do canal CFTR são divididas em 6 classes (**Figura 1**):

Classe I: Mutação na produção de proteína. Há ocorrência de uma mutação inespecífica no gene que codifica o CFTR, isso faz com que haja uma parada precoce na construção da cadeia de aminoácidos que codifica a proteína.

Classe II: Mutação no processamento de proteínas. Ocorre um erro na construção da proteína, em que um aminoácido não é introduzido ou colocado incorretamente. Isso faz com que a proteína não fique em sua conformação

adequada e então é destruída pela célula. A mutação mais comum nessa classe, é a mutação F508del, em que um único aminoácido é removido da cadeia.

Classe III: Mutação de bloqueio. Nessa mutação há a formação do canal CFTR, mas não funciona apropriadamente, uma vez que o canal não abre.

Classe IV: Mutação de condução. Ocorre uma mutação no formato do interior do canal, o que não permite que o íon cloreto se movimente adequadamente. Nessa mutação a quantidade de cloreto que passa pelo canal é reduzida.

Classe V: Mutações proteicas insuficientes. Na mutação da classe V, o canal funciona corretamente, porém não há quantidade suficiente de canais.

Classe VI: Na classe VI, o canal não está devidamente estabilizado, ocorrendo sua degradação. (Al-Abadi *et al.*, 2019) (KLIMOVA *et al.*, 2017) (ELBORN, 2016) (COONEY *et al.*, 2018).

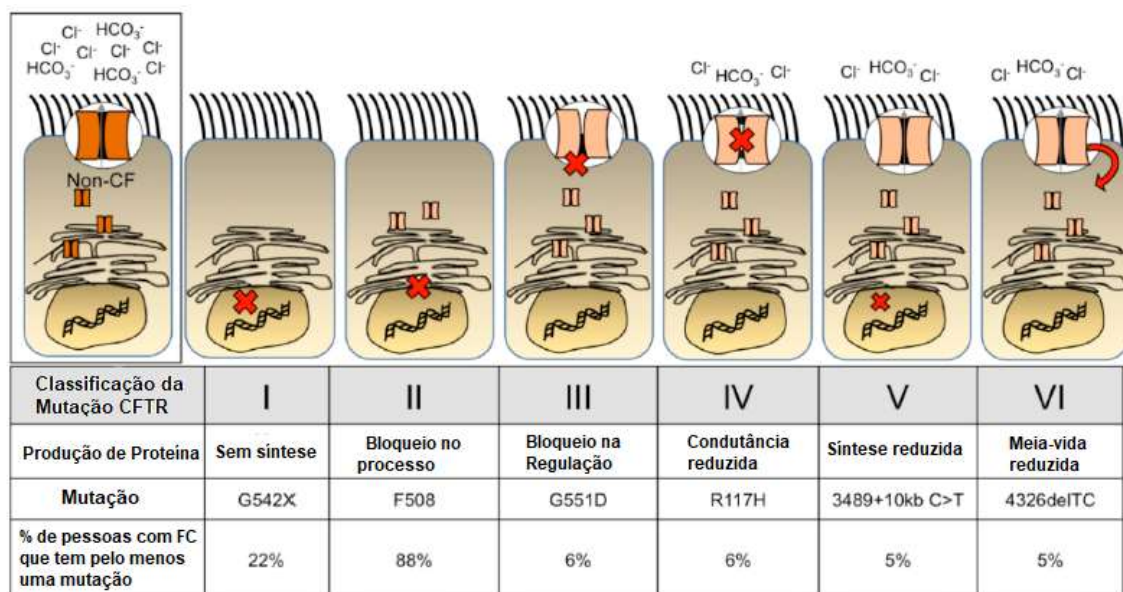


Figura 1: Esquema representativo da ação das 6 classes de mutações capazes de originar a patologia da Fibrose Cística (Adaptado de: COONEY *et al.*, 2018).

Cerca de 70 anos atrás, a expectativa de vida de um paciente com FC era de meses, devido a desnutrição pela má absorção pancreática e pelo fenômeno chamado íleo meconial, que é a obstrução da parte terminal do íleo por mecônio anormalmente endurecido. Após os avanços farmacêuticos e da medicina, melhorando o diagnóstico e tratamento, a expectativa de vida aumentou consideravelmente tendo em média 40 anos em países desenvolvidos (ELBORN, 2016) (CORRIVEAU *et al.*, 2018).

A severidade da doença está relacionada a diferentes fatores, como genótipo do CFTR, função pulmonar, nutrição, idade e sexo (CORRIVEAU *et al.*, 2018). Pacientes com FC que apresentam os tipos de mutação I, II e III tem um fenótipo mais severo da doença, enquanto aqueles que tem as mutações do tipo IV, V e VI apresentam algumas proteínas CFTR funcionantes, tendo assim certa funcionalidade do pulmão e pâncreas, mesmo que moderado (ELBORN, 2016).

Quanto ao gênero, é observado que mulheres tem taxas de sobrevivência menores que homens. Esse acontecimento tem sido relacionado ao hormônio estradiol que age reduzindo ainda mais o volume do líquido da superfície das vias aéreas no epitélio das pacientes com FC (CALLAGHAN *et al.*, 2012). Estudos também mostram que o estrogênio induz a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* para sua forma mucoide, além de suprimir a proteína lactoferrina que é conhecida por impedir a formação de biofilme (TYRRELL *et al.*, 2020).

A hospitalização do paciente pode ocorrer durante a determinação do diagnóstico, pelo agravamento do quadro ou por falta de adesão do tratamento (ABARNO *et al.*, 2012). O curso da evolução da doença vai depender do quão precoce é o seu diagnóstico, assim precauções podem ser tomadas a fim de retardar as complicações (PFEIFER *et al.*, 2009). Na maioria dos países com maior prevalência dessa doença, a triagem para FC é realizada logo após o parto, em que são recolhidas amostras de sangue do recém nato. Teste de suor também pode ser realizado, mas é utilizado como teste final. Apesar da maioria dos casos serem diagnosticados ainda na infância, pode ocorrer a descoberta da doença na fase adulta. A descoberta tardia está associada com os tipos de mutação IV, V e VI que são menos graves por apresentar funcionalidade parcial do CFTR nos órgãos (ELBORN, 2016).

Apesar desse canal estar presente em diferentes órgãos humanos, o mau funcionamento e/ou a falta dele tem implicações maiores nos pulmões, sendo doenças respiratórias a maior causa de morbidade e mortalidade em pacientes com FC (PLUMMER *et al.*, 2016) (ELBORN, 2016) (CORRIVEAU *et al.*, 2018).

Os pulmões apresentam estrutura que auxilia na defesa do órgão impedindo a instalação de patógenos, denominada aparelho mucociliar. Esse aparelho é constituído das células epiteliais ciliadas com células caliciformes e glândulas submucosas. As células epiteliais estão protegidas pelo líquido superficial e, para que haja movimento ciliar eficiente para eliminação de um patógeno ou partícula

estranha, esse líquido deve estar em equilíbrio osmótico (TRINDADE *et al.*, 2007) (VARAS *et al.* 2019). Em pulmões saudáveis, há nas vias respiratórias um líquido superficial que contém quantidade de cloreto e sódio balanceada e muco. O sistema mucociliar produz movimentos de maneira a remover partículas contaminantes do pulmão. Em pessoas com fibrose cística, as mutações no gene que codificam o canal CFTR resultam em um alterado fluxo iônico nas vias aéreas, onde não há transporte efetivo de cloreto, ocorrendo assim uma maior reabsorção de sódio para fora do líquido superficial comprometendo a função normal das vias aéreas. A água segue o influxo do sódio causando uma desidratação do líquido superficial, tornando o muco mais espesso e impossibilitando os movimentos ciliares de removerem o muco das vias respiratórias. O acúmulo desse muco espesso torna o ambiente propício a infecções recorrentes causadas tanto por bactérias como por fungos, e muitas vezes há evidências de infecções mistas (KING *et al.*, 2016) (GARCZEWSKA *et al.*, 2016).

1.2. Epidemiologia da colonização microbiana em pulmões de pacientes com Fibrose Cística

Nas infecções das vias aéreas, é muito comum infecções por bactérias tanto Gram-positivas, quanto Gram-negativas. Amostras de escarro de pacientes com FC mostram que nos primeiros anos de vida os micro-organismos mais encontrados são *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae*. Já mais tarde, na vida desses pacientes, os patógenos mais comuns de serem encontrados são *Pseudomonas aeruginosa* e complexo *Burkholderia*, principalmente *Burkholderia cepacia*. (CRIBBS *et al.*, 2017)

Além de infecções bacterianas, os pacientes com FC também apresentam grande suscetibilidade para infecções fúngicas. Foi identificado que durante a infecção, as células fúngicas secretam enzimas proteolíticas que protegem o patógeno de sofrer fagocitose, facilitando assim sua adesão e colonização nas vias aéreas. (GARCZEWSKA *et al.*, 2016). A colonização do sistema respiratório de pacientes com FC por fungos se dá principalmente pelo uso de antibióticos de amplo espectro para o tratamento de infecções bacterianas. Um estudo mostrou que o uso do antibiótico tobramicina para tratar infecção por *P. aeruginosa* leva a colonização por fungos filamentosos, como *Aspergillus fumigatus*. (GARCZEWSKA *et al.*, 2016).

Como mencionado, a ocorrência de infecções pulmonares recorrentes e de difícil tratamento em pacientes com FC representa uma grave complicação da doença. Assim, a identificação dos patógenos responsáveis por cada ocorrência de infecção é de extrema importância para o tratamento dos pacientes. A pesquisa para determinação do patógeno ainda está muito voltada para o uso da cultura, não só para identificar os micro-organismos, mas também para realizar testes de suscetibilidade a antibióticos (BLANCHARD *et al.*, 2019). Porém, técnicas moleculares têm auxiliado bastante a compreensão da diversidade microbiológica nos pulmões de pacientes com FC (ROGERS *et al.*, 2017). O uso da técnica de sequenciamento de rRNA de amostras do trato respiratório mostra que as infecções do trato respiratório inferior de pacientes com FC é de característica polimicrobiana, havendo inclusive a coexistência de espécimes aeróbios e anaeróbios (ROGERS *et al.*, 2017).

A pesquisa do microbioma pulmonar tem seus desafios, pois para a coleta de material do trato respiratório inferior há a passagem pelo trato respiratório superior e pela orofaringe, o que aumenta o risco de contaminação pela microbiota anfiótica. Apesar desse fator, vários estudos têm sido realizados visando estabelecer os micro-organismos mais comumente encontrados em pulmão de pacientes com FC, mas o perfil de qual micro-organismo predomina pode variar de acordo com a idade do paciente e progressão da doença, indicando que a colonização desses ambientes apresenta uma característica dinâmica (HUANG *et al.*, 2016).

A composição do microbioma dos pulmões dos pacientes se modifica com a idade. Enquanto crianças são comumente infectadas com *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae*, adultos tendem a ser colonizados por bactérias cada vez mais resistentes, incluindo *Pseudomonas aeruginosa* e *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) (LIPUMA *et al.*, 2010). Das espécies de fungos mais frequentemente associadas a FC estão *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* e *Aspergillus nidulans*. *A. fumigatus* e *A. terreus* podem colonizar tanto as vias aéreas superiores quanto inferiores, levando a quadros de pneumonia, sinusite e bronquite. Outras espécies fúngicas também são frequentemente encontrados colonizando as vias aéreas, como espécies de *Candida*, principalmente *Candida albicans*, fungos do gênero *Scedosporium*, *Exophiala dermatitidis* e *Penicillium* spp. (GARCZEWSKA *et al.*, 2016) (HEDAYATI *et al.*, 2019). Devido à característica polimicrobiana da infecção de pulmões de

pacientes com FC, o estudo da dinâmica dessa colonização e as implicações da presença de determinadas espécies se tornam informações relevantes para o entendimento do desenvolvimento da doença. Assim, as seções seguintes trarão uma breve descrição das principais espécies bacterianas e fúngicas comumente encontradas, conforme mencionado acima.

1.2.1. Colonização Bacteriana

1.2.1.1. *Staphylococcus aureus*

S. aureus é uma bactéria coco Gram-positiva aeróbia, mas que também pode crescer como anaeróbia facultativa. É uma bactéria comensal em humanos, colonizando sítios como a pele e trato respiratório superior, mas também pode se tornar patogênica, causando quadros de infecções respiratórias em pacientes suscetíveis (TONG *et al.*, 2015).

S. aureus é um dos primeiros patógenos a colonizar as vias respiratórias de pacientes com FC e tornou-se o mais prevalente após a eliminação de infecções por *Pseudomonas aeruginosa*, que até então era a mais prevalente, ter se tornado mais efetiva (SCHWERDT *et al.*, 2018). MRSA é mais comumente encontrada em pacientes jovens adultos do que em crianças com FC. Infecções por MRSA tem grande importância, pois está associada a casos com prognóstico ruim, como aceleração do declínio da função pulmonar, aumento de hospitalização e mortalidade precoce dos pacientes com FC em comparação a pacientes colonizados pela *S. aureus* sensível a meticilina (BLANCHARD *et al.*, 2019).

1.2.1.2. Complexo *Burkholderia cepacia*

O Complexo *Burkholderia cepacia* compreende mais de 20 espécies de bacilos Gram-negativos não fermentativos. Por estar presentes em plantas, animais e humanos, essa bactéria pode ser adquirida no ambiente ou transmitida de pessoa para pessoa (KENNA *et al.*, 2017) (BLANCHARD *et al.*, 2019).

Em pacientes com FC, *B. cepacia* está relacionada com a redução da função pulmonar e do aumento da morbidade e mortalidade (KENNA *et al.*, 2017) (BLANCHARD *et al.*, 2019). Essas espécies são resistentes a diferentes antibióticos além de produzir grande variedade de fatores de virulência, como aderir as células epiteliais e sobreviver dentro dos macrófagos das vias aéreas. Além de serem capazes de formar biofilme que o protege das células de defesa e da ação dos antibióticos (HORSLEY *et al.*, 2012).

As bactérias que consistem Complexo *Burkholderia cepacia* mudam seu fenótipo de mucoide para não-mucoide durante a infecção crônica. Pacientes com FC colonizados pela forma não-mucoide apresentam um declínio pulmonar mais rápido quando comparado com pacientes que estão colonizados pela forma mucoide da bactéria (CALLAGHAN *et al.*, 2012).

1.2.1.3. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa não fermentadora. É facilmente encontrada em água doce, sendo adquirida principalmente no ambiente (BLANCHARD *et al.*, 2019). Em paciente com FC, é mais comumente encontrada nos primeiros anos da infância, se tornando menos frequente ao passar dos anos. Acredita-se que isso ocorra devido a administração precoce de antibióticos (BLANCHARD *et al.*, 2019). No início da infecção, as bactérias ligam-se a receptores da superfície do epitélio pulmonar através de adesinas específicas a fim de estabelecer a infecção nas vias aéreas dos pacientes com FC. Para isso essas bactérias secretam substâncias que facilitam sua sobrevivência, como por exemplo enzimas elastase, protease alcalinas, exotoxinas, pirocianina e outras moléculas relacionadas a virulência desse patógeno (KAUR *et al.*, 2015).

Alterações fenotípicas podem acontecer com a *P. aeruginosa* durante o curso da infecção. Durante a infecção aguda, a *P. aeruginosa* se encontra na forma não-mucoide, em que caracteriza da bactéria não encapsulada, expressando fatores de virulência invasivos como flagelos. Já durante a infecção crônica a *P. aeruginosa* se converte para o fenótipo mucoide que está associado à formação do biofilme e resistência a fagocitose (CALLAGHAN *et al.*, 2012).

1.2.1.4. *Haemophilus influenzae*

Haemophilus influenzae tem sua morfologia descrita como um cocobacilo Gram-negativo. Esse micro-organismo está relacionado a diferentes infecções no trato respiratório e também em doenças invasivas como a meningite (WEN *et al.*, 2019). *H. influenzae* tem diferentes mecanismos de virulência, como a presença de uma cápsula polissacarídica que o protege da ação de células de defesa. Além disso, essa bactéria possui pili que auxilia na adesão e formação de biofilme, dificultando assim a ação dos antibióticos e proporcionando resistência a esses fármacos (WEN *et al.*, 2019).

1.2.2. Colonização Fúngica

1.2.2.1. *Aspergillus* spp.

Dentre os fungos filamentosos, o mais encontrado em pacientes com FC é o gênero *Aspergillus*, principalmente *A. fumigatus* (BLANCHARD *et al.*, 2019). Segundo a literatura, a infecção por *Aspergillus* está associada a redução da capacidade das células pulmonares de identificar, captar e levar a morte o patógeno em questão (KING *et al.*, 2016).

O gênero *Aspergillus* é composto por fungos filamentosos saprófitos, formadores de esporos e amplamente disseminados no ambiente. *A. fumigatus* é a espécie mais associada a doenças em humanos. Em pacientes imunocompetentes, os esporos inalados são facilmente eliminados pelos macrófagos presentes no ambiente pulmonar, mas em indivíduos imunocomprometidos esses esporos desencadeiam uma reação inflamatória e o desenvolvimento de infecções invasivas no trato respiratório (KING *et al.*, 2016).

O isolamento de *Aspergillus* em pacientes com FC aumenta conforme a idade do paciente avança, ou seja, é mais comum encontrar esse tipo de micro-organismo em jovens e adultos do que em crianças (KING *et al.*, 2016). Das consequências que podem surgir em decorrência da infecção por *Aspergillus*, a aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) é a mais conhecida em pacientes de FC, tendo a

prevalência maior em adultos do que em crianças. Essa doença manifesta-se com exacerbações respiratórias, anticorpos positivos para *Aspergillus* e anomalia em exames radiológicos, mas o diagnóstico é difícil, uma vez que os exames radiológicos apresentam semelhança a complicações provocadas por bactérias. A ABPA leva à bronquiectasia, fibrose pulmonar e insuficiência respiratória do paciente (KING *et al.*, 2016; BLANCHARD *et al.*, 2019).

Um estudo realizado no Centro de Stanford relatou um aumento da resistência de *A. fumigatus* à diferentes agentes antifúngicos, como voriconazol, o que tem tornado o tratamento dessas infecções um desafio e uma complicação maior para os pacientes com FC (SABINO *et al.*, 2017).

1.2.2.2. *Candida albicans*

Candida albicans é uma levedura comumente encontrada na microbiota da orofaringe e de outros sítios do corpo humano. Em indivíduos suscetíveis, como os pacientes com FC, esse fungo se torna um patógeno comum encontrado em amostras pulmonares desses pacientes (BLANCHARD *et al.*, 2019). Devido ao comprometimento da mucosa pulmonar de pacientes com FC, e do uso de esteroides e tratamento frequente com antibióticos, há um aumento da colonização por *C. albicans*, além desse micro-organismo formar biofilme facilmente (SABINO *et al.*, 2017).

O uso de fluconazol é a primeira escolha para o tratamento de *C. albicans*, e o aparecimento de espécies resistentes aos azóis é algo que preocupa a clínica e eleva os riscos dessas infecções (SABINO *et al.*, 2017).

1.2.2.3. *Exophiala dermatitidis*

Dentre as leveduras melanizadas que acometem o homem, o gênero *Exophiala*, especialmente a espécie *Exophiala dermatitidis*, é o mais comum. Esse micro-organismo é um colonizador frequente do trato respiratório de pacientes com FC. Além da exacerbação da doença pulmonar, esse patógeno também é conhecido por causar infecção do sistema nervoso central (KIRCHHOFF *et al.*, 2019).

O primeiro achado de *E. dermatitidis* em escarro foi relatado mesmo após o tratamento com anfotericina B em paciente de 5 anos com FC. Porém a maioria dos casos relatados de *E. dermatitidis* é em adolescente e adultos (KIRCHHOFF *et al.*, 2019). Por ter baixa virulência em pacientes com FC, *E. dermatitidis* não apresenta sintomas clínicos específicos e a descoberta de infecções por esse patógeno se dá através do achado em cultura, além de positividade de anticorpos IgG específicos para *E. dermatitidis* (KIRCHHOFF *et al.*, 2019).

1.2.2.4. Gênero *Scedosporium*

A scedosporiose, doença causada pelos fungos do gênero *Scedosporium* vem crescendo ao longo dos anos. A patologia causada por esses fungos pode variar desde infecções cutâneas, como a formação de micetoma, uma infecção granulomatosa localizada, até infecções invasivas que inicial pela inalação de conídios e pode disseminar para outros sítios além do trato respiratório. Ela é capaz de acometer hospedeiros imunocomprometidos, causando principalmente patologias localizadas, e imunocompetentes, nos quais as infecções invasivas são mais frequentes (LUPLERTLOP, 2018).

A taxonomia desde fungos tem sofrido modificações durante os últimos anos, e técnicas envolvidas como genética, biologia molecular e filogenética fez com que as espécies que compreendiam esse gênero fossem realocadas. Hoje em dia, o fungo anteriormente conhecido como *Scedosporium prolificans* saiu da classificação de *Scedosporium* e agora passou a ser chamado de *Lomentospora prolificans* (MELLO *et al.*, 2019)

Atualmente, o gênero *Scedosporium* compreende mais de 10 espécies, sendo elas *Scedosporium angustum*, *Scedosporium apiospermum*, *Scedosporium aurantiacum*, *Scedosporium boydii*, *Scedosporium cereisporum*, *Scedosporium dehoogii*, *Scedosporium desertorum*, *Scedosporium ellipsoideum*, *Scedosporium fusoidium*, *Scedosporium minutisporum*, *Scedosporium rarisporum* e *Scedosporium sanyaense* (LUPLERTLOP, 2018; HEDAYATI *et al.*, 2019). Os mais frequentemente associados a infecções em humanos são *S. boydii*, *S. apiospermum*, *S. aurantiacum* e *S. dehoogii*.

Na Austrália, espécies desse gênero foram encontrados em áreas como solo de agricultura e parques, mas não foram encontrados em solos naturais de pouco

contato com os humanos. Isso é um indício de que esses fungos estão presentes em ambientes com interferência humana. De fato, é sabido que eles são capazes de resistir a alta pressão osmótica e presença de concentrações mais elevadas de nitrogênio, características típicas de ambientes poluídos e impactados pelo homem. A infecção ocorre a partir da inoculação do conídio por trauma, penetrando assim a pele ou através da inalação, chegando assim em outros tecidos e podendo atingir o sistema nervoso central (LUPLERTLOP, 2018).

Por esses fungos estarem presentes em solo que teve contato com o Homem, um estudo realizado por Sidot e colaboradores em 2007 identificaram a presença dessas espécies fúngicas em vasos de plantas na casa de pacientes com FC. Dessa maneira mostrou-se importante que esses pacientes, assim como outros que sofrem com doenças pulmonares crônicas não apresentem vasos de plantas em suas casas (SIDOT *et al*, 2007)

Apesar da transmissão ocorrer através da inalação de conídio do ambiente ou por inoculação através de traumas, Guerrero e colaboradores em 2001 descreveram um caso de *L. prolificans* resistente a diferentes antifúngicos transmitido de paciente para paciente, ocasionando o óbito de 6 pessoas. Episódios como esse fez com que fosse necessário a instalação de filtro de ar tipo HEPA a fim de evitar surto no ambiente hospitalar (GUERRERO *et al*, 2001).

O gênero *Scedosporium* vem sendo reportado como o segundo mais importante dos fungos filamentosos que acometem pacientes com FC, logo após *A. fumigatus* (HEDAYATI *et al.*, 2019). As espécies de *Scedosporium* têm se mostrado resistentes aos fármacos disponíveis no mercado, como anfotericina B, itraconazol e caspofungina, sendo os novos azóis, como o voriconazol, a droga de escolha atualmente para essas infecções (HEDAYATI *et al.*, 2019). Com isso torna-se necessário a pesquisa de novos fármacos. Apesar de voriconazol aparentemente ser a melhor escolha para pacientes colonizados por esses fungos, há uma problemática envolvendo seu uso. Voriconazol apresenta interação medicamentosa com imunossupressores e quimioterápicos. (MELLO *et al.*, 2019). O uso concomitante de voriconazol e imunossupressores deve ser acompanhado por médicos e dosado os níveis de imunossupressores, pois o aumento da biodisponibilidade desses medicamentos leva a nefrotoxicidade, algumas classes de imunossupressores são contraindicadas.

Já é conhecido algumas proteínas relacionadas aos fungos do gênero *Scedosporium* que atuam na resistência físico-química dessas espécies, como proteínas de resistência dos antifúngicos fluconazol, ciclo-heximida, leptomicina B, proteína de resistência a oxidação, a radiação UV além de outras (MELLO *et al.*, 2019).

Comparando as faixas etárias de pacientes com FC, é possível observar que os pacientes mais jovens apresentam maior colonização por espécies de *Scedosporium* além de apresentar uma resposta broncopulmonar mais alérgica. A colonização dessas espécies em pacientes mais jovens pode ser explicada pelo fato de crianças terem mais contato com solo e ambientes em que esses fungos estão comumente presentes em suas atividades ao ar livre (MELLO *et al.*, 2019).

O diagnóstico desse fungo se torna difícil por apresentar características semelhantes a infecção por *Aspergillus*, *Fusarium* e outras espécies fúngicas. O diagnóstico é dado após realizar diversas pesquisas que envolvem morfologia, citologia e abordagem fenotípicas e genotípicas (MELLO *et al.*, 2019). O uso de técnicas por imagem, como raio X, como método de diagnóstico não resulta em um diagnóstico confiável por as características encontradas serem inespecíficas, assim como por não existir marcadores sorológicos específicos para essas espécies fúngicas para o caso de tomografia computadorizada. Também não há marcadores específicos para detecção de fungos do gênero *Scedosporium*. O uso de ensaio sorológico é possível identificar apenas que a infecção é provocada por fungo utilizando marcadores para β -(1,3)-D-glucana (MELLO *et al.*, 2019).

Em um estudo realizado por Mina e colaboradores em 2017, foi desenvolvido um teste que é capaz de detectar infecção por fungos do gênero *Scedosporium* em pacientes com FC, além do teste ser capaz de diferenciar infecção por *Aspergillus*. Essa técnica utiliza duas proteínas recombinantes encontradas em *S. boydii*. (MINA *et al.*, 2017).

1.3. Interações Microbianas no Contexto da FC

Diferentes tipos de interação entre micro-organismos são conhecidos, tais como simbiose, parasitismo, mutualismo, comensalismo, sinergismo e *quorum sensing*.

Simbiose é a interação entre dois ou mais organismos de diferentes espécies (DIMIJIAN, 2000). As diferentes interações entre organismos como o parasitismo, mutualismo e comensalismo fazem parte do conceito de simbiose (DIMIJIAN, 2000) em que no parasitismo a relação parasito-hospedeiro traz danos ao hospedeiro (CUMMINGS *et al.*, 2009). No mutualismo a interação entre os organismos traz benefícios para as espécies envolvidas (SHINGLETON *et al.*, 2005) já no comensalismo apenas quem é beneficiado na interação é a espécie comensal, mas o hospedeiro não sofre danos (MOUGI, 2016).

Quorum Sensing (QS) é um mecanismo de comunicação que ocorre entre células de mesma espécie ou espécies diferentes capazes de modificar a expressão gênica desses micro-organismos em resposta a mudança do ambiente. Em bactérias, QS ativa mecanismos de defesa como produção de biofilme e fatores de virulência (SCOFFONE *et al.*, 2019).

São conhecidos dois sistemas de QS relacionados a *S. aureus*, sendo eles Gene Regulador Acessório (Agr) e o sistema LuxS. Existem quatro diferentes variantes de Agr, sendo eles classificados de A à D. É conhecido que Agr se encontra inativo durante a formação do biofilme, mas está ativo no desprendimento da célula, facilitando sua disseminação para outros tecidos (SCOFFONE *et al.*, 2019).

Das moléculas mais estudadas relacionadas ao QS de *P. aeruginosa* estão relacionadas às Homoserinas Lactonas (HSLs), Quinolonas (PQS) e fenazinas (BRIARD *et al.*, 2019), enquanto que no Complexo *B. cepacia* algumas são comuns para todas espécies, como a N-acil-homoserina lactona (AHL), e outras são espécie específica. (SCOFFONE *et al.*, 2019).

Em relação aos fungos, a primeira molécula de QS isolada foi farnesol de *C. albicans*. Logo em seguida, foram identificadas outras moléculas como tirosol, feniletanol e triptofol. Essas moléculas são importantes para o desenvolvimento de biofilme, competição de nutrientes, e auxiliam no processo infeccioso e estabelecimento das colônias (WONGSUK *et al.*, 2016).

Como visto, é frequente a presença de colonização dos pulmões de pacientes com FC por diferentes espécies bacterianas e fúngicas simultaneamente. Dessa forma, para o melhor entendimento da interação desses patógenos com o hospedeiro, é crescente o interesse em estudos que buscam compreender as relações estabelecidas entre esses micro-organismos no ambiente pulmonar da FC.

As interações microbianas ocorrem a todo momento na natureza, uma vez que diferentes espécies estão constantemente disputando fontes de nutrientes num mesmo nicho. Diferentes fatores vão influenciar no resultado dessa interação, provocando uma interação benéfica, neutra ou negativa para um ou ambos micro-organismos (ARVANITIS *et al.*, 2015).

Interações benéficas podem ser vistas por exemplo com fungo *C. albicans*, em que a formação do seu biofilme promove o crescimento de algumas bactérias por protegê-las de estresses ambientais (ARVANITIS *et al.*, 2015). Por outro lado, as interações microbianas no mesmo ambiente podem levar a morte de um deles, como é o caso da própria *C. albicans* na presença de *P. aeruginosa*, em que a formação do biofilme bacteriano leva a morte do fungo (ARVANITIS *et al.*, 2015).

Pacientes com FC colonizados por fungos também estão, na maioria das vezes, colonizados por espécies bacterianas de forma concomitante, e essa interação fungo-bactéria contribui para complicações pulmonares e os impactos observados nos portadores dessa doença (CHEN *et al.*, 2018). Nesse contexto, é descrito não somente uma relação direta entre esses patógenos, mas também pode ocorrer a modificação do ambiente, influenciando no crescimento de outros micro-organismos. Essas interações podem inclusive proporcionar a melhor biodisponibilidade de algum medicamento, influenciando negativamente a permanência do micro-organismo alvo. Esse tipo de relação foi observada entre *P. aeruginosa* e *C. albicans*, em que a bactéria tem o potencial de ação sinérgica com a classe antifúngica dos azóis, potencializando seu efeito sobre o fungo (ARVANITIS *et al.*, 2015). Tendo em vista interações dinâmicas das interações entre fungos e bactérias, há de se esperar que essas interações modifiquem o curso das infecções pulmonares em pacientes com FC.

Dentre as interações mais estudadas em pacientes com FC está a entre *A. fumigatus* e *P. aeruginosa*, principalmente em pacientes adultos. A bactéria *P. aeruginosa* evolui no ambiente pulmonar dos pacientes com FC, passando de colônias não mucoides para colônias mucoides. Apesar da clínica apresentar dados em que há um aumento na resposta inflamatória levando à um declínio na função pulmonar e respostas clínicas mais graves em pacientes co-infectados com *A. fumigatus* e *P. aeruginosa*, modelos murinos apresentaram maior sobrevivência quando o camundongo estava co-infectado por essas espécies do que infectado apenas por *A. fumigatus*. Como o crescimento de hifas de *A. fumigatus* apresentou declínio após

a inoculação de *P. aeruginosa*, isso nos sugere que a bactéria interfere no crescimento fúngico, sendo por secretar substâncias que promovem essa ação fungicida/fungistática ou por estimular uma resposta imunológica. Essas substâncias são as moléculas relacionadas ao *quorum sensing* da *P. aeruginosa*. Apesar do mecanismo de ação das HSLs não estarem elucidadas, sabe-se que essas moléculas são capazes de reduzir a formação de hifa e conseqüentemente a redução da biomassa fúngica do *A. fumigatus*. As moléculas PQS impedem a formação do biofilme por impedir a fixação dos conídios, bloqueando assim a germinação. Além disso, as fenazinas em altas concentrações induzem mitocôndria a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (SNR) que ao serem liberadas no citoplasma promovem a morte fúngica (BRIARD *et al.*, 2019).

Os resultados dessas interações podem variar de acordo com a amostragem e idade do paciente, uma vez que a evolução de *P. aeruginosa* da forma não mucoide para a forma mucoide ocorre devido a idade (CHEN *et al.*, 2018). Estudos mostram que a interação entre *P. aeruginosa* e espécies de *Candida* pode alterar a patogenicidade da bactéria. Entretanto, essa análise é dificultada pelo fato de *P. aeruginosa* ser amplamente pesquisada em amostras clínicas, enquanto *Candida* spp tem sua detecção e identificação realizadas ocasionalmente, por não apresentar tanta relevância clínica (HAIKO *et al.*, 2019). Haiko e colaboradores em 2019 realizaram um estudo visando determinar a coexistência de espécies bacterianas com espécies de *Candida*, fazendo comparação com amostras de pacientes com FC e pacientes com outras doenças respiratórias. Nesse estudo, foi observado que não houve diferença entre as espécies bacterianas encontradas em pacientes adultos e crianças com FC, porém a infecção por *Candida* spp. apresentou maiores níveis em adultos do que em crianças. Além disso, dentre as espécies de *Candida* spp., a mais encontrada é *C. albicans* (HAIKO *et al.*, 2019). Além desses dados, Haiko e colaboradores em 2019 observaram que a coexistência de *Candida* spp. com bactérias patogênicas é mais alta em pacientes com FC do que em pessoas com outras doenças respiratórias e essa constatação também é verdadeira quando comparados crianças e adultos com FC, sendo essa coexistência maior em adultos que em crianças (HAIKO *et al.*, 2019).

P. aeruginosa produz diferentes tipos de fatores de virulência e uma das substâncias secretadas, como a fenazina, é capaz de comprometer o

desenvolvimento de biofilme e o crescimento da *C. albicans* (CHEN *et al.*, 2018). A fenazina azul, conhecida como piocianina é tóxica para diferentes bactérias e fungos, além de danificar também células de mamíferos. É sabido que sobrenadantes de culturas de *P. aeruginosa* contém alguns tipos de fenazina como fenazina-1-carboxalato (GIBSON *et al.*, 2009).

Evidências na literatura mostram que na Austrália e alguns países da Europa os casos de infecções provocadas por espécies de *Scedosporium* têm aumentado, sendo esses fungos classificados como o segundo fungo associado a pacientes com FC. Kaur e colaboradores em 2015 realizaram interações entre *S. aurantiacum* e *P. aeruginosa*, visando entender os mecanismos de interação entre essas espécies de fungo e bactéria. Kaur e colaboradores em 2015 realizaram inicialmente experimentos em que as células foram inoculadas em placa de Petri contendo um ágar sintético que mimetiza as condições da FC, sendo em linhas transversais o fungo e a bactéria. Nesses experimentos, eles observaram que não havia inibição de crescimento nessas condições. Para verificar a importância do contato entre as células, eles realizaram a inoculação dos micro-organismos em uma placa de seis poços separados por uma membrana em que não havia contato entre as espécies, mas permitia a troca de nutrientes e substâncias. Nesse caso, a troca de substâncias resultou na inibição de crescimento de *S. aurantiacum*, indicando que *P. aeruginosa* secreta algum componente capaz de interferir no crescimento fúngico. As moléculas que participam da virulência da *P. aeruginosa*, fenazina e piocianina não se mostraram capazes de inibir o crescimento de *S. aurantiacum* nesse estudo (KAUR *et al.*, 2015).

Mowart e colaboradores em 2010 realizaram diferentes experimentos envolvendo a interação entre *P. aeruginosa* e *Aspergillus fumigatus*. Na interação direta de suspensão bacteriana e fúngica teve como resultado uma redução significativa da biomassa fúngica. A fim de descobrir se o efeito dessa interação ocorre apenas com o contato célula-célula ou se moléculas secretadas pela *P. aeruginosa* pode provocar esse efeito. Nos experimentos de interação indireta foram realizados dois testes: o contato com o conídio fúngico com o sobrenadante bacteriano aquecido e incubação do conídio com a célula bacteriana viável separada por membrana semipermeável. Essa membrana permite que líquido e substâncias passem através dela, mas apresenta poro que impede a passagem e o contato dos micro-organismos. O sobrenadante aquecido não apresentou redução significativa

da biomassa fúngica, enquanto a interação entre células fúngicas e bacterianas separadas pela membrana semipermeável reduziu o crescimento da biomassa fúngica para 19,1% (MOWART *et al*, 2010).

Outro experimento também realizado por Mowart e colaboradores em 2010 foi a interação da célula bacteriana com o biofilme fúngico já formado. O resultado desse experimento não apresentou redução significativa da biomassa fúngica (MOWART *et al*, 2010).

Análises *ex vivo* podem auxiliar a entender essas interações entre os micro-organismos e seus efeitos estimuladores e/ou inibitórios. Tanto bactérias quanto fungos são capazes de produzir e secretar substâncias que interferem no ambiente em que estão alocadas. Essas moléculas secretadas pode influenciar diretamente outro micro-organismo ou pode modificar o ambiente em que se encontra, podendo beneficiar ou não o crescimento de outro micro-organismo (ARVANITIS *et al.*, 2015).

Considerando que o prognóstico da FC depende de fatores como o micro-organismo envolvido na colonização pulmonar, estudos visando entender os mecanismos de interação fungo-bactéria nesse contexto pode ajudar a melhorar o tratamento e a reduzir os riscos de morte dos pacientes em decorrência do quadro infeccioso nos pulmões.

2. JUSTIFICATIVA

A partir desse cenário em que pacientes com FC podem ser acometidos por infecções pulmonares bacterianas e/ou fúngicas e que há interações entre esses micro-organismos, esse estudo se propõe a verificar como o entendimento dessas interações fungo x bactéria podem auxiliar no tratamento dos pacientes com FC.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo avaliar a dinâmica de interação dos fungos *S. apiospermum* e *S. boydii* com as bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. cepacia*, todos esses micro-organismos relevantes na doença FC.

3.2. Objetivos específicos

- Analisar a interação da célula fúngica com a célula bacteriana em meio de cultura sólido;
- Analisar a interação da célula fúngica com a célula bacteriana viável e tratada com metanol em meio de cultura líquido;
- Analisar a interação da célula fúngica com a célula bacteriana sem contato direto, intermediado por membrana semi-permiável;
- Analisar a formação de biomassa fúngica na presença de sobrenadante bacteriano;
- Analisar a interferência do sobrenadante de cultivo bacteriano em biomassa fúngica pré-formada;
- Analisar a composição do sobrenadante bacteriano.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Micro-organismos e condições de cultivo

S. aureus cepa ATCC 25923, *P. aeruginosa* cepa ATCC 27853 e *B. cepacia* cepa ATCC 25416 foram mantidas em culturas, em 50 mL de meio caldo nutriente (extrato de carne e peptona) da marca Difco à 37°C, com repiques semanais (pré-inóculo bacteriano). As linhagens bacterianas foram gentilmente cedidas pelo Prof. André Luís Souza dos Santos, do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Scedosporium boydii cepa HLPB/Clado 4 (isolado de paciente com micetoma eumicótico) e *Scedosporium apiospermum* cepa RK107-0417/Clado 5 foram mantidos em 200 mL de meio caldo batata dextrosado (PDB) da marca Acumedia à temperatura ambiente sob agitação, com repiques quinzenais (pré-inóculo fúngico). As linhagens fúngicas foram gentilmente cedidas pelo Dr. Bodo Wanke, do Instituto de Pesquisa Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz.

4.1.1. Obtenção de conídios

Para obtenção dos conídios, os fungos foram inoculados em placa de Petri contendo 15mL de ágar batata dextrosado (PDA) da Acumedia. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 7 dias. Após o período de incubação, foi realizada a raspagem do crescimento fúngico. Para isso, foram adicionados 10mL de Tampão Fosfato Salino (PBS) 0,1M pH7,2 em cada placa e com auxílio de uma espátula estéril foi realizada a raspagem do material. O raspado foi transferido, com uma pipeta estéril, para tubo Falcon de 50mL passando antes por filtro ("cell strainer") com porosidade de 0,40µm, a fim de reter fragmentos da raspagem. Os tubos foram centrifugados a uma velocidade de 3,5x1000 rpm durante 10 minutos. Após o tempo de centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 1mL de PBS 0,01M pH 7,2 e transferido para microtubo estéril. O precipitado foi lavado mais duas vezes e em cada etapa foi centrifugado a uma velocidade de 12x1000 rpm durante 3 minutos.

Para a contagem de conídios, foram realizadas duas diluições e transferido 10µL da última diluição para câmara de Newbauer e a leitura foi realizada com auxílio de um microscópio óptico. A partir da contagem feita na câmara de Newbauer, foram realizados cálculos para determinar o volume necessário para obter as concentrações de conídios usadas em cada ensaio.

Cada etapa descrita acima, foi realizada para os fungos *S. apiorpermum* e *S. boydii*.

4.1.2. Obtenção das culturas bacterianas

Para a utilização das culturas bacterianas contendo célula viva, foi realizada a incubação de cada espécie bacteriana separadamente (*S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. cepacia*) em tubo Falcon de 15 mL contendo caldo nutriente. A incubação foi feita 24 horas antes do uso das células bacterianas à uma temperatura de 37°C.

4.2. Obtenção dos sobrenadantes bacterianos

Sobrenadantes de culturas livre de células foram preparados após a incubação de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. cepacia* a 37°C por 7, 14 e 21 dias em meio caldo nutriente. Após este tempo, o sobrenadante foi filtrado através de membrana com poros de 0,22 µm (DISMIC® - 13cp).

Para a preparação dos sobrenadantes liofilizados, após a filtração, os sobrenadantes foram dialisados em membranas de diálise, por 3 dias, contra água destilada. A troca da água da diálise foi realizada 2 vezes ao dia. Após a diálise, os sobrenadantes livres de células bacterianas foram colocados em tubos de vidro e passaram pelo processo de congelamento para posteriormente serem liofilizados. O tempo de liofilização variou de acordo com o volume de cada frasco.

4.3. Interação célula fúngica com célula bacteriana

Nesse trabalho foram realizados diferentes tipos de interação entre as células fúngicas de *S. boydii* e *S. apiospermum* com células viáveis ou sobrenadantes livres de células viáveis das bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. cepacia*.

As diferentes interações foram realizadas para determinar o comportamento da célula fúngica em cada situação, quando desafiada com as células bacterianas viáveis seja em meio de cultura líquido ou sólido, célula bacteriana não viável e os sobrenadantes bacterianos.

Para facilitar a compreensão das interações realizadas entre as células fúngicas e bacterianas, foi produzido um esquema (**Figura 2**). Cada experimento relatado a seguir foi realizado pelo menos 3 vezes para que os resultados pudessem fornecer dados possíveis de serem analisados estatisticamente.

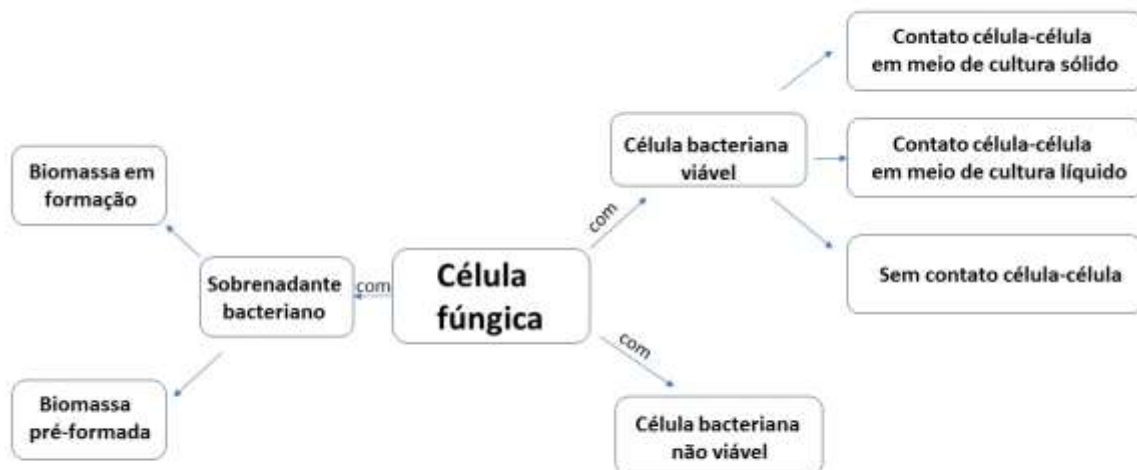


Figura 2: Esquematização das interações realizadas entre as células fúngicas e células bacterianas (viáveis, não viáveis ou sobrenadante de cultura das bactérias).

4.3.1. Concentração Mínima Inibitória (MIC)

Para determinar qual concentração do antifúngico Voriconazol é capaz de interferir no crescimento dos fungos *S. boydii* e *S. apiospermum*, foi realizado uma curva de calibração de concentração mínima inibitória.

O antifúngico Voriconazol (Sigma) foi preparado em meio de cultura DMEM F12. Com uma concentração inicial de 50µg/mL, foram feitas diluições sucessivas em placa de 96 poços em que cada poço seguinte a concentração caia a metade, já levando em consideração o volume final do poço. Foram incubados em cada poço 3×10^4 de conídios.

A placa foi incubada por 72 horas a temperatura de 37°C. Após o tempo de incubação foi verificado a viabilidade fúngica através da leitura por XTT sendo incubada por 2 horas em estufa de 37°C e lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm.

Voriconazol é o antifúngico de primeira escolha para o tratamento de fungos do gênero *Scedosporium* (BOX *et al*, 2018) e por esse motivo foi a substância de escolha para o MIC.

4.3.2. Interação célula-célula em placa de Petri

A partir do protocolo adaptado de Rella e colaboradores (RELLA *et al.*, 2012), foi realizado interação de células bacterianas viáveis com células fúngicas em placa de Petri. Uma suspensão com concentração de 10^5 de conídios foi inoculada em placa de Petri contendo PDA. O conteúdo foi uniformemente espalhado por toda placa com auxílio de uma alça de Drigalski. Discos de papel de filtro estéril foram acrescentados com auxílio de uma pinça no centro de cada placa e um volume de 10µL de suspensão bacteriana (concentração de cerca de 10^5 células) foi dispensada sobre o disco de papel de filtro.

As condições acima foram feitas em duplicatas e realizadas com as três bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. cepacia* e os dois fungos *S. apiospermum* e *S. boydii*. Para condição controle, foram acrescentados nos discos de papel de filtro 10µL de caldo nutriente estéril. As placas foram incubadas à 37°C por 72 horas.

4.3.3. Interação célula-célula em meio líquido

Em placa de 24 poços foram inoculados em 900mL do meio DMEM, contendo 10^5 conídios. Foram acrescentados em cada poço, 100µL de suspensão bacteriana (aproximadamente 10^5 de célula bacteriana) em PBS 0,01M pH 7,2. Para condição controle foi acrescentado 100µL de PBS estéril. A placa foi incubada 24 horas em temperatura de 37°C.

Após o tempo de incubação, cada poço foi raspado com aparato “cell scraper” para que células que estivessem aderidas à placa pudessem voltar a suspensão. Após homogeneização do conteúdo de cada poço, 500µL foram retirados e diluídos em 4,5mL de PBS 0,01M pH7,2 em tubo Falcon. O conteúdo de cada tubo foi tratado com 1% de antibiótico penicilina-estreptomicina durante 2 horas em temperatura ambiente, a fim de eliminar as células bacterianas.

Terminado o tempo de incubação com o antibiótico, foram retirados de cada tubo 100µL da suspensão e transferido para uma placa de 96 poços. Para observar a viabilidade fúngica, foram acrescentados em cada poço, 54µL do preparado de XTT com menadiona. A placa foi incubada por 2 horas em estufa de 37°C. A placa foi lida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 490 nm.

Esse experimento foi adaptado do protocolo de Chen e colaboradores (CHEN *et al.*, 2018).

XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanilide) é um reagente utilizado no método colorimétrico para determinação da viabilidade de células fúngicas. Células fúngicas viáveis convertem o sal em um produto de formazana a partir da clivagem do sal por ação da enzima desidrogenase, o produto dessa reação apresenta coloração alaranjada. A formação da cor evidencia células fúngicas viáveis, pois apenas células vivas, com mitocôndria intacta, são capazes de sintetizar desidrogenase (MELETIADIS *et al.*, 2001) (LOURES *et al.*, 2015).

4.3.4. Interação célula fúngica com célula bacteriana não viável

Para determinar se apenas a presença bacteriana é capaz de inibir o crescimento fúngico, mesmo que a célula não esteja viável, foi realizado um experimento de interação fúngica com células bacterianas mortas usando como base o protocolo de Mowat e colaboradores (MOWAT *et al.*, 2010).

A suspensão de crescimento bacteriano foi centrifugada por 10 minutos à 4,0 x 100 RPM. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 4 vezes o volume de metanol P.A. sobre a célula bacteriana decantada. A suspensão foi homogeneizada a fim de permitir que o metanol entrasse em contato com toda célula bacteriana e a interação com o solvente ocorreu por 2 horas em temperatura ambiente.

Terminado o tempo de interação com o solvente, a suspensão foi centrifugada novamente nas mesmas condições descritas acima e o decantado bacteriano foi lavado exaustivamente com PBS 0,01M pH7,2.

Em placa de 24 poços, foram inoculados em 900mL do meio DMEM, 10^5 conídios. Foram acrescidos em cada poço, 100 μ L de suspensão bacteriana tratadas com metanol em PBS 0,01M pH 7,2. Para condição controle foram acrescidos 100 μ L de PBS estéril. A placa foi incubada 24 horas em temperatura de 37°C.

Após o tempo de incubação, cada poço foi raspado com aparato “cell scraper” para que células que tivessem aderido à placa pudessem voltar a suspensão. Após homogeneização do conteúdo de cada poço, 500 μ L foram retirados e diluídos em 4,5mL de PBS 0,01M pH7,2 em tubo Falcon. Foram retirados de cada tubo, 100 μ L da suspensão e transferidos para uma placa de 96 poços. Para observar a viabilidade fúngica, foram acrescidos em cada poço, 54 μ L do preparado de XTT com menadiona. A placa foi incubada por 2 horas em estufa de 37°C. A placa foi lida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 490 nm.

4.3.5. Interação célula fúngica com célula bacteriana separados por membrana de 0,22 μ m

Outro experimento que nos permite verificar se o contato físico entre as células bacterianas e fúngicas se faz necessário para promover a inibição fúngica é realizando essa interação separando as duas espécies através de uma membrana 0,22 μ m. Separadas pela membrana, as células fúngicas e bacterianas não tem contato direto, mas a membrana permite que haja troca de substâncias entre as duas espécies.

O aparato utilizado para realização desse experimento foi um microtubo tipo eppendorf (Corning® Costar® Spin-X® centrifuge tube filters da Sigma-Aldrich) em que em seu interior era acoplado uma espécie de cesto com fundo semipermeável de 0,22 μ m.

Antes do início do experimento, cada cesto foi pesado de maneira estéril. Na parte inferior de cada microtubo foram adicionados 250 μ L de suspensão bacteriana e para condição controle adicionado 250 μ L de caldo nutriente. O cesto com membrana semipermeável era inserido no microtubo e 250 μ L de suspensão fúngica contendo uma concentração de 10^5 foi acrescida dentro do cesto. Os tubos foram incubados por 24 horas em estufa com temperatura de 37°C.

Terminado o tempo de incubação, os cestos com membrana semipermeável foram removidos e secos em forno Pasteur. Após secura, os cestos foram pesados para determinação do peso seco de célula fúngica.

O experimento descrito acima foi adaptado do protocolo de Kaur e colaboradores (KAUR *et al.*, 2015).

4.3.6. Interação biomassa fúngica com sobrenadante bacteriano

A fim de descobrir se a inibição provocada no crescimento fúngico é ocasionado pela presença da célula bacteriana ou se substâncias produzidas e secretadas também exercem esse efeito, foi realizado experimento desafiando os conídios fúngicos com sobrenadantes bacterianos livres de célula.

Para isso, foi crescida uma suspensão bacteriana em diferentes dias de incubação, sendo eles 7, 14 e 21 dias. Após o tempo de incubação de cada período,

os tubos foram centrifugados (para diminuir a quantidade de célula suspensa) e o sobrenadante foi filtrado em filtro de membrana de poro 0,22µm. Essa membrana é considerada esterilizante, uma vez que retém as células bacterianas, mas permite a passagem de líquido e substâncias.

Em placa de 96 poços foram adicionados 200µL de PDB por poço juntamente com 200µL de sobrenadante bacteriano livre de célula e para a condição controle, os 200µL de sobrenadante foram substituídos por caldo nutriente. Uma concentração de 10^5 conídios foi acrescentada em cada poço. A placa foi incubada em estufa à 37°C por 48 horas. Após a incubação, as placas foram lavadas com PBS 0,01M pH 7,2 por três vezes para remover as células planctônicas que não estavam aderidas na placa e não faziam parte do biofilme formado.

Para avaliação da viabilidade fúngica, foram adicionados em cada poço 54µL de XTT em menadiona por 2 horas à 37°C no escuro. Após esse tempo, a placa foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490nm.

Experimento utilizando os sobrenadantes bacterianos e desafiando-os com as células fúngicas é uma adaptação descrita em Homa e colaboradores (HOMA *et al*, 2019).

4.3.7. Interação biomassa fúngica pré-formada com sobrenadante bacteriano

Nesse experimento, o fungo é desafiado pelo sobrenadante bacteriano só após a formação prévia de biomassa fúngica. Com isso é possível determinar se o sobrenadante bacteriano é capaz de interferir na formação e crescimento da biomassa fúngica já estabelecida.

A formação prévia dessa biomassa foi realizada incubando concentração de 10^5 conídios em placa de 96 poços em meio PDB por 48 horas a temperatura de 37°C.

Terminado as 48 horas de incubação, o conteúdo da placa foi removido e foram acrescentados 200µL de sobrenadante bacteriano para as condições desafio e 200µL de caldo nutriente para a condição controle. Após a troca de conteúdo as placas foram incubadas por mais 24 horas a temperatura de 37°C. Após a incubação, as placas foram lavadas com PBS 0,01M pH 7,2 por três vezes para

remover as células planctônicas que não estavam aderidas na placa e não fazia parte do biofilme formado.

Para avaliação da viabilidade fúngica, foi adicionado em cada poço 54µL de XTT em menadiona por 2 horas à 37°C no escuro. Após esse tempo a placa foi lida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 490nm.

Experimento utilizando os sobrenadantes bacterianos e desafiando-os com as células fúngicas é uma adaptação descrita em Homa e colaboradores (HOMA *et al*, 2019).

4.3.7 Interação fungo x sobrenadantes bacterianos em diferentes concentrações

Como na determinação das classes de moléculas presentes nos sobrenadantes bacterianos apresentou maior concentração de proteína, foi realizado então um experimento desafiando os conídios com sobrenadantes bacterianos com concentração proteica conhecida.

A partir da dosagem de proteína feita do sobrenadante liofilizado, foi determinado o volume necessário para obter concentrações dos sobrenadantes bacterianos de 100µg, 50µg e 25µg em um volume final de 100µL.

Em uma placa de 96 poços, uma concentração de 10^5 de conídio dos fungos *S. boydii* e *S. apiospermum* foram incubados juntamente com os volumes de sobrenadantes bacterianos de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. cepacia* necessários para apresentar concentração final de 100µg, 50µg e 25µg por poço. Foi adicionado ainda uma quantidade suficiente de PDB para atingir o volume final de 100µL por poço.

As placas foram incubadas a temperatura de 37°C por 4, 24 e 48 horas e após o final de cada incubação foi medida a viabilidade fúngica através de 54µL de XTT em menadiona por poço durante 2 horas à 37°C no escuro. Após esse tempo a placa foi lida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 490nm.

4.4. Determinação das classes de moléculas presentes nos sobrenadantes bacterianos

4.4.1. Dosagem de Proteína

Para a dosagem de proteína, foi utilizado o método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951). O método de Lowry utiliza cinco reagentes para quantificação e tem a albumina como padrão para realizar a curva padrão de calibração.

Para a preparação de cada uma das diferentes amostras, foi pesado 1 mg de cada sobrenadante bacteriano livre de célula liofilizado e acrescentado 1 mL de água estéril.

Em uma placa de 96 poços, foram adicionadas as concentrações de albumina (0,00 mg/mL; 0,05 mg/mL; 0,10 mg/mL; 0,25 mg/mL; 0,50 mg/mL e 1,00 mg/mL) em 4 replicatas. As amostras dos sobrenadantes a serem dosadas foram colocadas em 3 replicatas. Em cada poço, foram adicionados 100 µL do reagente D (junção dos 3 primeiros reagentes contendo carbonato de sódio em hidróxido de sódio 0,1M, sulfato de cobre e tartarato de sódio e potássio ambos em água), e a placa foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. Após esse tempo, foram adicionados em cada poço 10 µL do reagente E (folin e água 1:1 (v/v)), e a placa foi incubada por 20 minutos à temperatura ambiente. Após esse tempo, a placa foi lida em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 660nm.

Os dados obtidos foram analisados através do programa Excel, para a realização da curva de calibração e quantificação de proteína presente em cada amostra. Para cada nova obtenção de sobrenadante liofilizado, foi realizado uma nova dosagem de proteína.

4.4.2. Dosagem de açúcar

Para a dosagem de açúcar, usou-se o método de fenol-sulfúrico. Para a determinação, foram necessários os seguintes reagentes: Fenol 80% (20 g de fenol em 5 mL de água), H₂SO₄ 75% (60 mL de H₂SO₄ em 20 mL de água) (DUBOIS *et al.*, 1956).

O padrão foi preparado com manose na concentração 1 mg/mL em água destilada e a partir dessa concentração foram preparadas diluições para obtenção das demais concentrações. Para realizar a curva de calibração foram utilizadas as seguintes concentrações: 0,0 mg/mL; 0,1 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,3 mg/mL; 0,4 mg/mL e 1,0 mg/mL. Para a preparação de cada amostra a ser testada, foi pesado 1 mg de cada sobrenadante bacteriano livre de célula liofilizado e acrescentado 1 mL de água estéril.

Em tubos de ensaio, foram acrescentados os reagentes nas diferentes concentrações do padrão e as amostras. Os tubos foram aquecidos em banho-maria por 20 minutos. Após o tempo de incubação e resfriamento das amostras, foi aliquotado 200µL de cada amostra para uma placa de 96 poços e o resultado lido em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490nm.

Os dados obtidos foram analisados através do programa Excel, para a realização da curva de calibração e quantificação de açúcar presente em cada amostra. Para cada nova obtenção de sobrenadante liofilizado, foi realizada uma nova dosagem de açúcar.

4.5. Extração de moléculas no sobrenadante bacteriano

4.5.1. Extração de Lipídio

Para a extração de lipídio, foi utilizado o método descrito por Folch e colaboradores (FOLCH *et al*, 1957). Os sobrenadantes liofilizados foram tratados com clorofórmio : metanol na proporção 1:2 (v/v) em agitação por 2 horas. Após a extração o conteúdo líquido foi evaporado com gás nitrogênio. As amostras foram aplicadas na placa cromatográfica utilizada para a cromatografia de camada fina (TLC do inglês – Thin Layer Chromatography)

A fase móvel foi preparada um dia antes utilizando os solventes clorofórmio : metanol : hidróxido de amônio 2M nas proporções 40:10:1 (v/v) e colocado em cuba cromatográfica juntamente com papel de filtro para saturação do ambiente com a fase móvel.

4.5.2. Extração de Açúcar

Para a extração de açúcar foi pesado 1mg dos sobrenadantes liofilizados de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. cepacia* para tubo de vidro e solubilizados em 1mL de ácido trifluoracético. As amostras ficaram em estufa à 105°C por 3 horas. Após esse período o conteúdo líquido foi evaporado com gás nitrogênio. Quando o conteúdo atingia a secura era acrescentado cerca de 1mL de água destilada e o conteúdo líquido era novamente levado à secura através do gás nitrogênio, esse processo de lavagem foi realizado 5 vezes. Após as lavagens foram adicionados 500µL de metanol e o solvente foi levado à secura com gás nitrogênio.

Para aplicar o conteúdo extraído na placa, o concentrado de açúcar foi resuspendido em 100µL de metanol.

A placa TLC deve ser preparada um dia antes da aplicação das amostras e padrão. A placa HPTLC é borrifada com fosfato de potássio monobásico 0,3M.

É utilizado como fase móvel os solventes n-butanol : acetona : água na proporções 4:5:1 (v/v). A fase móvel foi preparada e colocada na cuba cromatográfica junto com papel de filtro um dia antes da corrida para que o ambiente saturasse com os solventes.

Como padrão foi utilizado uma solução 1% contendo glicose, manose e galactose diluídos em água destilada.

As amostras e padrão foram aplicados na placa cromatográfica previamente tratada com fosfato de potássio monobásico e corridas na fase móvel 5 vezes. Ao término de cada corrida a placa era retirada da cuba cromatográfica, era esperado a placa secar e depois a mesma era reintroduzida na cuba para mais uma corrida.

Ao término das 5 corridas, foi borrifada sobre a placa o reagente de orcinol com ácido sulfúrico e a placa foi aquecida para que assim ocorresse a revelação e o surgimento das bandas referentes a compostos de açúcar.

Método de extração de açúcar foi realizado a partir dos protocolos descritos em Xisto e colaboradores, e Bittencourt e colaboradores. (XISTO *et al*, 2016) (BITTENCOURT *et al*, 2006).

4.6. Análise Estatística

Os dados foram apresentados como média dos valores \pm SEM e foram comparados usando teste one-way ANOVA e comparações múltiplas utilizando o teste Bonferroni (Bonferroni post-test). O programa GraphPad 5.0 foi usado para fazer as análises. Os valores de P foram considerados significativos quando $*p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Concentração Mínima Inibitória (MIC)

Para determinar a concentração em que o antifúngico Voriconazol é capaz de produzir o efeito fungistático/fungicida em *S. boydii* e *S. apiospermum* foi realizado o experimento do contato da substância em diferentes concentrações com as células fúngicas. Foram testadas 11 concentrações, cada concentração de Voriconazol entrou em contato com uma quantidade de 3×10^4 de conídios. A interação com o antifúngico foi de 72 horas à 37°C. A viabilidade fúngica foi verificada com XTT e lida em espectrofotômetro em comprimento de 490nm.

A partir dos dados obtidos, foi feito um gráfico (**Figura 3**) correlacionando a concentração com a viabilidade fúngica. Foi escolhido o ponto da curva referente a concentração de 3 μ g/mL, pois era o segundo ponto referente ao decaimento de mais de 50% da viabilidade fúngica.

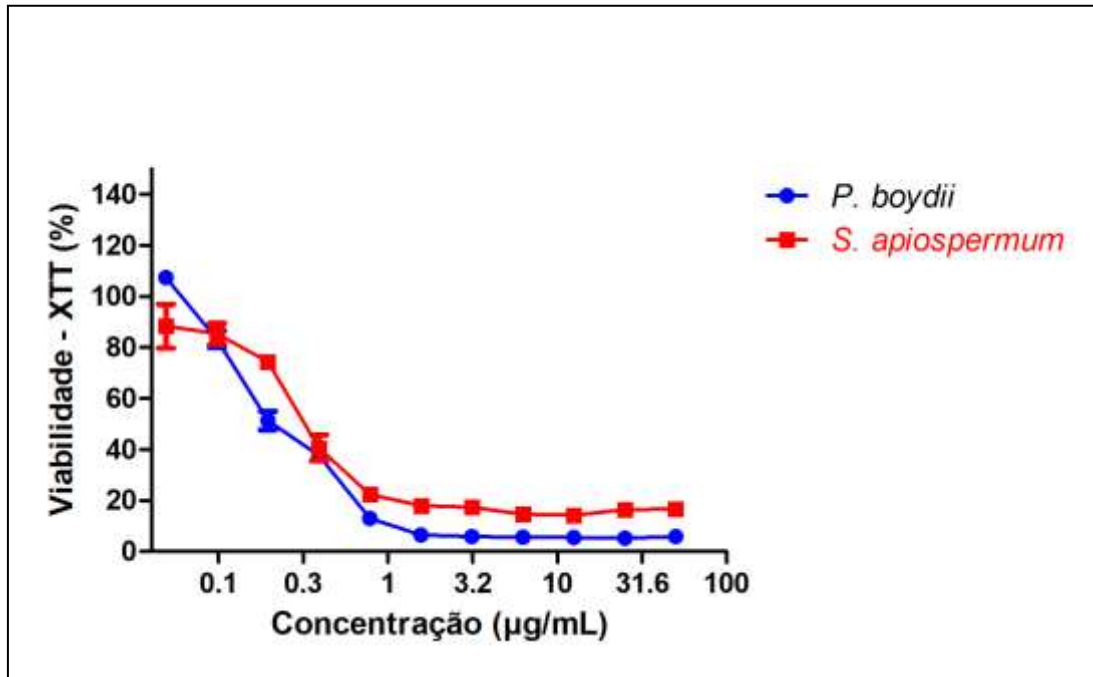


Figura 3: Suscetibilidade fúngica ao Voriconazol correlacionando a viabilidade fúngica (eixo Y) com a concentração do antifúngico Voriconazol (eixo X). É possível observar um decaimento de mais de 50% da viabilidade fúngica a partir da concentração de 1µg/mL tanto para o fungo *S. boydii* (círculo) quanto para o fungo *S. apiospermum* (quadrado).

5.2. Interação célula-célula em placa de Petri

Com o intuito de avaliar a interação entre os fungos *S. apiospermum* e *S. boydii* com as bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. cepacia*, assim como o potencial das bactérias em inibir o crescimento fúngico, foi realizado um co-cultivo simultâneo em placa de Petri contendo meio sólido PDA de cada espécie fúngica com cada espécie bacteriana (**Figura 4**). Foi possível observar que *S. boydii* cresceu normalmente na presença de *S. aureus*, porém seu crescimento foi inibido na presença de *P. aeruginosa* e *B. Cepacia*, uma vez que as células bacterianas adicionadas no centro das placas resultaram na formação de um halo de inibição do crescimento fúngico. Já *S. apiospermum*, apresentou uma pequena inibição na presença de *S. aureus* e uma redução considerável de crescimento na presença de *P. aeruginosa* e *B. Cepacia*.

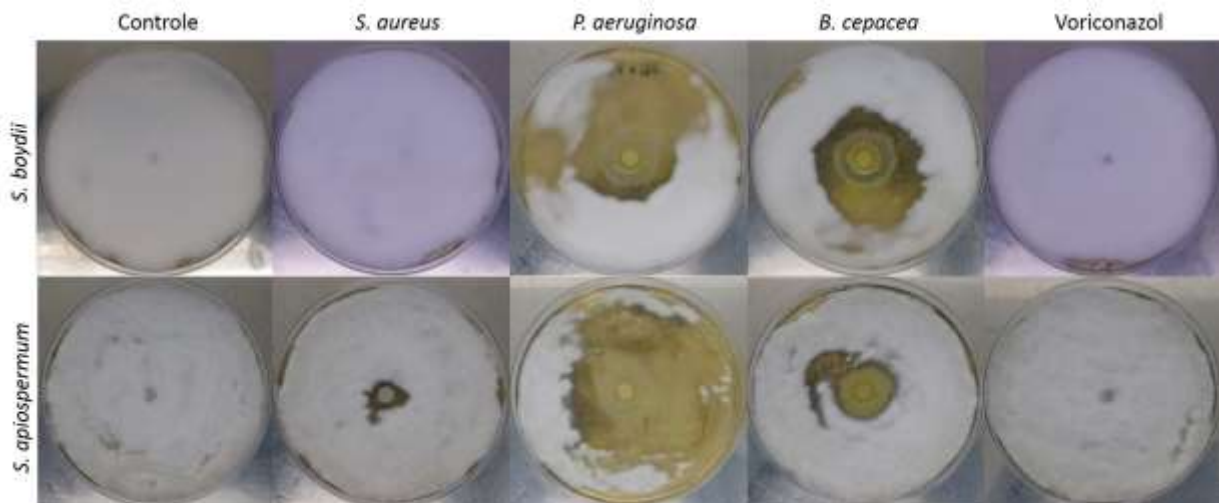


Figura 4: Na primeira fileira encontram-se os resultados da interação fúngica *S. boydii* com as bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. cepacia* e o antifúngico Voriconazol, respectivamente. É possível observar que as bactérias *P. aeruginosa* e *B. cepacia* provocam inibição do crescimento fúngico formando um halo inibitório. Quanto a bactéria *S. aureus* e o antifúngico Voriconazol não provocaram influência negativa no crescimento fúngico. A segunda linha apresenta resultados para o fungo *S. apiospermum*. Os resultados obtidos são bem semelhantes aos encontrados para *S. boydii*, porém é observado um halo sutil na placa da interação com *S. aureus*.

5.3. Interação célula-célula em meio líquido

Para avaliar a interação entre conídios e célula bacteriana em meio de cultura líquido, a fim de descobrir se a interação em meio líquido proporciona resultados semelhantes à interação célula-célula em meio sólido, conídios de *S. boydii* e *S. apiospermum* foram incubados com as bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. cepacia*, em placa de 24 poços por 24h. Após esse tempo, as células bacterianas foram lisadas com solução antibiótica de Penicilina-Estreptomicina à 1%. A viabilidade fúngica foi medida através do uso do reagente XTT. A interação célula-célula através de cultivo em meio líquido também se mostrou capaz de reduzir a viabilidade fúngica (**Figura 5**). Comparado ao grupo controle (crescimento fúngico sem a presença de bactérias), os diferentes grupos testes (fungo x bactéria) apresentaram grande diminuição na viabilidade fúngica em todas as combinações fungo x bactérias testadas.

Esse resultado corrobora com o resultado anterior de co-cultivo em placa de Petri, em que a presença da bactéria, ou substâncias secretadas por ela, são capazes de diminuir e/ou inibir o crescimento fúngico. Quanto a interação fúngica com a bactéria *S. aureus*, o resultado célula-célula em meio líquido se apresentou diferente na interação célula-célula em meio sólido, em que apresentou redução significativa da viabilidade e não foi capaz de formar halo de inibição, respectivamente.

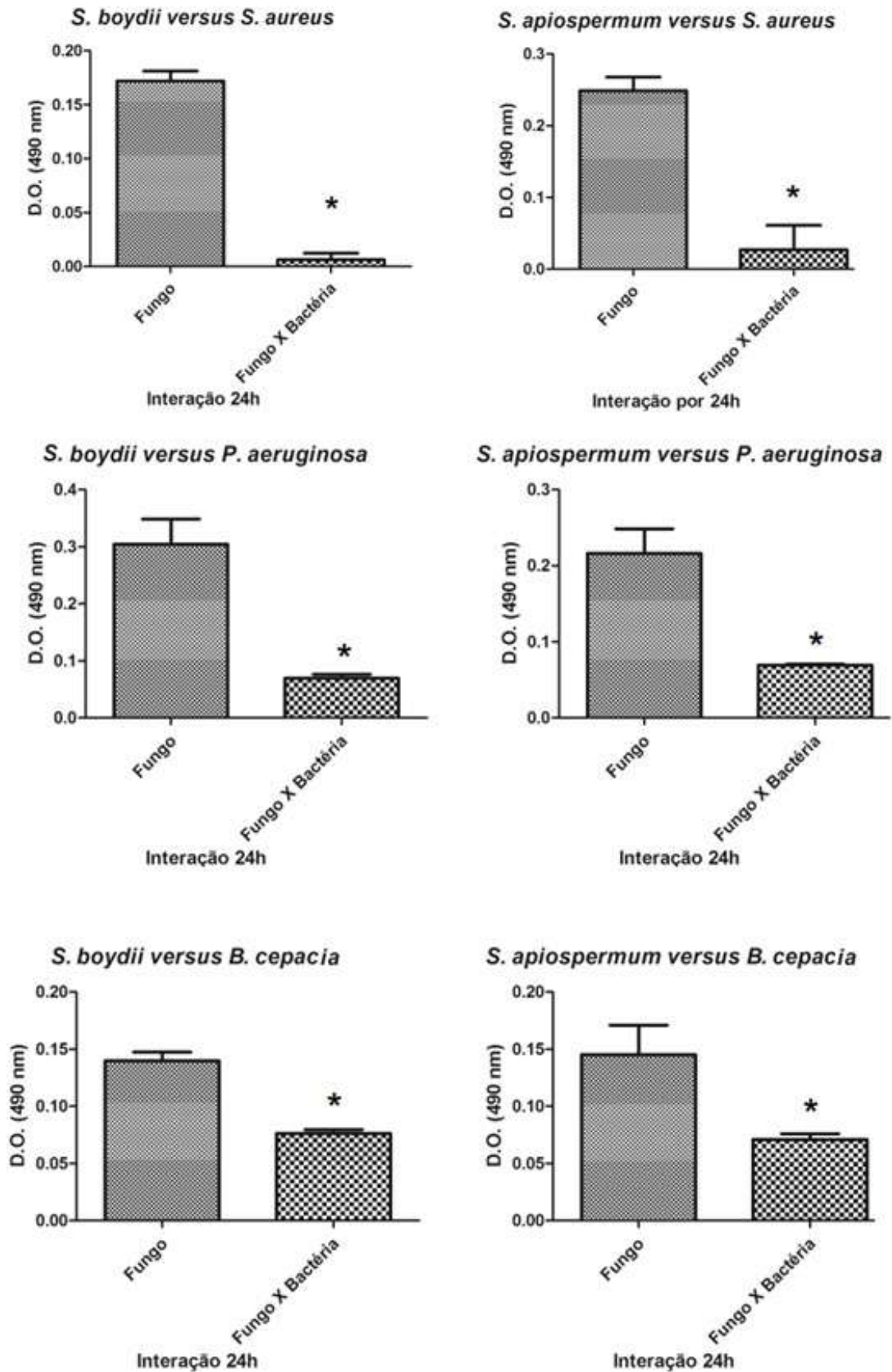


Figura 5: Viabilidade de *S. boydii* (coluna da esquerda) e *S. apiospermum* (coluna

da direita) na ausência (Fungo) ou presença (Fungo X Bactéria) das bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. cepacia*. Após a interação, as células foram incubadas com penicilina-estreptomicina para eliminação das bactérias e a viabilidade fúngica foi avaliada pela técnica de redução de XTT e a leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm.

5.4. Interação célula fúngica com célula bacteriana não viável

As interações fúngicas com células bacterianas viáveis se mostraram bem promissoras em seus resultados tanto na interação com meio de cultura sólido quanto no meio de cultura líquido. Para determinarmos se a presença da bactéria viável é determinante nesse processo de inibição ou se apenas a presença física também é capaz de inibir o crescimento fúngico, foi realizado experimento de interação de conídio fúngico com célula bacteriana morta tratada com metanol P.A.

Através dos resultados obtidos e esquematizados na **Figura 6**, as células bacterianas tratadas com metanol não foram capazes de produzir redução da viabilidade fúngica, esse resultado pode ser observado na interação do fungo *S. boydii* com as bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. cepacia* e *S. apiospermum* com as bactérias *P. aeruginosa* e *B. cepacia*. A interação do *S. apiospermum* e *S. aureus* foi capaz de produzir inibição na viabilidade fúngica.

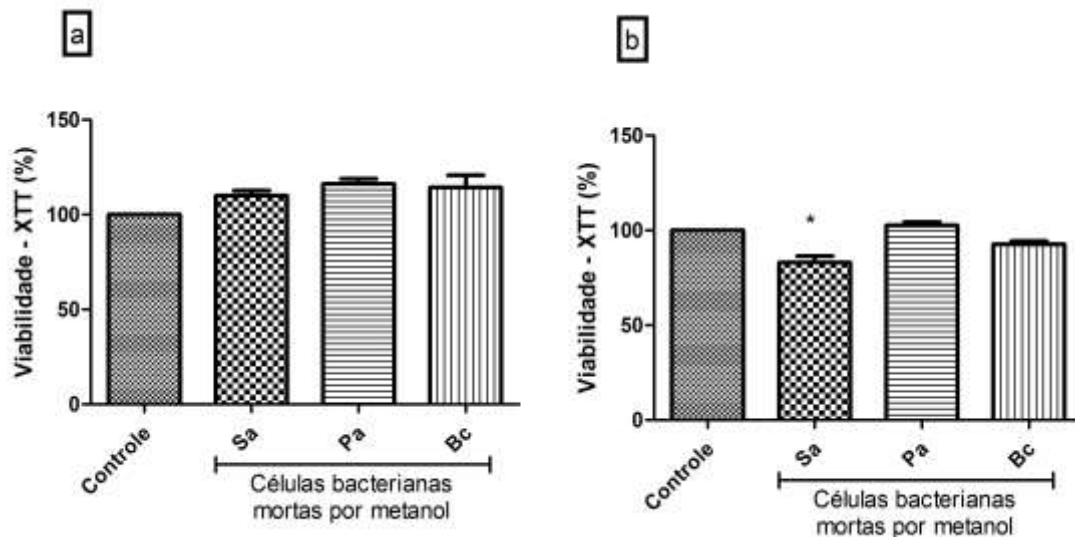


Figura 6: Interação dos fungos *S. boydii* (a) e *S. apiospermum* (b) com as células bacterianas previamente tratadas com metanol. Como resultado, as bactérias não viáveis não foram capazes de inibir a viabilidade fúngica, quando comparado com o controle, com exceção do fungo *S. apiospermum* que quando desafiado com *S. aureus* apresentou redução da viabilidade. Sa, *S. aureus*. Pa, *P. aeruginosa*. Bc, *B. cepacia*.

5.5. Interação célula fúngica com célula bacteriana separados por membrana de 0,22 μ m

Esse experimento avaliou a interferência no crescimento fúngico quando exposto a substâncias secretadas por bactérias, mas não havendo contato célula-célula entre fungos e bactérias testados. A comparação foi feita por peso seco, dessa forma, os filtros foram pesados antes e ao final do experimento.

Após o período de interação, foi observado uma diminuição do peso seco fúngico em todas as condições testadas com as bactérias (**Figura 7**), quando comparado com a condição-controle, o que demonstrou que houve uma inibição no crescimento fúngico medido pelo peso de massa fúngica resultante. Isso nos dá indícios que as substâncias secretadas pelas bactérias são capazes de reduzir o crescimento fúngico, independente do contato direto bactéria x fungo.

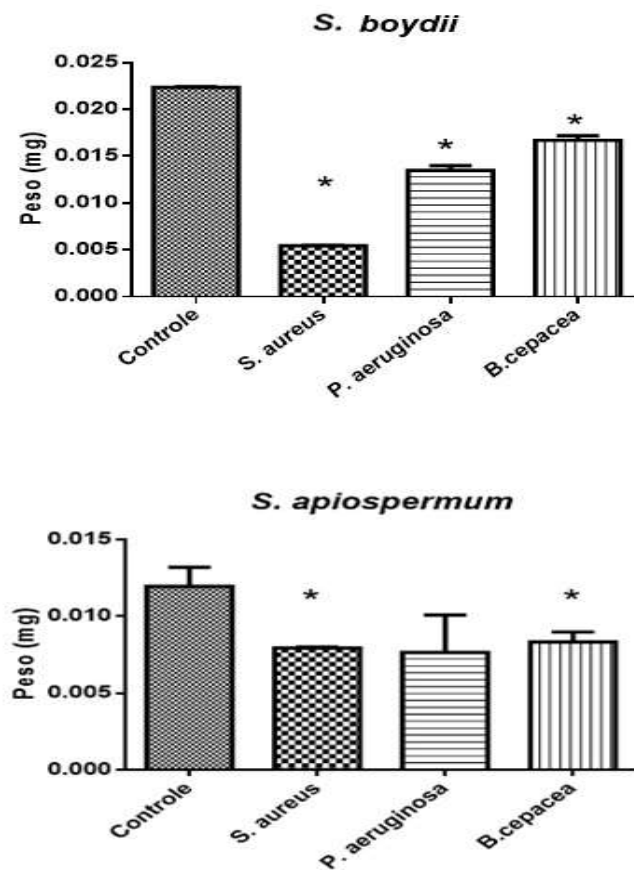


Figura 7: Avaliação do peso seco (em mg) da massa fúngica quando em contato com caldo nutriente (condição controle) e em contato com suspensão bacteriana. O primeiro gráfico mostra que *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. cepacia* quando em contato com os conídios de *S. boydii* reduziram a massa fúngica em comparação com o controle. O segundo gráfico mostra que apenas *P. aeruginosa* não se mostrou capaz de reduzir o peso seco quando em contato com *S. apiospermum*.

5.6. Interação biomassa fúngico com sobrenadante bacteriano

Nesse experimento foi avaliado se os sobrenadantes bacterianos *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. cepacia* livre de células bacterianas e diferentes tempos de crescimento são capazes de afetar o crescimento e formação da biomassa fúngica do *S. boydii* e *S. apiospermum*. Como é possível observar na **Figura 8**, o sobrenadante de 7 dias da *P. aeruginosa* não foi capaz de afetar a viabilidade do *S. boydii*, enquanto só o sobrenadante *S. aureus* de 7 dias promoveu redução da viabilidade do *S. apiospermum*. Os sobrenadantes de 14 dias apresentaram melhor resultado quando comparado com os sobrenadantes de 7 dias, pois todos foram

capazes de diminuir a viabilidade da biomassa fúngica tanto de *S. boydii* quanto de *S. apiospermum*.

Assim como observado com os sobrenadantes de 14 dias, os sobrenadantes de 21 dias de todas as bactérias foram capazes de diminuir a viabilidade da biomassa fúngica, sendo essa redução mais acentuada para os sobrenadantes de 21 dias quando comparados com os sobrenadantes de 14 dias.

Esse resultado nos mostra que não apenas o contato célula-célula é capaz de diminuir a viabilidade fúngica, mas que o material produzido e secretado pelas bactérias também apresenta essa ação.

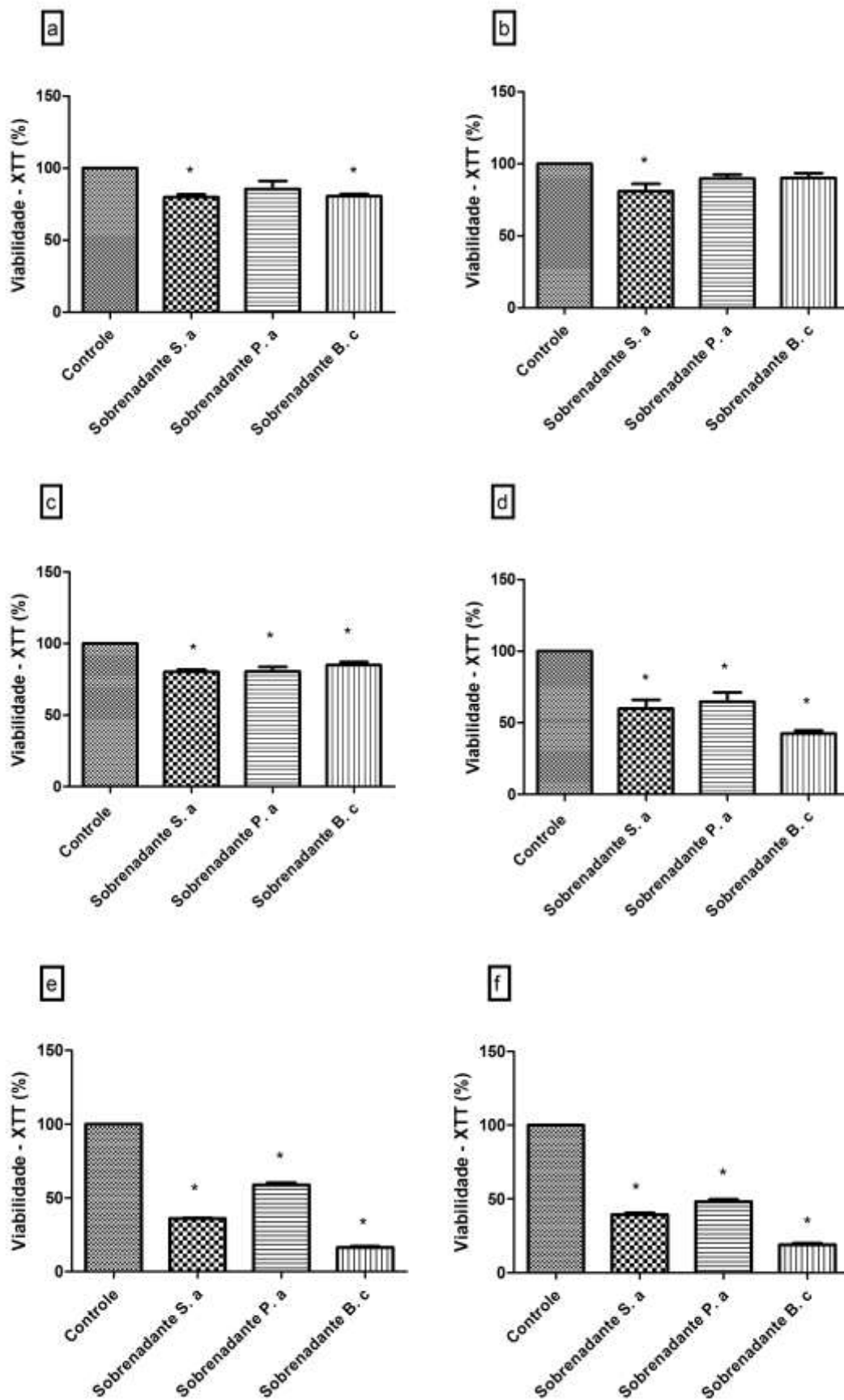


Figura 8: Viabilidade da biomassa fúngica de *S. boydii* e *S. apiospermum* quando desafiados com os sobrenadantes bacterianos de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B.*

cepacia em diferentes tempos de aquisição (7, 14 e 21 dias). A interação de *S. boydii* com os sobrenadantes de 7, 14 e 21 dias (a, c e f, respectivamente) nos mostra que apenas o sobrenadante de 7 dias de *P. aeruginosa* não foi capaz de diminuir a viabilidade da biomassa fúngica. Nas interações de *S. apiospermum* com os sobrenadantes de 7, 14 e 21 dias (b, d e f, respectivamente), os sobrenadantes de *P. aeruginosa* e *B. cepacia* de 7 dias não produziram efeito inibitório na viabilidade da biomassa fúngica. S.a, *S. aureus*. P.a, *P. aeruginosa*. B.c, *B. cepacia*.

5.7. Interação biomassa fúngica pré-formada com sobrenadante bacteriano

Para verificar se a ação dos sobrenadantes bacterianos livres de célula viável são capazes de inibir a viabilidade fúngica mesmo com a biomassa fúngica já formada, os sobrenadantes das bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. cepacia* de diferentes dias de obtenção 7, 14 e 21 dias foram acrescentados em placa de 96 poços somente após a formação prévia da biomassa fúngica de *S. boydii* e *S. apiospermum*. Para a formação da biomassa, 10^5 conídios foram incubados por 48 horas à temperatura de 37°C em PDB. Somente após esse tempo de incubação que a biomassa foi desafiada com os sobrenadantes bacterianos. A placa foi incubada por mais 24 horas e o resultado lido com XTT pode ser observado na **Figura 9**. Nenhum sobrenadante bacteriano foi capaz de inibir a viabilidade da biomassa fúngica já formado de *S. boydii*. Já para *S. apiospermum* é observado redução da viabilidade da biomassa quando desafiado com os sobrenadantes de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. cepacia* dos tempos de 7 e 21 dias. Do sobrenadante de 14 dias apenas o sobrenadante de *P. aeruginosa* se mostrou eficiente na redução da biomassa de *S. apiospermum*.

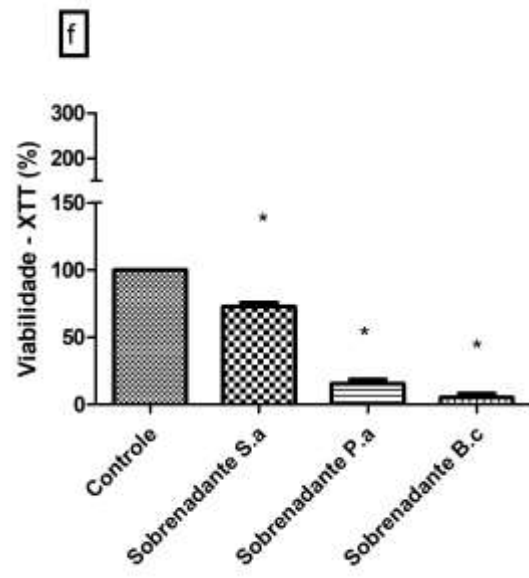
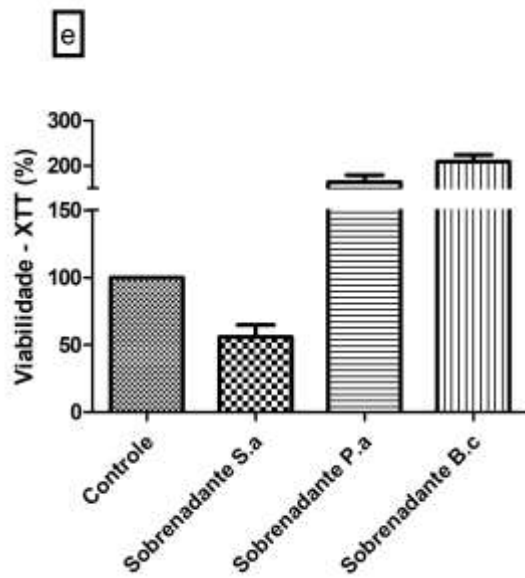
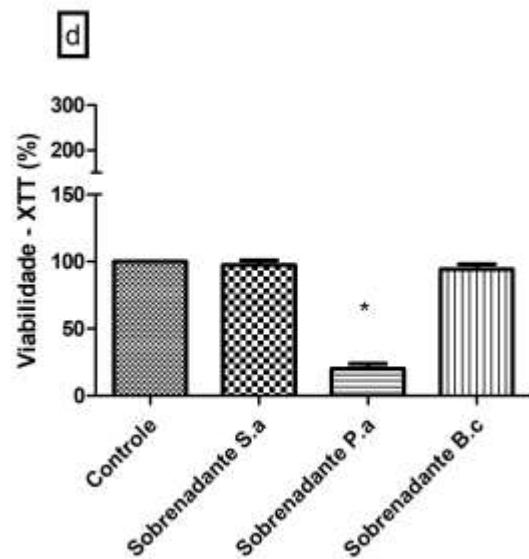
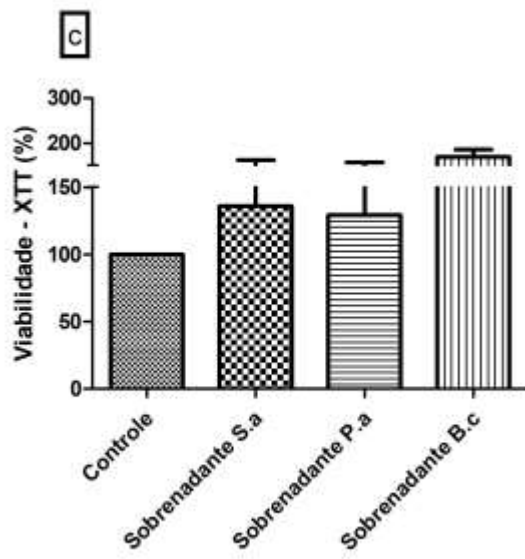
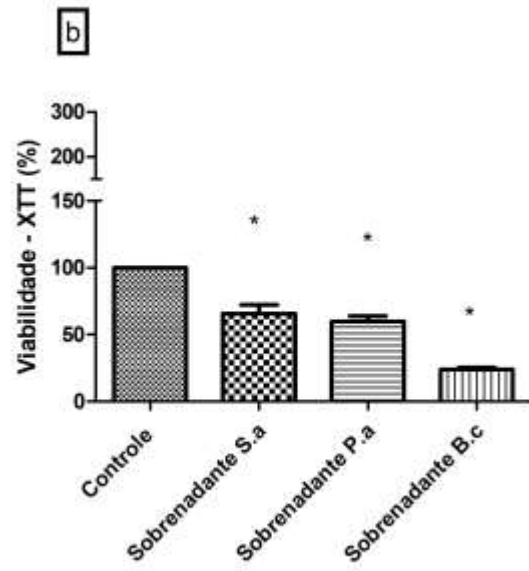
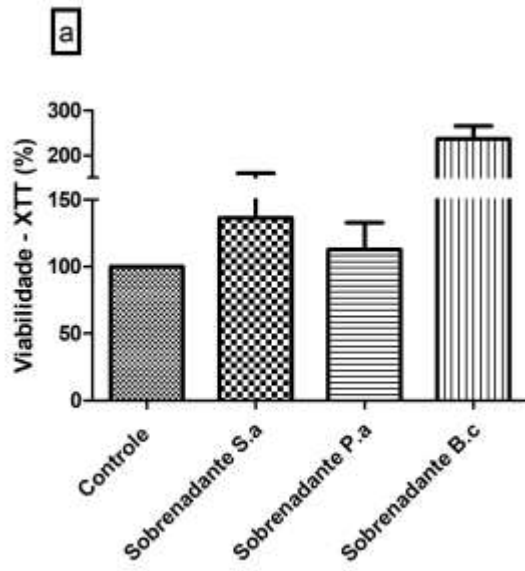


Figura 9: Viabilidade da biomassa fúngica pré-formada de *S. boydii* e *S. apiospermum* quando desafiados com os sobrenadantes de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. cepacia* em diferentes tempos de aquisição (7, 14 e 21 dias). A interação de *S. boydii* com os sobrenadantes de 7, 14 e 21 dias (a, c e f, respectivamente) mostra que nenhum sobrenadante foi capaz de diminuir a viabilidade da biomassa fúngica. Nas interações de *S. apiospermum* com sobrenadantes de 7, 14 e 21 dias (b, d e f, respectivamente), somente os sobrenadantes de 7 dias e 21 dias produziram efeito inibitório na viabilidade da biomassa fúngica, enquanto apenas o sobrenadante *P. aeruginosa* de 14 dias induziu a inibição da biomassa pré-formada de *S. apiospermum*. S.a, *S. aureus*. P.a, *P. aeruginosa*. B.c, *B. cepacia*.

5.8. Interação fungo x sobrenadantes bacterianos em diferentes concentrações

A partir dos sobrenadantes liofilizados obtidos em diferentes tempos de incubação foi determinado a concentração de proteína através de método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951).

Uma concentração de 10^5 conídios de *S. boydii* e *S. apiospermum* foram incubados com os sobrenadantes bacterianos de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. cepacia* nas concentrações 100µg, 50µg e 25µg de proteína nos tempos de incubação de 4, 24 e 48 horas à 37°C

A **Figura 10** mostra a interação do *S. boydii* com os sobrenadantes bacterianos. Os sobrenadantes obtidos de *S. aureus* se mostraram capazes de reduzir a viabilidade fúngica principalmente nos tempos de incubação de 4 e 24 horas (**Figura 10, a e d**). Sendo os sobrenadantes de 14 dias capazes de reduzir a viabilidade fúngica para todas as concentrações testadas e os sobrenadantes de 21 dias nas concentrações de 100µg e 50µg.

Já todos os sobrenadantes de *P. aeruginosa* obtidos nos diferentes dias e testados nas diferentes concentrações foram capazes de reduzir a viabilidade fúngica testada nos diferentes tempos de incubação (**Figura 10, b, e e f**).

Os sobrenadantes de *B. cepacia* não se mostraram eficazes, em nenhuma concentração, em reduzir a viabilidade fúngica nos tempos de incubação de 4 e 24 horas (**Figura 10, c e f**). Apenas a concentração de 50µg para o sobrenadante obtido em 14 dias e com o tempo de incubação de 48 horas foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica.

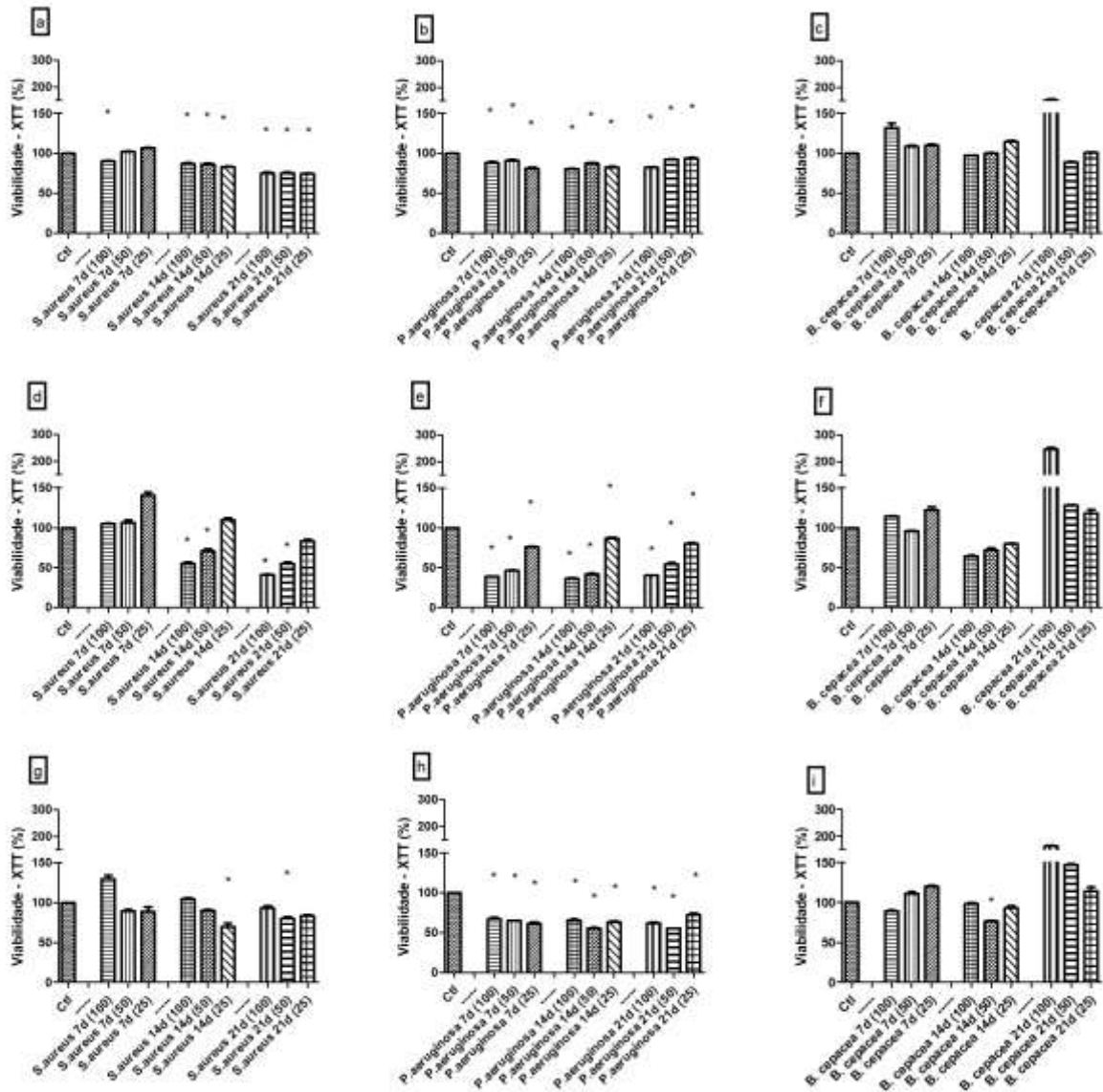


Figura 10: Interação de *S. boydii* com os sobrenadantes liofilizados obtidos em diferentes tempos de incubação com diferentes concentrações de proteína do sobrenadante. Gráficos **a**, **b** e **c** - tempo de interação de 4 horas. Gráficos **d**, **e** e **f** de 24 horas e gráficos **g**, **h** e **j** de 48 horas.

A **Figura 11** mostra a interação do *S. apiospermum* com os sobrenadantes bacterianos. Os sobrenadantes obtidos de *S. aureus* se mostraram capazes de reduzir a viabilidade fúngica em todos os tempos de incubação (4, 24 e 48 horas), tempos de obtenção do sobrenadante (7, 14 e 21 dias) e nas diferentes concentrações de proteínas testadas 100µg, 50µg e 25µg (**Figura 11, a, d e g**).

Dos sobrenadantes de *P. aeruginosa* obtidos nos diferentes dias e testados nas diferentes concentrações, apenas o sobrenadante de 21 dias testado na concentração de 25µg no tempo de incubação de 4 horas não se mostrou capaz de reduzir a viabilidade fúngica testada (**Figura 11, b**). Todos os outros sobrenadantes de *P. aeruginosa* foram eficazes em reduzir a viabilidade fúngica (**Figura 11, b, e e h**).

O melhor resultado encontrado para *B. cepacia* foi o tempo de incubação de 24 horas, em que os sobrenadantes de 7, 14 e 21 dias foram capazes de reduzir a viabilidade do fungo nas concentrações de 100µg e 50µg para os dois primeiros tempos e 25µg para sobrenadante de 21 dias (**Figura 11, f**).

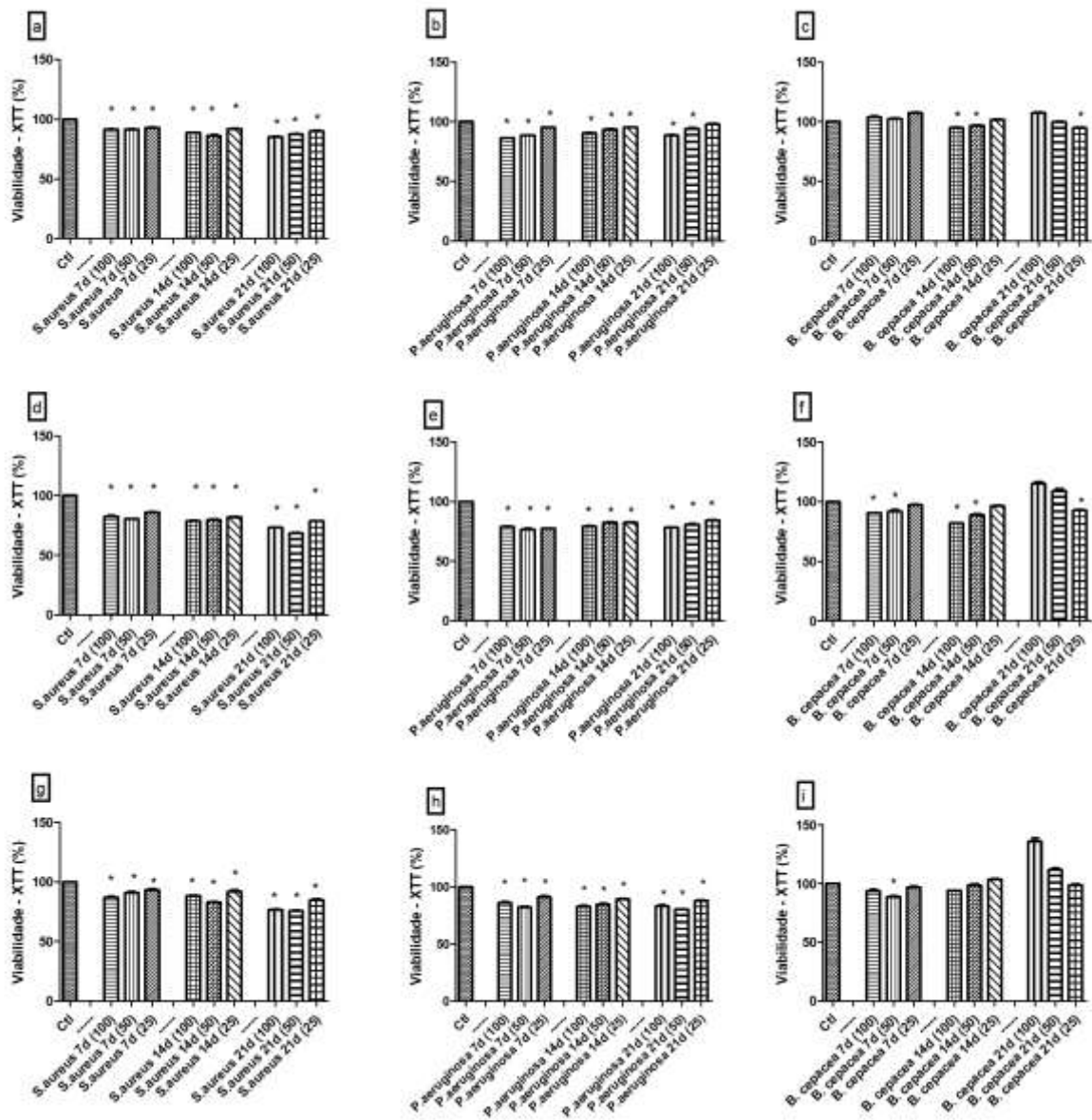


Figura 11: Interação de *S. apiospermum* com sobrenadantes liofilizados obtidos em diferentes tempos de incubação com diferentes concentrações de proteína. Gráficos **a**, **b** e **c** - tempo de interação de 4 horas. Gráficos **d**, **e** e **f** de 24 horas e gráficos **g**, **h** e **j** de 48 horas.

5.9. Determinação das classes de moléculas presentes nos sobrenadantes bacterianos

Os sobrenadantes bacterianos livres de célula viável apresentaram respostas satisfatórias na diminuição da viabilidade fúngica. Por esse motivo foram realizados alguns experimentos para determinar a classe de moléculas presentes nesses sobrenadantes.

Os sobrenadantes foram dialisados em membrana semipermeável durante 3 dias com troca de água 2 vezes ao dia. Após o período de diálise, os sobrenadantes foram congelados e liofilizados.

A partir do sobrenadante liofilizado foram feitas dosagens de proteína e dosagem de açúcar, utilizando o método de Lowry e fenol sulfúrico de Dubois, respectivamente (LOWRY *et al.*, 1951) (DUBOIS *et al.*, 1956) e identificado a porcentagem de açúcar e proteína presentes nos sobrenadantes (**Tabela 1**)

Tabela 1: Porcentagem de açúcar e proteína encontrada nos sobrenadantes liofilizados de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. cepacia* livres de células viáveis.

	Açúcar	Proteína	Desconhecido
Caldo Nutriente	4 – 6%	40 – 60%	34 – 56%
<i>S. aureus</i>	6 – 8%	50 – 70%	22 – 44%
<i>P. aeruginosa</i>	6 – 8%	50 – 70%	22 – 44%
<i>B. cepacia</i>	9 – 11%	60 – 70%	19 – 31%

5.10. Extração de moléculas nos sobrenadantes bacterianos

A placa cromatográfica referente a extração de lipídio não apresentou separação de bandas, mas no local de aplicação da amostra é possível observar uma coloração intensa após a revelação. Isso pode indicar que o solvente utilizado como fase móvel não foi o mais adequado para promover a eluição adequada da substância (Dados não mostrados).

Para a cromatografia dos açúcares extraídos do sobrenadante, a placa apresentou a presença de bandas fracas nas amostras referentes aos sobrenadantes. Não foi possível identificar através do TLC e utilizando o fator de retenção, qual molécula de açúcar correspondia as bandas evidenciadas na revelação (Dados não mostrados).

DISCUSSÃO

Fibrose Cística é uma doença autossômica recessiva causada por uma mutação no gene da proteína do CFTR. A mutação desse gene leva a não formação ou a má formação do canal aniônico que transporta cloreto em diferentes epitélios.

A proteína CFTR é expressa em diferentes órgãos do corpo, como pulmão, intestino, pâncreas e sistema biliar (KELLY *et al*, 2015). Apesar de apresentar complicações nesses órgãos descritos, os progressivos danos ocorridos no pulmão e a exacerbação das infecções ocorridas nesse órgão é a maior causa de morbidade e mortalidade em pacientes com FC (PLUMMER *et al*, 2016). Devido ao mal ou não funcionamento adequado do canal CFTR, há a formação de um muco espesso que devido a sua alta viscosidade os movimentos ciliares não são capazes de remover. O acúmulo desse muco espesso proporciona um ambiente adequado para crescimento de micro-organismos. Pacientes com FC podem ser colonizados por diferentes espécies bacterianas, mas as espécies mais encontradas e persistentes são *S. aureus* e *P. aeruginosa*, principalmente pela dificuldade do tratamento em que a *S. aureus* pode evoluir para MRSA e a *P. aeruginosa* pode passar para seu fenótipo mucóide (STAERCK *et al*, 2017).

Em pacientes com FC, o fungo que mais acomete o trato respiratório é *A. fumigatus* seguido do gênero *Scedosporium*. Na França, a espécie de *Scedosporium* mais isolada em pacientes com FC é *S. boydii* (STAERCK *et al*, 2017).

Esses micro-organismos, por habitarem o mesmo sítio, podem apresentar interações sinérgicas ou antagônicas, e essas interações podem ser observadas *in vivo* e *in vitro*. Essas interações podem alterar também a resposta do sistema imune, impactando assim na clínica do paciente (NOGUEIRA *et al*, 2019).

A comunicação entre bactérias e fungos é intermediada por moléculas chamadas *quorum sensing* e outras proteínas (NOGUEIRA *et al*, 2019). Estudos correlacionando *A. fumigatus* e *P. aeruginosa* mostram que interações negativas do crescimento de *A. fumigatus* está relacionado às moléculas *quorum sensing* de *P. aeruginosa* como HSLs e piroverdina, porém interações positivas entre esses micro-organismos também foram observadas (BRIARD *et al*, 2019).

A partir desses conceitos, nesse presente trabalho foram realizados experimentos *in vitro* correlacionando o segundo gênero fúngico de maior importância para pacientes com FC, utilizando as espécies *S. boydii* e *S.*

apiospermum, com as bactérias mais comumente isoladas *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. cepacia*. Foram realizados diferentes experimentos, variando de interações em que as células bacterianas e fúngicas viáveis tinham contato direto tanto em meio sólido quanto em meio líquido, interação de célula fúngica viável com célula bacteriana não viável, interação sem contato físico e interação com os sobrenadantes bacterianos livre de célula. Além disso, para verificar a possível composição dos sobrenadantes bacterianos, também foi realizada a dosagem de proteína, açúcar e a tentativa de identificação de lipídios na composição dos sobrenadantes.

No experimento de interação de célula bacteriana com célula fúngica em meio sólido, é possível observar que as células bacterianas *P. aeruginosa* e *B. cepacia* são capazes de afetar o crescimento fúngico de *S. boydii* e *S. apiospermum*. A formação do halo inibitório observado a partir do meio da placa, onde a célula bacteriana foi inoculada em disco de papel de filtro estéril, já seria uma evidência de inibição do crescimento fúngico, mas é possível observar que além da formação do halo inibitório, o crescimento bacteriano foi capaz de inibir a formação de hifa em outros pontos da placa. Esse resultado é mais evidente na interação de *P. aeruginosa* com *S. apiospermum* (**Figura 4**).

Os resultados de interação célula-célula em meio de cultura sólido, reproduzido de diferentes maneiras, com diferentes espécies fúngicas e diferentes meios de cultura corroboram com o resultado encontrado no presente estudo, em que a célula bacteriana *P. aeruginosa* foi capaz de provocar inibição das células fúngicas *S. boydii* e *S. apiospermum*. Além disso, a partir de nossos resultados, foi possível observar que *B. cepacia* consegue promover também essa ação inibitória do crescimento fúngico. Apenas a cepa de *S. aureus* utilizada não se mostrou capaz de provocar inibição fúngica quando desafiados em meio de cultura sólido.

A inibição do crescimento fúngico quando desafiada com célula bacteriana também pode ser observado no estudo de Chen e colaboradores em 2018, em que quase todas as cepas de *P. aeruginosa* testadas nos fungos *L. prolificans* e *S. aurantiacum* foram capazes de inibir o crescimento fúngico, formando um halo de inibição. Chen e colaboradores em 2018 também observaram que a formação do halo é dose dependente, ou seja, quanto maior a inoculação de célula bacteriana, maior é o tamanho do halo observado, mas que em um determinado volume (acima de 50µL) essa dose dependência não é mais observada (CHEN *et al.*, 2018).

Kaur e colaboradores em 2015 realizaram dois diferentes experimentos correlacionando a interação da célula bacteriana com a célula fúngica em meio de cultura sólido. No primeiro experimento descrito, foi realizada a inoculação do fungo em linha horizontal e a inoculação da bactéria em linha vertical tocando a linha de inoculação fúngica em sua extremidade. O segundo experimento descrito foi realizado com disco de papel de filtro estéril (KAUR *et al.*, 2015). As cepas de *P. aeruginosa* testadas contra *S. aurantiacum* foram capazes de provocar inibição do crescimento fúngico, sendo observado menor inibição nas cepas mais virulentas de *S. aurantiacum* (KAUR *et al.*, 2015).

Rella e colaboradores testaram o efeito inibitório de *P. aeruginosa* contra *Cryptococcus neoformans*. No teste realizado em que a célula fúngica foi semeada por toda placa de Petri e o inóculo bacteriano em disco de papel de filtro estéril mostrou que a célula bacteriana foi capaz de inibir o crescimento fúngico uma vez que os dados resultaram em formação do halo inibitório (RELLA *et al.*, 2011).

Smith e colaboradores realizaram uma técnica em que ambas as células, fúngica e bacteriana, foram inoculadas em disco de papel de filtro separadas por distância de 5, 10 e 20 mm. Para as distâncias de 5 e 10 mm, foram observadas inibição do crescimento de *A. fumigatus*, já para a distâncias de 20mm o fungo cresceu em sua totalidade no disco de papel de filtro. Também foi observado uma pequena redução do crescimento de *P. aeruginosa* quando desafiado com a célula fúngica na distância de 5 mm, indicando que há uma interação de inibição mútua, mas que a inibição da célula bacteriana sobre a célula fúngica é mais proeminente (SMITH *et al.*, 2015).

Na interação célula-célula em meio de cultura líquido, os resultados se apresentaram semelhantes aos resultados da interação em meio de cultura sólido, uma vez que a interação direta com as células bacterianas se mostrara capaz de inibir a viabilidade das células fúngicas (**Figura 5**).

Resultados semelhantes podem ser encontrados nos trabalhos de Chen e colaboradores e Mowat e colaboradores. Chen e colaboradores testaram a interação de *P. aeruginosa* com células fúngicas de *L. prolificans* e *S. aurantiacum* em diferentes tempos de incubação, e não houve diferença significativa entre os tempos de incubação. Para todos os casos, houve redução da viabilidade nos casos de interação da célula bacteriana com a célula fúngica quando comparado com o grupo controle composto apenas pela célula fúngica (CHEN *et al.*, 2018). Mowat e

colaboradores apresentaram resultados bem significativos, em que a interação célula-célula da bactéria *P. aeruginosa* com o fungo *A. fumigatus* em meio de cultura líquido provocou uma redução de aproximadamente 85% da biomassa fúngica quando comparado com o grupo controle composto apenas pelo fungo (MOWAT *et al.*, 2010).

Outra técnica utilizada por Chen e colaboradores para verificar a interação entre as células fúngicas e bacterianas em meio de cultura líquido, foi através da microscopia de fluorescência. Os conídios de *S. aurantiacum* e *L. prolificans* foram desafiados com as células de *P. aeruginosa* viável e não viável (tratado com metanol). A atividade metabólica dos fungos foram medidas através do corante FUN-1. Esse corante é internalizado através da membrana plasmática de células fúngicas vivas ou mortas. Nas células fúngicas vivas o corante FUN-1 é transportado para um vacúolo e compactado dentro de uma estrutura intravascular cilíndrica que sobre a luz fluorescente se apresenta na cor laranja-avermelhado, enquanto nas células fúngicas mortas a coloração do FUN-1 é verde-amarelado (CHEN *et al.*, 2018). Como resultado, a microscopia apresentou verde fluorescente para *S. aurantiacum* e *L. prolificans* quando em contato com *P. aeruginosa*. Já a *P. aeruginosa* tratada com metanol não teve efeito na viabilidade do *S. aurantiacum* (CHEN *et al.*, 2018).

Os resultados da interação célula fúngica com célula bacteriana tanto em meio de cultura sólido quanto em meio de cultura líquido nos mostra que as células bacterianas provocam inibição do crescimento e viabilidade das células fúngicas. A partir desses dados é possível se questionar se a interação das células bacterianas viáveis é necessária para provocar tal efeito. Dessa maneira, foram realizados diferentes experimentos sem esse contato para verificar o efeito dessas interações.

Para verificar se a presença da bactéria viável é determinante na promoção da inibição da célula fúngica ou se a sua presença física, mesmo que sem atividade celular, apenas por competição de espaço físico possa provocar essa inibição, foi realizado a interação do conídio com a célula bacteriana não viável. Para isso, as células de *S. aureus*, *B. cepacia* e *P. aeruginosa* foram tratadas com metanol e posteriormente colocadas em contato com as células de *S. boydii* e *S. apiospermum*. Os resultados obtidos nesse experimento mostraram que as células bacterianas não viáveis não foram capazes de produzir inibição sobre as células fúngicas, com exceção da bactéria *S. aureus* que produziu redução significativa do crescimento

fúngico quando comparado com a condição controle composta apenas de fungos (**Figura 6**).

Os resultados encontrados por Mowat e colaboradores para esse experimento de interação da célula bacteriana *P. aeruginosa* tratada com metanol com célula fúngica *A. fumigatus* também não apresentou redução da viabilidade fúngica (MOWAT *et al.*, 2010). Chen e colaboradores desafiaram *L. prolificans* e *S. apiospermum* com *P. aeruginosa* tratada com metanol. Diferente do realizado no presente estudo e por Mowat e colaboradores, Chen e colaboradores testaram essa interação em meio sólido, através da técnica disco de papel de filtro, porém o resultado foi similar. As células de *P. aeruginosa* tratadas com metanol não foram capazes de inibir o crescimento das células fúngicas (CHEN *et al.*, 2018).

Assim, considerando que o contato célula-célula entre fungos e bactérias leva à inibição do crescimento fúngico apenas quando as células bacterianas estão viáveis, é possível sugerir que o metabolismo bacteriano ativo é essencial para afetar o crescimento fúngico.

É sabido que micro-organismos são capazes de secretar substâncias em resposta à presença de outros micro-organismos. Essas substâncias podem desencadear mudanças nas atividades fisiológicas, como simbiose, virulência, entre outros. A partir desse conceito, e sabendo que as bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. cepacia* são capazes de alterar a viabilidade fúngica, foram realizados experimentos sem o contato direto célula-célula para verificar se substâncias liberadas por essas bactérias produzem efeito de inibição fúngica.

O experimento de interação entre as células fúngicas e bacterianas através de uma membrana de poro de 0,22µm permite que haja troca de substâncias entre os espécimes sem que haja o contato físico entre elas. Assim podemos avaliar se o conteúdo secretado pelas bactérias pode afetar a viabilidade fúngica, com a vantagem de contínua produção dessas possíveis substâncias uma vez que as células bacterianas se encontram viáveis. Além disso, esse modelo de experimento impede o contato célula-célula, sendo possível avaliar se esse contato direto é necessário para o efeito de inibição fúngica observado nos experimentos anteriores.

A determinação do crescimento fúngico se deu pela avaliação do peso seco, através da diferença do peso final do compartimento com o peso inicial, aferido de maneira estéril. Em comparação com a condição controle, em que o compartimento da parte inferior continha apenas caldo nutriente estéril, o peso seco dos

compartimentos em que as células fúngicas foram desafiadas com as bactérias separadas pela membrana de poro de 0,22µm se apresentou menor, indicando que não é necessário a interação física entre as células bacterianas com as células fúngicas para que a inibição seja observada. Isso nos dá indício de que substâncias secretadas pelas bactérias tem ação contra o crescimento fúngico (**Figura 7**).

Mowat e colaboradores utilizaram o aparato Transwell® para aplicar a técnica de interação entre as células sem que haja contato direto e técnicas de microscopia e determinação da biomassa através de coloração com cristal violeta foram usadas para avaliar o crescimento fúngico. A célula fúngica de *A. fumigatus* foi colocada na parte de baixo do aparato Transwell®, enquanto a célula bacteriana *P. aeruginosa* foi inoculada na câmara de cima. Como resultado, eles encontraram uma redução de aproximadamente 70% da biomassa quando comparado com o controle (MOWAT *et al.*, 2010).

Kaur e colaboradores também utilizaram a placa Transwell® para realizar o experimento de interação separado por membranas, mas utilizou como quantificação a determinação do peso seco. Os resultados apresentados no trabalho mostram que houve inibição e redução da biomassa fúngica de *S. aurantiacum* quando desafiado com *P. aeruginosa*, mas que o resultado foi menos proeminente para a cepa mais virulenta de *S. aurantiacum* (KAUR *et al.*, 2015).

Já Rella e colaboradores utilizaram um tubo em formato de U contando uma membrana de poro 0,22µm no meio para realizar experimento da interação célula-célula separa pela membrana, um lado do tubo continha o fungo *C. neoformans* e do outro lado separado pela membrana *P. aeruginosa*. A viabilidade fúngica foi mensurada a partir de contagem de Unidade Formadora de Colônia (UFC). Apesar de haver redução de metade de log na contagem de UFC, o resultado não foi tão expressivo em relação a interação por contato entre as células. Dessa maneira, Rella e colaboradores sugeriram que o contato célula-célula é importante para uma melhor inibição do *C. neoformans*.

Através do experimento em que as células fúngicas e bacterianas não tem contato físico direto, mas que o contato é intermediado por membrana semipermeável que permite que moléculas secretadas por ambas as células possa transitar entre os compartimentos apresentar que há uma diminuição da viabilidade fúngica, pode-se então deduzir que não somente o contato direto das bactérias

provoca certa inibição no crescimento fúngico, mas que substâncias secretas pelas bactérias também atuam produzindo esse efeito de inibição.

Para verificar se os sobrenadantes bacterianos livres de células viáveis são capazes de produzir efeito sobre células fúngicas, foram crescidas bactérias em caldo nutriente em diferentes tempos de incubação, sendo 7, 14 e 21 dias de incubação. A avaliação em diferentes dias foi realizada para verificar se ao longo do crescimento bacteriano esta possa produzir diferentes tipos de moléculas, uma vez que o meio de cultura não era repostado e a falta de nutriente pode ocasionar a morte do micro-organismo. Após o tempo de cada incubação, a suspensão era filtrada com filtro de poro de 0,22µm, a trama desse poro permite a passagem de líquido e substâncias, mas as células bacterianas ficam retidas, tornando assim o sobrenadante livre do micro-organismo.

Ao desafiar os conídios de *S. boydii* e *S. apiospermum* com os sobrenadantes bacterianos de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. cepacia* foi observado que todos sobrenadantes de 14 e 21 dias foram capazes de diminuir a viabilidade fúngica quando comparado com o controle. Já para os sobrenadantes de 7 dias, apenas os sobrenadantes de *S. aureus* e *B. cepacia* foram capazes de reduzir a viabilidade da *S. boydii* e para o fungo *S. apiospermum* apenas o sobrenadante de *S. aureus* produziu um efeito inibitório sobre o conídio. Além disso, a biomassa fúngica previamente formada também foi utilizada para verificar a capacidade dos sobrenadantes em reduzir a viabilidade do crescimento fúngico já formado (**Figuras 8, 9, 10 e 11**).

No trabalho de Mowat e colaboradores, a exposição do sobrenadante de *P. aeruginosa* com os conídios de *A. fumigatus* levou a inibição da formação de hifa fúngica, sendo quantificada biomassa de apenas 19% em comparação com a condição controle. Já o sobrenadante de *P. aeruginosa* que foi aquecido à 80°C por 10 minutos não apresentou um resultado tão significativo quando o sobrenadante sem aquecimento (MOWAT *et al.*, 2010).

Alguns trabalhos realizaram experimentos para verificar o efeito de moléculas conhecidas obtidas a partir de bactérias para verificar sua interação com as células fúngicas. Mowat e colaboradores testaram moléculas com estrutura semelhante as moléculas de *quorum sensing* produzidas por *P. aeruginosa* e desafiaram contra células de *A. fumigatus* a fim de verificar propriedades inibitórias contra o fungo. As moléculas testadas foram decanol, ácido decanóico, ácido octanóico, tetradecanol e

dodecanol. Como resultado do experimento todas as moléculas apresentaram a capacidade de reduzir a viabilidade do *A. fumigatus*. Foi notado também uma inibição dose dependente. Apenas o tetradecanol não apresentou redução significativa da viabilidade fúngica em nenhuma concentração testada. Das quatro moléculas que apresentaram efeito inibitório, elas foram capazes de reduzir a biomassa do *A. fumigatus* em 80% na concentração máxima testada que foi de 25mM (MOWAT *et al.*, 2010).

Uma vez que já foram descritos na literatura trabalhos caracterizando moléculas, principalmente relacionadas ao *quorum sensing* bacteriano, capazes de alterar o crescimento fúngico, o presente trabalho visou identificar as principais classes de moléculas presentes nos sobrenadantes coletados do crescimento bacteriano. As dosagens de açúcar e proteínas revelaram que os sobrenadantes das três bactérias apresentam um pequeno aumento na porcentagem dessas moléculas em relação ao meio de cultura ausente de crescimento. Já as análises de lipídeos e perfil de açúcares presentes nos sobrenadantes precisam de mais estudos, pois os resultados não foram conclusivos e ainda estão sendo realizados.

Esse estudo realizou diferentes experimentos correlacionando as células bacterianas *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. cepacia* e seus sobrenadantes com as células fúngicas de *S. boydii* e *S. apiospermum*. Na maioria das condições testadas, através de diferentes metodologias, foi possível observar que as bactérias e seus sobrenadantes são capazes de impedir significativamente o crescimento e viabilidade fúngica. Os achados realizados nesse estudo vão de acordo com outros estudos que também associam uma atividade antagônica das espécies bacterianas isoladas de amostras pulmonares clínicas, auxiliando no entendimento das interações microbianas em colonização mista presente em pulmões de pacientes com FC. Esses dados permitem o maior conhecimento da dinâmica dessas infecções, ajudando a entender o desenvolvimento e prognóstico dos pacientes com FC.

6. CONCLUSÃO

- O presente estudo avaliou diferentes interações entre os fungos *S. boydii* e *S. apiospermum* com as bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. cepacia*.
- A interação célula fúngica com célula bacteriana por contato direto em meio de cultura sólido mostrou que as bactérias *P. aeruginosa* e *B. cepacia* foram capazes de produzir um halo de inibição nos dois fungos testados.
- Todas as bactérias testadas foram capazes de reduzir a viabilidade fúngica no experimento célula fúngica com célula bacteriana por contato direto em meio de cultura líquido.
- Na interação célula-célula sem contato físico, sendo a interação intermediada por uma membrana semi-permeável nos apresenta dados que não é necessário o contato físico entre as células para que haja a inibição do crescimento fúngico.
- O contato entre os sobrenadantes bacterianos com as células fúngicas só é eficiente para inibição da viabilidade fúngica quando as células são crescidas em concomitância. Os sobrenadantes não foram eficazes sobre biomassa fúngica pré-formada.
- Foi analisada a composição dos sobrenadantes bacterianos e os resultados obtidos não foram conclusivos, mas a composição é, majoritariamente, proteica.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABARNO, C. P.; RIBEIRO, N. R. R. Trajetória da família do paciente com fibrose cística até a sua morte. **Rev Soc Bras Enferm Ped**, v. 12, n. 2, p. 113-121, 2012.
- AL-ABADI, Baheieh *et al.* Cystic Fibrosis Gene Mutation Frequency Among a Group of Suspected Children in King Hussein Medical Center. **Medical Archives**, v. 73, n. 2, p. 118, 2019.
- ARVANITIS, Marios; MYLONAKIS, Eleftherios. Fungal–bacterial interactions and their relevance in health. **Cellular microbiology**, v. 17, n. 10, p. 1442-1446, 2015.
- ATHANAZIO, Rodrigo Abensur *et al.* Diretrizes brasileiras de diagnóstico e tratamento da fibrose cística. **Jornal brasileiro de pneumologia**, v. 43, n. 3, p. 219-245, 2017.
- ATKINSON, C. T.; TRISTRAM, S. G. Antimicrobial resistance in cystic fibrosis isolates of *Haemophilus influenzae*. **British journal of biomedical science**, v. 73, n. 2, p. 87-89, 2016.
- BITTENCOURT, Vera Carolina B. *et al.* An α -glucan of *Pseudallescheria boydii* is involved in fungal phagocytosis and toll-like receptor activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 32, p. 22614-22623, 2006.
- BLANCHARD, Ana C.; WATERS, Valerie J. Microbiology of Cystic Fibrosis Airway Disease. In: **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**. Thieme Medical Publishers, 2019. p. 727-736.
- BOX, Helen *et al.* Pharmacodynamics of voriconazole for invasive pulmonary scedosporiosis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n. 5, p. e02516-17, 2018.
- BRIARD, Benoit *et al.* Interactions between *Aspergillus fumigatus* and pulmonary bacteria: current state of the field, new data, and future perspective. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 2, p. 48, 2019.
- CALLAGHAN, Máire; MCCLEAN, Siobhán. Bacterial host interactions in cystic fibrosis. **Current opinion in microbiology**, v. 15, n. 1, p. 71-77, 2012.
- CHEN, Sharon C.-A. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of *Scedosporium* and *Lomentospora* in vitro. **Mycopathologia**, v. 183, n. 1, p. 251-261, 2018.

- COONEY, Ashley L.; MCCRAY, Paul B.; SINN, Patrick L. Cystic fibrosis gene therapy: looking back, looking forward. **Genes**, v. 9, n. 11, p. 538, 2018.
- CORRIVEAU, Sophie; SYKES, Jenna; STEPHENSON, Anne L. Cystic fibrosis survival: the changing epidemiology. **Current opinion in pulmonary medicine**, v. 24, n. 6, p. 574-578, 2018.
- CRIBBS, Sushma K.; BECK, James M. Microbiome in the pathogenesis of cystic fibrosis and lung transplant-related disease. **Translational Research**, v. 179, p. 84-96, 2017.
- CUMMINGS, Richard; TURCO, Salvatore. Parasitic infections. In: **Essentials of Glycobiology. 2nd edition**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009.
- DIMIJIAN, Gregory G. Evolving together: the biology of symbiosis, part 1. In: **Baylor University Medical Center Proceedings**. Taylor & Francis, 2000. p. 217a-226.
- DUBOIS, Michel *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- ELBORN, J. S. April 2016. cystic fibrosis. **Lancet** [http://dx. doi. org/10.1016/S0140-6736 \(16\)](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00576-6), p. 00576-6, 29.
- FOLCH, Jordi; LEES, M_; STANLEY, GH Sloane. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **Journal of biological chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.
- GARCZEWSKA, Barbara *et al.* Fungal infection of cystic fibrosis patients—single center experience. **Advances in Respiratory Medicine**, v. 84, n. 3, p. 151-159, 2016.
- GIBSON, Jane; SOOD, Arpana; HOGAN, Deborah A. Pseudomonas aeruginosa-Candida albicans interactions: localization and fungal toxicity of a phenazine derivative. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, n. 2, p. 504-513, 2009.
- GUERRERO, Antonio *et al.* Airborne outbreak of nosocomial Scedosporium prolificans infection. **The Lancet**, v. 357, n. 9264, p. 1267-1268, 2001.
- HAIKO, Johanna *et al.* Coexistence of Candida species and bacteria in patients with cystic fibrosis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 38, n. 6, p. 1071-1077, 2019.
- HEDAYATI, Mohammad T. *et al.* Fungal epidemiology in cystic fibrosis patients with a special focus on Scedosporium species complex. **Microbial pathogenesis**, v. 129, p. 168-175, 2019.

- HOMA, Mónika *et al.* In vitro interactions of *Pseudomonas aeruginosa* with *Scedosporium* species frequently associated with cystic fibrosis. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 441, 2019.
- HORSLEY, Alex; JONES, Andrew M. Antibiotic treatment for *Burkholderia cepacia* complex in people with cystic fibrosis experiencing a pulmonary exacerbation. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 10, 2012.
- HUANG, Yvonne J.; LIPUMA, John J. The microbiome in cystic fibrosis. **Clinics in chest medicine**, v. 37, n. 1, p. 59-67, 2016.
- KAUR, Jashanpreet *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of *Scedosporium aurantiacum*, an opportunistic fungal pathogen isolated from the lungs of cystic fibrosis patients. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 866, 2015.
- KELLY, Thomas; BUXBAUM, James. Gastrointestinal manifestations of cystic fibrosis. **Digestive diseases and sciences**, v. 60, n. 7, p. 1903-1913, 2015.
- KENNA, Dervla TD *et al.* Prevalence of *Burkholderia* species, including members of *Burkholderia cepacia* complex, among UK cystic and non-cystic fibrosis patients. **Journal of medical microbiology**, v. 66, n. 4, p. 490-501, 2017.
- KING, Jill; BRUNEL, Shan F.; WARRIS, Adilia. *Aspergillus* infections in cystic fibrosis. **Journal of Infection**, v. 72, p. S50-S55, 2016.
- KIRCHHOFF, Lisa *et al.* *Exophiala dermatitidis*: Key issues of an opportunistic fungal pathogen. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 984-998, 2019.
- KLIMOVA, Blanka *et al.* Cystic fibrosis revisited—a review study. **Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 2, p. 102-109, 2017.
- LIPUMA, John J. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 23, n. 2, p. 299-323, 2010.
- LOURES, Flávio V.; LEVITZ, Stuart M. XTT assay of antifungal activity. **Bio-protocol**, v. 5, p. e1543, 2015.
- LOWRY, Oliver *et al.* PROTEIN MEASUREMENT WITH THE. **J. biol. Chem**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LUPLERTLOP, N. *Pseudallescheria/Scedosporium* complex species: From saprobic to pathogenic fungus. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 28, n. 2, p. 249-256, 2018.
- MELETIADIS, Joseph *et al.* Colorimetric Assay for Antifungal Susceptibility Testing of *Aspergillus* Species. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 9, p. 3402-3408, 2001.

- MELLO, Thaís P. *et al.* Insights into the social life and obscure side of *Scedosporium/Lomentospora* species: ubiquitous, emerging and multidrug-resistant opportunistic pathogens. **Fungal Biology Reviews**, v. 33, n. 1, p. 16-46, 2019.
- MINA, Sara *et al.* *Scedosporium boydii* CatA1 and SODC recombinant proteins, new tools for serodiagnosis of *Scedosporium* infection of patients with cystic fibrosis. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 89, n. 4, p. 282-287, 2017.
- MOUGI, Akihiko. The roles of amensalistic and commensalistic interactions in large ecological network stability. **Scientific Reports**, v. 6, p. 29929, 2016.
- MOWAT, Eilidh *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* and their small diffusible extracellular molecules inhibit *Aspergillus fumigatus* biofilm formation. **FEMS microbiology letters**, v. 313, n. 2, p. 96-102, 2010.
- NOGUEIRA, Filomena *et al.* Pathogenetic Impact of Bacterial–Fungal Interactions. **Microorganisms**, v. 7, n. 10, p. 459, 2019.
- PARANJAPE, S. M., & MOGAYZEL, P. J. Cystic Fibrosis. **Pediatrics in Review**, 35(5), 194–205, 2014.
- PFEIFER, Luzia Iara; SILVA, Mariléia Araújo da. Avaliação da qualidade de vida em crianças com fibrose cística. **Revista do NUFEN**, v. 1, n. 2, p. 118-130, 2009.
- PLUMMER, Amanda; WILDMAN, Martin; GLEESON, Tim. Duration of intravenous antibiotic therapy in people with cystic fibrosis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 9, 2016.
- RELLA, Antonella *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of *Cryptococcus* species. **Mycopathologia**, v. 173, n. 5-6, p. 451-461, 2012.
- ROGERS, Geraint B.; BRUCE, Kenneth D.; HOFFMAN, Lucas R. How can the cystic fibrosis respiratory microbiome influence our clinical decision making?. **Current opinion in pulmonary medicine**, v. 23, n. 6, p. 536, 2017.
- SABINO, Raquel *et al.* Susceptibility of *Candida albicans* from cystic fibrosis patients. **Mycopathologia**, v. 182, n. 9-10, p. 863-867, 2017.
- SCHWERDT, Mathias *et al.* *Staphylococcus aureus* in the airways of cystic fibrosis patients-A retrospective long-term study. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 308, n. 6, p. 631-639, 2018.
- SCOFFONE, Viola Camilla *et al.* Quorum sensing as antivirulence target in cystic fibrosis pathogens. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 8, p. 1838, 2019.

- SHINGLETON, Alexander W.; STERN, David L.; FOSTER, William A. The origin of a mutualism: a morphological trait promoting the evolution of ant-aphid mutualisms. **Evolution**, v. 59, n. 4, p. 921-926, 2005.
- SIDOT, C. *et al.* 116 *Scedosporium apiospermum*. Environmental study in the homes of patients with cystic fibrosis. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 6, p. S29, 2007.
- SMITH, Karen *et al.* *Aspergillus fumigatus* enhances elastase production in *Pseudomonas aeruginosa* co-cultures. **Medical mycology**, v. 53, n. 7, p. 645-655, 2015.
- STAERCK, Cindy *et al.* The secreted polyketide boydone A is responsible for the anti-*Staphylococcus aureus* activity of *Scedosporium boydii*. **FEMS microbiology letters**, v. 364, n. 22, p. fnx223, 2017.
- TONG, Steven YC *et al.* *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical microbiology reviews**, v. 28, n. 3, p. 603-661, 2015.
- TRINDADE, Sergio Henrique Kiemle *et al.* Métodos de estudo do transporte mucociliar. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 73, n. 5, p. 704-712, 2007.
- TYRRELL, Jean; HARVEY, Brian J. Sexual dimorphism in the microbiology of the CF 'Gender Gap': Estrogen modulation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence. **Steroids**, v. 156, p. 108575, 2020.
- VARAS, Silvia M.; PÉREZ CHACA, María Verónica; GÓMEZ, Nidia N. Transportadores de iones en pulmón. Uso como dianas terapéuticas. **Revista Medicina**, v. 79, n. 4, 2019.
- WEN, Shuxian *et al.* **Molecular epidemiology and evolution of *Haemophilus influenzae***. *Infection, Genetics and Evolution*, p. 104205, 2020.
- WONGSUK, Thanwa; PUMESAT, Potjaman; LUPLERTLOP, Natthanej. Fungal quorum sensing molecules: role in fungal morphogenesis and pathogenicity. **Journal of basic microbiology**, v. 56, n. 5, p. 440-447, 2016.
- XISTO, Mariana IDS *et al.* Peptidorhamnomannan negatively modulates the immune response in a scedosporiosis murine model. **Sabouraudia**, v. 54, n. 8, p. 846-855, 2016.
- ZHANG, Tengyue; TIAN, Xinlun; XU, Kai-Feng. Cystic fibrosis: a rare disease emerging in China. **Science China Life Sciences**, p. 1-3, 2020.