

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia

Clênio Silva Cruz

**Impacto da deficiência em fibras dietéticas na infecção pulmonar causada por uma
cepa de *Klebsiella pneumoniae* resistente a antimicrobianos**

Belo Horizonte

2024

Clênio Silva Cruz

Impacto da deficiência em fibras dietéticas na infecção pulmonar causada por uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* resistente a antimicrobianos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Prof. Dra. Angélica Thomaz Vieira

Coorientadora: Dra. Mayra Fernanda Ricci

Belo Horizonte

2024

043

Cruz, Clênio Silva.

Impacto da deficiência em fibras dietéticas na infecção pulmonar causada por uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* resistente a antimicrobianos [manuscrito] / Clênio Silva Cruz. – 2024.

102 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof. Dra. Angélica Thomaz Vieira. Coorientadora: Dra. Mayra Fernanda Ricci.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Fibras na Dieta. 3. Microbiota. 4. Farmacorresistência Bacteriana. I. Vieira, Angélica Thomaz. II. Ricci, Mayra Fernanda. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE CLÊNIO SILVA DA CRUZ. Aos cinco dias do mês de março de 2024 às 08:30 horas, reuniu-se de forma “on line” utilizando a Plataforma “Zoom”, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “Impacto da deficiência em fibras dietéticas na infecção pulmonar causada por uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* resistente a antimicrobianos”, requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profª. Angélica Thomaz Vieira, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Flávia Figueira Aburjaile (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Luis Gustavo Carvalho Pacheco (Universidade Federal da Bahia), aprovado; Dra. Tatiani Ucelli Maioli (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Denise Fonseca (Universidade de São Paulo), aprovado; Dra. Mayra Fernanda Ricci - Coorientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Angélica Thomaz Vieira - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado:

☒ **APROVADO**

☐ **REPROVADO**

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 05 de março de 2024.

Dra. Flávia Figueira Aburjaile (UFMG)

Dr. Luis Gustavo Carvalho Pacheco (UFBA)

Dra. Tatiani Ucelli Maioli (UFMG)

Dra. Denise Fonseca (USP)

Dra. Mayra Fernanda Ricci - Coorientadora (UFMG)

Dedico a Sebastiana Cruz e Antônio Cruz. O amor que sinto por vocês é inexorável e permeia todas as esferas da minha existência.

AGRADECIMENTOS

A conclusão desta jornada representa a concretização de um sonho. Ao olhar para trás, vejo com clareza os inúmeros desafios que enfrentei e superei para alcançar este resultado. Sinto uma profunda alegria e satisfação ao reconhecer o quanto amadureci e evoluí ao longo deste processo.

Neste momento de gratidão, muitas pessoas se destacam como pilares fundamentais para a conclusão deste trabalho. Por mais que seja difícil expressar em palavras toda a minha gratidão, sinto-me compelido a "eternizar" algumas delas nesta página...

Primeiramente, agradeço à minha família nuclear, que é o meu porto seguro, meu refúgio em meio ao mundo, meu tudo.

Um agradecimento especial se direciona à minha orientadora, professora Angélica. Obrigado pela confiança depositada em mim e pelos inúmeros ensinamentos. Angel, foi sob sua orientação que descobri como ser cientista e como enfrentar todos os desafios que essa profissão proporciona.

Expresso minha gratidão a todos aqueles que fazem ou fizeram parte do meu querido LMI. Em particular (com todo amor e carinho), a Isabela Garbazza, Victor Melo, Elayne Cristina e Viviane Mendes. Não posso esquecer também de mencionar Izabela Galvão, João Victor, Laiza Martins, Érika Rosa e Anna Carolina. Obrigado pelo companheirismo, pelas risadas compartilhadas, pelos momentos de descontração, e, acima de tudo, por toda ajuda, incentivo e apoio ao longo dessa jornada.

À minha coorientadora, Dr^a Mayra Ricci, expresso minha gratidão pela paciência e apoio constantes que foram fundamentais para a conclusão desta tese.

Aos meus amigos de Pernambuco, Iris Costa, Adson Bernadino e Jéssica Lucena, que mesmo distante me apoiaram e me encorajaram incondicionalmente nos momentos mais simples e nos mais desafiadores.

A Álvaro, Maria Paula e Letícia. Meus amigos queridos de BH, vocês são especiais e inesquecíveis. A presença de vocês foi fundamental para que eu chegasse até aqui.

Agradeço também ao meu amigo Daniel Paiva, pelos conselhos, por ter compartilhado tetos e plantas comigo e por ter permanecido.

A Eduardo Leal, agradeço por todos os momentos compartilhados, pelo carinho e pelo apoio. Du, peço desculpas por todas as minhas falhas.

A todos que fazem parte do LABIO; em especial ao professor Dr. Flaviano Martins, expresso minha gratidão por todo o acesso irrestrito ao laboratório, que foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço também à Ilma e à dona Bete, por sua paciência e pelo suporte técnico essencial, sem os quais este trabalho não teria sido possível.

A todos os professores do ICB da UFMG que contribuíram para a minha formação acadêmica.

Ao professor Dr. Vasco Ariston, agradeço pela disponibilidade da *K. pneumoniae* B31 utilizada neste estudo.

A equipe de limpeza, aos seguranças, aos porteiros e demais técnicos do ICB.

Por fim, agradeço ao CNPq e ao Instituto Serrapilheira pelo financiamento deste trabalho, sem o qual não seria possível sua realização.

“(...) Os deuses se são justos na sua injustiça, nos conservem os sonhos ainda quando sejam impossíveis, e nos deem bons sonhos, ainda que sejam baixos. (...) Mudem-me os deuses os sonhos, mas não o dom de sonhar. (...)” (FERNANDO PESSOA, 1888-1935).

RESUMO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), até o ano de 2050, estima-se que aproximadamente 10 milhões de pessoas venham a falecer devido a infecções provocadas por microrganismos resistentes a antimicrobianos (RAM). Embora se reconheça a importância da microbiota intestinal para a saúde do hospedeiro, muitos estudos têm apontado a microbiota intestinal como um reservatório de genes de resistência antimicrobiana, denominado resistoma intestinal. Dietas industrializadas com baixo teor ou ausência de fibras resultam em desequilíbrios na diversidade e função da microbiota intestinal (disbiose), reduzindo a capacidade do hospedeiro de resistir a infecções provocadas por microrganismos patobiontes. Ademais, estudos tem demonstrado que essa industrialização pode impactar negativamente o resistoma intestinal, causando elevação na transferência horizontal de genes de resistência e consequentemente aumento na diversidade e abundância desses genes. Nesse contexto, investigamos o impacto de uma dieta deficiente em fibras no resistoma de cepas de *Enterobacteriaceae* intestinais e avaliamos a susceptibilidade do hospedeiro a infecções pulmonares causadas por *Klebsiella pneumoniae* RAM. Nossos achados sugerem que dietas com baixo teor de fibras induzem alterações na microbiota intestinal de camundongos C57BL/6, aumentando sua suscetibilidade a infecções pulmonares por *K. pneumoniae* resistente a antimicrobianos. Além disso, dietas ausentes em fibras aumentam a frequência de *Escherichia coli* e *K. pneumoniae* com fenótipo de resistência intermediária aos antibióticos estreptomicina e ciprofloxacino. Após 15 dias da infecção pulmonar, observamos um aumento de *Enterobacteriaceae* resistentes a ampicilina na microbiota intestinal. Interessantemente, ao realizarmos transplante fecal para camundongos germ-free, observamos o mesmo perfil de susceptibilidade à infecção pulmonar por *K. pneumoniae* resistente a antimicrobianos naqueles que receberam as fezes dos animais C57BL/6 convencionais alimentados com dietas carentes em fibras. Além disso, após a infecção desses animais, observamos também uma redução nos níveis de propionato nas fezes, juntamente com um aumento de *Enterobacteriaceae* cultiváveis resistentes a ampicilina, ceftriaxona e ciprofloxacino no intestino, e um aumento na frequência de *E. coli* com fenótipo de resistência intermediária aos antibióticos estreptomicina e ciprofloxacino. Em conclusão, esses resultados reforçam a hipótese de que a microbiota intestinal é um importante reservatório de genes de resistência, destacando-se o fato de que um desequilíbrio nutricional pode favorecer a expansão do resistoma no hospedeiro após um quadro de infecção por bactérias RAM. Compreender o resistoma intestinal e os fatores que impactam em sua composição e estrutura é essencial para o desenvolvimento de estratégias de controle da resistência antimicrobiana.

Palavras-chave: fibras dietéticas; microbiota; eixo intestino-pulmão; resistoma.

ABSTRACT

According to the World Health Organization (WHO), it is estimated that approximately 10 million people will die from infections caused by antimicrobial-resistant microorganisms (AMR) by the year 2050. While the importance of the intestinal microbiota to host health is recognized, many studies have pointed to the intestinal microbiota as a reservoir of antimicrobial resistance genes, known as the intestinal resistome. Industrialized diets low in fiber content or lacking fiber result in imbalances in the diversity and function of the intestinal microbiota (dysbiosis), reducing the host's ability to resist infections caused by pathobiont microorganisms. Moreover, studies have shown that this industrialization can negatively impact the intestinal resistome, leading to an increase in horizontal transfer of resistance genes and consequently an increase in the diversity and abundance of these genes. In this context, we investigated the impact of a low-fiber diet on the resistome of intestinal *Enterobacteriaceae* strains and evaluated the host's susceptibility to lung infections caused by antimicrobial-resistant *Klebsiella pneumoniae*. Our findings suggest that low-fiber diets induce alterations in the intestinal microbiota of C57BL/6 mice, increasing their susceptibility to lung infections by antimicrobial-resistant *K. pneumoniae*. Furthermore, fiber-deficient diets increase the frequency of *Escherichia coli* and *K. pneumoniae* with intermediate resistance phenotypes to the antibiotics streptomycin and ciprofloxacin. Fifteen days after lung infection, we observed an increase in ampicillin-resistant *Enterobacteriaceae* in the intestinal microbiota. Interestingly, when performing fecal transplants to germ-free mice, we observed the same susceptibility profile to lung infection by antimicrobial-resistant *K. pneumoniae* in those receiving feces from conventionally fed C57BL/6 mice on low-fiber diets. Additionally, after infection of these animals, we also observed a reduction in propionate levels in the feces, along with an increase in cultivable *Enterobacteriaceae* resistant to ampicillin, ceftriaxone, and ciprofloxacin in the intestine, and an increase in the frequency of *E. coli* with intermediate resistance phenotypes to streptomycin and ciprofloxacin. In conclusion, these results reinforce the hypothesis that the intestinal microbiota is an important reservoir of resistance genes, highlighting the fact that nutritional imbalance may favor the expansion of the resistome in the host following an infection by AMR bacteria. Understanding the intestinal resistome and the factors that impact its composition and structure is essential for developing strategies to control antimicrobial resistance.

Keywords: dietary fiber; microbiota; gut-lung axis; resistome.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Visão geral dos principais gêneros microbianos no trato respiratório e gastrointestinal	17
Figura 2 - Eubiose e disbiose no eixo intestino-pulmão	19
Figura 3 - Fatores de virulência e estratégias de evasão do sistema imunológico encontrados na <i>K. pneumoniae</i>	22
Figura 4 - Resumo geral dos principais mecanismos de resistência a antimicrobianos	23
Figura 5 - Padronização do modelo de disbiose intestinal induzida por dieta ausente em fibras	38
Figura 6 - Composição da microbiota fecal cultivável de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta controle e dieta PF	40
Figura 7 - Fenótipo de resistência de <i>Escherichia coli</i> isoladas de camundongos C57BL/6 não infectados	42
Figura 8 - Aumento da suscetibilidade de camundongos C57BL/6 a infecção pulmonar por <i>K. pneumoniae</i> resistente a antimicrobianos	44
Figura 9 - Composição da microbiota fecal cultivável de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta controle e dieta PF e infectados com <i>K. pneumoniae</i> B31	46
Figura 10 - Fenótipo de resistência de <i>Escherichia coli</i> e <i>K. pneumoniae</i> isoladas de camundongos C57BL/6 após a infecção por <i>K. pneumoniae</i> resistente a antimicrobianos	48
Figura 11 - Quantificação de <i>Enterobacteriaceae</i> resistente a ampicilina após 15 dias de infecção pulmonar por <i>K. pneumoniae</i> B31 e efeito de SCFAs sobre o crescimento da <i>K. pneumoniae</i> B31	50
Figura 12 - Transferência fecal para camundongos germ-free	53
Figura 13 - Dosagem de SCFAs nas fezes de camundongos germ-free	54
Figura 14 - Quantificação de bactérias aeróbias e <i>Enterobacteriaceae</i> resistente aos antibióticos ampicilina, ceftriaxona e ciprofloxacino	56

Figura 15 - Avaliação do fenótipo de resistência a antimicrobianos de cepas de <i>Enterobacteriaceae</i> isoladas de camundongos GF antes da infecção	58
Figura 16 - Avaliação do fenótipo de resistência a antimicrobianos de cepas de <i>Enterobacteriaceae</i> isoladas de camundongos GF após infecção	60
Figura 17 - Esquema experimental da análise do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de cepas de <i>Enterobacteriaceae</i> isoladas de indivíduos controles e pós-COVID	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição e porcentagem de macro e micronutrientes das dietas controle (AIN93 padrão) e dieta PF (AIN93 ausente em fibras).	<u>31</u>
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARGs	Genes de Resistência a Antimicrobianos
BAL	Lavado Bronco-Alveolar
CDC	Centro de Controle de Doenças
CDI	Inibição Dependente de Contato
CEUA	Comissão de Ética no Uso Animal
CFU	Unidades Formadoras de Colônias
CLR	Receptores de Lectina do Tipo C
COVID-19	Doença do Coronavírus 19
EPO	Peroxidase Eosinofílica
ESKAPE	<i>Enterococcus, Staphylococcus, Klebsiella, Acinetobacter, Pseudomonas, Enterobacter</i>
GPRs	Receptores Acoplados à Proteína G
HGT	Transferência Horizontal de Genes
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IP	Intraperitoneal
LPS	Lipopolissacarídeos
MALDI ToF	Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz
MDR	Resistência Multidrogas
MPO	Mieloperoxidase
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente à Meticilina
NIH	National Institute of Health
NLRs	Receptores Similares ao Domínio de Oligomerização Ligante de Nucleotídeo
ONU	Organização das Nações Unidas
PBPs	Proteína Ligadora de Penicilina
PRRs	Receptores de Reconhecimento de Padrões
RAM	Patógenos Resistentes a Antimicrobianos
SARS-CoV-2	Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave
SCFAs	Ácidos Graxos de Cadeia Curta
TGI	Trato Gastrointestinal
TLRs	Receptores do Tipo Toll
TR	Trato Respiratório
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Breve introdução a microbiota do trato gastrointestinal e respiratório.....	15
1.2 Resistoma: destaque para <i>Klebsiella pneumoniae</i> carreadoras de genes de resistência a antimicrobianos de relevância clínica.....	19
1.3 Dietas e resistoma intestinal.....	25
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivo geral:.....	29
3.2 Objetivos específicos:.....	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1 Animais.....	30
4.2 Dieta e grupos experimentais.....	30
4.3 Bactérias, condições de cultivo e infecção.....	31
4.4 Transferência fecal para camundongos germ-free (FMT).....	31
4.5 Ensaio da função intestinal - Motilidade gastrointestinal total.....	32
4.6 Microbiota fecal cultivável.....	32
4.7 Isolamento das cepas de <i>Enterobacteriaceae</i>	33
4.8 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos por disco difusão.....	33
4.9 Análise do fenótipo de resistência da comunidade de bactérias aeróbias e <i>Enterobacteriaceae</i> cultiváveis de camundongos germ-free.....	34
4.10 Identificação por MALDI-TOF.....	34
4.11 Avaliação do processo inflamatório pulmonar.....	35
4.12 Coleta e processamento histológico.....	35
4.13 Ensaio de MPO.....	36
4.14 Dosagem ácidos graxos de cadeia curta fecal (SCFAs).....	36
4.15 Pesquisa envolvendo seres humanos.....	36
4.16 Análise estatística.....	37
5. RESULTADOS.....	38
5.1 Dieta pobre em fibras não altera parâmetros clínicos e fisiológicos do hospedeiro.....	38
5.2 Influência da dieta ausente em fibras sobre a microbiota fecal cultivável de camundongos C57BL/6 convencionais.....	39
5.3 Fenótipo de resistência a antimicrobiano de espécies de <i>Enterobacteriaceae</i> isoladas dos camundongos dos grupos experimentais.....	41

5.4 Dieta deficiente em fibras aumenta a susceptibilidade de camundongos C57BL/6 convencionais a infecção por <i>Klebsiella pneumoniae</i> RAM.....	43
5.5 Influência da infecção por <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente a antimicrobianos na microbiota fecal cultivável de camundongos C57BL/6 alimentados com dietas controle e ausente em fibras.....	45
5.6 Fenótipo de resistência a antimicrobiano de espécies de <i>Enterobacteriaceae</i> isoladas após infecção pulmonar por <i>K. pneumoniae</i> RAM em camundongos C57BL/6 alimentados com dietas controle e ausente em fibras.....	47
5.7 Camundongos C57BL/6 alimentados com dietas ausente em fibras mantêm elevado a população de <i>Enterobacteriaceae</i> resistentes a ampicilina após 15 dias da infecção pulmonar por <i>K. pneumoniae</i> RAM.....	49
5.8 Transferência fecal para camundongos germ-free recapitula susceptibilidade à infecção pulmonar por <i>Klebsiella pneumoniae</i> observada em camundongos convencionais C57BL/6 alimentados com dietas ausente em fibras.....	51
5.9 Infecção pulmonar por <i>Klebsiella pneumoniae</i> RAM impacta a quantidade de bactérias aeróbias e <i>Enterobacteriaceae</i> resistentes a antimicrobianos presentes nas fezes de animais germ-free receptores das fezes de doadores alimentados com dietas PF.....	55
5.10 Transferência fecal demonstra diminuição de diversidade e mudanças no fenótipo de resistência a antimicrobianos de espécies de <i>Enterobacteriaceae</i>	57
5.11 Infecção por <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente a antimicrobianos pós transferência fecal, modifica o fenótipo de resistência a antimicrobianos de espécies de <i>Enterobacteriaceae</i>	59
5.12 Mudanças do resistoma da comunidade de <i>Enterobacteriaceae</i> intestinal humano após a infecção por SARS-CoV-2.....	61
6. DISCUSSÃO.....	63
7. CONCLUSÃO.....	70
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
ANEXOS.....	79

1. INTRODUÇÃO

1.1 Breve introdução a microbiota do trato gastrointestinal e respiratório

Microorganismos e mamíferos coevoluíram por milhões de anos, e durante este tempo diversas funções para sobrevivência de ambos foram definidas. Todas as superfícies e mucosas corporais estão associadas a microbiotas, comunidades complexas e dinâmicas de microrganismos (fungos, protozoários, helmintos, arqueas, bactérias e vírus) presentes em diferentes riquezas e abundâncias, que apresentam diferentes relações filogenéticas-ecológicas entre si e entre o hospedeiro (KIM et al., 2020; SHKOPOROV; HILL, 2019)

Em seres humanos, a composição taxonômica e função da microbiota é regulada por uma gama de fatores, tais como: idade, sexo biológico, genética do hospedeiro, sistema imune, doenças crônicas, inflamatórias e/ou infecciosas; fatores geosocioeconômicos, convívio com animais domesticados, tempo de nascimento (premature ou a termo), modo de parto (cesária ou vaginal), uso de substâncias químicas (terapêuticas e recreativas), estilo de vida (ativo ou sedentário) e dieta (COELHO et al., 2021; DE STEENHUIJSEN PITERS; BINKOWSKA; BOGAERT, 2020; MAN; DE STEENHUIJSEN PITERS; BOGAERT, 2017; ROBERTSON et al., 2019)

Alterações na dinâmica de colonização microbiana nos primeiros dias e meses de vida, especialmente devido à proliferação de patógenos ou patobiontes (microrganismos que causam infecções quando há desequilíbrio na relação microbiota-hospedeiro) e ao uso de agentes antimicrobianos, têm consequências profundas na predisposição do hospedeiro a desenvolver diversas doenças na fase adulta. Esse contexto ressalta o impacto negativo da colonização inadequada da microbiota na elevação da susceptibilidade a doenças em fases posteriores da vida do hospedeiro (PATTARONI et al., 2018; WU et al., 2021)

Dentre as microbiotas presentes no hospedeiro, destacam-se aquelas associadas ao trato respiratório (TR) e gastrointestinal (TGI) (Figura 1). O TR é composto por diferentes órgãos (narinas, passagens nasais, seios paranasais, nasofaringe e orofaringe, traqueia, brônquios, bronquíolos e alvéolos) que juntos compõem uma das maiores áreas de mucosa do corpo humano, medindo aproximadamente 70 m² (SCHITTNY, 2017). Porém, com aproximadamente 10-100 bactérias por 1.000 células humanas este sistema,

é uma das superfícies corporais menos colonizadas, composta principalmente por microrganismos pouco abundantes e transitórios (MAN; DE STEENHUIJSEN PITERS; BOGAERT, 2017).

A microbiota do TR em indivíduos saudáveis, apresenta diferenças significativas na composição taxonômica, diversidade, riqueza e função quando comparada a microbiota do TGI. Apesar dos filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* serem os mais abundantes tanto na microbiota do TGI quanto na microbiota do TR, a níveis taxonômicos inferiores a composição de ambas microbiotas diferem drasticamente (SENDER; FUCHS; MILO, 2016). No TR os gêneros bacterianos mais abundantes e que constituem o “core” da microbiota saudável são principalmente *Streptococcus* spp., *Veillonella* sp., *Prevotella* sp., *Haemophilus* sp. e *Moraxella* sp. Ademais, em estado de disbiose (desequilíbrio da composição taxonômica e função da microbiota); vírus, incluindo rinovírus, bocavírus, poliomavírus e adenovírus; e fungos, como *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Candida* spp. e *Alternaria* spp., podem ser encontrados em grande abundância (LIMON; SKALSKI; UNDERHILL, 2017; PAPADOPOULOS; SKEVAKI, 2006).

No TGI de indivíduos saudáveis, a microbiota é composta por microrganismos residentes, bem estabelecidos e abundantes, pertencentes principalmente aos gêneros *Bacteroides* sp., *Faecalibacterium* sp., *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. Ademais, é possível encontrar bactérias residentes em baixa abundância, como as da família *Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae* e *Streptococcaceae* que destacam-se por serem microrganismos patobiontes (HORNEF, 2015; SANTACROCE et al., 2020).

Em um estado de eubiose, que representa um equilíbrio composicional e funcional da microbiota com o hospedeiro, as microbiotas associadas ao TR e ao TGI atuam na prevenção da proliferação excessiva e/ou colonização de patógenos e patobiontes a partir de mecanismos de antagonismo diretos e indiretos conhecidos como Resistência à Colonização (CABALLERO-FLORES; PICKARD; NÚÑEZ, 2023).

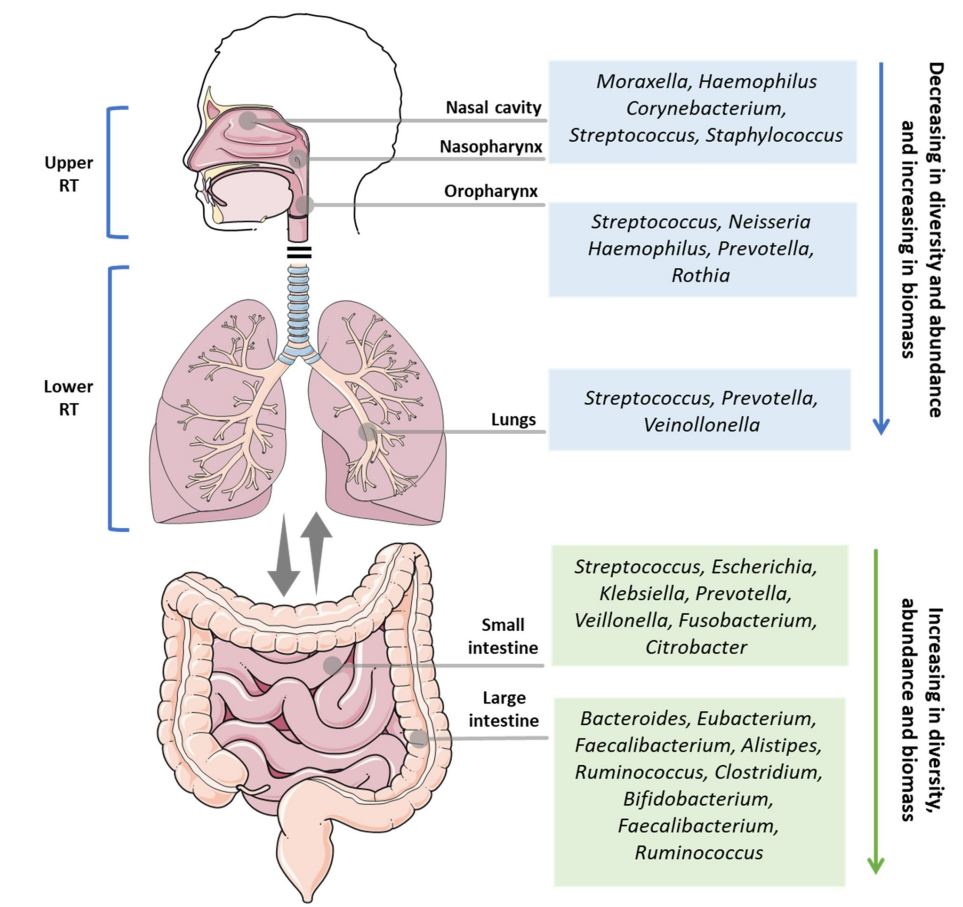


Figura 1. Visão geral dos principais gêneros microbianos no trato respiratório superior (cavidade nasal, nasofaringe, orofaringe), trato respiratório inferior (pulmões), intestino delgado e intestino grosso. TR: trato respiratório. Fonte: CRUZ; RICCI; VIEIRA, 2021.

Através do antagonismo direto bactérias simbiotes podem consumir macro e micronutrientes dietéticos e se aderir ao epitélio e muco para privar patógenos e patobiontes de locais de adesão e moléculas cruciais para seu crescimento. Ademais, a inibição direta do crescimento de patógenos e patobiontes pela microbiota simbiótica pode ocorrer por meio da inibição dependente de contato (CDI) ou pela secreção de moléculas como ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs), bacteriocinas e peptídeos antimicrobianos como as defensinas, lectinas tipo-C e lisozimas (GEITANI et al., 2020).

De forma indireta (antagonismo indireto), a resistência à colonização se dá principalmente através da regulação do sistema imune por meio da ativação de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) e receptores sensoriais metabólicos, como os receptores acoplados à proteína G (GPCRs). Os PRRs incluem os receptores do

tipo *toll* (TLRs), receptores de lectina do tipo C (CLRs), receptores semelhantes ao domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos (NLRs) e sensores citosólicos de DNA e RNA. A ativação dos PRRs induz a produção de quimiocinas e citocinas essenciais para o recrutamento de células imunológicas como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos, que orquestram respostas imunes homeostáticas e protetoras contra patógenos e patobiontes (BELKAID; HAND, 2014; ZHENG; LIWINSKI; ELINAV, 2020). Além da ativação dos PRRs, os GPCRs possuem papel importante na regulação da resposta imune contra patógenos e patobiontes. Os SCFAs exercem efeitos imunomoduladores locais e sistêmicos, por meio da ativação de receptores acoplado à proteína G (*G protein-coupled receptors* - GPRs) 41, 43 e 109A (GPR41, GPR43 e GPR109A) contribuindo, dentre outros mecanismos, para a redução da inflamação e manutenção da barreira intestinal (MASLOWSKI et al., 2009).

A conexão funcional entre a microbiota intestinal e pulmonar encontra sua expressão máxima no eixo intestino-pulmão, um importante sistema de comunicação e interação entre o TR e o TGI, que desempenha um papel crucial na manutenção da saúde do hospedeiro (CRUZ; RICCI; VIEIRA, 2021). Estudos clínicos têm demonstrado que alterações na composição da microbiota intestinal podem desencadear distúrbios imunológicos e inflamatórios aumentando a susceptibilidade a doenças pulmonares crônicas, como asma e doença pulmonar obstrutiva crônica e doenças infecciosas (ALCAZAR et al., 2022; LI et al., 2021; LIN; ZHU; ZHANG, 2023; LOVERDOS et al., 2019). Esses dados têm sido corroborados com estudos experimentais que sugerem que a disbiose intestinal contribui para o aumento da susceptibilidade a infecções no TR, e, que infecções no TR podem resultar em disbiose intestinal. Nesses estudos tem-se demonstrado que os principais mecanismos envolvidos no aumento da susceptibilidade a infecções estão relacionados a diminuição da produção de SCFAs intestinais, redução da permeabilidade da barreira intestinal e de células imunes regulatórias, assim como aumento da produção de mediadores pró-inflamatórios (ICHINOHE et al., 2011; PANG et al., 2018; SENCIO et al., 2020; YILDIZ et al., 2018). Neste eixos as células e moléculas bioativas se movem de forma bidirecional entre o TR e o TGI, através dos vasos sanguíneos e linfáticos (ANTUNES et al., 2019; DANG; MARSLAND, 2019; GALVÃO et al., 2018) (Figura 2).

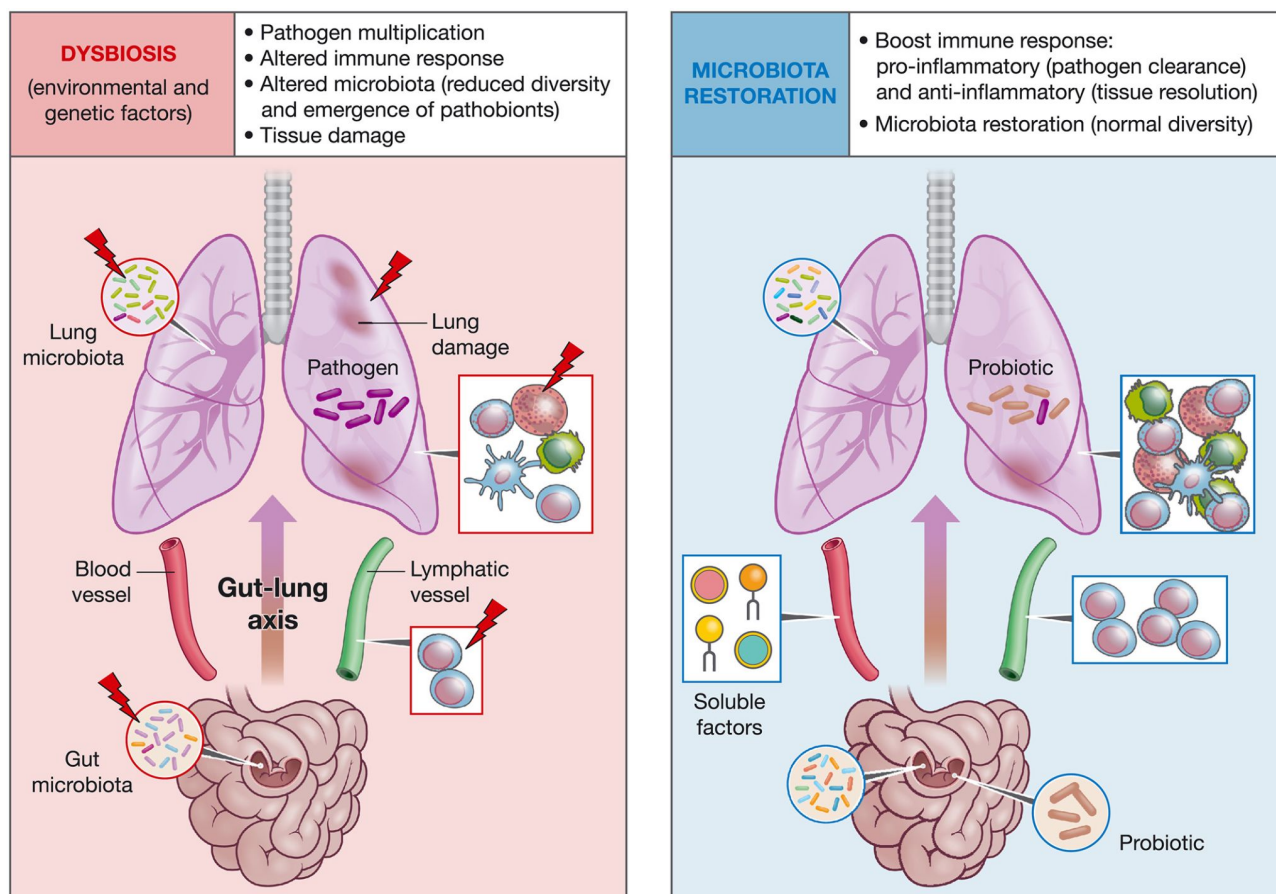


Figura 2. Eubiose e disbiose no eixo intestino-pulmão. Através da exposição de ligantes estruturais como lipopolissacarídeos (LPS) e/ou peptidoglicano e a produção de metabólitos secretados, como ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs), a microbiota intestinal saudável induz respostas imunológicas locais homeostáticas. A atividade dos linfócitos circulantes é afetada pelos metabólitos ingeridos e pelos microrganismos invasores, auxiliando no controle de respostas imunes sistêmicas. Os sinais usualmente derivados da microbiota, são alterados quando ocorre a quebra da estrutura e função da microbiota intestinal, como durante uma doença ou exposição a antibióticos, e isso impacta a resposta imunológica local e sistêmica. De forma contrária a disbiose da microbiota intestinal em adultos pode resultar em inflamação sistêmica e na proliferação de infecções oportunistas, o que pode induzir a inflamação crônica em locais extra intestinais. Fonte: ASHIQUE et al., 2022.

1.2 Resistoma: destaque para *Klebsiella pneumoniae* carreadoras de genes de resistência a antimicrobianos de relevância clínica

A emergência e disseminação de patógenos resistentes a antimicrobianos (RAM) representam uma séria ameaça à capacidade humana de combater infecções. De acordo com um relatório divulgado pela Organização das Nações Unidas (ONU), até 2025 estima-se que 10 milhões de pessoas anualmente podem perder a vida devido a infecções causadas por microrganismos RAM. Anualmente, cerca de 700.000 pessoas de diferentes continentes e estratos sociais perdem suas vidas devido a infecções causadas

por microrganismos RAM (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015). No Brasil, cerca de 40% das doenças infecciosas bacterianas são causadas por microrganismos resistentes a antibióticos (SOUZA et al., 2015).

Além disso, estudos indicam que a pandemia de COVID-19 impulsionou o aumento da resistência a antimicrobianos. Dados dos EUA disponibilizados pelo CDC (Centro de Controle de Doenças), entre março de 2020 e outubro de 2020, revelam que quase 80% dos pacientes hospitalizados com COVID-19 receberam algum tipo de antibiótico, principalmente azitromicina e ceftriaxona prescritas de forma conjunta ou isolada, sem nenhuma comprovação científica quanto à eficácia no tratamento da infecção por SARS-CoV-2 (LANGFORD et al., 2023; RAWSON et al., 2020). Isso pode ter contribuído para o aumento nas infecções causadas por patógenos RAM, associados diretamente a piores desfechos clínicos, internação mais prolongada e aumento de mortalidade (KARIYAWASAM et al., 2022; LOBIE et al., 2021).

Com o avanço das técnicas de biologia molecular, sequenciamento de alto rendimento e ferramentas computacionais, agora compreendemos que a microbiota intestinal atua como um reservatório altamente dinâmico de genes de resistência a antimicrobianos (ARGs), denominado resistoma intestinal (DOORDUIJN et al., 2016; MCINNIS et al., 2020). A composição do resistoma está intrinsecamente ligada à composição taxonômica da microbiota, mas os fatores que moldam sua dinâmica estão apenas começando a ser compreendidos. Assim como a microbiota intestinal, no início da vida o resistoma é adquirido principalmente de fontes maternas. Com o tempo, a abundância de ARGs no resistoma infantil tende a diminuir, acompanhando principalmente as mudanças na composição da microbiota devido principalmente a alterações na dieta (PÄRNÄNEN et al., 2018, 2022; PATANGIA et al., 2022).

O resistoma intestinal humano, torna-se importante através de duas ideias principais: 1 – a compreensão de como e quais fatores contribuem para a dinâmica do resistoma, nos prediz como as bactérias intestinais vão responder ao tratamento com antimicrobianos; 2 – e como compartilharão sua resistência via HGT (*horizontal gene transfer* – HGT), com membros simbiotes da microbiota intestinal ou patobiontes de interesse clínico (CRITS-CHRISTOPH et al., 2022). É interessante citar que, apesar de ocorrer de forma prolixa entre procariotos, a HGT dá-se principalmente entre microrganismos que compartilham o mesmo microambiente ecológico e que são próximos filogeneticamente (SMILLIE et al., 2011; VAN HOEK et al., 2011).

De forma interessante, os principais microrganismos que carregam genes de resistência, são microrganismos considerados patobiontes (ROWAN-NASH et al., 2020). Neste contexto, para orientar a pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos, a OMS publicou uma lista de microrganismos patobiontes multirresistentes, para os quais novas terapias e antibióticos são urgentemente necessárias. Nesta lista, destacam-se as bactérias ESKAPE, acrônimo para: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. (além de *Escherichia coli* e *Streptococcus pneumoniae*). As bactérias do grupo ESKAPE são responsáveis por uma gama de infecções, incluindo aquelas do sistema urinário e digestivo, sepse, infecções sexualmente transmissíveis e infecções da pele (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016).

No grupo ESKAPE, a *K. pneumoniae*, um bastonete Gram-negativo, destaca-se como o microrganismo mais prevalente isolado de pacientes com pneumonia nosocomial e comunitária. Além da pneumonia, a *K. pneumoniae* é responsável por diversas outras doenças incluindo sepse, meningite, abscessos hepáticos e infecções do trato urinário em indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos (CHANG et al., 2021). A *K. pneumoniae*, ao contrário de patógenos oportunistas, está presente na microbiota intestinal como um microrganismo patobionte. Os patobiontes estão associados a condições inflamatórias crônicas, uso de antibióticos e dietas ocidentalizadas, ao contrário de patógenos oportunistas que frequentemente causam infecções agudas e geralmente são adquiridos do ambiente comunitário (HORNEF, 2015). A patogenicidade e infecciosidade da *K. pneumoniae* está intrinsecamente ligada aos diversos fatores de virulência que subvertem os mecanismos de defesa do hospedeiro, estes incluem: cápsulas mucosas, lipopolissacarídeos (LPS) de parede celular, adesinas e sistemas de captação de ferro (XU; SUN; MA, 2017) (Figura 3).

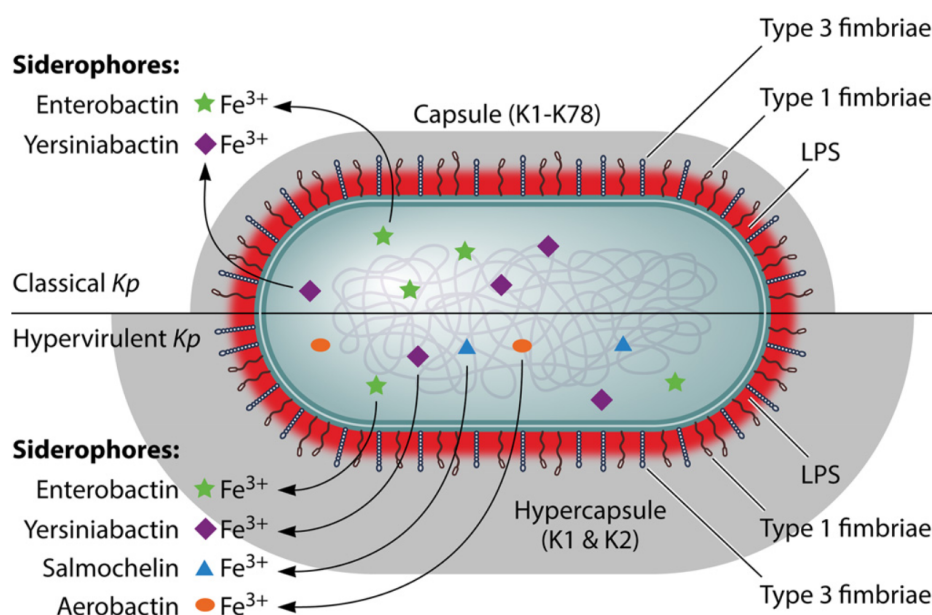


Figura 3. Fatores de virulência e estratégias de evasão do sistema imunológico encontrados na *K. pneumoniae*. A *K. pneumoniae* patogênica apresenta quatro fatores de virulência bem estabelecidos: cápsula, LPS, fímbrias (tipo 1 e tipo 3) e sideróforos. A cápsula consiste em uma matriz polissacarídica extracelular que envolve as bactérias, conferindo-lhes resistência e proteção contra as defesas do hospedeiro. Cepas clássicas de *K. pneumoniae* produzem cápsulas que podem ser de qualquer um dos sorotipos K1 a K78, com os sorotipos K1 e K2 sendo particularmente associados a uma maior virulência. O LPS, um componente essencial da membrana externa, também desempenha um papel crucial na patogenicidade da *K. pneumoniae*. Ele pode variar em seus sorotipos de O-antígenos de 1 a 9, influenciando sua interação com o sistema imunológico do hospedeiro. Além disso, a bactéria produz fímbrias do tipo 1 e tipo 3, estruturas adesivas que facilitam a colonização e a formação de biofilmes nos tecidos hospedeiros. Outro mecanismo importante é a secreção de sideróforos, moléculas que sequestram o ferro do ambiente circundante, essencial para o crescimento bacteriano. Entre os sideróforos produzidos pela *K. pneumoniae*, a enterobactina é amplamente sintetizada por quase todas as cepas, enquanto a yersiniabactina é produzida por aproximadamente metade das cepas clássicas e a maioria das cepas hipervirulentas. Fonte: PACZOSA; MECSAS, 2016

Os mecanismos de resistência aos antimicrobianos presentes na *K. pneumoniae*, se enquadram em diversas categorias, incluindo inativação/alteração do antibiótico, modificação dos sítios/alvos de ligação do antibiótico e mudanças na permeabilidade celular resultando em menor acúmulo intracelular do medicamento (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016) (Figura 4).

A *K. pneumoniae* está cada vez mais associada à resistência aos β -lactâmicos através da produção de β -lactamases, sendo esta a principal forma de resistência a antimicrobianos encontrado nesta bactéria. Essas enzimas atuam hidrolisando o anel β -lactâmico que está presente em todos os antibióticos da classe homônima, como penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (BUSH; BRADFORD, 2020). Embora as β -lactamases possam ser codificadas no cromossomo bacteriano, a utilização expressiva desses antimicrobianos na clínica humana e animal, associada ao

processo de pressão seletiva, impulsionou a disseminação de genes de resistência, por meio de elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons (PARTRIDGE et al., 2018).

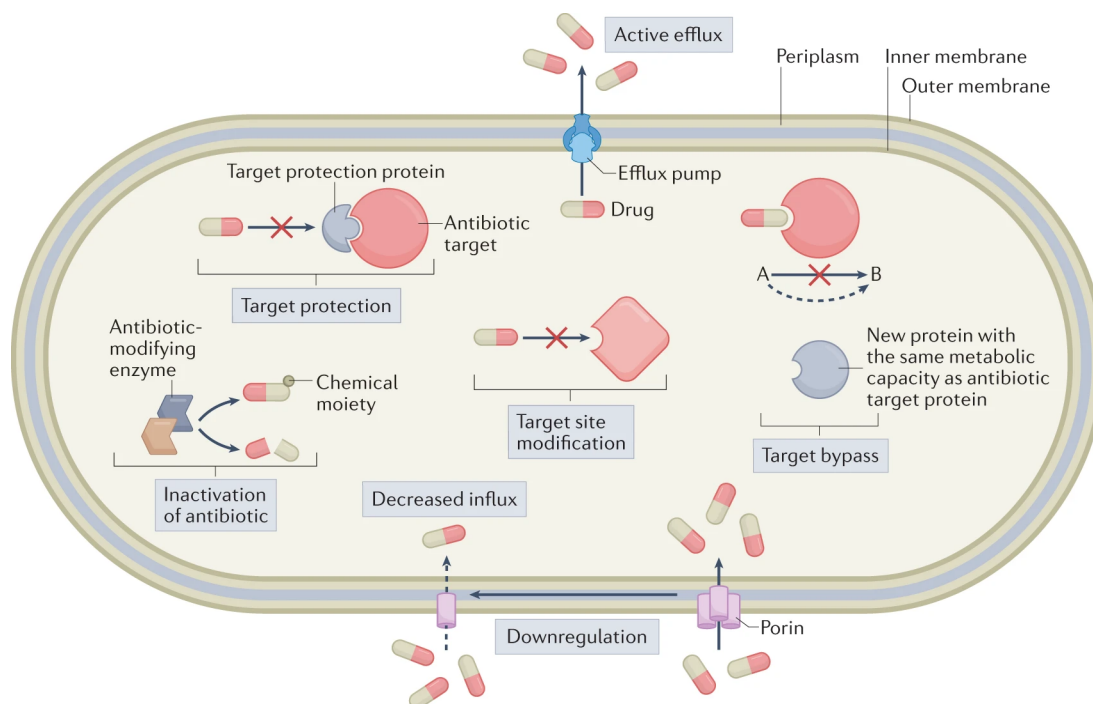


Figura 4. Resumo geral dos principais mecanismos de resistência a antimicrobianos. A degradação enzimática implica na hidrólise do grupo funcional do antibiótico, tornando-o ineficaz, ou na transferência de vários grupos químicos para o antibiótico, o que impede sua ligação ao alvo. A alteração do local de ligação implica na modificação do alvo do antibiótico por meio de mutações no gene que codifica a proteína alvo da molécula de antibiótico ou alteração enzimática do sítio de ligação. No caso do "target bypass", a função do alvo do antibiótico é desempenhada por uma nova proteína não inibida pelo antibiótico, tornando o alvo original redundante e o antibiótico ineficaz. Além disso, pode haver diminuição do influxo do antibiótico devido à regulação negativa de porinas nas membranas celulares. O efluxo ativo é facilitado por bombas de efluxo transmembranares, que exportam antibióticos para fora das células bacterianas, reduzindo sua concentração intracelular. Fonte: DARBY et al., 2023.

A classificação das β -lactamases, fundamentada no sistema de Ambler, categoriza essas enzimas em quatro classes principais: A, B, C e D. As classes A, C e D são serina β -lactamases, enquanto a classe B compreende as metalo- β -lactamases (CASTANHEIRA; SIMNER; BRADFORD, 2021). A *K. pneumoniae* é reconhecida por ser portadora frequente de β -lactamases da classe A. Exemplos notáveis dessas enzimas incluem os genes blaSHV, blaTEM, blaCTX-M e KPC, conferindo amplo espectro de ação contra penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos (EJAZ et al., 2021). No contexto da classe B, cepas de *K. pneumoniae* podem abrigar genes como blaNDM, blaIMP e blaVIM, cujas enzimas hidrolisam antibióticos carbapenêmicos (ALIZADEH et al., 2021;

ALSHAHRANI et al., 2022; KUMARI et al., 2021). A classe C, representada pelo gene *blaAmpC*, também desempenha papel significativo na resistência, pois as β -lactamases produzidas por esses genes são notáveis pela capacidade de hidrolisar cefalosporinas, penicilinas e inibidores tradicionais de β -lactamase, como clavulanato, sulbactam e tazobactam (JACOBY, 2009). Por outro lado, as β -lactamases da classe D, codificadas pelo gene *blaOXA*, são comuns em *K. pneumoniae* e frequentemente conferem resistência a oxacilina, cefalosporinas e carbapenêmicos (eficácia inibitória inferior àquela promovida pelas carbapenemases das classes A ou B) (MENG et al., 2023).

Adicionalmente, certas bactérias podem sofrer mutações nos genes responsáveis pela codificação das proteínas-alvo de vários antibióticos, modificando sua estrutura e tornando-as menos acessíveis ou menos propensas a se ligarem a esses antibióticos. Isso resulta na redução da eficácia do medicamento contra essas bactérias. A diminuição da suscetibilidade aos antibióticos β -lactâmicos, por exemplo, é conferida por mutações nos genes que codificam as proteínas de ligação à penicilina (*Penicillin binding protein* - PBPs). As PBPs são enzimas normalmente presentes na parede celular bacteriana, desempenhando um papel fundamental na montagem e controle das etapas finais da formação dessa estrutura (ALI et al., 2021). Mecanismo similar é visto na resistência aos antibióticos quinolônicos, que inibem enzimas topoisomerases essenciais na replicação do DNA. Substituições de aminoácidos nas proteínas-alvo, resultam em menor eficiência de ligação dos antibióticos quinolônicos, permitindo simultaneamente o funcionamento da enzima e a resistência a esses antibióticos (BUSH et al., 2020). Esse mecanismo pode ser observado na *K. pneumoniae* a partir da presença de mutações em genes que codificam as topoisomerases (GEETHA et al., 2020; ZHAN et al., 2021).

A redução da permeabilidade da membrana celular bacteriana à entrada de antibióticos é uma estratégia adotada por certas bactérias para desenvolver resistência a essas moléculas, impedindo assim que alcancem concentrações letais no interior da célula bacteriana. Este fenômeno está frequentemente associado a modificações na estrutura da membrana externa bacteriana, como por exemplo diminuição da expressão ou mutações em porinas, proteínas transmembranares responsáveis pela difusão de metabólitos. Quando há uma modificação na expressão das porinas, a permeabilidade aos antibióticos pode ser reduzida, dificultando a entrada dessas substâncias na célula bacteriana (ZHOU et al., 2023). Um exemplo notável desse mecanismo é encontrado em algumas cepas de *K. pneumoniae* que são parcialmente resistentes aos antibióticos β -lactâmicos devido a modificações na estrutura das porinas como por exemplo a OmpK35

e a OmpK36. Mutações nessas proteínas levam a uma constrição estrutural significativa do poro que resulta em resistência a esses antibióticos (WONG et al., 2019).

A redução da permeabilidade também pode ser acompanhada pelo desenvolvimento de sistemas de efluxo, proteínas transmembranas que transportam antibióticos para fora da célula de maneira dependente de energia, diminuindo assim a concentração interna dessas substâncias a níveis não letais. O impacto dos diferentes sistemas de efluxo em medicamentos específicos varia, com alguns proporcionando níveis elevados e outros baixos níveis de resistência (NAZAROV, 2022). Os genes *tetA* e *tetB*, encontrado em certas cepas de *K. pneumoniae*, são exemplos desse fenômeno, conferindo resistência à tetraciclina, um antibiótico crítico na medicina humana devido ao seu alto uso (BOKAEIAN et al., 2014).

Outro mecanismo de resistência, a estratégia de desvio de alvo (*target bypass* - TB) é uma abordagem que envolve a criação de uma rota alternativa que contorna a ação do antibiótico tornando o alvo original redundante. Isso pode ocorrer por meio da aquisição de genes alternativos similares aos da via original capaz de conferir as propriedades necessárias à célula mas que induzem a formação de uma proteína diferente da original, sendo esta nova proteína resistente a ação do antibiótico (DARBY et al., 2023). Um exemplo notável de TB é observado no desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA). No caso do *S. aureus* MRSA, a bactéria pode adquirir uma PBP exógena, conhecida como PBP2a, que é homóloga ao alvo original, mas apresenta menor afinidade pelos antibióticos β -lactâmicos. Essa proteína é codificada pelo gene *mecA*, também conhecido como gene resistente à metilicina, localizado no elemento genético móvel denominado SCCmec (LARSEN et al., 2022).

Os mecanismos de resistência, que vão desde a inativação de antibióticos até a formação de biofilmes, evidenciam a notável adaptabilidade bacteriana e a HGT emerge como um componente crítico na disseminação desses mecanismos. Essa dinâmica evolutiva bacteriana apresenta um desafio adicional na busca por terapias eficazes. Assim, a compreensão abrangente desses mecanismos é crucial para orientar a pesquisa e o desenvolvimento de novas terapias antimicrobianas, enfrentando a crescente ameaça da resistência a antibióticos que afeta diretamente a capacidade humana de combater infecções.

1.3 Dietas e resistoma intestinal

O contínuo processo de industrialização na dieta humana, impulsionado pelos avanços na indústria alimentar e pelas demandas da sociedade contemporânea, resultou na produção de alimentos com menor valor nutricional e funcional (RAKHRA et al., 2020). Neste contexto, as fibras alimentares foram um dos nutrientes que mais sofreram impactos, tanto na quantidade consumida quanto na qualidade nutricional. As fibras alimentares são carboidratos de origem primariamente vegetal que não são metabolizados por enzimas digestivas codificadas no genoma humano e que são utilizadas principalmente por microrganismos da microbiota intestinal que possuem a maquinaria enzimática necessária para realizar as reações de fermentação destes carboidratos (CRONIN et al., 2021; FU et al., 2022; WILLIAMS et al., 2017). Assim, a industrialização da dieta exerce um impacto negativo significativo na composição e abundância de diversos membros da microbiota intestinal.

Comparando populações humanas, estudos indicam que estilos de vida industrializados estão relacionados a taxas mais altas de transferência horizontal de ARGs na microbiota intestinal em comparação com populações rurais (GROUSSIN et al., 2021). Indivíduos que se alimentam com dietas ricas em fibras e com quantidade limitada de proteínas animal, tendem a apresentar menor abundância de ARGs no intestino, pois as fibras “direcionam” a composição da microbiota para um estado mais anaeróbio obrigatório, reduzindo os espaços para aeróbios e anaeróbios facultativos, conhecidos por portarem diversos ARGs de interesse clínico (OLIVER et al., 2022).

Corroborando a ligação do estilo dietético com resistoma intestinal, foi visto que alimentos prebióticos têm o potencial de reduzir a abundância de ARGs no resistoma intestinal. Um dos mecanismos pelo qual o prebióticos podem levar a essa redução é a mudança no metabolismo da microbiota que induz aumento de bactérias capazes de assimilar carboidratos complexos como aquelas do gênero *Bifidobacterium* spp. as quais exibem uma menor presença de ARGs. Além disso, prebióticos também reduzem a colonização intestinal por *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Escherichia*, gêneros bacterianos altamente associados a ARGs (WU et al., 2016). Essas descobertas indicam que a dieta desempenha um papel crucial na regulação do resistoma, moldando a composição da microbiota intestinal por meio do impacto no metabolismo bacteriano e do hospedeiro.

Evidencia-se também que as dietas exercem uma influência significativa na composição microbiana do trato gastrointestinal humano, o que por sua vez, impacta na

prevalência de diversas doenças (GROUSSIN et al., 2021). Em sociedades menos industrializadas e em áreas rurais, observa-se elevado consumo de alimentos ricos em fibras, em contraste com as sociedades das nações industrializadas. Nestas últimas, as chamadas "dietas ocidentais", caracterizadas pelo aumento de carboidratos simples e lipídios, associado à redução de fibras, estão cada vez mais relacionadas ao aumento de doenças metabólicas, inflamatórias e infecciosas (AGUS et al., 2016; LAS HERAS et al., 2022; SHI, 2019). Dietas ricas em fibras promovem a proliferação de bactérias simbiotes como exemplo bactérias segmentadas filamentosas, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, *Faecalibacterium* e *Akkermansia*, que podem limitar a adesão e crescimento de microrganismos patogênicos e patobióticos, manter a integridade da barreira intestinal e produzir SCFAs (CALATAYUD et al., 2021; CARVALHO-WELLS et al., 2010; SO et al., 2018; WALKER et al., 2011).

Ainda, de forma independente da microbiota intestinal, as fibras também afetam a função do intestino, gerando um aumento na produção de bolo fecal, diluição do conteúdo colônico, aumento do tempo de trânsito intestinal e aumento da absorção de vitaminas e minerais (CAI et al., 2020; PUHLMANN; DE VOS, 2022).

A industrialização da dieta, marcada por estilos de vida urbanizados e dietas ocidentais, impacta negativamente o resistoma intestinal, com taxas mais elevadas de transferência horizontal de genes de resistência antimicrobiana em populações industrializadas em comparação com populações rurais. Dietas ricas em fibras, associadas a populações rurais, reduzem a presença de ARGs, destacando o papel crucial da dieta na modelagem da microbiota intestinal e, conseqüentemente, do resistoma. A compreensão do resistoma intestinal é essencial para desenvolver estratégias de controle da resistência antimicrobiana, sendo a identificação de alvos terapêuticos e intervenções dietéticas e terapêuticas direcionadas à microbiota intestinal abordagens promissoras para preservar a eficácia dos antibióticos.

2. JUSTIFICATIVA

A emergência e disseminação de bactérias resistentes aos antimicrobianos (RAM) ameaça a nossa capacidade de tratar infecções bacterianas comuns e pode causar graves impactos econômicos e sociais ainda no século XXI. De acordo com a Organização das Nações Unidas (ONU), até 2025 estima-se que 10 milhões de pessoas anualmente podem perder a vida devido a infecções causadas por microrganismos RAM. Esses números foram agravados após a pandemia do SARS-CoV-2 devido ao uso sem comprovação científica quanto à eficácia de antibióticos macrolídeos e beta-lactâmicos no tratamento da infecção por SARS-CoV-2.

O trato gastrointestinal dos seres humanos é colonizado por um ecossistema microbiano altamente complexo e dinâmico, denominado de microbiota intestinal, que é fundamental para a homeostasia. A estrutura e função da microbiota intestinal é determinada por diversos fatores como por exemplo dieta, uso de antibióticos e infecções. Curiosamente, com a evolução de métodos computacionais e de biologia molecular, hoje sabemos que a microbiota intestinal também funciona como um reservatório de genes de resistência a antibióticos, o resistoma. Dentre os membros da microbiota intestinal que muito contribuem para a composição e estrutura do resistoma, destaca-se a família *Enterobacteriaceae* e o gênero *Klebsiella*, bacilos Gram negativos, patobiontes dos quais muitas cepas podem carrear e disseminar genes de resistência a antimicrobianos de interesse clínico.

Nesse cenário, nossa hipótese é que dietas com ausência de fibras dietéticas, além de contribuir para o aumento da resistência bacteriana aos antibióticos, também aumentam a susceptibilidade do hospedeiro a infecções pulmonares causadas por *Klebsiella pneumoniae* RAM.

Compreender as contribuições específicas de fatores dietéticos, como a deficiência da ingestão de fibras, para a resistência bacteriana é de suma importância, pois oferece *insights* valiosos sobre possíveis estratégias de prevenção e controle da disseminação de genes de resistência a antibióticos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Investigar o impacto de uma dieta deficiente em fibra dietética na microbiota intestinal e no resistoma intestinal, além de avaliar esse impacto na infecção pulmonar causada pela bactéria *Klebsiella pneumoniae* resistente a antimicrobianos.

3.2 Objetivos específicos:

Tendo em vista a importância de fibras dietéticas na composição e função da microbiota intestinal, objetivamos:

- Avaliar o impacto da deficiência de fibras na estrutura da microbiota de camundongos C57BL/6;
- Avaliar a influência da deficiência de fibras na susceptibilidade de camundongos C57BL/6 frente a infecção pulmonar induzida pela *Klebsiella pneumoniae* RAM;
- Avaliar a influência da deficiência de fibra no fenótipo de resistência a antimicrobianos de *Enterobacteriaceae* isoladas das fezes dos camundongos antes e após a infecção.

Para investigar as consequências das alterações da microbiota induzida pela deficiência de fibra dietética no hospedeiro, realizamos transferência fecal da microbiota para animais *germ-free* e objetivamos:

- Avaliar a susceptibilidade de camundongos *germ-free* frente a infecção pulmonar induzida pela *Klebsiella pneumoniae* RAM;
- Quantificar bactérias cultiváveis aeróbias e *Enterobacteriaceae* resistentes a antibióticos.
- Avaliar o fenótipo de resistência a antimicrobianos de *Enterobacteriaceae* isoladas das fezes dos camundongos antes e após a infecção.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Utilizamos camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 convencional, com idades entre 6 e 8 semanas, mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG). Ademais, utilizamos camundongos fêmeas germ-free Swiss/NIH, na mesma faixa etária, mantidas em isoladores plásticos flexíveis isentos de microrganismos, seguindo procedimentos clássicos de gnotobiologia no Laboratório de Gnotobiologia da UFMG. Ambas as linhagens foram mantidas sob condições padrões de criação, incluindo dieta padrão simples e água filtrada esterilizada *ad libitum*, umidade entre 60-80%, temperatura de 25°C, e um ciclo de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. Salientamos que todos os procedimentos experimentais foram submetidos à aprovação da Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA/UFMG, protocolo nº 281/2020).

4.2 Dieta e grupos experimentais

A dieta experimental para o grupo controle consistiu na ração padrão AIN93, mantendo quantidade padrão de fibras (GALLOTTI et al., 2021). Já para o grupo PF (dieta ausente em fibras), utilizamos a AIN93 como base, substituindo toda a celulose presente na dieta AIN93 controle por sacarose, sem a adição de outros tipos de fibras. A tabela abaixo (Tabela 1) detalha a composição e as porcentagens de cada componente das dietas controle e PF.

Realizamos dois experimentos independentes com os camundongos C57BL/6 convencionais. Em ambos, os animais foram divididos em dois grupos - dieta controle e dieta PF - e submetidos a essas dietas por 21 dias. No primeiro experimento, os animais foram infectados após o 21º dia de dieta, acompanhados por 48 horas e, em seguida, eutanasiados. No segundo experimento, os animais foram infectados após o mesmo período de dieta, acompanhados por 15 dias e, posteriormente, eutanasiados. Os camundongos germ-free Swiss/NIH receberam dieta padrão simples e água filtrada e esterilizada durante todo o experimento, incluindo o período após a transferência fecal. Após o período de estabilização da microbiota, os camundongos Swiss/NIH germ-free foram infectados e acompanhados por 48h e então eutanasiados.

Componentes	Dieta controle (quantidade em %)	Dieta PF (quantidade em %)
BHT	0,0008	0,0008
Bitartarato de colina	0,25	0,25
Cistina	0,18	0,18
Mix de vitaminas	1,0	1,0
Mix de minerais	3,5	3,5
Celulose	5,0	0,0
Óleo de soja	4,0	4,0
Sacarose	10,0	15,0
Maltodextrina	15,5	15,5
Caseína	14,0	14,0
Amido de milho	46,6	46,6

Tabela 1. Composição e porcentagem de macro e micronutrientes das dietas controle (AIN93 padrão) e dieta PF (AIN93 ausente em fibras).

4.3 Bactérias, condições de cultivo e infecção

A cepa utilizada neste estudo foi a *Klebsiella pneumoniae* B31, isolada do escarro de pacientes com pneumonia hospitalar, caracterizada por sua resistência a antimicrobianos, conforme descrito por Profeta et al. (2021). O processo de cultivo da cepa envolveu sua incubação em caldo BHI a 37°C por um período de 24 horas. Após esse período, as culturas foram submetidas à centrifugação e diluição, resultando em uma concentração final de 1×10^6 unidades formadoras de colônias (CFU). A infecção por *K. pneumoniae* B31 nos camundongos C57BL6 convencionais e Swiss/NIH germ-free, foi realizada após anestesia via intraperitoneal com solução de xilazina (15 mg/Kg) e cetamina (80 mg/Kg), administradas de acordo com o peso dos animais. Para a infecção, a traqueia dos animais foi exposta através de uma incisão na pele, e uma suspensão contendo 1×10^6 CFU de *K. pneumoniae* B31 foi injetada com o auxílio de agulha e seringa estéreis. A incisão na pele foi posteriormente fechada com sutura cirúrgica. A cepa de *K. pneumoniae* B31 foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo do Laboratório de Genética Molecular do ICB/UFMG.

4.4 Transferência fecal para camundongos germ-free (FMT)

A transferência fecal para os camundongos Swiss/NIH germ-free foi realizada utilizando fezes dos camundongos C57BL/6 convencionais, pertencentes aos grupos dieta controle e dieta PF não infectados. O material fecal de ambos os grupos, foram coletados

de forma asséptica, pesados, diluídos e homogeneizados em solução salina estéril 0,9% (w/v) na proporção de 100 mg de fezes para 1 mL de solução salina. Após homogeneização, a solução de fezes foi mantida a 4°C por 10 minutos, para precipitação dos componentes fecais insolúveis, e então, 100 µL do sobrenadante foram utilizados para realizar a gavagem nos camundongos Swiss/NIH germ-free. Antes da infecção, aguardamos 14 dias para permitir a estabilização da microbiota (MENDES DE ALMEIDA et al., 2023; VIEIRA et al., 2015).

4.5 Ensaio da função intestinal - Motilidade gastrointestinal total

Para estudar o tempo total de trânsito gastrointestinal foi utilizado o corante *vermelho carmim* (Merck, EUA), que não pode ser absorvido pelo lúmen intestinal. Uma solução de 300 µL de vermelho carmim a 6% suspenso em 0,5% de metilcelulose (Merck, EUA) foi administrado por gavagem aos camundongos. O tempo em que ocorreu a gavagem foi registrado. Após a gavagem, os grânulos fecais foram monitorados em intervalos de 10 min para verificar a presença do corante vermelho carmim. O tempo total de trânsito GI foi considerado em minutos como o intervalo entre a gavagem e o tempo da primeira visualização do corante vermelho carmim nas fezes.

4.6 Microbiota fecal cultivável

Para a análise quantitativa das populações da microbiota fecal, as fezes dos animais dos grupos dieta controle e dieta PF foram coletadas assepticamente em microtubos, pesadas, maceradas e diluídas em solução salina 0,9% (w/v). Posteriormente, 25µL da solução diluída foi plaqueada por esgotamento em diferentes tipos de agar microbiológicos, conforme se segue: Microbiota total: Ágar Sangue (Microgen®): utilizado para o cultivo de bactérias aeróbias. Ágar Sangue (Microgen®, EUA) suplementado com hemina e menadiona 1% v/v: utilizado para o cultivo de bactérias anaeróbias. Microbiota relativa: Ágar Manitol Salgado (Neogen®, EUA): utilizado para o isolamento de *Staphylococcus* spp. Ágar MacConkey (Sigma-Aldrich®, EUA): utilizado para o isolamento de *Enterobacteriaceae*. Ágar Bile Esculina (Neogen®, EUA): utilizado para o isolamento de *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp. Ágar Bacteroides Bile Esculina (Neogen®, EUA) suplementado de 0,1% v/v de gentamicina (Vigor®, Brasil): utilizado para o isolamento de *Bacteroides* spp. Ágar De Man, Rogosa e Sharpe (MRS)

(Acumedia®, EUA): utilizado em aerobiose para o isolamento de bactérias ácido lácticas e em anaerobiose para o isolamento de *Bifidobacterium* spp. As placas foram incubadas a 37°C, em condições de aerobiose ou anaerobiose, conforme a necessidade dos microrganismos de interesse, por um período de 24 a 72h, respectivamente. Após a incubação, as unidades formadoras de colônias (CFU) foram contadas, e os resultados foram expressos como Log 10 média $\pm$ SEM de CFU/mg de fezes.

4.7 Isolamento das cepas de *Enterobacteriaceae*

Após 24 horas de incubação a 37°C, colônias de *Enterobacteriaceae* a partir do ágar MacConkey (Sigma-Aldrich, NutriSelect® Basic), foram isoladas de cada grupo experimental com o auxílio de alças de semeio.. O isolamento foi realizado com base em critérios morfológicos da colônia, como tamanho, cor, brilho, relevo, forma e consistência. As colônias isoladas foram incubadas em caldo BHI (Merck®, EUA) durante 24 horas a 37°C e posteriormente semeadas novamente no ágar MacConkey para garantir a pureza do isolado. As colônias puras foram preservadas em BHI contendo glicerol (10%) a -20°C para uso nos testes subsequentes.

4.8 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos por disco difusão

Colônias de *Enterobacteriaceae* previamente isoladas, foram reativadas em ágar Muller-Hinton (MH) para obtenção de cultivo bacteriano recente. Com auxílio de alça bacteriológica, as colônias de cultivo bacteriano recente foram retiradas da placa e suspendidas em salina estéril até obtenção de turvação compatível com a concentração de 1×10^8 na escala MacFarland. Em seguida, um swab estéril foi embebido na solução bacteriana padronizada e estriado de forma suave por toda a superfície da placa de Petri para antibiograma (140x15mm) contendo ágar MH. Após 15 minutos, com auxílio de um dispensador (Thermo Scientific, Remel™, EUA), 12 discos (Thermo Scientific, Oxoid™, EUA) referentes aos antibióticos β -lactâmicos (amoxicilina-ácido clavulânico, cefalosporina, ertapenem, meropenem, imipenem), aminoglicosídeos (amicacina, estreptomicina, gentamicina), quinolonas (ciprofloxacino, levofloxacino, norfloxacino), sulfonamida e inibidores de folato (sulfametoxazol-trimetoprim) e macrolídeos (azitromicina) foram adicionadas às placas estriadas, respeitando distância entre eles para garantir que não houvesse sinergismo ou outros tipos de interação entre as drogas

testadas. Em seguida as placas foram incubadas a 37°C por 18h. Após esse período, foi observada a presença ou ausência de halos de inibição de crescimento; em caso de presença do halo foi realizada a medida do mesmo para determinação do fenótipo de resistência em: sensível, intermediário e resistente, de acordo com as diretrizes do manual Clinical & Laboratory Standards Institute (PERFORMANCE STANDARDS FOR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING, CLSI).

4.9 Análise do fenótipo de resistência da comunidade de bactérias aeróbias e *Enterobacteriaceae* cultiváveis de camundongos germ-free

Para isolar a comunidade de bactérias aeróbias, anaeróbias e *Enterobacteriaceae* resistentes presentes nas fezes dos animais Swiss/NIH germ-free, utilizamos placas de ágar sangue (Microgen®) suplementadas com os antibióticos ampicilina (32 µg/mL), ceftriaxona (64 µg/mL) e ciprofloxacino (4 µg/mL). As placas foram incubadas a 37°C, em condições de aerobiose, por um período de 24 horas. Após a incubação, as unidades formadoras de colônias (CFUs) foram contadas e os resultados foram expressos como média ± SEM de CFU/mg de fezes, com a aplicação do Log10 em concordância com o tipo de análise realizada.

4.10 Identificação por MALDI-TOF

Uma única colônia fresca de cada cepa de *Enterobacteriaceae* que foi submetida ao teste de susceptibilidade antimicrobiana, foi coletada com auxílio de alça bacteriana e espalhada sobre uma placa alvo de aço para MALDI TOF. Para cada colônia isolada, procedemos com a aplicação de 1 µL de ácido fórmico (70%) e 1 µL de matriz MALDI-TOF MS (solução saturada de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) - Bruker Daltonics, Alemanha). Essa mistura foi cuidadosamente depositada sobre as colônias e deixada à temperatura ambiente para secar. Os espectros foram adquiridos usando o espectrômetro de massa FlexControl MicroFlex LT (Bruker Daltonics, Alemanha) com um laser de nitrogênio de 60 Hz. Os critérios de pontuação para identificação em tempo real foram utilizados como recomendado pelo fabricante: pontuação ≥ 2.000 indica identificação em nível de espécie, pontuação ≥ 1.700 e < 2.000 indica identificação em nível de gênero e pontuação <1.700 indica identificação não confiável. A calibração do aparelho para as identificações, foi feita utilizando a cepa padrão *E. coli* DH5 alfa (Bruker Daltonics). Todas

as análises foram realizadas no Laboratório de Diagnóstico de Doenças dos Animais Aquáticos da Escola de Veterinária da UFMG.

4.11 Avaliação do processo inflamatório pulmonar

Imediatamente após a eutanásia, procedemos à coleta do lavado bronco-alveolar (BAL) para obtenção e quantificação de leucócitos do espaço alveolar. Este procedimento envolveu a inserção de 1 mL de tampão fosfato (PBS) esteril nas vias aéreas, utilizando um cateter intravenoso de calibre 20 acoplado a uma seringa de 1 mL. Posteriormente, o BAL foi submetido à centrifugação, e a quantidade de leucócitos foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. Após a coleta do BAL, procedemos à coleta dos pulmões e intestinos, os quais foram devidamente separados em alíquotas para análises subsequentes. Para a avaliação histopatológica, o tecido pulmonar foi processado e corado com hematoxilina e eosina para determinação do escore inflamatório a partir da inflamação das vias aéreas, vasos sanguíneos e parênquima.

4.12 Coleta e processamento histológico

O pulmão foi coletado para análises estruturais e patológicas associadas a infecção ou não por *K. pneumoniae*. Os camundongos foram anestesiados com overdose anestésica e logo após eutanasiados. Os órgãos foram retirados e submersos a uma solução de formalina neutra tamponada a 10% por 48 horas, desidratados gradativamente em etanol (80% e 90% e absoluto 1, 2, 3), para serem diafanizados em xilol (1, 2 e 3) cada um durante 30 minutos. Após esses processos, os tecidos foram incluídos em blocos de parafina cortados com 4-5 µm de espessura e fixados na lâmina de microscopia. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para avaliação de dano tecidual e infiltrado celular. As lâminas foram examinadas em microscópio óptico de campo de luz acoplado a um sistema de captura digital de imagens (Olympus BX43; Olympus Qcolor5). Para o escore histopatológico, foram selecionadas 20 imagens aleatórias por amostra de tecido com ampliação de 10X e, quando necessário para observar detalhes, foi utilizada ampliação de 40X. Para o escore histopatológico foram realizadas análises descritivas onde cada tecido recebeu pontuação ao critério avaliado. Onde: 0 = ausente; 1 = mínimo; 2 = leve; 3 = moderado; 4 = acentuado e 5 = grave. Os parâmetros avaliados no pulmão: inflamação das vias aéreas (0-4), inflamação vascular (0-4), inflamação do parênquima (0-

5). A avaliação foi realizada às cegas pelo patologista a fim de evitar viés que pudesse comprometer os resultados.

4.13 Ensaios de MPO

A presença de neutrófilos nos pulmões e intestinos, foi medido indiretamente através da quantificação da enzima mieloperoxidase (MPO). Para a quantificação da MPO, 100 mg do tecido pulmonar ou intestinal foram homogeneizados em 1.9 mL de PBS e centrifugado a 12.000 g por 10 min a 4°C. As amostras foram então ressuspensas em tampão contendo hexadeciltrimetilamônio (HTAB, 0.5% w/v) e submetidas a 3 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido. Após esses ciclos, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante coletado para o ensaio enzimático. Para o ensaio enzimático da MPO, o substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, Sigma, EUA) e H₂O₂ em tampão Tris-HCL foi usado, e a reação foi parada com H₂SO₄ 1M. A atividade da MPO foi calculada através da alteração da densidade óptica em 450 nm usando espectrofotômetro para microplacas (Epoch, BioTek Instruments, EUA).

4.14 Dosagem ácidos graxos de cadeia curta fecal (SCFAs)

Amostras fecais de camundongos foram suspensas em ácido fosfórico a 1% (1:6 peso:volume) (Merck, EUA), vortexadas e centrifugadas (20.000xg, 30 min, 4°C). Os sobrenadantes foram filtrados (0,22 µm) e injetados diretamente em um sistema de HPLC com uma coluna de resina de troca iônica 300×7,8 mm (Sigma, Alemanha) a 30°C com um cartucho Micro-Guard cation H⁺ (Sigma, Alemanha) e detector ajustado para 210 nm. A taxa de fluxo foi de 0,5 mL/min por 35 minutos, alterada para 0,7 mL/min até o final da corrida cromatográfica de 55 minutos. Curvas de calibração externa de sete pontos foram adotadas para quantificar as amostras fecais SCFAs de grau analítico (Sigma, Alemanha) como padrões.

4.15 Pesquisa envolvendo seres humanos

Foram coletadas fezes frescas de voluntários controle (saudáveis) e pós-COVID-19 (1 a 4 meses após diagnóstico positivo para SARS-CoV-2 por RT qPCR). Também aplicou-se um questionário sobre sintomas clínicos durante a COVID-19, uso de

medicamentos e estilo de vida. No total, foi incluído no estudo setenta e dois voluntários pós-COVID e cinquenta e nove voluntários controle. Todos os voluntários tinham idade entre 15 e 60 anos. Os critérios de exclusão da análise foram indivíduos vacinados para SARS-CoV-2 e que no momento da coleta das amostras apresentaram resultados positivos para os testes sorológicos. As amostras fecais, coletadas entre outubro de 2020 e abril de 2021 na região metropolitana de Belo Horizonte, foram coletadas e processadas para quantificação e isolamento de cepas de *Enterobacteriaceae*. Após o isolamento das cepas, elas foram identificadas por MALDI-ToF e submetidas a teste de susceptibilidade a antimicrobianos, como descrito anteriormente no tópico 4.8. Todos os indivíduos consentiram em participar deste estudo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP/UFMG, protocolo nº 4.615.69).

4.16 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Todos os resultados obtidos foram classificados pela análise de distribuição normal como dados normalmente distribuídos. As comparações entre médias foram feitas usando testes *t* Student não pareados (ou seja, não infectado vs. infectados). ANOVA two-away foi usada para comparações entre tratamentos e entre as dietas (Dieta controle x Dieta PF). Quando um valor *F* significativo foi encontrado, realizamos um teste post-hoc de acordo com o coeficiente de variação (CV): Tukey ($CV \leq 15\%$), Student Newman-Keuls (CV entre 15 - 30%) e Duncan ($CV > 30\%$).

5. RESULTADOS

5.1 Dieta pobre em fibras não altera parâmetros clínicos e fisiológicos do hospedeiro

Com o objetivo de avaliar o impacto de uma dieta deficiente em fibras, alimentamos camundongos C57BL/6 com duas dietas diferentes: 1 - dieta controle (Dieta controle) com quantidade normal de fibras (5% de fibras insolúveis - celulose) e 2 - dieta ausente de qualquer tipo de fibras (Dieta PF) (Fig. 5A). Observamos que os camundongos dos grupos Dieta controle e Dieta PF durante 21 dias (Fig.5B) não apresentaram diferenças significativas no ganho de massa ponderal entre si (Fig. 5C). Ademais, após esse período, não observamos diferenças significativas entre os grupos Dieta Controle e Dieta PF no tempo de trânsito intestinal (Fig. 5D) e na presença de células inflamatórias através da quantificação da enzima mieloperoxidase (MPO) no intestino delgado (Fig. 5E) e no cólon (Fig. 5F).

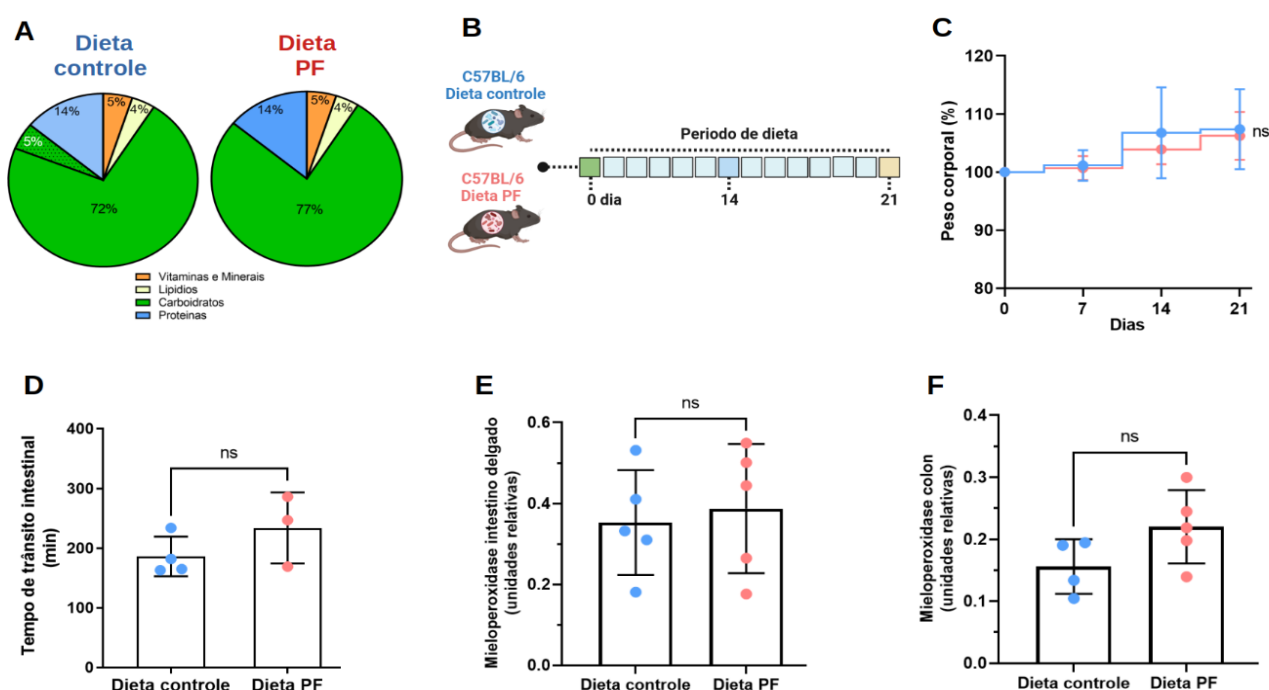


Figura 5. Padronização do modelo de disbiose intestinal induzida por dieta ausente em fibras. (A) Composição em percentagem (%) de macro e micronutrientes presentes na dieta controle e dieta PF. (B) Representação esquemática do período de dietas dos camundongos C57BL/6. (C) Evolução ponderal dos camundongos C57BL/6 submetidos às dietas controle e PF durante 21 dias. (D) Avaliação do tempo de trânsito intestinal dos camundongos C57BL/6 alimentados com dieta controle e dieta PF. Quantificação da enzima mieloperoxidase no (E) cólon (F) e no intestino delgado de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta controle e dieta PF. Azul: grupo dieta controle. Vermelho: grupo Dieta PF. As comparações estatísticas entre as médias foram feitas usando testes t de Student não pareado. ns = $p > 0.05$.

5.2 Influência da dieta ausente em fibras sobre a microbiota fecal cultivável de camundongos C57BL/6 convencionais

Para avaliação do impacto da dieta PF na composição da microbiota fecal cultivável de camundongos C57BL/6, utilizamos de métodos clássicos cultivo-dependente para quantificação dos principais membros cultiváveis que a compõem (Fig. 6A). Ao compararmos quantitativamente a microbiota fecal cultivável total dos grupos Dieta Controle e Dieta PF, não observamos diferenças significativas na quantidade de bactérias aeróbias totais (Fig. 6B), porém observamos aumento significativo na quantidade de bactérias anaeróbias totais (Fig. 6C) no grupo Dieta PF quando comparado ao grupo Dieta controle. Apesar de não termos observado aumento na quantidade de CFU de bactérias aeróbias e de não termos visto diferença significativa na quantidade de CFU das bactérias anaeróbias, quando avaliamos a alfa-diversidade (abundância relativa dentro do mesmo grupo analisado) observamos aumento de bactérias aeróbias (Fig. 6B) e diminuição de bactérias anaeróbias (Fig. 6C) no grupo Dieta PF quando comparado ao grupo Dieta Controle. Ao avaliarmos a microbiota relativa, observamos aumento significativo na quantidade de *Staphylococcus* (Fig. 6D), bactérias ácido lácticas (Fig. 6E), *Bifidobacterium* (Fig. 6F) e *Enterobacteriaceae* (Fig. 6A) no grupo Dieta PF comparado com o grupo Dieta Controle. Porém, não observamos diferenças significativas na quantidade de *Bacteroides* (Fig. 6G) entre os grupos. Quando avaliamos a alfa-diversidade, demonstrou-se aumento de *Staphylococcus* (Fig. 6D) e *Bifidobacterium* (Fig. 6F) e redução de bactérias ácido lácticas (Fig. 6E), *Bacteroides* (Fig. 6G) e *Enterobacteriaceae* (Fig. 3A) no grupo Dieta PF quando comparado ao grupo dieta controle.

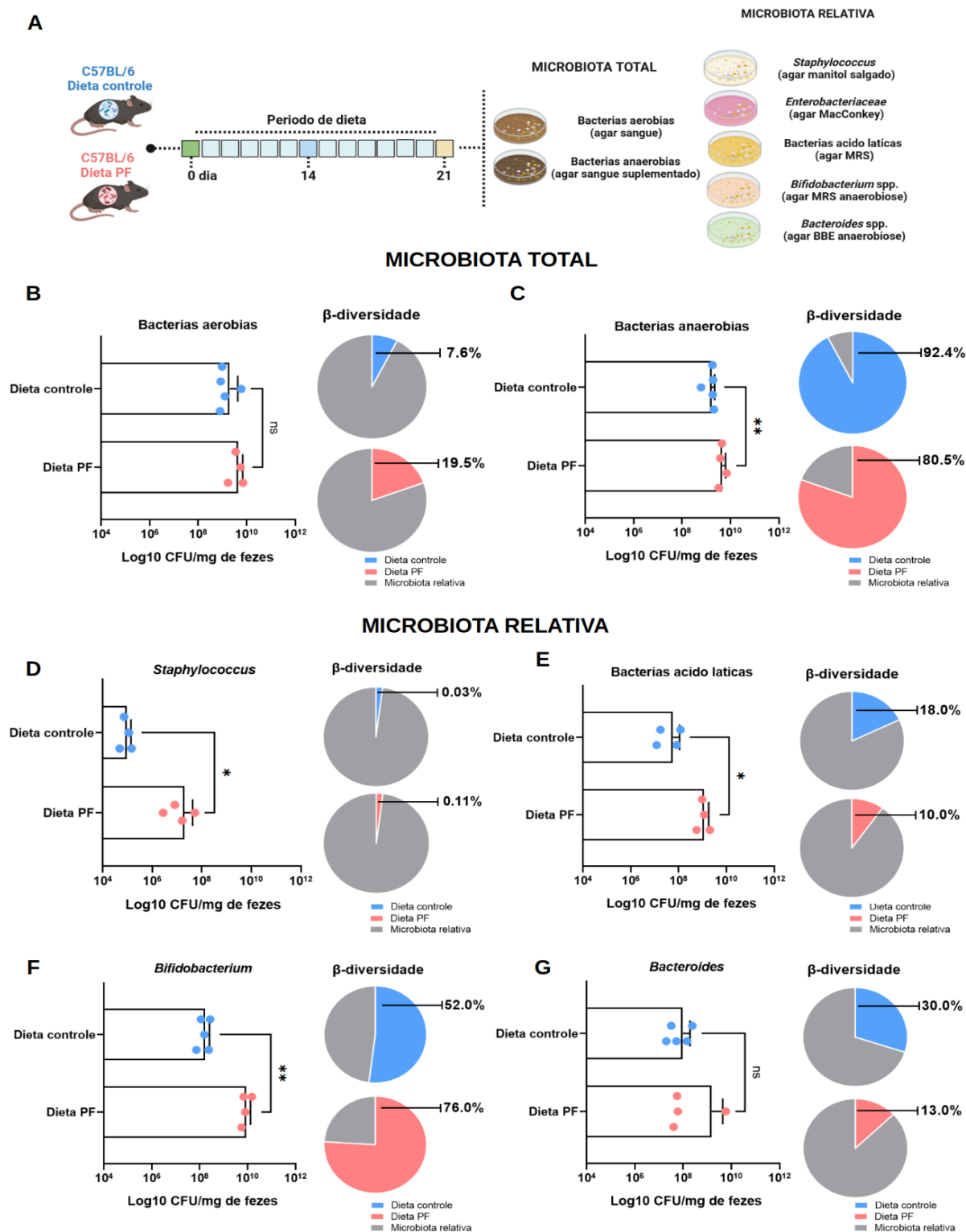


Figura 6. Composição da microbiota fecal cultivável de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta controle e dieta PF antes da infecção. (A) Para avaliação das populações bacterianas da microbiota fecal cultivável utilizamos de métodos clássicos cultivo-dependente para quantificação da microbiota total e relativa. Microbiota total: (B) bactérias aeróbias e (C) bactérias anaeróbias. Microbiota relativa: (D) *Staphylococcus* sp., (E) bactérias ácido láticas, (F) *Bifidobacterium* e (G) *Bacteroides*. Gráfico de barras mostra a quantificação de CFU/mg de fezes para cada grupo bacteriano e gráfico de pizza mostra a distribuição percentual da média de cada grupo dentro da microbiota total (A-B) e relativa (B-G). Azul: grupo Dieta Controle. Vermelho: grupo Dieta PF. As comparações estatísticas entre as médias foram feitas usando testes t de Student não pareado. ns = $p > 0.05$, * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$.

5.3 Fenótipo de resistência a antimicrobiano de espécies de *Enterobacteriaceae* isoladas dos camundongos dos grupos experimentais

Com intuito de avaliar o impacto de dietas ausentes em fibras no fenótipo de resistência a antimicrobianos de *Enterobacteriaceae*, após o período de dieta dos grupos Dieta Controle e Dieta PF, isolamos do ágar MacConkey diferentes cepas que foram identificadas e submetidas a teste de susceptibilidade a antimicrobianos (Fig. 7A). Quantitativamente, observamos aumento significativo de *Enterobacteriaceae* no grupo Dieta PF quando comparado ao grupo Dieta Controle. Ao avaliarmos a alfa-diversidade observamos aumento de *Enterobacteriaceae* no grupo Dieta PF comparado ao grupo Dieta Controle (Fig. 7B). No total, isolamos 5 cepas no grupo dieta controle e 4 cepas no grupo dieta PF, que após a identificação foram definidas como *Escherichia coli* (Fig. 7C). Após o teste de susceptibilidade a antimicrobianos, observamos diferenças no perfil de resistência do qual no grupo Dieta Controle, 20% das cepas isoladas de *E. coli* apresentavam fenótipo de resistência intermediário ao antibiótico ciprofloxacino (Fig. 7D) enquanto no grupo Dieta PF, 60% das cepas de *E. coli* isoladas apresentaram fenótipo de resistência intermediário ao antibiótico estreptomicina (Fig. 7E).

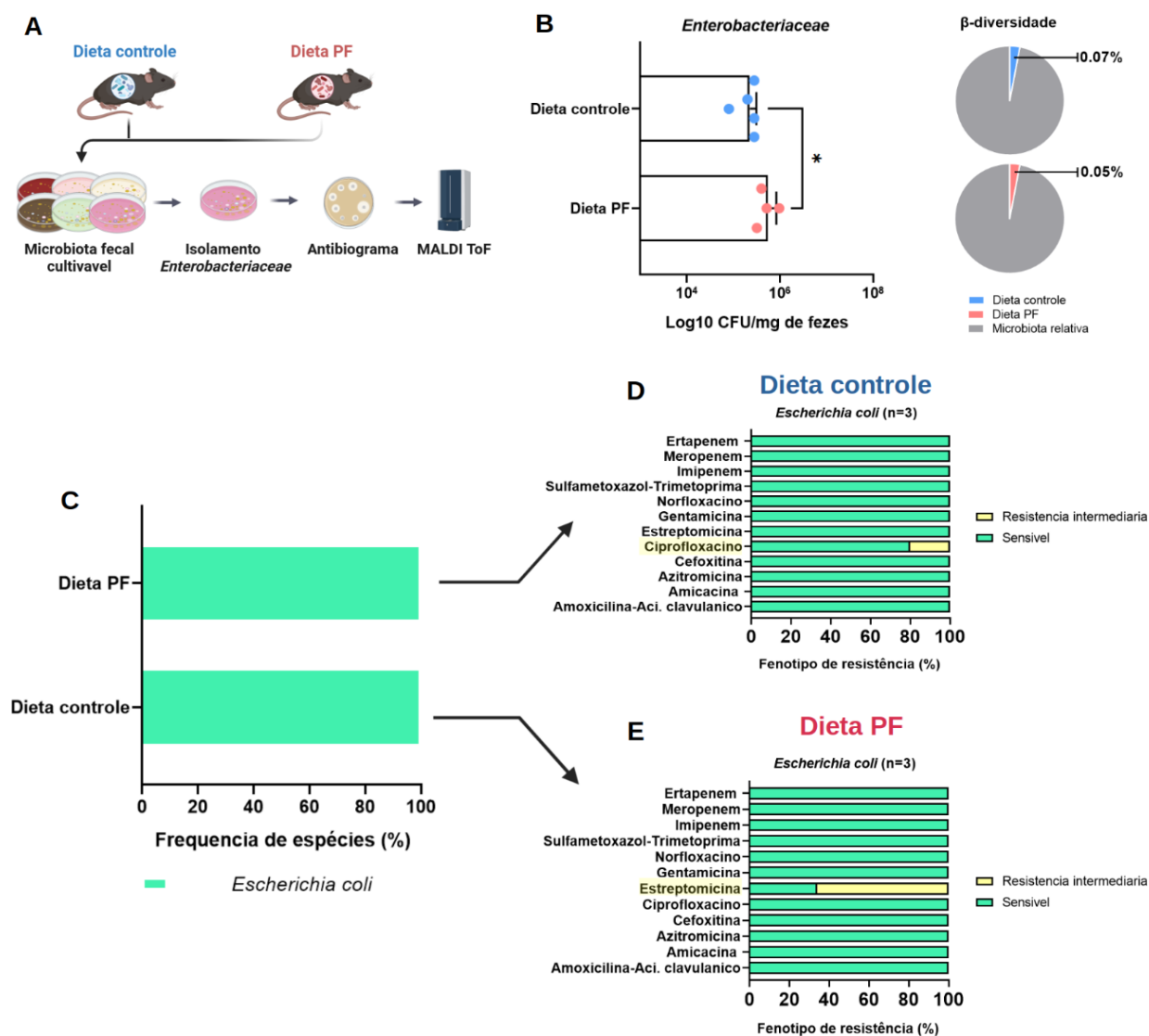


Figura 7. Fenótipo de resistência de *Escherichia coli* isoladas de camundongos C57BL/6 não infectados. (A) Esquema experimental da avaliação do fenótipo de resistência a antimicrobianos de cepas de *Enterobacteriaceae* isoladas de camundongos C57BL/6 alimentados com dietas controle e pobre em fibras. (B) Quantificação e análise relativa da população de *Enterobacteriaceae* nos camundongos do grupo Dieta Controle e Dieta PF. (C) Frequência de espécies de *Enterobacteriaceae* isoladas de animais alimentados com dietas controle e pobre em fibras submetidas à identificação por MALDI-ToF. Fenótipo de resistência ou susceptibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de animais alimentados com (D) Dietas Controle e (E) Pobre em Fibras. Gráficos de barras mostram a quantificação de CFU/mg de fezes, frequência de *E. coli* para cada grupo experimental e frequência de susceptibilidade aos antibióticos testados. Gráfico de pizza mostra a distribuição percentual da média de *Enterobacteriaceae* dentro da microbiota relativa. Azul: grupo Dieta Controle. Vermelho: grupo Dieta PF. As comparações estatísticas entre as médias foram feitas usando testes t de Student não pareado. * = $p < 0.05$.

5.4 Dieta deficiente em fibras aumenta a susceptibilidade de camundongos C57BL/6 convencionais a infecção por *Klebsiella pneumoniae* RAM

Com o intuito de avaliar o impacto da dieta pobre em fibras na susceptibilidade do hospedeiro a infecção pulmonar, infectamos camundongos C57BL/6 via traqueal com *K. pneumoniae* B31 (cepa RAM) (Fig. 8A). Após 48h de infecção, não observamos mortalidade entre os camundongos dos grupos Dieta Controle e Dieta PF (dados não mostrados). Porém, observamos maior perda ponderal no grupo Dieta PF quando comparado ao grupo Dieta Controle (Fig. 8B). A análise histopatológica do tecido pulmonar dos camundongos do grupo Dieta PF demonstrou maior infiltrado inflamatório tecidual nas regiões peribronquiolar (seta) quando comparado com animais do grupo Dieta Controle (Fig. 8C, painéis superiores). De forma correlata os camundongos do grupo Dieta PF não-infectados apresentaram maior quantidade de MPO pulmonar (Fig. 8F), porém, não observamos diferenças significativas no escore histopatológico do parênquima pulmonar geral (Fig. 8D) e na quantidade de leucócitos do lavado broncoalveolar (Fig. 8E), quando comparado aos camundongos do grupo Dieta Controle não-infectados. Após a infecção, observamos no grupo Dieta PF infectado maior infiltrado inflamatório peribronquiolar (setas) com comprometimento do parênquima pulmonar (asteriscos) quando comparado ao grupo Dieta Controle infectado (Fig. 8C, painéis inferiores). Ademais, houve aumento significativo no escore histopatológico do parênquima (Fig. 8D) no grupo Dieta PF infectado quando comparado ao grupo Dieta Controle infectado. Porém, não observamos diferença significativa entre ambos os grupos, no número de leucócitos do lavado bronco-alveolar (Fig. 8E) e na quantidade da enzima MPO pulmonar (Fig. 8F). Ademais, não observamos diferença significativa na quantidade de MPO do cólon (Fig. 8G) e do intestino delgado (Fig. 8H) dos camundongos C57BL/6 não-infectados e infectados alimentados com dieta controle e dieta PF.

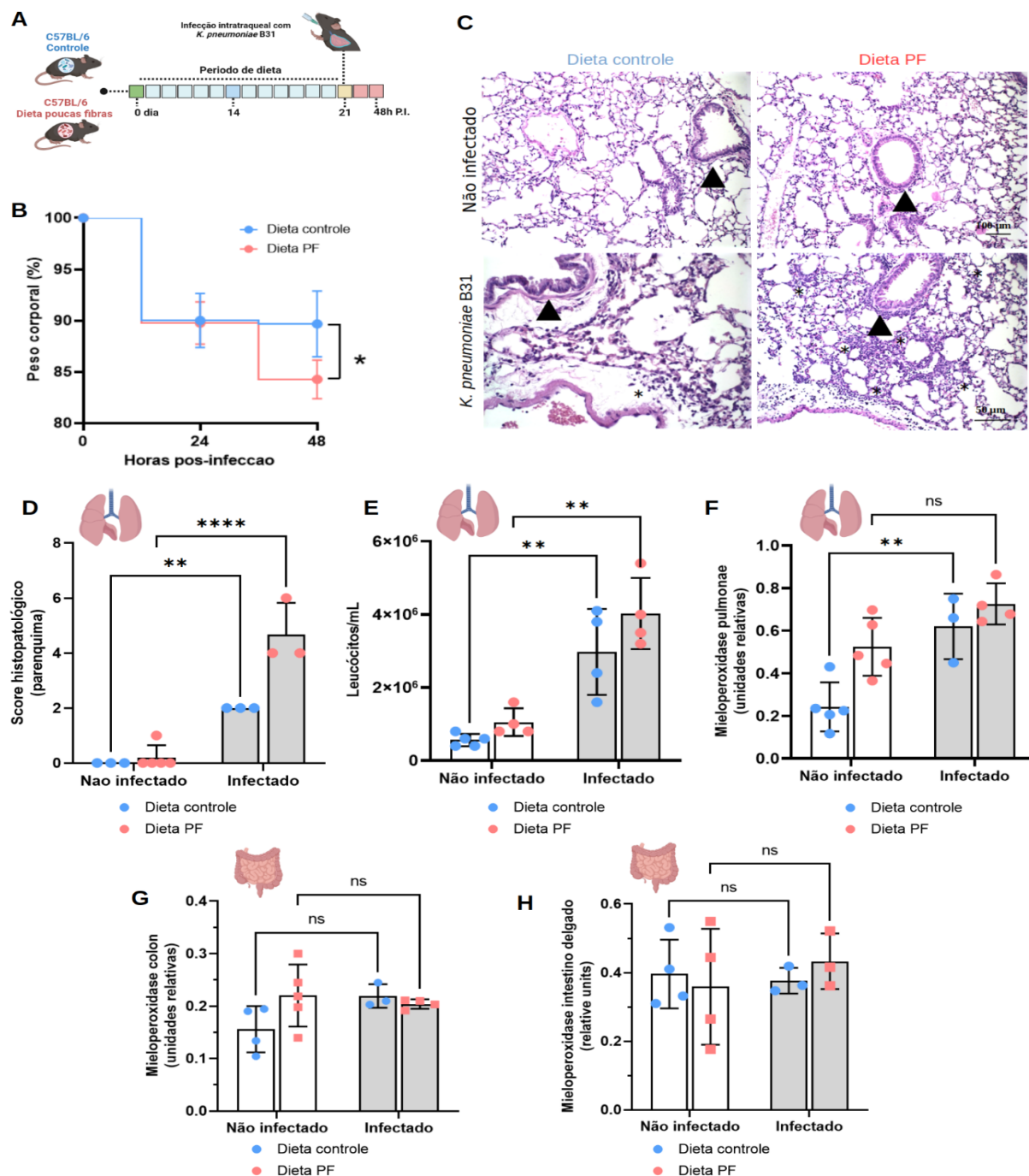


Figura 8. Aumento da suscetibilidade de camundongos C57BL/6 a infecção pulmonar por *K. pneumoniae* resistente a antimicrobianos. (A) Camundongos C57BL/6 foram alimentados com dieta controle e dieta PF por 21 dias e então foram infectados via intratraqueal com *K. pneumoniae* B31 e acompanhados durante 48h. (B) Evolução ponderal dos camundongos dos grupos Dieta Controle e Dieta PF após a infecção. (C) Fotomicrografia do tecido pulmonar. (D) Escore histopatológico do parênquima pulmonar de camundongos C57BL/6 não-infectados e infectados dos grupos Dieta Controle e Dieta PF. (E) Leucócitos do lavado bronco-alveolar de camundongos C57BL/6 não-infectados e infectados dos grupos Dieta Controle e Dieta PF. (F) Quantificação da enzima mieloperoxidase (MPO) pulmonar de camundongos C57BL/6 não-infectados e infectados dos grupos Dieta Controle e Dieta PF. Quantificação da enzima mieloperoxidase (MPO) do cólon (G) e do intestino delgado (H) de camundongos C57BL/6 não-infectados e infectados dos grupos Dieta Controle e Dieta PF. Azul: grupo Dieta Controle. Vermelho: grupo Dieta PF. Barras brancas: animais não-infectados. Barras cinzas: animais infectados. As comparações estatísticas entre as médias foram feitas usando testes t de Student não pareado. ns = $p > 0.05$; ** = $p < 0.01$; **** = $p < 0.0001$. Objetiva 20x. Setas indicam infiltrado inflamatório.

5.5 Influência da infecção por *Klebsiella pneumoniae* resistente a antimicrobianos na microbiota fecal cultivável de camundongos C57BL/6 alimentados com dietas controle e ausente em fibras

Com o intuito de avaliar como a infecção pulmonar induzida por *K. pneumoniae* B31, em camundongos C57BL/6 alimentados com dieta controle e dieta ausente em fibras, impactaria a composição e estrutura dos principais membros cultiváveis que compõem a microbiota fecal, utilizamos o mesmo método cultivo-dependente descrito anteriormente (Fig. 9A). Ao compararmos quantitativamente a microbiota fecal cultivável total dos grupos Dieta Controle e Dieta PF, não observamos diferenças significativas entre os grupos Dieta Controle e Dieta PF na quantidade de bactérias aeróbias totais (Fig. 9B) e na quantidade de bactérias anaeróbias totais (Fig. 9C). Ao avaliarmos a alfa-diversidade, observamos aumento de bactérias aeróbias e diminuição de bactérias anaeróbias no grupo Dieta PF (Fig. 9B) comparado ao grupo Dieta Controle. Ao avaliarmos quantitativamente a microbiota relativa, não observamos aumento significativo entre os grupos Dieta Controle e Dieta PF na quantidade de *Staphylococcus* (Fig. 9D), bactérias ácido lácticas (Fig. 9E), *Bifidobacterium* (Fig. 9F), *Bacteroides* (Fig. 9G) e *Enterobacteriaceae* (Fig. 9A). A análise da alfa-diversidade da microbiota relativa demonstrou aumento de bactérias ácido lácticas (Fig. 9E) e *Bifidobacterium* (Fig. 9F) e redução de *Staphylococcus* (Fig. 9D), *Bacteroides* (Fig. 9G) e *Enterobacteriaceae* (Fig. 9A) no grupo Dieta PF quando comparado ao grupo Dieta Controle.

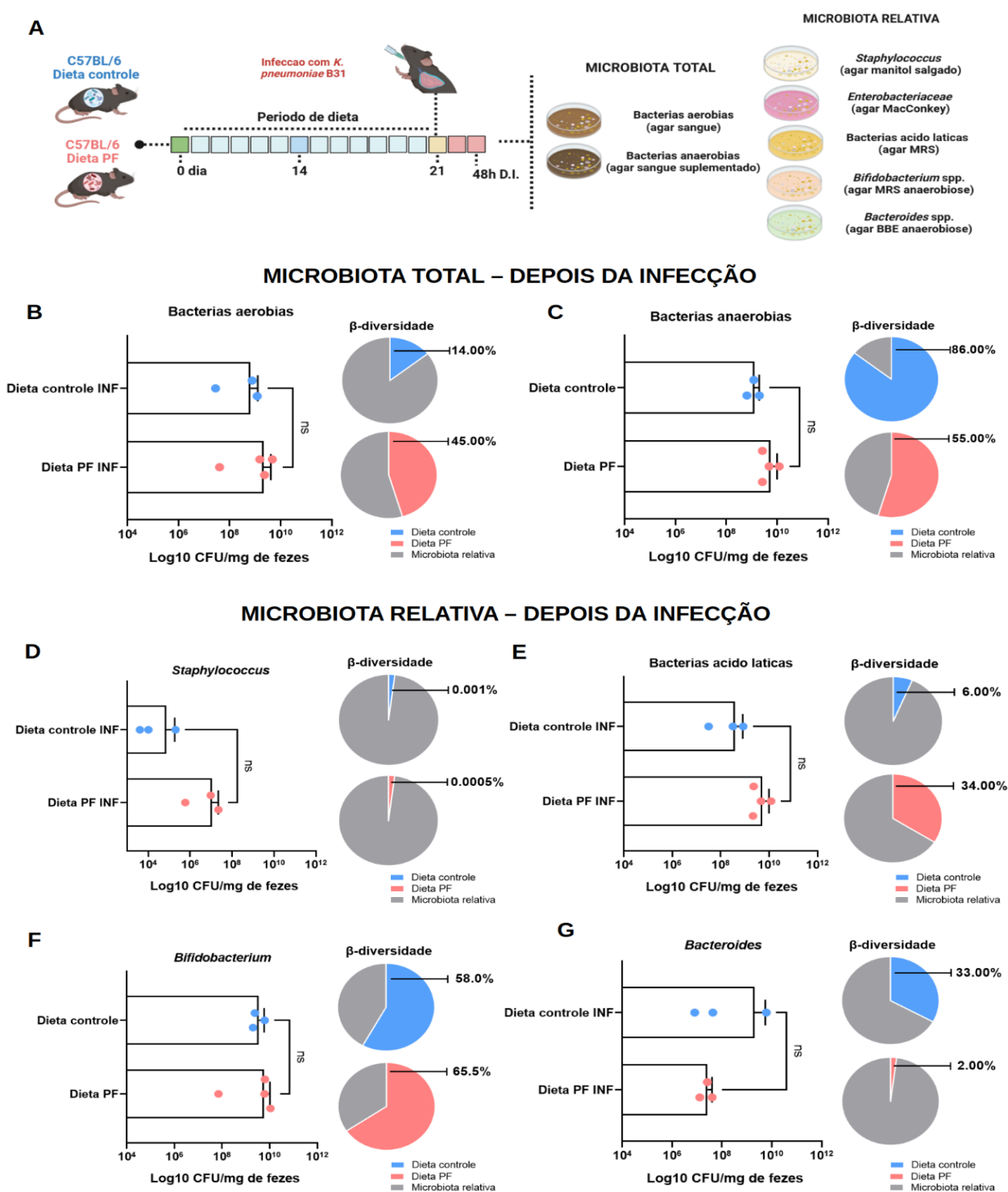


Figura 9. Composição da microbiota fecal cultivável de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta controle e dieta PF e infectados com *K. pneumoniae* resistente a antimicrobianos. Para avaliação das populações bacterianas da microbiota fecal cultivável utilizamos de métodos clássicos cultivo-dependente para quantificação da microbiota total e relativa (A). Microbiota total: bactérias aeróbias (B) e bactérias anaeróbias (C). Microbiota relativa: *Staphylococcus* sp. (D), bactérias ácido láticas (E), *Bifidobacterium* (F) e *Bacteroides* (G). Gráfico de barras mostra a quantificação de CFU/mg de fezes para cada grupo bacteriano e gráfico de pizza mostra a distribuição percentual da média de cada grupo dentro da microbiota total (A-B) e relativa (B-G). Azul: grupo Dieta Controle. Vermelho: grupo Dieta PF. As comparações estatísticas entre as médias foram feitas usando testes t de Student não pareado. ns = p > 0.05.

5.6 Fenótipo de resistência a antimicrobiano de espécies de *Enterobacteriaceae* isoladas após infecção pulmonar por *K. pneumoniae* RAM em camundongos C57BL/6 alimentados com dietas controle e ausente em fibras

Com intuito de avaliar o impacto da infecção por *K. pneumoniae* B31 no fenótipo de resistência de espécies de *Enterobacteriaceae* isoladas de camundongos C57BL/6 alimentados com dietas controle e dietas ausente em fibras, realizamos testes de susceptibilidade a antimicrobianos (Fig. 10A). Quantitativamente, após a infecção não observamos aumento significativo de *Enterobacteriaceae* no grupo Dieta PF quando comparado ao grupo Dieta Controle. A análise de alfa-diversidade demonstrou redução de *Enterobacteriaceae* no grupo Dieta PF comparado ao grupo Dieta Controle (Fig. 10B). No total, isolamos 3 cepas de *K. pneumoniae* e 2 cepas de *Escherichia coli* em ambos os grupos (Fig. 10C). O teste de susceptibilidade a antimicrobianos demonstrou algumas diferenças quanto ao perfil de resistência. No grupo Dieta Controle, todas as cepas de *E. coli* isoladas apresentavam fenótipo de resistência sensível a todos os antibióticos testados (dados não mostrados) enquanto no grupo Dieta PF 50% das cepas isoladas de *E. coli* apresentaram perfil de susceptibilidade intermediário ao antibiótico ciprofloxacino (Fig. 10E, painel superior). Quanto às cepas de *K. pneumoniae*, em ambos os grupos todas as cepas apresentaram perfil de susceptibilidade resistente aos antibióticos sulfametoxazol-trimetoprim, norfloxacino e ciprofloxacino, e perfil de resistência intermediária ao antibiótico amoxicilina-ácido clavulânico (Fig. 10D-E, painéis inferiores).

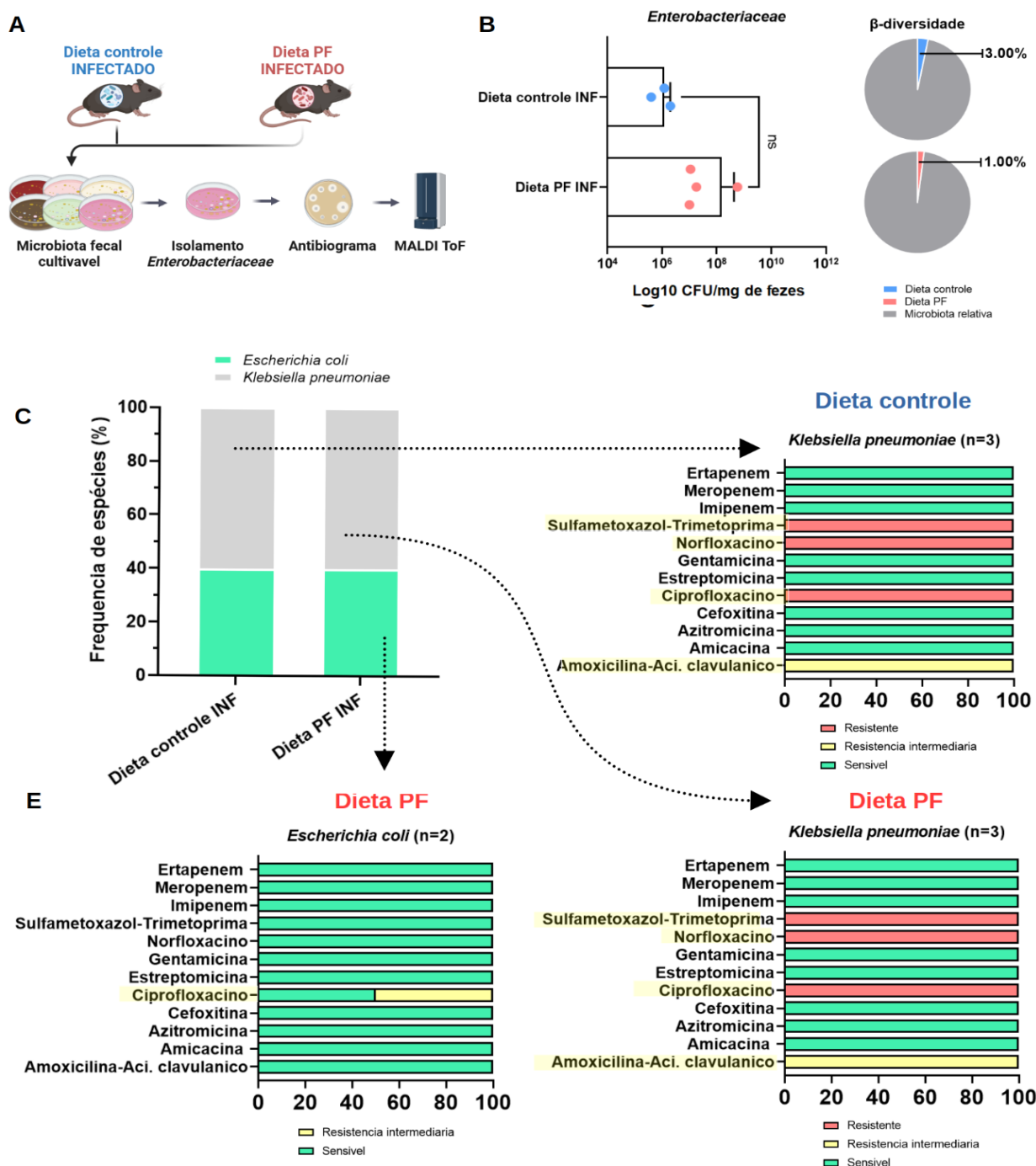


Figura 10. Fenótipo de resistência de *E. coli* e *K. pneumoniae* isoladas de camundongos C57BL/6 após a infecção por *K. pneumoniae* resistente a antimicrobianos. Esquema experimental da avaliação do fenótipo de resistência a antimicrobianos de cepas de *Enterobacteriaceae* isoladas de camundongos C57BL/6 alimentados com dietas controle e pobre em fibras e infectados com *K. pneumoniae* B31 (A). Quantificação e análise relativa da população de *Enterobacteriaceae* nos camundongos do grupo Dieta Controle e Dieta PF após a infecção (B). Frequência de espécies de *Enterobacteriaceae* isoladas de animais alimentados com dietas controle e pobre em fibras após a infecção (C). Fenótipo de resistência ou susceptibilidade a antimicrobianos de *E. coli* e *K. pneumoniae* isoladas de animais alimentados com dietas controle (D) e pobre em fibras (E). Gráficos de barras mostram a quantificação de CFU/mg de fezes, frequência de *E. coli* para cada grupo experimental e frequência de susceptibilidade aos antimicrobianos testados. Gráfico de pizza mostra a distribuição percentual da média de *Enterobacteriaceae* dentro da microbiota relativa. Azul: grupo Dieta Controle. Vermelho: grupo Dieta PF. As comparações estatísticas entre as médias foram feitas usando testes t de Student não pareado. ns = $p > 0.05$.

5.7 Camundongos C57BL/6 alimentados com dietas ausente em fibras mantêm elevado a população de *Enterobacteriaceae* resistentes a ampicilina após 15 dias da infecção pulmonar por *K. pneumoniae* RAM

Com o intuito de verificar se a dieta ausente em fibras favorece a colonização de *Enterobacteriaceae* resistentes a antimicrobianos, infectamos via intratraqueal camundongos alimentados com dietas controle e PF com *K. pneumoniae* B31 e aguardamos 15 dias até a quantificação de *Enterobacteriaceae* resistentes a ampicilina nas fezes desses animais (Fig. 11A). Após 15 dias de infecção, os camundongos do grupo Dieta Controle, comparados ao início da infecção, não apresentaram diferença estatisticamente significativa na quantidade de *Enterobacteriaceae* resistentes à ampicilina. Porém os animais do grupo Dieta PF mostraram aumento estatisticamente significativo na quantidade de *Enterobacteriaceae* resistente à ampicilina após 15 dias de infecção pulmonar. Esse aumento foi significativamente maior que os valores observados nos animais do grupo Dieta Controle 15 dias após a infecção (Fig. 11B).

Sabendo que dietas pobres ou ausentes em fibras reduzem a quantidade de SCFAs produzidos pela microbiota intestinal, como já demonstrado pelo nosso grupo (GALLOTTI et al., 2021) e ainda, considerando que os SCFAs possuem atividade antimicrobiana contra espécies de *Enterobacteriaceae* resistentes a antimicrobianos (KADRY; EL-ANTRAWY; EL-GANINY, 2023), conduzimos um experimento *in vitro* de cultivo da *K. pneumoniae* B31 com os SCFAs acetato, propionato e butirato para avaliar o efeito antimicrobiano desses metabólitos no crescimento da *K. pneumoniae* B31 (Fig 11C). Observamos ao final da curva de crescimento da bactéria uma redução significativa do crescimento da *K. pneumoniae* B31 quando cultivado na dose menor de acetato (30 mMol), na dose maior testadas de propionato (30 mMol) e inibição completa do crescimento da *K. pneumoniae* nas doses de butirato testadas (10 mMol e 30 mMol) (Fig. 11D).

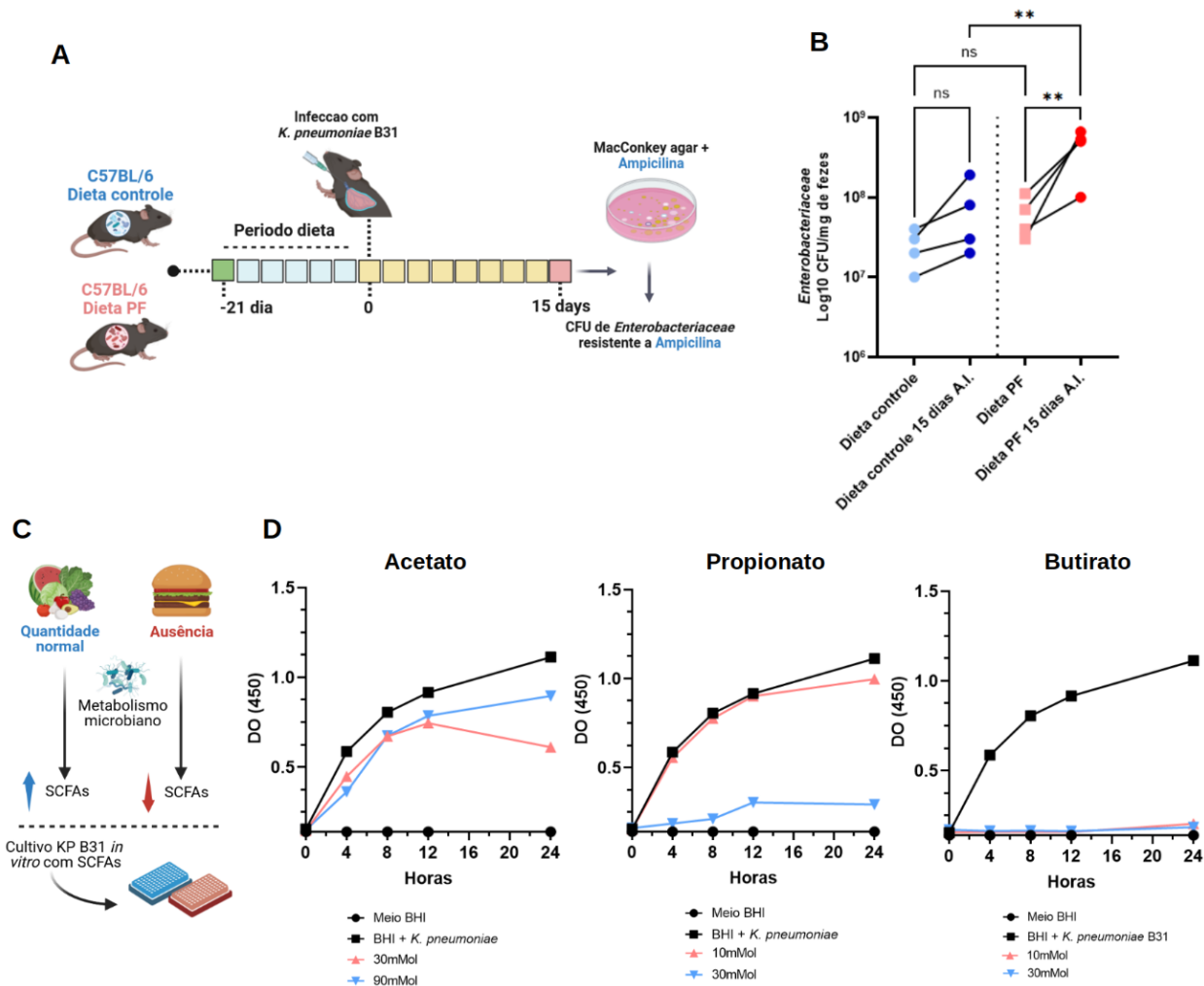


Figura 11. Quantificação de *Enterobacteriaceae* resistente a ampicilina após 15 dias de infecção pulmonar por *K. pneumoniae* B31 e efeito de SCFAs sobre o crescimento da *K. pneumoniae* B31. (A) Para avaliação da quantificação de *Enterobacteriaceae* resistente a ampicilina, camundongos C57BL/6 foram alimentados com dietas controle e PF por 21 dias, infectados via intratraqueal com *K. pneumoniae* B31 e acompanhados durante 15 dias. (B) Quantificação de *Enterobacteriaceae* resistente a ampicilina em camundongos alimentados com dietas controle e PF antes e após 15 dias de infecção intratraqueal por *K. pneumoniae* B31. (C) Justificativa do experimento *in vitro*. (D) Cultivo da *K. pneumoniae* B31 com os SCFAs acetato, propionato e butirato. Azul: grupo dieta controle. Vermelho: grupo Dieta PF. As comparações estatísticas entre as médias foram feitas usando testes t de Student pareado. ns = p > 0.05; ** = p < 0.01.

5.8 Transferência fecal para camundongos germ-free recapitula susceptibilidade à infecção pulmonar por *Klebsiella pneumoniae* observada em camundongos convencionais C57BL/6 alimentados com dietas ausente em fibras

Com intuito de avaliarmos se a estrutura da microbiota de camundongos convencionais alimentados com dietas PF afeta a resposta do hospedeiro frente à infecção pulmonar por *K. pneumoniae* resistente a antimicrobianos, realizamos experimentos de transferência fecal para camundongos germ-free (Fig. 12A). Após o período de estabilização da microbiota que foi seguido da infecção pulmonar, não observamos mortalidade nos camundongos germ-free que receberam fezes dos camundongos C57BL/6 dos grupos dietas controle e dieta PF (dados não mostrados). Após 48h da infecção, os camundongos germ-free que receberam as fezes de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta PF (GF dieta PF) demonstraram maior perda ponderal quando comparado com camundongos germ-free que receberam fezes de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta controle (GF dieta controle) (Fig. 12B). A análise histopatológica do parênquima pulmonar dos animais do grupo GF dieta PF, demonstrou maior infiltrado inflamatório tecidual nas regiões peribronquiolar (seta) quando comparado com animais do grupo FMT dieta controle (Fig. 12C). Em conformidade com esses dados, observamos aumento significativo do escore inflamatório do parênquima pulmonar no grupo GF dieta PF quando comparado ao grupo GF dieta controle (Fig. 12D). Ademais, observamos aumento significativo na quantidade de CFU de *Enterobacteriaceae* (Fig. 12E) e na quantidade da MPO (Fig. 12F) no tecido pulmonar no grupo GF dieta PF quando comparado ao grupo GF dieta controle. Não observamos diferenças significativas na quantidade de MPO do intestino delgado (Fig. 12G) e do cólon (Fig. 12H), entre os grupos GF dieta controle e GF dieta PF. Estes dados sugerem que a microbiota está relacionada ao fenótipo de susceptibilidade a infecção pulmonar pela *Klebsiella pneumoniae* B31 nos camundongos.

Em vista disso, sabendo que os SCFAs são importantes metabólitos produzidos pela microbiota comensal e do qual exerce papel antimicrobiano importante (KADRY; EL-ANTRAWY; EL-GANINY, 2023) realizamos a análise da produção de SCFAs nas fezes dos animais germ-free receptores e observamos que a produção dos SCFAs (acetato, propionato e butirato) não alteraram entre os grupos (dados não mostrados), porém, após a infecção, observamos que os camundongos germ-free que receberam fezes dos

doadores alimentados com dieta PF tiveram redução significativa da produção de propionato (Fig. 13C) porém aumento de butirato nas fezes após a infecção (Fig. 13D). Aumento este, também observado no grupo GF que recebeu o transplante de doadores alimentados com a dieta controle (Fig. 13D). Esses dados nos sugerem que a infecção pulmonar pela *K. pneumoniae* B31 influencia a capacidade da microbiota intestinal de produzir metabólitos e, a deficiência em fibra parece acentuar essa disfunção da microbiota intestinal.

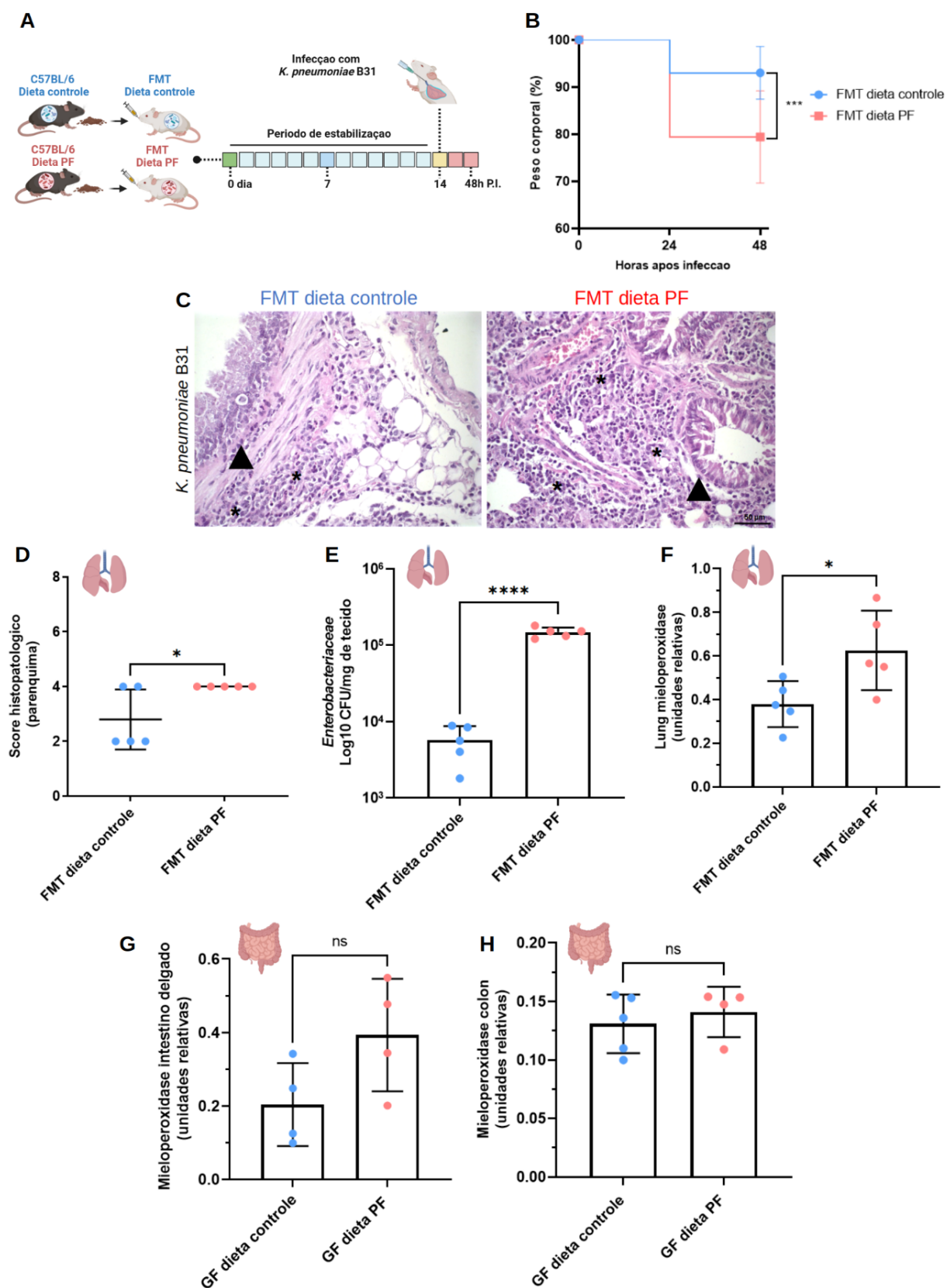


Figura 12. Transferência fecal para camundongos germ-free. (A) Fezes foram coletadas de camundongos C57BL/6 alimentados com dietas controle e PF por 21 dias e então foram transferidas para camundongos germ-free. Após o período de estabilização da microbiota, os camundongos dos grupos GF dieta controle e GF dieta PF foram infectados via intratraqueal com *K. pneumoniae* B31 e acompanhados durante 48h. (B) Evolução ponderal dos camundongos dos grupos GF dieta controle e GF dieta PF. (C)

Fotomicrografia do tecido pulmonar corado com hematoxilina-eosina, de camundongos dos grupos GF dieta controle e GF dieta PF infectados. (D) Escore histopatológico do parênquima pulmonar. (F) Quantificação de *Enterobacteriaceae* no tecido pulmonar. Quantificação da enzima mieloperoxidase (MPO) pulmonar (F), do intestino delgado (G) e do cólon (H). Azul: grupo GF dieta controle. Vermelho: grupo GF dieta PF. As comparações estatísticas entre as médias foram feitas usando testes t de Student não pareado. ns = $p > 0.05$; * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$. faltou os 4 asteriscos

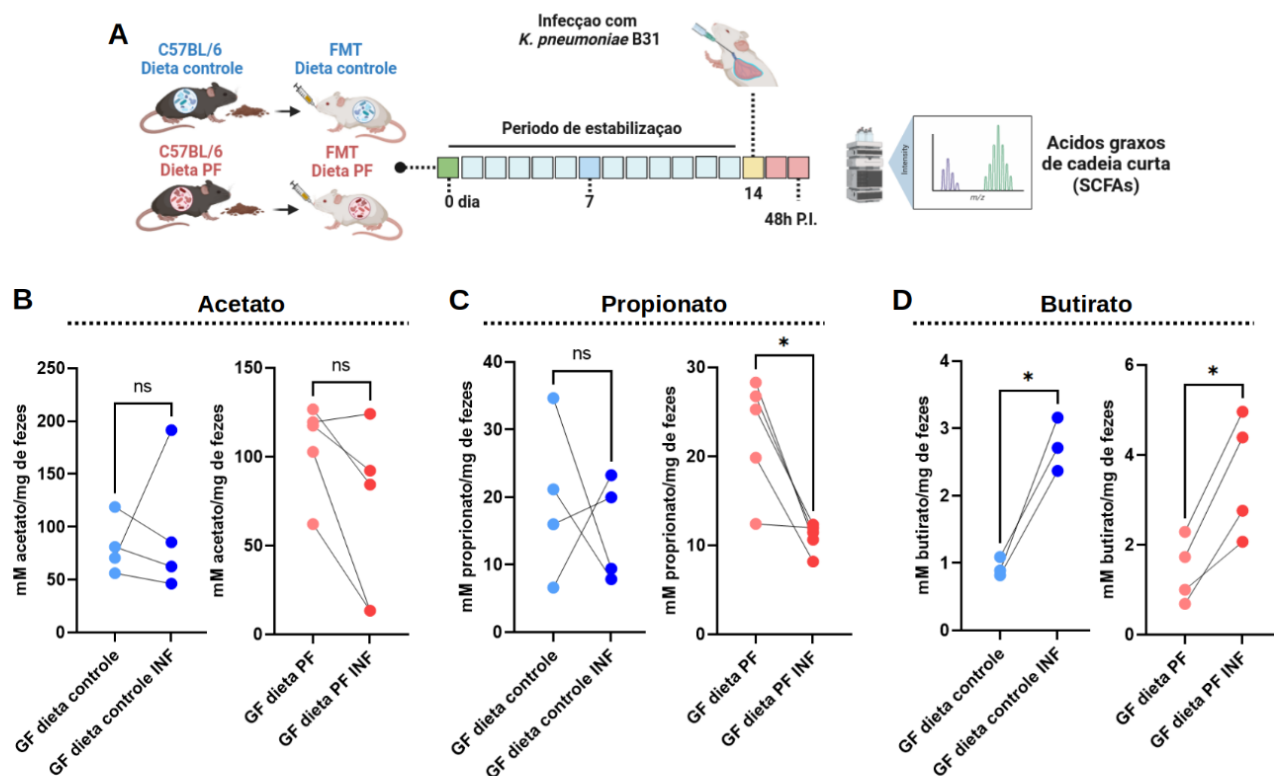


Figura 13. Dosagem de SCFAs nas fezes de camundongos germ-free (A). Quantificação de (B) acetato, (C) propionato e (D) butirato, nas fezes de camundongos germ-free após transplante fecal e infecção por *K.pneumoniae* B31. Azul: grupo GF dieta controle. Vermelho: grupo GF dieta PF. As comparações estatísticas entre as médias foram feitas usando testes t de Student pareado. ns = $p > 0.05$; * = $p < 0.05$.

5.9 Infecção pulmonar por *Klebsiella pneumoniae* RAM impacta a quantidade de bactérias aeróbias e *Enterobacteriaceae* resistentes a antimicrobianos presentes nas fezes de animais germ-free receptores das fezes de doadores alimentados com dietas PF

Após a transferência fecal e período de estabilização da microbiota e infecção pulmonar por *K. pneumoniae* B31 (Fig. 14A), cultivamos as fezes de camundongos dos grupos GF dieta controle e GF dieta PF em meios de cultura não seletivos (ágar sangue) e seletivos (ágar MacConkey) acrescidos de antibióticos (ampicilina, ceftriaxona e ciprofloxacino) (Fig. 14B), com o intuito de avaliar a quantidade de bactérias resistentes a esses antibióticos. Após a infecção (D.I), observamos que os animais do grupo GF dieta controle e GF dieta PF, apresentaram aumento significativo de bactérias aeróbias resistentes à ampicilina (Fig. 14C). Observamos também que após a infecção os animais do grupo GF dieta controle, apresentaram aumento significativo de bactérias aeróbias resistentes ao ciprofloxacino (Fig. 14E). Não observamos diferenças significativas na quantidade de bactérias aeróbias resistente ao antibiótico ceftriaxona após a infecção (Fig. 14D). Quanto à comunidade de *Enterobacteriaceae*, após a infecção (D.I) observamos aumento significativo de *Enterobacteriaceae* resistentes à ampicilina no grupo GF dieta controle (Fig. 14F) e aumento significativo nos grupos GF dieta controle e GF dieta PF de *Enterobacteriaceae* resistente aos antibióticos ceftriaxona (Fig. 14G) de ciprofloxacino (Fig. 14H). Não observamos no grupo GF dieta PF diferença significativa na quantidade de *Enterobacteriaceae* resistente ao antibiótico ampicilina (Fig. 14F).

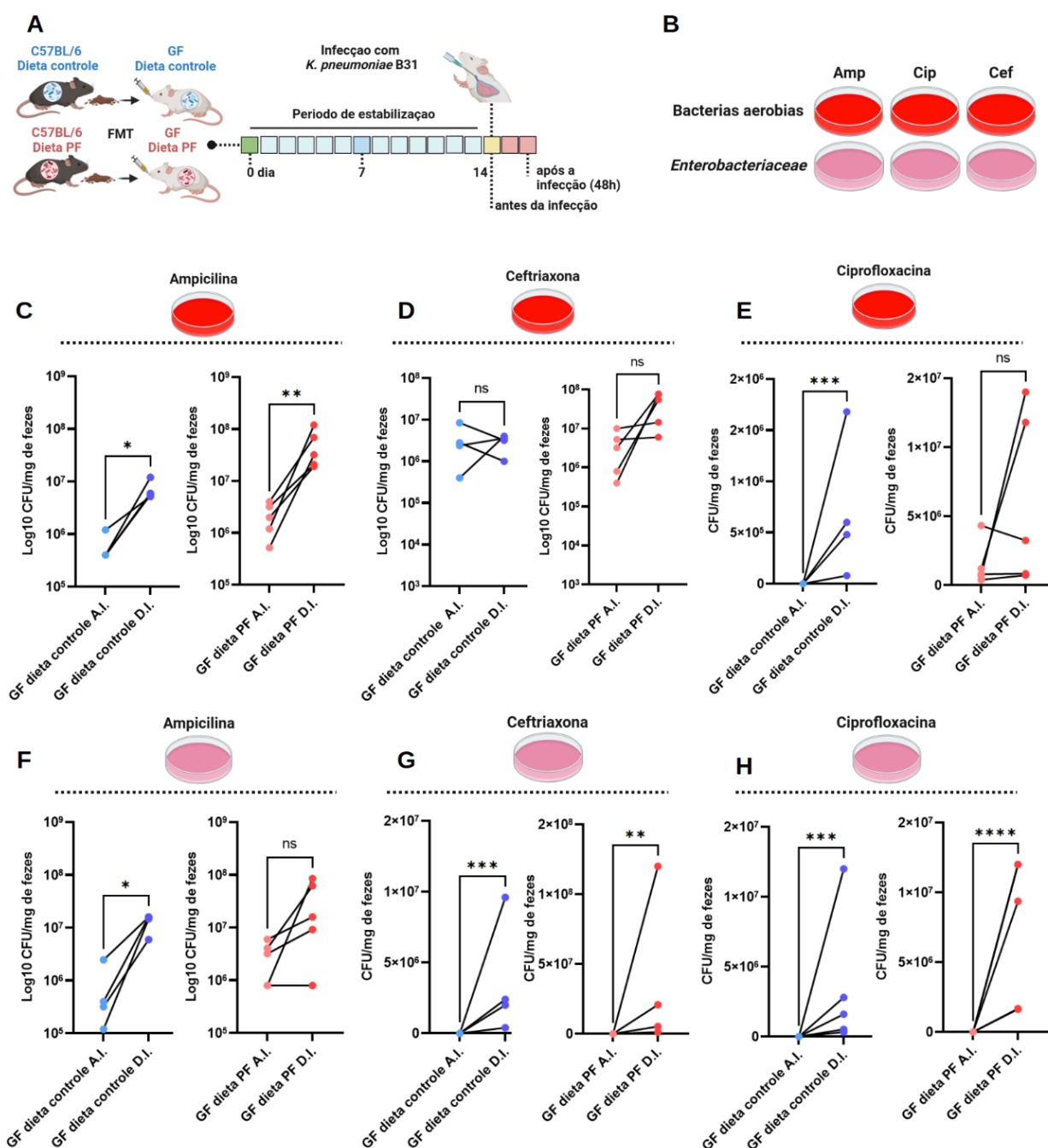


Figura 14. Quantificação de bactérias aeróbias e *Enterobacteriaceae* resistente aos antibióticos ampicilina, ceftriaxona e ciprofloxacino (A-B). (C) Bactérias aeróbias resistentes à ampicilina. (D) Bactérias aeróbias resistentes à ceftriaxona. (E) Bactérias aeróbias resistentes ao ciprofloxacino. (F) *Enterobacteriaceae* resistentes à ampicilina. (G) *Enterobacteriaceae* resistentes à ceftriaxona. (H) *Enterobacteriaceae* resistentes a ciprofloxacino. Azul: grupo GF dieta controle. Vermelho: grupo GF dieta PF. As comparações estatísticas entre as médias foram feitas usando testes t de Student pareado. ns = $p > 0.05$; * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; * = $p < 0.001$. **** = $p < 0.0001$.**

5.10 Transferência fecal demonstra diminuição de diversidade e mudanças no fenótipo de resistência a antimicrobianos de espécies de *Enterobacteriaceae*

Com intuito de avaliar se a estrutura da microbiota de animais convencionais que foram submetidos a dieta ausente em fibras possui influência no fenótipo de resistência a antimicrobianos de espécies de *Enterobacteriaceae*, realizamos transferência fecal das fezes desses animais para camundongos germ-free. Para isso, após o período de estabilização da microbiota, isolamos do ágar MacConkey diferentes cepas que foram identificadas por MALDI-ToF e submetidas a teste de susceptibilidade a antimicrobianos (Fig. 15A). Quantitativamente, antes da infecção (A.I) observamos aumento significativo de *Enterobacteriaceae* no grupo GF dieta PF quando comparado ao grupo GF Dieta Controle (Fig. 15B). No total, antes da infecção, isolamos 10 cepas no GF grupo dieta controle e 13 cepas no grupo GF dieta PF. Após a identificação, isolamos mais espécies diferentes no grupo GF dieta controle (n=5) que no grupo GF dieta PF (n=3). As cepas isoladas do grupo GF dieta controle foram identificadas como: *Escherichia coli* (40%), *Enterobacter cloacae* (20%), *Proteus vulgaris* (10%), *Alcaligenes* sp. (20%) e *Providencia rettgeri* (10%). As cepas do grupo GF dieta PF foram identificadas como: *Escherichia coli* (70%), *Proteus vulgaris* (23%) e *Morganella morganii* (7%) (Fig. 15C).

Para esta tese, focamos apenas nas *Enterobacteriaceae* *E. coli* e *K. pneumoniae* por terem sido as que isolamos dos animais convencionais e que apresentaram perfil de susceptibilidade a antimicrobianos que não são relacionados a sua resistência intrínseca. No grupo GF dieta Controle, todas as cepas isoladas de *E. coli* apresentavam fenótipo de resistência sensível aos antibióticos testados (Fig. 15D). Já no grupo GF dieta PF, 8% das cepas de *E. coli* isoladas apresentaram fenótipo de resistência intermediário ao antibiótico estreptomicina (Fig. 15E).

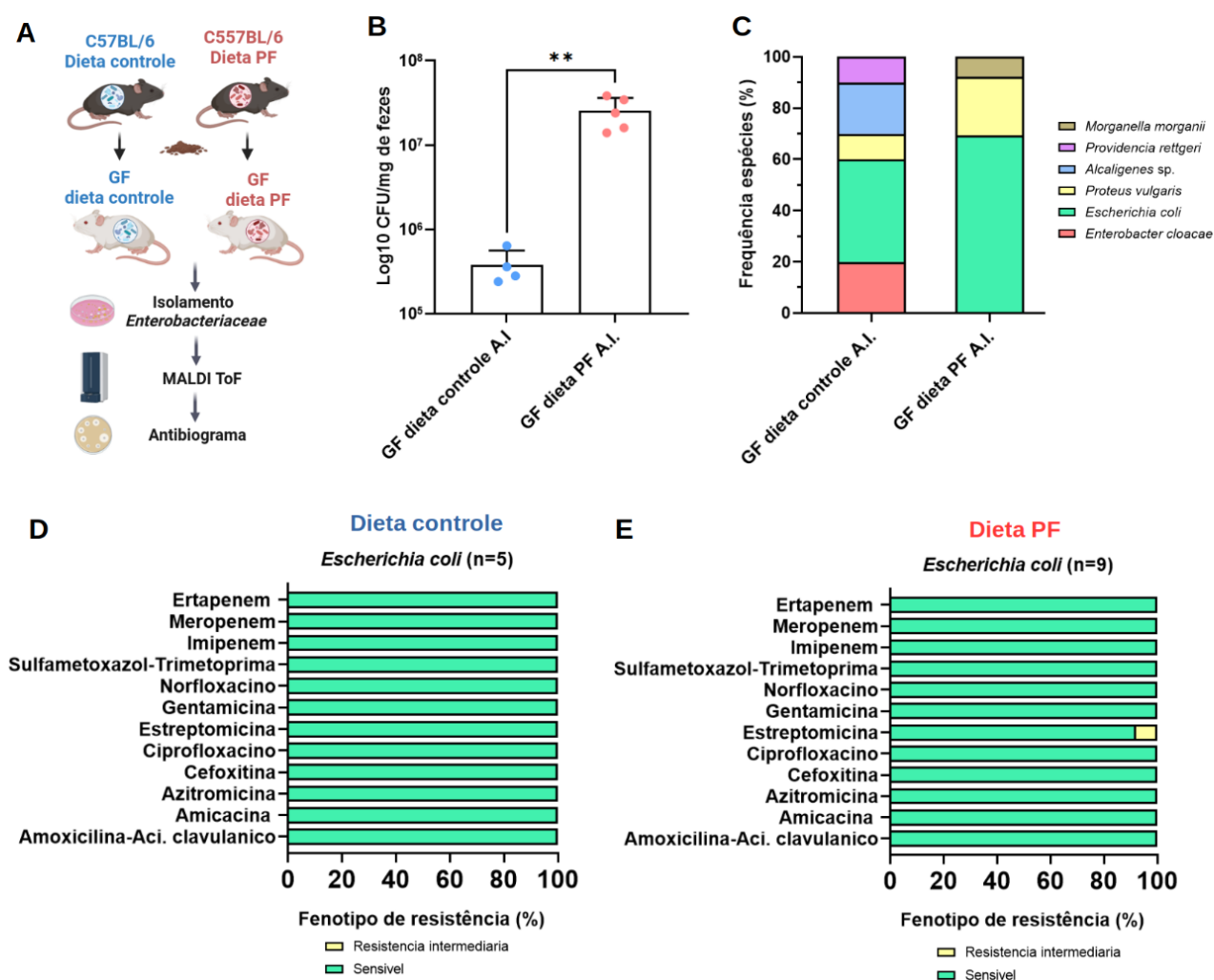


Figura 15. Avaliação do fenótipo de resistência a antimicrobianos de cepas de *Enterobacteriaceae* isoladas de camundongos GF antes da infecção (A). (B) Quantificação da população de *Enterobacteriaceae* nos camundongos do grupo GF dieta controle e GF dieta PF. (C) Frequência de espécies de *Enterobacteriaceae* isoladas submetidas à identificação por MALDI-ToF. Fenótipo de resistência ou susceptibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de animais dos grupos (D) GF dieta controle e (E) GF dieta PF. Gráficos de barras mostram a quantificação de CFU/mg de fezes, frequência de *E. coli* para cada grupo experimental e frequência de susceptibilidade aos antibióticos testados. Azul: grupo Dieta Controle. Vermelho: grupo Dieta PF. As comparações estatísticas entre as médias foram feitas usando testes t de Student não pareado = $p < 0.01$.**

5.11 Infecção por *Klebsiella pneumoniae* resistente a antimicrobianos pós transferência fecal, modifica o fenótipo de resistência a antimicrobianos de espécies de *Enterobacteriaceae*

Após FMT e o período de estabilização da microbiota, infectamos os camundongos dos grupos GF dieta controle e GF dieta PF e isolamos do ágar MacConkey diferentes cepas que foram identificadas por MALDI-ToF e submetidas a teste de susceptibilidade a antimicrobianos (Fig. 16A). Quantitativamente, após a infecção (D.I) não observamos diferença significativa na quantidade de *Enterobacteriaceae* entre os grupos (Fig. 16B). No total, depois da infecção, isolamos 13 cepas de *Enterobacteriaceae* no grupo GF dieta controle D.I e 10 cepas no grupo GF dieta PF D.I. Após a identificação, o grupo GF dieta controle D.I apresentou maior número de espécies diferentes (n=5) comparado ao grupo GF dieta PF D.I (n=3). As cepas isoladas do grupo GF dieta controle D.I foram identificadas como: *Klebsiella pneumoniae* (61%), *Escherichia coli* (8%), *Enterobacter cloacae* (15%), *Proteus vulgaris* (8%) e *Providencia rettgeri* (8%). As cepas do grupo GF dieta PF foram identificadas como: *Klebsiella pneumoniae* (80%), *Escherichia coli* (10%), e *Proteus vulgaris* (10%) (Fig. 16C). Quanto ao perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das espécies de *Escherichia coli* isoladas, identificamos no grupo GF dieta controle D.I, apresentavam perfil de susceptibilidade sensível a todos os antibióticos testados (Fig. 16D, painéis superiores). No grupo GF dieta PF D.I, observamos que 100% das cepas de *E. coli* isoladas apresentavam fenótipo de resistência intermediário aos antibióticos estreptomicina e ciprofloxacino (Fig. 16E, painéis superiores). Ademais, no grupo GF dieta controle D.I, todas as cepas isoladas de *K. pneumoniae* apresentaram fenótipo de resistência aos antibióticos sulfametoxazol-trimetoprima, norfloxacino e ciprofloxacino (Fig. 16D, paines superiores) e 25% das cepas isoladas apresentavam fenótipo de resistência intermediária aos antibióticos amoxicilina-ácido clavulânico. Já no grupo GF dieta PF todas as cepas de *K. pneumoniae* apresentaram fenótipo de resistência aos antibióticos sulfametoxazol-trimetoprima, norfloxacino e ciprofloxacino (Fig. 16D, paines superiores) e 50% das cepas isoladas apresentavam fenótipo de resistência intermediária aos antibióticos amoxicilina-ácido clavulânico.

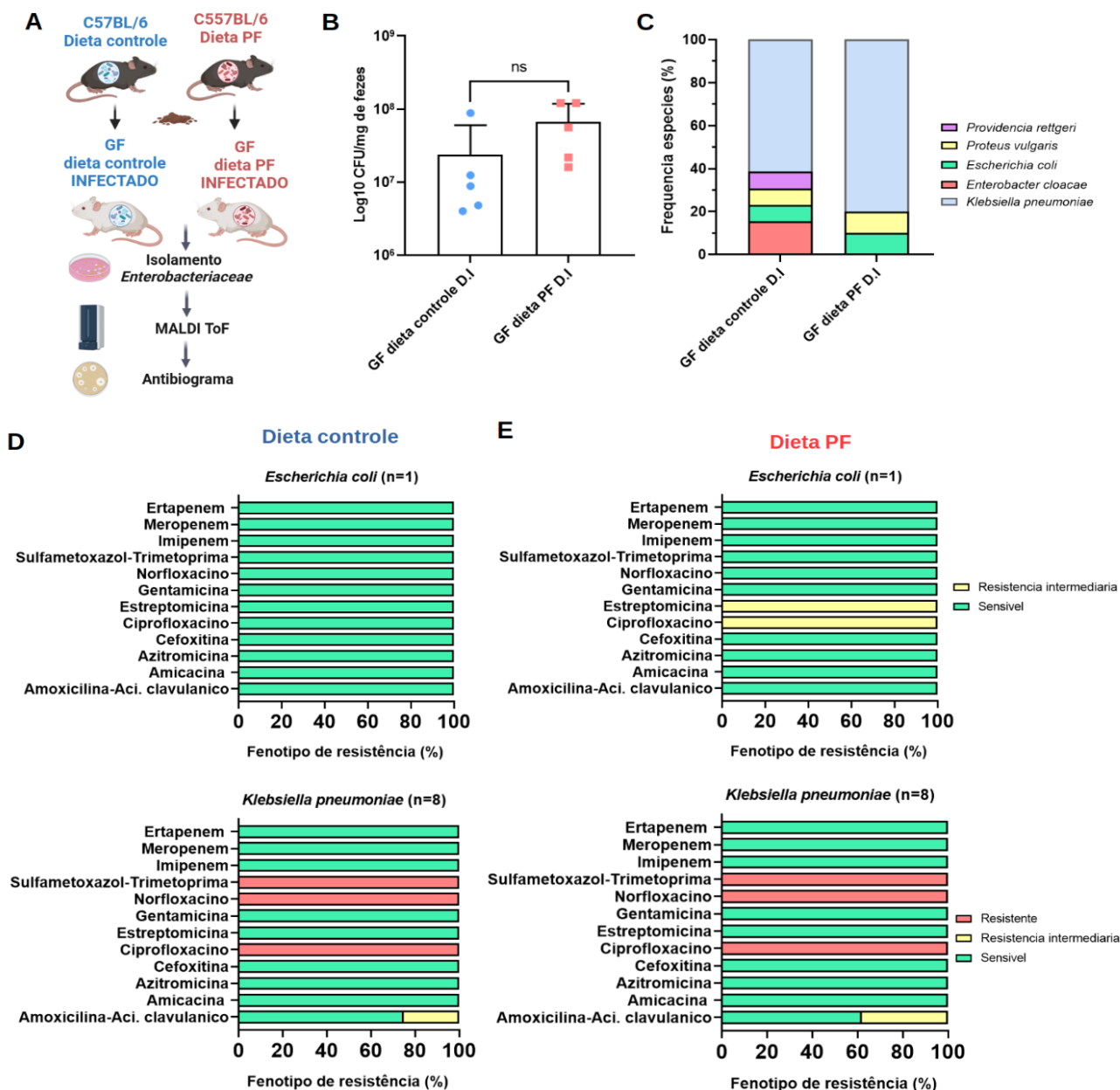


Figura 16. Avaliação do fenótipo de resistência a antimicrobianos de cepas de *Enterobacteriaceae* isoladas de camundongos GF após infecção pulmonar por *K. pneumoniae* resistente a antimicrobianos. (A) Esquema experimental da avaliação do fenótipo de resistência a antimicrobianos de cepas de *Enterobacteriaceae* isoladas de camundongos GF transfectados depois da infecção. (B) Quantificação da população de *Enterobacteriaceae* nos camundongos do grupo GF dieta controle D.I. e GF dieta PF D.I. (C) Frequência de espécies de *Enterobacteriaceae* isoladas submetidas à identificação por MALDI-ToF. Fenótipo de resistência ou susceptibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* e *K. pneumoniae* isoladas de animais dos grupos (D) GF dieta controle D.I. e (E) GF dieta PF D.I. Gráficos de barras mostram a quantificação de CFU/mg de fezes, frequência de *E. coli* para cada grupo experimental e frequência de susceptibilidade aos antibióticos testados. Azul: grupo Dieta Controle. Vermelho: grupo Dieta PF. As comparações estatísticas entre as médias foram feitas usando testes t de Student não pareado. ns = p > 0.05.

5.12 Mudanças do resistoma da comunidade de *Enterobacteriaceae* intestinal humano após a infecção por SARS-CoV-2

Estudos indicam que a pandemia do SARS-CoV-2 impulsionou o aumento da resistência a antimicrobianos principalmente devido ao aumento do uso de antibióticos no tratamento de pacientes com COVID-19, sem comprovação científica quanto a eficácia no tratamento dessa infecção (LANGFORD et al., 2023; RAWSON et al., 2020). De um ponto de vista holístico - de Saúde Única - estudos demonstraram que o uso exacerbado de antimicrobianos durante a pandemia de SARS-Cov-2, modificou o resistoma e aumentou a quantidade de espécies resistentes a antimicrobianos, particularmente aquelas pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, presentes por exemplo em águas residuais (ZHAO et al., 2023, 2023). Isto sugere que a infecção por SARS-CoV-2 por si poderia afetar a microbiota e o resistoma intestinal.

Neste contexto, realizamos a coleta de fezes de indivíduos saudáveis (controles) e pós-COVID (1-4 meses após resolução da infecção) (Fig. 17A). Relatamos que apesar dos indivíduos de ambos os grupos não apresentarem diferença significativa da quantidade de *Enterobacteriaceae* (Fig. 17B), as cepas dessa família isoladas dos indivíduos pós-COVID apresentaram uma notável predominância de fenótipo resistente a antibióticos e (45%) e multi antibiótico resistente (23%) em comparação com os controles (39% e 13%, respectivamente) (Fig. 17C). Ademais, identificamos prevalência aumentada de *Klebsiella* spp. em indivíduos pós-COVID em comparação com os controles (Fig. 17D). Estas cepas de *Klebsiella* eram predominantemente resistentes a quinolonas (64%), aminoglicosídeos (100%), e sulfonamidas (91%) (dados não mostrados). Tal perfil de resistência não é associado à resistência intrínseca conhecida para este gênero bacteriano. Estes dados foram publicados recentemente pelo nosso grupo de pesquisa (Almeida et al., 2023).

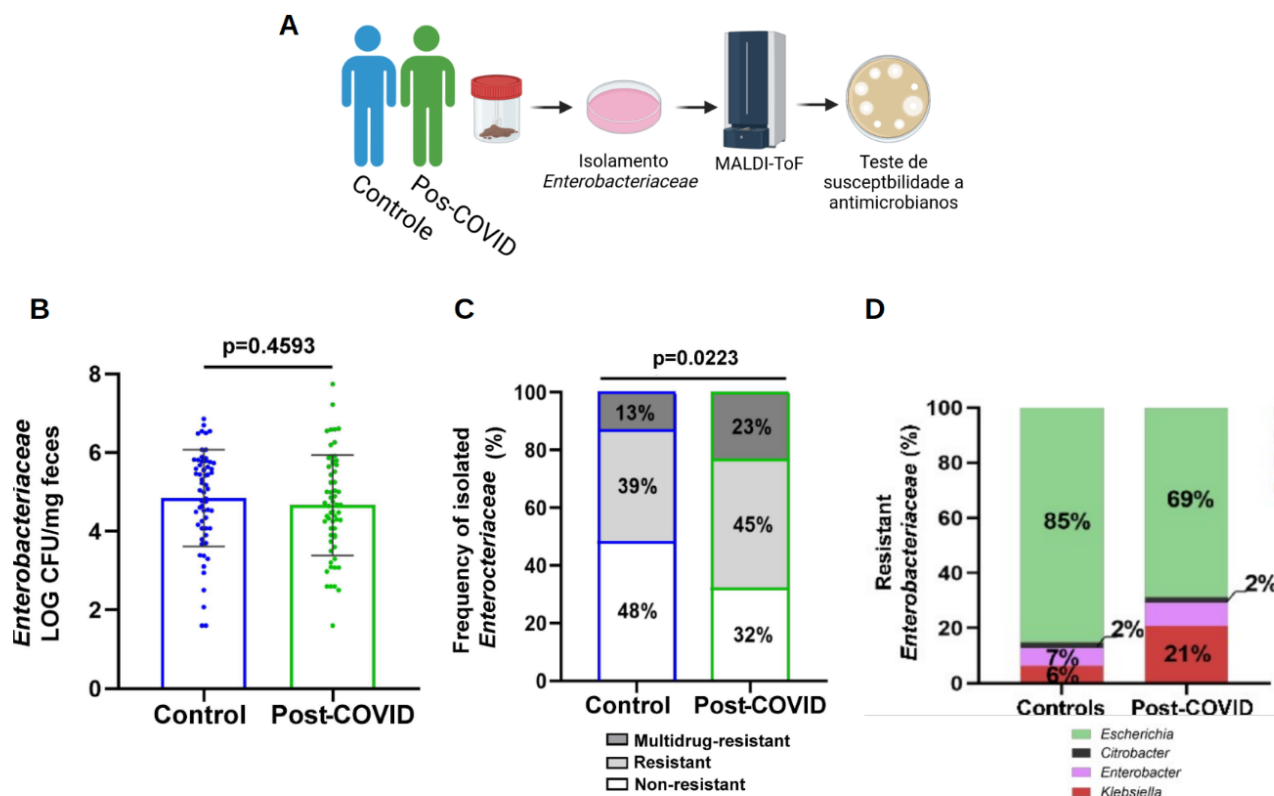


Figura 17. Esquema experimental da análise do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de cepas de *Enterobacteriaceae* isoladas de indivíduos controles e pós-COVID (A). (B) Quantificação de *Enterobacteriaceae* de indivíduos controles e pós-COVID. (C) Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de cepas de *Enterobacteriaceae* isoladas de indivíduos controles e pós-COVID. (D) Frequência de espécies de *Enterobacteriaceae* isoladas de indivíduos controles e pós-COVID. As comparações estatísticas entre as médias foram feitas usando testes t de Student não pareado. ns = $p > 0.05$.

6. DISCUSSÃO

Dietas denominadas "ocidentais", caracterizadas pelo aumento na quantidade de carboidratos simples e lipídios, bem como diminuição na quantidade de fibras, estão sendo cada vez mais associadas com o aumento de diversas doenças como aquelas de origem metabólica e infecciosas. Nesta tese, estabelecemos uma dieta com ausência de fibras, baseada em padrões alimentares ocidentais, denominada com o objetivo de explorar como a ausência de fibras na dieta afeta a composição do resistoma intestinal e a vulnerabilidade de camundongos a infecções causadas por uma cepa de *K. pneumoniae* RAM.

A literatura científica evidencia que a disbiose resultante de dietas com baixos teores de fibras está associada à hipomotilidade do trato gastrointestinal (SINGH et al., 2021). Porém em nosso estudo não observamos, diferença significativa no tempo de transito intestinal entre os grupos dieta controle e dieta PF. Conforme observado em estudos anteriores, um dos mecanismos pelos quais a disbiose pode causar estase intestinal é o aumento do processo inflamatório (AROSA; CAMBA-GÓMEZ; CONDE-ARANDA, 2022; YAO et al., 2023). No entanto, nossa dieta carente em fibras não provocou inflamação intestinal, como parcialmente justificado pela ausência de diferença significativa na quantidade de MPO presente no intestino delgado e no cólon entre os grupos experimentais. Apesar disto, precisamos de uma investigação mais profunda dos mecanismos imunológicos para afirmar que nosso modelo de dieta com baixo teor de fibras não desencadeia uma inflamação intestinal capaz de exercer influência significativa nas análises realizadas neste estudo.

A microbiota intestinal compreende diversas comunidades microbianas, presentes em diferentes níveis de riqueza e abundância que exibem perfis metabólicos e de distribuição espacial distintos. Nessa perspectiva, podemos categorizar a microbiota intestinal saudável em dois grupos principais: (1) grupos de bactérias aeróbias e (2) grupos de bactérias anaeróbias (maior parte da microbiota intestinal, superando em aproximadamente 2-3 vezes o número de bactérias aeróbias). Esses grupos englobam bactérias altamente abundantes, como aquelas pertencentes aos grupos *Clostridium*, *Bacteroides* e *Bifidobacterium*, bem como bactérias menos abundantes, exemplificadas pelas famílias *Enterobacteriaceae* e pelos gêneros *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Staphylococcus* (JALILI-FIROOZINEZHAD et al., 2019). Notavelmente, constata-se que a maioria de espécies bacterianas consideradas patobiontes são representantes de

bactérias estritamente ou facultativamente aeróbias, dentre os quais podemos citar: *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp., *Proteus mirabilis* e *K. pneumoniae* (CHANDRA et al., 2021, 2021; CHOW; TANG; MAZMANIAN, 2011). Destacamos que a quantidade total de um grupo bacteriano não reflete necessariamente sua abundância relativa no ecossistema (frequência relativa de cada grupo bacteriano) (WEI et al., 2021).

Em nosso estudo, avaliamos a composição da microbiota fecal de camundongos C57BL/6 utilizando métodos clássicos cultivo-dependentes. Esses métodos possibilitam a contagem direta de microrganismos viáveis, permitindo também o isolamento de espécies/cepas puras para estudos sobre funções específicas de cada espécie, assim como permite a avaliação da atividade antimicrobiana de diversos antibióticos, incluindo aqueles utilizados na clínica. No entanto, é importante destacar que muitas espécies microbianas intestinais não podem ser cultivadas em laboratório, podendo resultarem uma subestimação da diversidade microbiana. Ademais, os métodos cultivo-independentes são mais demorados e demandam recursos financeiros e humanos qualificado (DICKSON et al., 2014; HILTON et al., 2016).

Em nossa pesquisa, observamos um aumento na proporção relativa de bactérias aeróbias e uma redução na proporção relativa de bactérias anaeróbias em animais alimentados com dietas PF. Um estudo conduzido por Spencer et al., evidenciou que dietas com baixo teor de fibras e ricas em açúcares resultam em um aumento de oxigênio no trato gastrointestinal, impactando a composição da microbiota e provocando alterações na resposta imunológica (SPENCER et al., 2021). Esses resultados sugerem que nossa dieta PF pode alterar o potencial redox da microbiota intestinal, favorecendo a proliferação de microrganismos patobiontes aeróbicos/anaeróbios-facultativos, como os *Staphylococcus* sp. e *Enterobacteriaceae*, como observado neste estudo.

Estudos anteriores já demonstraram que em contextos de dietas com baixo teor de fibras, a ausência de substratos fermentáveis estimula a proliferação de *Enterobacteriaceae*, que podem utilizar glicoproteínas do muco como fonte alternativa de carbono (DESAI et al., 2016). Além disso, a falta de substratos fermentáveis reduz a produção de ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs) pela microbiota intestinal, criando um ambiente propício para a proliferação de *Enterobacteriaceae* (BYNDLOSS et al., 2017), o que pode desencadear processos inflamatórios e danos à integridade da barreira intestinal. No entanto, é crucial enfatizar que, como a relação entre os microrganismos e o hospedeiro é intrinsecamente dependente do contexto, diferentes espécies podem responder de maneira distinta aos estímulos ambientais. Em nossa pesquisa, observamos

uma redução na proporção relativa de bactérias do gênero *Bacteroides* (bacilos Gram-negativos anaeróbios estritos), patobiontes que mantêm uma relação complexa e geralmente benéfica com o hospedeiro quando retidas no intestino, mas quando escapam desse ambiente, podem causar patologias significativas, incluindo bacteremia e formação de abscessos em vários locais do corpo (WEXLER, 2007). Apesar de não serem consideradas invasivas, estudos conduzidos por Curtis et al. demonstraram que *B. thetaiotaomicron* e *B. vulgatus*, duas espécies prevalentes do gênero *Bacteroides*, desempenham um papel na amplificação da patogenicidade da *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC). Essa amplificação ocorre pela clivagem de glicoproteínas de mucosas, posteriormente aproveitadas pela EHEC, resultando no aumento da expressão de genes de virulência dessa bactéria (CURTIS et al., 2014).

Diversos estudos evidenciam que os componentes das dietas exercem efeitos tanto diretos quanto indiretos nas doenças inflamatórias pulmonares (DE BOER et al., 2017). Por exemplo, comprovou-se que dietas ricas em gordura estão associadas à redução da função pulmonar e ao aumento dos níveis sistêmicos das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF α , contribuindo para o desenvolvimento da asma (WOOD et al., 2015; WOOD; GIBSON, 2009). Adicionalmente, a composição e função da microbiota intestinal desempenham um papel fundamental na proteção do hospedeiro contra infecções causadas por diversos patógenos respiratórios (DUMAS et al., 2018; GAUGUET et al., 2015).

Esses dados estão em concordância com os achados observados em nosso estudo, no qual os animais alimentados com dietas PF apresentaram maior suscetibilidade à infecção por *K. pneumoniae* resistente a antimicrobianos (cepa B31). Isso foi evidenciado pela maior perda de peso, inflamação tecidual intensificada e maior quantidade de MPO pulmonar. Acreditamos que esse aumento de suscetibilidade em camundongos convencionais alimentados com dietas PF ocorre principalmente devido à modificação na composição e função da microbiota intestinal desses animais. De fato, ao transferirmos a microbiota desses animais para camundongos germ-free, também observamos o mesmo perfil de suscetibilidade dos animais receptores à infecção observados nos animais convencionais. Isso mostra que esse fenótipo é, de fato, resultado da alteração na estrutura e função da microbiota causada pela ausência de fibras dietéticas.

A conexão entre os sistemas respiratório e digestivo (eixo intestino-pulmão) é mediada principalmente pela microbiota através de células imunes e metabólitos que

orquestram e regulam as respostas inflamatórias (DANG; MARSLAND, 2019; MARSLAND; TROMPETTE; GOLLWITZER, 2015). Em nosso laboratório, foi demonstrado que a administração de acetato ou o tratamento oral com a cepa *Bifidobacterium longum* 51A (que produz altas quantidades de acetato) resulta na ativação do receptor de metabolitos microbianos GPR43, especialmente em neutrófilos e macrófagos. Essa ativação é fundamental para controlar as respostas imunes inflamatórias e aumentar a fagocitose e eliminação de *K. pneumoniae* durante infecções pulmonares (VIEIRA et al., 2016; GALVÃO et al., 2018).

Durante infecções pulmonares causadas por *K. pneumoniae*, também foram relatadas alterações na composição da microbiota intestinal. Wu et al., observaram mudanças significativas na composição e diversidade taxonômica da microbiota intestinal, incluindo um aumento na colonização por patobiontes como *E. coli* e *Clostridium methylpentosum*. Além disso, foi observada uma redução na quantidade de ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs) intestinais após a infecção pulmonar por *K. pneumoniae*. A infecção também desencadeou uma resposta inflamatória acentuada, como evidenciado por níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias e marcadores de inflamação nos tecidos intestinais e pulmonares, como IL-6, TNF- α e MCP-1, além de uma diminuição na permeabilidade intestinal (WU et al., 2021).

Na microbiota intestinal humana, a *E. coli* é amplamente reconhecida como a espécie predominante da família *Enterobacteriaceae* (MARTINSON et al., 2019). Em nosso estudo, todas as cepas isoladas dos animais convencionais C57BL/6 após as dietas controle e PF pertenciam à espécie *E. coli*, sugerindo uma maior prevalência dessa bactéria na microbiota desses animais. Outros membros da família *Enterobacteriaceae* não foram identificados, possivelmente devido à sua provável menor abundância em relação à *E. coli* e/ou limitações metodológicas.

Porém, ao realizarmos o FMT para animais germ-free, conseguimos isolar outras espécies pertencentes à família *Enterobacteriaceae* e observamos que os animais do grupo GF dieta PF antes da infecção apresentaram redução da diversidade de *Enterobacteriaceae* com aumento da frequência de *E. coli*. Após a infecção intratraqueal com *K. pneumoniae* B31 observamos nos animais germ-free receptores, redução de diversidade de espécies de *Enterobacteriaceae* isoladas, com destaque para maior frequência de isolamento de *K. pneumoniae* no intestino de animais do grupo FMT dieta PF comparado os animais FMT dieta controle. Esses dados nos sugerem que a disbiose causada pela dieta ausente em fibras, além de reduzir a diversidade de espécies de

Enterobacteriaceae, favoreceu a maior proliferação e colonização no intestino das espécies *E. coli* e *K. pneumoniae* em detrimento de outras.

Ao avaliar o impacto da ausência de fibras na dieta sobre o fenótipo de resistência a múltiplos antibióticos na população de *Enterobacteriaceae*, notamos que as cepas de *E. coli*, dependendo do grupo experimental do qual foram isoladas, exibiram perfis de resistência distintos aos antibióticos. Tanto nos animais convencionais alimentados com dietas pobres em fibras quanto nos animais germ-free receptores das fezes desses animais, antes e após a infecção, observamos que as cepas de *E. coli* isoladas apresentaram um perfil de resistência intermediária ao ciprofloxacino e à estreptomicina.

Além disso, nossos dados também revelaram um aumento de bactérias aeróbicas e de *Enterobacteriaceae* resistentes ao ciprofloxacino nas fezes dos animais GF receptores. Esses resultados corroboram com as descobertas de Cabral et al., que utilizando uma abordagem combinada de metagenômica e metatranscriptômica, caracterizaram o impacto de uma dieta pobre em fibras na função e na composição da microbiota durante o tratamento com ciprofloxacino. Os autores demonstraram que a dieta pobre em fibras teve um grande impacto na abundância de genes chaves, especialmente em duas importantes bactérias comensais, *Akkermansia muciniphila* e *Bacteroides thetaiotaomicron*. Essas bactérias apresentaram um aumento na transcrição de vários genes conhecidos de resposta ao estresse, no metabolismo central do carbono e na aquisição de micronutrientes (vitamina B12 e ferro). De forma interessante, os autores também observaram um aumento na expressão de bombas de efluxo de aminoglicosídeos em *B. Thetaiotaomicron* (CABRAL et al., 2020). Isso está em consonância com nossos dados, onde observamos um aumento na resistência intermediária ao antibiótico estreptomicina (um antimicrobiano pertencente à classe de aminoglicosídeos) nas cepas isoladas de *E. coli*.

Em outro estudo conduzido pelo mesmo grupo de pesquisa, foi demonstrado que o *B. thetaiotaomicron* apresenta sensibilidade aumentada à amoxicilina quando cultivado *in vitro* em meios de cultura com níveis elevados de carboidratos simples. Além disso, em experimentos *in vivo*, os autores também mostraram que dietas ricas em açúcares afetaram tanto a abundância quanto a proliferação do *B. thetaiotaomicron*, influenciando sua susceptibilidade à amoxicilina (CABRAL et al., 2019).

Adicionalmente, Littlejohn et al. demonstraram que a deficiência de micronutrientes (zinco, folato, ferro, vitamina A e vitamina B12) na dieta de camundongos não apenas aumentou os níveis de *Enterobacteriaceae* na microbiota intestinal, mas também induziu

um aumento do estresse oxidativo bacteriano. Esse aumento do estresse oxidativo, por sua vez, resultou em uma maior expressão de genes e redes gênicas diretamente ou indiretamente associadas à resistência intrínseca a antibióticos (LITTLEJOHN et al. 2023). Dietas ricas em proteínas, açúcares e lipídeos, também foram ligadas ao aumento de genes de resistência a aminoglicosídeos na microbiota intestinal de camundongos. Tan et al. 2022, demonstrou também amplificação da HGT entre membros da microbiota através do aumento da expressão dos genes reguladores *trfAp* e *trbBp*, os quais podem estimular a conjugação e transferência de ARGs. Neste estudo, também foi visto aumento na quantidade de ARGs na microbiota após o início das dietas, sendo o pico do aumento ocorrendo no 7º dia de dieta (TAN et al., 2022). Esse dado, em parte, é concordante com o aumento da população de *Enterobacteriaceae* resistentes à ampicilina após 15 dias de infecção pulmonar pela *K. pneumoniae* B31 observado nos camundongos alimentados com dieta PF.

De maneira geral, esses dados sugerem que a deficiência de fibras, devido à sua influência na composição, metabolismo e aumento do estresse bacteriano na microbiota intestinal, pode induzir patobiontes comensais a aumentar a expressão de genes relacionados à transferência horizontal de genes e genes de resistência a antimicrobianos (especialmente aqueles relacionados a aminoglicosídeos e quinolonas). Esses genes podem persistir e ser transferidos entre os membros da microbiota intestinal.

Com o intuito de investigar se outra infecção pulmonar, neste caso a infecção por SARS-CoV-2, também influencia na população de *Enterobacteriaceae* e no resistoma de espécies dessa família, em artigo recente, publicado pelo nosso grupo de pesquisa, observamos que indivíduos após a infecção leve ou assintomática por SARS-CoV-2, apresentaram aumento de *Enterobacteriaceae* resistente a antimicrobianos na microbiota intestinal (MENDES DE ALMEIDA et al., 2023). Dado, que corrobora com o estudo realizado por Su et al., que observaram que pacientes com COVID-19 que não haviam sido previamente expostos a antibióticos, apresentaram um notável aumento na abundância e diversidade de genes de resistência a antimicrobianos (ARGs). A expansão do resistoma observado neste estudo foi principalmente impulsionada por genes que conferem resistência a tetraciclinas e vancomicina, e manteve-se evidente por um período mínimo de seis meses após a erradicação do vírus. Ademais, na microbiota dos pacientes com COVID-19, esses pesquisadores observaram prevalência aumentada de bactérias do gênero *Klebsiella* em sua microbiota intestinal (SU et al., 2022) Esses dados corroboram com nossos achados, de aumento na frequência de *K. pneumoniae* resistente a

antimicrobianos na microbiota fecal de indivíduos pós-COVID (MENDES DE ALMEIDA et al., 2023). Espécies de gênero *Klebsiella*, são os principais patógenos resistentes a antimicrobianos responsáveis pela maioria das pneumonias nosocomiais em pacientes hospitalizados com COVID-19 (BAZAID et al., 2022; RUSSELL et al., 2021). Uma revisão sistemática publicada em 2022, constatou que as bactérias Gram-negativas resistentes mais comumente relatadas em pacientes pós-COVID foram: *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* (LANGFORD et al., 2023).

Esses resultados reforçam a hipótese de que a microbiota intestinal é um importante reservatório de genes de resistência e traz como destaque, o fato de que um desequilíbrio nutricional pode favorecer a expansão do resistoma no hospedeiro, após um quadro de infecção por bactérias RAM. Ademais, pesquisas empregando métodos mais sensíveis e específicos, como técnicas de biologia molecular e metagenômica, podem proporcionar uma visão mais abrangente de como a composição e função da microbiota intestinal dos animais do grupo dieta PF influência na transferência e manutenção dos genes de resistência no microbioma intestinal.

7. CONCLUSÃO

De forma geral, nossos resultados apresentam algumas limitações. Utilizamos métodos convencionais cultivo-dependentes para analisar a composição da microbiota intestinal e a susceptibilidade a antimicrobianos de nossos isolados de Enterobacteriaceae, o que pode não capturar completamente a complexidade das interações entre a microbiota intestinal, a dieta e a resistência antimicrobiana. Além disso, a quantidade de isolados foi muito pequena em ambos os grupos. A avaliação do processo inflamatório neste estudo também possui limitações, como a falta de medições diretas de marcadores inflamatórios específicos no tecido pulmonar ou no intestino dos animais, o que não pode ser descartado. Essas limitações destacam a necessidade de estudos adicionais para elucidar o papel do processo inflamatório nas interações entre a dieta, a microbiota intestinal e a resistência antimicrobiana.

Quanto às perspectivas futuras, continuaremos explorando os mecanismos imunológicos subjacentes. Com as futuras análises de metagenômica, poderemos estudar de forma mais profunda o impacto da dieta pobre em fibras na composição e estrutura da microbiota intestinal e do resistoma, com o intuito de compreender melhor a transferência de genes e seus efeitos no desenvolvimento da resistência antimicrobiana.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUS, A. et al. Western diet induces a shift in microbiota composition enhancing susceptibility to Adherent-Invasive E. coli infection and intestinal inflammation. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 19032, 8 jan. 2016.
- ALCAZAR, C. G.-M. et al. The association between early-life gut microbiota and childhood respiratory diseases: a systematic review. **The Lancet Microbe**, v. 3, n. 11, p. e867–e880, nov. 2022.
- ALI, T. et al. Mutation-Based Antibiotic Resistance Mechanism in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Clinical Isolates. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 5, p. 420, 1 maio 2021.
- ALIZADEH, H. et al. Molecular Characteristics of Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae Isolates Producing blaVIM, blaNDM, and blaIMP in Clinical Centers in Isfahan, Iran. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 14, n. 2, 16 maio 2021.
- ALQUMAIZI, K. I. et al. Differential Gene Expression of Efflux Pumps and Porins in Clinical Isolates of MDR Acinetobacter baumannii. **Life**, v. 12, n. 3, p. 419, 14 mar. 2022.
- ALSHAHRANI, A. M. et al. Molecular Epidemiology of Carbapenem-Resistant K. pneumoniae Clinical Isolates from the Adult Patients with Comorbidities in a Tertiary Hospital, Southern Saudi Arabia. **Antibiotics**, v. 11, n. 12, p. 1697, 25 nov. 2022.
- ANTUNES, K. H. et al. Microbiota-derived acetate protects against respiratory syncytial virus infection through a GPR43-type 1 interferon response. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 3273, 22 jul. 2019.
- AROSA, L.; CAMBA-GÓMEZ, M.; CONDE-ARANDA, J. Neutrophils in Intestinal Inflammation: What We Know and What We Could Expect for the Near Future. **Gastrointestinal Disorders**, v. 4, n. 4, p. 263–276, 4 out. 2022.
- ASHIQUE, S. et al. Short Chain Fatty Acids: Fundamental mediators of the gut-lung axis and their involvement in pulmonary diseases. **Chemico-Biological Interactions**, v. 368, p. 110231, dez. 2022.
- BAZAID, A. S. et al. Bacterial Coinfection and Antibiotic Resistance Profiles among Hospitalised COVID-19 Patients. **Microorganisms**, v. 10, n. 3, p. 495, 23 fev. 2022.
- BELKAID, Y.; HAND, T. W. Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 121–141, mar. 2014.
- BOKAEIAN, M. et al. tetA and tetB Genes in Klebsiella Pneumoniae Isolated From Clinical Samples. **Gene, Cell and Tissue**, v. 1, n. 2, 22 maio 2014.
- BUSH, N. G. et al. Quinolones: Mechanism, Lethality and Their Contributions to Antibiotic Resistance. **Molecules**, v. 25, n. 23, p. 5662, 1 dez. 2020.
- BYNDLOSS, M. X. et al. Microbiota-activated PPAR-γ signaling inhibits dysbiotic Enterobacteriaceae expansion. **Science**, v. 357, n. 6351, p. 570–575, 11 ago. 2017.

- CABALLERO-FLORES, G.; PICKARD, J. M.; NÚÑEZ, G. Microbiota-mediated colonization resistance: mechanisms and regulation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, n. 6, p. 347–360, jun. 2023.
- CABRAL, D. J. et al. Microbial Metabolism Modulates Antibiotic Susceptibility within the Murine Gut Microbiome. **Cell Metabolism**, v. 30, n. 4, p. 800–823.e7, out. 2019.
- CAI, Y. et al. Microbiota-dependent and -independent effects of dietary fibre on human health. **British Journal of Pharmacology**, v. 177, n. 6, p. 1363–1381, mar. 2020.
- CALATAYUD, M. et al. Comparative Effect of 22 Dietary Sources of Fiber on Gut Microbiota of Healthy Humans in vitro. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, p. 700571, 2 jul. 2021.
- CARVALHO-WELLS, A. L. et al. Determination of the *in vivo* prebiotic potential of a maize-based whole grain breakfast cereal: a human feeding study. **British Journal of Nutrition**, v. 104, n. 9, p. 1353–1356, 14 nov. 2010.
- CASTANHEIRA, M.; SIMNER, P. J.; BRADFORD, P. A. Extended-spectrum β - lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. **JAC-Antimicrobial Resistance**, v. 3, n. 3, p. dlab092, 12 jul. 2021.
- CHANDRA, H. et al. Pathobionts: mechanisms of survival, expansion, and interaction with host with a focus on *Clostridioides difficile*. **Gut Microbes**, v. 13, n. 1, p. 1979882, 1 jan. 2021.
- CHANG, D. et al. Clinical Epidemiology, Risk Factors, and Control Strategies of Klebsiella pneumoniae Infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 750662, 22 dez. 2021.
- CHOW, J.; TANG, H.; MAZMANIAN, S. K. Pathobionts of the gastrointestinal microbiota and inflammatory disease. **Current Opinion in Immunology**, v. 23, n. 4, p. 473–480, ago. 2011.
- COELHO, G. D. P. et al. Acquisition of microbiota according to the type of birth: an integrative review. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 29, p. e3446, 2021.
- CRONIN, P. et al. Dietary Fibre Modulates the Gut Microbiota. **Nutrients**, v. 13, n. 5, p. 1655, 13 maio 2021.
- CRUZ, C. S.; RICCI, M. F.; VIEIRA, A. T. Gut Microbiota Modulation as a Potential Target for the Treatment of Lung Infections. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 724033, 7 set. 2021.
- DANG, A. T.; MARSLAND, B. J. Microbes, metabolites, and the gut–lung axis. **Mucosal Immunology**, v. 12, n. 4, p. 843–850, jul. 2019.
- DARBY, E. M. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 280–295, maio 2023.
- DE BOER, A. et al. The effect of dietary components on inflammatory lung diseases – a literature review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 68, n. 7, p. 771–787, 3 out. 2017.

- DE STEENHUIJSEN PITERS, W. A. A.; BINKOWSKA, J.; BOGAERT, D. Early Life Microbiota and Respiratory Tract Infections. **Cell Host & Microbe**, v. 28, n. 2, p. 223–232, ago. 2020.
- DESAI, M. S. et al. A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. **Cell**, v. 167, n. 5, p. 1339–1353.e21, nov. 2016.
- DICKSON, R. P. et al. Analysis of Culture-Dependent versus Culture-Independent Techniques for Identification of Bacteria in Clinically Obtained Bronchoalveolar Lavage Fluid. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 10, p. 3605–3613, out. 2014.
- DOORDUIJN, D. J. et al. Complement resistance mechanisms of *Klebsiella pneumoniae*. **Immunobiology**, v. 221, n. 10, p. 1102–1109, out. 2016.
- DUMAS, A. et al. The Host Microbiota Contributes to Early Protection Against Lung Colonization by *Mycobacterium tuberculosis*. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2656, 14 nov. 2018.
- EJAZ, H. et al. Molecular analysis of blaSHV, blaTEM, and blaCTX-M in extended-spectrum β -lactamase producing Enterobacteriaceae recovered from fecal specimens of animals. **PLOS ONE**, v. 16, n. 1, p. e0245126, 7 jan. 2021.
- FU, J. et al. Dietary Fiber Intake and Gut Microbiota in Human Health. **Microorganisms**, v. 10, n. 12, p. 2507, 18 dez. 2022.
- GALLOTTI, B. et al. Effects of dietary fibre intake in chemotherapy-induced mucositis in murine model. **British Journal of Nutrition**, v. 126, n. 6, p. 853–864, 28 set. 2021.
- GALVÃO, I. et al. The Metabolic Sensor GPR43 Receptor Plays a Role in the Control of *Klebsiella pneumoniae* Infection in the Lung. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 142, 20 fev. 2018.
- GAUGUET, S. et al. Intestinal Microbiota of Mice Influences Resistance to *Staphylococcus aureus* Pneumonia. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 10, p. 4003–4014, out. 2015.
- GEETHA, P. V. et al. Fluoroquinolone Resistance in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Laboratory Physicians**, v. 12, n. 02, p. 121–125, ago. 2020.
- GEITANI, R. et al. Expression and Roles of Antimicrobial Peptides in Innate Defense of Airway Mucosa: Potential Implication in Cystic Fibrosis. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1198, 30 jun. 2020.
- GROUSSIN, M. et al. Elevated rates of horizontal gene transfer in the industrialized human microbiome. **Cell**, v. 184, n. 8, p. 2053–2067.e18, abr. 2021.
- HILTON, S. K. et al. Metataxonomic and Metagenomic Approaches vs. Culture-Based Techniques for Clinical Pathology. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 7 abr. 2016.
- HORNEF, M. Pathogens, Commensal Symbionts, and Pathobionts: Discovery and Functional Effects on the Host. **ILAR Journal**, v. 56, n. 2, p. 159–162, 31 ago. 2015.

HUANG, L. et al. Bacterial Multidrug Efflux Pumps at the Frontline of Antimicrobial Resistance: An Overview. **Antibiotics**, v. 11, n. 4, p. 520, 13 abr. 2022.

ICHINOHE, T. et al. Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 13, p. 5354–5359, 29 mar. 2011.

JACOBY, G. A. AmpC β -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 161–182, jan. 2009.

JALILI-FIROOZINEZHAD, S. et al. A complex human gut microbiome cultured in an anaerobic intestine-on-a-chip. **Nature Biomedical Engineering**, v. 3, n. 7, p. 520–531, 13 maio 2019.

KADRY, A. A.; EL-ANTRAWY, M. A.; EL-GANINY, A. M. Impact of short chain fatty acids (SCFAs) on antimicrobial activity of new β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations and on virulence of *Escherichia coli* isolates. **The Journal of Antibiotics**, v. 76, n. 4, p. 225–235, abr. 2023.

KARIYAWASAM, R. M. et al. Antimicrobial resistance (AMR) in COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis (November 2019–June 2021). **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 11, n. 1, p. 45, dez. 2022.

KUMARI, M. et al. Emergence of bla_{NDM-1} and bla_{VIM} producing Gram-negative bacilli in ventilator-associated pneumonia at AMR Surveillance Regional Reference Laboratory in India. **PLOS ONE**, v. 16, n. 9, p. e0256308, 8 set. 2021.

LANGFORD, B. J. et al. Antimicrobial resistance in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Microbe**, v. 4, n. 3, p. e179–e191, mar. 2023.

LARSEN, J. et al. Emergence of methicillin resistance predates the clinical use of antibiotics. **Nature**, v. 602, n. 7895, p. 135–141, 3 fev. 2022.

LAS HERAS, V. et al. The Influence of the Western Diet on Microbiota and Gastrointestinal Immunity. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 13, n. 1, p. 489–512, 25 mar. 2022.

LI, N. et al. Gut microbiota dysbiosis contributes to the development of chronic obstructive pulmonary disease. **Respiratory Research**, v. 22, n. 1, p. 274, dez. 2021.

LIMON, J. J.; SKALSKI, J. H.; UNDERHILL, D. M. Commensal Fungi in Health and Disease. **Cell Host & Microbe**, v. 22, n. 2, p. 156–165, ago. 2017.

LIN, S.; ZHU, N.; ZHANG, S. Associations of dietary fiber intake with chronic inflammatory airway diseases and mortality in adults: a population-based study. **Frontiers in Public Health**, v. 11, p. 1167167, 26 maio 2023.

LOVERDOS, K. et al. Lung Microbiome in Asthma: Current Perspectives. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 11, p. 1967, 14 nov. 2019.

M100 PERFORMANCE STANDARDS FOR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING, 33RD EDITION, M100ED33. S.I.: CLSI, 2023.

- MAN, W. H.; DE STEENHUIJSEN PITERS, W. A. A.; BOGAERT, D. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 259–270, maio 2017.
- MARSLAND, B. J.; TROMPETTE, A.; GOLLWITZER, E. S. The Gut–Lung Axis in Respiratory Disease. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 12, n. Supplement 2, p. S150–S156, nov. 2015.
- MARTINSON, J. N. V. et al. Rethinking gut microbiome residency and the Enterobacteriaceae in healthy human adults. **The ISME Journal**, v. 13, n. 9, p. 2306–2318, set. 2019.
- MASLOWSKI, K. M. et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. **Nature**, v. 461, n. 7268, p. 1282–1286, out. 2009.
- MCINNES, R. S. et al. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in the human gut microbiome. **Current Opinion in Microbiology**, v. 53, p. 35–43, fev. 2020.
- MENDES DE ALMEIDA, V. et al. Gut microbiota from patients with COVID-19 cause alterations in mice that resemble post-COVID symptoms. **Gut Microbes**, v. 15, n. 2, p. 2249146, 18 dez. 2023.
- MENG, L. et al. The distribution characteristics of global blaOXA-carrying *Klebsiella pneumoniae*. **BMC Infectious Diseases**, v. 23, n. 1, p. 182, 29 mar. 2023.
- NAZAROV, P. A. MDR Pumps as Crossroads of Resistance: Antibiotics and Bacteriophages. **Antibiotics**, v. 11, n. 6, p. 734, 30 maio 2022.
- OLIVER, A. et al. Association of Diet and Antimicrobial Resistance in Healthy U.S. Adults. **mBio**, v. 13, n. 3, p. e00101-22, 28 jun. 2022.
- PACZOSA, M. K.; MECSAS, J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 3, p. 629–661, set. 2016.
- PANG, P. et al. Alteration of Intestinal Flora Stimulates Pulmonary microRNAs to Interfere with Host Antiviral Immunity in Influenza. **Molecules**, v. 23, n. 12, p. 3151, 30 nov. 2018.
- PAPADOPOULOS, N. G.; SKEVAKI, C. L. VIRUSES OF THE LUNG. Em: **Encyclopedia of Respiratory Medicine**. [s.l.] Elsevier, 2006. p. 483–488.
- PÄRNÄNEN, K. M. et al. Early-life formula feeding is associated with infant gut microbiota alterations and an increased antibiotic resistance load. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 115, n. 2, p. 407–421, fev. 2022.
- PARTRIDGE, S. R. et al. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. e00088-17, out. 2018.
- PATANGIA, D. V. et al. Vertical transfer of antibiotics and antibiotic resistant strains across the mother/baby axis. **Trends in Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 47–56, jan. 2022.

- PATTARONI, C. et al. Early-Life Formation of the Microbial and Immunological Environment of the Human Airways. **Cell Host & Microbe**, v. 24, n. 6, p. 857- 865.e4, dez. 2018.
- PUHLMANN, M.-L.; DE VOS, W. M. Intrinsic dietary fibers and the gut microbiome: Rediscovering the benefits of the plant cell matrix for human health. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 954845, 18 ago. 2022.
- RAKHRA, V. et al. obesity and the Western diet: how We Got here. [s.d.].
- RAWSON, T. M. et al. COVID-19 and the potential long-term impact on antimicrobial resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 7, p. 1681–1684, 1 jul. 2020.
- ROBERTSON, R. C. et al. The Human Microbiome and Child Growth – First 1000 Days and Beyond. **Trends in Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 131–147, fev. 2019.
- ROWAN-NASH, A. D. et al. Antimicrobial Resistance Gene Prevalence in a Population of Patients with Advanced Dementia Is Related to Specific Pathobionts. **iScience**, v. 23, n. 3, p. 100905, mar. 2020.
- RUSSELL, C. D. et al. Co-infections, secondary infections, and antimicrobial use in patients hospitalised with COVID-19 during the first pandemic wave from the ISARIC WHO CCP-UK study: a multicentre, prospective cohort study. **The Lancet Microbe**, v. 2, n. 8, p. e354–e365, ago. 2021.
- SANTACROCE, L. et al. The Human Respiratory System and its Microbiome at a Glimpse. **Biology**, v. 9, n. 10, p. 318, 1 out. 2020.
- SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–8, 2016.
- SCHITTNY, J. C. Development of the lung. **Cell and Tissue Research**, v. 367, n. 3, p. 427–444, mar. 2017.
- SENCIO, V. et al. Gut Dysbiosis during Influenza Contributes to Pulmonary Pneumococcal Superinfection through Altered Short-Chain Fatty Acid Production. **Cell Reports**, v. 30, n. 9, p. 2934- 2947.e6, mar. 2020.
- SENDER, R.; FUCHS, S.; MILO, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. **PLOS Biology**, v. 14, n. 8, p. e1002533, 19 ago. 2016.
- SHI, Z. Gut Microbiota: An Important Link between Western Diet and Chronic Diseases. **Nutrients**, v. 11, n. 10, p. 2287, 24 set. 2019.
- SHKOPOROV, A. N.; HILL, C. Bacteriophages of the Human Gut: The “Known Unknown” of the Microbiome. **Cell Host & Microbe**, v. 25, n. 2, p. 195–209, fev. 2019.
- SINGH, R. et al. Gut Microbial Dysbiosis in the Pathogenesis of Gastrointestinal Dysmotility and Metabolic Disorders. **Journal of Neurogastroenterology and Motility**, v. 27, n. 1, p. 19–34, 30 jan. 2021.

SMILLIE, C. S. et al. Ecology drives a global network of gene exchange connecting the human microbiome. **Nature**, v. 480, n. 7376, p. 241–244, dez. 2011.

SO, D. et al. Dietary fiber intervention on gut microbiota composition in healthy adults: a systematic review and meta-analysis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 107, n. 6, p. 965–983, jun. 2018.

SOUZA, E. S. et al. Mortality and risks related to healthcare-associated infection. **Texto & Contexto - Enfermagem**, v. 24, n. 1, p. 220–228, mar. 2015.

SPENCER, C. N. et al. Dietary fiber and probiotics influence the gut microbiome and melanoma immunotherapy response. **Science**, v. 374, n. 6575, p. 1632–1640, 24 dez. 2021.

SU, Q. et al. Antibiotics and probiotics impact gut antimicrobial resistance gene reservoir in COVID-19 patients. **Gut Microbes**, v. 14, n. 1, p. 2128603, 31 dez. 2022.

TAN, R. et al. High-sugar, high-fat, and high-protein diets promote antibiotic resistance gene spreading in the mouse intestinal microbiota. **Gut Microbes**, v. 14, n. 1, p. 2022442, 31 dez. 2022.

VAN HOEK, A. H. A. M. et al. Acquired Antibiotic Resistance Genes: An Overview. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, 2011.

VIEIRA, A. T. et al. A Role for Gut Microbiota and the Metabolite-Sensing Receptor GPR43 in a Murine Model of Gout. **Arthritis & Rheumatology**, v. 67, n. 6, p. 1646–1656, jun. 2015.

WALKER, A. W. et al. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. **The ISME Journal**, v. 5, n. 2, p. 220–230, fev. 2011.

WEI, S. et al. Determining Gut Microbial Dysbiosis: a Review of Applied Indexes for Assessment of Intestinal Microbiota Imbalances. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 87, n. 11, p. e00395-21, 11 maio 2021.

WEXLER, H. M. *Bacteroides*: the Good, the Bad, and the Nitty-Gritty. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 4, p. 593–621, out. 2007.

WILLIAMS, B. et al. Gut Fermentation of Dietary Fibres: Physico-Chemistry of Plant Cell Walls and Implications for Health. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 10, p. 2203, 20 out. 2017.

WONG, J. L. C. et al. OmpK36-mediated Carbapenem resistance attenuates ST258 *Klebsiella pneumoniae* in vivo. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 3957, 2 set. 2019.

WOOD, L. G. et al. Dietary inflammatory index is related to asthma risk, lung function and systemic inflammation in asthma. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 45, n. 1, p. 177–183, jan. 2015.

WOOD, L. G.; GIBSON, P. G. Dietary factors lead to innate immune activation in asthma. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 123, n. 1, p. 37–53, jul. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global action plan on antimicrobial resistance**. Geneva: World Health Organization, 2015.

WU, B. G. et al. Episodic Aspiration with Oral Commensals Induces a MyD88-dependent, Pulmonary T-Helper Cell Type 17 Response that Mitigates Susceptibility to *Streptococcus pneumoniae*. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 203, n. 9, p. 1099–1111, 1 maio 2021.

WU, G. et al. Diminution of the gut resistome after a gut microbiota-targeted dietary intervention in obese children. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 24030, 5 abr. 2016.

XU, L.; SUN, X.; MA, X. Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 16, n. 1, p. 18, dez. 2017.

YAO, H. et al. The macrophages regulate intestinal motility dysfunction through the PGE2 Ptger3 axis during *Klebsiella pneumoniae* sepsis. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1147674, 29 mar. 2023.

YILDIZ, S. et al. Influenza A virus infection impacts systemic microbiota dynamics and causes quantitative enteric dysbiosis. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 9, dez. 2018.

ZHAN, Q. et al. Distribution of fluoroquinolone resistance determinants in Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates associated with bloodstream infections in China. **BMC Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 164, dez. 2021.

ZHAO, L. et al. Impact of COVID-19 pandemic on profiles of antibiotic-resistant genes and bacteria in hospital wastewater. **Environmental Pollution**, v. 334, p. 122133, out. 2023.

ZHENG, D.; LIWINSKI, T.; ELINAV, E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. **Cell Research**, v. 30, n. 6, p. 492–506, jun. 2020. KIM, J. Y. et al. The human gut archaeome: identification of diverse haloarchaea in Korean subjects. **Microbiome**, v. 8, n. 1, p. 114, dez. 2020.

ZHOU, G. et al. Outer Membrane Porins Contribute to Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacteria. **Microorganisms**, v. 11, n. 7, p. 1690, 28 jun. 2023. AGUS, A. et al. Western diet induces a shift in microbiota composition enhancing susceptibility to Adherent-Invasive *E. coli* infection and intestinal inflammation. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 19032, 8 jan. 2016.

ZHOU, G. et al. Outer Membrane Porins Contribute to Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacteria. **Microorganisms**, v. 11, n. 7, p. 1690, 28 jun. 2023. ALCAZAR, C. G.-M. et al. The association between early-life gut microbiota and childhood respiratory diseases: a systematic review. **The Lancet Microbe**, v. 3, n. 11, p. e867–e880, nov. 2022.

ANEXO A



Gut Microbiota Modulation as a Potential Target for the Treatment of Lung Infections

Clênio Silva Cruz, Mayra Fernanda Ricci^{*†} and Angélica Thomaz Vieira^{*†}

Laboratory of Microbiota and Immunomodulation (LMI), Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Helioswilton Sales-Campos,
Universidade Federal de Goiás, Brazil

Reviewed by:

Paulo José Basso,
University of São Paulo, Brazil
Gislane Lelis Vilela de Oliveira,
São Paulo State University, Brazil
Abhishek Mohanty,
University of Ottawa Heart Institute,
Canada

*Correspondence:

Mayra Fernanda Ricci
riccimayra@gmail.com
Angélica Thomaz Vieira
angelicathomazvieira@ufmg.br

†ORCID:

Mayra Fernanda Ricci
orcid.org/0000-0003-2074-1204
Angélica Thomaz Vieira
orcid.org/0000-0002-4556-7671

Specialty section:

This article was submitted to
Inflammation Pharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 11 June 2021

Accepted: 20 August 2021

Published: 07 September 2021

Citation:

Cruz CS, Ricci MF and Vieira AT (2021)
Gut Microbiota Modulation as a
Potential Target for the Treatment of
Lung Infections.
Front. Pharmacol. 12:724033.
doi: 10.3389/fphar.2021.724033

The gastrointestinal and respiratory systems are colonized by a complex ecosystem of microorganisms called the microbiota. These microorganisms co-evolved over millions of years with the host, creating a symbiotic relationship that is fundamental for promoting host homeostasis by producing bioactive metabolites and antimicrobial molecules, and regulating the immune and inflammatory responses. Imbalance in the abundance, diversity, and function of the gut microbiota (known as dysbiosis) have been shown to increase host susceptibility to infections in the lungs, suggesting crosstalk between these organs. This crosstalk is now referred to as the gut-lung axis. Hence, the use of probiotics, prebiotics, and synbiotics for modulation of gut microbiota has been studied based on their effectiveness in reducing the duration and severity of respiratory tract infections, mainly owing to their effects on preventing pathogen colonization and modulating the immune system. This review discusses the role and responses of probiotics, prebiotics, and synbiotics in the gut-lung axis in the face of lung infections.

Keywords: symbiotics, mucosal immunity, gut-lung axis, prebiotics, probiotics, immunobiotics, inflammation, microbiota

INTRODUCTION

Microorganisms and humans have co-evolved for thousands of years, and many survival functions have been defined throughout this time for both. All body surfaces are colonized by complex and dynamic communities of symbiotic microorganisms, including bacteria, viruses, fungi, helminths, and protists, called microbiota (Grice and Segre, 2012; Sender et al., 2016). As demonstrated by next-generation sequencing, the lungs and gut possess unique microbiota that differ mainly in composition and structure, with bacteria being the most predominant microorganisms (Dickson et al., 2015; Santacroce et al., 2020). The microbiota plays fundamental roles in host homeostasis via the metabolism of nutrients, production of vitamins, metabolites, and antimicrobial molecules, activation of the immune system, and regulation of the inflammatory process (Dang and Marsland, 2019). The gut dysbiosis has been shown to increase susceptibility to infection in the lungs, and infections in the lung are identified as a cause of gut dysbiosis; highlighting a bidirectional link between these two organs; this crosstalk is now called the gut-lung axis (Li et al., 2008; Hand et al., 2016; Budden et al., 2017; Sencio et al., 2020). Also, the lung and gut originate from the same embryonic organ, the foregut, and consequently have some structural similarities that might

Abbreviations: GF, Germ-free; GPCR, G-protein-coupled receptors; ICU, Intensive care units; IFV, Influenza virus; PRR, pattern recognition receptors; PVM, Pneumonia virus of mice; ROS, Reactive oxygen species; RSV, Respiratory syncytial virus; SCFA, Short-chain fatty acids; SFB, Segmented filamentous bacteria; URT, Upper respiratory tract; VAP, Ventilator-associated pneumonia.

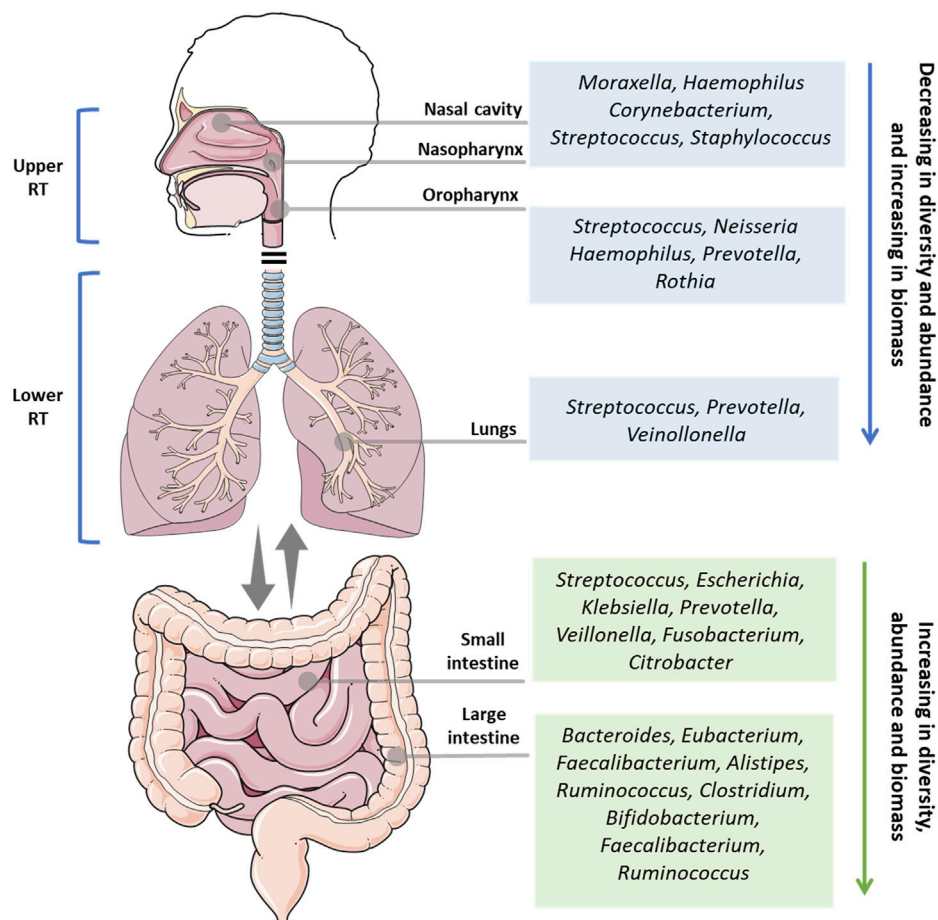


FIGURE 1 | Overview of the main microbial genus in the health upper respiratory tract (nasal cavity, nasopharynx, oropharynx), lower respiratory tract (lungs), small intestine, and large intestine. RT: respiratory tract.

contribute to the interaction between these two organs (Faure and de Santa Barbara, 2011). Respiratory tract infections (RTI) are a global health concern. Approximately 2.38 million deaths were attributed to RTI in 2016 alone, making it the sixth leading cause of mortality among all ages and the leading cause of death among children under 5 years (Ferkol and Schraufnagel, 2014; Troeger et al., 2018). Given the importance of the gut-lung axis, our review summarized the latest experimental and clinical studies on this topic and showed that modulation of the gut-lung axis with probiotics, prebiotics, and synbiotics, could be an important therapeutic target for preventing and treating lung infections caused by bacteria, viruses, fungi, and parasites.

GUT-LUNG AXIS IN RESPIRATORY TRACT INFECTIONS

The respiratory system is composed of different organs, and is divided into two main parts: the upper respiratory tract (URT) and the lower respiratory tract (LRT). The URT comprises the nostrils, nasal passages, paranasal sinuses, nasopharynx, and

oropharynx, while the lower respiratory tract comprises the trachea, bronchi, bronchioles, and alveoli. These organs make up one of the largest surface areas in the human body, that from the nostrils to the lungs, is colonized by a symbiotic and diverse community of microorganisms (Figure 1).

The microbiota of the lungs and gut of healthy individuals differ significantly in taxonomic composition, diversity, and function. In contrast to the thriving resident microbiota in the gut, the lung microbiota is composed of transient microorganisms mainly derived from URT. While Bacteroidetes and Firmicutes are the most abundant bacterial phyla in both microbiotas, the lung and gut microbiota are very different at the species level. In the lungs, the genera *Streptococcus* spp., *Veillonella* spp., and *Prevotella* were the most abundant, whereas *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, and *Bifidobacterium* are more prevalent in the gut (Sender et al., 2016). In a disease or dysbiotic state, other organisms are present in the lung, such as viruses, including human rhinovirus, human bocavirus, polyomaviruses, human adenovirus, and human coronavirus, and fungi such as *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Candida* spp., and *Alternaria* spp. (Papadopoulos and Skevaki, 2006; Limon et al., 2017).

The immune responses in the gut-lung axis depend on the balance of microbiota composition, particularly in the gut. The regulated interaction between the metabolites and antigens of symbiotic microbiota with the host is crucial for the activation of pattern recognition receptors (PRRs) and metabolic sensor receptors such as G-protein-coupled receptors (GPCRs), and the production of inflammatory mediators, which are necessary for the migration, activation, and proliferation of innate and adaptive immune cells responsible for the production of pro- and anti-inflammatory cytokines, immunoglobulins, and antimicrobial peptides (Fan and Pedersen, 2021). These cells and molecules can move bidirectionally between the lungs and the gut through the bloodstream and lymphatic system and regulate immune and inflammatory responses (Marshall et al., 2015; Dang and Marshall, 2019).

Intestinal dysbiosis is responsible for increasing the susceptibility of the host to lung disease, as evidenced by the high prevalence of asthma in patients with irritable bowel syndrome (Yazar et al., 2001). Experimentally, mice treated with antibiotics are more susceptible to lethal infection by the influenza virus (IFV) (Ichinohe et al., 2011; Pang et al., 2018). Furthermore, infections in the lungs are also linked to dysbiosis in the gut; mice infected with IFV displayed a significant increase in *Enterobacteriaceae* and decreased diversity of *Lactobacillus* and *Lactococcus* (Wang et al., 2018). Influenza infection also affects the production of short-chain fatty acids (SCFAs) and impairs the gut barrier properties thereby increasing susceptibility to second bacterial infections (Sencio et al., 2020, 2021).

SCFAs, such as butyrate, propionate, and acetate derived from the fermentation of dietary fibers by the microbiota, are involved in regulating the inflammatory process and pulmonary immune response (Fukuda et al., 2011; Trompette et al., 2014). SCFAs activate GPCRs and inhibit histone deacetylases, thus contributing to the reduction of inflammation in the gut-lung axis by inhibiting the NF- κ B signaling pathway, increasing regulatory T (Treg) cells, and decreasing T helper 1 (Th1) and Th17 cells (Maslowski et al., 2009; Kim et al., 2013; Li et al., 2018). SCFAs can also reach the bone marrow and influence the generation and development of immune cells such as Ly6C- and Ly6C + monocytes and dendritic cells, which can be recruited into the lungs and modulate the immune response against pathogens (Trompette et al., 2014, 2018; Kopf et al., 2015). Our research group has also demonstrated that activation of the GPR43 receptor in neutrophils and alveolar macrophages by acetate is essential for modulating the inflammatory response and controlling pulmonary infection by *Klebsiella pneumoniae* (Galvão et al., 2018) and *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 in mice (Sencio et al., 2020). In another study, activation of GPR43 in pulmonary epithelial cells induced interferon (IFN)- β in the lungs and increased the protection of mice infected with respiratory syncytial virus (RSV) (Antunes et al., 2019).

PROBIOTICS, PREBIOTICS, AND SYNBIOTICS

Probiotics are live microorganisms that confer benefits to the host when administered in adequate amounts (Salminen et al., 2021).

Probiotics are considered important tools for the modulation of microbiota in the gut-lung axis, with their benefits on the gut-lung axis dependent on the strains used (Figure 2). However, common mechanisms have been reported between species, such as –1) colonization of the respiratory and intestinal tracts, 2) production of SCFAs and antimicrobial peptides, 3) maintenance of the integrity of the intestinal and pulmonary mucosa, and –4) stimulation of the innate and adaptive immune system (Bermudez-Brito et al., 2012; Salminen et al., 2021). The benefits of probiotics have been shown in animal models and clinical studies in many disease conditions, such as post-antibiotic-associated diarrhea, allergies and inflammatory bowel diseases, and respiratory tract infections (Vieira et al., 2013). For a given microorganism to be assessed as a probiotic, biosafety criteria and scientific evidence regarding its biological benefits must be considered (Harzallah and Belhadj, 2013). *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species are more commonly used as probiotics; however, yeasts, certain *Streptococcus* spp. strains, and *Bacillus* spp. are also used as probiotics, but less frequently (Fijan, 2014). The use of inactivated probiotics is also of great interest because live probiotic microorganisms may cause systemic infections, excessive immune stimulation, and antibiotic resistance gene transfer (Doron and Snyderman, 2015). Taking this into consideration, the term postbiotics was proposed as preparation for inanimate microorganisms and/or their components that confer a health benefit on the host (Salminen et al., 2021).

Prebiotics are dietary fibers, such as inulin, fructooligosaccharides, and galactooligosaccharides, which are fermented in the gut and promote an increase in the diversity and activity of specific symbiotic microorganisms (Salminen et al., 2021). The activity of prebiotics also leads to an enhancement of immune response, decrease in colon pH, local induction of reactive oxygen species (ROS), trophic effects on enterocytes, and anti-inflammatory responses (Vieira et al., 2013). In addition, the SCFAs butyrate and propionate, derived from the metabolism of prebiotics, can increase miRNAs through the inhibition of histone deacetylases, leading to improved antibody class switching and local and systemic impact on the T-dependent and T-independent immunoglobulin production (Sanchez et al., 2020).

Synbiotics consist of probiotics and prebiotics to achieve synergistic and complementary effects on their functions (Salminen et al., 2021). A recent meta-analysis of randomized controlled clinical trials involving over 10,000 individuals showed the effectiveness of synbiotic interventions in reducing the rate of respiratory tract infections (Chan et al., 2021). Understanding the specific mechanisms of interaction between probiotics and prebiotics and their modulation of the gut environment and immune response will lead to better utilization of the synbiotics to treat infections and metabolic diseases.

Gut-Lung Axis Modulation in the Context of Bacterial Lung Infections

The lung is highly vulnerable to bacterial infections due its constant exposure to environment agents. One of the most

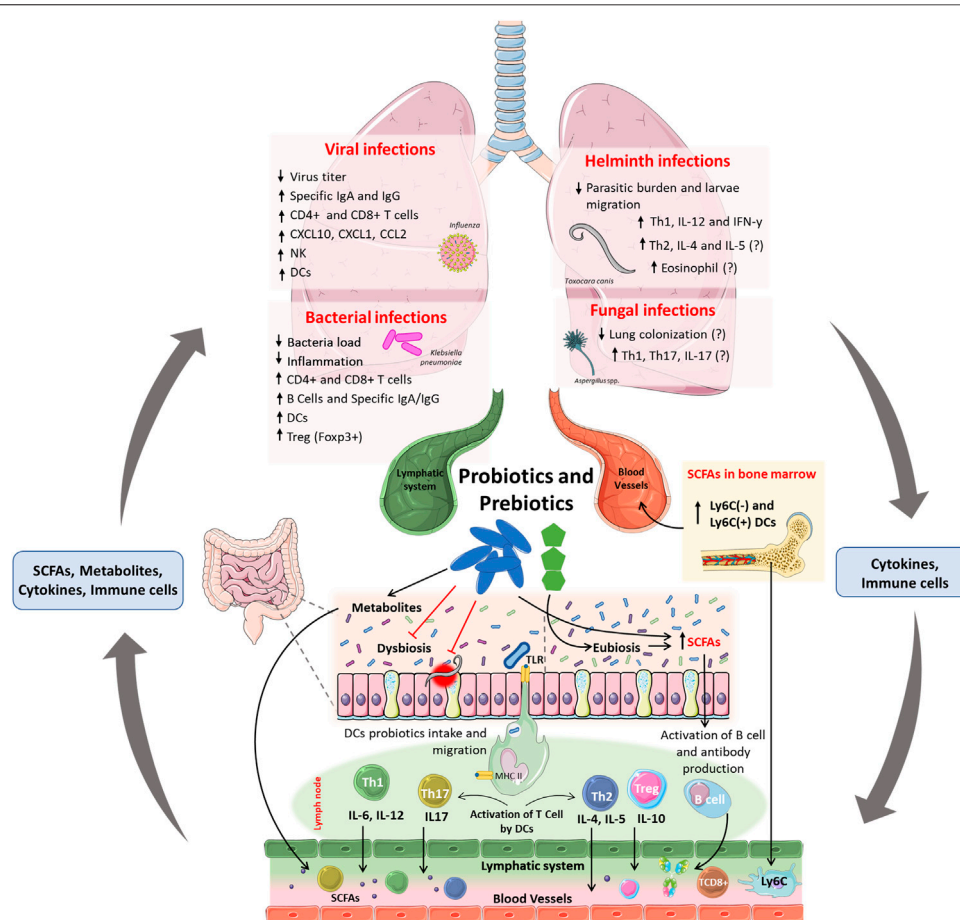


FIGURE 2 | Effects and mainly mechanisms of probiotics and prebiotics in the gut-lung axis and context of respiratory infections. Probiotics and prebiotics administered orally can improve dysbiosis and induce eubiosis in the host, leading to an increase in SCFAs directly (produced by probiotics) or indirectly (produced by commensal microbiota). Furthermore, probiotics can also reduce the burden and epithelial damage induced by intestinal parasites. The uptake of probiotics by DCs in the intestinal submucosa, and their migration to lymph nodes, induces the activation and proliferation of Th1, Th2, Th17, Treg, and B cells. Activated T cells and B cells produce cytokines and antibodies, enter the circulatory and lymphatic systems, and reach the lungs, where they will increase resistance to infections caused by viruses, bacteria, and fungi. The fermentation of prebiotics and production of SCFAs increases the number of DCs precursors in the bone marrow and increases CD8⁺ T cells activity, that confer protection against infections in the lung. The immunomodulation demonstrated after the administration of probiotics and prebiotics may be linked to the reduced viral titer, bacterial colonization, parasite load, and migration in the lungs. Probiotic-induced immunomodulation can increase the frequency of dendritic cells and CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the lungs against infections by viruses and bacteria and can increase specific IgG and IgM antibodies to these pathogens. Also, the increase in Treg cells may be related to the reduction of inflammation-induced lung damage. In parasitic infections, probiotics have been linked with increased frequency of Th1 and concentration of IL-12 and IFN- γ , which may justify the reduction in the parasite load and larvae migration in the lung. Because there are no scientific studies that demonstrate the reduction of lung colonization by fungi after oral administration of probiotics, is still unknown if the antimycotic potential from probiotics metabolites, as shown *in vitro*, could be applied in an *in vivo* system.

common diseases caused by bacteria in the lungs is pneumonia that is characterized by alveolar infection and intense inflammatory response that ranges from mild to severe and can affect both the right and left lobes and may impair the gaseous exchange. The most common causes of bacterial pneumonia in immunocompetent hosts include *S. pneumoniae*, *Haemophilus* spp., and *Mycobacterium tuberculosis*. In immunocompromised hosts the number of pathogens that cause pneumonia is much larger, and in general those individuals are more vulnerable and have worse outcomes (van der Poll and Opal, 2009) (Table 1).

Several studies have shown that the oral administration of different strains of probiotics, such as *Lactobacillus bulgaricus*

CRL 423 and *Streptococcus thermophilus* CRL 412 (Villena et al., 2006), *L. casei* CRL 431 (Villena et al., 2005, 2009), *L. fermentum* (Cangemi De Gutierrez et al., 2001), and *L. rhamnosus* CRL 1505 (Barbieri et al., 2017) causes: 1) increased resistance to infection, 2) decreased number of bacteria in the lungs, and 3) increased survival of mice infected with *S. pneumoniae*. In general, these articles, associated this protection with an increase in neutrophils, lymphocytes, macrophages, phagocytic activity, and levels specific anti-*S. pneumoniae* IgG and IgA in the lungs. The increase in phagocytic activity and the number of neutrophils in the lower respiratory tract is the first line of defense against invading pathogens, and the increase in regulatory cells and cytokines contributes to the reduction of the inflammatory

TABLE 1 | Pre-clinical studies on the modulation of the microbiota for treatment of bacterial and viral lung infections.

Strategy for microbiota modulation	Dose and route of administration	Experimental model	Pathogen	Main outcomes	References
Effects on bacterial pathogen <i>Lactobacillus bulgaricus</i> CRL 423 and <i>Streptococcus thermophilus</i> CRL 412	2×10^8 CFU, via oral	Malnourished, Swiss albino mice	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Reduced bacterial load in the lungs; increased bactericidal function of bronco-alveolar phagocytes; reduced tissue inflammation; increased neutrophils in blood; and increased level of lung anti-pneumococcal IgA and IgG	Villena et al. (2006)
<i>Lactobacillus casei</i> CRL 431	1×10^9 CFU, via intranasal	Malnourished, Male, 3-week-old Swiss albino mice	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Increased the bacteria lung clearance; improved production of TNF- α ; increased activity of phagocytes in the respiratory tract; increased IL-4, IL-10, and <i>Pneumococcus</i> -specific IgG	Villena et al. (2009)
<i>Lactobacillus casei</i> CRL 431	1×10^9 CFU, via oral	Male 6-week-old Swiss albino	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Increased pathogen clearance from blood; lower lung damage; improved number of leukocytes and neutrophils; and increased levels of antipneumococcal IgA in BAL.	Villena et al. (2005)
<i>Lactobacillus fermentum</i>	1×10^7 , via intranasal	Adult, BALB/c mice	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Increased the number of activated macrophages and lymphocytes; and increased anti- <i>S.pneumoniae</i> antibodies	Cangemi De Gutierrez et al. (2001)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CRL1505	1×10^8 CFU, via intranasal	Malnourished, Male, 3-week-old Swiss-albino mice	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Changed the quantitative and qualitative alterations of CD4 ⁺ T cells in the bone marrow, thymus, spleen and lung induced by malnutrition and infection; and increased IL-10 and IL-4 in respiratory and systemic compartments	Barbieri et al. (2017)
<i>Lactobacillus casei</i> CRL 431, <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> and <i>Streptococcus thermophilus</i>	1×10^9 CFU, via oral	3-week-old, Swiss albino mice	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Enhanced lung clearance of <i>P. aeruginosa</i> ; increased phagocytic activity of alveolar macrophages; and increased IgA and IgM levels in BAL.	Alvarez et al. (2001)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	4×10^8 CFU, via oral	5 to 8-week-old, FVB/N mice	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Mice treated had improved survival; reduced bacterial counts in BAL; decreased the levels of IL-6 and increased levels of IL-10 mRNA; improved lung pathology; and increased levels of Treg cell marker Foxp3	Meitert et al. (2013)
<i>Lactobacillus fermentum</i> K.C6.3.1E, <i>Lactobacillus zeae</i> Od.76, and <i>Lactobacillus paracasei</i> ES.D.88	9×10^6 CFU, via intratracheal	6 to 8-week-old, C57BL/6 mice	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Decreased secretion in BAL of IL-6 and TNF- α	Fangous et al. (2019)
<i>Bifidobacterium longum</i> 5 ^{1A}	1×10^8 , via oral	8 to 12-week-old, C57BL/6 WT and Mal/TIRAP ^{-/-} mice	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Reduced bacterial burden; faster resolution of inflammation; decreased lung damage; increased production of IL-10; and increased alveolar macrophages ROS associated with Mal/TIRAP activation	Vieira et al. (2016)
Effects on viral pathogen <i>Lactobacillus casei</i> Shirota	1×10^8 CFU, via oral	Neonatal and infant, BALB/c mice	Influenza A/PR/8/34 (H1N1)	Higher survival rate, reduced titer of virus in the nasal washings; greater pulmonary NK cell activity; and increased IL-12 production by mediastinal lymph nodes	Yasui et al. (2004)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> M21	1×10^9 CFU, via oral	Female, specific pathogen-free, BALB/c mice	Influenza A/NWS/33 (H1N1)	Increased IL-2 and IFN- γ ; increased sIgA levels; reduced inflammatory cells in BAL.	Song et al. (2016)

(Continued on following page)

TABLE 1 | (Continued) Pre-clinical studies on the modulation of the microbiota for treatment of bacterial and viral lung infections.

Strategy for microbiota modulation	Dose and route of administration	Experimental model	Pathogen	Main outcomes	References
<i>Lactobacillus pentosus</i> S-PT84	Heat-killed <i>L. pentosus</i> S-PT84, via intranasal	Female, BALB/c mice	Influenza A/PR/8/34 (H1N1)	Increased survival rates; reduced titer of influenza virus in BAL; increased IL-12 and IFN γ production in mediastinal lymph node cells; increased IL-12 and IFN- α in BAL; and increased NK cell activity	Izumo et al. (2010)
<i>Lactobacillus plantarum</i> and <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1 $\times$ 10 ⁹ CFU, via oral	Female, 5-week-old, BALB/c mice	Influenza rK09 (H1N1)	Restrained viral replication; and increased rates of survival of infected mice	Bae et al. (2018)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	200 μ g of <i>L. rhamnosus</i> GG lyophilized, via intranasal	Female, 7-week-old BALB/c mice	Influenza A/PR/8/34 (H1N1)	Higher survival rate; increased cell-killing activity of lung cells; and increased mRNA expression of interleukin IL-1 beta, TNF and MCP-1	Harata et al. (2010)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> L-92	4 $\times$ 10 ¹⁰ CFU, via oral	Female, 4-weeks-old BALB/c mice	Influenza A/PR/8/34 (H1N1)	Reduced Virus titers in the lung; increased NK cells activity; decreased the number of neutrophils; increased eotaxin, MCSF, IL-1 β , RANTES and IFN- α in the lung; and increased IL-17 levels in Peyer's patches	Goto et al. (2013)
<i>Lactobacillus plantarum</i> DK119	1 $\times$ 10 ⁸ or 1 $\times$ 10 ⁹ CFU, via oral	Female, BALB/c mice	Influenza A/PR8	Reduced lung viral loads; increased levels of cytokines IL-12 and IFN- γ in BAL; and reduced degree of inflammation	Park et al. (2013)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> JCM5805	1 mg of heat-killed <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> JCM5805, via oral	Female, DBA/2jcl mice	Murine Parainfluenza virus (mPIV1)	Increased survival rate; prevention of weight loss; reduced lung histopathology scores; increased activation of Peyer's patches (PP) and PP pDCs; increased levels of type I IFNs; and increased expressions of anti-viral factors such as <i>Isg15</i> , <i>Oasl2</i> , and <i>Viperin</i> , at lung	Jounai et al. (2015)
<i>Lactobacillus paracasei</i> CNCM I-1518	2 $\times$ 10 ⁸ CFU, via oral	Female, 6-week-old BALB/c mice	Influenza A/Scotland/20/74 (H3N2)	Reduced weight loss; and increased recruitment of inflammatory myeloid cells, such as interstitial monocytes and dendritic cells, to the lungs	Belkacem et al. (2017)
<i>Bacillus subtilis</i> 3 (UCM B-5007)	1 $\times$ 10 ⁷ CFU, via oral	Four-week-old BALB/c mice	Influenza A/FM/1/47 (H1N1)	Prevented influenza infection	Starosila et al. (2017)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CRL1505	1 $\times$ 10 ⁸ CFU, via oral	Male, 6-week-old BALB/c mice	Respiratory Syncytial Virus strain A2 and Influenza virus A/PR/8/34 (H1N1)	Reduced lung immune-coagulative reaction triggered by TLR3 activation	Zelaya et al. (2014)
<i>Lactobacillus plantarum</i> NCIMB 8826 and <i>Lactobacillus reuteri</i> F275	1 $\times$ 10 ⁹ CFU, via intranasal	BALB/c and C57BL/6 MyD88 ^{-/-} mice	Pneumonia Virus of mice (PVM) strain J3666	Protection against lethal infection; reduced granulocyte recruitment; reduced expression of proinflammatory cytokines CXCL10, CXCL1, CCL2, and TNF.	Gabryszewski et al. (2011)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CRL1505 and CRL1506	1 $\times$ 10 ⁸ CFU, via intranasal	Female, 3-week-old BALB/c mice	Human RSV strain A	Increased levels of IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-6 and IL-10; increased levels of CD4 ⁺ Tregg cells and CD11c ⁺ CD103 ⁺ DCs; reduced viral replication and lung damage	Tomosada et al. (2013)

response and to the maintenance of tolerance to symbiotic microorganisms, which is necessary to reduce damage associated with infections by pathogens (Martin and Frevert, 2005).

Similar results were observed in mice infected with *Pseudomonas aeruginosa*, treated orally with the probiotics *L. casei* CRL 431, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *S. thermophilus* (Alvarez et al., 2001) and *L. rhamnosus* GG (Meitert et al., 2013).

TABLE 2 | Clinical studies on the modulation of the microbiota for treatment of bacterial and viral lung infections.

Strategy for microbiota modulation	Dose and route of administration	Study design and subjective	Pathogen and disease	Outcome	References
Effects on bacterial pathogen <i>Lactobacillus casei</i> <i>rhamnosus</i> Lcr35	1×10^9 CFU, via oral	Prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study with patients aged 18-91	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Reduction in the occurrence of <i>P. aeruginosa</i> respiratory colonization and/or infection in the probiotic group. Reduction in the frequency of VAP to <i>P. aeruginosa</i>	Forestier et al. (2008)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	2×10^9 CFU, via oral	Prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled trial with patients at high risk of developing VAP	VAP by Gram-positive and Gram-negative pathogens	Reduction in the development of microbiologically confirmed VAP. Patients treated with probiotics had fewer days of antibiotics prescribed for VAP.	Morrow et al. (2010)
<i>Bifidobacterium breve</i> Yakult, <i>Lactobacillus casei</i> Shirota, and galacto-oligosaccharide	1×10^8 CFU of <i>B. breve</i> and <i>L. casei</i> and Galacto-oligosaccharides in a 10 g/day formula, via oral	Randomized controlled trial with patients with more than 16 years old	Patients with more than 16 years old, placed on a ventilator, and who were diagnosed as having sepsis	Reduced incidence of VAP. Increased number of <i>Bifidobacterium</i> and <i>Lactobacillus</i> . Increased concentration of acetate in the feces	Shimizu et al. (2018)
Effects on viral pathogens <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ATCC 5310 and galacto-oligosaccharide and polydextrose mixture <i>Lactobacillus brevis</i> KB290	1×10^9 CFU/day for 1–30 days and 2×10^9 CFU/day for 31–60 days, via oral 6×10^9 , via oral	Randomized, double-blind, placebo-controlled study with preterm infants	Rhinovirus-associated respiratory tract infection	Reduced respiratory tract infections. Reduced rhinovirus-induced episodes	Luoto et al. (2014)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	1×10^9 , via oral	Open-label, parallel-group trial with elementary schoolchildren	Influenza infection	Reduced incidence of influenza infections	Waki et al. (2014)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	1×10^9 , via oral	Randomized, double-blind, placebo-controlled study with nursing home residents aged 65 and older	Influenza infection	Reduced laboratory-confirmed respiratory viral infections	Wang et al. (2018)
<i>Streptococcus thermophilus</i> DSM 32245, <i>Bifidobacterium lactis</i> DSM 32246, <i>Bifidobacterium lactis</i> DSM 32247, <i>Lactobacillus acidophilus</i> DSM 32241, <i>Lactobacillus helveticus</i> DSM 32242, <i>Lactobacillus paracasei</i> DSM 32243, <i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 32244, and <i>Lactobacillus brevis</i> DSM 27961	2.4×10^9 , via oral	Retrospective, observational cohort study with adults	COVID-19 pneumonia by SARS-CoV-2	Increased survival rates of patients that received BAT plus oral bacteriotherapy	Ceccarelli et al. (2021)

In addition, the administration of *L. rhamnosus* GG induces an anti-inflammatory response by increasing the levels of regulatory T cells (Treg) Foxp3+ and decreasing the production of the proinflammatory cytokine IL-6. This anti-inflammatory profile was also observed in mice infected with *P. aeruginosa* with intratracheal administration of probiotics *L. fermentum* K.C6.3.1E, *L. zeae* Od.76, and *L. paracasei* ES.D.88, demonstrated by the reduction of lung inflammation and decreased production of IL-6 and tumor necrosis factor (TNF)- α (Fangous et al., 2019).

In an experimental lung infection by *K. pneumoniae*, the administration of viable or inactivated probiotic *Bifidobacterium longum* 5^{1A} induced pulmonary clearance of *K. pneumoniae* by increasing ROS production in alveolar

macrophages through activation of the mal/TIRAP signaling pathway (Vieira et al., 2016). There was a concomitant reduction in the inflammatory process and concentration of cytokines TNF- α and IL-6 and an increase in IL-10 in the lungs of mice. However, only viable probiotics were able to increase the levels of IL-10 in the lungs of mice. Viable *B. longum* 5^{1A} produces SCFA acetate in large quantities, and acetate administration in mice before respiratory infection by *K. pneumoniae* induced increased production of IL-10 in animals. The authors demonstrated that acetate might be the primary inducer production of IL-10 in this model (Vieira et al., 2016). In addition, intestinal colonization of germ-free mice with *B. longum* 5^{1A} restored the ability of these mice to decrease infection by increasing the production of CXCL1 and the recruitment of

neutrophils (Vieira et al., 2016). In mice infected with IFV, the lower quantity of acetate was also related to increased susceptibility to secondary respiratory pneumococcal infection, mainly due to the impaired bactericidal activity of alveolar macrophages, and this detrimental effect was restored after acetate supplementation (Sencio et al., 2020).

The potential of probiotics to protect the host from pulmonary infections has also been assessed in several clinical studies, including diverse patients, methodological designs, and inclusion criteria (Table 2). Most of these studies focused on probiotics for prevention and treatment of nosocomial pulmonary infections in patients admitted to intensive care units (ICUs). Two prospective, randomized, double-blind, and placebo-controlled studies showed that the probiotics *L. casei* rhamnosus Lcr35 and *L. rhamnosus* GG, administered orally or oropharyngeally, resulted in decreased colonization and infection of the LRT by *P. aeruginosa* or related gram-positive and gram-negative pathogens in patients admitted to the ICU using mechanized pulmonary ventilation (Forestier et al., 2008; Morrow et al., 2010). Only one study showed that administration of a synbiotic consisting of *B. breve* Yakult, *L. casei* Shirota, and galactooligosaccharides decreased the incidence of ventilator-associated pneumonia (VAP) in patients diagnosed with sepsis admitted to the ICU (Shimizu et al., 2018).

In general, we can conclude that the modulation of the intestinal microbiota, mainly with probiotics, is an exciting alternative for treating lung diseases caused by bacteria. Although it is already well established in the literature that probiotic species and strains behave differently according to their metabolic pathways and their interaction with the host, the probiotic species used against lung alterations attract attention to those from the *Lactobacillus* genus. Most articles demonstrated that non-specific immune responses mediated by probiotics, prebiotics, and symbionts are the principal host protection against lung bacteria. Generally, it seemed more significant phagocytic activity of lung macrophages, reduced lung bacterial load, and less tissue inflammation, associated with increased levels of IL-4 and IL-10, increased frequency of Treg cells, increased production of IgA and IgG, and reduced of IL-6 and TNF- α levels. This demonstrates a more resolving anti-inflammatory profile after modulation of the host's intestinal microbiota. Despite the benefits, these articles use different study designs, experimental models, doses, and routes of administration, making it challenging to translate the results obtained in animal models to humans and thus develop more specific therapies with probiotics.

Gut-Lung Axis Modulation in the Context of Lung Viral Infections

Viral infections generally cause common cold, bronchiolitis, and pneumonia and vary widely in severity depending on age, immune and nutritional status, genetics, and use of antibiotics. IFV, RSV, and rhinovirus are the most abundant and common causes of lung infections (Jain, 2017). IFV is well known to cause outbreaks of varying severity every year, but recently the novel

coronavirus SARS-CoV-2 has emerged as a pandemic that has caused more than 3.5 million deaths (Zhu et al., 2020) (Table 1).

Several studies have demonstrated the potential for oral and intranasal administration of probiotics such as *L. casei* Shirota (Yasui et al., 2004), *L. rhamnosus* M21 (Song et al., 2016), *L. pentosus* S-PT84 (Izumo et al., 2010), and *L. plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides* (Bae et al., 2018) to protect and increase the survival of IFV-infected animals, mainly by inducing anti-viral immune responses with the activation of NK cells and increased production of cytokines such as IL-12 and IFN- γ , increased production of IgA in the respiratory mucosa, and reduction of polymorphonuclear inflammatory infiltrate in the lung tissue. In addition to these protective effects, *L. rhamnosus* GG administered intranasally (Harata et al., 2010), and *L. acidophilus* L-92 (Goto et al., 2013) also demonstrated the ability to increase the levels of proinflammatory cytokines, such as IL-1 β , monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), and chemokines such as eotaxin and M-CSF.

Dendritic cells are crucial for developing immune responses because of their ability to detect pathogens through TLRs and create a link between innate and adaptive immune responses. Mice with depleted alveolar macrophages lost the anti-viral protection against IFV infection conferred by increasing IL-12 and IFN- γ levels after oral administration of the probiotic *L. plantarum* DK119 (Park et al., 2013). In addition, the importance of dendritic cells was demonstrated after oral administration of the probiotic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM5805 in mice infected with murine parainfluenza virus. The authors showed that the probiotic was incorporated into CD11c⁺ immune cells in Peyer's patches and activated plasmacytoid dendritic cells that produce type I IFNs at draining mucosal sites. The authors also observed an increase in IFN-related genes, such as *lsg15*, *Oasl2*, and *Viperin* in the lungs, suggesting that the type I IFN produced by plasmacytoid dendritic cells could reach systemic levels and induce anti-viral activity in the lungs. In addition, *ex vivo* stimulation with murine parainfluenza virus of lung lymphocytes from mice treated with JCM5805 demonstrated high expression of IFN- α and IFN- β (Jounai et al., 2015).

Determining the taxonomic composition and function of the microbiota is crucial for understanding the impact of probiotics on the protective response against pathogens. The oral administration of *L. paracasei* CNCM I-1518 did not modify the gut microbiota structure in mice infected with IFV; however, it conferred protection against the virus (Belkacem et al., 2017).

Diets rich in inulin and SCFAs improve mice lung pathology after infection with IFV by promoting the differentiation of alternatively activated macrophages (AAMs) from circulating Ly6C⁺ monocytes and decreasing the immunopathological effects of neutrophils. Also SCFAs increases anti-IFV immunity by enhancing the CD8⁺ T cells activity by serving as a substrate for fatty acid oxidation and by specifically interacting with the receptor GPR41 (Trompette et al., 2018). One study showed that activation of GPR43 and interferon- α/β receptor (IFNAR) in pulmonary epithelial cells by SCFA acetate induced increased levels of IFN- β in the lungs and increased protection of mice in an experimental model of RSV infection (Antunes et al., 2019).

Other probiotic-derived metabolites also require further investigations. A peptide P18 produced by the probiotic *Bacillus subtilis* 3 (UCM B-5007) share high structural homology with IFV neutralizing antibody, and it is capable of inhibit IFV replication *in vitro* and protect 80% of mice from lethal IFV infection when administered in a therapeutic regimen. This protection is superior to that observed using the anti-viral drug oseltamivir (approximately 70%) (Starosila et al., 2017).

Double-stranded RNA intermediates from IFV and RSV are associated with changes in the host's coagulation process by activation of receptors such as TLR-3, and retinoic acid-inducible gene I (RIG-I). The activation of these receptors by these viruses, increases the expression of coagulation factors in endothelial cells and monocytes and inhibits fibrinolysis, inducing a prothrombotic state in the hosts, leading to fibrin deposition in the pulmonary alveoli and exacerbation of tissue inflammation. In order to address this issue one study demonstrated in a murine model of IFV and RSV infection, that oral administration of *L. rhamnosus* CRL 1505 in mice increases the clearance of both viruses and controls immune-coagulative responses initiated by the activation of TLR-3 in the lungs, in a process dependent on IL-10 (Zelaya et al., 2014).

Intranasal administration of viable or heat-killed *L. plantarum* NCIMB 8826 and *L. reuteri* F275 protected mice from lethal pneumonia virus of mice (PVM) infection. The lungs showed minimal inflammation, with fewer granulocytes and an increased number of lymphocytes, correlated with a reduction in proinflammatory cytokines CXCL10, CXCL1, CCL2, and TNF- α . Evaluation of the lymphocyte populations demonstrated that treatment did not result in changes in the relative proportions of CD4⁺ T cells (CD3⁺CD4⁺CD8⁺), CD8⁺ (CD3⁺CD4⁺CD8⁺), or B cells (B220⁺). In contrast, the fraction of NK cells (CD3⁺DX5⁺) decreased. The authors demonstrated that these results are not specific for *L. plantarum* NCIMB 8826 and *L. reuteri* F275, as the same protection was observed when using the non-pathogenic gram-positive bacteria *Listeria innocua*. These probiotics also increased the survival of mice infected with the PVM, with the deleted MyD88 (TLRs adapter protein) gene (MyD88^{-/-}), thus demonstrating that this induced protection can be TLR-independent (Gabryszewski et al., 2011). However, other studies have determined that the anti-viral activity of probiotics is related to the activation of TLRs. This was demonstrated in mice with *L. rhamnosus* probiotics CRL1505 and CRL1506 that differentially activate the TLR3/RIF-I pathway to inoculate with poly (I:C) (a molecular pattern associated with viruses). The activation of TLR3/RIF-I leads to increased production of IFN- γ , IFN- β , TNF- α , IL-6, and IL-10, the frequency of CD3⁺CD4⁺IFN- γ ⁺, CD3⁺CD4⁺IL-10⁺, and the dendritic cells D11c⁺CD11b^{low}CD103⁺ and CD11c⁺CD11b^{high}CD103, in the lungs. Additionally, this study showed an increase in MHC-II levels in both populations of dendritic cells. The authors also demonstrated that this protective response and modulation of the immune response were similar to those observed in mice infected with the human RSV strain (Tomosada et al., 2013).

Clinical studies showed that probiotics have general effects on viral infections of the respiratory tract (Table 2). A randomized, double-blind, placebo-controlled study, on

preterm infants showed that a synbiotic composed of *L. rhamnosus* GG ATCC5310 and galactooligosaccharides and polydextrose reduced the rate of rhinovirus infection compared to the placebo group (Luoto et al., 2014). In school-aged children, consumption of *L. brevis* KB290 during the influenza season was associated with a reduction in the clinical diagnosis of IFV infection (Waki et al., 2014). In a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study, the probiotic *L. rhamnosus* GG was also associated with a reduction in the occurrence of influenza infections (Wang et al., 2018).

As demonstrated, the most used probiotics in studies of pulmonary diseases caused by viruses are also those of the *Lactobacillus* genus. The effects of this genus related to increased protection against viruses are linked to increased production of IFN types I and II, proinflammatory cytokines such as IL-12 and IFN- γ , or even increased expression of genes encoding anti-viral factors. Unfortunately, a mechanistic basis for the observed beneficial effects of probiotics in combating viral lung infections is often not well defined. This knowledge gap is mainly because most experiments using probiotics for viral treatment use different study designs and experimental models, doses, times, and routes of administration. Therefore, more research is needed to understand better the role of probiotics in our immune system in fighting viral pulmonary infections.

The Gut-Lung Axis During SARS-CoV-2 Infection

The severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), which causes coronavirus disease 2019 (COVID-19), has spread around the world since 2019 and has been declared a pandemic that continues to spread with devastating consequences to public health. As of July 2021, there were approximately 190, 600, 300 global confirmed cases and 4,130,000 confirmed deaths.

SARS-CoV-2 can invade human cells by binding its spike protein to a variety of receptors, such as angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), neuropilin-1, tyrosine-protein kinase receptor (AXL), and antibody-Fc γ R complexes (V'kovski et al., 2021). The current evidence suggests that the severity of COVID-19 is a consequence of a hyperinflammatory immune response culminating in a 'cytokine storm', with markedly increased levels of proinflammatory cytokines such as IL-1, IL-6, IL-12, IFN- γ , and TNF- α , which elicit extensive local and systemic tissue damage (Coperchini et al., 2020).

Recent studies have revealed that patients infected with SARS-CoV-2 demonstrate intestinal dysbiosis, which correlates with the susceptibility and severity of COVID-19 (Zuo et al., 2020; Yeoh et al., 2021). Though some studies detected SARS-CoV-2 RNA in the feces of patients, the activity and infectivity of SARS-CoV-2 in the GI tract are still largely unknown (Zuo et al., 2021). However, as ACE2 is highly expressed in the intestinal epithelia, this receptor may be involved in gastrointestinal symptoms that are common in severe cases (Chen et al., 2020; Villapol, 2020; Koester et al., 2021). Interestingly, in a study with gnotobiotic rats, researchers demonstrated that the gut microbiota regulates the colonic mRNA of ACE2 (Yang et al., 2020).

Another study demonstrated that patients with severe COVID-19 had a significant decrease in the abundance of butyrate-producing bacteria, such as *Faecalibacterium prausnitzii*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium leptum*, and *Eubacterium rectale*, and an increased number of common opportunistic pathogens, *Enterococcus* and *Enterobacteriaceae* (Tang et al., 2020). In non-human primates infected with SARS-CoV-2, 16S rRNA analysis of the microbial gut community showed changes in the taxonomic composition, with the relative abundance of *Acinetobacter* and *Ruminococcaceae* being positively correlated with the presence of SARS-CoV-2 in the URT. In addition, SARS-CoV-2 infection significantly alters the metabolite composition with a reduction in the levels of SCFAs, bile acids, and tryptophan metabolites (Sokol et al., 2021).

The impact of probiotics in COVID-19 and in the cytokine storm can be deduced by their known mechanisms in modulating immune response and inflammation (He et al., 2020; de Oliveira et al., 2021), but more basic and clinical research is needed to show their benefits. In a retrospective study of ICU patients diagnosed with pneumonia caused by SARS-CoV-2, the association of the best available therapy with the probiotics *S. thermophilus* DSM 32245, *B. lactis* DSM 32246, *B. lactis* DSM 32247, *L. acidophilus* DSM 32241, *L. helveticus* DSM 32242, *L. paracasei* DSM 32243, *L. plantarum* DSM 32244, and *L. brevis* DSM 27961 showed a positive association with reduced mortality (Ceccarelli et al., 2021).

Gut-Lung Axis Modulation in the Context of Fungal Lung Infections

Among the wide variety of respiratory pathogens, fungi are responsible for only a small proportion of nosocomial or community-acquired pneumonia. However, these species are of relevant medical interest, as fungi cause high morbidity and mortality especially when they affect immunosuppressed patients, or patients with chronic lung diseases, such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (Charlson et al., 2012; Delhaes et al., 2012).

Although some studies showed that the microbiota in the gut-lung axis is fundamental to the host response to lung infections by fungi, most studies that have demonstrated antimycotic action against respiratory pathogens have been carried out *in vitro*. *In vitro* experiments showed that the bacterium *Bacillus safensis* can block, in a contact-dependent manner, several *Cryptococcus neoformans* virulence factors including melanin, antiphagocytic capsule, and biofilm formation (Mayer and Kronstad, 2017). Many microorganisms of the genus *Bacillus* are characterized as probiotics (Hong et al., 2005); however, *B. safensis* has not yet been characterized as such. *B. safensis* is phylogenetically close to the probiotic *B. pumilus* (Satomi et al., 2006), and its anti-fungal activity has been described (Pandya and Saraf, 2015), making *B. safensis* an exciting candidate for studies of biological safety and probiotic activity. Another study demonstrated *in vitro* that treatment with concentrated cell-free supernatant from the culture of *L. plantarum* 16 altered the transcription of genes involved in a variety of cellular functions, especially those related

to cellular metabolism, which culminated in the complete inhibition of spore germination and development of the germ tubes and hyphae of the pathogen *A. fumigatus* (Crowley et al., 2013). In one *in vivo* study using the probiotics *Saccharomyces boulardii*, *L. paracasei* ST-11, and *L. rhamnosus* GG, mice were not protected against lung infection caused by the pathogen *Cryptococcus gattii* (Oliveira et al., 2017).

The recognition of lectins in the fungal cell wall by PRRs is crucial for the activation of dendritic cells and macrophages and the activation of T cells, including Th1 and Th17, which are the best defense strategies against fungal infections, as they help promote the clearance of fungi through innate effectors such as neutrophils and macrophages. The activation of Treg cells and anti-inflammatory cytokines is also fundamental to the anti-fungal immune response, as these cells and molecules are essential for controlling the inflammatory response. The immune response against fungi has already been extensively reviewed by other authors, such as Lionakis et al. (2017).

Among the opportunistic species that affect the lungs, *Aspergillus* spp. are the primary etiologic agents of invasive lung diseases and mainly affect transplant patients (Kontoyiannis et al., 2010; Pappas et al., 2010). Evidence also suggests that COPD patients are at a high risk of developing invasive aspergillosis, although this association is poorly explored (Hammond et al., 2020). An experimental study demonstrated the importance of intestinal microbiota in structuring the pulmonary anti-*Aspergillus* immune response. During infection by *A. fumigatus*, the administration of antibiotics decreased the number of Th17 cells and IL-17 in the lungs, which correlated with a decrease in intestinal colonization by segmented filamentous bacteria (SFB). By investigating how commensal SFBs were linked to this phenotype, the authors, through serum transfer experiments from mice colonized by SFB to negative SFB mice, demonstrated that SFBs contribute to the accumulation of Th17 cells in the lung by inducing an increase in IL-1. This was confirmed when mice that received serum pre-incubated with an IL-1 antagonist attenuated the response of Th17 cells in the lungs (McAleer et al., 2016). Germ-free mice (GF) infected with *C. gattii* showed greater susceptibility to lung colonization, mortality, correlated with reduced levels of IFN- γ , IL-1 β , and IL-17 and reduced phagocytosis and ROS production than conventional mice. After restoring the intestinal microbiota those mice mounted a stronger response to infection by *C. gattii*, associated with prolonged survival rates and higher levels of inflammatory mediators (Costa et al., 2016).

Pneumocystis jirovecii is another opportunistic fungus that causes pneumonia, particularly in HIV-positive patients, with an inverse relationship between the CD4⁺ T cell count in the blood and the risk of infection by *P. jirovecii* (Dunbar et al., 2020). When investigating the diversity of the intestinal microbial community between immunocompetent mice and mice depleted of CD4⁺ T cells, with pneumonia caused by *Pneumocystis murina*, there was a significant change in alpha and beta diversity and a change in the taxonomic abundance of the intestinal microbiota among these groups, suggesting that the loss of CD4⁺ T cells affects the intestinal microbiota and the response to *P. murina*. *P. murina* infection was also found to

increase the expression of genes in the intestinal microbiota related to carbohydrate energy metabolism, xenobiotic degradation, and signal transduction pathways (Samuelson et al., 2016a).

Another study demonstrated that vaccination, using a prime-boost vaccination strategy, with live *P. murina* induced protection against subsequent lung infection with the same pathogen in immunocompetent mice and even in mice depleted of CD4⁺ T cells. In immunocompetent mice, this immunization increased the number of CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, CD19⁺ B cells, and CD11b⁺ macrophages in the lungs after a respiratory infection and increased the levels of IgG and IgA specific for *P. murina*. A significant reduction in the lung load of *P. murina* was observed in serum transfer experiments from non-infected and immunized mice to infected mice. The beta diversity of the intestinal microbial community in mice immunized with *P. murina* was also altered, suggesting that the effectiveness of this immunization may be partly related to the modification of the microbiota; however, further studies are needed to determine whether changes in the microbiota participate in the induction of immunological memory in *P. murina* (Samuelson et al., 2016b).

Despite the importance of the intestinal microbiota and its metabolites for the development of anti-fungal immune responses, and *in vitro* studies demonstrate that probiotics have an action against fungi that cause lung infections, there have been no reports of robust studies aiming to assess the effectiveness of the modulation of *in vivo* intestinal microbiota for the prevention and/or treatment of pulmonary fungal infections. Thus, with the significance of lung infections in mind, more researchers urgently need to turn their attention to this broad and promising field.

Gut-Lung Axis Modulation in the Context of Parasitic Lung Infection

Many helminths cause disease, but they have been shown to also influence the pulmonary immune response. Similar to bacteria, they co-evolved with the host's immune system to maintain a mutually beneficial relationship (Schwartz et al., 2018). Some helminths also share the same niche, the intestinal lumen, with bacteria belonging to the microbiota, and some studies have shown that there are complex interactions between the two (Leung et al., 2018). The intestinal microbiota acts as one of the main inducers of the activation and function of local and systemic antiparasitic responses, such as the activation of Th2 cells and eosinophils (Jiménez-Saiz et al., 2020).

During the larval phase of their life cycle, different species of helminths, such as *Ascaris lumbricoides*, *Toxocara* sp., *Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale*, and *Strongyloides* sp., migrate through the lungs and induce pathological immune responses and cause tissue damage, such as eosinophilic pneumonia, which is characterized mainly by increased infiltration of eosinophils in the lung parenchyma and blood eosinophilia (Akuthota and Weller, 2012).

Some studies involving the modulation of the microbiota in spite of helminth infections have focused only on intestinal pathology and on the parasitological aspects of the infection, such as intestinal parasitic load, release of eggs in the feces,

and survival of mice. This was demonstrated experimentally with the probiotic *L. casei* ATCC7469 in infection with *Trichinella spiralis* (Bautista-Garfias et al., 2001), *B. animalis* 04450B against infection by *S. venezuelensis* (Oliveira-Sequeira et al., 2014), and *S. bouardii* in mice infected with *T. canis* (Avilada et al., 2012). However, researchers have already reported the beneficial effect of probiotics in reducing the parasitic burden of larval stages during *T. canis* infection in mice. *In vitro* experiments demonstrated a reduction in the viability of *T. canis* larvae after direct incubation with live cells or cell-free supernatant of the probiotic *Enterococcus faecalis* CECT712. The same study also showed that oral administration of *E. faecalis* CECT712 significantly reduced the number of *T. canis* larvae found in the lungs of these animals (Chiodo et al., 2010). *L. rhamnosus* (Walcher et al., 2018) and *L. acidophilus* ATCC 4356 (Cadore et al., 2020) were also able to reduce the parasitic larval burden of *T. canis* in the lungs of mice, but had no antiparasitic action against the larvae *in vitro*, which indicates the indirect action of these two probiotics on *T. canis*, probably related to the stimulation of the protective immune response. The administration of *S. bouardii* in mice infected with *T. canis* increased the transcription of genes encoding IL-12 and IFN γ , which correlated with a decrease in the number of larvae in the lungs and other tissues (de Avila et al., 2016).

Some probiotics, mainly from the *Lactobacillus* genera, showed action *in vitro* and *in vivo* against helminths that cycle through the lungs. However, differences in the efficacy of species and strains used can be attributed to variability in the experimental models, the probiotic dose, and the administration route. However, data are insufficient to determine the molecular mechanisms by which probiotics act on helminths that cycle through the lungs. Furthermore, further studies on host-microbiota-helminth interaction mechanisms are needed to validate the actions of probiotics in clinical studies with humans.

STUDIES PERSPECTIVES AND CONCLUSION

Although studies have shown that probiotics, prebiotics, and synbiotics have prophylactic and therapeutic effects against lung infections caused by bacteria, viruses, fungi, and helminths, further studies are needed to better understand the mechanisms of action and molecular pathways involved in these strategies. It is necessary to favor the translational use of gut microbiota modulation strategies as a therapeutic approach to human lung diseases. In addition, since the effect of these strategies is highly linked to the strains of the microorganism and the dose and route of administration, more in-depth investigations should be performed, considering well-defined experimental protocols. Considering the complexity of the microbiota and its interaction with the host, it is also important to determine whether this strategy acts in synergy with the microbiota or has another mechanism involving direct action against the lung pathogen or modulation of the host

immune system. In addition, it is important to emphasize the therapeutic window necessary to restore the gut microbiota to re-establish homeostasis after lung infection control.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CC wrote the manuscript, tables, and made the figures; MR and AV contributed to the design, writing, and review of the manuscript. The authors read and approved the final manuscript.

REFERENCES

- Akuthota, P., and Weller, P. F. (2012). Eosinophilic Pneumonias. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 649–660. doi:10.1128/CMR.00025-12
- Alvarez, S., Herrero, C., Bru, E., and Perdigon, G. (2001). Effect of Lactobacillus Casei and Yogurt Administration on Prevention of *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Young Mice. *J. Food Prot.* 64, 1768–1774. doi:10.4315/0362-028X-64.11.1768
- Antunes, K. H., Fachi, J. L., de Paula, R., da Silva, E. F., Pral, L. P., dos Santos, A. Á., et al. (2019). Microbiota-Derived Acetate Protects Against Respiratory Syncytial Virus Infection Through a GPR43-Type 1 Interferon Response. *Nat. Commun.* 10, 3273–3317. doi:10.1038/s41467-019-11152-6
- Avilada, L. F. d. C. d. C. de, Conceição, F. R., Telmo, P. d. L., Dutra, G. F., Santos, D. G. d. I., Martins, L. H. R., et al. (2012). Saccharomyces Boulardii Reduces Infection Intensity of Mice With Toxocariasis. *Vet. Parasitol.* 187, 337–340. doi:10.1016/j.vetpar.2012.01.002
- Bae, J. Y., Kim, J. I., Park, S., Yoo, K., Kim, I. H., Joo, W., et al. (2018). Effects of Lactobacillus Plantarum and Leuconostoc Mesenteroides Probiotics on Human Seasonal and Avian Influenza Viruses. *J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 893–901. doi:10.4014/jmb.1804.04001
- Barbieri, N., Herrera, M., Salva, S., Villena, J., and Alvarez, S. (2017). Lactobacillus Rhamnosus CRL1505 Nasal Administration Improves Recovery of T-Cell Mediated Immunity Against Pneumococcal Infection in Malnourished Mice. *Benef. Microbes.* 8, 393–405. doi:10.3920/BM2016.0152
- Bautista-Garfias, C. R., Ixta-Rodríguez, O., Martínez-Gómez, F., López, M. G., and Aguilar-Figueroa, B. R. (2001). Effect of Viable or Dead Lactobacillus Casei Organisms Administered Orally to Mice on Resistance against trichinella Spiralis Infection. *Parasite.* 8, S226–S228. doi:10.1051/parasite/200108s2226
- Belkacem, N., Serafini, N., Wheeler, R., Derrien, M., Boucinha, L., Couesnon, A., et al. (2017). Lactobacillus Paracasei Feeding Improves Immune Control of Influenza Infection in Mice. *PLoS One.* 12, e0184976. doi:10.1371/journal.pone.0184976
- Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., and Gil, A. (2012). Probiotic Mechanisms of Action. *Ann. Nutr. Metab.* 61, 160–174. doi:10.1159/000342079
- Budden, K. F., Gellatly, S. L., Wood, D. L. A., Cooper, M. A., Morrison, M., Hugenholtz, P., et al. (2017). Emerging Pathogenic Links Between Microbiota and the Gut-Lung Axis. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 55–63. doi:10.1038/nrmicro.2016.142
- Cadore, P. S., Walcher, D. L., Sousa, N. F., Martins, L. H., Hora, V. P., Groll, A. Von., et al. (2020). Protective Effect of the Probiotic Lactobacillus Acidophilus ATCC 4356 in BALB/c Mice Infected with Toxocara Canis. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 63, 1–6. doi:10.1590/S1678-9946202163009
- Cangemi De Gutierrez, R., Santos, V., and Nader-Macías, M. E. (2001). Protective Effect of Intranasally Inoculated Lactobacillus Fermentum against Streptococcus Pneumoniae challenge on the Mouse Respiratory Tract. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 31, 187–195. doi:10.1111/j.1574-695X.2001.tb00519.x
- Ceccarelli, G., Borrazzo, C., Pinacchio, C., Santinelli, L., Innocenti, G. P., Cavallari, E. N., et al. (2021). Oral Bacteriotherapy in Patients with COVID-19: A Retrospective Cohort Study. *Front. Nutr.* 7, 1–8. doi:10.3389/fnut.2020.613928
- Chan, C. K. Y., Tao, J., Chan, O. S., Li, H.-B., and Pang, H. (2020). Preventing Respiratory Tract Infections by Synbiotic Interventions: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Adv. Nutr.* 11, 979–988. doi:10.1093/ADVANCES/NMAA003
- Charlson, E. S., Diamond, J. M., Bittinger, K., Fitzgerald, A. S., Yadav, A., Haas, A. R., et al. (2012). Lung-Enriched Organisms and Aberrant Bacterial and Fungal Respiratory Microbiota after Lung Transplant. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 186, 536–545. doi:10.1164/rccm.201204-0693OC
- Chen, R., Yu, Y. L., Li, W., Liu, Y., Lu, J. X., Chen, F., et al. (2020). Gastrointestinal Symptoms Associated With Unfavorable Prognosis of COVID-19 Patients: A Retrospective Study. *Front. Med. (Lausanne).* 7, 608259–9. doi:10.3389/fmed.2020.608259
- Chiodo, P. G., Sparo, M. D., Pezzani, B. C., Minvielle, M. C., and Basualdo, J. A. (2010). In Vitro and In Vivo Effects of Enterococcus faecalis CECT7121 on Toxocara Canis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 105, 615–620. doi:10.1590/S0074-02762010000500003
- Coperchini, F., Chiovato, L., Croce, L., Magri, F., and Rotondi, M. (2020). The Cytokine Storm in COVID-19: An Overview of the Involvement of the Chemokine/Chemokine-Receptor System. *Cytokine Growth Factor. Rev.* 53, 25–32. doi:10.1016/j.cytogfr.2020.05.003
- Costa, M. C., Santos, J. R., Ribeiro, M. J., Freitas, G. J., Bastos, R. W., Ferreira, G. F., et al. (2016). The Absence of Microbiota Delays the Inflammatory Response to Cryptococcus Gattii. *Int. J. Med. Microbiol.* 306, 187–195. doi:10.1016/j.ijmm.2016.03.010
- Crowley, S., Mahony, J., Morrissey, J. P., and van Sinderen, D. (2013). Transcriptomic and Morphological Profiling of Aspergillus Fumigatus Af293 in Response to Antifungal Activity Produced by Lactobacillus Plantarum 16. *Microbiology (Reading).* 159, 2014–2024. doi:10.1099/mic.0.068742-0
- Dang, A. T., and Marsland, B. J. (2019). Microbes, Metabolites, and the Gut-Lung Axis. *Mucosal Immunol.* 12, 843–850. doi:10.1038/s41385-019-0160-6
- de Avila, L. F., de Leon, P. M., de Moura, M. Q., Berne, M. E., Scaini, C. J., and Leivas Leite, F. P. (2016). Modulation of IL-12 and IFN γ by Probiotic Supplementation Promotes protection Against Toxocara canis Infection in Mice. *Parasite Immunol.* 38, 326–330. doi:10.1111/pim.12314
- de Oliveira, G. L. V., Oliveira, C. N. S., Pinzan, C. F., de Salis, L. V. V., and Cardoso, C. R. d. B. (2021). Microbiota Modulation of the Gut-Lung Axis in COVID-19. *Front. Immunol.* 12, 635471. doi:10.3389/fimmu.2021.635471
- Delhaes, L., Monchy, S., Fréalle, E., Hubans, C., Salleron, J., Leroy, S., et al. (2012). The Airway Microbiota in Cystic Fibrosis: a Complex Fungal and Bacterial Community—Implications for Therapeutic Management. *PLoS One.* 7, e36313. doi:10.1371/journal.pone.0036313
- Dickson, R. P., Erb-Downward, J. R., Freeman, C. M., McCloskey, L., Beck, J. M., Huffnagle, G. B., et al. (2015). Spatial Variation in the Healthy Human Lung Microbiome and the Adapted Island Model of Lung Biogeography. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 12, 821–830. doi:10.1513/AnnalsATS.201501-029OC
- Doron, S., and Snyderman, D. R. (2015). Risk and Safety of Probiotics. *Clin. Infect. Dis.* 60 Suppl 2, S129–S134. doi:10.1093/cid/civ085
- Dunbar, A., Schauwvlieghe, A., Algae, S., van Hellemond, J. J., Reynders, M., Vandecasteele, S., et al. (2020). Epidemiology of Pneumocystis Jirovecii Pneumonia and (Non-)use of Prophylaxis. *Front. Cel. Infect. Microbiol.* 10, 224–227. doi:10.3389/fcimb.2020.00224
- Fan, Y., and Pedersen, O. (2021). Gut Microbiota in Human Metabolic Health and Disease. *Nat. Rev. Microbiol.* 19, 55–71. doi:10.1038/s41579-020-0433-9
- Fangous, M. S., Alexandre, Y., Hymery, N., Gouriou, S., Arzur, D., Blay, G. L., et al. (2019). Lactobacilli Intra-Tracheal Administration Protects from Pseudomonas

- aeruginosa* Pulmonary Infection in Mice - a Proof of Concept. *Benef. Microbes*. 10, 893–900. doi:10.3920/BM2019.0069
- Faure, S., and de Santa Barbara, P. (2011). Molecular Embryology of the Foregut. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 52 Suppl 1, S2–S3. doi:10.1097/MPG.0b013e3182105a1a
- Ferkol, T., and Schraufnagel, D. (2014). The Global Burden of Respiratory Disease. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 11, 404–406. doi:10.1513/AnnalsATS.201311-405PS
- Fijian, S. (2014). Microorganisms With Claimed Probiotic Properties: An Overview of Recent Literature. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 11, 4745–4767. doi:10.3390/ijerph110504745
- Forestier, C., Guelon, D., Cluytens, V., Gillart, T., Sirot, J., and De Champs, C. (2008). Oral Probiotic and Prevention of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Pilot Study in Intensive Care Unit Patients. *Crit. Care*. 12, R69–R10. doi:10.1186/cc6907
- Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., et al. (2011). Bifidobacteria can Protect From Enteropathogenic Infection Through Production of Acetate. *Nature* 469, 543–549. doi:10.1038/nature09646
- Gabryszewski, S. J., Bachar, O., Dyer, K. D., Percopo, C. M., Killoran, K. E., Domachowski, J. B., et al. (2011). Lactobacillus-Mediated Priming of the Respiratory Mucosa Protects Against Lethal Pneumovirus Infection. *J. Immunol.* 186, 1151–1161. doi:10.4049/jimmunol.1001751
- Galvão, I., Tavares, L. P., Corrêa, R. O., Fachi, J. L., Rocha, V. M., Rungue, M., et al. (2018). The Metabolic Sensor GPR43 Receptor Plays a Role in the Control of *Klebsiella Pneumoniae* Infection in the Lung. *Front. Immunol.* 9, 1–11. doi:10.3389/fimmu.2018.00142
- Goto, H., Sagitani, A., Ashida, N., Kato, S., Hirota, T., Shinoda, T., et al. (2013). Anti-Influenza Virus Effects of Both Live and Non-Live Lactobacillus Acidophilus L-92 Accompanied by the Activation of Innate Immunity. *Br. J. Nutr.* 110, 1810–1818. doi:10.1017/S0007114513001104
- Grice, E. A., and Segre, J. A. (2012). The Human Microbiome: Our Second Genome. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 13, 151–170. doi:10.1146/annurev-genom-090711-163814
- Hammond, E. E., McDonald, C. S., Vestbo, J., and Denning, D. W. (2020). The Global Impact of Aspergillus Infection on COPD. *BMC Pulm. Med.* 20, 241. doi:10.1186/s12890-020-01259-8
- Hand, T. W., Vujkovic-Cvijin, I., Ridaura, V. K., and Belkaid, Y. (2016). Linking the Microbiota, Chronic Disease and the Immune System. *Trends Endocrinol. Metab.* 27, 831–843. doi:10.1016/j.tem.2016.08.003
- Harata, G., He, F., Hiruta, N., Kawase, M., Kubota, A., Hiramatsu, M., et al. (2010). Intranasal Administration of Lactobacillus Rhamnosus GG Protects Mice From H1N1 Influenza Virus Infection by Regulating Respiratory Immune Responses. *Lett. Appl. Microbiol.* 50, 597–602. doi:10.1111/j.1472-765X.2010.02844.x
- Harzallah, D., and Belhadj, H. (2013). Lactic Acid Bacteria as Probiotics: Characteristics, Selection Criteria and Role in Immunomodulation of Human GI Mucosal Barrier. *Lact. Acid Bact. - R. D Food Heal. Livest. Purp.* 8, 197–216. doi:10.5772/50732
- He, L. H., Ren, L. F., Li, J. F., Wu, Y. N., Li, X., and Zhang, L. (2020). Intestinal Flora as a Potential Strategy to Fight SARS-CoV-2 Infection. *Front. Microbiol.* 11, 1388. doi:10.3389/fmicb.2020.01388
- Hong, H. A., Duc, le, H., and Cutting, S. M. (2005). The Use of Bacterial Spore Formers as Probiotics. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 813–835. doi:10.1016/j.femsre.2004.12.001
- Ichinohe, T., Pang, I. K., Kumamoto, Y., Peaper, D. R., Ho, J. H., Murray, T. S., et al. (2011). Microbiota Regulates Immune Defense Against Respiratory Tract Influenza a Virus Infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 5354–5359. doi:10.1073/pnas.1019378108
- Izumo, T., Maekawa, T., Ida, M., Noguchi, A., Kitagawa, Y., Shibata, H., et al. (2010). Effect of Intranasal Administration of Lactobacillus Pentosus S-PT84 on Influenza Virus Infection in Mice. *Int. Immunopharmacol.* 10, 1101–1106. doi:10.1016/j.intimp.2010.06.012
- Jain, S. (2017). Epidemiology of Viral Pneumonia. *Clin. Chest Med.* 38, 1–9. doi:10.1016/j.ccm.2016.11.012
- Jiménez-Saiz, R., Anipindi, V. C., Galipeau, H., Ellenbogen, Y., Chaudhary, R., Koenig, J. F., et al. (2020). Microbial Regulation of Enteric Eosinophils and its Impact on Tissue Remodeling and Th2 Immunity. *Front. Immunol.* 11, 155. doi:10.3389/fimmu.2020.00155
- Jounai, K., Sugimura, T., Ohshio, K., and Fujiwara, D. (2015). Oral Administration of Lactococcus Lactis Subsp. Lactis JCM5805 Enhances Lung Immune Response Resulting in Protection from Murine Parainfluenza Virus Infection. *PLoS One*. 10, e0119055–16. doi:10.1371/journal.pone.0119055
- Kim, M. H., Kang, S. G., Park, J. H., Yanagisawa, M., and Kim, C. H. (2013). Short-Chain Fatty Acids Activate GPR41 and GPR43 on Intestinal Epithelial Cells to Promote Inflammatory Responses in Mice. *Gastroenterology* 145, 396–406. e10. doi:10.1053/j.gastro.2013.04.056
- Koester, S. T., Li, N., Lachance, D. M., Morella, N. M., and Dey, N. (2021). Variability in Digestive and Respiratory Tract Ace2 Expression Is Associated With the Microbiome. *PLoS One*. 16, e0248730–9. doi:10.1371/journal.pone.0248730
- Kontoyiannis, D. P., Marr, K. A., Park, B. J., Alexander, B. D., Anaissie, E. J., Walsh, T. J., et al. (2010). Prospective Surveillance for Invasive Fungal Infections in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients, 2001–2006: Overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database. *Clin. Infect. Dis.* 50, 1091–1100. doi:10.1086/651263
- Kopf, M., Schneider, C., and Nobs, S. P. (2015). The Development and Function of Lung-Resident Macrophages and Dendritic Cells. *Nat. Immunol.* 16, 36–44. doi:10.1038/ni.3052
- Leung, J. M., Graham, A. L., and Knowles, S. C. L. (2018). Parasite-Microbiota Interactions With the Vertebrate Gut: Synthesis Through an Ecological Lens. *Front. Microbiol.* 9, 843–920. doi:10.3389/fmicb.2018.00843
- Li, M., Wang, B., Zhang, M., Rantalainen, M., Wang, S., Zhou, H., et al. (2008). Symbiotic Gut Microbes Modulate Human Metabolic Phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 2117–2122. doi:10.1073/pnas.0712038105
- Li, M., van Esch, B. C. A. M., Wagenaar, G. T. M., Garssen, J., Folkerts, G., and Henricks, P. A. J. (2018). Pro- and Anti-Inflammatory Effects of Short Chain Fatty Acids on Immune and Endothelial Cells. *Eur. J. Pharmacol.* 831, 52–59. doi:10.1016/j.ejphar.2018.05.003
- Limon, J. J., Skalski, J. H., and Underhill, D. M. (2017). Commensal Fungi in Health and Disease. *Cell Host Microbe*. 22, 156–165. doi:10.1016/j.chom.2017.07.002
- Lionakis, M. S., Iliev, I. D., and Hohl, T. M. (2017). Immunity Against Fungi. *JCI insight*. 2, e93156. doi:10.1172/jci.insight.93156
- Luoto, R., Ruuskanen, O., Waris, M., Kalliomäki, M., Salminen, S., and Isolauri, E. (2014). Prebiotic and Probiotic Supplementation Prevents Rhinovirus Infections in Preterm Infants: A Randomized, Placebo-Controlled Trial. *J. Allergy Clin. Immunol.* 133, 405–413. doi:10.1016/j.jaci.2013.08.020
- Marsland, B. J., Trompette, A., and Gollwitzer, E. S. (2015). The Gut-Lung Axis in Respiratory Disease. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 12, S150–S156. doi:10.1513/AnnalsATS.201503-133AW
- Maslowski, K. M., Vieira, A. T., Ng, A., Kranich, J., Sierro, F., Yu, D., et al. (2009). Regulation of Inflammatory Responses by Gut Microbiota and Chemoattractant Receptor GPR43. *Nature* 461, 1282–1286. doi:10.1038/nature08530
- Martin, T. R., and Frevert, C. W. (2005). Innate Immunity in the Lungs. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2, 403–411. doi:10.1513/pats.200508-090js
- Mayer, F. L., and Kronstad, J. W. (2017). Disarming Fungal Pathogens: Bacillus Safensis Inhibits Virulence Factor Production and Biofilm Formation by Cryptococcus Neoformans and Candida Albicans. *MBio*. 8, 1–22. doi:10.1128/mBio.01537-17
- McAleer, J. P., Nguyen, N. L., Chen, K., Kumar, P., Ricks, D. M., Binnie, M., et al. (2016). Pulmonary Th17 Antifungal Immunity Is Regulated by the Gut Microbiome. *J. Immunol.* 197, 97–107. doi:10.4049/jimmunol.1502566
- Meitert, E., Petrovici, M., Meitert, T., Sima, F., and Costache, G. (2013). Experimental *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. *Arch. Roum. Pathol. Exp. Microbiol.* 38, 167–172. doi:10.1097/SHK.0000000000000066.LACTOBACILLUS
- Morrow, L. E., Kollef, M. H., and Casale, T. B. (2010). Probiotic Prophylaxis of Ventilator-Associated Pneumonia: A Blinded, Randomized, Controlled Trial. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 182, 1058–1064. doi:10.1164/rccm.200912-1853OC
- Oliveira, L. V. N., Bastos, R. W., Ribeiro, N. Q., Costa, M. C., Acurcio, L. B., Rocha, K. M., et al. (2017). In Vivo probiotic and Antimicrobial Photodynamic Therapy as Alternative Therapies Against Cryptococcosis Are Ineffective. *Vet. Microbiol.* 211, 169–173. doi:10.1016/j.vetmic.2017.08.015
- Oliveira-Sequeira, T. C. G., David, É. B., Ribeiro, C., Guimarães, S., Masseno, A. P. B., Katagiri, S., et al. (2014). EFFECT of Bifidobacterium Animalis on MICE INFECTED With Strongyloides Venezuelensis. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. 56, 105–109. doi:10.1590/S0036-46652014000200003

- Pandya, U., and Saraf, M. (2015). Purification and Characterization of Antifungal Chitinase From *Bacillus Safensis* MBCU6 and its Application for Production of Chito-Oligosaccharides. *Biologia*. 70, 863–868. doi:10.1515/biolog-2015-0112
- Pappas, P. G., Alexander, B. D., Andes, D. R., Hadley, S., Kauffman, C. A., Freifeld, A., et al. (2010). Invasive Fungal Infections Among Organ Transplant Recipients: Results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (Transnet). *Clin. Infect. Dis.* 50, 1101–1111. doi:10.1086/651262
- Papadopoulos, N. G., and Skevaki, C. L. (2006). Viruses of the Lung. *Encycl. Respir. Med.* 13, 483–488. doi:10.1016/B0-12-370879-6/00494-4
- Pang, P., Yu, B., Shi, Y., Deng, L., Xu, H., Wu, S., et al. (2018). Alteration of Intestinal Flora Stimulates Pulmonary MicroRNAs to Interfere With Host Antiviral Immunity in Influenza. *Molecules* 23. doi:10.3390/molecules23123151
- Park, M. K., Ngo, V., Kwon, Y. M., Lee, Y. T., Yoo, S., Cho, Y. H., et al. (2013). *Lactobacillus Plantarum* DK119 as a Probiotic Confers Protection against Influenza Virus by Modulating Innate Immunity. *PLoS One*. 8, e75368–29. doi:10.1371/journal.pone.0075368
- Salminen, S., Collado, M. C., Endo, A., Hill, C., Lebeer, S., Quigley, E. M. M., et al. (2021). The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) Consensus Statement on the Definition and Scope of Postbiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 32, 20. doi:10.1038/s41575-021-00440-6
- Samuelson, D. R., Charles, T. P., de la Rua, N. M., Taylor, C. M., Blanchard, E. E., Luo, M., et al. (2016a). Analysis of the Intestinal Microbial Community and Inferred Functional Capacities During the Host Response to Pneumocystis Pneumonia. *Exp. Lung Res.* 42, 425–439. doi:10.1080/01902148.2016.1258442
- Samuelson, D. R., de la Rua, N. M., Charles, T. P., Ruan, S., Taylor, C. M., Blanchard, E. E., et al. (2016b). Oral Immunization of Mice With Live *Pneumocystis Murina* Protects Against *Pneumocystis* Pneumonia. *J. Immunol.* 196, 2655–2665. doi:10.4049/jimmunol.1502004
- Sanchez, H. N., Moroney, J. B., Gan, H., Shen, T., Im, J. L., Li, T., et al. (2020). B Cell-Intrinsic Epigenetic Modulation of Antibody Responses by Dietary Fiber-Derived Short-Chain Fatty Acids. *Nat. Commun.* 11, 60. doi:10.1038/s41467-019-13603-6
- Santacroce, L., Charitos, I. A., Ballini, A., Inchingolo, F., Luperto, P., De Nitto, E., et al. (2020). The Human Respiratory System and its Microbiome at a Glimpse. *Biology (Basel)* 9, 1–16. doi:10.3390/biology9100318
- Satomi, M., La Duc, M. T., and Venkateswaran, K. (2006). *Bacillus Safensis* Sp. nov., Isolated from Spacecraft and Assembly-Facility Surfaces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 1735–1740. doi:10.1099/ijs.0.64189-0
- Schwartz, C., Hams, E., and Fallon, P. G. (2018). Helminth Modulation of Lung Inflammation. *Trends Parasitol.* 34, 388–403. doi:10.1016/j.pt.2017.12.007
- Sencio, V., Barthelemy, A., Tavares, L. P., Machado, M. G., Soulard, D., Cuinat, C., et al. (2020). Gut Dysbiosis During Influenza Contributes to Pulmonary Pneumococcal Superinfection Through Altered Short-Chain Fatty Acid Production. *Cell Rep.* 30, 2934–e6. doi:10.1016/j.celrep.2020.02.013
- Sencio, V., Gallerand, A., Gomes Machado, M., Deruyter, L., Heumel, S., Soulard, D., et al. (2021). Influenza Virus Infection Impairs the Gut's Barrier Properties and Favors Secondary Enteric Bacterial Infection Through Reduced Production of Short-Chain Fatty Acids. *Infect. Immun.* 89, e0073420. doi:10.1128/IAI.00734-20
- Sender, R., Fuchs, S., and Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* 14, 1–14. doi:10.1371/journal.pbio.1002533
- Shimizu, K., Yamada, T., Ogura, H., Mohri, T., Kiguchi, T., Fujimi, S., et al. (2018). Synbiotics Modulate Gut Microbiota and Reduce Enteritis and Ventilator-Associated Pneumonia in Patients with Sepsis: a Randomized Controlled Trial. *Crit. Care*. 22, 239–9. doi:10.1186/s13054-018-2167-x
- Sokol, H., Contreras, V., Maisonnasse, P., Desmons, A., Delache, B., Sencio, V., et al. (2021). SARS-CoV-2 Infection in Nonhuman Primates Alters the Composition and Functional Activity of the Gut Microbiota. *Gut Microbes*. 13, 1–19. doi:10.1080/19490976.2021.1893113
- Song, J. A., Kim, H. J., Hong, S. K., Lee, D. H., Lee, S. W., Song, C. S., et al. (2016). Oral Intake of *Lactobacillus Rhamnosus* M21 Enhances the Survival Rate of Mice Lethally Infected With Influenza Virus. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 49, 16–23. doi:10.1016/j.jmii.2014.07.011
- Starosila, D., Rybalko, S., Varbanetz, L., Ivanskaya, N., and Sorokulova, I. (2017). Anti-Influenza Activity of a *Bacillus Subtilis* Probiotic Strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61, 1–11. doi:10.1128/AAC.00539-17
- Tang, L., Gu, S., Gong, Y., Li, B., Lu, H., Li, Q., et al. (2020). Clinical Significance of the Correlation Between Changes in the Major Intestinal Bacteria Species and COVID-19 Severity. *Engineering (Beijing)*. 6, 1178–1184. doi:10.1016/j.eng.2020.05.013
- Tomasoda, Y., Chiba, E., Zelaya, H., Takahashi, T., Tsukida, K., Kitazawa, H., et al. (2013). Nasally Administered *Lactobacillus Rhamnosus* Strains Differentially Modulate Respiratory Antiviral Immune Responses and Induce protection against Respiratory Syncytial Virus Infection. *BMC Immunol.* 14, 40. doi:10.1186/1471-2172-14-40
- Troeger, C., Blacker, B., Khalil, I. A., Rao, P. C., Cao, J., Zimsen, S. R. M., et al. (2018). Estimates of the Global, Regional, and National Morbidity, Mortality, and Aetiologies of Lower Respiratory Infections in 195 Countries, 1990–2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect. Dis.* 18, 1191–1210. doi:10.1016/S1473-3099(18)30310-4
- Trompette, A., Gollwitzer, E. S., Pattaroni, C., Lopez-Mejia, I. C., Riva, E., Pernot, J., et al. (2018). Dietary Fiber Confers Protection against Flu by Shaping Ly6c-Patrolling Monocyte Hematopoiesis and CD8+ T Cell Metabolism. *Immunity*. 48, 992–e8. doi:10.1016/j.immuni.2018.04.022
- Trompette, A., Gollwitzer, E. S., Yadava, K., Sichelstiel, A. K., Sprenger, N., Ngom-Bru, C., et al. (2014). Gut Microbiota Metabolism of Dietary Fiber Influences Allergic Airway Disease and Hematopoiesis. *Nat. Med.* 20, 159–166. doi:10.1038/nm.3444
- van der Poll, T., and Opal, S. M. (2009). Pathogenesis, Treatment, and Prevention of Pneumococcal Pneumonia. *Lancet*. 374, 1543–1556. doi:10.1016/S0140-6736(09)61114-4
- Vieira, A. T., Rocha, V. M., Tavares, L., Garcia, C. C., Teixeira, M. M., Oliveira, S. C., et al. (2016). Control of *Klebsiella pneumoniae* Pulmonary Infection and Immunomodulation by Oral Treatment with the Commensal Probiotic *Bifidobacterium Longum* 5(1A). *Microbes Infect.* 18, 180–189. doi:10.1016/j.micinf.2015.10.008
- Vieira, A. T., Teixeira, M. M., and Martins, F. S. (2013). The Role of Probiotics and Prebiotics in Inducing Gut Immunity. *Front. Immunol.* 4, 445–512. doi:10.3389/fimmu.2013.00445
- Villapol, S. (2020). Gastrointestinal Symptoms Associated With COVID-19: Impact on the Gut Microbiome. *Transl. Res.* 226, 57–69. doi:10.1016/j.trsl.2020.08.004
- Villena, J., Barbieri, N., Salva, S., Herrera, M., and Alvarez, S. (2009). Enhanced Immune Response to Pneumococcal Infection in Malnourished Mice Nasally Treated with Heat-Killed *Lactobacillus Casei*. *Microbiol. Immunol.* 53, 636–646. doi:10.1111/j.1348-0421.2009.00171.x
- Villena, J., Racedo, S., Agüero, G., and Alvarez, S. (2006). Yoghurt Accelerates the Recovery of Defence Mechanisms Against *Streptococcus Pneumoniae* in Protein-Malnourished Mice. *Br. J. Nutr.* 95, 591–602. doi:10.1079/bjn20051663
- Villena, J., Racedo, S., Agüero, G., Bru, E., Medina, M., and Alvarez, S. (2005). *Lactobacillus Casei* Improves Resistance to Pneumococcal Respiratory Infection in Malnourished Mice. *J. Nutr.* 135, 1462–1469. doi:10.1093/jn/135.6.1462
- V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., and Thiel, V. (2021). Coronavirus Biology and Replication: Implications for SARS-CoV-2. *Nat. Rev. Microbiol.* 19, 155–170. doi:10.1038/s41579-020-00468-6
- Waki, N., Matsumoto, M., Fukui, Y., and Suganuma, H. (2014). Effects of Probiotic *Lactobacillus Brevis* KB290 on Incidence of Influenza Infection Among Schoolchildren: An Open-Label Pilot Study. *Lett. Appl. Microbiol.* 59, 565–571. doi:10.1111/lam.12340
- Walcher, D. L., Cruz, L. A. X., de Lima Telmo, P., Martins, L. H. R., da Costa de Avila, L. F., Berne, M. E. A., et al. (2018). *Lactobacillus Rhamnosus* Reduces Parasite Load on *Toxocara Canis* Experimental Infection in Mice, but Has No Effect on the Parasite *In Vitro*. *Parasitol. Res.* 117, 597–602. doi:10.1007/s00436-017-5712-7
- Wang, B., Hylwka, T., Smieja, M., Surrence, M., Bowdish, D. M. E., and Loeb, M. (2018). Probiotics to Prevent Respiratory Infections in Nursing Homes: A Pilot Randomized Controlled Trial. *J. Am. Geriatr. Soc.* 66, 1346–1352. doi:10.1111/jgs.15396
- Yang, T., Chakraborty, S., Saha, P., Mell, B., Cheng, X., Yeo, J. Y., et al. (2020). Gnotobiotic Rats Reveal that Gut Microbiota Regulates Colonic mRNA of Ace2, the Receptor for SARS-CoV-2 Infectivity. *Hypertension*. 76, e1–3. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15360
- Yasui, H., Kiyoshima, J., and Hori, T. (2004). Reduction of Influenza Virus Titer and protection against Influenza Virus Infection in Infant Mice Fed

- Lactobacillus Casei Shirota. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11, 675–679. doi:10.1128/CDLI.11.4.675-679.2004
- Yazar, A., Atis, S., Konca, K., Pata, C., Akbay, E., Calikoglu, M., et al. (2001). Respiratory Symptoms and Pulmonary Functional Changes in Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* 96, 1511–1516. doi:10.1016/S0002-9270(01)02311-5
- Yeoh, Y. K., Zuo, T., Lui, G. C., Zhang, F., Liu, Q., Li, A. Y., et al. (2021). Gut Microbiota Composition Reflects Disease Severity and Dysfunctional Immune Responses in Patients with COVID-19. *Gut.* 70, 698–706. doi:10.1136/gutjnl-2020-323020
- Zelaya, H., Tsukida, K., Chiba, E., Marranzino, G., Alvarez, S., Kitazawa, H., et al. (2014). Immunobiotic Lactobacilli Reduce Viral-Associated Pulmonary Damage Through the Modulation of Inflammation-Coagulation Interactions. *Int. Immunopharmacol.* 19, 161–173. doi:10.1016/j.intimp.2013.12.020
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., et al. (2020). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 382, 727–733. doi:10.1056/nejmoa2001017
- Zuo, T., Liu, Q., Zhang, F., Lui, G. C., Tso, E. Y., Yeoh, Y. K., et al. (2021). Depicting SARS-CoV-2 Faecal Viral Activity in Association with Gut Microbiota Composition in Patients with COVID-19. *Gut.* 70, 276–284. doi:10.1136/gutjnl-2020-322294
- Zuo, T., Zhang, F., Lui, G. C. Y., Yeoh, Y. K., Li, A. Y. L., Zhan, H., et al. (2020). Alterations in Gut Microbiota of Patients With COVID-19 During Time of Hospitalization. *Gastroenterology.* 159, 944–e8. doi:10.1053/j.gastro.2020.05.048
- Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
- Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.
- Copyright © 2021 Cruz, Ricci and Vieira. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.