

Antagonismo e Sinergia: um estudo da ação dos sistemas de secreção de *Pseudomonas aeruginosa* em co-cultura com *Aspergillus fumigatus*

Autora: Isabella Lourenço¹

Colaboradores: Patricia A. C. Silva²; Layla F. Martins¹; Germán G. Sgro² ; Gustavo H. Goldman²

Orientadora: Regina Lúcia Baldini¹

¹Departamento De Bioquímica, Instituto De Química - Universidade De São Paulo (IQ-USP)

²Faculdade De Ciências Farmacêuticas De Ribeirão Preto - Universidade De São Paulo (FCFRP-USP)

isabella.lourenco@usp.br

Objetivos

Investigar como os sistemas de secreção da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (PA)^{1,2} influenciam sua interação com o fungo *Aspergillus fumigatus* (AF), em contextos de co-colonização associados à fibrose cística^{3,4,5}.

Métodos e Procedimentos

Foram utilizadas linhagens derivadas de *P. aeruginosa* PA14 e a cepa selvagem de *A. fumigatus* CEA17. A triagem inicial, com mutantes da biblioteca de inserção por transposon, focou genes de SS(Tipo I-VI)⁶. Ensaios de co-cultura ocorreram em RPMI-HEPES por 5 dias a 37 °C⁷, permitindo formação de biofilme. O DNA extraído foi quantificado por qPCR para avaliar o crescimento específico. Com base nos resultados, mutantes de deleção, como *aprF* (T1SS) e *estA* (T5aSS), foram gerados com o vetor suicida pEX18Gm. Três protocolos de extração de RNA com Trizol foram testados: (I) com aquecimento, (II) em baixa temperatura(BT) e (III) BT com adição de 0,01% β-mercaptoetanol. A quantificação ocorreu no Nanodrop e a integridade do RNA foi analisada no Bioanalyzer.

Resultados

Verificou-se que mutações em genes de SS causaram desvantagem de crescimento para AF. Isso foi confirmado com mutantes por deleção, destacando que a ausência da proteína de membrana externa do T1SS (*AprF*) e, em menor grau, da esterase do T5aSS (*EstA*) prejudicou o crescimento fúngico (Figura 1).

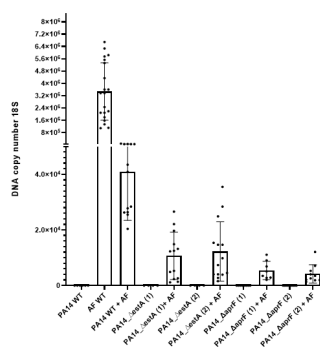


Figura 1 - Influência de *P. aeruginosa* (PA14) selvagem (WT) e mutantes por deleção de dois genes, *aprF* (T1SS) e *estA* (T5aSS), no crescimento de *Aspergillus fumigatus* (AF). Número de cópias do gene 18S rDNA por qPCR como inferência da quantidade do fungo em cada amostra.

O efeito mais marcado ocorreu com o mutante $\Delta aprF$, envolvido na secreção de proteases como AprA e AprX, que possivelmente beneficiam o fungo ao modular a matriz do biofilme ou degradar proteínas extracelulares usadas por AF como carbono. Em contraste, mutantes do cluster H1 do T6SS não alteraram a interação com AF, indicando especialização funcional entre os clusters. Diante disso, novos mutantes da biblioteca PA14NR foram selecionados para investigar os clusters H2 e H3 do T6SS (Tabela 1).

Tabela 1 - Lista de genes associados aos clusters H2 e H3 para T6SS presentes na biblioteca PA14NR

Cluster	"Active" Gene Locus	Gene ID	Gene synonyms
H2	PA14_42980	clpV2	
	PA14_43000	hslG2	tssF2
	PA14_43030	hslC2	tssC2
	PA14_43050	hslA2	tssA2
	PA14_34010	hslG3	tssF3
H3	PA14_34050	hslC3	
	PA14_34080	lip3	tssJ3
	PA14_34110	dotU3	tssL3
	PA14_34130	lcmF3	tssM3
	PA14_34150	sfa3	

Com o objetivo de realizar uma análise transcriptômica, para compreender mais precisamente o perfil de expressão da bactéria nas condições de co-cultivo, uma otimização do protocolo de extração de RNA das bactérias em co-culturas foi realizada. Diferentes métodos foram testados, e demonstrou-se que a adição de 0,01% de β -ME ao Trizol (Método III) foi a abordagem mais eficaz, resultando em RNA de alta concentração (até 909 ng/ μ L) e com excelentes parâmetros de pureza e integridade (Figura 2).



Figura 2 – Otimização do método para extração do RNA total de PA em co-cultura com AF. A quantificação de RNA foi realizada pelo Nanodrop

(tabela) e a integridade avaliada no Bioanalyzer (eletroferograma à direita). As amostras 1-6, provenientes de culturas de PA e AF processadas por três métodos, mostraram bandas nítidas de RNA ribossômico bacteriano (23S e 16S), indicando alta qualidade do material obtido.

Conclusões

A interação entre *P. aeruginosa* e *A. fumigatus* vai além de uma simples relação antagônica. A inativação do T1SS prejudicou o fungo, sugerindo um papel mutualístico ao fornecer benefícios por meio de efetores secretados. Este estudo amplia a compreensão das interações polimicrobianas clinicamente relevantes e reforça a necessidade de uma visão mais abrangente da ação bacteriana. Futuras análises transcriptômicas esclareceram os mecanismos moleculares dessa coexistência complexa.

Agradecimentos

Aos laboratórios da Prof^a. Dr^a. Regina Lúcia Baldini e do Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman pelo apoio e infraestrutura. Ao apoio financeiro da FAPESP, IQ-USP e ao CEPID B3.

Referências

1. Tacconelli, E. *et al.* Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* **18**, 318–327 (2018).
2. WHO Bacterial Priority Pathogens List 2024: Bacterial Pathogens of Public Health Importance(...) (World Health Organization, Geneva, 2024).
3. Amin, R., Dupuis, A., Aaron, S. D. & Ratjen, F. The Effect of Chronic Infection With *Aspergillus fumigatus* on Lung Function and Hospitalization in Patients With Cystic Fibrosis. *Chest* **137**, 171–176 (2010).
4. Ostapska, H. *et al.* Co-Operative Biofilm Interactions between *Aspergillus fumigatus* and *Pseudomonas aeruginosa* through Secreted Galactosaminogalactan Exopolysaccharide. *J. Fungi* **8**, 336 (2022).
5. Qin, S. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduct. Target. Ther.* **7**, 199 (2022).
6. Liberati, N. T. *et al.* An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 2833–2838 (2006).
7. Bastos, R. W. *et al.* Secondary Metabolites Produced during *Aspergillus fumigatus* and *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation. *mBio* **13**, e0185022 (2022).