

Evely Bertulino de Oliveira

Papel de peptidoramnomanas nas interações polimicrobianas  
entre espécies de *Scedosporium/Lomentospora* e bactérias de  
relevância clínica na fibrose cística



**Monografia apresentada ao Instituto de  
Microbiologia Paulo de Góes, da  
Universidade Federal do Rio de Janeiro,  
como pré-requisito para a obtenção do grau  
de Bacharel em Ciências Biológicas:  
Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
RIO DE JANEIRO  
MARÇO / 2022**

**Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Geral, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Eliana Barreto Bergter e coorientação de Rodrigo Rollin Pinheiro**

**Ficha catalográfica**

dD278p de Oliveira, Evely Bertulino  
Papel de peptidoramnomanas nas interações  
polimicrobianas entre espécies de  
Scedosporium/Lomentospora e bactérias de relevância  
clínica na fibrose cística / Evely Bertulino de  
Oliveira. -- Rio de Janeiro, 2022.  
77 f.

Orientadora: Eliana Barreto Bergter.

Coorientador: Rodrigo Rollin Pinheiro.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) -  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto  
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:  
Microbiologia e Imunologia, 2022.

1. Bactérias. 2. Biofilme. 3. Fibrose Cística. 4.  
Scedosporium. 5. Peptidoramnomanas. I. Barreto  
Bergter, Eliana, orient. II. Rollin Pinheiro,  
Rodrigo, coorient. III. Título.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

### INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Evely Bertulino de Oliveira**  
DRE: 118047481

BANCA EXAMINADORA: Prof. Sergio Eduardo Longo Fracalanza (Presidente)  
Profª. Daniela Sales Alviano Moreno  
Dra. Giulia Maria Pires dos Santos Freitas  
Profª. Marta Helena Branquinha de Sá (Suplente)

Título da Monografia: **“Papel de peptidoramnomanas nas interações polimicrobianas entre espécies de *Scedosporium/Lomentospora* e bactérias de relevância clínica na fibrose cística”**

Local: Sala virtual <http://meet.google.com/nyv-upxk-jen>  
Data e hora de início: 7 de março de 2022 às 9:30h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 07 de março de 2022.

NOTA	Banca Examinadora:
<u>10,0</u>	Prof. Sergio Eduardo Longo Fracalanza
<u>10,0</u>	Profª. Daniela Sales Alviano Moreno
<u>10,0</u>	Dra. Giulia Maria Pires dos Santos Freitas
_____	Profª. Marta Helena Branquinha de Sá

Presidente da banca



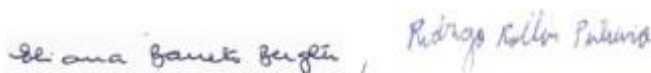
Prof. Sergio Eduardo Longo Fracalanza

Aluno:



Evely Bertulino de Oliveira

Orientador:



Profª. Eliana Barreto Bergter/ Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Rollin Pinheiro

Coordenador de TCC



Profª. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

## AGRADECIMENTOS

Ao longo dos últimos anos muitas pessoas tiveram um papel essencial na minha vida e na conclusão desta fase muito importante para mim. Em primeiro lugar, agradeço meu pai Luiz e minha avó Rose, por todo apoio, amor, especialmente nos momentos difíceis, e por possibilitarem que hoje eu estivesse aqui.

Agradeço minha orientadora Eliana pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, por todo incentivo, dedicação e amizade. Muito obrigada por ter me ensinado tanto e por ser a profissional que me espelha ser.

Agradeço ao meu coorientador Rodrigo, por todas as conversas, principalmente para acalmar a ansiedade, pelo encorajamento e por acreditar na minha capacidade, mesmo quando eu não acreditava. Ao mesmo tempo, agradeço à minha coorientadora extraoficial Mariana Xisto, pela parceria e por estar presente no meu dia a dia.

Obrigada também a toda família do laboratório 065, Rodrigo, Mariana X., Mariana C., Victor, Yuri, Carol, Andréina, Giulia e Michel. Sou muito grata por todas as conversas, risadas, conselhos e por todo cafezinho com biscoitos compartilhado nas tardes.

Agradeço muito as minhas amigas do Seleção Natural pelas trocas, por toda energia caótica nas apresentações de trabalho e antes das avaliações, pelos passeios para conhecer a universidade e por todo apoio, principalmente nos momentos difíceis. Gostaria de agradecer também a minha amiga e praticamente irmã Ariane, por todos os anos de amizade, por ter sido a melhor veterana que eu poderia desejar e por sempre saber quando preciso de ajuda.

Agradeço também aos professores Sergio Fracalanza, Daniela Alviano, Giulia Pires e Marta Branquinha por terem aceitado participar da minha banca de defesa de monografia.

Por fim, agradeço aos órgãos de fomento CNPq, CAPES FAPERJ e UFRJ pelo apoio financeiro.

**A experiência humana não seria tão rica e gratificante se não existissem obstáculos a superar. O topo ensolarado de uma montanha não seria tão maravilhoso se não existissem vales sombrios a atravessar.**

*(Helen Keller)*

## RESUMO

EVELY BERTULINO DE OLIVEIRA

PAPEL DE PEPTIDORAMNOMANANAS NAS INTERAÇÕES POLIMICROBIANAS ENTRE ESPÉCIES DE *SCEDOSPORIUM/LOMENTOSPORA* E BACTÉRIAS DE RELEVÂNCIA CLÍNICA NA FIBROSE CÍSTICA

**Orientadores: Eliana Barreto Bergter e Rodrigo Rollin Pinheiro**

**Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

**Palavras-chave:** Bactérias; Biofilme; Fibrose cística; *Scedosporium*; Peptidoramnomananas.

A fibrose cística é uma doença genética causada pela mutação no gene que codifica a proteína CFTR. Essa desordem gera um desequilíbrio de eletrólitos e água que leva a formação de um muco altamente viscoso nas vias aéreas, que não é facilmente eliminado, causando nos indivíduos portadores uma maior susceptibilidade a infecções pulmonares por microrganismos, principalmente bactérias e fungos. A colonização polimicrobiana por fungos e bactérias no contexto de fibrose cística tem sido cada vez mais investigada, dada a sua emergência. Como os estudos geralmente avaliam a interferência das bactérias no crescimento e metabolismo fúngico, direcionamos nossas pesquisas para o estudo do papel dos fungos no crescimento bacteriano. Assim, o trabalho em questão teve como objetivo investigar as interações polimicrobianas entre espécies do gênero fúngico *Scedosporium* (*Scedosporium apiospermum*, *Scedosporium boydii* e *Scedosporium aurantiacum*) e *Lomentospora prolificans* e bactérias de relevância clínica na fibrose cística (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina [MRSA], *Escherichia coli* e *Burkholderia cepacia*), assim como o papel das peptidoramnomananas desses fungos nessas interações. Para tal, foi realizado inicialmente testes para avaliação da concentração mínima inibitória (CIM) e concentração mínima microbicida (CMM) nas quais foi possível observar o maior poder inibitório e microbicida pela PRM de *L. prolificans* em comparação a molécula extraída das outras espécies, assim como foi verificada uma maior susceptibilidade das espécies *B.*

*cepacia* e MRSA à PRM do que *P. aeruginosa* e *E. coli*. Considerando que os microrganismos normalmente se encontram formando comunidades microbianas, tanto no ambiente quanto em hospedeiros, foi averiguada a atuação da PRM na formação do biofilme bacteriano, assim como em biofilmes maduros pré-formados. Em ambas as situações, foi possível observar uma redução da biomassa e da matriz extracelular do biofilme no emprego de diferentes concentrações de PRMs, contra *B. cepacia* e MRSA, as quais foram selecionadas por serem mais susceptíveis a PRM. Para investigar de que forma as PRMs inibiam as bactérias, a espécie *B. cepacia* foi selecionada para a avaliação do estresse oxidativo e do seu potencial e sua integridade de membrana no contato com a PRM. Foi observado o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio na bactéria, induzido pela PRM de *L. prolificans*. Apenas a PRM de *S. boydii* foi capaz de interferir na integridade lipídica da membrana bacteriana. E por último, todas as PRMs testadas foram capazes de diminuir o potencial de membrana de *B. cepacia*,

interferindo assim na produção energética da bactéria. Também visamos estabelecer um biofilme misto entre as espécies fúngicas *S. apiospermum* e *S. boydii* com a MRSA e a estrutura do biofilme misto foi avaliada através da observação da biomassa total, pela marcação com o cristal violeta, matriz extracelular, pela marcação com a safranina, e a viabilidade microbiana pela contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). Em ambos os biofilmes pode ser observado um aumento da biomassa e da matriz extracelular do biofilme no crescimento misto quando comparado com as contrapartes monomicrobianas. Com relação às UFCs, foi possível observar um estímulo no crescimento de MRSA em um contexto de biofilme misto, mas ainda é necessária uma maior análise sobre o efeito verificado. Estes resultados demonstram o poder inibitório e anti-biofilme das PRMs contra as espécies bacterianas MRSA e *B. cepacia*, assim como a necessidade de maiores investigações quanto ao crescimento polimicrobiano.



**ABSTRACT****EVELY BERTULINO DE OLIVEIRA****ROLE OF PEPTIDORAMNOMANANS IN POLYMICROBIAL INTERACTIONS  
BETWEEN SCEDOSPORIUM/LOMENTOSPORA SPECIES AND CLINICALLY  
RELEVANT BACTERIA IN CYSTIC FIBROSIS****Orientadores: Eliana Barreto Bergter e Rodrigo Rollin Pinheiro**

**Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

**Key-words:** Bacteria; Biofilm; Cystic fibrosis; *Scedosporium*; Peptidorhamnomannans.

Cystic fibrosis is a genetic disease caused by a mutation in the gene that encodes the CFTR protein. This disorder generates an imbalance of electrolytes and water that leads to the formation of a highly viscous mucus in the airways, which is not easily eliminated, causing individuals with greater susceptibility to lung infections by microorganisms, mainly bacteria and fungi. Polymicrobial colonization by fungi and bacteria in the context of cystic fibrosis has been increasingly investigated, given its emergence. As studies generally assess the interference of bacteria in fungal growth and metabolism, we direct our research towards the study of the role of fungi in bacterial growth. Thus, the work in question aimed to investigate the polymicrobial interactions between species of the fungal genus *Scedosporium* (*Scedosporium apiospermum*, *Scedosporium boydii* and *Scedosporium aurantiacum*) and *Lomentospora prolificans* and bacteria of clinical relevance in cystic fibrosis (*Pseudomonas aeruginosa*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [MRSA], *Escherichia coli* and *Burkholderia cepacia*), as well as the role of peptidoramnomannans from these fungi in these interactions. Tests were initially carried out to evaluate the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum microbicidal concentration (MMC) in which it was possible to observe a higher inhibitory effect by the PRM of *L. prolificans* compared to the molecule extracted from other species. Also it was observed a greater susceptibility

of the species *B. cepacia* and MRSA to PRM when compared with *P. aeruginosa* and *E. coli*. Considering that microorganisms are normally found forming microbial communities, the role of PRM in the formation of bacterial biofilms was investigated, as well as in pre-formed mature biofilms. In both situations, it was possible to observe a reduction in the biomass and extracellular matrix of the biofilm using different concentrations of PRMs, against *B. cepacia* and MRSA, which were selected for being more susceptible to PRM. To investigate how PRMs inhibit bacteria, the species *B. cepacia* was selected for the evaluation of oxidative stress and its potential and membrane integrity in contact with PRM. An increase in the production of reactive oxygen species in the bacteria was observed, induced by the PRM of *L. prolificans*. *S. boydii* PRM was able to interfere with the lipid integrity of the bacterial membrane. Finally, all PRMs tested were able to decrease the membrane potential of *B. cepacia*, thus interfering with the energy production of the bacterium. We also aim to establish a mixed biofilm between the fungal species *S. apiospermum* and *S. boydii* with MRSA. The structure of the mixed biofilm was evaluated by observing the total biomass, by staining with crystal violet, extracellular matrix, by staining with safranin, and microbial viability by counting colony forming units (CFU). In both biofilms an increase in the biomass and extracellular matrix of the biofilm could be observed in the mixed growth when compared to the monomicrobial counterparts. Regarding the CFUs, a stimulus in the growth of MRSA was observed in a mixed biofilm context. However, further analysis is still necessary. These results demonstrate the inhibitory and anti-biofilm effect of PRMs against MRSA and *B. cepacia*, as well as the need for further investigations regarding polymicrobial growth.

## RESUMO PARA LEIGOS

EVELY BERTULINO DE OLIVEIRA

PAPEL DE PEPTIDORAMNOMANANAS NAS INTERAÇÕES POLIMICROBIANAS ENTRE ESPÉCIES DE *SCEDOSPORIUM/LOMENTOSPORA* E BACTÉRIAS DE RELEVÂNCIA CLÍNICA NA FIBROSE CÍSTICA

**Orientadores: Eliana Barreto Bergter e Rodrigo Rollin Pinheiro**

**Resumo para leigos da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

A fibrose cística (FC) é uma doença genética que causa diversos problemas ao indivíduo portador, sendo a mais comum e preocupante a maior vulnerabilidade a infecções por microrganismos, principalmente bactérias e fungos. Isso acontece porque o pulmão desses indivíduos produz um muco que permite um melhor estabelecimento destes microrganismos. Estes microrganismos encontrados no trato respiratório na FC formam uma comunidade denominada biofilme, uma estrutura que permite proteção tanto contra o nosso sistema imune quanto contra medicamentos utilizados para a sua eliminação. Com relação aos fungos, uma estrutura importante para sua sobrevivência, interação com outros microrganismos e colonização de hospedeiros, é a parede celular. Ela apresenta diferentes moléculas, como a peptidoramnomanana (PRM) presente nos fungos chamados *Scedosporium*. A PRM é de extrema importância por aumentar a colonização, virulência e disseminação dos fungos. Assim, o objetivo do trabalho foi investigar as interações entre bactérias e fungos relevantes na FC e observar o papel da PRM nesse contato. Para isso, diferentes testes foram realizados, sendo a avaliação da concentração mínima inibitória (CIM), que nos diz qual concentração da molécula é capaz de inibir as bactérias, e a concentração mínima microbicida, que indica qual concentração da PRM mata a bactéria. Vimos que a PRM com a maior capacidade de inibir as bactérias foi aquela obtida da espécie *L. prolificans*, enquanto as bactérias mais afetadas foram *B. cepacia* e MRSA. Além disso, também testamos o efeito da PRM nos biofilmes de duas espécies bacterianas, MRSA e *B. cepacia*. As PRMs inibiram o biofilme dessas bactérias e para entender melhor como as PRMs causavam essa inibição, selecionamos *B. cepacia* para realização de testes que mostrassem o estresse oxidativo do microrganismo e o potencial e

integridade de sua membrana celular. Apenas a molécula de *L. prolificans* causou estresse oxidativo, que está relacionado com a degradação de componentes importantes da bactéria, como lipídeos e até mesmo o material genético. Somente a PRM de *S. boydii* ocasionou uma interferência na integridade da membrana da bactéria. Quando testado então a capacidade das PRMs de diminuir o potencial de membrana e assim interferir na produção de energia pelas bactérias, todas as moléculas apresentaram esta capacidade. Também avaliamos um biofilme misto entre bactérias e fungos para testar as interações entre as células e para isso usamos as espécies *S. apiospermum*, *S. boydii* e MRSA. A formação dessas comunidades foi avaliada observando se o crescimento do biofilme estava ocorrendo e o quanto estes microrganismos estavam crescendo. Nesses experimentos, percebemos que a bactéria estava aparentemente crescendo melhor na presença do fungo, porém é necessária uma maior avaliação deste resultado. Estes resultados mostraram que as PRMS inibem as bactérias MRSA e *B. cepacia* bem como seus biofilmes. No entanto, mais experimentos precisam ser realizados para um melhor entendimento do crescimento combinado entre bactérias e fungos.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Predominância de patógenos identificados por faixa etária no Brasil, 2019.....	6
<b>Figura 2:</b> Esquema de parede celular de espécies de <i>Scedosporium</i> .....	15
<b>Figura 3:</b> Estrutura dos oligosacarídeos <i>O</i> -ligados da peptidoramnomana de espécies de <i>Scedosporium</i> .....	16
<b>Figura 4:</b> Crescimento das bactérias <i>B. cepacia</i> , <i>P. aeruginosa</i> , MRSA e <i>E. coli</i> na presença das PRMs.....	29
<b>Figura 5:</b> Avaliação da atividade das PRMs de <i>L. prolificans</i> , <i>S. apiospermum</i> , <i>S. boydii</i> e <i>S. aurantiacum</i> na biomassa total e matriz extracelular do biofilme de <i>B. cepacia</i> .....	30
<b>Figura 6:</b> Avaliação da atividade das PRMs de <i>L. prolificans</i> , <i>S. apiospermum</i> , <i>S. boydii</i> e <i>S. aurantiacum</i> na biomassa total e matriz extracelular do biofilme de MRSA.....	31
<b>Figura 7:</b> Avaliação da atividade das PRMs de <i>L. prolificans</i> , <i>S. apiospermum</i> , <i>S. boydii</i> e <i>S. aurantiacum</i> na biomassa total e matriz extracelular do biofilme maduro pré-formado de <i>B. cepacia</i> .....	32
<b>Figura 8:</b> Avaliação da atividade das PRMs de <i>L. prolificans</i> , <i>S. apiospermum</i> , <i>S. boydii</i> e <i>S. aurantiacum</i> na biomassa total e matriz extracelular do biofilme maduro pré-formado de MRSA.....	33
<b>Figura 9:</b> Avaliação da atividade das PRMs de <i>L. prolificans</i> , <i>S. apiospermum</i> , <i>S. boydii</i> e <i>S. aurantiacum</i> no estresse oxidativo pela produção de ROS por <i>B. cepacia</i> .....	34
<b>Figura 10:</b> Efeito das PRMs de <i>L. prolificans</i> , <i>S. apiospermum</i> , <i>S. boydii</i> e <i>S. aurantiacum</i> na integridade da membrana de <i>B. cepacia</i> .....	35
<b>Figura 11:</b> Efeito das PRMs de <i>L. prolificans</i> , <i>S. apiospermum</i> , <i>S. boydii</i> e <i>S. aurantiacum</i> no potencial de membrana de <i>B. cepacia</i> .....	36
<b>Figura 12:</b> Avaliação da biomassa, matriz extracelular e viabilidade celular do biofilme misto entre MRSA e <i>S. apiospermum</i> .....	37
<b>Figura 13:</b> Avaliação da biomassa, matriz extracelular e viabilidade celular do biofilme misto entre MRSA e <i>S. boydii</i> .....	38
<b>Figura 14:</b> Avaliação das unidades formadoras de colônia de MRSA crescidas em biofilme misto com <i>S. apiospermum</i> e <i>S. boydii</i> .....	39

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**Ara** - Arabinose

**BHI** - Brain-Heart Infusion

**CBc** - Complexo *Burkholderia cepacia*

**CBS** – Coleção de cultura de fungos da Holanda

**CFTR** - do inglês, Regulador de Condutância Transmembranar de Fibrose Cística

**CMI** - Concentração inibitória mínima

**CMH** - Glucosilceramida

**CMM** - Concentração mínima microbicide

**DCF** - 2', 7'-diclorofluoresceína

**DCFDA** - 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato

**EPS** - do inglês, substâncias poliméricas extracelulares

**FC** - Fibrose cística

**Gal** - Galactose

**Glc** - Glicose

**GlcNH<sub>2</sub>** – Glucosamina

**GPI** - do inglês, glicosilfosfatidilinositol

**Hep2** – Linhagem de células tumorais derivada de carcinoma de laringe humana

**JC-1** - 5,5', 6,6'-tetracloro-1,1', 3,3'tetraetilbenzimidazolilcarbocianina iodeto

**LB** - Luria-Bertani

**LPS** - lipopolissacarídeo

**Man** - Manose

**MRSA** - do inglês, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

**MSSA** - do inglês, *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina

**NTM** - do inglês, micobactérias não tuberculosas

**PAMP** - do inglês, padrões moleculares associados a patógenos

**PBS** – do inglês, solução de tampão fosfato

**PHA** - polihidroxialcanoato

**Rha** - ramnose

**Rib** - ribose

**ROS** - do inglês, espécies reativas de oxigênio

**SAB** - Sabouraud

**SCFM** - do inglês, meio sintético de fibrose cística

**SCVs** - do inglês, variantes de pequenas colônias

**TNF- $\alpha$**  - do inglês, fator de necrose tumoral

**TSB** - Tryptic Soy Broth

**UFC** - unidades formadoras de colônias

**XTT** - 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfonil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b> .....	VI
<b>ABSTRACT</b> .....	VIII
<b>RESUMO PARA LEIGOS</b> .....	X
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	XII
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	XIII
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 Fibrose cística.....	1
1.2 Infecções bacterianas.....	3
1.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	5
1.2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	7
1.2.3 <i>Burkholderia cepacia</i> .....	9
1.2.4 <i>Escherichia coli</i> .....	10
1.3 Infecções fúngicas.....	11
1.3.1 <i>Scedosporium/Lomentospora</i> .....	12
1.3.1.1 Parede celular e peptidoramnomanas.....	15
1.4 Infecções polimicrobianas e biofilmes mistos.....	18
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	22
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	23
3.1 Objetivos específicos.....	23
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	23
4.1 Microrganismos e condições de cultivo.....	23
4.2 Extração e purificação de peptidoramnomanas.....	24
4.3 Determinação do CMI e CMM.....	25
4.4 Ensaio de biofilme.....	25
4.4.1 Inibição da formação de biofilme.....	25
4.4.2 Inibição do biofilme maduro pré-formado.....	26
4.5 Efeito da PRM no estresse oxidativo e no potencial e integridade de membrana.....	26
4.6 Estabelecimento de biofilme misto.....	27
4.7 Análises estatísticas.....	28
<b>5 RESULTADOS</b> .....	28
5.1 Isolamento e purificação de PRMs de espécies de <i>Scedosporium/Lomentospora</i> .....	28
5.2 Influência da PRM no crescimento bacteriano.....	29
5.3 Efeito da PRM na formação de biofilme bacteriano.....	31
5.4 Efeito da PRM em biofilme maduro pré-formado bacteriano.....	32
5.5 Atuação da PRM no estresse oxidativo e no potencial e integridade de membrana de <i>Burkholderia cepacia</i> .....	34
5.6 Formação de biofilme misto bactéria-fungo.....	37
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	40
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	46
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	46
<b>ANEXO</b> .....	60



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Fibrose Cística

Fibrose cística (FC) é uma desordem genética transmitida em um padrão autossômico recessivo, causada por uma mutação no gene que codifica o Regulador de Condutância Transmembranar de Fibrose Cística (CFTR), uma proteína que regula a concentração iônica em líquidos extracelulares (Cohen e Prince, 2012; Stoltz *et al.*, 2015; Alberts, 2017). A proteína CFTR está presente na porção apical de células epiteliais do fígado, intestino, glândula sudorípara, ducto deferente, pâncreas e brônquios (Wilschanski e Durie, 2007).

A fibrose cística é a doença genética mais comum e letal em populações caucasianas do mundo. Ela apresenta uma incidência de aproximadamente 1 em 3.000 a 4.000 nascidos, e estima-se que 1 em 25 a 30 pessoas brancas sejam portadores de uma mutação no gene CFTR. Países como Estados Unidos e os que compõem a União Europeia apresentam os maiores números de pacientes com fibrose cística, porém, acredita-se que devido à ausência de órgãos em outras nações que também mantenham registros mais abrangentes e que ofereçam um diagnóstico mais precoce, os números possam ser muito maiores em países da África, por exemplo (Mirtajani *et al.*, 2017). Segundo dados de 2018, foram registrados 31.199 e 50.902 indivíduos com FC pela Fundação de Fibrose Cística dos EUA e pela Sociedade Europeia de Fibrose Cística, respectivamente. No Brasil, o Grupo Brasileiro de Estudos de Fibrose Cística tem por função registrar os dados dos indivíduos portadores da doença e no mesmo ano foram registrados 5.773 pacientes.

A primeira descrição da FC ocorreu em 1938, e ao longo dos anos com a melhor compreensão da causa e dos mecanismos da doença a expectativa e qualidade de vida dos pacientes teve uma melhora significativa (Balfour-Lynn e King, 2020). Até o começo do século XXI a expectativa de vida para os pacientes de FC era de 32 anos de idade, mas com novas descobertas acerca de diferentes tratamentos, a idade média de sobrevivência se aproxima, e em algumas populações excede, 50 anos de idade (Boucher, 2004; Bell *et al.*, 2019). Dentre os fatores que vêm contribuindo para essa melhoria na vida dos pacientes pode-se destacar o emprego de medicamentos que podem ser usados em casa, assim como a telemedicina, que junto com o uso de aparelhos como espirômetro, oxímetros de pulso, dentre outros, por exemplo,

conseguiu ser limitada a necessidade de tratamento agressivo, incluindo hospitalização (Bell *et al.* 2019).

As alterações na proteína em indivíduos portadores de fibrose cística proporcionam sintomas relacionados com a sua disposição no organismo. Dentre as doenças hepáticas relacionadas à FC, a colangite biliar primária é a de maior relevância, podendo levar a complicações como hipertensão portal e até mesmo se relacionar com a desnutrição dos pacientes (Colombo, 2007). Com relação às consequências clínicas observadas no intestino, elas geralmente são causadas devido ao impacto da doença em outros órgãos do trato gastrointestinal como, por exemplo, a deficiência de fluidos intestinais por conta de alterações pancreáticas. Também há uma alteração na diversidade e densidade da microbiota intestinal, ocorrência também multifatorial (De Lisle e Borowitz, 2013). As alterações na microbiota intestinal desses indivíduos geralmente fazem com que apresentem quantidades diminuídas de *Bifidobacterium* spp., o grupo *Bacteroides-Prevotella*, *Clostridium* cluster XIVa, *Faecalibacterium prausnitzii* e *Eubacterium rectale*, ao passo que *Enterobacteriaceae* e *Clostridium difficile* exibem números aumentados (Hussain *et al.*, 2004; Duytschaever *et al.*, 2013; Bruzzese *et al.*, 2014; Miragoli *et al.*, 2017; de Freitas *et al.*, 2018). Como consequência da disbiose intestinal observada, devido a influência da microbiota no sistema imunológico, podem ser observados impactos em órgãos distantes, incluindo as vias aéreas (De Lisle e Borowitz, 2013).

Ademais, já foram relatados casos de infertilidade relacionados com fibrose cística, principalmente masculina. No caso dos homens, pode ser observada a ausência bilateral congênita de canais deferentes como principal alteração clínica. Nas mulheres, a infertilidade pode estar relacionada com a desnutrição e puberdade tardia, além de geralmente apresentarem um muco cervical que não sofre as alterações normais de acordo com o ciclo menstrual (Jarzabek *et al.*, 2004). Diversas manifestações clínicas, portanto, podem ser associadas com a fibrose cística, porém a obstrução por secreção altamente viscosa nos ductos pancreáticos, o que gera uma deficiência nutricional, e nos pulmões, o que facilita a ocorrência de infecções pulmonares, são as mais comuns e preocupantes da doença (Davis, 2006; Cutting, 2014).

Devido a infecção e inflamação pulmonar crônica, 80 a 95% dos pacientes com fibrose cística sucumbem à insuficiência respiratória (Lyczak *et al.*, 2002). Os pulmões desses indivíduos são colonizados na infância, principalmente por *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus*

*influenzae*, seguido da colonização por outros patógenos quando adultos, como *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia* e micobactérias não tuberculosas (NTM) (Ciofu *et al.*, 2013). Os danos causados ao epitélio pulmonar pelo estabelecimento desses microrganismos permitem a adesão e infecção por *Pseudomonas aeruginosa*, que pode estar presente em até 80% dos pacientes adultos com FC (Lyczak *et al.*, 2002; Vandeplassche *et al.*, 2019). Além da colonização por bactérias, indivíduos com FC também sofrem frequentemente infecções fúngicas. Dentre os fungos mais isolados dos pulmões destes indivíduos temos o gênero *Candida*, mais especificamente *Candida albicans*, assim como *Aspergillus fumigatus*, *Exophiala dermatitidis*, espécies de *Penicillium*, *Scedosporium* e *Cladosporium*, entre outras espécies fúngicas (Ziesing *et al.*, 2016; Engel *et al.*, 2019).

## 1.2. Infecções bacterianas

Os defeitos presentes nos canais CFTR afetam o controle de fluidos e, com isso, os pulmões dos indivíduos portadores da FC apresentam um muco muito espesso e difícil de ser eliminado pelo transporte mucociliar (Ciofu *et al.*, 2013; Lynch e Bruce, 2015). Esse ambiente pulmonar se torna propício então para instalação de microrganismos que podem gerar infecções severas nos pacientes e diminuir assim a capacidade pulmonar dos mesmos, aumentando a mortalidade da doença. Primeiramente se tem a colonização por comunidades bacterianas, pelos patógenos mencionados anteriormente como *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *H. influenzae*, por exemplo (Ciofu *et al.*, 2013). De acordo com a região em que se está analisando, vão haver diferenças na prevalência dessas espécies, como o maior isolamento de *B. cepacia* no Brasil do que nos Estados Unidos (USCFF, 2019; REBRACF, 2019). Dados microbiológicos do Registro Brasileiro de Fibrose Cística (REBRACF) mostraram no ano de 2019 os microrganismos mais isolados de amostras dos pacientes. Com isso, foi verificada uma maior prevalência das bactérias descritas como patógenos clássicos da doença, com *S. aureus* sensível a meticilina (64,67%) sendo o mais frequentemente isolado, seguido de *P. aeruginosa* (42,95%), *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) (10,57%), Complexo *Burkholderia cepacia* (8,36%) e *H. influenzae* (8,00%) (Quadro 1).

**Quadro 1** - Descrição de microrganismos isolados de pacientes com FC no Brasil, 2019 (REBRAFC, 2019)

Patógeno	N	%
<i>S. aureus</i> oxacilina-sensível	2.165	64,67
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.438	42,95
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> não-mucoide	1.091	32,59
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucoide	639	19,09
<i>S. aureus</i> oxacilina-resistente (MRSA)	354	10,57
Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	280	8,36
<i>Haemophilus influenzae</i>	268	8,00
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	247	7,38
<i>Candida sp.</i>	175	5,23
<i>Aspergillus sp.</i>	171	5,11
<i>Klebsiella sp.</i>	157	4,69
<i>Achromobacter sp.</i>	101	3,02
<i>Serratia sp.</i>	89	2,66
<i>Escherichia coli</i>	72	2,15
Outras <i>Pseudomonas</i>	70	2,09
<i>Mycobacterium não tuberculosis</i>	23	0,69
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5	0,15

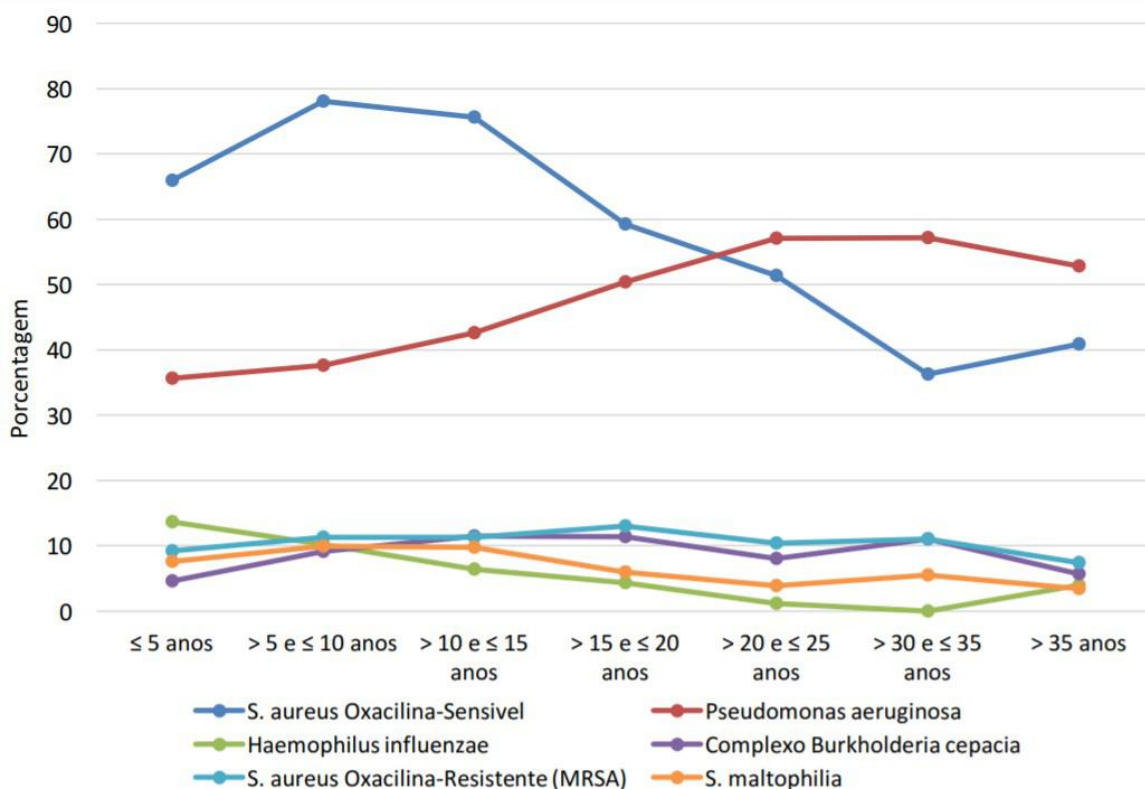
As infecções bacterianas crônicas podem ser observadas na maioria dos pacientes com FC. O processo de patogênese e adaptação utilizado por estes microrganismos característicos da doença envolve diversos fatores de virulência, incluindo produção de adesinas para facilitar a interação com as células do hospedeiro, proteínas da membrana externa e LPS, mecanismos de resistência à antibióticos, produção de EPS e formação de biofilme (Cullen e McClean, 2015). Foi observado em *P. aeruginosa* que os isolados do início da infecção apresentam características mais similares com isolados ambientais, apresentando maior motilidade e baixa resistência à antibióticos, por exemplo. Já os isolados de pacientes com infecções crônicas exibiam alterações fenotípicas que facilitavam sua patogênese, como a capacidade aumentada na formação de biofilmes (Goss e Burns, 2007). Essas infecções usualmente são polimicrobianas e dificilmente são eliminadas com o tratamento antimicrobiano.

O tratamento antibacteriano geralmente é dificultoso pela ocorrência de microrganismos que expressam uma resistência inata, como *B. cepacia* e *S. maltophilia*, além dos isolados multirresistentes, por exemplo *P. aeruginosa*, que desenvolvem mecanismos para auxiliar na sua persistência no organismo (Conway *et al.*, 2003). A resistência antimicrobiana representa um dos

principais problemas em infecções nosocomiais, sendo responsável por milhares de mortes e representando um risco para pacientes com FC que necessitam de tratamento mais agressivos em instalações hospitalares (Rybak, 2004; Shehabi *et al.*, 2004, Sriramulu, 2013). Pacientes infectados por patógenos resistentes têm uma tendência a necessitar de agentes antimicrobianos de segunda ou terceira escolha que podem ser menos efetivos no combate à bactéria, assim como têm o potencial de ser mais caros e tóxicos (Rybak, 2004). Geralmente, a escolha do antibiótico a ser empregado depende dos padrões de sensibilidade *in vitro*, e estes dispõem de 4 modos principais de ação: perturbação na síntese da parede celular, inibição da síntese de proteínas, bloqueio de uma via metabólica e interferência na síntese de ácido nucleico (Tenover, 2006). Como exemplo, enquanto para o tratamento de *B. cepacia* é recomendada tobramicina e meropenem, que atuam interferindo na síntese de ácidos nucleicos e na síntese da parede celular, respectivamente, *P. aeruginosa* multirresistente necessita de um tratamento que atue contra os seus fatores de virulência e por isso, se faz o uso de combinações de antibióticos (Conway *et al.*, 2003; Darville, 1999; Reyhanoglu e Reddivari, 2020).

#### 1.2.1. *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* é comumente identificado como o primeiro microrganismo a ser isolado do trato respiratório de crianças e adolescentes com FC (Goss e Muhlebach, 2011; LiPuma, 2010). Posteriormente ocorre a substituição da espécie por *P. aeruginosa*, porém, cerca de 50% dos pacientes com FC infectados por *P. aeruginosa* apresentam também *S. aureus* em suas vias aéreas (Hirschhausen *et al.*, 2013) (Figura 1). Essa espécie tem como características ser um coco Gram-positivo, com crescimento tipicamente aeróbio, mas também como anaeróbio facultativo, têm a capacidade de formar biofilme e é um comensal da pele humana, especialmente narinas anteriores de indivíduos com ou sem FC (Goss e Muhlebach, 2011).



**Figura 1** - Predominância de patógenos identificados por faixa etária no Brasil, 2019 (REBRACF, 2019).

*S. aureus* é um dos patógenos mais prevalentes achados em ambientes hospitalares, podendo causar não apenas infecções respiratórias em casos de FC, onde vai induzir uma intensa resposta imune do hospedeiro, caracterizada principalmente por leucócitos polimorfonucleares, mas também é a causa mais comum de bacteremias, podendo gerar endocardite, osteomielite, pneumonia e sepse (Goerke e Wolz, 2010; Hirschhausen *et al.*, 2013; Wong *et al.*, 2013). Para escapar das defesas do hospedeiro, assim como do tratamento com antibióticos, essa espécie utiliza diversas estratégias adaptativas como formação de biofilmes, rearranjos do genoma, emergência de variantes de pequenas colônias (SCVs), mobilização de fagos, inatividade do regulador de virulência agr, persistência intracelular, entre outros (Goerke e Wolz, 2010; Hirschhausen *et al.*, 2013; Schwerdt *et al.*, 2018).

Pacientes com FC podem apresentar uma infecção precoce por *S. aureus* que pode ser assintomática ou sintomática (Esposito *et al.*, 2019). Uma vez colonizado por este microrganismo, muitos especialistas recomendam que seja praticada uma terapia antibiótica agressiva com o intuito da erradicação de *S. aureus* (Marks, 1990). Porém, o tratamento agressivo contra a bactéria de forma precoce na vida do portador de FC pode levar a uma colonização

aumentada por *P. aeruginosa* e a resistência aos antibióticos administrados (Esposito *et al.*, 2019; Goss e Muhlebach, 2011). Com o estabelecimento então de *P. aeruginosa* no organismo, juntamente com a colonização primária por *S. aureus*, recomenda-se que a terapia antipseudomonas seja incluída no tratamento para infecção por *S. aureus* (Marks, 1990).

Nas últimas décadas, tem aumentado consideravelmente a notificação de infecções por MRSA (Saiman *et al.*, 2003). Estima-se que a prevalência de cepas de MRSA em pacientes com fibrose cística possa ser de mais de 20% no mundo (Dasenbrook *et al.*, 2010). No Brasil, o microrganismo mais isolado de amostras de indivíduos com FC é *S. aureus* sensível à meticilina (MSSA), enquanto MRSA ocupa terceiro lugar com prevalência crescente ao longo dos anos (REBRAFC, 2019) (**Quadro 1**).

O aumento de MRSA em casos de FC ao longo dos anos se tornou um fator preocupante. Além das dificuldades encontradas no tratamento para tais cepas, o controle do contato com a mesma é desafiante, já que ela é transmissível entre indivíduos com e sem FC, e também, foi relatado que infecções por MRSA estão associadas à diminuição da função pulmonar e pior sobrevida (Dasenbrook *et al.*, 2010; Kahl, 2010; Muhlebach, 2017). Assim como a resistência a antibióticos, algumas cepas de MRSA também apresentam fatores de virulência que podem aumentar sua capacidade de danificar o tecido do hospedeiro (Gordon e Lowy, 2008). Por conta dessas características, a prevenção primária pelo controle da infecção é considerada a melhor estratégia para lidar com a infecção por MRSA (Akil e Muhlebach, 2018).

### 1.2.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Enquanto *S. aureus* representa a espécie bacteriana mais comumente isolada em crianças com FC, há uma predominância de *P. aeruginosa* em pacientes adultos. (Gaspar *et al.*, 2013). *P. aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa, não-fermentadora e oxidase-positiva, capaz de crescer em condições de aerobiose e anaerobiose, além de ser tolerante a temperaturas de até 50 °C (Alhazmi, 2015; Talwalkar e Murray, 2016). Essa espécie corresponde a um patógeno oportunista que pode causar infecções em pacientes com sistema imunológico comprometido, podendo ocasionar sepse e morte, além de ter a capacidade de estabelecer uma infecção crônica de difícil tratamento (Alhazmi, 2015; Talwalkar e Murray, 2016).

*P. aeruginosa* é um microrganismo de distribuição ubíqua, sobrevivendo na água, no solo, e em hospedeiros animais e vegetais (Hogardt e Heesemann, 2010; Talkawar e Murray, 2016). A transmissão de suas cepas pode se dar pelo contato direto entre pacientes de FC e por reservatórios ambientais, como equipamentos de inalação e outros utilizados no tratamento, sendo essa a forma mais frequente de disseminação (Folkesson *et al.*, 2012; Hogardt e Heesemann, 2010; Gaspar *et al.*, 2013; Taylor *et al.*, 1990). Esse patógeno apresenta múltiplos fatores de virulência que são expressos de formas distintas dependendo do fenótipo apresentado pela bactéria (Caldwell *et al.*, 2009)

Foi determinado que *P. aeruginosa* apresenta diferentes morfotipos, em pacientes de FC, que estão associados com o tipo de infecção estabelecida. No caso da infecção aguda, pode ser observado o fenótipo não mucóide, cujas principais características são a motilidade pela atividade flagelar da bactéria e a adesão mediada pelo flagelo e pili tipo IV, que possibilitam a colonização das vias respiratórias (Gaspar *et al.*, 2013; Hogardt e Heesemann, 2010). Já na infecção pulmonar crônica em FC, ocorre a conversão de *P. aeruginosa* para o fenótipo mucóide. As cepas mucóides se caracterizam pela falta de motilidade, perda de *quorum sensing*, crescimento lento e por uma superexpressão de alginato, que resulta na formação de biofilmes que conferem uma alta resistência a antibióticos, além da proteção contra a fagocitose, e com isso temos a promoção da persistência da bactéria no pulmão dos pacientes (Folkesson *et al.*, 2012; Gaspar *et al.*, 2013; Hogardt e Heesemann, 2010).

A infecção por *P. aeruginosa* está correlacionada com um pior prognóstico em pacientes com FC (Douglas *et al.*, 2008). A presença crônica da bactéria no pulmão destes indivíduos causa danos teciduais e diminuição da função pulmonar, isso é decorrente de diferentes fatores (Folkesson *et al.*, 2012). Primeiramente, a presença do patógeno ocasiona uma abundante resposta inflamatória com produção de altos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS). Isso junto com um desequilíbrio dos fatores antioxidantes do tecido levam a danos ao DNA, lipídios e proteínas do tecido pulmonar (Caldwell *et al.*, 2009; Folkesson *et al.*, 2012). Além disso, a elevada produção de alginato gera um aumento na resposta de anticorpos, o que foi associado com os danos em questão, assim como com a proteção de *P. aeruginosa* contra as consequências da inflamação, o que faz com que o patógeno em si também possa levar a uma injúria nos pulmões dos pacientes de FC (Folkesson *et al.*, 2012).



Com relação ao tratamento empregado para eliminação de *P. aeruginosa*, são geralmente utilizados antibióticos inalatórios, devido às dificuldades farmacocinéticas do sítio de instalação da bactéria, sendo ou não associado com ciprofloxacina oral (Talwalkar e Murray, 2016). No entanto, o tratamento com antibióticos que se inicia precocemente em pacientes com FC tem um papel fundamental na seleção de cepas altamente resistentes, o que junto com a resistência intrínseca já apresentada pelo patógeno, torna-o dificultoso de ser eliminado. Um dos fatores que mais contribuem para tal resistência vai ser a produção de biofilmes, pois proporcionam uma penetração reduzida do antibiótico assim como a alteração do metabolismo bacteriano (Talwalkar e Murray, 2016; Hogardt e Heesemann, 2010). Ademais, a identificação precisa de *P. aeruginosa* também desempenha um importante papel na dificuldade na eliminação do mesmo. Isso porque outros bacilos Gram-negativos como *Achromobacter*, *Stenotrophomonas* e *Burkholderia* podem gerar conflitos nesse reconhecimento do patógeno e impedir um tratamento correto que permita a erradicação do agente infeccioso (Kidd *et al.*, 2009).

### 1.2.3. *Burkholderia cepacia*

Apesar da maior frequência no isolamento das espécies *S. aureus* e *P. aeruginosa* em infecções pulmonares de pacientes com FC, espécies do complexo *Burkholderia cepacia* (CBc) podem causar infecções respiratórias graves em indivíduos imunocomprometidos, e no caso de pacientes de FC estão associados com um pior prognóstico e morte precoce (Coutinho *et al.*, 2015; Somayaji *et al.*, 2020). Esse complexo de bactérias pode ser isolado em água, solo e ambientes úmidos, além de, é claro, poder estar presente no escarro de pacientes de FC (Leitão *et al.*, 2017; Sfeir, 2018).

O CBc corresponde a um grupo heterogêneo de bactérias composto por cerca de 23 espécies relacionadas (Coutinho *et al.*, 2015; Somayaji *et al.*, 2020). As bactérias do gênero têm como características serem bacilos Gram-negativos, aeróbios e não fermentadores de glicose (Sfeir, 2018). Apesar de todas as espécies do complexo representarem um risco como patógenos para os pacientes de FC e haver uma distribuição geográfica desproporcional da prevalência destas, estudos epidemiológicos mostraram que há uma predominância nos isolados clínicos, com *B. cenocepacia* e *B. multivorans* sendo responsáveis por aproximadamente 80% das infecções por CBc em pacientes com FC (Leitão *et al.*, 2017; Coutinho *et al.*, 2015). Essa disparidade na

prevalência, no entanto, não tem uma implicação na transmissão paciente para paciente, nas infecções crônicas, no pior prognóstico ou na síndrome de cepacia que também podem ser ocasionadas pelas outras espécies do complexo (Coutinho *et al.*, 2015).

Geralmente, tenta-se impedir a ocorrência das infecções por CBc pela capacidade de resistência das espécies, pela fácil transmissão entre pacientes de FC e pela imprevisibilidade da resolução das infecções, de forma que podem acontecer de casos assintomáticos a infecções graves como a chamada síndrome de cepacia (Folescu *et al.*, 2015; Leitão *et al.*, 2017). A síndrome de cepacia, com incidência de aproximadamente 20% dos pacientes colonizados por *B. cepacia*, é uma pneumonia necrosante progressiva que se manifesta com um rápido declínio da função pulmonar, bacteremia, febre, leucocitose e resultam em septicemia e morte (Govan e Deretic, 1996; Zlosnik *et al.*, 2011; Sfeir, 2018; Somayaji *et al.*, 2020). Esta síndrome já foi associada com resultados adversos após transplante de pulmão, e por conta disso, muitos programas de transplante não aceitam pacientes com FC infectados pela bactéria (Chaparro *et al.*, 2001; Ramsay *et al.*, 2013).

Com relação à virulência do CBc, foi determinado que se trata de uma condição multifatorial (Leitão *et al.*, 2017). Assim, as bactérias deste gênero apresentam estruturas como flagelos, pili, além de adesinas, que vão proporcionar a interação inicial com a célula hospedeira. Por serem bactérias Gram-negativas, também apresentam lipopolissacarídeo (LPS), bem como expressam hemolisina e fosfolipase C. Além disso, podem produzir diferentes tipos de sideróforos, exopolissacarídeos, que auxiliam na inibição da produção assim como na eliminação de ROS produzidas por neutrófilos, e também são bons formadores de biofilme e apresentam bombas de efluxo, ambos fatores que contribuem para a virulência observada neste complexo bacteriano (Hassan *et al.*, 2019; Leitão *et al.*, 2017; Govan e Deretic, 1996; Sfeir, 2018).

#### 1.2.4. *Escherichia coli*

A fibrose cística tem como principal patologia associada aquelas que acometem os pulmões dos pacientes, no entanto, a doença gastrointestinal é comumente observada, e também representa um importante fator que pode resultar em morbidade e mortalidade substanciais. O trato gastrointestinal dos pacientes de FC normalmente é um dos primeiros sítios de manifestação

da doença, que incluem uma má absorção de nutrientes, inflamação intestinal, instabilidade de íons e fluidos, acúmulo de muco, dentre outros (Hoffman *et al.*, 2014).

*Escherichia coli* se dispõe habitualmente na microbiota intestinal humana, representando menos de 1% dos microrganismos observados, no entanto, na FC a abundância da bactéria pode chegar a representar 50% da microbiota nesse sítio (Matamouros *et al.*, 2018). Apesar da prevalência de trato gastrointestinal, *E. coli* é frequentemente isolada das secreções respiratórias de pacientes com fibrose cística, mas não é considerada um patógeno clássico para doença, como seria o caso de *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *B. cepacia* (Izydorczyk *et al.*, 2020). Estima-se que *E. coli* poderia ser isolada na expectoração de até 25% dos pacientes com FC (Edwards *et al.*, 2019).

*E. coli* é uma bactéria Gram-negativa, que inclui cepas comensais e patogênicas, sendo os isolados patogênicos dotados de muitas estratégias de virulência (Croxen e Finlay, 2010; Izydorczyk *et al.*, 2020). Dentre os fatores de virulência mais relevantes para essa espécie há a presença de fímbrias ou pili, que auxiliam na adesão às células hospedeiras, secreção de proteínas, sequestro e manipulação de vias de sinalização da célula hospedeira, dentre outros (Croxen e Finlay, 2010).

### 1.3. Infecções fúngicas

As infecções pulmonares em casos de FC são comumente associadas a patógenos bacterianos, no entanto, leveduras e fungos filamentosos são cada vez mais isolados de amostras de pacientes (Nagano *et al.*, 2007). Pouco se sabe ainda sobre a dimensão da relevância clínica dos patógenos fúngicos neste contexto, mas com o desenvolvimento de meios de cultura seletivos para fungos e uso de técnicas moleculares na última década, o papel destes microrganismos tem sido gradualmente desvendado (Müller e Seidler, 2010; Middleton *et al.*, 2013).

A patogenicidade dos fungos associados à FC é variável e não completamente compreendida. Entretanto, as infecções fúngicas estão associadas a uma maior taxa de mortalidade do que infecções virais e bacterianas (Nagano *et al.*, 2007; Schwarz *et al.*, 2018). Esse fato se dá principalmente pela terapia antifúngica limitante e pela dificuldade em um diagnóstico precoce devido ao baixo surgimento de sintomas (Nagano *et al.*, 2007). Um dos quadros clínicos mais comuns gerado pela colonização e formação de biofilme fúngico é a

aspergilose broncopulmonar alérgica, causada por *A. fumigatus*, afetando cerca de 10% dos indivíduos com FC (Middleton *et al.*, 2013; Williams *et al.*, 2016; Schwarz *et al.*, 2018).

As infecções fúngicas requerem tratamentos específicos contra o patógeno causador do quadro. Antigamente, itraconazol era a droga de escolha para a grande maioria das infecções fúngicas, porém, com o aumento de relatos de resistência, principalmente em *A. fumigatus*, novos medicamentos começaram a ser introduzidos no tratamento. Uma alternativa é o uso de voriconazol, que dispõe de uma biodisponibilidade oral superior ao itraconazol, além da menor notificação de casos de resistência (Müller e Seidler, 2010).

### 1.3.1. *Scedosporium/Lomentospora*

*Scedosporium* é um gênero que engloba fungos filamentosos saprófitos, composto atualmente de 10 espécies que correspondem a *S. desertorum*, *S. fusoidium*, *S. ellipsoideum*, *S. angustum*, *S. cereisporum*, *S. aurantiacum*, *S. dehoogii*, *S. apiospermum*, *S. minutisporum* e *S. boydii*, sendo as últimas cinco possuindo relevância clínica (Ramirez-Garcia *et al.*, 2018). Enquanto isso, *Lomentospora prolificans* foi primeiramente inserida no gênero *Scedosporium* como a espécie *S. inflatum*, sendo posteriormente reclassificada como *S. prolificans* (Gueho and de Hoog, 1991; Lennon *et al.*, 1994; Malloch and Salkin, 1984). Em 2011 foi revisada a forma em que a classificação de fungos era realizada, devido à dualidade de nomes para uma mesma espécie dependendo da morfologia sexual ou assexual, e assim foi estabelecida a “Declaração de Amsterdã sobre Nomenclatura de Fungos” (Hawksworth, 2011). Com isso, ocorreu uma reorganização da família *Microascaceae* e percebeu-se diferenças morfológicas e genéticas entre *S. prolificans* e outras espécies do gênero *Scedosporium*, e assim, foi nomeada como *Lomentospora prolificans*, sendo a única espécie do gênero (Lackner *et al.*, 2014). As espécies desses gêneros fúngicos são colonizadoras tardias das vias aéreas de FC, com isolamento relatado após infecções bacterianas e por *Aspergillus*, que é o agente infeccioso fúngico prevalente nestes casos. Já foi sugerido que as espécies de *Scedosporium* são mais virulentas do que as espécies de *Aspergillus* na FC (Schwarz *et al.*, 2018).

As manifestações clínicas de *Scedosporium/Lomentospora* são muito diversificadas, de forma que podem ocasionar desde infecções superficiais até aquelas envolvendo o sistema

nervoso, podendo acometer hospedeiros imunocompetentes e imunocomprometidos (Guarro *et al.*, 2006; Cortez *et al.*, 2008; Richardson e Lass-Flörl, 2008). As infecções podem acontecer por inoculação traumática do fungo no indivíduo, sendo capaz de levar a formação de eumicetoma, mas a principal porta de entrada é pela inalação dos conídios, o que permite a colonização do trato respiratório, chegando aos pulmões, onde podem germinar e invadir o trato respiratório na forma de hifas (Cortez *et al.*, 2008; Estrada *et al.*, 2012).

Na literatura, *Scedosporium* é descrito como ocupando o segundo ou o terceiro lugar dentre os fungos filamentosos mais isolados das vias aéreas de pacientes com FC e essa variação se dá principalmente pelo uso ou não de meios de cultura seletivos para o crescimento do gênero (Engel *et al.*, 2018; Bouchara *et al.*, 2019). Existem variações também no predomínio das espécies deste gênero ao redor do mundo. Geralmente, *S. boydii* e *S. apiospermum* são as espécies mais isoladas, porém, em algumas regiões, *S. aurantiacum* é tido como mais relevante. Não existem muitos estudos que relatem a epidemiologia de *Lomentospora* de forma isolada às espécies de *Scedosporium*, mas acredita-se que *L. prolificans* pode ser isolado das vias aéreas de até 17% dos pacientes com FC (Lackner *et al.*, 2012).

Os fungos do gênero *Scedosporium/Lomentospora* apresentam distribuição mundial. São relatados principalmente em locais que sofreram com a ação antropogênica, incluindo águas poluídas, solos com presença de óleo e esgoto, e lamas de marés costeiras. Esse fato pode ser explicado pela capacidade das espécies em sobreviver em locais pouco aerados, e pela tolerância a diferentes concentrações de sal e pressão osmótica (Ramirez-Garcia *et al.*, 2018). Já foi observado que a presença desses fungos em áreas naturais ou menos impactadas é bem incomum (Rougeron *et al.*, 2014).

Diversos mecanismos podem ser utilizados por *Scedosporium/Lomentospora* para proporcionar uma maior virulência, como o aumento da germinação em casos de *S. boydii*, formação de biofilme pelo gênero, produção de enzimas para facilitar a invasão, como serina e

metaloproteases, melanização, entre outros (Larcher *et al.*, 1996; Pinto *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2006; Ghamrawi *et al.*, 2014). Componentes da parede celular destes fungos também são muito importantes para sua patogênese, como peptidoramnomanas (PRM) e glucosilceramida (CMH), este sendo o principal glicosfingolípido neutro da estrutura de *Scedosporium/Lomentospora*, estando relacionado com o crescimento, a diferenciação e, conseqüentemente, com a patogênese do fungo.

O tratamento para infecções causadas por *Scedosporium/Lomentospora* possui diversas dificuldades apesar da disponibilidade de vários antifúngicos (Ramirez-Garcia *et al.*, 2018; Bouchara *et al.*, 2019). Esses fungos apresentam uma resistência intrínseca à maioria dos antifúngicos atuais, como anfotericina B e fluconazol, e assim, o voriconazol se tornou a droga de escolha no tratamento de infecções do gênero. Existem diferenças na susceptibilidade aos antifúngicos entre as espécies. Geralmente, *S. aurantiacum* é considerada a mais resistente, além de coincidir também com uma maior virulência (Lackner e Guarro, 2013).

Como foi mencionado, um importante fator de virulência de *Scedosporium/Lomentospora* é a formação de biofilme. Biofilmes são comunidades complexas de microrganismos que interagem entre si, se apresentando embebidos em uma matriz extracelular polimérica produzida pelas células microbianas (Ramage *et al.*, 2011; Rollin-Pinheiro *et al.*, 2017). Esta matriz exibe canais que possibilitam a passagem de substâncias e assim, o contato das células com o ambiente externo. As células do biofilme demonstram mudanças fenotípicas, quando comparadas com as células planctônicas, que diz respeito a um aumento da tolerância a estresses químicos, físicos e biológicos (Harding *et al.*, 2009). A consequência mais relevante disto é o aumento da resistência aos antimicrobianos (Harding *et al.*, 2009). Por essas razões, a formação de biofilme é uma forma de crescimento facilmente observada em diversos patógenos fúngicos, incluindo *Candida* spp., *Trichosporon* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp., entre outros (Mello *et*

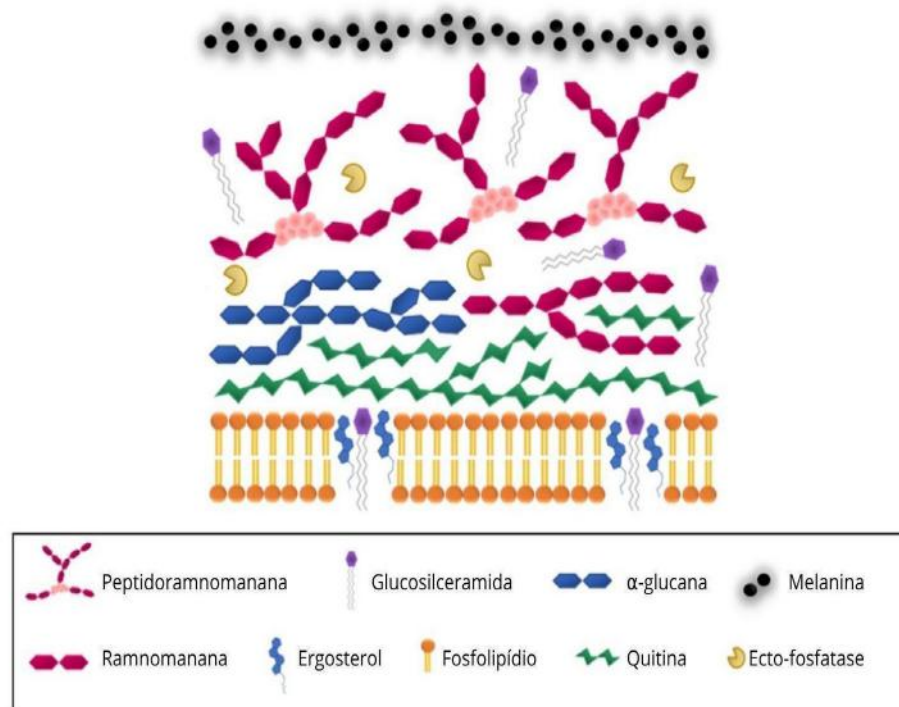
*al.*, 2016; Rollin-Pinheiro *et al.*, 2017). Assim, a formação de biofilmes por espécies de *Scedosporium* pode dificultar ainda mais o tratamento de infecções causadas por estes fungos.

#### 1.3.1.1. Parede celular e peptidoramnomanas

A parede celular fúngica é uma estrutura dinâmica e diversificada e essencial para a viabilidade celular, morfogênese e patogênese do microrganismo (Gow *et al.*, 2017). Por ser a estrutura mais externa do fungo, a parede medeia o processo de adesão celular e atua como um ponto central para a ativação de vias de transdução de sinal dentro da célula (Bowman e Free, 2006). Devido às suas funções, a parede celular é geralmente muito visada no desenvolvimento de agentes antifúngicos (Bowman e Free, 2006).

Essencialmente, a parede celular dos fungos apresenta um arcabouço similar entre as espécies, de forma que a camada interna dispõe de moléculas mais conservadas, enquanto que as maiores diferenças são observadas nas camadas mais externas. Alterações na composição da estrutura também podem ser observadas em um único isolado, variando de acordo com as condições e estágio de crescimento. Em geral, a parte mais interna da parede celular é composta por um núcleo de  $\beta$ -1,3-glucana ramificada e quitina. De forma alternativa, em algumas espécies podem ser encontradas uma prevalência de  $\beta$ -1,6-glucana (Bowman e Free, 2006; Gow *et al.*, 2017). Como principais moléculas expostas na porção mais externa da parede temos os polissacarídeos e as glicoproteínas, estas modificadas covalentemente por carboidratos através de ligações glicosídicas *N*- e *O*-ligadas (Bowman e Free, 2006; Gow *et al.*, 2017; Pinto *et al.*, 2004).

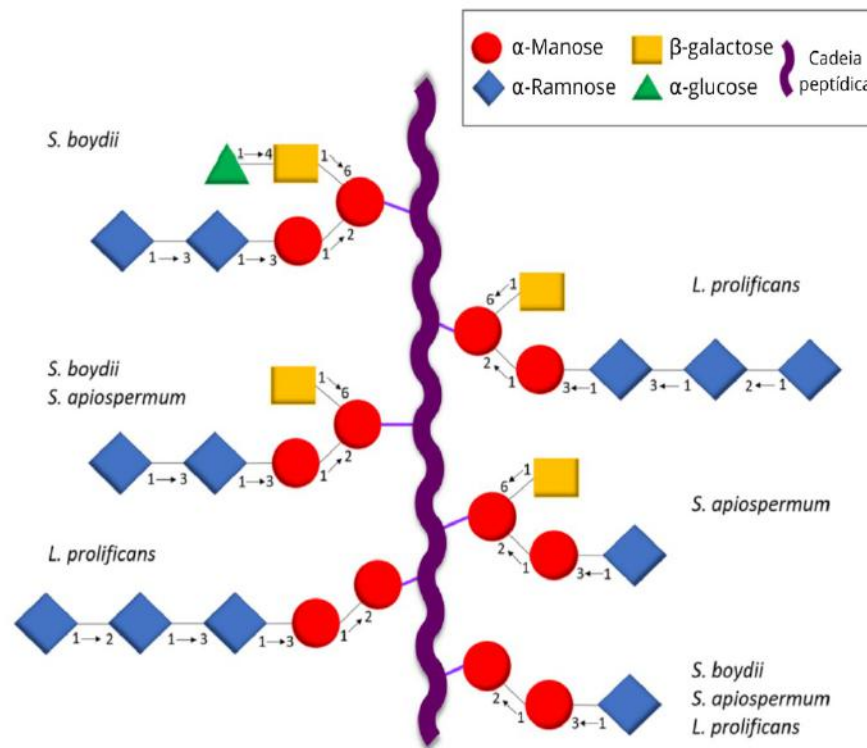
A parede celular de espécies do gênero *Scedosporium/Lomentospora* apresentam moléculas como peptidoramnomanas (PRM), glucosilceramidas,  $\alpha$ -glucanas e ramnomanas que são de extrema importância para a arquitetura da estrutura em questão. Além destes, já foram observadas também outros componentes como proteínas ancoradas em glicosilfosfatidilinositol (GPI), melanina e ecto-fosfatases (Barreto-Bergter *et al.*, 2011; Ghamrawi *et al.*, 2015; Rollin-Pinheiro *et al.*, 2020) (**Figura 2**).



**Figura 2** - Esquema de parede celular de espécies de *Scedosporium* (Adaptado de Rollin-Pinheiro *et al.*, 2020)

Peptidoramnomananas são moléculas expressas comumente nos conídios e nas hifas de espécies do complexo *Scedosporium/Lomentospora* (Xisto *et al.*, 2016). Estes glicoconjugados são compostos por cadeias *N*- e *O*-glicosiladas ligadas a um núcleo peptídico conservado, apresentando a estrutura  $\alpha$ -Rhap- (1 → 3) - $\alpha$ -Manp- (1 → 2) - $\alpha$ -Manp, contendo também alterações em outras partes da molécula, já tendo sido observadas alterações estruturais entre *S. apiospermum*, *S. boydii* e *L. prolificans* (de Meirelles *et al.*, 2021; Xisto *et al.*, 2016) (**Figura 3**).





**Figura 3** - Estrutura dos oligosacarídeos O-ligados da peptidoramnomanana de espécies de *Scedosporium* (Adaptado de Rollin-Pinheiro *et al.*, 2020).

Além de desempenhar um papel imprescindível na arquitetura da parede celular, a PRM também facilita a colonização, a virulência e a disseminação do fungo no hospedeiro (Ramirez-Garcia *et al.*, 2018). Essa molécula está fortemente relacionada com a adesão do fungo às células epiteliais do hospedeiro, facilitando assim sua invasão (Pinto *et al.*, 2005). Ademais, foi observado em *S. boydii* que a PRM é uma molécula antigênica que aumenta a sobrevivência intracelular dentro de macrófagos, assim como está envolvida na germinação e viabilidade dos conídios (Lopes *et al.*, 2011). Tudo isso demonstra que a PRM exerce um importante papel na interação entre espécies de *Scedosporium*/*Lomentospora* e células do hospedeiro, assim como é um ponto de contato que pode ditar a interação com outros microrganismos.

A primeira caracterização estrutural da PRM do gênero ocorreu com a molécula de *S. boydii*, anteriormente denominada *Pseudallescheria boydii*, com o objetivo de determinar se o antígeno poderia ser utilizado para fins diagnósticos, o que posteriormente pode ser constatado de fato o seu potencial (Pinto *et al.*, 2001; Pinto *et al.*, 2004). Também foi reconhecido o papel da PRM de *S. boydii* para sua adesão, função que foi verificada pela intensa inibição da adesão à

células HEP2 quando os conídios foram pré-incubados com antisoro contra a molécula, assim como pelo tratamento das células tumorais com PRM solúvel, o que também diminuiu a adesão do fungo pela saturação dos receptores das células (Pinto *et al.*, 2004).

O papel da PRM de outras espécies também foi avaliado, como o de *S. apiospermum*. Foi observado neste caso que os anticorpos monoclonais para a PRM se ligavam a moléculas na superfície do fungo e como consequência diminuía a taxa de fagocitose e aumentavam a sobrevivência intracelular assim como a germinação, o que proporciona uma vantagem ao fungo durante sua infecção (Lopes *et al.*, 2010). Já a PRM das espécies *S. aurantiacum* e *S. minutisporum* demonstraram exercer um papel na fagocitose quando eram pré-incubadas com os macrófagos, assim como foi verificado que essa molécula induz a liberação de óxido nítrico pelos macrófagos (de Meirelles *et al.*, 2021). Tudo isso indica que a PRM é um importante PAMP exposto na superfície fúngica e que ela representa um importante mediador patógeno-hospedeiro.

#### 1.4. Infecções polimicrobianas e biofilmes mistos

Comunidades polimicrobianas podem ser encontradas em diversos ambientes, como no pulmão e trato gastrointestinal de pacientes com FC, na cavidade oral humana, na produção de alimentos e em ambientes agrícolas e florestais (Frey-Klett *et al.*, 2011). O trato respiratório de pacientes com FC corresponde a um ambiente propício à colonização de diversos microrganismos. Dessa forma, a ocorrência de infecções polimicrobianas com interações entre bactérias e fungos é recorrente (Filkins e O'Toole, 2015). Como consequência da associação entre estes microrganismos, as infecções são mais difíceis de serem gerenciadas do que suas contrapartes monomicrobianas, principalmente pelo aumento da resistência a antimicrobianos, além de também estar relacionada com a exacerbação e progressão da doença na FC (Reece, 2018). Além disso, alguns trabalhos correlacionam uma diminuição da função pulmonar agravada em um contexto de infecções polimicrobianas bactéria-fungo. Um exemplo disto é o co-isolamento entre *P. aeruginosa* e *A. fumigatus*, que apresenta 62% de prevalência em casos de FC causando um impacto negativo na atividade pulmonar (Leclair e Hogan, 2010; Manavathu *et al.*, 2014; Dixon e Hall, 2015).

A interação entre bactérias e fungos pode alterar a capacidade de colonização, a quantidade de fatores de virulência expressos, assim como o próprio comportamento dos

microrganismos envolvidos (Leclair e Hogan, 2010). Essa relação, uma vez estabelecida, pode ser simbiótica, de forma a ser mutualmente benéfica para ambos os microrganismos ou resultam em uma interação neutra (Todd e Peters, 2019). A associação entre *C. albicans* e bactérias presentes na cavidade oral é um exemplo de relação simbiótica, que permite o aumento da colonização fúngica, o que pode levar a um quadro de estomatite dentária (Cannon e Chaffin, 1999; Thein *et al.*, 2006). A interação num contexto polimicrobiano também pode ter um resultado negativo para ambas as partes ou para qualquer um dos parceiros. Um exemplo disto é a inibição observada sendo exercida por *P. aeruginosa* em *B. cenocepacia* e em espécies fúngicas como *C. albicans* e *S. aurantiacum* (Brand *et al.*, 2008; Costello *et al.*, 2014; Kaur *et al.*, 2015).

Infecções polimicrobianas no contexto de FC são comumente observadas devido às consequências fisiológicas que a doença ocasiona nos pacientes. Acredita-se que as interações bactéria-fungo contribuam para a disfunção pulmonar e que impactam nos desfechos da FC, e por conta disso, atualmente muitos estudos se dedicam a avaliar tais interações microbianas (Chen *et al.*, 2018). Soret *et al.* (2020) investigaram as interações inter-reinos durante exacerbações pulmonares em fibrose cística, e com isso, observaram que nessas condições temos regularmente associações entre bactérias e fungos, sendo *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Candida*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Scedosporium* os gêneros dominantes encontrados, além do isolamento de populações minoritárias de microrganismos. Apesar dessa diversidade constatada nos pulmões de indivíduos com FC, grande parte dos trabalhos busca investigar somente a interação entre espécies fúngicas com *P. aeruginosa*, dada a sua prevalência no trato respiratório dos pacientes. Já foi investigada, por exemplo, co-infecções entre *P. aeruginosa* e *A. fumigatus*, de forma que foi verificado que através de mecanismos antagônicos e contra-antagônicos é possível que os dois organismos coexistem em pacientes com FC (Keown *et al.*, 2020). Dentre estes mecanismos inibitórios, podemos ter a liberação de fatores de virulência por *P. aeruginosa* como fenazinas, assim como a competição por nutrientes, principalmente compostos de ferro, que favorecem o desenvolvimento da bactéria em detrimento de *A. fumigatus*. Por outro lado, *P. aeruginosa* não vai ser capaz de eliminar completamente o fungo, já que uma vez formado o seu biofilme, a atuação das fenazinas é restringida (Keown *et al.*, 2020). Ademais, alguns estudos também foram realizados para compreender as relações entre *P. aeruginosa* e o gênero fúngico *Scedosporium*. Foi avaliado que *P. aeruginosa* é capaz de aumentar ou inibir o crescimento de espécies de *Scedosporium* de acordo com as condições de cultivo e o modo de interação (Homa *et al.*, 2019).

Em contrapartida, foi percebido que pacientes adultos de FC colonizados com *Scedosporium* são menos propensos a serem colonizados por *P. aeruginosa* mucóide (Blyth *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2018).

Interações entre fungos e bactérias têm sido cada vez mais estudados em modelos *in vitro* com o intuito de que os resultados obtidos possam ser um reflexo das infecções recorrentes que acometem os pacientes de FC. Dentre as bactérias mais utilizadas nestes ensaios temos *P. aeruginosa* e o Complexo *Burkholderia cepacia*, enquanto *Aspergillus* e *C. albicans* representam geralmente os fungos mais empregados em tais trabalhos, isso por conta da prevalência dessas espécies nesse contexto (Delhaes *et al.* 2012). Pode ser observado, por exemplo, que di-rhamnolipídios secretados por *P. aeruginosa* gera alterações na parede celular de *A. fumigatus* como consequência do seu efeito antifúngico, o que sugere que a bactéria possa promover a inibição do fungo quando em co-cultura (Briard *et al.*, 2017). Da mesma forma, foi verificada a atividade antifúngica de dois metabólitos, Bc-255 e Bc-257, produzidos por *B. cepacia* contra *A. niger* (Kilani-Feki *et al.*, 2012). Além disso, em um estudo avaliando as interações polimicrobianas entre *P. aeruginosa*, *B. cepacia* e *S. aureus* com espécies de *Scedosporium*, descobriu-se que as espécies bacterianas vão exercer uma atividade antifúngica não apenas pelo contato direto célula-célula, mas também pela presença de metabólitos secretados no meio de cultivo (Marques *et al.*, 2021).

Seja no meio ambiente ou no hospedeiro humano, os microrganismos se encontram comumente na forma de biofilme, e comunidades polimicrobianas constituídas por bactérias e fungos são frequentes (Dhamgaye *et al.*, 2016). As interações entre os microrganismos no biofilme podem ser mutualísticas, comensalistas ou antagônicas, dependendo da espécie, cepa e do ambiente em questão (Dixon e Hall, 2015; Costa-Orlandi *et al.*, 2017). Infecções associadas a biofilmes polimicrobianos são regularmente observadas no pulmão, trato urinário, ouvido interno, cavidade oral, feridas e dispositivos abióticos (Costa-Orlandi *et al.*, 2017). Em regiões de queimadura e locais de trauma já foram relatados, por exemplo, interações entre espécies de *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus* (Costa-Orlandi *et al.*, 2017).

A formação de biofilmes mistos no pulmão de indivíduos com FC normalmente é estabelecida entre bactérias ou entre bactérias e fungos. Como exemplo de biofilmes mistos entre bactérias, Pompilio *et al.* (2015) observaram que essas comunidades polimicrobianas formadas entre *S. maltophilia* e *P. aeruginosa*, e perceberam que apesar da *Pseudomonas* dispor de uma

maior agressividade dominando a outra espécie durante o crescimento planctônico para formação do biofilme, *S. maltophilia* é capaz de alterar a fisiologia de *P. aeruginosa* e modular assim seu perfil de virulência (Pompilio *et al.*, 2015). A formação de biofilme misto entre *P. aeruginosa* e *B. cepacia* também já foi investigada, e notou-se que por conta dessas espécies utilizarem mecanismos químicos de controle semelhantes para formação do biofilme e para expressão de fatores de virulência, essas bactérias podem aumentar sinergicamente a virulência da comunidade mista. Além disso, também foi sugerido que *P. aeruginosa* altera a superfície da célula epitelial do pulmão de pacientes com FC de forma que a adesão de *B. cepacia* é facilitada (Eberl e Tümmler, 2004). A respeito das relações em biofilmes mistos estabelecidas por bactérias e fungos clinicamente relevantes na FC alguns estudos também já foram realizados. Na associação entre *A. fumigatus* e *S. maltophilia*, por exemplo, percebeu-se um efeito de antibiose bacteriana no fungo quando era estabelecido o biofilme misto (Melloul *et al.*, 2016; Melloul *et al.*, 2018). Também foram percebidas alterações nas características estruturais e funcionais no biofilme misto entre *A. fumigatus* e *P. aeruginosa* quando comparado com suas contrapartes monomicrobianas (Manavathu *et al.*, 2014).

Com relação ao tratamento, um efeito benéfico da terapia antifúngica em casos de infecções polimicrobianas foi descrito em pacientes que se apresentavam colonizados simultaneamente por *A. fumigatus* e por *P. aeruginosa* e *S. maltophilia* (Shoseyov *et al.*, 2006). No entanto, um aumento da carga fúngica pulmonar foi observado pelo tratamento com antibióticos em infecções polimicrobianas (Leclair e Hogan, 2010). Diversos estudos já foram realizados para investigar a susceptibilidade aos antibióticos por biofilmes mistos e monomicrobianos, e na maioria dos casos foi observado um aumento significativo na resistência ao tratamento com antimicrobianos (Elias e Banin, 2012). Essa resistência pode ser causada por alguns fatores como uma mudança na composição da matriz extracelular polimérica, o fornecimento de condições favoráveis ao crescimento de um microrganismo pelo outro, como exemplo na interação de bactérias anaeróbias sensíveis ao oxigênio que conseguem sobreviver quando cultivadas na presença de bactérias aeróbias, dentre outros fatores (Elias e Banin, 2012).

O tratamento antimicrobiano para essas infecções em espécimes de FC é dificultoso, principalmente por essa escolha ser realizada levando em conta apenas o teste de sensibilidade às drogas que possam combater o organismo tradicional associada a doença, como seria o caso de *P. aeruginosa* (Lopes *et al.*, 2012). Já foi constatado, no entanto, que no tratamento de biofilmes

mistos de, por exemplo, *P. aeruginosa* com espécies presentes em baixas concentrações em FC como *Inquilinus limosus* e *Dolosigranulum pigrum*, essas novas espécies podem aumentar a resistência aos antimicrobianos de populações mistas onde estão envolvidas, o que mostra que mais estudos precisam ser realizados para o melhor entendimento da complexidade das interações polimicrobianas (Lopes *et al.*, 2012).

## 2. JUSTIFICATIVA

Como mencionado, a FC é uma doença genética de grande importância devido a sua incidência e sintomas que oferecem um risco à vida dos pacientes. Diversas manifestações clínicas podem ser ocasionadas pela FC, porém, aquelas envolvendo o trato respiratório são as mais preocupantes da doença. A deficiência no gene que codifica a proteína CFTR causa um desequilíbrio nos fluidos dos pacientes o que pode gerar uma obstrução pulmonar, assim como oferece um local propício à colonização por microrganismos.

Normalmente os microrganismos são encontrados formando comunidades microbianas, seja no ambiente ou em um hospedeiro animal, e infecções polimicrobianas são usualmente observadas em pacientes com fibrose cística. A interação entre bactérias e fungos neste contexto pode alterar a capacidade de colonização, a quantidade de fatores de virulência, além de poder aumentar a resistência dos microrganismos quando comparado com suas contrapartes monomicrobianas. Esse fato se dá principalmente pelo estabelecimento de biofilmes mistos, o que em conjunto vai favorecer para um pior prognóstico do paciente, gerando infecções mais difíceis de serem tratadas.

As espécies dos gêneros *Scedosporium/Lomentospora* estão dentre os fungos filamentosos mais isolados dos pulmões de pacientes de FC, ocupando normalmente o segundo lugar na prevalência fúngica. Estes microrganismos podem causar um espectro de infecções que geralmente são difíceis de tratar pela limitada disponibilidade de terapias fúngicas eficientes em seu combate. Ao mesmo tempo, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. cepacia* estão dentre os patógenos clássicos de pacientes de FC, enquanto *E. coli* representa um agente que tem uma alta prevalência no trato gastrointestinal, assim como consegue colonizar o trato respiratório, podendo causar em ambos os sítios infecções. Essas bactérias também representam um risco para manutenção da saúde dos indivíduos portadores de CF devido ao seu vasto arsenal de fatores de virulência, assim como pela alta resistência frequentemente observada.

Dessa forma, a investigação das interações entre estes microrganismos de diferentes domínios pode contribuir para uma melhor compreensão das infecções que ocasionam em pacientes com FC, e o estudo do papel da PRM, uma molécula tão importante para a virulência de fungos do gênero *Scedosporium*, nessas interações irá auxiliar no entendimento da atuação da mesma nas atividades biológicas decorrentes das infecções mistas.

### 3. OBJETIVOS

Avaliar as interações polimicrobianas entre espécies dos gêneros fúngicos *Scedosporium/Lomentospora* e bactérias de relevância clínica na fibrose cística, assim como o papel das peptidoramnomanas (PRMs) desses fungos nessas interações.

#### 3.1. Objetivos específicos

- (1) Avaliar a concentração mínima inibitória (CMI) e a concentração mínima microbica (CMM) da PRM de espécies de *Scedosporium* e de *Lomentospora prolificans* contra quatro espécies bacterianas;
- (2) Verificar a ação das PRMs de *Scedosporium/Lomentospora* frente ao biofilme bacteriano;
- (3) Investigar os efeitos da PRM fúngica na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelas células bacterianas e no potencial e integridade de membrana;
- (4) Estabelecer um modelo de biofilme misto entre espécies de *Scedosporium*, sendo elas *S. boydii* e *S. apiospermum*, com a espécie bacteriana MRSA.

### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1. Microrganismos e condições de cultivo

Foram selecionadas para o trabalho as cepas bacterianas *B. cepacia* (American Type Culture Collection ATCC 25416), *E. coli* (ATCC 11229), *S. aureus* resistente à metilina - MRSA (ATCC 9393) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853). Estas são mantidas como estoque em meio caldo Luria-Bertani (LB) (peptona 10g / l, extrato de levedura 5g / l NaCl 5g / l) sob refrigeração a 4°C. Para utilização nos experimentos, uma alíquota de cada cepa foi inoculada em ágar Brain-

Heart Infusion (BHI) e incubada por 24h a 37°C. Posteriormente foi realizada a raspagem das colônias, e inserção destas em tubo Falcon com o meio a ser utilizado no experimento. Uma alíquota da suspensão bacteriana foi então inserida em placa de 96 poços que foi lida em espectrofotômetro para a padronização da quantidade de células, sendo preparadas para uma turbidez equivalente a 0,5 na escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/ml).

Em relação aos fungos, utilizamos as seguintes espécies: *L. prolificans* (cepa FMR3569), *S. apiospermum* (cepa RK107-0417) e *S. aurantiacum* (cepa IHEM21147), que foram fornecidos pelo Dr. J. Guarro, Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina e Institut d'Estudis Avançats, Réus, Espanha. *S. boydii* (cepa HLPB) foi fornecida pelo Dr. Bodo Wanke, Hospital Evandro Chagas, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. As cepas são mantidas à temperatura ambiente em amostras de ágar Sabouraud (SAB; 2% glicose, 1% peptona, 0,5% extrato de levedura) como cultura estoque. Os micélios foram obtidos cultivando células em meio de cultura líquida SAB durante sete dias à temperatura ambiente com agitação. A fim de obter os conídios, uma alíquota do crescimento fúngico foi transferida para placas de Petri com meio Sabouraud sólido, e estas foram incubadas por 7 dias antes da realização dos experimentos à temperatura ambiente. As placas com o crescimento foram então raspadas utilizando PBS e, posteriormente o líquido foi filtrado e centrifugado. Os conídios fúngicos depositados no fundo do recipiente para centrifugação foram então diluídos e uma alíquota de 10µl foi transferida para uma câmara de Neubauer para contagem e ajuste das células para quantidade desejada.

#### 4.2. Extração e purificação da peptidoramnanana (PRM)

A glicoproteína bruta foi extraída do micélio de *L. prolificans*, *S. apiospermum*, *S. boydii* e *S. aurantiacum* com tampão fosfato de sódio 0,05M, pH 7,2, a 100°C sob refluxo por 2h. Após centrifugação a 5000g por 15min, o sobrenadante foi coletado e concentrado em evaporador rotatório à vácuo a um volume de 100 ml e precipitado com 3 volumes de etanol, durante a noite a 4°C. O precipitado foi dissolvido em água destilada e dialisado contra a mesma por 48h. A solução foi então liofilizada, resultando nos peptidopolissacarídeos brutos. As peptidoramnanas foram purificadas por fracionamento com brometo de hexadeciltrimetilamônio (Cetavlon, Merck, Darmstadt, Alemanha) (Barreto-Bergter *et al.*, 2008).



### 4.3. Determinação da CMI e CMM

Os testes para determinação da concentração inibitória mínima (CMI) da PRM de *S. apiospermum*, *S. boydii* e *S. aurantiacum* e *L. prolificans* foram realizados pelo método de microdiluição em caldo LB contra as bactérias MRSA, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *B. cepacia* (Vieira *et al.*, 2018). Foram utilizadas placas de 96 poços nos experimentos e o CMI foi estabelecido como a menor concentração capaz de inibir 50% do crescimento bacteriano. Para tal, são adicionados 100µl da PRM diluída em meio LB no primeiro poço, sendo realizada então uma diluição seriada com concentrações variando entre 500 µg/ml e 1,95 µg/ml em cada poço. Com relação às bactérias, elas foram padronizadas como mencionado anteriormente, para  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml, e 50 µl das suspensões bacterianas foram adicionadas em cada poço, além de serem acrescentados também 100µl do meio LB, e as placas foram incubadas a 37°C por 24h. Uma solução de estreptomicina/penicilina foi usada como composto antimicrobiano de referência (8 – 0,015 µg/ml) e culturas em caldo LB sem antibióticos foram empregadas como controle. Após a incubação, a absorbância foi lida em um espectrofotômetro a 660nm (Vieira *et al.*, 2018). Após a avaliação da CMI, uma alíquota de 10µl de cada concentração de PRM foi retirada dos poços e colocada em uma placa de Petri com meio BHI sólido para a verificação da concentração mínima microbicida (CMM) da PRM das espécies fúngicas. As placas foram incubadas a 37°C por 24h e então foi avaliado se houve ou não o crescimento bacteriano. Os valores de CMM foram definidos como a menor concentração de PRM capaz de impedir o crescimento bacteriano em meio de cultura sólido.

### 4.4. Ensaio de biofilme

#### 4.4.1. Inibição da formação de biofilme

Para avaliar a atividade inibitória das PRMs na formação de biofilmes bacterianos, as bactérias foram crescidas 24h antes da realização do experimento, como mencionado anteriormente e, após a incubação, o crescimento bacteriano foi transferido para um tubo Falcon com meio TSB + 1% glicose. A padronização da suspensão bacteriana foi feita como mencionado no item anterior, sendo transferidos 50µl da solução bacteriana ( $1,5 \times 10^8$  UFC/ml) para placas de

96 poços. Além disso, também foram introduzidas nas placas as PRMs nas concentrações de  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$  e 1x CMI. As placas foram então incubadas por 24h à 37°C e depois cuidadosamente lavadas com PBS para retirada das células planctônicas. As placas foram secas à temperatura ambiente por 10min, sendo os poços posteriormente corados com 0,5% de cristal violeta por 10min, para observação da biomassa total do biofilme, ou com 1% de safranina, para verificação da matriz extracelular. Os biofilmes foram lavados três vezes com PBS estéril para a remoção dos corantes. O cristal violeta impregnado no biofilme foi dissolvido em 200 $\mu$ l de etanol (95%, v/v) e a solução colorida foi lida a uma absorbância de 595nm usando um espectrofotômetro (Spectra MAX 340 Tunable; Molecular Devices Ltd., San Jose, CA, EUA). A safranina foi dissolvida em água (100 $\mu$ l) e a absorbância lida a 492nm.

#### 4.4.2. Inibição do biofilme maduro pré-formado

Os biofilmes bacterianos, estabelecidos para avaliação da atividade inibitória das PRMs em biofilmes pré-formados, foram preparados conforme descrito no item anterior. Após a incubação do biofilme bacteriano por 24h a 37°C, o sobrenadante foi removido e  $\frac{1}{2}$ , 1 e 2x CMIs de cada PRM foram adicionados. As placas foram então incubadas por 24h à 37°C, e o biofilme foi lavado suavemente com PBS, sendo posteriormente realizada a coloração com violeta de cristal e safranina como descrito anteriormente.

#### 4.5. Efeito da PRM no estresse oxidativo e no potencial e integridade de membrana

Para avaliar o efeito das PRMs no estresse oxidativo e na integridade e potencial da membrana, as células bacterianas ( $1,5 \times 10^8$  UFC/ml) foram cultivadas em caldo LB na presença de  $\frac{1}{4}$  CMI de todas as quatro PRMs por 24h a 37°C. Posteriormente, foram adicionados os marcadores fluorescentes a seguir: DCFDA (2', 7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato), para avaliar o estresse oxidativo (produção de ROS); Vermelho do Nilo (Sigma-Aldrich, MO, EUA), para avaliar a integridade de membrana; e JC-1 (5,5', 6,6'-tetracloro-1,1', 3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina iodeto) (Sigma-Aldrich, MO, EUA), para avaliar o potencial de membrana (Ullrich *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2007; Acker *et al.*, 2016). A marcação

com DCFDA foi realizada em uma concentração final de 10mM em PBS por 45min em temperatura ambiente no escuro. Após a lavagem com PBS, a fluorescência (excitação = 485 nm, emissão = 535 nm) foi medida usando um fluorímetro SpectraMax (Acker *et al.*, 2016). A marcação com vermelho do Nilo, a uma concentração final de 8 µg/ml foi realizada durante 45 min à temperatura ambiente no escuro. Após lavagem com PBS, a fluorescência (excitação = 550 nm, emissão = 635 nm) foi medida como descrito acima (Pereira *et al.*, 2007). A marcação com JC-1 foi usada na concentração de 2,5 µg/ml em PBS 0,01M, pH 7,2, durante 45min a 37°C no escuro. Após a lavagem com PBS, a fluorescência (excitação = 515 nm, emissão = 529 nm (verde) e 590 nm (vermelho)) foi medida como descrito acima (Ullrich *et al.*, 2003). O potencial de membrana foi determinado pela razão da intensidade de fluorescência vermelho/verde.

#### 4.6. Estabelecimento de biofilme misto

Para o estabelecimento do biofilme misto selecionamos *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) devido a sua prevalência entre as espécies bacterianas mais isoladas na FC, assim como foram escolhidas as espécies *S. boydii* e *S. apiospermum* por serem as espécies de *Scedosporium* de maior relevância na doença (Ciofu *et al.*, 2013; Lyczak *et al.*, 2002; Vandeplassche *et al.*, 2019; REBRACF, 2019; Hirschhausen *et al.*, 2013; Engel *et al.*, 2018; Bouchara *et al.*, 2019). Além disso, o biofilme foi estabelecido no meio sintético de fibrose cística (SCFM) que simula o ambiente das vias aéreas dos pacientes com FC, para tal, o meio foi elaborado de acordo com Deschamps *et al.* (2020).

Para realização do experimento, foram utilizadas diferentes concentrações dos fungos para composição do biofilme misto, sendo elas  $1 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$ . Uma alíquota de 100µl do crescimento fúngico nessas concentrações foi inserida em uma placa de 96 poços que foi incubada à 37°C por 18h. Após a incubação para formação de uma monocamada micelial fortemente aderida aos poços, 3 lavagens com PBS foram realizadas para a remoção das células não aderidas. Posteriormente foram introduzidas em cada poço diferentes concentrações ( $1 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$ ) da bactéria, além de 100µl do meio SCFM. Em seguida, 24 ou 48h após a incubação dos microrganismos, os poços foram lavados novamente, 3x com PBS, e então os poços foram corados com cristal violeta ou safranina, como mencionado anteriormente, e então foi lida a absorbância em 595 e 492nm, respectivamente. Além disso, também foi realizada a avaliação da

viabilidade celular utilizando 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida (XTT). O XTT foi preparado utilizando 400µl de XTT (0,5mg/ml), 200µl de menadiona e 1,4ml de PBS e posteriormente, 54µl foram adicionados nos poços e, após incubação por 2h, a absorbância tem a leitura em 490nm. Ademais, avaliamos as Unidades Formadoras de Colônias (UFC) para quantificar o crescimento fúngico ou bacteriano após o cultivo misto. Para observar o crescimento fúngico, placas com meio Sabouraud foram acrescidas de estreptomicina/penicilina e uma alíquota de 100µl dos poços de crescimento misto foi inserida nas placas de Petri. Já para avaliar o crescimento bacteriano, o antifúngico posaconazol foi inserido nas placas de BHI com posterior introdução de uma alíquota dos poços com crescimento polimicrobiano. Após o tempo de incubação de 48 ou 72h a 37 °C, as placas foram contadas para a determinação das UFCs.

#### 4.7. Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). Uma ANOVA de duas vias de variância foi realizada usando os testes de comparação de Turkey e Bonferroni para avaliar a formação de biofilme e a inibição de biofilme pré-formado.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Isolamento e purificação de PRMs de espécies de *Scedosporium/Lomentospora*

As PRMs de *L. prolificans*, *S. apiospermum*, *S. boydii* e *S. aurantiacum* foram purificadas a partir das glicoproteínas brutas por fracionamento com brometo de hexadeciltrimetilamônio (CETAVLON). Essas moléculas já foram extraídas e caracterizadas em diferentes trabalhos e suas informações estão presentes na **Tabela 1**.

**Tabela 1** – Características das PRMs de *L. prolificans*, *S. boydii*, *S. apiospermum* e *S. aurantiacum*.

<b>Espécie/PRM</b>	<b>Proteínas</b>	<b>Monossacarídeos</b>	<b>Referência</b>
<i>Lomentospora prolificans</i>	35%	Rha, Ara, Man, Gal, Glc e GlcNH <sub>2</sub>	Barreto-Bergter <i>et al.</i> , 2008
<i>Scedosporium boydii</i>	15%	Ram, Ara, Man, Gal, e GlcNH <sub>2</sub>	Pinto <i>et al.</i> , 2001 Gorin, <i>et al.</i> , 2009
<i>Scedosporium apiospermum</i>	37%	Rha, Rib, Ara, Man, Gal, Glc e GlcNH <sub>2</sub>	Barreto-Bergter <i>et al.</i> , 2011
<i>Scedosporium aurantiacum</i>	23-25%	Ram, Man, Gal e Glc	De Meirelles <i>et al.</i> , 2020

## 5.2. Influência da PRM no crescimento bacteriano

A concentração inibitória mínima (CMI) das PRMs de *L. prolificans*, *S. apiospermum*, *S. boydii* e *S. aurantiacum* foi estabelecida pelo método de microdiluição em caldo LB contra as espécies bacterianas *B. cepacia*, *P. aeruginosa*, MRSA e *E. coli*, de acordo com Vieira *et al.* (2018). Para os testes foram empregadas as PRMS em concentrações finais variando de 500 µg/ml a 1,95 µg/ml, sendo a CMI definida como a menor concentração capaz de inibir 50% do crescimento bacteriano.

Com a PRM de *L. prolificans* foi observada a CMI de 31.3, > 500, 15.6 e 500 µg/ml para *B. cepacia*, *P. aeruginosa*, MRSA e *E. coli*, respectivamente. No caso da PRM de *S. apiospermum*, os valores de CMI foram consideravelmente mais altos, sendo eles 500 µg/ml para *B. cepacia* e MRSA, e > 500 µg/ml para *P. aeruginosa* e *E. coli*. A PRM de *S. boydii* apresentou CMI de 125 µg/ml para *B. cepacia*, 250 µg/ml para MRSA e >500 µg/ml para *P. aeruginosa* e *E. coli*. A PRM de *S. aurantiacum* teve como CMI para *B. cepacia* e MRSA 125 µg/ml e para *P. aeruginosa* e *E. coli* >500 µg/ml. Os resultados de CMI podem ser observados no **Tabela 2**.

Uma vez determinados os valores de CMI, a concentração mínima microbicida (CMM) foi avaliada através da introdução de uma alíquota de cada uma das concentrações de PRM, com as espécies bacterianas, em placas de Petri com meio BHI.

Assim, foram obtidos como valores do CMM para a PRM de *L. prolificans*, 31.3 µg/ml para *B. cepacia* e MRSA e >500 µg/ml para *P. aeruginosa* e *E. coli*. A PRM de *S. boydii* teve como CMM 125 µg/ml para MRSA, 500 µg/ml para *B. cepacia* e > 500 µg/ml para *P. aeruginosa* e *E. coli*. No caso da PRM de *S. apiospermum* e *S. aurantiacum*, foi obtido uma CMM de > 500 µg/ml para todas as bactérias testadas. Estes resultados podem ser observados na **Tabela 2** e na **Figura 4**.

**Tabela 2.** Concentração Mínima Inibitória e Concentração Mínima Microbicida das PRMs de *L. prolificans*, *S. apiospermum*, *S. boydii* e *S. aurantiacum* frente a *B. cepacia*, *P. aeruginosa*, MRSA e *E. coli*.

	PRM (µg/mL)							
	<i>L. prolificans</i>		<i>S. apiospermum</i>		<i>S. boydii</i>		<i>S. aurantiacum</i>	
	CMI <sub>50</sub>	CMM	CMI <sub>50</sub>	CMM	CMI <sub>50</sub>	CMM	CMI <sub>50</sub>	CMM
<i>B. cepacia</i>	31.3	31.3	500	> 500	125	500	125	> 500
<i>P. aeruginosa</i>	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
MRSA	15.6	31.3	500	> 500	125	250	125	> 500
<i>E. coli</i>	500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500

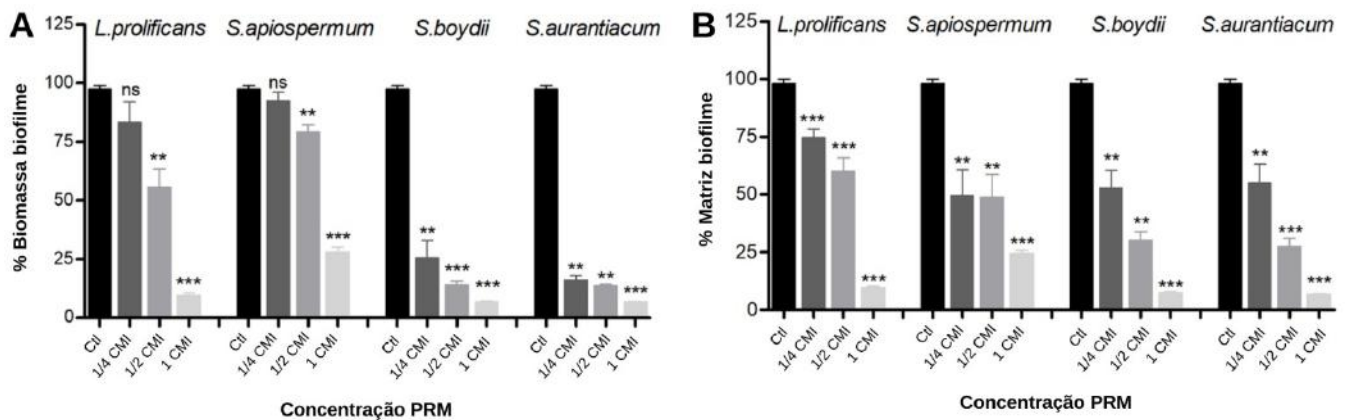


**Figura 4.** Crescimento das bactérias *B. cepacia*, *P. aeruginosa*, MRSA e *E. coli* na presença das PRMs, extraídas de *L. prolificans*, *S. apiospermum*, *S. boydii* e *S. aurantiacum*, em uma concentração variando entre 500µg/ml a 1,95µg/ml. Esses dados foram usados para determinar a concentração mínima microbicida.

### 5.3. Efeito da PRM na formação de biofilme bacteriano

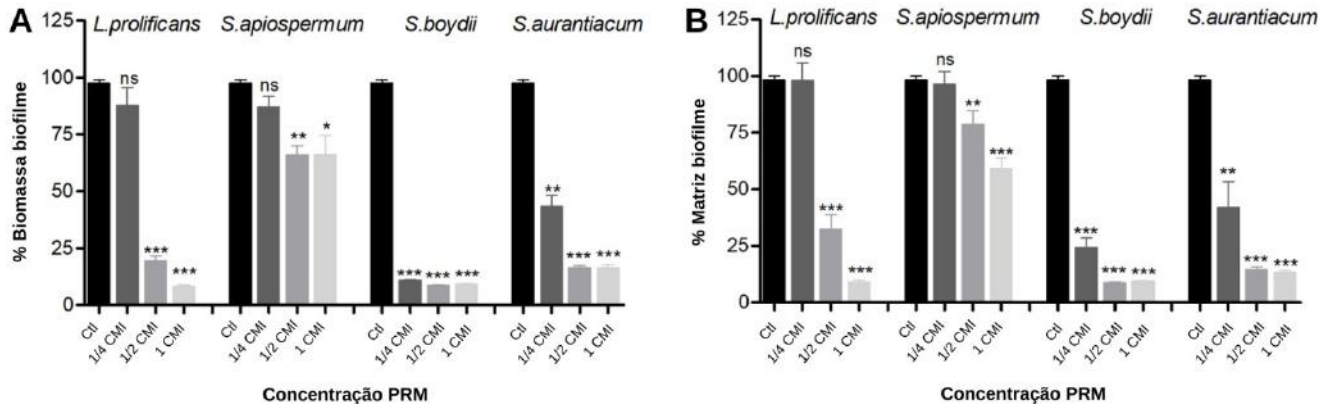
Devido à maior susceptibilidade às PRMs observada em *B. cepacia* e MRSA, essas espécies foram selecionadas para avaliar se as PRMs fúngicas também poderiam afetar a formação de biofilme bacteriano. As PRMs foram usadas nas concentrações de 1x CMI, 1/2 CMI e 1/4 CMI, referentes a cada espécie bacteriana. Para esta análise foram empregados cristal violeta e safranina, possibilitando avaliar a biomassa total do biofilme e a matriz extracelular, respectivamente.

Na avaliação de *B. cepacia*, as PRMs de *L. prolificans* e *S. apiospermum* inibiram a biomassa total do biofilme na concentração de ½ e 1x CMI. Já as PRMs de *S. boydii* e *S. aurantiacum* mostraram uma ação inibitória em todas as concentrações testadas. Com relação à matriz extracelular, todas as PRMs resultaram na redução da matriz nas três concentrações testadas (1x CMI, ½ CMI e ¼ CMI). Estes resultados podem ser observados na **Figura 5**.



**Figura 5.** Avaliação da atividade das PRMs de *L. prolificans*, *S. apiospermum*, *S. boydii* e *S. aurantiacum* na biomassa total e matriz extracelular do biofilme de *B. cepacia*. (A) representa a avaliação do crescimento do biofilme. (B) mostra a matriz extracelular. Ctl, retrata o controle sem adição de PRM. ¼ CMI, ½ CMI e 1x CMI foram baseados nos valores mostrados na Tabela 2. Os valores representam a média ± S.D. de três experiências independentes realizadas em triplicata. Asteriscos denotam valores estatisticamente diferentes do controle. \**p* < 0,05; \*\**p* < 0,01; \*\*\**p* < 0,001. ns, não significativo.

Na avaliação da biomassa do biofilme de MRSA, resultados semelhantes aos observados em *B. cepacia* foram obtidos. Já no caso da matriz extracelular, as PRMs de *L. prolificans* e *S. apiospermum* foram capazes de reduzi-la nas concentrações de ½ CMI e 1x CMI, enquanto as PRMs de *S. boydii* e *S. aurantiacum* inibiram em todas as concentrações testadas (**Figura 6**).



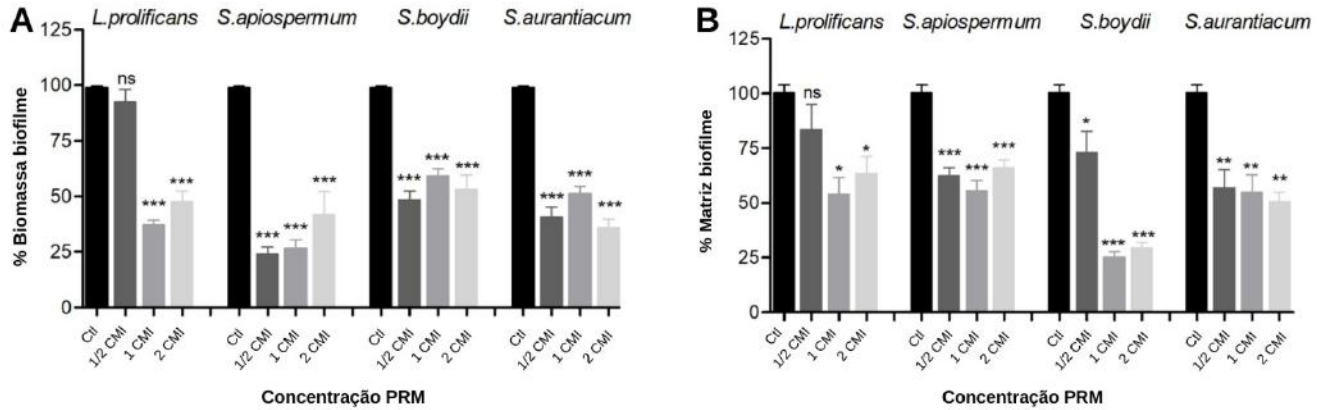
**Figura 6.** Avaliação da atividade das PRMs de *L. prolificans*, *S. apiospermum*, *S. boydii* e *S. aurantiacum* na biomassa total e matriz extracelular do biofilme de MRSA. (A) representa a avaliação do crescimento do biofilme. (B) mostra a matriz extracelular. Ctl, retrata o controle sem adição de PRM. ¼ CMI, ½ CMI e 1x CMI foram baseados nos valores mostrados na **Tabela 2**. Os valores representam a média ± S.D. de três experiências independentes realizadas em triplicata. Asteriscos denotam valores estatisticamente diferentes do controle. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . ns, não significativo.

#### 5.4. Efeito da PRM em biofilme maduro pré-formado bacteriano

Considerando o potencial inibitório das PRMs fúngicas observado no crescimento bacteriano e na formação do biofilme, verificamos o efeito dessas moléculas contra biofilmes maduros pré-formados. Novamente foram selecionadas as espécies *B. cepacia* e MRSA para realização dos testes, nos quais também foram empregadas as concentrações ½ CMI, 1 CMI e 2 CMI.

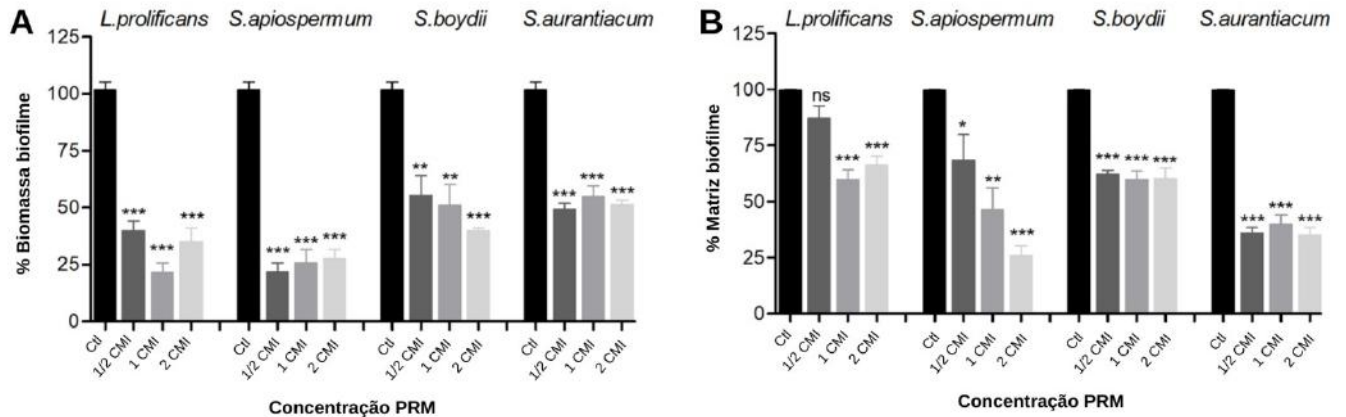
A PRM de *L. prolificans* foi capaz de reduzir a biomassa pré-formada e a matriz extracelular de *B. cepacia* em 1x CMI e ½ CMI, enquanto as PRMs de *S. apiospermum*, *S. boydii* e *S. aurantiacum* geraram uma redução em todas as concentrações testadas (**Figura 7**).





**Figura 7.** Avaliação da atividade das PRMs de *L. prolificans*, *S. apiospermum*, *S. boydii* e *S. aurantiacum* na biomassa total e matriz extracelular do biofilme maduro pré-formado de *B. cepacia*. (A) representa a avaliação do crescimento do biofilme. (B) mostra a matriz extracelular. Ctl, retrata o controle sem adição de PRM. 1/2 CMI, 1x CMI e 2 CMI foram baseados nos valores mostrados na **Tabela 2**. Os valores representam a média  $\pm$  S.D. de três experiências independentes realizadas em triplicata. Asteriscos denotam valores estatisticamente diferentes do controle. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . ns, não significativo.

Na avaliação do biofilme de MRSA pré-formado, foram obtidos resultados similares, com as PRMs de *S. apiospermum*, *S. boydii* e *S. aurantiacum* sendo capazes de reduzir a biomassa pré-formada e a matriz extracelular do biofilme bacteriano, enquanto a PRM de *L. prolificans* ocasionou uma diminuição na biomassa, mas não na matriz extracelular (**Figura 8**).



**Figura 8.** Avaliação da atividade das PRMs de *L. prolificans*, *S. apiospermum*, *S. boydii* e *S. aurantiacum* na biomassa total e matriz extracelular do biofilme maduro pré-formado de MRSA. (A) representa a avaliação do crescimento do biofilme. (B) mostra a matriz extracelular. Ctl, retrata o controle sem adição de PRM. ½ CMI, 1x CMI e 2 CMI foram baseados nos valores mostrados na **Tabela 2**. Os valores representam a média ± S.D. de três experiências independentes realizadas em triplicata. Asteriscos denotam valores estatisticamente diferentes do controle. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . ns, não significativo.

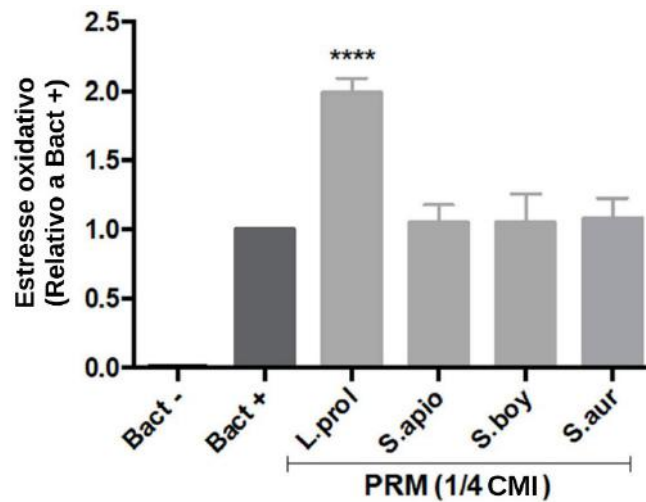
Esses resultados sugerem que as PRMs fúngicas afetam não apenas o crescimento bacteriano e o processo de formação do biofilme, mas também os biofilmes bacterianos pré-formados.

### 5.5. Atuação da PRM no estresse oxidativo e no potencial e integridade de membrana de *Burkholderia cepacia*

Para um melhor entendimento do mecanismo de ação das PRMs frente às bactérias, o estresse oxidativo nas células bacterianas foi avaliado, bem como a integridade e o potencial de membrana. A espécie *B. cepacia* foi selecionada como modelo representativo devido aos resultados obtidos nas etapas anteriores e pela sua relevância em pacientes com FC com pior prognóstico.

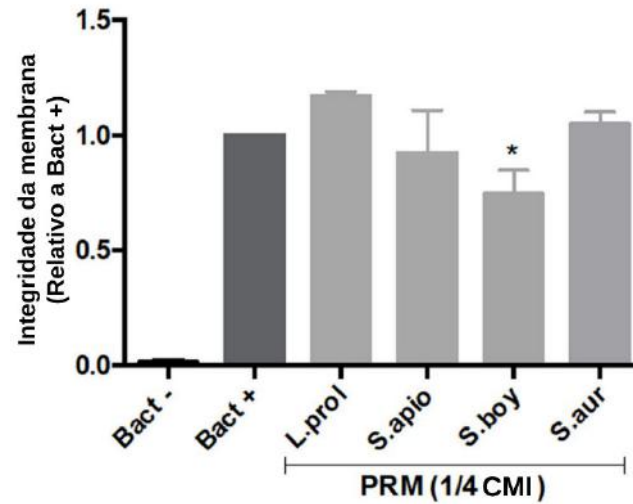
O estresse oxidativo foi avaliado pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), utilizando o marcador DCFDA. DCFDA é oxidado por ROS dentro das células para formar 2', 7'-diclorofluoresceína (DCF), uma molécula fluorescente. Foi observado então que a PRM de *L. prolificans* foi a única molécula capaz de aumentar a produção de ROS, indicando sua atuação na

indução de estresse oxidativo em *B. cepacia*. As demais PRMs não influenciaram na produção de ROS quando comparadas ao controle (**Figura 9**).



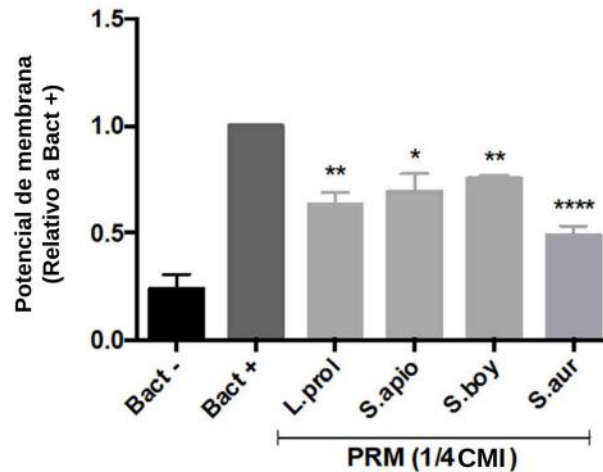
**Figura 9.** Avaliação da atividade das PRMs de *L. prolificans*, *S. apiospermum*, *S. boydii* e *S. aurantiacum* no estresse oxidativo pela produção de ROS por *B. cepacia*. Bact -, controle sem marcador. Bact +, células com marcador na ausência de PRM. *L. prol*, *L. prolificans*. *S. apio*, *S. apiospermum*. *S. boy*, *S. boydii*. *S. aur*, *S. aurantiacum*. ¼ CMI foi baseado nos valores mostrados no Quadro 1. Os valores representam a média ± S.D. de três experiências independentes realizadas em triplicata. Asteriscos denotam valores estatisticamente diferentes do controle. \*\*\*\* $p < 0,001$ .

O comprometimento da integridade de membrana é um mecanismo pelo qual muitos compostos causam a morte celular. Assim, foi utilizado o marcador Vermelho do Nilo que se liga a polihidroxialcanoatos (PHAs), compostos procarióticos comuns de armazenamento de carbono e energia presentes em gotículas lipídicas intracelulares, para observar se as PRMs estavam causando uma inibição por esse mecanismo (Jendrossek, 2009). Como resultados, a PRM de *S. boydii* diminuiu a intensidade de fluorescência do Vermelho do Nilo, sugerindo um impacto na integridade lipídica em *B. cepacia*, enquanto as outras PRMs não alteraram os lipídios bacterianos quando comparados ao controle (**Figura 10**).



**Figura 10.** Efeito das PRMs de *L. prolificans*, *S. apiospermum*, *S. boydii* e *S. aurantiacum* na integridade da membrana de *B. cepacia*. Bact -, controle sem marcador. Bact +, células com marcador na ausência de PRM. *L. prol*, *L. prolificans*. *S. apio*, *S. apiospermum*. *S. boy*, *S. boydii*. *S. aur*, *S. aurantiacum*. ¼ CMI foi baseado nos valores mostrados no Quadro 1. Os valores representam a média ± S.D. de três experiências independentes realizadas em triplicata. Asteriscos denotam valores estatisticamente diferentes do controle. \* $p < 0,05$ .

A redução da geração de energia como consequência da morte celular pode ser medida avaliando o potencial de membrana usando o marcador JC-1. Todas as PRMs fúngicas testadas causaram uma diminuição no potencial de membrana em comparação com o controle (células não tratadas), indicando que as PRMs induzem uma menor polarização da membrana em *B. cepacia* (Figura 11).



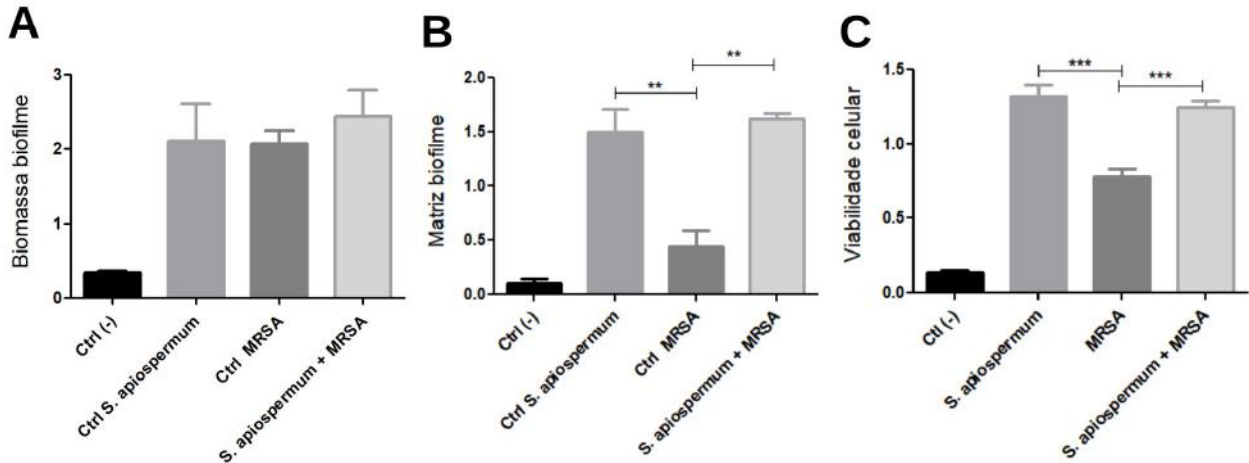
**Figura 11.** Efeito das PRMs de *L. prolificans*, *S. apiospermum*, *S. boydii* e *S. aurantiacum* no potencial de membrana de *B. cepacia*. Bact -, controle sem marcador. Bact +, células com marcador na ausência de PRM. *L. prol*, *L. prolificans*. *S. apio*, *S. apiospermum*. *S. boy*, *S. boydii*. *S. aur*, *S. aurantiacum*. ¼ CMI foi baseado nos valores mostrados no Quadro 1. Os valores representam a média  $\pm$  S.D. de três experiências independentes realizadas em triplicata. Asteriscos denotam valores estatisticamente diferentes do controle. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,001$ .

## 5.6. Formação de biofilme misto bactéria-fungo

Nas metodologias anteriores, a interação entre espécies bacterianas relevantes da FC e *Scedosporium* foi estudada através da PRM extraída deste. Considerando que o estabelecimento de biofilmes mistos *in vitro* ainda é um assunto pouco explorado na literatura, mas de extrema importância para o entendimento da clínica, visamos desenvolver um modelo de biofilme misto entre MRSA e duas espécies fúngicas *S. apiospermum* e *S. boydii*. Os microrganismos foram selecionados por conta do predomínio observado em pacientes de FC.

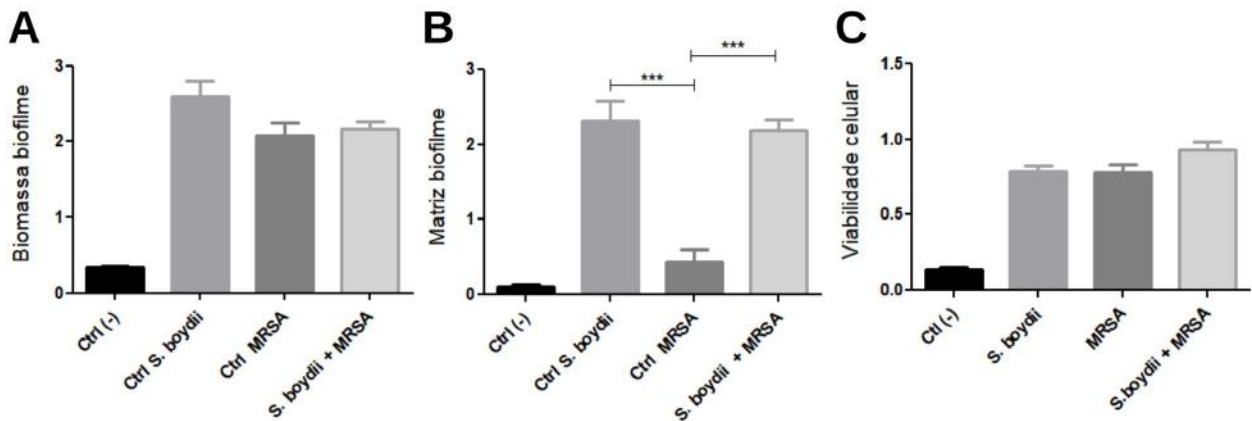
Inicialmente avaliamos os biofilmes mistos através dos ensaios de cristal violeta e safranina, para observação da biomassa total e matriz extracelular, respectivamente, assim como observamos a viabilidade celular utilizando XTT. No caso do biofilme misto entre MRSA e *S. apiospermum*, não foi possível observar diferenças na biomassa total do crescimento misto quando comparado com os controles da bactéria e do fungo. Enquanto isso, no biofilme misto, a matriz extracelular apresentou valores semelhantes ao controle de *S. apiospermum*, mas o controle do biofilme bacteriano teve uma menor produção de matriz. Com relação aos resultados obtidos com o XTT, tanto os controles do fungo e bactéria quanto no biofilme misto pode ser verificado que as células microbianas estavam viáveis. Além disso, não foi possível constatar

uma diferença no crescimento de *S. apiospermum* quando comparado com o biofilme misto, mas foi detectada essa diferença na comparação entre MRSA e o crescimento misto (**Figura 12**).



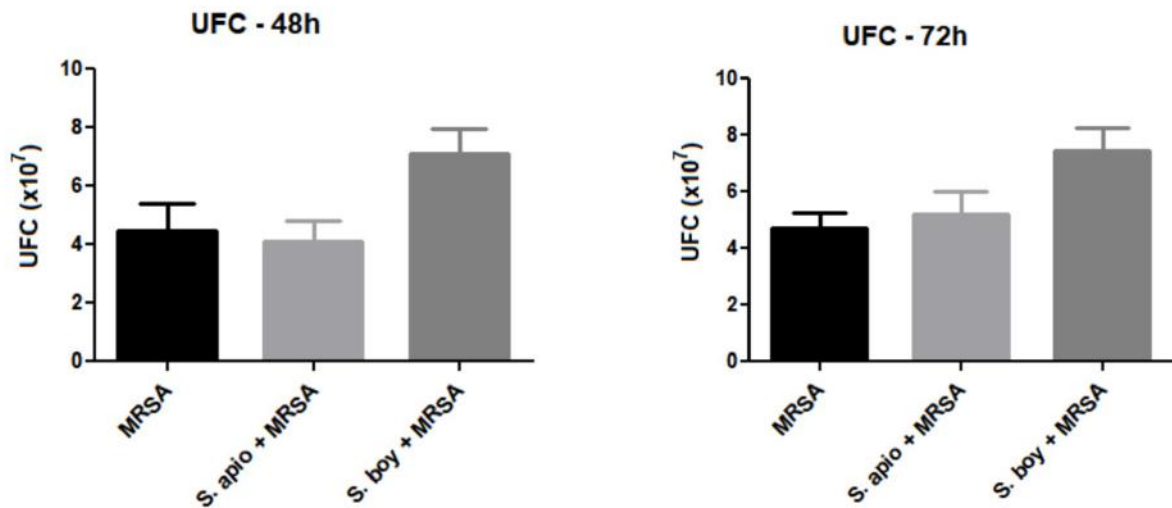
**Figura 12.** Avaliação da biomassa, matriz extracelular e viabilidade celular do biofilme misto entre MRSA e *S. apiospermum*. (A) representa a avaliação do crescimento do biofilme. (B) mostra a matriz extracelular. (C) demonstra a viabilidade celular pelo XTT. Ctrl (-), retrata o controle sem crescimento microbiano. Os valores representam a média  $\pm$  S.D. de três experiências independentes realizadas em triplicata. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

No biofilme misto entre MRSA e *S. boydii*, também não foram constatadas diferenças estatísticas na biomassa dos biofilmes de *S. boydii* e MRSA quando comparadas com o biofilme misto, assim como não foram observadas diferenças no XTT dos controles quando comparado com o biofilme misto, mas pode ser verificada a viabilidade celular do crescimento dos microrganismos utilizados. Já quando a matriz extracelular foi avaliada, não houve divergências comparando os valores do controle de *S. boydii* com o biofilme misto, mas o controle do biofilme bacteriano teve uma menor produção de matriz em comparação com o crescimento misto (**Figura 13**).



**Figura 13.** Avaliação da biomassa, matriz extracelular e viabilidade celular do biofilme misto entre MRSA e *S. boydii*. (A) representa a avaliação do crescimento do biofilme. (B) mostra a matriz extracelular. (C) demonstra a viabilidade celular pelo XTT. Ctl (-), retrata o controle sem crescimento microbiano. Os valores representam a média  $\pm$  S.D. de três experiências independentes realizadas em triplicata. \*\*\* $p < 0,001$ .

Visando a quantificação do crescimento bacteriano e fúngico nesse contexto de biofilme misto avaliamos as Unidades Formadoras de Colônias (UFC) provenientes do crescimento misto. Para tal, em um meio Sabouraud acrescido de penicilina/estreptomicina realizamos a contagem de UFC de *S. boydii* e *S. apiospermum*, enquanto no meio BHI acrescido de posaconazol realizamos a contagem de UFC de MRSA. O biofilme foi estabelecido em placas de 96 poços e após o crescimento dessas comunidades, foram realizadas diluições  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  das quais foram retiradas alíquotas de 100 $\mu$ l para serem inoculadas em placas de Petri com Sabouraud ou BHI. O crescimento bacteriano e fúngico nas placas foi observado em 24, 48 e 72 horas. Resultados preliminares mostraram que em nenhum dos tempos estabelecidos foi possível observar o crescimento fúngico. Com relação ao crescimento de MRSA, apesar de com 24h não terem sido observadas UFCs, foi possível a quantificação em 48h e 72h (**Figura 14**).



**Figura 14.** Avaliação das unidades formadoras de colônia de MRSA crescidas em biofilme misto com *S. apiospermum* e *S. boydii*. (A) contagem de UFC em 48h. (B) contagem de UFC em 72h. *S. apio*, *S. apiospermum*. *S. boy*, *S. boydii*.

Não puderam ser obtidos resultados conclusivos com a metodologia utilizada, mas aparentemente MRSA tem uma tendência a apresentar um maior crescimento na presença dos fungos, mas não foram observadas diferenças estatísticas.

## 6. DISCUSSÃO

Pacientes com fibrose cística apresentam diferentes manifestações clínicas como consequência da mutação no CFTR, como doenças hepáticas e distúrbios do trato gastrointestinal. No entanto, a principal complicação está relacionada a uma redução da depuração de muco dos pulmões, o que leva a infecções crônicas causadas por bactérias e fungos, sendo a principal causa de mortalidade (Colombo, 2007; Lipuma, 2010; Cohen e Prince, 2012; De Lisle e Borowitz, 2013).

As bactérias desempenham um papel importante nos pulmões de pacientes com FC. Geralmente são os primeiros microrganismos a colonizar este local e são a causa de uma resposta inflamatória exacerbada comum observada no trato respiratório. Guss *et al.* (2011) identificaram oito filos bacterianos, incluindo mais de 60 gêneros, em pulmões de pacientes com FC, evidenciando assim a diversidade desta comunidade microbiana. No entanto, como mencionado



anteriormente, existem algumas espécies mais prevalentes colonizando o trato pulmonar na FC, como *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *B. cepacia*. A presença de *B. cepacia* é considerada uma ameaça para indivíduos com FC, devido à sua alta transmissibilidade de paciente para paciente e resistência a antibióticos, além de pior prognóstico do desfecho da doença, podendo impedir até mesmo a aceitação de pacientes em programas de transplante de órgãos (Chaparro *et al.*, 2001; Kenna *et al.*, 2017; Ramsay *et al.*, 2013). Um estudo recente mostrou que a *E. coli* foi recuperada do escarro de até 25% dos pacientes com FC, principalmente naqueles com mau estado nutricional e função pulmonar, embora isso não tenha previsto declínio clínico (Edwards *et al.*, 2020). Além disso, estudos epidemiológicos demonstram uma prevalência de *P. aeruginosa* e *S. aureus* em diferentes momentos da vida de pacientes com FC, com *S. aureus* sendo a espécie bacteriana mais isolada em pacientes jovens, com uma gradativa substituição no predomínio por *P. aeruginosa* em pacientes adultos (REBRACF, 2019; USCFF, 2019). Em nosso estudo, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. cepacia* e *E. coli* foram usadas como espécies representativas para FC para avaliar o efeito inibitório bacteriano de PRMs fúngicas isoladas de *L. prolificans*, *S. boydii*, *S. apiospermum*, e *S. aurantiacum*.

Por razões semelhantes à das bactérias, os fungos são capazes de colonizar e infectar pacientes de FC, como em decorrência da atividade mucociliar anormal e pelo comprometimento imunogênico local. Além disso, o uso a longo prazo de antibióticos e corticosteroides também irão facilitar o estabelecimento fúngico, permitindo a sua colonização crônica do trato respiratório (Chotirmall e McElvaney, 2014). Sabe-se que os fungos do gênero *Scedosporium* são o terceiro mais prevalente em pacientes com FC após *Aspergillus* e *Penicillium*. *S. apiospermum* é o mais frequente (28,6%), seguido por *S. boydii* (19,3%), *S. aurantiacum* (10,0%) e *L. prolificans* (3,6%) (Engel *et al.*, 2019). Outros estudos descreveram as espécies de *Scedosporium* como o segundo fungo filamentosos mais prevalente em pacientes com FC quando foram empregados meios seletivos para o seu crescimento ou pela utilização de métodos moleculares (Pihet *et al.*, 2009; Sudfeld *et al.*, 2010). Essa diferença no predomínio de *Scedosporium* pode ser observada em diversas outras espécies fúngicas isoladas das vias aéreas da FC. Métodos de isolamento tradicionais continuam sendo largamente empregados, mas técnicas emergentes de base molecular e genotipagem estão sendo cada vez mais usadas para detecção e classificação correta de fungos (Chotirmall e McElvaney, 2014).

Como mencionado, pacientes de FC têm uma predisposição a terem suas vias aéreas colonizadas por bactérias e fungos, porém, apesar dos estudos sobre esses microrganismos normalmente os investigarem de forma isolada, é raro que eles não sejam encontrados formando um consórcio polimicrobiano. Os microrganismos que são membros dessas comunidades podem interagir entre si, seja por *quorum sensing*, reconhecimento de proteínas de superfície ou pela secreção de pequenos metabólitos (O'Brien e Welch, 2019). Tais formas de comunicação podem ser de natureza sinérgica ou antagônica, e são capazes de levar a alterações quanto ao perfil de expressão gênica, na expressão de fatores de virulência, em alterações nas reações contra terapia antimicrobiana, dentre outras mudanças (O'Brien e Welch, 2019).

Com relação às interações nas comunidades polimicrobianas através da secreção de moléculas, diferentes formas de relações podem ser estabelecidas. O farnesol, por exemplo, é uma molécula de *quorum sensing* que vai induzir diferentes efeitos dependendo do microrganismo em questão. Uma das principais funções dessa molécula é a regulação da mudança morfogênica de *Candida albicans*, porém, também pode estar relacionada com a inibição da morfogênese de *Paracoccidioides brasiliensis*, com a interferência no crescimento de *Cryptococcus neoformans* e *Penicillium expansum*, assim como pode estar envolvida com a apoptose de *Aspergillus nidulans*. Já foi observado também efeitos de farnesol, produzido por *C. albicans*, em espécies bacterianas, como na inibição da produção de quinolonas por *P. aeruginosa* (Dixon e Hall, 2015). Além de atuar no crescimento e morfogênese, alguns metabólitos secundários podem também afetar a virulência de patógenos, como é o caso da sinergia observada na alimentação cruzada de lactato entre *Streptococcus gordonii* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Murray et al, 2014). Outros exemplos de interações através da liberação de moléculas que também podem ser citadas são a inibição da germinação de *Candida* pela secreção da molécula 3-oxo-C12 homoserina lactona por *P. aeruginosa*, e a propriedade antifúngica de fenazinas de *Pseudomonas* e atividade antiviral, antibacteriana e antifúngica expressa por várias lectinas produzidas por microrganismos (Coelho et al., 2018; Peleg, Hogan e Mylonakis, 2010; Peters et al., 2012).

Considerando então o padrão polimicrobiano das infecções pulmonares por FC, assim como as interações polimicrobianas através de moléculas produzidas pelos microrganismos envolvidos, é relevante o estudo das PRMs fúngicas. Nesse contexto, o presente trabalho utilizou PRMs isoladas de *L. prolificans* (Barreto-Bergter et al., 2008), *S. boydii* (Pinto et al., 2005), *S.*

*apiospermum* (Barreto-Bergter et al., 2011), e *S. aurantiacum* (de Meirelles et al., 2020). Esses glicoconjugados são expostos em superfícies fúngicas, pois são reconhecidos por anticorpos anti-PRM (Lopes et al., 2010; Xisto et al., 2015). Sabe-se que PRMs de *S. boydii* e *S. apiospermum* estão envolvidas na adesão a uma linha celular epitelial e na sobrevivência intracelular dentro de macrófagos, respectivamente (Pinto et al., 2004; Lopes et al., 2010). Além disso, PRMs isoladas de *S. boydii* e *L. prolificans* também desempenham um papel na estimulação imune do hospedeiro, aumentando a liberação de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$  (Figueiredo et al., 2010; Xisto et al., 2015).

Embora *S. apiospermum* seja descrito como a espécie de *Scedosporium* mais comum identificada em pulmões de pacientes com FC, os resultados de CMI e CMM obtidos neste trabalho mostraram que sua PRM foi a molécula menos potente contra bactérias, enquanto a PRM de *L. prolificans*, que é a espécie do grupo *Scedosporium/Lomentospora* menos frequentemente isolada de pacientes com FC, foi a mais ativa contra bactérias. Além disso, todas as PRMs apresentaram CMIs elevadas contra *P. aeruginosa* e *E. coli*, indicando que certas bactérias apresentam maior tolerância a essas moléculas.

Devido à relevância dos biofilmes na infecção, a influência da PRM nos biofilmes bacterianos também foi avaliada. Todas as quatro PRMs inibem a formação de biofilme e são ativas contra biofilmes pré-formados de *B. cepacia* e MRSA em valores de CMI. A matriz extracelular também foi reduzida por PRMs, indicando que os biofilmes bacterianos foram enfraquecidos na presença de PRMs. Vários glicoconjugados e polissacarídeos já foram descritos como potentes inibidores de biofilmes bacterianos. O C-fucosilpeptídeo e dendrímeros de peptídeo galactosilado demonstraram inibir a formação de biofilme e dispersar o biofilme pré-formado, interferindo com *P. aeruginosa* LecA e B, uma molécula de lectina responsável pela aderência bacteriana nos tecidos do hospedeiro (Kadam et al., 2011; Reymond et al., 2013). Os oligossacarídeos humanos e vegetais, como os galactooligossacarídeos, já são conhecidos por bloquear a adesão bacteriana às superfícies, diminuindo a formação de biofilme de *E. coli*, *Burkholderia pseudomallei* e outras bactérias (Thomas e Brooks, 2004; Shoaf et al., 2006; Lane et al., 2010; Quintero et al., 2011; Rendueles et al., 2013). Em relação às moléculas fúngicas, a quitosana, um derivado desacetilado da quitina encontrado na parede celular fúngica, é reconhecido como um potente agente antibacteriano e inibe o crescimento e a formação de biofilme por diferentes bactérias, como *S. aureus* e *E. coli* (Asli et al., 2017). Para outros

glicoconjugados fúngicos, como o biossurfactante ramnolípido de *Aspergillus* spp., também foi relatada atividade antimicrobiana contra *Streptococcus* spp., *Micrococcus luteus* e *Enterococcus faecalis* (Kiran et al., 2009).

Em conjunto, todos os dados apresentados em nosso estudo demonstraram que os PRMs possuem efeitos antibacterianos e anti-biofilmes. Em relação à inibição do crescimento bacteriano, a PRM de *L. prolificans* foi a mais eficaz, seguida de *S. aurantiacum*, *S. boydii* e *S. apiospermum*, contra *B. cepacia* e MRSA, que foram as bactérias mais suscetíveis. *P. aeruginosa* e *E. coli* pareceram ser resistentes a todas as PRM. Considerando o efeito anti-biofilme, as PRMs de *S. boydii* e *S. aurantiacum* mostraram-se mais eficazes, sendo necessário  $\frac{1}{4}$  CMI para observar a redução do biofilme de *B. cepacia* e MRSA.

A variação no potencial antibacteriano entre as PRMs pode ser devido às diferenças em suas cadeias de oligossacarídeos. As PRMs isoladas das espécies *Scedosporium* e *Lomentospora* utilizadas neste trabalho compartilham epítomos semelhantes, como  $\alpha$ -Rhap-(1 $\rightarrow$ 3) - Manp-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -Manp (Lopes et al., 2011; de Meirelles et al., 2020). Por outro lado, outras diferenças estruturais são observadas entre essas PRMs, o que pode resultar em alterações na atividade antimicrobiana. A PRM de *L. prolificans*, por exemplo, contém um pentassacarídeo sem a cadeia lateral  $\beta$ -Galp (Barreto-Bergter et al., 2008) e uma alta proporção de unidades Rhap 2-O-substituídas, que estão ausentes nas PRMs de *S. boydii* e *S. apiospermum* (Pinto et al., 2005; Barreto-Bergter et al., 2008; Barreto-Bergter et al., 2011). No entanto, mais estudos são necessários para esclarecer o motivo pelo qual a PRM de *L. prolificans* apresenta maior atividade contra as bactérias testadas quando comparado às outras PRMs.

A fim de avaliar alguns possíveis mecanismos envolvidos na morte bacteriana, avaliamos estresse oxidativo, integridade de membrana e potencial de membrana em *B. cepacia* tratada com PRMs usando coloração DCFDA, Vermelho Nilo e JC-1, respectivamente. A PRM de *L. prolificans* aumentou a produção de ROS quando comparado ao controle. PRMs isoladas de *S. boydii*, *S. apiospermum* e *S. aurantiacum* não causaram nenhum efeito, sugerindo que diferenças estruturais entre as PRMs podem estar relacionadas à produção de ROS por *B. cepacia*. Por outro lado, foi observada uma diminuição do potencial de membrana em *B. cepacia* na presença de todas as PRMs utilizadas. A integridade da membrana só foi afetada quando as células bacterianas foram tratadas com a PRM de *S. boydii*. A alteração da membrana detectada pelo Vermelho Nilo é bem conhecida em bactérias tratadas com penicilina, o que leva à

desorganização da superfície celular (Pereira et al., 2007). No entanto, poucas informações sobre indução de ROS, desorganização de membrana e alterações no potencial de membrana causadas por glicoconjugados e polissacarídeos são descritas na literatura.

Além de avaliar as relações polimicrobianas através da interação célula-molécula, optamos por investigar esse relacionamento entre célula-célula. Para tal, foram selecionadas as espécies fúngicas *S. apiospermum* e *S. boydii* e a espécie bacteriana MRSA, considerando a predominância desses microrganismos em amostras isoladas de pacientes com FC. Na quantificação da biomassa total não foram observadas diferenças nos valores obtidos dos biofilmes de controle dos microrganismos nem dos biofilmes mistos. Com relação à matriz extracelular do biofilme, no entanto, foi observado maiores valores no crescimento misto quando comparado com a MRSA sozinha. No entanto, a análise apenas por cristal violeta e safranina não fornece resultados conclusivos considerando que essas técnicas não distinguem os microrganismos crescidos, podendo talvez estar ocorrendo uma inibição do fungo ou da bactéria e o crescimento a ser observado ser fruto do desenvolvimento de um microrganismo em detrimento do outro. Assim, foi realizada a contagem de UFC para quantificação do crescimento dos fungos e das bactérias nesse contexto de biofilme polimicrobiano. Resultados preliminares mostraram que em 24h não foi possível verificar o crescimento microbiano. Já em 48h houve o crescimento bacteriano nas placas de Petri, mas não foi observado crescimento fúngico, e o mesmo ocorreu em 72h. Com isso, quantificamos as UFCs de MRSA e comparando o crescimento monomicrobiano com o misto foi evidenciado a possibilidade de um estímulo no desenvolvimento bacteriano no contexto de biofilme misto, apesar de não ter ocorrido uma diferença estatística. Apesar disto, os testes precisam ser repetidos para confirmação do resultado obtido, assim como para tentar acessar uma forma de quantificar o crescimento fúngico no biofilme misto.

Alguns estudos já foram realizados para averiguar as interações polimicrobianas entre fungos e bactérias. Kousser *et al.* (2019) verificaram que *P. aeruginosa* e *Rhizopus microsporum* exibem uma relação de competição por ferro na clínica, na qual a bactéria secreta sideróforos para captação do ferro, o que resulta na inibição do crescimento e germinação do fungo. Na relação entre *Candida sp.* e *Porphyromonas gingivalis*, no entanto, *C. albicans* estabelece uma relação mutualística na qual fornece um ambiente anóxico que permite o crescimento robusto da bactéria (Todd e Peters, 2019). Avaliando o biofilme misto entre *A. fumigatus* e *P. aeruginosa*,

também foi possível constatar uma relação mutualística, na qual é observado um aumento na massa do biofilme polimicrobiano em comparação com os biofilmes monomicrobianos (Manavathu, Vager e Vazquez, 2014). Neste estudo também foram encontrados problemas na observação do crescimento fúngico através de UFC, de forma que o método não foi adequado para a determinação deste em biofilmes mais maduros (24-48h), o que corrobora com as dificuldades experimentadas no presente trabalho.

## 7. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos, é possível concluir que MRSA e *B. cepacia* são suscetíveis a uma inibição pela PRMs de espécies do gênero *Scedosporium/Lomentospora* e que dentre estas, a de *L. prolificans* representa a molécula com maior poder de inibição apresentando, no entanto, uma leve perda da sua eficácia contra biofilme maduro pré-formado. Além disso, pode-se concluir também que a inibição gerada pelas moléculas se dá por diferentes mecanismos que provavelmente se diferem devido a pequenas alterações presentes nas PRMs das diferentes espécies. Por último, pode-se supor que o biofilme misto entre *S. boydii* e *S. apiospermum* com MRSA favoreça a bactéria, mas são necessários mais testes para determinar essa relação.

## 8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

- Acker, H.V., Gielis, J., Acke, M., Cools, F., Cos, P., Coenye, T., (2016). The Role of Reactive Oxygen Species in Antibiotic-Induced Cell Death in *Burkholderia cepacia* Complex Bacteria. PLOS ONE 11, e0159837.
- Akil, N., Muhlebach, M.S., (2018). Biology and management of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 53, S64–S74.
- Alberts, B., n.d. (2017). *Biologia molecular da célula* [recurso eletrônico], 6. ed. (Porto Alegre: Artmed), pp. 611.
- Alhazmi, A., (2015). *Pseudomonas aeruginosa* – Pathogenesis and Pathogenic Mechanisms. *International Journal of Biology* 7, p44.
- Asli, A., Brouillette, E., Ster, C., Ghinet, M.G., Brzezinski, R., Lacasse, P., Jacques, M., Malouin, F. (2017). Antibiofilm and antibacterial effects of specific chitosan molecules on *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. PLOS ONE 12, e0176988.
- Balfour-Lynn, I.M., King, J.A., (2020). CFTR modulator therapies - Effect on life expectancy in people with cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* S1526-0542(20)30081–6.

- Barreto-Bergter, E; Sasaki, GL; Souza, LM; Rollin, RR; Wagner, R; Bittencourt, VCB; Lopes, LCL; Simas-Tosin, FF; Nosedá, MD; Gorin, PAJ. (2011). Carbohydrate epitopes in glycoprotein from the opportunistic fungal pathogen *Scedosporium apiospermum*. *Carbohydrate Polymers* 85, 349-355.
- Barreto-Bergter, E., Sasaki, G.L., Wagner, R., Souza, L.M., Souza, M.V. a. R., Pinto, M.R., da Silva, M.I.D., Gorin, P. a. J., (2008). The opportunistic fungal pathogen *Scedosporium prolificans*: carbohydrate epitopes of its glycoproteins. *Int J Biol Macromol* 42, 93–102.
- Barreto-Bergter, E, Sasaki, G., Souza, L., (2011). Structural Analysis of Fungal Cerebrosides. *Frontiers in Microbiology* 2, 239.
- Bell, S.C., Mall, M.A., Gutierrez, H., Macek, M., Madge, S., Davies, J.C., Burgel, P.-R., Tullis, E., Castaños, C., Castellani, C., Byrnes, C.A., Cathcart, F., Chotirmall, S.H., Cosgriff, R., Eichler, I., Fajac, I., Goss, C.H., Drevinek, P., Farrell, P.M., Gravelle, A.M., Havermans, T., Mayer-Hamblett, N., Kashirskaya, N., Kerem, E., Mathew, J.L., McKone, E.F., Naehrlich, L., Nasr, S.Z., Oates, G.R., O'Neill, C., Pypops, U., Raraigh, K.S., Rowe, S.M., Southern, K.W., Sivam, S., Stephenson, A.L., Zampoli, M., Ratjen, F., (2020). The future of cystic fibrosis care: a global perspective. *Lancet Respir Med* 8, 65–124.
- Blyth, C.C., Middleton, P.G., Harun, A., Sorrell, T.C., Meyer, W., Chen, S.C.-A., (2010). Clinical associations and prevalence of *Scedosporium* spp. in Australian cystic fibrosis patients: identification of novel risk factors? *Med Mycol* 48 Suppl 1, S37-44.
- Bouchara, J.-P., Le Govic, Y., Kabbara, S., Cimon, B., Zouhair, R., Hamze, M., Papon, N., Nevez, G., (2020). Advances in understanding and managing *Scedosporium* respiratory infections in patients with cystic fibrosis. *Expert Review of Respiratory Medicine* 14, 259–273.
- Boucher, R.C., (2004). New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J* 23, 146–158.
- Bowman, S.M., Free, S.J., (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays* 28, 799–808.
- Brand, A., Barnes, J.D., Mackenzie, K.S., Odds, F.C., Gow, N.A.R., (2008). Cell wall glycans and soluble factors determine the interactions between the hyphae of *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 287, 48–55.
- Breitenbach Barroso Coelho, L.C., Marcelino Dos Santos Silva, P., Felix de Oliveira, W., de Moura, M.C., Viana Pontual, E., Soares Gomes, F., Guedes Paiva, P.M., Napoleão, T.H., Dos Santos Correia, M.T. (2018). Lectins as antimicrobial agents. *J Appl Microbiol* 125, 1238–1252.
- Briard, B., Rasoldier, V., Bomme, P., ElAouad, N., Guerreiro, C., Chassagne, P., Muszkieta, L., Latgé, J.-P., Mulard, L., Beauvais, A., (2017). Dirhamnolipids secreted from *Pseudomonas aeruginosa* modify antifungal susceptibility of *Aspergillus fumigatus* by inhibiting  $\beta$ 1,3 glucan synthase activity. *ISME J* 11, 1578–1591.
- Bruzzese, E., Callegari, M.L., Raia, V., Viscovo, S., Scotto, R., Ferrari, S., Morelli, L., Buccigrossi, V., Lo Vecchio, A., Ruberto, E., Guarino, A., (2014). Disrupted intestinal microbiota and intestinal inflammation in children with cystic fibrosis and its restoration with *Lactobacillus* GG: a randomised clinical trial. *PLoS One* 9, e87796.

- Caldwell, C.C., Chen, Y., Goetzmann, H.S., Hao, Y., Borchers, M.T., Hassett, D.J., Young, L.R., Mavrodi, D., Thomashow, L., Lau, G.W., (2009). *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin causes cystic fibrosis airway pathogenesis. *Am J Pathol* 175, 2473–2488.
- Cannon, R.D., Chaffin, W.L., (1999). Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit Rev Oral Biol Med* 10, 359–383.
- Chaparro, C., Maurer, J., Gutierrez, C., Kraiden, M., Chan, C., Winton, T., Keshavjee, S., Scavuzzo, M., Tullis, E., Hutcheon, M., Kesten, S., (2001). Infection with *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis: outcome following lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 163, 43–48.
- Chen, S., Patel, S., Meyer, W., Chapman, B., Yu, H., Byth, K., Middleton, P., Nevalainen, H., Sorrell, T., (2018). *Pseudomonas aeruginosa* Inhibits the Growth of *Scedosporium* and *Lomentospora* In Vitro. *Mycopathologia* 183(1):251–261
- Chotirmall, S.H., McElvaney, N.G. (2014). Fungi in the cystic fibrosis lung: bystanders or pathogens? *Int J Biochem Cell Biol* 52, 161–173.
- Ciofu, O., Hansen, C.R., Høiby, N., (2013). Respiratory bacterial infections in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 19, 251–258.
- Cohen, T.S., Prince, A., (2012). Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome. *Nat Med* 18, 509–519.
- Colombo, C., (2007). Liver disease in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 13, 529–536.
- Conway, S.P., Brownlee, K.G., Denton, M., Peckham, D.G., (2003). Antibiotic treatment of multidrug-resistant organisms in cystic fibrosis. *Am J Respir Med* 2, 321–332.
- Cortez, K.J., Roilides, E., Quiroz-Telles, F., Meletiadiis, J., Antachopoulos, C., Knudsen, T., Buchanan, W., Milanovich, J., Sutton, D.A., Fothergill, A., Rinaldi, M.G., Shea, Y.R., Zaoutis, T., Kottlil, S., Walsh, T.J., (2008). Infections Caused by *Scedosporium* spp. *Clin Microbiol Rev* 21, 157–197.
- Costa-Orlandi, C.B., Sardi, J.C.O., Pitangui, N.S., de Oliveira, H.C., Scorzoni, L., Galeane, M.C., Medina-Alarcón, K.P., Melo, W.C.M.A., Marcelino, M.Y., Braz, J.D., Fusco-Almeida, A.M., Mendes-Giannini, M.J.S., (2017). Fungal Biofilms and Polymicrobial Diseases. *J Fungi (Basel)* 3, 22.
- Costello, A., Reen, J., O’Gara, F., Callaghan, M., Mcclean, S., (2014). Inhibition of co-colonizing cystic fibrosis-associated pathogens by *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia multivorans*. *Microbiology (Reading, England)* 160, 1474-1487.
- Coutinho, C.P., Barreto, C., Pereira, L., Lito, L., Melo Cristino, J., Sá-Correia, I., (2015). Incidence of *Burkholderia* contaminans at a cystic fibrosis centre with an unusually high representation of *Burkholderia cepacia* during 15 years of epidemiological surveillance. *J Med Microbiol* 64, 927–935.
- Croxen, M.A., Finlay, B.B., (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* 8, 26–38.
- Cullen, L., McClean, S., (2015). Bacterial Adaptation during Chronic Respiratory Infections. *Pathogens* 4, 66–89.



- Cutting, G.R., (2015). Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nat Rev Genet* 16, 45–56.
- Darville, T., (1999). Imipenem and meropenem. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases, Antimicrobial Therapy, Part 2* 10, 38–44.
- Dasenbrook, E.C., Checkley, W., Merlo, C.A., Konstan, M.W., Lechtzin, N., Boyle, M.P., (2010). Association between respiratory tract methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and survival in cystic fibrosis. *JAMA* 303, 2386–2392.
- Davis, P.B., (2006). Cystic fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med* 173, 475–482.
- de Freitas, M.B., Moreira, E.A.M., Tomio, C., Moreno, Y.M.F., Daltoe, F.P., Barbosa, E., Ludwig Neto, N., Buccigrossi, V., Guarino, A., (2018). Altered intestinal microbiota composition, antibiotic therapy and intestinal inflammation in children and adolescents with cystic fibrosis. *PLoS One* 13, e0198457.
- De Lisle, R.C., Borowitz, D., (2013). The cystic fibrosis intestine. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3, a009753.
- de Meirelles, J.V., Xisto, M.I.D. da S., Rollin-Pinheiro, R., Serrato, R.V., Haido, R.M.T., Barreto-Bergter, E., (2021). Peptidorhamanomannan: A surface fungal glycoconjugate from *Scedosporium aurantiacum* and *Scedosporium minutisporum* and its recognition by macrophages. *Medical Mycology* 59, 441–452.
- Delhaes, L., Monchy, S., Fréalle, E., Hubans, C., Salleron, J., Leroy, S., Prevotat, A., Wallet, F., Wallaert, B., De-Cas, E., Sime-Ngando, T., Chabé, M., Viscogliosi, E., (2012). The airway microbiota in cystic fibrosis: a complex fungal and bacterial community--implications for therapeutic management. *PLoS One* 7, e36313.
- Deschamps, E., Schaumann, A., Schmitz-Afonso, I., Afonso, C., Dé, E., Loutelier-Bourhis, C., Alexandre, S., (2021). Membrane phospholipid composition of *Pseudomonas aeruginosa* grown in a cystic fibrosis mucus-mimicking medium. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1863, 183482.
- Dhamgaye, S., Qu, Y., Peleg, A.Y., (2016). Polymicrobial infections involving clinically relevant Gram-negative bacteria and fungi. *Cell Microbiol* 18, 1716–1722.
- Dixon, E.F., Hall, R.A., (2015). Noisy neighbourhoods: quorum sensing in fungal-polymicrobial infections. *Cell Microbiol* 17, 1431–1441.
- Douglas, T.A., Brennan, S., Gard, S., Berry, L., Gangell, C., Stick, S.M., Clements, B.S., Sly, P.D., (2009). Acquisition and eradication of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 33, 305–311.
- Duytschaever, G., Huys, G., Bekaert, M., Boulanger, L., De Boeck, K., Vandamme, P., (2013). Dysbiosis of bifidobacteria and *Clostridium* cluster XIVa in the cystic fibrosis fecal microbiota. *J Cyst Fibros* 12, 206–215.
- Eberl, L., Tümmler, B., (2004). *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis: genome evolution, interactions and adaptation. *Int J Med Microbiol* 294, 123–131.

- Edwards, B.D., Somayaji, R., Greysson-Wong, J., Izydorczyk, C., Waddell, B., Storey, D.G., Rabin, H.R., Surette, M.G., Parkins, M.D., (2020). Clinical Outcomes Associated With *Escherichia coli* Infections in Adults With Cystic Fibrosis: A Cohort Study. *Open Forum Infect Dis* 7, ofz476.
- Elias, S., Banin, E., (2012). Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiol Rev* 36, 990–1004.
- Engel, T.G.P., Slabbers, L., de Jong, C., Melchers, W.J.G., Hagen, F., Verweij, P.E., Merkus, P., Meis, J.F., Dutch Cystic Fibrosis Fungal Collection Consortium, (2019). Prevalence and diversity of filamentous fungi in the airways of cystic fibrosis patients - A Dutch, multicentre study. *J Cyst Fibros* 18, 221–226.
- Esposito, S., Pennoni, G., Mencarini, V., Palladino, N., Peccini, L., Principi, N., (2019). Antimicrobial Treatment of *Staphylococcus aureus* in Patients With Cystic Fibrosis. *Frontiers in Pharmacology* 10, 849.
- Estrada, R., Chávez-López, G., Estrada-Chávez, G., López-Martínez, R., Welsh, O., (2012). Eumycetoma. *Clin Dermatol* 30, 389–396.
- Figueiredo, R.T., Fernandez, P.L., Dutra, F.F., González, Y., Lopes, L.C., Bittencourt, V.C.B., Sasaki, G.L., Barreto-Bergter, E., Bozza, M.T. (2010). TLR4 recognizes *Pseudallescheria boydii* conidia and purified rhamnomannans. *J Biol Chem* 285, 40714–40723.
- Filkins, L.M., O’Toole, G.A., (2015). Cystic Fibrosis Lung Infections: Polymicrobial, Complex, and Hard to Treat. *PLoS Pathog* 11, e1005258.
- Folescu, T.W., da Costa, C.H., Cohen, R.W.F., Neto, O.C. da C., Albano, R.M., Marques, E.A., (2015). *Burkholderia cepacia* complex: clinical course in cystic fibrosis patients. *BMC Pulm Med* 15, 158.
- Folkesson, A., Jelsbak, L., Yang, L., Johansen, H.K., Ciofu, O., Høiby, N., Molin, S., (2012). Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol* 10, 841–851.
- Frey-Klett, P., Burlinson, P., Deveau, A., Barret, M., Tarkka, M., Sarniguet, A., (2011). Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. *Microbiol Mol Biol Rev* 75, 583–609.
- Gaspar, M.C., Couet, W., Olivier, J.-C., Pais, A. a. C.C., Sousa, J.J.S., (2013). *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis lung disease and new perspectives of treatment: a review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 32, 1231–1252.
- Ghamrawi, S., Gastebois, A., Zykwinska, A., Vandeputte, P., Marot, A., Mabileau, G., Cuenot, S., Bouchara, J.-P., (2015). A Multifaceted Study of *Scedosporium boydii* Cell Wall Changes during Germination and Identification of GPI-Anchored Proteins. *PLoS One* 10, e0128680.
- Ghamrawi, S., Rénier, G., Saulnier, P., Cuenot, S., Zykwinska, A., Dutilh, B.E., Thornton, C., Faure, S., Bouchara, J.-P., (2014). Cell wall modifications during conidial maturation of the human pathogenic fungus *Pseudallescheria boydii*. *PLoS One* 9, e100290.
- Goerke, C., Wolz, C., (2010). Adaptation of *Staphylococcus aureus* to the cystic fibrosis lung. *Int J Med Microbiol* 300, 520–525.

- Gordon, R.J., Lowy, F.D., (2008). Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis* 46 Suppl 5, S350-359.
- Gorin, P.A.J., Xisto, M., Sasaki, G., Souza, L., Wagner, R., Bittencourt, V., Simas, F., Nosedá, M., Barreto-Bergter, E., (2010). Carbohydrates present in the glycoprotein from conidia of the opportunistic pathogen *Scedosporium prolificans*. *Carbohydrate Polymers* 79, 927–932.
- Goss, C.H., Burns, J.L., (2007). Exacerbations in cystic fibrosis. 1: Epidemiology and pathogenesis. *Thorax* 62, 360–367.
- Goss, C.H., Muhlebach, M.S., (2011). Review: *Staphylococcus aureus* and MRSA in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* 10, 298–306.
- Govan, J.R., Deretic, V., (1996). Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* 60, 539–574.
- Gow, N.A.R., Latge, J.-P., Munro, C.A., (2017). The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiology Spectrum* 5, 5.3.01.
- Guarro, J., Kantarcioglu, A.S., Horré, R., Luis Rodriguez-Tudela, J., Cuenca Estrella, M., Berenguer, J., Sybren De Hoog, G., (2006). *Scedosporium apiospermum*: changing clinical spectrum of a therapy-refractory opportunist\*. *Medical Mycology* 44, 295–327.
- Gueho, E., and Hoog, S.G. de (1991) Taxonomy of the medical species of *Pseudallescheria* and *Scedosporium*. *J Mycol Med* 118: 4–9.
- Guss, A.M., Roeselers, G., Newton, I.L.G., Young, C.R., Klepac-Ceraj, V., Lory, S., Cavanaugh, C.M. (2011). Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria associated with cystic fibrosis. *ISME J* 5, 20–29.
- Harding, M.W., Marques, L.L.R., Howard, R.J., Olson, M.E., (2009). Can filamentous fungi form biofilms? *Trends Microbiol* 17, 475–480.
- Hassan, A.A., Vitorino, M.V., Robalo, T., Rodrigues, M.S., Sá-Correia, I., (2019). Variation of *Burkholderia cenocepacia* cell wall morphology and mechanical properties during cystic fibrosis lung infection, assessed by atomic force microscopy. *Sci Rep* 9, 16118.
- Hawksworth, D.L. (2011) A new dawn for the naming of fungi: impacts of decisions made in Melbourne in July 2011 on the future publication and regulation of fungal names. *IMA Fungus* 2: 155–162.
- Hirschhausen, N., Block, D., Bianconi, I., Bragonzi, A., Birtel, J., Lee, J.C., Dübbers, A., Küster, P., Kahl, J., Peters, G., Kahl, B.C., (2013). Extended *Staphylococcus aureus* persistence in cystic fibrosis is associated with bacterial adaptation. *Int J Med Microbiol* 303, 685–692.
- Hoffman, L.R., Pope, C.E., Hayden, H.S., Heltshe, S., Levy, R., McNamara, S., Jacobs, M.A., Rohmer, L., Radey, M., Ramsey, B.W., Brittnacher, M.J., Borenstein, E., Miller, S.I., (2014). *Escherichia coli* dysbiosis correlates with gastrointestinal dysfunction in children with cystic fibrosis. *Clin Infect Dis* 58, 396–399.

- Hogardt, M., Heesemann, J., (2010). Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during persistence in the cystic fibrosis lung. *Int J Med Microbiol* 300, 557–562.
- Homa, M., Sándor, A., Tóth, E., Szebenyi, C., Nagy, G., Vágvölgyi, C., Papp, T., (2019). In vitro Interactions of *Pseudomonas aeruginosa* With *Scedosporium* Species Frequently Associated With Cystic Fibrosis. *Frontiers in Microbiology* 10, 441.
- Hussain, S.Z., Chu, C., Greenberg, D.P., Orenstein, D., Khan, S., (2004). *Clostridium difficile* colitis in children with cystic fibrosis. *Dig Dis Sci* 49, 116–121.
- Izydorczyk, C., Waddell, B., Edwards, B.D., Greysson-Wong, J., Surette, M.G., Somayaji, R., Rabin, H.R., Conly, J.M., Church, D.L., Parkins, M.D., (2020). Epidemiology of *E. coli* in Cystic Fibrosis Airways Demonstrates the Capacity for Persistent Infection but Not Patient-Patient Transmission. *Frontiers in Microbiology* 11, 475.
- Jarzabek, K., Zbucka, M., Pepiński, W., Szamatowicz, J., Domitrz, J., Janica, J., Wołczyński, S., Szamatowicz, M., (2004). Cystic fibrosis as a cause of infertility. *Reprod Biol* 4, 119–129.
- Jendrossek, D., (2009). Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes). *J Bacteriol* 191, 3195–3202.
- Kadam, R.U., Bergmann, M., Hurley, M., Garg, D., Cacciarini, M., Swiderska, M.A., Nativi, C., Sattler, M., Smyth, A.R., Williams, P., Cámara, M., Stocker, A., Darbre, T., Reymond, J.-L. (2011). A glycopeptide dendrimer inhibitor of the galactose-specific lectin LecA and of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Angew Chem Int Ed Engl* 50, 10631–10635.
- Kahl, B.C., (2010). Impact of *Staphylococcus aureus* on the pathogenesis of chronic cystic fibrosis lung disease. *Int J Med Microbiol* 300, 514–519.
- Kaur, J., Pethani, B.P., Kumar, S., Kim, M., Sunna, A., Kautto, L., Penesyan, A., Paulsen, I.T., Nevalainen, H., (2015). *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of *Scedosporium aurantiacum*, an opportunistic fungal pathogen isolated from the lungs of cystic fibrosis patients. *Frontiers in Microbiology* 6, 866.
- Kenna, D.T.D., Lilley, D., Coward, A., Martin, K., Perry, C., Pike, R., Hill, R., Turton, J.F. (2017). Prevalence of *Burkholderia* species, including members of *Burkholderia cepacia* complex, among UK cystic and non-cystic fibrosis patients. *J Med Microbiol* 66, 490–501.
- Keown, K., Reid, A., Moore, J.E., Taggart, C.C., Downey, D.G., (2020). Coinfection with *Pseudomonas aeruginosa* and *Aspergillus fumigatus* in cystic fibrosis. *European Respiratory Review* 29, 11-20.
- Kidd, T.J., Ramsay, K.A., Hu, H., Bye, P.T.P., Elkins, M.R., Grimwood, K., Harbour, C., Marks, G.B., Nissen, M.D., Robinson, P.J., Rose, B.R., Sloots, T.P., Wainwright, C.E., Bell, S.C., ACPinCF Investigators, (2009). Low rates of *Pseudomonas aeruginosa* misidentification in isolates from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 47, 1503–1509.
- Kilani-Feki, O., Zouari, I., Culioli, G., Ortalo-Magné, A., Zouari, N., Blache, Y., Jaoua, S., (2012). Correlation between synthesis variation of 2-alkylquinolones and the antifungal activity of a *Burkholderia cepacia* strain collection. *World J Microbiol Biotechnol* 28, 275–281.

- Kiran, G.S., Hema, T.A., Gandhimathi, R., Selvin, J., Thomas, T.A., Rajeetha Ravji, T., Natarajaseenivasan, K. (2009). Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. *Colloids Surf B Biointerfaces* 73, 250–256.
- Kousser, C.; Clark, C.; Sherrington, S.; Voelz, K.; Hall, R.A. *Pseudomonas aeruginosa* inhibits *Rhizopus microsporus* germination through sequestration of free environmental iron. *Sci. Rep.* 2019, 9, 5714.
- Lackner, M., Guarro, J., (2013). Pathogenesis of *Scedosporium*. *Curr Fungal Infect Rep* 7, 326–333.
- Lane, J.A., Mehra, R.K., Carrington, S.D., Hickey, R.M. (2010). The food glycome: a source of protection against pathogen colonization in the gastrointestinal tract. *Int J Food Microbiol* 142, 1–13.
- Larcher, G., Cimon, B., Symoens, F., Tronchin, G., Chabasse, D., Bouchara, J.P., (1996). A 33 kDa serine proteinase from *Scedosporium apiospermum*. *Biochem J* 315 ( Pt 1), 119–126.
- Lackner, M., de Hoog, G.S., Verweij, P.E., Najafzadeh, M.J., Curfs-Breuker, I., Klaassen, C.H., Meis, J.F., (2012). Species-specific antifungal susceptibility patterns of *Scedosporium* and *Pseudallescheria* species. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 2635–2642.
- Lackner, M., Hoog, G.S. de, Yang, L., Moreno, L.F., Ahmed, S.A., Andreas, F., et al. (2014) Proposed nomenclature for *Pseudallescheria*, *Scedosporium* and related genera. *Fungal Divers* 67: 1–10.
- Leclair, L.W., Hogan, D.A., (2010). Mixed bacterial-fungal infections in the CF respiratory tract. *Medical Mycology* 48, S125–S132.
- Lennon, P.A., Cooper, C.R., Salkin, I.F., and Lee, S.B. (1994) Ribosomal DNA internal transcribed spaced analysis supports synonymy of *Scedosporium inflatum* and *Lomentospora prolificans*. *J Clin Microbiol* 32: 2413–2416
- Leitão, J., Feliciano, J., Sousa, S., Pita, T., Guerreiro, S., (2017). *Burkholderia cepacia* Complex Infections Among Cystic Fibrosis Patients: Perspectives and Challenges. IntechOpen, London 4.
- Lipuma, J.J., (2010). The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 23, 299–323.
- Lopes, L.C.L., Rollin-Pinheiro, R., Guimarães, A.J., Bittencourt, V.C.B., Martinez, L.R., Koba, W., Farias, S.E., Nosanchuk, J.D., Barreto-Bergter, E., (2010). Monoclonal Antibodies Against Peptidorhamnomannans of *Scedosporium apiospermum* Enhance the Pathogenicity of the Fungus. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 4, e853.
- Lopes, L.C.L., da Silva, M.I.D., Bittencourt, V.C.B., Figueiredo, R.T., Rollin-Pinheiro, R., Sasaki, G.L., Bozza, M.T., Gorin, P.A.J., Barreto-Bergter, E., (2011). Glycoconjugates and polysaccharides from the *Scedosporium/Pseudallescheria boydii* complex: structural characterisation, involvement in cell differentiation, cell recognition and virulence. *Mycoses* 54 Suppl 3, 28–36.
- Lopes, S.P., Ceri, H., Azevedo, N.F., Pereira, M.O., (2012). Antibiotic resistance of mixed biofilms in cystic fibrosis: impact of emerging microorganisms on treatment of infection. *Int J Antimicrob Agents* 40, 260–263.

- Lyczak, J.B., Cannon, C.L., Pier, G.B., (2002). Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 15, 194–222.
- Lynch, S.V., Bruce, K.D., (2013). The cystic fibrosis airway microbiome. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3, a009738.
- Malloch, D., and Salkin, I.F. (1984) A new species of *Scedosporium* associated with osteomyelitis in humans. *Mycotaxon* 21: 247–255.
- Manavathu, E.K., Vager, D.L., Vazquez, J.A., (2014). Development and antimicrobial susceptibility studies of in vitro monomicrobial and polymicrobial biofilm models with *Aspergillus fumigatus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiology* 14, 14-53.
- Marks, M.I., (1990). Clinical significance of *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis. *Infection* 18, 53–56.
- Marques, A. de J., Rollin-Pinheiro, R., Xisto, M.I.D. da S., Dos Santos, A.L.S., Barreto-Bergter, E., Liporagi-Lopes, L.C., (2021). Influence of relevant cystic fibrosis bacteria on *Scedosporium apiospermum* and *Scedosporium boydii* growth and viability. *Braz J Microbiol* 52, 185–193.
- Matamouros, S., Hayden, H.S., Hager, K.R., Brittnacher, M.J., Lachance, K., Weiss, E.J., Pope, C.E., Imhaus, A.-F., McNally, C.P., Borenstein, E., Hoffman, L.R., Miller, S.I., (2018). Adaptation of commensal proliferating *Escherichia coli* to the intestinal tract of young children with cystic fibrosis. *PNAS* 115, 1605–1610.
- Mello, T.P., Aor, A.C., Gonçalves, D.S., Seabra, S.H., Branquinha, M.H., Santos, A.L.S., (2016). Assessment of biofilm formation by *Scedosporium apiospermum*, *S. aurantiacum*, *S. minutisporum* and *Lomentospora prolificans*. *Biofouling* 32, 737–749.
- Melloul, E., Luiggi, S., Anaïs, L., Arné, P., Costa, J.-M., Fihman, V., Briard, B., Dannaoui, E., Guillot, J., Decusser, J.-W., Beauvais, A., Botterel, F., (2016). Characteristics of *Aspergillus fumigatus* in Association with *Stenotrophomonas maltophilia* in an In Vitro Model of Mixed Biofilm. *PLOS ONE* 11, e0166325.
- Melloul, E., Roisin, L., Durieux, M.-F., Woerther, P.-L., Jenot, D., Risco, V., Guillot, J., Dannaoui, E., Decusser, J.-W., Botterel, F., (2018). Interactions of *Aspergillus fumigatus* and *Stenotrophomonas maltophilia* in an in vitro Mixed Biofilm Model: Does the Strain Matter? *Frontiers in Microbiology* 9, 2850.
- Middleton, P.G., Chen, S.C.-A., Meyer, W., (2013). Fungal infections and treatment in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 19, 670–675.
- Miragoli, F., Federici, S., Ferrari, S., Minuti, A., Rebecchi, A., Bruzzese, E., Buccigrossi, V., Guarino, A., Callegari, M.L., (2017). Impact of cystic fibrosis disease on archaea and bacteria composition of gut microbiota. *FEMS Microbiol Ecol* 93, fiw230.
- Mirtajani, S., Farnia, Poopak, Hassanzad, M., Ghanavi, J., Farnia, Parissa, Velayati, A., (2017). Geographical distribution of cystic fibrosis; The past 70 years of data analysis. *Biomedical and Biotechnology Research Journal (BBRJ)* 1, 105.
- Muhlebach, M.S., (2017). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis: how should it be managed? *Curr Opin Pulm Med* 23, 544–550.

- Müller, F.-M.C., Seidler, M., (2010). Characteristics of pathogenic fungi and antifungal therapy in cystic fibrosis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8, 957–964.
- Murray, J.L., Connell, J.L., Stacy, A., Turner, K.H., Whiteley, M. (2014). Mechanisms of synergy in polymicrobial infections. *J Microbiol* 52, 188–199.
- Nagano, Y., Millar, C., Johnson, E., Goldsmith, C., Elborn, J., Rendall, J., Moore, J., (2007). Fungal infections in patients with cystic fibrosis. *Reviews in Medical Microbiology* 18, 11–16.
- O'Brien, T.J., Welch, M. (2019). Recapitulation of polymicrobial communities associated with cystic fibrosis airway infections: a perspective. *Future Microbiology* 14, 1437–1450.
- Peleg, A.Y., Hogan, D.A., Mylonakis, E. (2010). Medically important bacterial-fungal interactions. *Nat Rev Microbiol* 8, 340–349.
- Peters, B.M., Jabra-Rizk, M.A., O'May, G.A., Costerton, J.W., Shirtliff, M.E. (2012). Polymicrobial Interactions: Impact on Pathogenesis and Human Disease. *Clin Microbiol Rev* 25, 193–213.
- Pereira, S.F.F., Henriques, A.O., Pinho, M.G., de Lencastre, H., Tomasz, A., (2007). Role of PBP1 in Cell Division of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 189, 3525–3531.
- Pihet, M., Carrere, J., Cimon, B., Chabasse, D., Delhaes, L., Symoens, F., Bouchara, J.-P. (2009). Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis--a review. *Med Mycol* 47, 387–397.
- Pinto, M.R., Mulloy, B., Haido, R.M.T., Travassos, L.R., Barreto Bergter, E., (2001). A peptidoglycan from the mycelium of *Pseudallescheria boydii* is a potential diagnostic antigen of this emerging human pathogen. *Microbiology (Reading)* 147, 1499–1506.
- Pinto, Marcia R, de Sá, A.C.M., Limongi, C.L., Rozental, S., Santos, A.L.S., Barreto-Bergter, E., (2004). Involvement of peptidoglycan in the interaction of *Pseudallescheria boydii* and HEp2 cells. *Microbes Infect* 6, 1259–1267.
- Pinto, M.R., Gorin, P.A.J., Wait, R., Mulloy, B., Barreto-Bergter, E., (2005). Structures of the O-linked oligosaccharides of a complex glycoconjugate from *Pseudallescheria boydii*. *Glycobiology* 15, 895–904.
- Pompilio, A., Crocetta, V., De Nicola, S., Verginelli, F., Fiscarelli, E., Di Bonaventura, G., (2015). Cooperative pathogenicity in cystic fibrosis: *Stenotrophomonas maltophilia* modulates *Pseudomonas aeruginosa* virulence in mixed biofilm. *Frontiers in Microbiology* 6, 951.
- Quintero, M., Maldonado, M., Perez-Munoz, M., Jimenez, R., Fangman, T., Rupnow, J., Wittke, A., Russell, M., Hutkins, R. (2011). Adherence inhibition of *Cronobacter sakazakii* to intestinal epithelial cells by prebiotic oligosaccharides. *Curr Microbiol* 62, 1448–1454.
- Ramage, G., Rajendran, R., Gutierrez-Correa, M., Jones, B., Williams, C., (2011). *Aspergillus* biofilms: clinical and industrial significance. *FEMS Microbiol Lett* 324, 89–97.

Ramirez-Garcia, A., Pellon, A., Rementeria, A., Buldain, I., Barreto-Bergter, E., Rollin-Pinheiro, R., de Meirelles, J.V., Xisto, M.I.D.S., Ranque, S., Havlicek, V., Vandeputte, P., Govic, Y.L., Bouchara, J.-P., Giraud, S., Chen, S., Rainer, J., Alastrucy-Izquierdo, A., Martin-Gomez, M.T., López-Soria, L.M., Peman, J., Schwarz, C., Bernhardt, A., Tintelnot, K., Capilla, J., Martin-Vicente, A., Cano-Lira, J., Nagl, M., Lackner, M., Irinyi, L., Meyer, W., de Hoog, S., Hernando, F.L., (2018). *Scedosporium* and *Lomentospora*: an updated overview of underrated opportunists. *Medical Mycology* 56, S102–S125.

Ramsay, K.A., Butler, C.A., Paynter, S., Ware, R.S., Kidd, T.J., Wainwright, C.E., Bell, S.C., (2013). Factors influencing acquisition of *Burkholderia cepacia* complex organisms in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 51, 3975–3980.

REBRACF (2019). Grupo Brasileiro de Estudos de Fibrose Cística. Registro Brasileiro de Fibrose Cística: relatório anual de 2019. Disponível em: [http://portalgbefc.org.br/ckfinder/userfiles/files/REBRAFC\\_2019.pdf](http://portalgbefc.org.br/ckfinder/userfiles/files/REBRAFC_2019.pdf).

Reece, E., Doyle, S., Grealley, P., Renwick, J., McClean, S., (2018). *Aspergillus fumigatus* Inhibits *Pseudomonas aeruginosa* in Co-culture: Implications of a Mutually Antagonistic Relationship on Virulence and Inflammation in the CF Airway. *Frontiers in Microbiology* 9, 1205.

Rendueles, O., Kaplan, J.B., Ghigo, J.-M. (2013). Antibiofilm polysaccharides. *Environ Microbiol* 15, 334–346.

Reyhanoglu, G., Reddivari, A.K.R., (2021). Tobramycin, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).

Reymond, J.-L., Bergmann, M., Darbre, T. (2013). Glycopeptide dendrimers as *Pseudomonas aeruginosa* biofilm inhibitors. *Chem Soc Rev* 42, 4814–4822.

Richardson, M., Lass-Flörl, C., (2008). Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clin Microbiol Infect* 14 Suppl 4, 5–24.

Rollin-Pinheiro, R., de Meirelles, J.V., Vila, T.V.M., Fonseca, B.B., Alves, V., Frases, S., Rozental, S., Barreto-Bergter, E., (2017). Biofilm Formation by *Pseudallescheria/Scedosporium* Species: A Comparative Study. *Frontiers in Microbiology* 8, 1568.

Rollin-Pinheiro, R., Xisto, M.I.D. da S., Rochetti, V.P., Barreto-Bergter, E., (2020). *Scedosporium* Cell Wall: From Carbohydrate-Containing Structures to Host-Pathogen Interactions. *Mycopathologia* 185, 931–946.

Rougeron, A., Schuliar, G., Leto, J., Sitterle, E., Landry, D., Bougnoux, M.-E.E., et al (2014) Human-impacted areas of France are environmental reservoirs of the *Pseudallescheria boydii/Scedosporium apiospermum* species complex. *Environ Microbiol* 17: 1039–1048

Rutter, W.C., Burgess, D.R., Burgess, D.S., (2017). Increasing Incidence of Multidrug Resistance Among Cystic Fibrosis Respiratory Bacterial Isolates. *Microb Drug Resist* 23, 51–55.

Rybak, M.J., (2004). Resistance to antimicrobial agents: an update. *Pharmacotherapy* 24, 203S–15S.

Saiman, L., Siegel, J., Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference on Infection Control Participants, (2003). Infection control recommendations for patients with cystic fibrosis: Microbiology, important pathogens, and infection control practices to prevent patient-to-patient transmission. *Am J Infect Control* 31, S1-62.



- Santos, A.L.S., Bittencourt, V.C.B., Pinto, M.R., Silva, B.A., Barreto-Bergter, E., (2009). Biochemical characterization of potential virulence markers in the human fungal pathogen *Pseudallescheria boydii*. *Medical Mycology* 47, 375–386.
- Schwarz, C., Brandt, C., Whitaker, P., Sutharsan, S., Skopnik, H., Gartner, S., Smazny, C., Röhmel, J.F., (2018). Invasive Pulmonary Fungal Infections in Cystic Fibrosis. *Mycopathologia* 183, 33–43.
- Schwarz, C., Hartl, D., Eickmeier, O., Hector, A., Benden, C., Durieu, I., Sole, A., Gartner, S., Milla, C.E., Barry, P.J., (2018). Progress in Definition, Prevention and Treatment of Fungal Infections in Cystic Fibrosis. *Mycopathologia* 183, 21–32.
- Schwerdt, M., Neumann, C., Schwartbeck, B., Kampmeier, S., Herzog, S., Görlich, D., Dübbers, A., Große-Onnebrink, J., Kessler, C., Küster, P., Schültingkemper, H., Treffon, J., Peters, G., Kahl, B.C., (2018). *Staphylococcus aureus* in the airways of cystic fibrosis patients - A retrospective long-term study. *Int J Med Microbiol* 308, 631–639.
- Sfeir, M.M., (2018). *Burkholderia cepacia* complex infections: More complex than the bacterium name suggest. *J Infect* 77, 166–170.
- Shehabi, A.A., Abu-Al-Soud, W., Mahafzah, A., Khuri-Bulos, N., Abu Khader, I., Ouis, I.-S., Wadström, T., (2004). Investigation of *Burkholderia cepacia* nosocomial outbreak with high fatality in patients suffering from diseases other than cystic fibrosis. *Scand J Infect Dis* 36, 174–178.
- Shoaf, K., Mulvey, G.L., Armstrong, G.D., Hutkins, R.W. (2006). Prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to tissue culture cells. *Infect Immun* 74, 6920–6928.
- Shoseyov, D., Brownlee, K.G., Conway, S.P., Kerem, E., (2006). *Aspergillus* bronchitis in cystic fibrosis. *Chest* 130, 222–226.
- Silva, B.A., Pinto, M.R., Soares, R.M.A., Barreto-Bergter, E., Santos, A.L.S., (2006). *Pseudallescheria boydii* releases metalloproteinases capable of cleaving several proteinaceous compounds. *Res Microbiol* 157, 425–432.
- Somayaji, R., Yau, Y.C.W., Tullis, E., LiPuma, J.J., Ratjen, F., Waters, V., (2020). Clinical Outcomes Associated with *Burkholderia cepacia* Complex Infection in Patients with Cystic Fibrosis. *Ann Am Thorac Soc* 17, 1542–1548.
- Soret, P., Vandenborgh, L.-E., Francis, F., Coron, N., Enaud, R., Avalos, M., Schaefferbeke, T., Berger, P., Fayon, M., Thiebaut, R., Delhaes, L., (2020). Respiratory mycobiome and suggestion of inter-kingdom network during acute pulmonary exacerbation in cystic fibrosis. *Sci Rep* 10, 35-89.
- Sriramulu, D., (2013). Evolution and Impact of Bacterial Drug Resistance in the Context of Cystic Fibrosis Disease and Nosocomial Settings. *Microbiol Insights* 6, 29–36.
- Stoltz, D.A., Meyerholz, D.K., Welsh, M.J., (2015). Origins of cystic fibrosis lung disease. *N Engl J Med* 372, 351–362.
- Sudfeld, C.R., Dasenbrook, E.C., Merz, W.G., Carroll, K.C., Boyle, M.P. (2010). Prevalence and risk factors for recovery of filamentous fungi in individuals with cystic fibrosis. *J Cyst Fibrosis* 9, 110–116.

- Talwalkar, J.S., Murray, T.S., (2016). The Approach to *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis. Clin Chest Med 37, 69–81.
- Taylor, C.J., McGaw, J., Howden, R., Duerden, B.I., Baxter, P.S., (1990). Bacterial reservoirs in cystic fibrosis. Arch Dis Child 65, 175–177.
- Tenover, F.C., (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. Am J Infect Control 34, S3-10; discussion S64-73.
- Thein, Z.M., Samaranayake, Y.H., Samaranayake, L.P., (2006). Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. Arch Oral Biol 51, 672–680.
- Thomas, R., Brooks, T. (2004). Common oligosaccharide moieties inhibit the adherence of typical and atypical respiratory pathogens. J Med Microbiol 53, 833–840.
- Todd, O.A., Peters, B.M., (2019). *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* Pathogenicity and Polymicrobial Interactions: Lessons beyond Koch's Postulates. J Fungi (Basel) 5, E81.
- Ullrich, S., Berchtold, S., Boehmer, C., Fillon, S., Jendrossek, V., Palmada, M., Schroeder, T.H., Pier, G.B., Lang, F., (2003). *Pseudomonas aeruginosa* activates Cl<sup>-</sup> channels in host epithelial cells. Pflugers Arch 447, 23–28.
- USCFF (2019). Cystic Fibrosis Foundation. Patient Registry Annual Data Report. Disponível em <https://www.cff.org/sites/default/files/2021-10/2019-Patient-Registry-Annual-Data-Report.pdf>
- Vandeplassche, E., Tavernier, S., Coenye, T., Crabbé, A., (2019). Influence of the lung microbiome on antibiotic susceptibility of cystic fibrosis pathogens. European Respiratory Review 28, 19004.
- Vieira, E.R., Xisto, M.I.D. da S., Pele, M.A., Alviano, D.S., Alviano, C.S., Barreto-Bergter, E., de Campos-Takaki, G.M., (2018). Monohexosylceramides from *Rhizopus* Species Isolated from Brazilian Caatinga: Chemical Characterization and Evaluation of Their Anti-Biofilm and Antibacterial Activities. Molecules 23, 13-31.
- Williams, C., Ranjendran, R., Ramage, G., (2016). Pathogenesis of Fungal Infections in Cystic Fibrosis. Curr Fungal Infect Rep 10, 163–169.
- Wilschanski, M., Durie, P.R., (2007). Patterns of GI disease in adulthood associated with mutations in the CFTR gene. Gut 56, 1153–1163.
- Wong, J.K., Ranganathan, S.C., Hart, E., Australian Respiratory Early Surveillance Team for Cystic Fibrosis, (2013). *Staphylococcus aureus* in early cystic fibrosis lung disease. Pediatr Pulmonol 48, 1151–1159.
- Xisto, M.I.D.S., Liporagi-Lopes, L.C., Muñoz, J.E., Bittencourt, V.C.B., Santos, G.M.P., Dias, L.S., Figueiredo, R.T., Pinto, M.R., Taborda, C.P., Barreto-Bergter, E., (2016). Peptidorhamnomannan negatively modulates the immune response in a scedosporiosis murine model. Medical Mycology 54, 846–855.
- Ziesing, S., Suerbaum, S., Sedlacek, L., (2016). Fungal epidemiology and diversity in cystic fibrosis patients over a 5-year period in a national reference center. Med Mycol 54, 781–786.

Zlosnik, J.E.A., Costa, P.S., Brant, R., Mori, P.Y.B., Hird, T.J., Fraenkel, M.C., Wilcox, P.G., Davidson, A.G.F., Speert, D.P., (2011). Mucoïd and nonmucoïd *Burkholderia cepacia* complex bacteria in cystic fibrosis infections. *Am J Respir Crit Care Med* 183, 67–72.

## ANEXO

## PUBLICAÇÕES NO PERÍODO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO



## OPEN ACCESS

## Edited by:

Jean-Philippe Bouchard,  
Université d'Angers, France

## Reviewed by:

Aitor Rementería,  
University of the Basque Country,  
Spain

Lucimila Baltazar,  
Federal University of Minas Gerais,  
Brazil

## \*Correspondence:

Eliana Barreto-Bergter  
eliana.bergter@micro.ufjf.br

<sup>†</sup>These authors have contributed  
equally to this work

## Specialty section:

This article was submitted to  
Fungal Pathogenesis,  
a section of the journal  
Frontiers in Cellular and Infection  
Microbiology

Received: 25 August 2020

Accepted: 07 October 2020

Published: 28 October 2020

## Citation:

de Oliveira EB, Xisto MDS,  
Rollin-Pinheiro R, Rochetti VP and  
Barreto-Bergter E (2020)  
Peptidorhamnomannans From  
*Scedosporium* and *Lomentospora*  
Species Display Microbicidal Activity  
Against Bacteria Commonly Present in  
Cystic Fibrosis Patients.  
*Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10:598823.  
doi: 10.3389/fcimb.2020.598823

## Peptidorhamnomannans From *Scedosporium* and *Lomentospora* Species Display Microbicidal Activity Against Bacteria Commonly Present in Cystic Fibrosis Patients

Evely Bertulino de Oliveira<sup>†</sup>, Mariana Ingrid Dutra da Silva Xisto<sup>†</sup>,  
Rodrigo Rollin-Pinheiro<sup>†</sup>, Victor Pereira Rochetti and Eliana Barreto-Bergter<sup>\*</sup>


Laboratório de Química Biológica de Microrganismos, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Departamento de  
Microbiologia Geral, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil

*Scedosporium* and *Lomentospora* species are filamentous fungi that cause a wide range of infections in humans. They are usually found in the lungs of cystic fibrosis (CF) patients and are the second most frequent fungal genus after *Aspergillus* species. Several studies have been recently performed in order to understand how fungi and bacteria interact in CF lungs, since both can be isolated simultaneously from patients. In this context, many bacterial molecules were shown to inhibit fungal growth, but little is known about how fungi could interfere in bacterial development in CF lungs. *Scedosporium* and *Lomentospora* species present peptidorhamnomannans (PRMs) in their cell wall that play crucial roles in fungal adhesion and interaction with host epithelial cells and the immune system. The present study aimed to analyze whether PRMs extracted from *Lomentospora prolificans*, *Scedosporium apiospermum*, *Scedosporium boydii*, and *Scedosporium aurantiacum* block bacterial growth and biofilm formation *in vitro*. PRM from *L. prolificans* and *S. boydii* displayed the best bactericidal effect against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Burkholderia cepacia*, and *Escherichia coli*, but not *Pseudomonas aeruginosa*, all of which are the most frequently found bacteria in CF lungs. In addition, biofilm formation was inhibited in all bacteria tested using PRMs at minimal inhibitory concentration (MIC). These results suggest that PRMs from the *Scedosporium* and *Lomentospora* surface seem to play an important role in *Scedosporium* colonization in CF patients, helping to clarify how these pathogens interact to each other in CF lungs.

**Keywords:** cystic fibrosis, peptidorhamnomannan, *Scedosporium*, bacteria, interaction

## Article

# Glucosylceramide Plays a Role in Fungal Germination, Lipid Raft Organization and Biofilm Adhesion of the Pathogenic Fungus *Scedosporium aurantiacum*

Victor Pereira Rochetti, Rodrigo Rollin-Pinheiro, Evely Bertulino de Oliveira, Mariana Ingrid Dutra da Silva Xisto  and Eliana Barreto-Bergter \*

Laboratório de Química Biológica de Microrganismos, Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro 21941-902, Brazil; victorrochetti@gmail.com (V.P.R.); rodrigorollin@gmail.com (R.R.-P.); evelyoliveira4@outlook.com (E.B.d.O.); marylanax@gmail.com (M.I.D.d.S.X.)

\* Correspondence: eliana.bergter@micro.ufrj.br

Received: 29 October 2020; Accepted: 2 December 2020; Published: 8 December 2020



**Abstract:** Infections caused by *Scedosporium* species present a wide range of clinical manifestations, from superficial to disseminated, especially in immunocompromised patients. Glucosylceramides (GlcCer) are glycosphingolipids found on the fungal cell surface and play an important role in growth and pathogenicity processes in different fungi. The present study aimed to evaluate the structure of GlcCer and its role during growth in two *S. aurantiacum* isolates. Purified GlcCer from both isolates were obtained and its chemical structure identified by mass spectrometry. Using ELISA and immunofluorescence techniques it was observed that germination and NaOH-treatment of conidia favor GlcCer exposure. Monoclonal anti-GlcCer antibody reduced germination when cultivated with the inhibitor of melanin synthesis tricyclazole and also reduced germ tube length of conidia, both cultivated or not with tricyclazole. It was also demonstrated that anti-GlcCer altered lipid rafts organization, as shown by using the fluorescent stain filipin, but did not affect the susceptibility of the cell surface to damaging agents. Anti-GlcCer reduced total biomass and viability in biofilms formed on polystyrene plates. In the presence of anti-GlcCer, germinated *S. aurantiacum* conidia and biofilms could not adhere to polystyrene with the same efficacy as control cells. These results highlight the relevance of GlcCer in growth processes of *S. aurantiacum*.

**Keywords:** *Scedosporium*; glucosylceramide; fungal growth; biofilm

## 1. Introduction

*Scedosporium* and *Lomentospora* species are ubiquitous filamentous fungi, commonly found in areas impacted by humans. They cause disease in both immunocompetent and immunocompromised patients, ranging from localized to disseminated infections [1–3]. These fungal species are multidrug resistant and also highly associated with respiratory tract colonization in cystic fibrosis patients [4–6]. Within the *Scedosporium* genus, *Scedosporium aurantiacum* is a clinically relevant species that was related to severe disseminated infections and brain abscesses [7,8]. In experimental models *S. aurantiacum* was demonstrated to be as virulent as *Lomentospora prolificans* and relatively more virulent than other *Scedosporium* species [9,10]. Some aspects correlated to *S. aurantiacum* virulence include the capacity for germination under host conditions and rapid formation of robust biofilms on various types of surfaces, such as central venous catheter and tissue culture dishes [11,12].

The fungal cell wall is an important structure that possesses a variety of glycoconjugates that are related to biological properties and pathogenesis of the fungus [13]. Glucosylceramides (GlcCer) are the main neutral glycosphingolipids found on the cell surface of the majority of fungi and consist of a