

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Microbiologia

CARLOS EDUARDO DIAS IGÍDIO

**EFEITO DOS METABÓLITOS DE TRIPTOFANO PROVENIENTES DA
MICROBIOTA INDÍGENA SOBRE A VIRULÊNCIA DE ISOLADOS CLÍNICOS DE
*Pseudomonas aeruginosa***

Belo Horizonte
2021

CARLOS EDUARDO DIAS IGÍDIO

**EFEITO DOS METABÓLITOS DE TRIPTOFANO PROVENIENTES DA
MICROBIOTA INDÍGENA SOBRE A VIRULÊNCIA DE ISOLADOS CLÍNICOS DE
*Pseudomonas aeruginosa***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes

Coorientador: Dra. Camila Pacheco Silveira
Martins da Mata

Belo Horizonte
2021

- 043 Igídio, Carlos Eduardo Dias.
Efeito de metabólitos de triptofano provenientes da microbiota indígena sobre a virulência de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* [manuscrito] / Carlos Eduardo Dias Igídio. - 2021.
85 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientador: Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes. Coorientador: Dra. Camila Pacheco Silveira Martins da Mata.
- Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.
1. Microbiologia. 2. Triptofano. 3. Indóis. 4. *Pseudomonas aeruginosa*. 5. Virulência. I. Fagundes, Caio Tavares. II. Mata, Camila Pacheco Silveira Martins da. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE **CARLOS EDUARDO DIAS IGÍDIO**

Nº REGISTRO: **2019661980**

Às horas do dia **25 de JUNHO de 2021**, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Simone Gonçalves dos Santos, Luciana Debortoli de Carvalho e o Prof. Caio Tavares Fagundes – Orientador, para julgar o trabalho final “Efeito de metabólitos de triptofano provenientes da microbiota indígena sobre a virulência de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*”, do aluno **Carlos Eduardo Dias Igídio**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof. Caio Tavares Fagundes – Orientador, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para a 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 de resultado final. O candidato foi considerado **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Membros da banca:

Dr(a). Simone Gonçalves dos Santos

Dr(a). Luciana Debortoli de Carvalho

De acordo:

Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes [Orientador]

Profa. Danielle da Glória de Souza

(Coordenadora do PPGM/UFMG)

Belo Horizonte, 25 de junho de 2021.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Simone Gonçalves dos Santos, Professora do Magistério Superior**, em 28/06/2021, às 08:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Debortoli de Carvalho, Usuário Externo**, em 28/06/2021, às 10:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Caio Tavares Fagundes, Professor do Magistério Superior**, em 28/06/2021, às 13:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Glória de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 28/06/2021, às 16:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0766646** e o código CRC **4E3E7DA5**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Caio Fagundes, meu orientador, pelos ensinamentos, paciência e por sempre apoiar e confiar no meu trabalho.

Agradeço à minha família, especialmente minha mãe Rosilene e meus avós Maria e Edson, pelo carinho e incentivo que recebi durante essa etapa.

Agradeço à minha co-orientadora Dra. Camila Pacheco pelo apoio e atenção.

À minha amiga e colega de trabalho Camila de Brito que me acolheu e contribuiu com boa parte do conhecimento que adquiri durante esses dois anos. Nossos momentos juntos tornaram essa jornada mais leve.

Aos amigos e alunos de iniciação científica, Bárbara, Rafael e Samantha, pela ajuda nos experimentos e boas risadas.

À minha amiga Renata Lacerda por me acolher com tanto carinho e me dar força e coragem quando precisei.

Aos amigos Jomar Fagundes e Daniel Lira que, mesmo distantes, sempre foram atenciosos e suportaram meus longos áudios do *WhatsApp*.

Agradeço à toda equipe de alunos, técnicos e professores dos laboratórios de Interação Micro-organismo Hospedeiro e Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos pelo suporte à pesquisa e por terem se tornado grandes companheiros ao longo do mestrado. Guerreiros que resistem em tempos de desvalorização da ciência.

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia e sua secretaria da Universidade Federal de Minas Gerais.

À CAPES, por fornecer apoio financeiro para que eu pudesse me dedicar às atividades da pós-graduação.

Agradeço a Deus por guiar meu caminho e decisões.

Agradeço a todos que de um jeito ou de outro contribuíram para a finalização do mestrado e torceram por mim.

RESUMO

Pacientes submetidos à tratamento em Unidade de Terapia intensiva (UTI) e imunocomprometidos são frequentemente vítimas de infecções oportunistas, como infecções dos tratos respiratório e urinário. Ademais, o longo curso de antibioticoterapia contribui para a disseminação da resistência entre espécies e para impactos deletérios no microbioma benéfico. O efeito disbiótico, seja por alterações na diversidade microbiana ou produção de metabólitos pode favorecer a colonização do hospedeiro por patógenos. Sabe-se, por exemplo, que o indol, produto do metabolismo do aminoácido essencial triptofano pela microbiota indígena, é capaz de modular a expressão e atividade de fatores de virulência em *Pseudomonas aeruginosa in vitro*, atuando no controle da infecção experimental por essa bactéria. *P. aeruginosa* é um patógeno oportunista Gram-negativo e um dos principais agentes de pneumonia em ambiente hospitalar, responsável por altos índices de morbidade e mortalidade. Devido ao seu caráter multidroga resistente e a sua diversidade em fatores de patogenicidade, faz-se necessária a busca por moléculas com potencial atividade anti-virulência. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do indol e de outros metabólitos de triptofano provenientes da microbiota indígena sobre a virulência de isolados clínicos de *P. aeruginosa*. Para isso, foram realizados testes *in vitro* de motilidade, produção de biofilme e quantificação de piocianina e pioverdina utilizando as linhagens PAO1, PA103, PA14 e isolados clínicos obtidos do Hospital Risoleta Tolentino Neves. Além disso, foi investigado a expressão de genes envolvidos na virulência por *P. aeruginosa* na presença ou ausência dos metabólitos de triptofano e verificado o efeito da exposição da *P. aeruginosa* aos metabólitos na interação com macrófagos murinos *in vitro*, e durante a infecção pulmonar experimental em camundongos. Os metabólitos estudados reduziram a capacidade de motilidade, bem como a produção dos pigmentos piocianina e pioverdina. Por outro lado, o indol e o ácido indolacético (IAce), favoreceram a formação de biofilme por *P. aeruginosa*, sendo que o efeito do indol foi mais pronunciado. Além disso, nós demonstramos que esses metabólitos também alteram o curso da infecção pulmonar em um modelo experimental murino, uma vez que animais infectados com a bactéria crescida na presença do indol apresentaram uma maior perda de peso e, conseqüentemente, maior taxa de letalidade. Ainda, verificamos que os animais que

receberam a bactéria crescida no IAce apresentaram menor taxa de letalidade em relação ao grupo controle, apesar de apresentarem maior carga bacteriana no lavado broncoalveolar. A análise em isolados clínicos de *P. aeruginosa* confirmou a elevada diversidade fenotípica desse patógeno, o que refletiu em efeitos variados do indol e IAce. Nossos resultados demonstraram que produtos do triptofano pelo metabolismo da microbiota intestinal, são capazes de alterar o perfil de virulência tanto em linhagens laboratoriais quanto em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*.

Palavras-chave: Triptofano. Metabólitos. Indol. Virulência. *Pseudomonas aeruginosa*.

ABSTRACT

Patients developing treatment in an Intensive Care Unit (ICU) and immunocompromised are often victims of opportunistic infections, such as respiratory and urinary tract infections. Furthermore, the long course of antibiotic therapy contributes to the spread of resistance between species and to deleterious impacts on the beneficial microbiome. The disbiotic effect, whether due to changes in microbial diversity or metabolite production, can favor host colonization by pathogens. It is known, for example, that indole, a product of the metabolism of the essential amino acid tryptophan by the indigenous microbiota, is able to modulate the expression and activity of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa in vitro*, acting in the control of experimental infection by this bacterium. *P. aeruginosa* is a Gram-negative opportunistic pathogen and one of the main agents of pneumonia in the hospital environment, responsible for high rates of morbidity and mortality. Due to its resistant multidrug character and its diversity in pathogenicity factors, it is necessary to search for molecules with potential anti-virulence activity. In this sense, the aim of this study was to evaluate the effect of indole and other tryptophan metabolites from the indigenous microbiota on the virulence of clinical isolates of *P. aeruginosa*. For this, *in vitro* tests of motility, biofilm production and quantification of pyocyanin and pyoverdine were performed using strains PAO1, PA103, PA14 and clinical isolates obtained from Hospital Risoleta Tolentino Neves. Furthermore, we investigated the expression of genes involved in virulence by *P. aeruginosa* in the presence or absence of tryptophan metabolites and verified the effect of *P. aeruginosa* exposure to metabolites in the interaction with murine macrophages *in vitro*, and during experimental pulmonary infection in mice. The studied metabolites reduced the motility capacity, as well as the production of the pigments pyocyanin and pioverdine. On the other hand, indole and indoleacetic acid (IAce) favored biofilm formation by *P. aeruginosa*, and the indole effect was more pronounced. Furthermore, we demonstrated that these metabolites also alter the course of lung infection in an experimental murine model, since animals infected with the bacteria grown in the presence of indole showed greater weight loss and, consequently, a higher fatality rate. Furthermore, we found that the animals that received the bacteria grown in the IAce had a lower lethality rate compared to the control group, despite having a higher bacterial load in the bronchoalveolar lavage.

The analysis of clinical isolates of *P. aeruginosa* confirmed the high phenotypic diversity of this pathogen, which reflected in varied effects of indole and IAce. Our results demonstrated that tryptophan products by the metabolism of the intestinal microbiota are able to change the virulence profile both in laboratory strains and in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*.

Keywords: Tryptophan. Metabolites. Indole. Virulence. *Pseudomonas aeruginosa*.

SUMÁRIO

1. JUSTIFICATIVA.....	15
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1. A <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
2.1.1 Citotoxicidade.....	21
2.1.2 Captação de ferro.....	22
2.1.3 Motilidade.....	22
2.1.4 Biofilme – Estrutura e dinâmica.....	24
2.1.5 Produção de Proteases.....	26
2.1.6 Resistência a antibióticos.....	26
2.2 Microbiota Indígena Intestinal e Metabolismo do Triptofano.....	28
3. OBJETIVOS.....	35
3.1. Objetivo geral.....	35
3.1.1 Objetivos específicos.....	35
4. METODOLOGIA.....	36
4.1 Linhagem e cultivo da <i>P. aeruginosa</i>	36
4.1.1 População/Amostragem.....	36
4.1.2 Aspectos éticos.....	37
4.1.3 Preparo do inóculo.....	37
4.2 Animais.....	37
4.3 Preparo dos metabólitos.....	38
4.4 Estratégia experimental.....	39
4.5 Curva de crescimento de <i>P. aeruginosa</i>	39
4.6 Avaliação da capacidade de formação de biofilme por <i>P. aeruginosa</i>	40
4.7 Avaliação da motilidade de <i>P. aeruginosa</i>	40
4.8 Quantificação da produção de piocianina e pioverdina.....	41
4.9 Avaliação do perfil de sensibilidade ao peróxido de hidrogênio.....	42
4.10 Análise da expressão dos genes <i>pqsA</i> e <i>pvdS</i>	42
4.11 Determinação das taxas de <i>Killing</i> e fagocitose de <i>P. aeruginosa</i> por macrófagos murinos.....	44
4.12 Infecção pulmonar por <i>P. aeruginosa</i> em camundongos.....	45

4.12.1 Lavado bronco-alveolar e avaliação do influxo de leucócitos para o espaço alveolar.....	45
4.12.2 Avaliação da carga bacteriana.....	46
4.12.3 Avaliação do influxo de neutrófilos para o parênquima pulmonar pela quantificação da atividade de mieloperoxidase (MPO).....	46
4.12.4 Peso e Letalidade.....	47
4.13 Agrupamento hierárquico – <i>heatmap</i>	47
4.14 Análise estatística.....	47
5. RESULTADOS.....	48
5.1 Curva de crescimento.....	48
5.2 Capacidade de formação de biofilme por <i>P. aeruginosa</i>	50
5.3 Padrões de motilidade em <i>P. aeruginosa</i>	51
5.4 Produção dos pigmentos piocianina e pioverdina.....	52
5.5 Perfil de sensibilidade ao peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	53
5.6 Efeito dos metabólitos de triptofano sobre a virulência de isolados clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	53
5.6.1 Agrupamento fenotípico.....	53
5.6.2 Formação de biofilme.....	59
5.6.3 Padrões de motilidade.....	60
5.6.4 Produção de pioverdina e piocianina.....	63
5.6.5 Sensibilidade ao H ₂ O ₂	65
5.7 Taxas de fagocitose e <i>killing</i> da <i>P. aeruginosa</i>	66
5.8 Infecção por <i>P. aeruginosa</i> em um modelo murino.....	67
5.9 Expressão dos genes <i>pqsA</i> e <i>pvdS</i> relacionados a virulência em <i>P. aeruginosa</i>	69
6 DISCUSSÃO.....	70
7 CONCLUSÃO.....	76
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Sistema de regulação de fatores de virulência em *P. aeruginosa* por QS.

Figura 2- Mecanismos de virulência envolvidos na infecção por *Pseudomonas aeruginosa*.

Figura 3- Ciclo de vida do biofilme de *P. aeruginosa*.

Figura 4- Distribuição das comunidades microbianas ao longo do intestino humano.

Figura 5- Vias de metabolismo do triptofano.

Figura 6- Estrutura química dos produtos do catabolismo do triptofano.

Figura 7- Representação esquemática para definição dos metabólitos e concentrações utilizadas nesse estudo.

Figura 8- Esquema experimental para infecção de camundongos por *P. aeruginosa*.

Figura 9- Curva de crescimento da *P. aeruginosa* PAO1.

Figura 10- Capacidade de formação de biofilme por *P. aeruginosa* PAO1.

Figura 11- Padrões de motilidade em *P. aeruginosa* PAO1.

Figura 12- Produção de piocianina e pioverdina por *P. aeruginosa* PAO1.

Figura 13- Perfil de sensibilidade ao H₂O₂ da *P. aeruginosa* PAO1.

Figura 14- Caracterização fenotípica da virulência de isolados clínicos de *P. aeruginosa*.

Figura 15- Agrupamento dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* quanto ao sítio de isolamento.

Figura 16- Heatmap e agrupamento fenotípico dos isolados clínicos de *P. aeruginosa*.

Figura 17- Mapa de correlação entre os parâmetros relacionados à virulência de *P. aeruginosa*.

Figura 18- Efeito do indol e ácido indolacético sobre a formação de biofilme de isolados clínicos de *P. aeruginosa*

Figura 19- Efeito do indol e IAce sobre a motilidade de isolados clínicos de *P. aeruginosa*

Figura 20- Efeito do indol e ácido indolacético sobre a produção de piocianina e piovordina em isolados clínicos de *P. aeruginosa*

Figura 21- Efeito do indol e ácido indolacético sobre o perfil de sensibilidade ao H₂O₂ de isolados clínicos de *P. aeruginosa*

Figura 22- Taxas de fagocitose e killing da *P. aeruginosa* por macrófagos murinos

Figura 23- Peso e percentual de sobrevivência de camundongos infectados com *P. aeruginosa* PAO1

Figura 24- Infecção pulmonar por *P. aeruginosa* PAO1

Figura 25- Efeito de metabólitos triptofano sobre a expressão de genes relacionados à virulência de *P. aeruginosa*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Isolados clínicos de *P. aeruginosa* selecionados do Hospital Risoleta Tolentino Neves.

Tabela 2- Iniciadores utilizados no ensaio de RT-qPCR

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%- Percentual

μM- Micromolar

AHR- Receptor de hidrocarbonetos aromáticos

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ArAT- Aminoácido-aromático-aminotransferase

BAL- Lavado Bronco-alveolar

BMDM- (do inglês) *Bone marrow derived macrophage*

cDNA- (do inglês) *complementary Deoxyribonucleic Acid*

DMF- Dimetilformamida

EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético

EPS- Substâncias poliméricas extracelulares

ESKAPE+C- *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. e *Clostridioides difficile*.

Exo- Exotoxina

FeSO₄- Sulfato de ferro

H₂O₂- Peróxido de hidrogênio

HCl- Ácido clorídrico

HRTN- Hospital Risoleta Tolentino Neves

I3S- Indoxil-3-sulfato

IAce- Ácido indol-3-acético

IAcr- Ácido indol-3-acrílico

IAld- Ácido indol-3-aldeído

IAM- Indol-3-acetamida

IDO- Indoleamina 2,3-dioxigenase

IL- Interleucina

ILac- Ácido indol-3-láctico

IPIA- Indol-3-piruvato

IPro- Ácido indol-3-propiónico

IRAS- Infecções relacionadas a assistência em saúde

KA- (do inglês) *Kinurenic Acid*

LB- Caldo *Luria Broth*

M- Molar

Mbp- Mega pares de base

MDR- Multidroga resistente

MgSO₄- Sulfato de magnésio

mL- Mililitros

mm- Milímetros

mM- Milimolar

MPO- Mieloperoxidase

mRNA- (do inglês) *messenger Ribonucleic Acid*

NaCl- Cloreto de sódio

NISS- (do inglês) *National Nosocomial Infection Surveillance System*

OD- (do inglês) *Optical Density*

OMS- Organização Mundial da Saúde

PBS- (do inglês) *phosphate buffered saline*

PCR- (do inglês) *polimerase chain reaction*

pH- potencial Hidrogeniônico

PIA- (do inglês) *Pseudomonas isolation agar*

PQS- (do inglês) *Pseudomonas quinolone signal*

QS- (do inglês) *Quorum sensing*

SisGen- Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

TCLE- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TMO- Triptofano-2-monoxigenase

TnA- Triptofanase A

Trd- Triptofano-descarboxilase

Trp- Triptofano

SST3- Sistema de secreção tipo 3

UFC- Unidade Formadora de Colônia

UFMG- Universidade Federal de Minas Gerais

UTI- Unidade de Terapia Intensiva

WT- (do inglês) *Wild Type*

1 JUSTIFICATIVA

A *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno oportunista responsável por infecções associadas aos cuidados de saúde com elevados índices de morbidade e mortalidade. *P. aeruginosa* foi inserida no acrônimo “ESKAPE+C” (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. e *Clostridioides difficile*) devido ao seu caráter multidroga resistente (MDR) e sua diversidade em fatores de patogenicidade. Como bactéria de relevância clínica global, a OMS enfatiza a importância do desenvolvimento de novas terapias antimicrobianas (OMS, 2017; SERAFIM *et al.*, 2019).

Estima-se que a pneumonia causada por *P. aeruginosa* esteja relacionada à morte de aproximadamente 20% dos pacientes hospitalizados (CHOUDHURI *et al.*, 2017). Das infecções adquiridas em ambiente hospitalar, cerca de 11% estão associadas à *P. aeruginosa* e, quando se trata de pacientes fibrocísticos, esse número pode atingir os 30% (MORADALI *et al.*, 2017; ANVISA, 2017). Dessa forma, pacientes com pneumonia por *P. aeruginosa* têm significativamente mais tempo de permanência em unidades hospitalares e de terapia intensiva (UTI), maiores taxas de necessidade de ventilação mecânica, maiores taxas de mortalidade, maior risco de reinternação e maiores custos médios de internação que pacientes não diagnosticados com pneumonia (ARAÚJO *et al.*, 2019). Nesse contexto, o estudo em isolados clínicos é necessário devido à sua diversidade genotípica e de sítios de isolamento, logo, expandir a pesquisa além de linhagens laboratoriais é importante para o entendimento dos mecanismos de patogenicidade de *P. aeruginosa*.

Pacientes hospitalizados frequentemente estão expostos ao uso de antibióticos de amplo espectro, contribuindo para a disseminação da resistência entre espécies e para a perturbação do microbioma simbiótico benéfico do hospedeiro. Essa disbiose microbiana pode resultar no surgimento de infecções secundárias nos tecidos, nas vias respiratórias e na corrente sanguínea, causadas por patógenos bacterianos, seja pela ausência de competição por nichos de colonização ou desequilíbrio na produção de metabólitos importantes para a homeostase microbiana (VANGAY *et al.*, 2015). Assim, é fundamental o estudo de moléculas provenientes do metabolismo pela microbiota indígena e do seu papel durante infecções bacterianas (NEUMAN *et al.*, 2018).

Sabe-se que o indol, um dos metabólitos de triptofano provenientes da microbiota indígena, é capaz de modular a expressão de fatores de virulência de *P. aeruginosa*. Dessa forma, em estado disbiótico, o catabolismo do triptofano e produção dos seus metabólitos pela microbiota estaria comprometido e possivelmente facilitaria a infecção por *P. aeruginosa* (LEE et al., 2009). Entretanto, o triptofano pode ser catabolizado por vias enzimáticas microbianas variadas em diversos metabólitos distintos e o efeito desses metabólitos microbianos de triptofano sobre os fatores de patogenicidade de *P. aeruginosa* ainda é pouco estudado. Nesse sentido, torna-se interessante avaliar o efeito dos produtos do catabolismo de triptofano pela microbiota como possíveis agentes anti-virulência de *Pseudomonas aeruginosa*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A *Pseudomonas aeruginosa*

A *Pseudomonas aeruginosa* é um bastonete Gram-negativo, aeróbio, não fermentador pertencente à ordem Gama-proteobacteria (REZAIE et al., 2018). O genoma de *P. aeruginosa* (5,5-7 Mbp) é relativamente grande em comparação com outras bactérias sequenciadas e codifica um grande número de enzimas regulatórias importantes para o metabolismo, transporte e efluxo de compostos orgânicos. Esta capacidade de codificação aprimorada do genoma de *P. aeruginosa* permite grande versatilidade metabólica e alta adaptabilidade às mudanças ambientais (KLOCKGETHER et al., 2011).

A *P. aeruginosa* é um microrganismo ubíquo, podendo crescer em diversos nichos ecológicos como solo, águas superficiais, esgoto e plantas (MALHOTRA et al., 2019). A *P. aeruginosa* também apresenta caráter oportunista e está frequentemente relacionada às infecções relacionadas à assistência em saúde (IRAS), principalmente em pacientes imunocomprometidos, fibrocísticos, vítimas de queimaduras e portadores de cateteres (AGNIHOTRI et al., 2004). Tais características, associadas ao seu perfil de resistência a múltiplas drogas, fez com que a Organização Mundial da Saúde (OMS) incluísse *P. aeruginosa* no grupo ESKAPE+C (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp. e *Clostridioides difficile*) (BHAGIRATH et al., 2019). O acrônimo reúne os principais patógenos para os quais a descoberta de novos agentes antimicrobianos é premente (OMS, 2017).

Estima-se que aproximadamente 60% dos pacientes que dão entrada na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) desenvolvem uma doença infecciosa. Destas, 11% estão associadas à infecção por *P. aeruginosa*, perdendo apenas para *Klebsiella pneumoniae* (27%) e *Escherichia coli* (20%) e *Staphylococcus aureus* (12%) (CHAUDHURI et al., 2017). Em pacientes com fibrose cística, esse número pode chegar a 30% (MORADALI et al., 2017). As infecções por *P. aeruginosa* geralmente estão associadas ao trato respiratório, como por exemplo à pneumonia. Isso acontece devido sua capacidade de invadir as barreiras epiteliais das vias áreas e, conseqüentemente, causar lesão pulmonar, contribuindo para a disseminação da

bactéria para a circulação sanguínea (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2015). Além disso, *Pseudomonas aeruginosa* é comumente relatada como causa de bacteremias e infecções do trato urinário (GELLATLY & HANCOCK, 2013; HUBER et al., 2016).

Devido a sua alta versatilidade metabólica, a *P. aeruginosa* é um dos poucos patógenos capazes de metabolizar o triptofano através da via da quinurenina, gerando como metabólito final o antranilato. O antranilato é um precursor do sinal de quinolona de *Pseudomonas*, uma molécula autoindutora do sistema de *quorum-sensing* (QS) (BORTOLOTTI et al., 2016). O QS compreende um sistema de comunicação célula-célula que permite que uma comunidade bacteriana expresse determinado perfil gênico em resposta à sua densidade celular e outros estímulos ambientais (PAPENFORT et al., 2016). O QS apresenta um importante papel na sobrevivência e colonização de *P. aeruginosa* durante os estágios iniciais da infecção, regulando aproximadamente 10% dos seus genes (KESHAVAN et al., 2006). Os genes regulados por QS estão envolvidos na produção de fatores de virulência, motilidade, troca de padrões de motilidade, desenvolvimento de biofilme e mecanismos de resistência a antibióticos em *P. aeruginosa* (BARR et al., 2015).

A regulação de fatores de virulência por QS em *P. aeruginosa* pode seguir quatro caminhos: Las, Rhl, PQS e IQS (SCOFFONE et al., 2019). Em resposta a estresses/estímulos específicos, como hipóxia, depleção de ferro e estresse oxidativo, cada via sintetiza autoindutores. A concentração das moléculas autoindutoras aumenta à medida que a densidade celular (população bacteriana) aumenta. Ao atingir uma concentração limiar, os autoindutores interagem com reguladores transcricionais para ativar ou alterar a expressão gênica dos fatores de patogenicidade de *P. aeruginosa* (Figura 1) (MORADALI et al., 2017; PALMER et al., 2013).

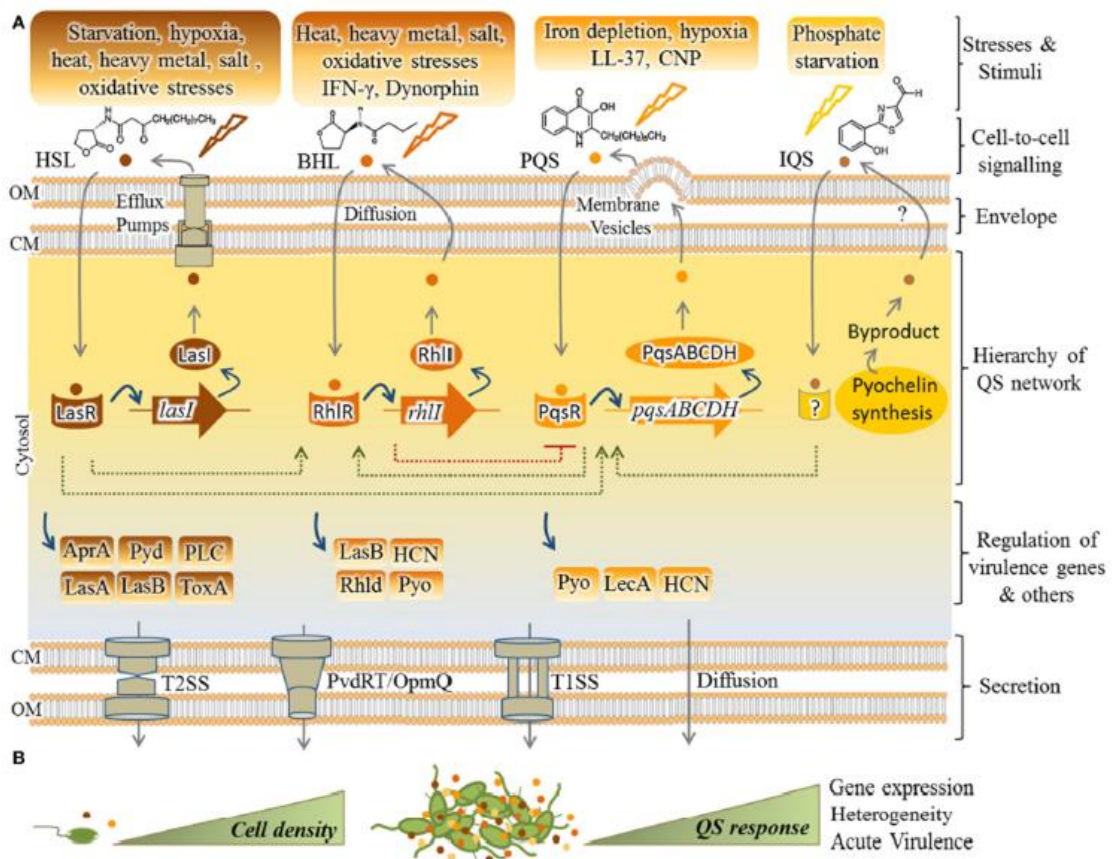


Figura 1- Sistema de regulação de fatores de virulência em *P. aeruginosa* por QS: Em resposta a estímulos específicos as vias de QS sintetizam moléculas autoindutoras responsáveis pela ativação de fatores transcricionais que medeiam a expressão de genes de virulência. Fonte: Moradali *et al.*, *Frontiers Cell Infect Microbiol*, 2017.

Em resposta a estímulos/estresse específicos, cada via sintetiza autoindutores cognatos (AIs) [HSL (3-oxo-C12-homoserina lactona)], BHL (N-butyrlhomoserina lactona ou C4-HSL), PQS (2-heptil-3- hidroxi-4-quinolona) e IQS [2- (2-hidroxifenil) - tiazol-4-carbaldeído (aeruginaldeído)]. Cada sistema consiste em dois elementos principais: a primeira categoria de proteínas (LasR, RhIR ou PqsR, respectivamente) é ativada ao detectar autoindutores específicos (AIs) e atua como ativador transcricional para genes que codificam a segunda categoria de proteínas, as sintases de AIs cognatas (LasI, RhII, e PqsABCDH, respectivamente). Nessa etapa, os AIs sintetizados são exportados para fora das células e, em seguida, importados novamente por difusão livre, bombas de efluxo ou vesículas de membrana (ALCALDE-RICO *et al.*, 2016). Os diferentes sistemas QS de *P. aeruginosa* atuam em hierarquia. Enquanto o LasR reside no topo da cascata e junto com o RhIR medeia a sinalização de QS no estágio inicial da fase de crescimento exponencial, a via de sinalização PQS está ativa na fase de crescimento exponencial final (CHOI *et al.*, 2011). A via de

sinalização IQS foi descoberta mais recentemente e é menos compreendida. Acredita-se que a molécula IQS é um subproduto da via de biossíntese de pioquelina e responsável pela biossíntese da toxina L-2-amino-4-metoxi-trans-3- ácido butenóico (SUN *et al.*, 2016).

Devido ao seu alto custo metabólico, a produção de muitos fatores de virulência está principalmente sob o controle regulatório dos sistemas QS (GARCIA-CONTRERAS, 2016). Mutantes deficientes em QS causam menos danos ao tecido e alterações patológicas durante infecções devido a uma diminuição significativa na virulência e citotoxicidade, o que ressalta a importância do sistema QS nesse processo (NELSON *et al.*, 2009; FENG *et al.*, 2016). Achados recentes sugerem uma correlação entre as concentrações sistêmicas de moléculas de sinalização de QS com o estado clínico de exacerbação pulmonar e algumas dessas moléculas foram elevadas no início da exacerbação pulmonar ou do tratamento com antibióticos ao avaliar diferentes biofluidos (BARR *et al.*, 2015). A partir disso, *P. aeruginosa* sintetiza fatores de virulência que permitem sua invasão e sobrevivência nos tecidos do hospedeiro, resultando na progressão da patogênese, particularmente no estágio inicial da colonização e infecção aguda (Figura 2).

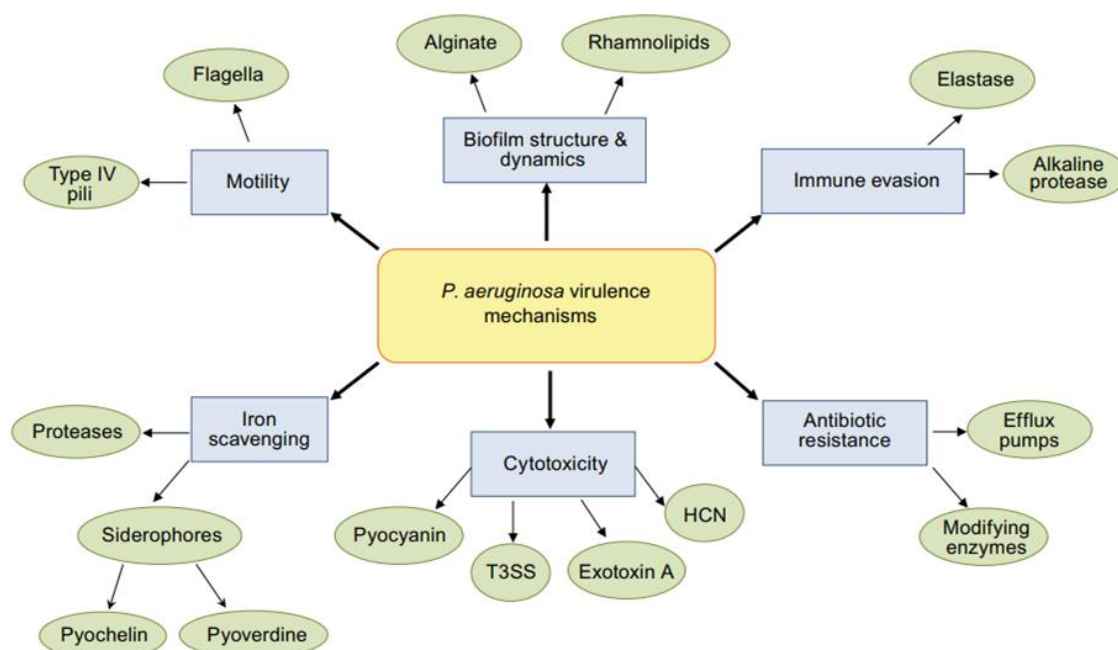


Figura 2- Mecanismos de virulência envolvidos na infecção por *Pseudomonas aeruginosa*: Em conjunto, esses fatores contribuem para a colonização pelo microorganismo dos tecidos do hospedeiro. Fonte: Lee *et al.*, Protein & Cell, 2015.

2.1.1 Citotoxicidade

Um dos principais mecanismos de invasão e citotoxicidade adotado por *P. aeruginosa* envolve o sistema de secreção do tipo 3 (SST3). O SST3 apresenta-se como um apêndice em forma de agulha responsável por transferir proteínas efetoras da bactéria diretamente para as células do hospedeiro (GELLATLY et al., 2013). Destaca-se quatro exotoxinas associadas ao SST3: ExoS, ExoT, ExoU e ExoY. Essas exotoxinas são expressas de forma variável em isolados de *P. aeruginosa*. A ExoS e ExoT são proteínas ativadoras de GTPase e com atividade ADP-ribosiltransferase, o que permite sua ação sobre a organização do citoesqueleto de actina das células do hospedeiro. Além disso, ExoS é capaz de romper a barreira pulmonar-vascular, contribuindo para a disseminação da bactéria. A ExoU é uma fosfolipase com forte atividade citotóxica capaz de causar rápida perda de integridade da membrana plasmática e de inibir a produção de mediadores pró-inflamatórios. Dessa mesma forma, a ExoY aumenta as concentrações de cAMP contribuindo para a desorganização do citoesqueleto de actina com consequente necrose celular (GELLATLY et al., 2013; LIMA et al., 2014).

A produção de piocianina por *P. aeruginosa* também contribui para a lesão em células do hospedeiro. O pigmento azul-esverdeado é secretado pelo sistema de secreção do tipo 2 (SST2) e estimula a produção de espécies reativas de oxigênio contribuindo para um estado de estresse oxidativo no hospedeiro, interrompendo a catalase do hospedeiro e o transporte de elétrons mitocondrial, além de induzir apoptose em neutrófilos e inibir a fagocitose (JIMENEZ et al., 2012). Estudos relacionados à piocianina em pacientes fibrocísticos revelam que ela pode estar envolvida na inibição da respiração celular, função ciliar, crescimento das células epidérmicas e interrupção da homeostase do cálcio (LAU et al., 2004). A importância da piocianina também foi demonstrada em um modelo de infecção aguda murino, em que camundongos infectados com *P. aeruginosa* mutantes deficientes em piocianina apresentaram menor carga bacteriana quando comparados com camundongos infectados com *P. aeruginosa* do tipo selvagem (LAU et al., 2004). A piocianina também apresenta um importante papel na evasão bacteriana ao sistema imune, já que é capaz de modular a expressão das quimiocina IL-8 pelas células epiteliais das vias aéreas, além de desempenhar um efeito protetor contra as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio produzidas por células fagocíticas durante a infecção (VINCKX et al., 2010).

2.1.2 Captação de ferro

P. aeruginosa utiliza diferentes estratégias para captar ferro do hospedeiro, entre elas os sideróforos pioverdina e pioquelina, os quais conferem uma coloração esverdeada às colônias bacterianas. Os sideróforos são moléculas de baixo peso molecular que quelam especificamente Fe^{3+} com alta afinidade. Após serem secretados, pioverdina e pioquelina interagem com o ferro do ambiente, sendo em seguida captado pela célula bacteriana através de proteínas de membrana externa reguladas por ferro (CORNELIS & DINGEMANS, 2013). Além disso, a pioverdina também pode atuar como uma molécula de sinal, uma vez que ligada ao ferro interage com o receptor de células *Pseudomonas* FpvA, e este complexo, por sua vez, interage com o fator FpvR, causando a suprarregulação de endoproteases, exotoxina A e da própria pioverdina (JIMENEZ et al., 2012; VISCA et al., 2007).

Sabe-se que *P. aeruginosa* é capaz de produzir pioverdina quando invade o pulmão, entretanto ao longo da colonização a bactéria induz uma forte resposta inflamatória, resultando em dano ao tecido e liberação de conteúdo celular, incluindo hemoproteínas e outras proteínas que contêm ferro (MARTIN et al., 2011). Dessa forma, em infecções crônicas por exemplo, a *P. aeruginosa* passa absorver heme de hemoproteínas liberadas pelo processo inflamatório para atender a sua demanda de ferro e reduz os níveis de produção de pioverdina e piocianina (KONINGS et al., 2013).

2.1.3 Motilidade

A *Pseudomonas aeruginosa* apresenta flagelo monotriquetado e pili em sua superfície que são responsáveis pela sua motilidade e aderência ao epitélio pulmonar (SADIKOT et al., 2005). Dessa forma, a transição entre infecção aguda e crônica ocorre devido a existência bacteriana em dois estilos de vida diferentes – planctônico (livre) e associado à superfície (sésil) (FURUKAWA et al., 2006). As infecções agudas que ocorrem no hospedeiro em horas ou dias são causadas pela população planctônica, enquanto as infecções crônicas que se prolongam por meses ou anos são causadas pelo patógeno em seu estado sésil, este último diretamente relacionado a formação de biofilme (TURNER et al., 2014).

Nesse sentido, *P. aeruginosa* é capaz de realizar três diferentes padrões de motilidade, sendo a troca do perfil de motilidade dependente de quórum. A patogênese da *P. aeruginosa* requer, inicialmente, a busca por um local de infecção usando o movimento natatório mediado por um único flagelo polar (CONRAD *et al.*, 2011). Esse movimento chamado *swimming* é frequente em ambientes de ágar pouco concentrado ou líquido e está associado à quimiotaxia e força hidrodinâmica. Quando em superfície, *P. aeruginosa* inicia seu processo de aderência irreversível realizando movimentos de enxame e contração, *swarming* e *twitching*, respectivamente. A motilidade do tipo enxame ou *swarming* ocorre em ambientes viscosos ou semissólidos e, por esse motivo, requer a ação do flagelo, pili tipo 4, ramnolipídicos, densidade celular bacteriana específica e disponibilidade de nutrientes (ferro, cobre, fontes de nitrogênio e carbono) (KHAN *et al.*, 2019). Por fim, a motilidade do tipo *twitching* ou contração é baseada na extensão e retração de um grupo pili conhecido como T4P, que é um filamento polar com aproximadamente 6 nm de diâmetro, em meios sólidos (PETROV *et al.*, 2013). Enquanto o *swarming* está associado ao estágio inicial de formação de microcolônias e do biofilme, o *twitching* é requerido durante o biofilme maduro (Fig. 3) (KHAN *et al.*, 2019).

O flagelo e os pili também estão envolvidos no processo de adesão bacteriana. O processo de adesão às células epiteliais do hospedeiro ocorre através da ligação de seu flagelo ao glicolípídeo GM1 e pode desencadear uma forte resposta inflamatória mediada por NFκB por meio de sinalização através de TLR5 (MIAO *et al.*, 2007). Sabe-se também que mutantes não flagelados são defeituosos em modelos de infecção aguda e que grande parte dos isolados de infecções crônicas demonstram regulação negativa da motilidade mediada por flagelo. Como demonstrado, a motilidade flagelar bacteriana é um mecanismo fundamental pelo qual os fagócitos do hospedeiro se ligam e ingerem bactérias. Logo, a perda de motilidade bacteriana, permite que *P. aeruginosa* evite a associação e a ingestão por fagócitos tanto *in vitro* quanto *in vivo* (PATANKAR *et al.*, 2013). Juntos, esses fatores fazem dos pili e flagelo um importante alvo da terapia anti-*Pseudomonas*.

2.1.4 Biofilme – Estrutura e dinâmica

Os biofilmes são comunidades estruturadas de células bacterianas em uma matriz extracelular que aderem a superfícies bióticas ou abióticas. As bactérias representam menos de 10% da biomassa do biofilme e produzem a matriz de exopolissacarídeos (EPS), que compõe mais de 90% do biofilme. A matriz é composta principalmente de polissacarídeos, proteínas, DNA extracelular (eDNA) e lipídeos (MAURICE *et al.*, 2018). A matriz EPS permite que os microrganismos atuem sinergicamente, mantendo contato próximo através das vias de comunicação intercelular e compartilhando nutrientes. A formação e dispersão de biofilmes é regulada por vários mecanismos, incluindo *quorum sensing* (QS), sinalização de bi-(3'-5') monofosfato de diguanosina cíclico (c-di-GMP) e regulação de pequenos RNAs (FAZLI *et al.*, 2014). Destes, o QS é responsável por direcionar a produção de componentes essenciais do biofilme, sendo, portanto, necessário para o desenvolvimento de biofilmes maduros (TOLKER-NIELSEN, 2014).

Nesse processo, *P. aeruginosa* é capaz de produzir três polissacarídeos - alginato, Pel e Psl. A diferença na composição desses polissacarídeos é o que distingue linhagens mucóides e não-mucóides (MANN *et al.*, 2012). Enquanto o alginato contribui para a estabilidade estrutural e proteção de biofilmes, bem como para a retenção de água e nutrientes, Pel e Psl atuam como base na estrutura primária para o desenvolvimento do biofilme e estão envolvidos nos estágios iniciais da formação do biofilme (RASAMIRAVAKA *et al.*, 2015).

O fenótipo do biofilme pode variar de acordo com a cepa e/ou condições nutricionais, mas geralmente pode ser dividido em 5 etapas. Inicialmente, bactérias planctônicas aderem a uma superfície adequada para o crescimento. Nesse estágio a adesão é reversível e está relacionado à motilidade do tipo *swimming* (Fig. 3, estágio I). O próximo estágio é marcado pela adesão irreversível das bactérias, troca do padrão de motilidade para *swarming* e início da formação de microcolônias na matriz EPS (Fig. 3, estágio II). Progressivamente, as microcolônias bacterianas se expandem gerando um fenótipo mais estruturado, a partir disso as bactérias começam a movimentar-se por *twitching* (Fig. 3, estágio III). Em seguida, os espaços não colonizados são preenchidos com bactérias e EPS que cobrem toda a superfície em uma estrutura tridimensional (Fig 3, estágio IV). No estágio final, as bactérias se dispersam da estrutura do biofilme e retornam ao estado planctônico para se espalhar e colonizar outras superfícies (Fig 3, estágio V) (RASAMIRAVAKA *et al.*, 2015).

Sabe-se que a formação do biofilme está intimamente relacionada aos sistemas QS. De acordo com relatos anteriores, o regulador LasR pode se ligar à região promotora do operon *psl*, sugerindo que essa via de QS possa regular a expressão do polissacarídeo Psl. Além disso, o sistema Rhl exerce papel importante na formação de biofilme de *P. aeruginosa* favorecendo a biossíntese do polissacarídeo Pel. O sistema PQS, por sua vez, está vinculado à liberação de eDNA durante o desenvolvimento do biofilme. O sistema QS também está envolvido no controle das motilidades *swarming* e *twitching*, atuantes nas fases inicial e tardia do biofilme, respectivamente (GILBERT *et al.*, 2009; SAKURAGI *et al.*, 2007).

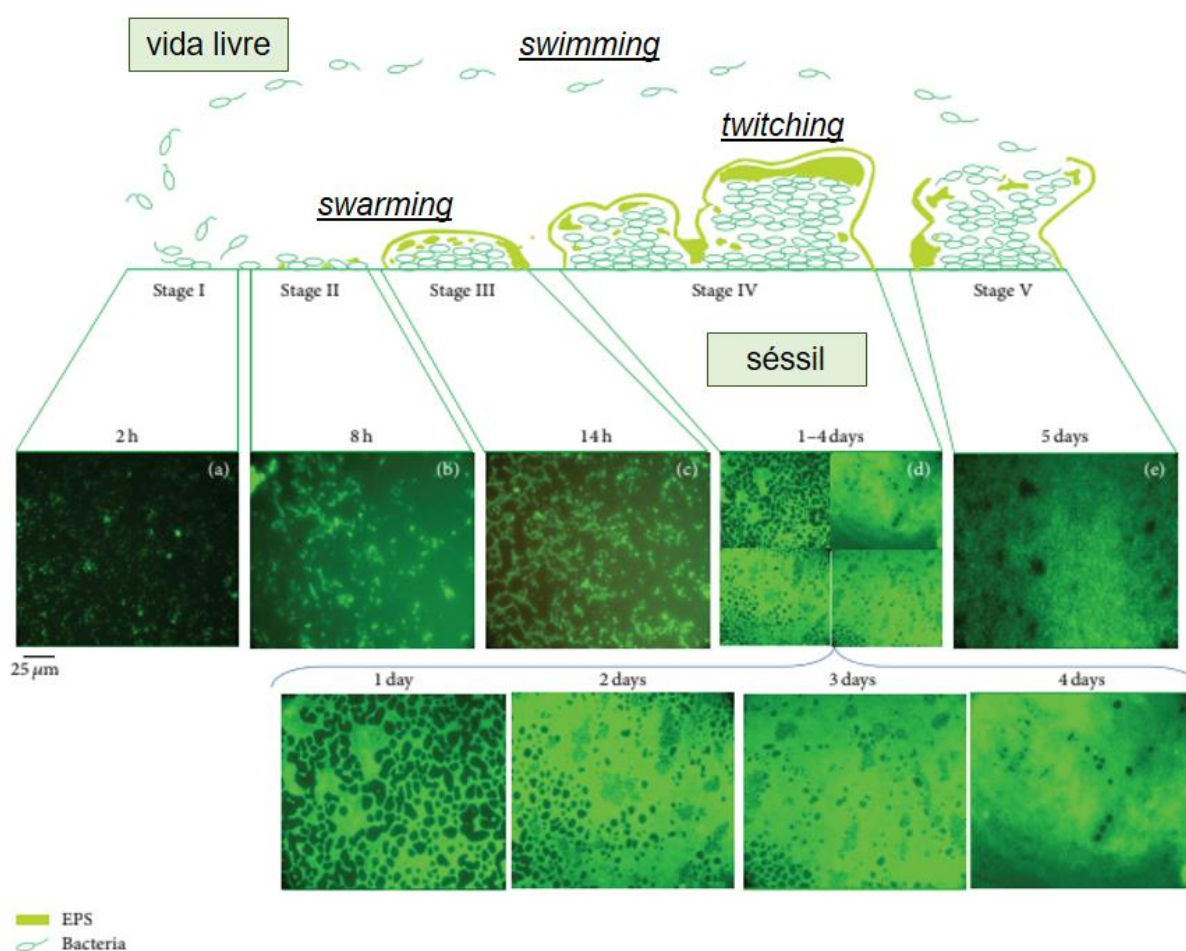


Figura 3- Ciclo de vida do biofilme de *P. aeruginosa*: No estágio I, as bactérias planctônicas iniciam a fixação a uma superfície abiótica, que se torna irreversível no estágio II. O estágio III corresponde à formação de microcolônias. O estágio IV corresponde à maturação do biofilme e ao crescimento da comunidade tridimensional. A dispersão ocorre no estágio V e bactérias planctônicas são liberadas do biofilme para colonizar outros locais. Adaptado de RASAMIRAVAKA *et al.*, 2015, BioMed Research International

A capacidade da *P. aeruginosa* formar biofilmes é um fator crítico associado a morbidade e mortalidade significativas, principalmente em pacientes fibrocísticos

(MULCAHY *et al.*, 2014). Os biofilmes fornecem vantagens à *P. aeruginosa* ao promover a sobrevivência em materiais artificiais, como cateteres e materiais cirúrgicos, a evasão do sistema imunológico e a tolerância à terapia antimicrobiana (MAURICE *et al.*, 2018). Nesse sentido, torna-se necessário a busca por agentes anti-biofilme baseada nas seguintes estratégias: (i) evitar a fixação microbiana a uma superfície; (ii) interromper o desenvolvimento do biofilme e/ou afetar a sua arquitetura; e (iii) induzir sua dispersão e degradação (MASAK *et al.*, 2014).

2.1.5 Produção de proteases

A *P. aeruginosa* é capaz de secretar diversas enzimas proteolíticas. Essas proteases contribuem para o dano tecidual em infecções respiratórias, incluindo a degradação do surfactante pulmonar, imunoglobulinas e fibrina do hospedeiro (KIPNIS *et al.*, 2006).

A protease alcalina é responsável pela degradação das proteínas do complemento e fibronectina do hospedeiro. Nesse sentido, essa enzima, juntamente com a exotoxina A, torna-se um componente essencial em um quadro de sepse por *P. aeruginosa* (LAARMAN *et al.*, 2012). Além disso, a protease alcalina é capaz de degradar unidades de flagelina livre, evitando o seu reconhecimento via TLR5 e, conseqüentemente, dificultando a detecção imunológica (BARDOEL *et al.*, 2011).

A *P. aeruginosa* também produz duas elastases, LasA e LasB. Essas enzimas são reguladas pelo sistema LasI de quorum-sensing e segregadas via sistemas de secreção tipo 2 (GELLATLY *et al.*, 2013). LasA atua principalmente aumentando a atividade de LasB e de proteases elastolíticas do próprio hospedeiro, enquanto LasB é responsável pela degradação de proteínas do hospedeiro por exemplo, elastina, colágeno, fibrina e o surfactante pulmonar e contribuir para danos aos tecidos do hospedeiro (MORADALI *et al.*, 2017).

2.1.6 Resistência a antibióticos

O tratamento de infecções por *P. aeruginosa* tornou-se um grande desafio devido à capacidade desta bactéria de resistir a muitos dos antibióticos disponíveis atualmente

(PANG *et al.*, 2019). O uso excessivo de antibióticos durante o tratamento acelera o desenvolvimento de *P. aeruginosa* multirresistente, levando à ineficácia da antibioticoterapia empírica contra esse microrganismo (HIRSCH *et al.*, 2010).

Os mecanismos de *P. aeruginosa* para resistir aos efeitos de agentes antibióticos são multifatoriais e podem ser classificados em intrínsecos, adquiridos e adaptativos. A resistência intrínseca de *P. aeruginosa* está relacionada à baixa permeabilidade da membrana externa, expressão de bombas de efluxo e produção de enzimas inativadoras de antibacterianos. A resistência adquirida ocorre por transferência horizontal de genes de resistência ou mudanças mutacionais (BREIDENSTEIN *et al.*, 2011). Por fim, o mecanismo adaptativo envolve a formação de biofilme, este atua como uma barreira para limitar o acesso de antibióticos às células bacterianas (DRENKARD, 2003).

P. aeruginosa é capaz de expressar diversas bombas de efluxo. Dentre elas destaca-se a MexAB-OprM que é responsável pelo efluxo de β -lactâmicos e quinolonas e a MexXY-OprM capaz de expelir aminoglicosídeos. A superexpressão de múltiplas bombas de efluxo foi encontrada em algumas linhagens clínicas de *P. aeruginosa*, ampliando a resistência bacteriana a antibióticos e contribuindo para o desenvolvimento de multirresistência a medicamentos (CABOT *et al.*, 2011).

Outra estratégia de resistência da *P. aeruginosa* é a capacidade de produzir enzimas inativadoras de antibióticos, entre elas β -lactamases e enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (WOLTER & LISTER, 2013). Enquanto as β -lactamases quebram a ligação amida do anel β -lactâmico, as enzimas modificadoras de aminoglicosídeos transferem grupos fosforil, adenil ou acetil, bloqueando a ação de antibióticos como neomicina, amicacina e gentamicina, respectivamente (SUBEDI *et al.*, 2018).

De acordo com o Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade publicado pela ANVISA em 2020, foi reportada resistência aos carbapenêmicos em 39,1% das amostras de *Pseudomonas aeruginosa*. As consequências das infecções causadas por microrganismos resistentes aos antimicrobianos são graves, incluindo o aumento da morbidade e mortalidade, o aumento do período de internação, redução ou falta de opção terapêutica para o tratamento diante de alguns microrganismos causadores da infecção (ANVISA, 2020). A avaliação dos indicadores nacionais das IRAS destaca a

importância do estudo de novas estratégias terapêuticas no controle de infecções bacterianas.

2.2 Microbiota Indígena Intestinal e Metabolismo do Triptofano

O microbioma humano é composto por grupos de microrganismos, entre eles bactérias, arqueias, fungos, vírus e protozoários que, juntos, habitam diferentes sítios do corpo humano em uma relação simbiótica com o hospedeiro (BELIZÁRIO *et al.*, 2018). Os produtos desses microrganismos podem ser encontrados em vários locais anatômicos do corpo, como a pele, a mucosa, o trato gastrointestinal, o trato respiratório, o trato urogenital e a glândula mamária (FORBES *et al.*, 2016). Juntos, eles formam um ecossistema complexo e discreto que se adapta às condições ambientais de cada nicho (OGUNRINOLA *et al.*, 2021). O processo de colonização microbiana se inicia logo após o contato com a microbiota vaginal no momento do nascimento e sofre modulações e adaptações ao longo do desenvolvimento humano (SONNENBURG *et al.*, 2019). A microbiota indígena está intimamente relacionada a funções metabólicas, imunológicas e comportamentais do hospedeiro e, conseqüentemente, ao seu estado de saúde e de doença (BACKHED *et al.*, 2015).

O trato gastrointestinal se apresenta como um dos ecossistemas mais complexos em relação à sua abundância e diversidade microbiana (FORBES *et al.*, 2016; BUDDEN *et al.*, 2016). Estima-se que o intestino humano possa abrigar cerca de 10^{14} microrganismos, incluindo representantes distribuídos em aproximadamente 1000 espécies distintas (ZHANG & FRENETTE, 2019). No entanto, a análise desses dados não pode ser separada do seu contexto ambiental; a genética do hospedeiro, a nutrição, o meio ambiente, a localização geográfica, as exposições microbianas iniciais e outros fatores impactam profundamente o microbioma do intestino humano saudável (HUTTENHOWER *et al.*, 2012).

Apesar de variada, a microbiota intestinal em adultos é predominantemente composta por anaeróbios obrigatórios (MAHOWALD *et al.*, 2009) e, a nível de filo, destacam-se os Firmicutes e Bacteroidetes seguidos de Proteobacteria, Actinobacteria e Verrucomicrobia (BAUMLER & SPERANDIO, 2016). No intestino humano saudável, o filo Firmicutes é dividido em duas classes principais de bactérias Gram-positivas:

Bacilli e *Clostridia*. Já os Bacteroidetes são bactérias Gram-negativas, das quais o *Bacteroides* representa um dos gêneros mais abundantes no intestino (HUTTENHOWER *et al.*, 2012).

A microbiota do indivíduo adulto sofre variações ao longo do trato gastrointestinal, adaptando-se a diferentes taxas de oxigênio, acidez, nutrientes e atividade imunológica (ISLAM *et al.*, 2011). O intestino delgado, por exemplo, apresenta níveis mais elevados de oxigênio e ácidos biliares, favorecendo a colonização por anaeróbios facultativos, como os das famílias Lactobacillaceae e Enterobacteriaceae. Além disso, acredita-se que o menor tempo de trânsito no intestino delgado em comparação com o cólon torna a aderência bacteriana ao tecido ou muco um fator importante para a colonização persistente nesse local (ISLAM *et al.*, 2011). Por outro lado, o ceco e o cólon, abrigam as comunidades microbianas mais densas e diversas de todos os habitats do corpo. O ambiente mais neutro e anaeróbio, bem como as baixas concentrações de substâncias antimicrobianas faz com que essa região apresente uma carga bacteriana mais elevada e predominantemente composta por anaeróbios estritos fermentadores, especialmente aqueles das famílias Bacteroidaceae e Clostridiaceae (Figura 4) (DONALDSON *et al.*, 2016).

Em condições fisiológicas normais, a microbiota indígena intestinal está envolvida em diversas funções vitais ao hospedeiro como fortalecimento da barreira epitelial intestinal, digestão de componentes alimentares não digeríveis pelo hospedeiro em metabólitos absorvíveis, síntese de vitaminas essenciais, remoção de compostos tóxicos e amadurecimento e regulação do sistema imunológico (HEINTZ-BUSCHART & WILMES, 2018). Além disso, a microbiota exibe um importante efeito protetor contra agentes patogênicos, seja pela produção de substâncias bactericidas ou pela competição por nichos e nutrientes (SHREINER *et al.*, 2015). Por outro lado, a alteração na composição e função da microbiota, estado chamado de disbiose, pode acarretar no desenvolvimento de doenças de origem infecciosa, imunológica ou metabólica (KRISS *et al.*, 2018). A disbiose pode ser causada por fatores externos ou internos ao hospedeiro, entre eles, genética, dieta, estilo de vida, exposição a agentes tóxicos e uso de antimicrobianos (LEVY *et al.*, 2017).

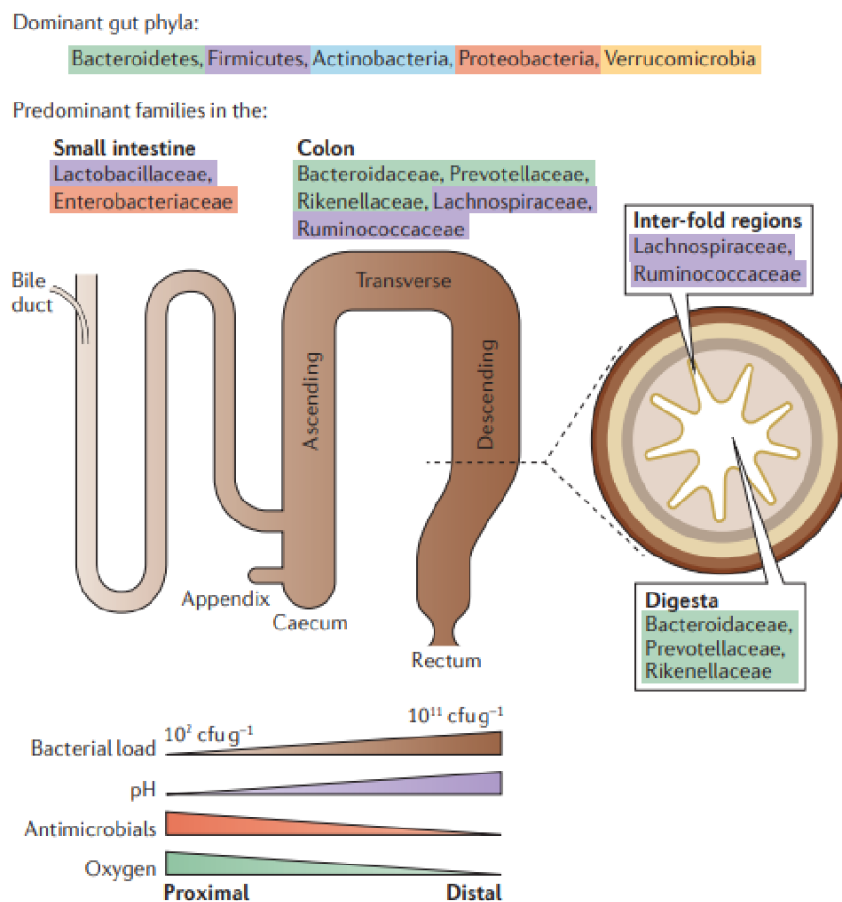


Figura 4-Distribuição das comunidades microbianas ao longo do intestino humano: A microbiota intestinal apresenta alto grau de complexidade em relação à sua diversidade microbiana. Em condições normais, a microbiota intestinal é predominantemente formada por bactérias dos filos Firmicutes e Bacteroidetes, que sofrem variações de acordo com as condições oferecidas pelo ambiente, como tensão de oxigênio, pH, disponibilidade de nutrientes e de substâncias antimicrobianas. Fonte: Donaldson et al., Nature Reviews Microbiology, 2016.

Sabe-se, por exemplo, que indivíduos colonizados por determinados grupos de bactérias e arqueas, apresentam menor tendência ao desenvolvimento de doenças de origem metabólica e inflamatória (ARORA & BACKHED, 2016). Além disso, o estudo do eixo intestino-cérebro evidencia que a microbiota e o sistema nervoso também se comunicam por diversas vias, incluindo o sistema imunológico, o metabolismo do triptofano, o nervo vago e o sistema nervoso entérico, envolvendo metabólitos microbianos, como ácidos graxos de cadeia curta e aminoácidos de cadeia ramificada (CRYAN *et al.*, 2019). Logo, a composição da microbiota e os seus efeitos disbióticos podem estar associados a distúrbios neurológicos como a doença de Parkinson, o autismo e a depressão (ALLEN *et al.*, 2016). A disbiose da microbiota intestinal também pode contribuir para a translocação bacteriana, aumentando a

permeabilidade intestinal e induzindo a disfunção imunológica da mucosa, perfil observado em doenças inflamatórias intestinais (WANG *et al.*, 2019; GÓMEZ-HURTADO *et al.*, 2011).

A microbiota intestinal também está envolvida na liberação de metabólitos que são intermediários ou produtos finais dos constituintes da dieta pelo metabolismo comensal, os quais podem exercer ações indispensáveis na imunidade e na saúde do hospedeiro (LIN & ZHANG, 2017). Nesse sentido, diversos estudos demonstram o efeito do processo disbiótico, seja em número de bactérias ou produção de metabólitos, na patogênese de infecções bacterianas (BROWNE *et al.*, 2017; KHAN *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2018). Alguns desses metabólitos matam diretamente os patógenos, pela ruptura das estruturas celulares bacterianas; outros interferem nos fatores de patogenicidade, afetando a virulência (LI *et al.*, 2018). Assim, estudos recentes têm buscado o entendimento dos mecanismos de regulação desencadeados em patógenos por alguns desses metabólitos, especialmente aqueles envolvidos na regulação da expressão de fatores de virulência. Dessa forma, o metabolismo de triptofano se destaca como um potencial alvo de estudo envolvendo a microbiota e o desenvolvimento de doenças infecciosas.

O triptofano (trp) é um aminoácido essencial composto de um carbono β ligado à posição 3 de um grupo indólico (KALUZNA *et al.*, 2019). Como o Trp não é produzido por células animais, os humanos dependem de ingestão exógena, principalmente na dieta. Fontes alimentares naturais comuns de Trp incluem aveia, banana, ameixa seca, leite, atum, queijo, pão, aves, amendoim e chocolate (AGUS *et al.*, 2018). A Organização Mundial da Saúde definiu a ingestão recomendada de Trp em 4 mg/kg/dia (FAO/WHO/UNU, 1985). Embora o Trp seja um dos aminoácidos menos abundantes em proteínas e células, é um precursor biossintético de grande número de metabólitos microbianos e do hospedeiro (ALKHALAF & RYAN, 2015). Além do seu papel na síntese proteica, o triptofano e seus metabólitos estão associados a inúmeras funções fisiológicas, como a homeostase imunológica e a resposta inflamatória (LE FLOC'H *et al.*, 2011).

Como parte da relação mutualística microbiota-hospedeiro, as bactérias que compõem o intestino podem ser responsáveis pelo catabolismo da molécula de triptofano (ZHANG & DAVIES, 2016). Quando no trato gastrointestinal, o trp pode

seguir por 3 vias de metabolização: i) catabolismo direto pela microbiota intestinal em várias moléculas, incluindo ligantes do receptor de aril hidrocarboneto (AhR); ii) via da quinurenina em células imunitárias e epiteliais via indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) 1; ou iii) via de produção da serotonina em células enterocromafins via Trp hidroxilase 1 (Tph1) (Figura 5) (ZELANTE *et al.*, 2013; CLARKE *et al.*, 2013; YANO *et al.*, 2015). A via das quinureninas é responsável pelo metabolismo de aproximadamente 95% do triptofano livre, enquanto a metabolização em serotonina e pela microbiota intestinal corresponde a aproximadamente 1% e 4%, respectivamente (TALEB, 2019).

A via de metabolização por microrganismos inclui a transformação do trp em várias moléculas, como o indol e seus derivados (AGUS *et al.*, 2018). Isso pode ocorrer pela expressão da enzima triptofanase A (TnA), presente principalmente em bactérias Gram-negativo e uma das responsáveis pela quebra do trp em indol (ARORA *et al.*, 2015). O indol pode ser detectado no intestino de humanos e camundongos em uma concentração que varia de 250-1100 μM (HUBBARD; MURRAY; PERDEW, 2015). A partir disso, o indol pode atingir a circulação hepática, onde também será metabolizado pelo hospedeiro. A primeira fase do metabolismo hepático é realizada pela enzima citocromo P450 2E1 (CYP2E1), gerando o metabólito 3-hidroxi-indol. Na fase II do metabolismo, o 3-hidroxi-indol será sulfatado por sulfotransferases, gerando o metabólito indoxil-3-sulfato (I3S), que pode ser encontrado na corrente sanguínea e tecidos periféricos. Além disso, as enzimas aminoácido-aromático-aminotransferase (ArAT), triptofano-2-monoxigenase (TMO) e triptofano-descarboxilase (Trd) também são capazes de catabolizar o trp em indol-3-piruvato (IPIA), triptamina e indol-3-acetamida (IAM), respectivamente. Estes, por sua vez, são precursores de metabólitos como, ácido indol-3-láctico (ILac), ácido indol-acrílico (IAcr), ácido indol-3-propiónico (IPro), ácido indol-acético (IAce) e ácido indol-3-acetaldeído (IAAld). Por outro lado, algumas bactérias também são capazes de expressar a enzima indolamina-2,3-dioxigenase (IDO) e metabolizar trp em quinurenina (HUBBARD *et al.*, 2015).

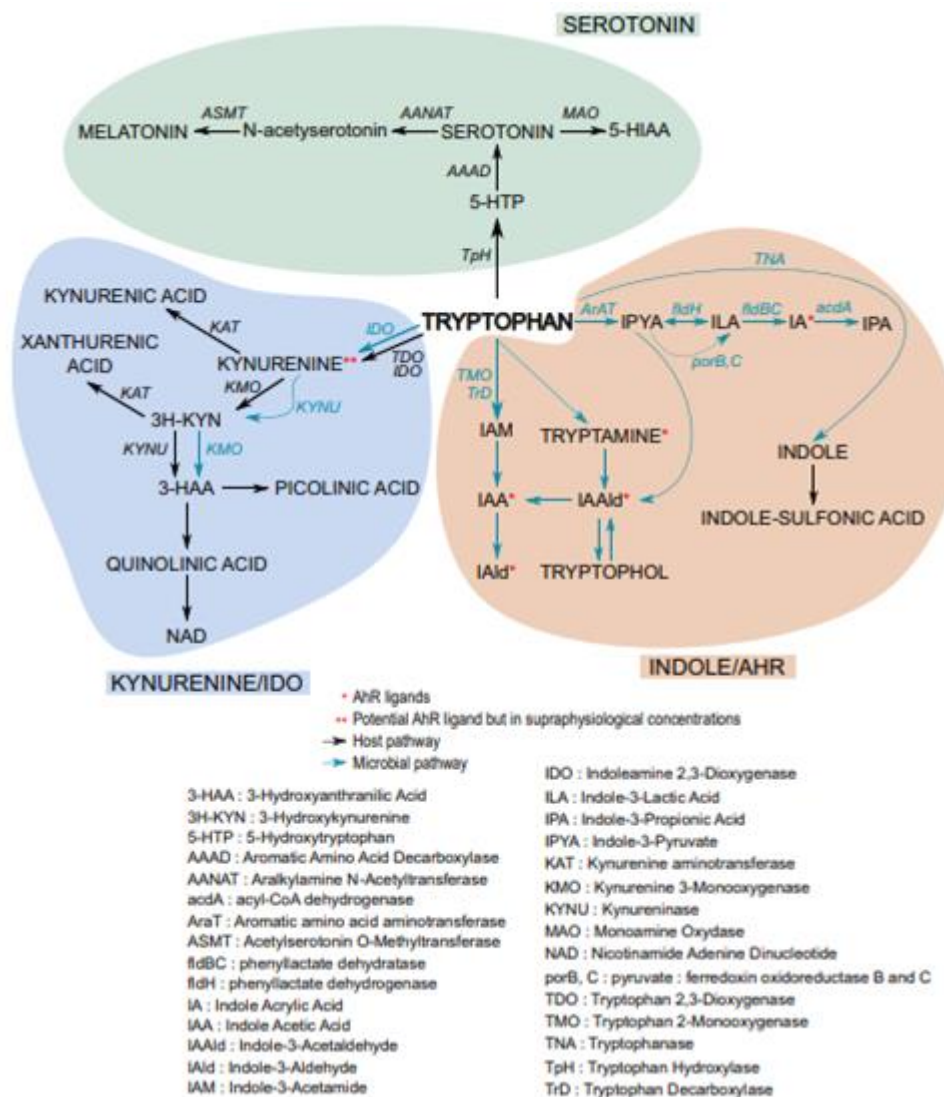


Figura 5- Vias de metabolismo do triptofano: O triptofano pode ser metabolizado diretamente por bactérias da microbiota intestinal, produzindo indol e seus derivados, ou pela via das quinureninas e da serotonina. Fonte: Agus et al., Cell Host & Microbe, 2018.

Muitos derivados de indol, tais como IAld, IAce, IPro, IAAld e IAcr, são ligantes para AhR (ALEXEEV *et al.*, 2018); A sinalização AhR é considerada um componente-chave da resposta imune em locais de barreira, agindo na renovação epitelial, integridade da barreira e muitos tipos de células imunológicas, como linfócitos intraepiteliais, células Th17, células linfoides inatas, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (LAMAS *et al.*, 2018). Por outro lado, o indol já foi descrito como um sinal de quorum sensing para bactérias como *Escherichia coli*, influenciando na sua motilidade, quimiotaxia e interação com células epiteliais (BANSAL *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2007). O indol diminui a expressão de genes dentro da ilha de patogenicidade do “*Locus of enterocyte effacement*” (LEE), que é essencial para esses patógenos formarem lesões de adesão em enterócitos (KUMAR & SPERANDIO, 2019).

Muitos estudos mostram a influência do indol e outros derivados do triptofano na patogênese bacteriana (LEE *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2015). Segundo Lee e colaboradores, o indol é capaz de modular a produção de ramnolipídeos, piocianina e a motilidade de *Pseudomonas aeruginosa*. Ademais, alguns autores relatam a diminuição da expressão de hemolisinas e enterotoxinas de *Staphylococcus aureus*, bem como a inibição da fixação de *Candida albicans* a células epiteliais intestinais pela ação do indol (LEE, J. H.; WOOD; LEE, J., 2015; MELANDER *et al.*, 2014). Moléculas derivadas de triptofano disponíveis comercialmente também foram testadas quanto ao seu papel na regulação da expressão de T3SS. Em concentrações milimolares, IAce, ácido 1-naftalacético (NAA) e 3-hidroxiquinurenina inibiram a expressão de T3SS (SHEN *et al.*, 2008). Além disso, *P. aeruginosa* é capaz de secretar níveis de quinurenina, ácido quinurênico e 3-OH-quinurenina clinicamente relevantes, sugerindo que essa bactéria possui tanto uma quinurenina aminotransferase funcional quanto uma quinurenina monooxigenase. A via da quinurenina bacteriana é a principal via que leva ao antranilato, um precursor crucial para alguns fatores de patogenicidade em *P. aeruginosa* (BORTOLOTTI *et al.*, 2016).

Diante do exposto, compostos antivirulência podem ter vantagens sobre antibióticos clássicos em duas formas principais: (i) inibindo a expressão de genes-alvo que estão envolvidos com mecanismos de virulência bacteriana, não induzindo pressão seletiva que levaria ao fenômeno de resistência e mutagenicidade; (ii) efeito direcionado contra as bactérias patogênicas, sem causar dano a microbiota residente dos diferentes sítios anatômicos. Nesse sentido, a hipótese do presente trabalho é que os produtos do catabolismo do triptofano pela microbiota intestinal indígena são capazes de alterar a virulência de *Pseudomonas aeruginosa* e, conseqüentemente, interferir no curso da infecção pulmonar em um modelo murino.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito de metabólitos microbianos de triptofano provenientes da microbiota indígena sobre a virulência de isolados clínicos de *P. aeruginosa*.

3.1.1 Objetivos específicos

- I. Avaliar o efeito de metabólitos de triptofano provenientes da microbiota indígena sobre os seguintes parâmetros associados à virulência de *P. aeruginosa*:
 - Crescimento planctônico;
 - Biofilme;
 - Motilidade (*swimming*, *swarming* e *twitching*);
 - Piocianina e pioverdina;
 - Sensibilidade ao peróxido de hidrogênio.
- II. Caracterizar e agrupar isolados clínicos de *P. aeruginosa* quanto ao perfil fenotípico de virulência;
- III. Determinar o efeito dos metabólitos microbianos de triptofano sobre os parâmetros associados à virulência de isolados clínicos de *P. aeruginosa*;
- IV. Avaliar a ação dos metabólitos microbianos de triptofano na expressão de genes relacionados à virulência de *P. aeruginosa*;
- V. Investigar os índices de *killing* e fagocitose por macrófagos murinos da *P. aeruginosa* crescida em diferentes metabólitos microbianos de triptofano;
- VI. Avaliar o efeito de metabólitos microbianos de triptofano sobre a virulência de *P. aeruginosa* em um modelo experimental murino de infecção pulmonar.

4 METODOLOGIA

4.1 Linhagens e cultivo da *Pseudomonas aeruginosa*

4.1.1 População/Amostragem

Foram incluídos no estudo isolados clínicos de pacientes internados no Centro de Terapia Intensiva do Hospital Risoleta Tolentino Neves (CTI/HRTN) no período de 1 de janeiro de 2019 a 31 de dezembro de 2019, com idade a partir de 18 anos, de ambos os sexos, com tempo de internação superior a 24 horas no CTI, e que preencheram os critérios de infecção hospitalar do *National Nosocomial Infection Surveillance System* (NNISS), utilizado pela CCIH/HRTN. A partir da análise microbiológica das amostras, realizada pelo laboratório de Patologia Clínica do HRTN, 30 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* foram selecionados e congelados à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para formação do biobanco que será utilizado nesse estudo (Tabela 1) (SisGen A2AC99D). Como controle e normatização foram utilizadas as linhagens de referência laboratorial PAO1, PA103 e PA14.

Tabela 2: Isolados clínicos de *P. aeruginosa* selecionados do Hospital Risoleta Tolentino Neves.

Isolado	n.º da amostra	Sítio de isolamento	Sexo do paciente
1	18-0076	Aspirado traqueal	M
2	22-0067	Ponta de cateter	M
3	19-0055	Hemocultura	M
4	22-0095	Aspirado traqueal	F
5	18-0124	LBA	F
6	21-0017	Aspirado traqueal	F
7	19-0057	LBA	F
8	02-0052	Hemocultura	F
9	12-0048	LBA	M
10	05-0056	Ponta de catéter	M
11	14-0057	LBA	M
12	03-0059	Aspirado traqueal	M
13	16-0040	Aspirado traqueal	M
14	02-0104	Ponta de cateter	F
15	04-0084	Escarro	M
16	06-0114	Abscesso abdominal	M
17	08-0129	Tecido Profundo	M
18	29-0087	LBA	M
19	09-0039	Aspirado traqueal	M
20	09-0040	Hemocultura	M
21	27-0071	LBA	M
22	01-0067	LBA	M
23	21-0042	LBA	M
24	11-0066	Tecido Profundo	M
25	25-0028	Swab perianal	M

26	11-0074	Ponta de catéter	F
27	30-0045	Swab perianal	M
28	25-0061	Swab nasal	M
29	24-0001	Materiais diversos	M
30	03-0074	Escara dorsal	M

Lavado bronco-alveolar (LBA); Feminino (F); Masculino (M).

4.1.2 Aspectos Éticos

A realização deste estudo foi aprovada pelo Núcleo de Ensino e Pesquisa e Extensão (NEPE) do HRTN (Processo 24/2018). Por se tratar de um estudo a partir de isolados clínicos, não houve a necessidade de recrutamento ou avaliação pessoal da população da pesquisa e aplicação de formulário de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e nem da discriminação de critérios para que a pesquisa fosse interrompida ou suspensa. Tal justificativa foi apresentada ao NEPE e a dispensa do TCLE foi autorizada. Os dados dos pacientes foram mantidos em sigilo, em conformidade com o que prevê os termos da resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

4.1.3 Preparo do inóculo

Previamente à realização dos experimentos, tanto as linhagens laboratoriais quanto os isolados clínicos foram cultivadas em caldo Luria Broth (LB) a 37 °C por 16 horas em aerobiose. O tempo de incubação foi determinado de acordo com a fase exponencial de crescimento da *P. aeruginosa* após realização da curva de crescimento. A densidade óptica (DO) foi medida a 600 nm em espectrofotômetro. Foram realizadas diluições 1:2 de forma à atingir-se a densidade desejada para cada experimento (a densidade óptica do inóculo para cada parâmetro de virulência está descrita nos seus respectivos itens da metodologia). Para isso, considerou-se a DO de 0,1 como aproximadamente 10⁸ UFC, conforme padronizado anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa.

4.2 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 selvagens (WT), fêmeas de 8 semanas de idade, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Os animais foram mantidos em caixas com no máximo 6 animais. No biotério onde os animais foram mantidos houve o controle de temperatura (28 a 30 °C), da umidade (50%), da ventilação e do ciclo da luz (claro-escuro). Os animais tiveram acesso a água e ração sem restrição. Todos os experimentos foram aprovados na Comissão de Ética na utilização de animais (CEUA) sob o número de protocolo 257/2020.

4.3 Preparo dos metabólitos

Os metabólitos utilizados neste projeto foram diluídos em dimetilformamida a 1% p/v (DMF) e mantidos a 4 °C. Foram produzidas soluções estoque na concentração 10 mM dos seguintes metabólitos, obtidos da SIGMA-ALDRICH: indol, ácido indolacético (IAce), ácido indolaldeído (IAld), indoxil-3-sulfato (I3S), ácido indolacrílico (IAcr), ácido indol-propiónico (IPro), ácido indol-lactico (ILac) e ácido kinurênico (KA) (Fig. 6).

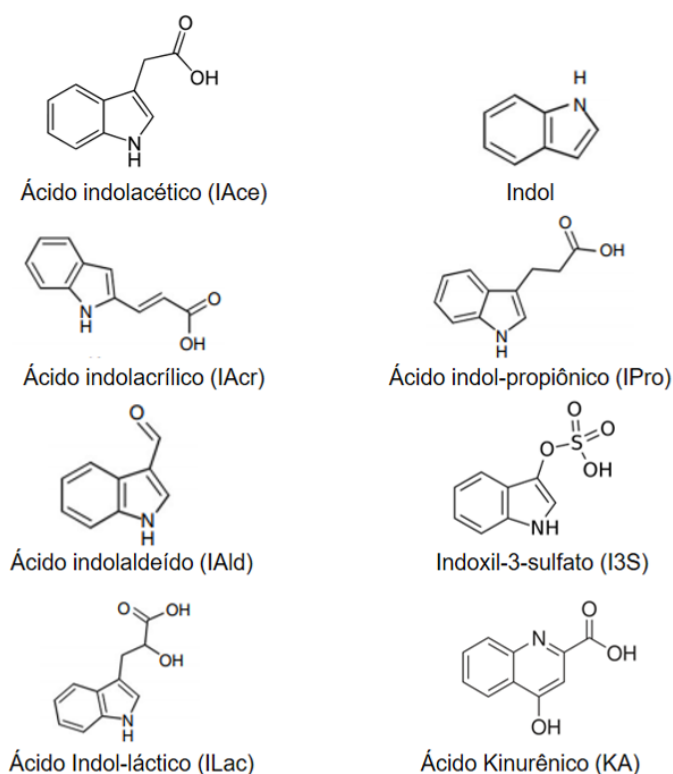


Figura 6- Estrutura química dos produtos do catabolismo do triptofano: Os metabólitos ácido indolacético, ácido indolacrílico, ácido indolaldeído, ácido indol-láctico, ácido indol-propiónico e indol são oriundos do metabolismo do triptofano pela microbiota, enquanto o ácido kinurênico e o indoxil-3-sulfato são gerados pelo metabolismo do hospedeiro. Todos os metabólitos têm em comum a presença de um grupo indol na cadeia lateral. Fonte: Adaptado de Roager et al., Nature Communications, 2018.

4.4 Estratégia experimental

A seleção dos metabólitos e as concentrações dos mesmos utilizadas para os testes foram estabelecidas de acordo com a ordem de testagem abaixo (Figura 7):

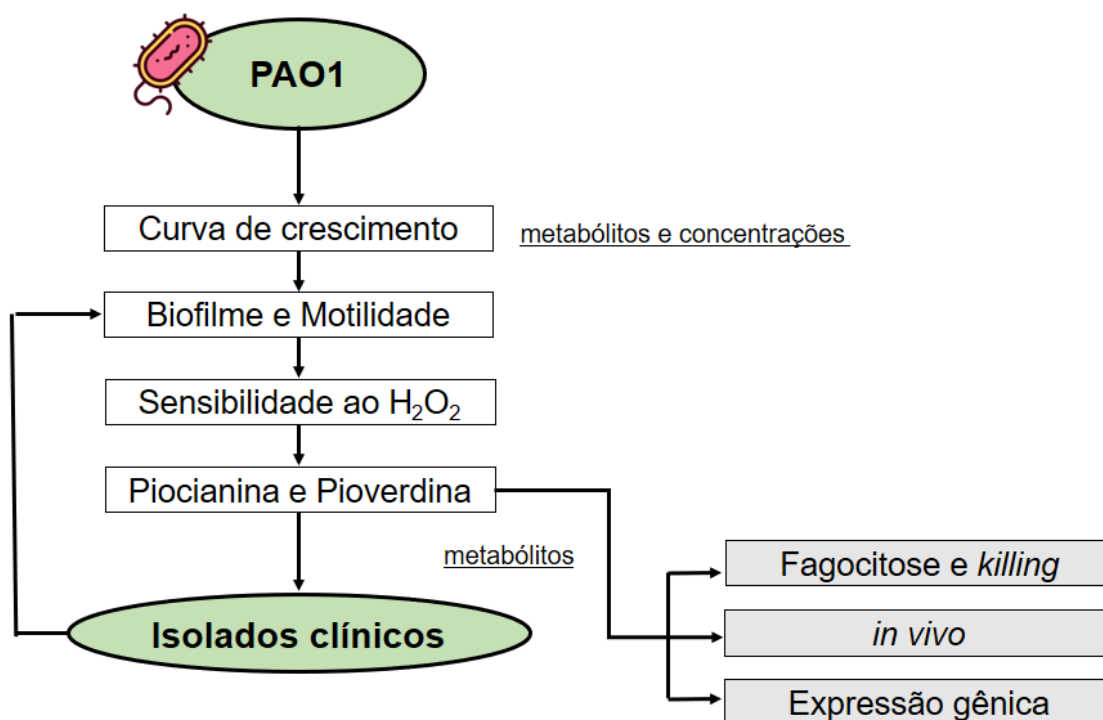


Figura 7- Fluxo de testagem dos metabólitos de triptofano sobre a virulência da linhagem PAO1: A partir dos resultados obtidos com a linhagem PAO1, foi determinado quais metabólitos e concentrações seriam testados sobre os isolados clínicos de *P. aeruginosa*.

De acordo com Roager e colaboradores, os produtos do metabolismo do triptofano podem ser encontrados no soro de adultos saudáveis em concentrações que variam de 1 a 2 μM (ROAGER *et al.*, 2018). Sendo assim, todos os metabólitos citados no item 4.3 foram testados nas concentrações de 1, 3, 10, 30, 100, μM em uma curva de crescimento utilizando a cepa PAO1. Os metabólitos em concentrações que não alteraram o crescimento de PAO1 foram escolhidos para os testes de biofilme, motilidade, piocianina, pioverdina e sensibilidade ao H_2O_2 . A avaliação da virulência por esses testes, definiu os metabólitos e suas concentrações para ensaios posteriores com os isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*, bem como para ensaios de *killing* e fagocitose por macrófagos murinos, infecção pulmonar em camundongos e expressão gênica.

4.5 Curva de crescimento de *P. aeruginosa*

A curva de crescimento foi realizada utilizando-se a linhagem PAO1 como referência. Para isso, 20 µL da alíquota de PAO1 no inóculo de 10⁶ UFC/mL foi adicionada a 180 µL do caldo LB em uma placa de 96 poços. A placa foi incubada a 37°C em aerobiose em um leitor de placas por 60 horas. A cada 1 h foi realizada a leitura da absorbância a 600 nm para a confecção de uma curva Absorbância X Tempo.

Para a avaliação do efeito dos metabólitos no crescimento da *P. aeruginosa* foi realizado o mesmo protocolo, no entanto, foi adicionado nos poços os metabólitos diluídos em DMF 1% nas concentrações finais de 1, 3, 10, 30, 100 µM.

4.6 Avaliação da capacidade de formação de biofilme por *P. aeruginosa*

Para a avaliação da capacidade de formação de biofilme, as linhagens PAO1, PA103 e PA14, bem como os isolados clínicos selecionados, foram crescidos em caldo LB, diluídas a uma densidade óptica a 600 nm de 0,1 e foram incubadas em placas de 24 poços de poliestireno na presença de diferentes metabólitos de triptofano na concentração de 100 µM durante 24 h, sem agitação. Após incubação, a placa foi submetida a lavagem com PBS 1X e posterior fixação com metanol por 10 minutos. Em seguida, 0,5 mL de uma solução de cristal violeta a 0,5% p/v foi adicionada à placa durante 10 minutos. O excesso de corante foi removido com água destilada estéril. Em seguida, 0,4 mL de solução de etanol-acetona (na proporção 4:1, respectivamente) foi adicionada aos poços por 10 minutos. Por fim, 150 µL da solução obtida foram transferidos para placas de 96 poços de fundo chato e a absorbância foi medida a 620 nm para quantificação da massa total do biofilme (Adaptado de LEE *et al.*, 2009).

4.7 Avaliação da motilidade de *P. aeruginosa*

Foram avaliados três padrões de motilidade nas linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, PA103, PA14 e isolados clínicos:

- I. *Swimming*: Utilizou-se um meio de cultura com 0,7% p/v de ágar, 1% p/v de triptona e 0,25% p/v de NaCl;

- II. *Swarming*: Utilizou-se o meio BM2 (tampão de fosfato de potássio 62 mM a pH 7, MgSO₄ 2 mM, FeSO₄ 10 µM, glicose a 0,4% p/v, 0,1% p/v de caseinoaminoácidos e 0,85% p/v de ágar).
- III. *Twitching*: Utilizou-se o meio de cultura LB com 1,0% de ágar.

Para a avaliação do papel dos metabólitos na modulação desses fatores, os metabólitos foram dissolvidos em DMF e adicionados ao ágar de motilidade. DMF (1% p/v) foi adicionado como controle negativo. O inóculo das linhagens PAO1, PA103, PA14 e isolados clínicos de *P. aeruginosa* a uma DO de 1 foi adicionado com uma alça em agulha no centro das placas de *swimming* e *twitching*. No entanto, para o *swarming* 10 µL do inóculo foi adicionado no centro das placas. A leitura do ensaio foi realizada através da medida do halo formado após 12 h de incubação a 37 °C em aerobiose (Adaptado de LEE *et al.*, 2009).

4.8 Quantificação da produção de piocianina e pioverdina

A quantificação da produção de piocianina foi realizada após adição de pequenas colônias das linhagens PAO1, PA103, PA14 e isolados clínicos de *P. aeruginosa* em 5 mL de caldo peptonado (para 1 L de água destilada, 20 g de peptona e após esterilização adicionou-se 1,4 g de MgCl₂ e 10 g de K₂SO₄) na presença dos metabólitos. Após 24h de incubação em aerobiose a 37 °C, a cultura foi centrifugada a 5,000 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 3 mL de clorofórmio. A solução foi centrifugada a 1,000 x g por 5 minutos. A partir disso, foi adicionado à fase orgânica 1 mL de HCl 0,2 M. A amostra foi agitada e a fase aquosa lida usando um espectrofotômetro no comprimento de onda de 530 nm (CHANDLER *et al.*, 2019).

Para a quantificação de pioverdina as linhagens laboratoriais e isolados clínicos foram crescidos em 5 mL de caldo peptonado (para 1 L, 10 g de peptona e 15 mL de glicerol e após esterilização adicionou-se 1,5 g de K₂PO₄ e 5 mL de MgSO₄ a 1 M) a 37°C. Após 24h, a cultura foi centrifugada a 5,000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e sua absorvância determinada usando um espectrofotômetro no comprimento de onda de 404 nm (CHANDLER *et al.*, 2019).

4.9 Avaliação do perfil de sensibilidade ao peróxido de hidrogênio

Para avaliação do perfil de sensibilidade de PAO1, PA103, PA14 e isolados clínicos de *P. aeruginosa* ao peróxido de hidrogênio foi adotada a técnica de ágar difusão (variante poços). Para isso, as linhagens foram cultivadas em caldo LB por aproximadamente 16h em aerobiose e, posteriormente, 100 µL da cultura foram adicionados a placas de *Pseudomonas Isolation Agar* (PIA) e espalhados com uma alça de *drigalski*. Com o auxílio de uma ponteira estéril, foram realizados poços no ágar aos quais foram adicionados 50 µL de peróxido de hidrogênio 30%. A leitura do ensaio foi realizada através da medida do halo de inibição formado após 24h de incubação a 37 °C em aerobiose (Adaptado de HAUSSLER *et al.*, 2008).

4.10 Análise da expressão dos genes *pqsA* e *pvdS*

Para a análise da expressão de genes de virulência na linhagem PAO1 foi adotada a técnica de RT-qPCR.

- I. *Extração do RNA bacteriano:* 20 mL de uma cultura da PAO1 crescida *overnight* foi centrifugada a 3000 RPM (*Megafuge 16R da Thermo Scientific™*) por 10 minutos e o pellet ressuspendido em 750 µL de Trizol. A mistura foi submetida a 3 ciclos de agitação de 1 minuto usando um vórtex e incubada a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, foi adicionado 150 µL de clorofórmio e centrifugado a 12,000 x g por 15 min. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo contendo 375 µL de isopropanol. Após centrifugação a 12,000 x g por 10 min, o sobrenadante foi removido e os sedimentos lavados com 750 µL de etanol a 75% v/v. Por fim, o conteúdo do tubo foi mantido em banho seco e ressuspendido em 40 µL de água Mili-Q autoclavada para quantificação do RNA em espectrofotômetro.
- II. *Tratamento com DNase:* O RNA extraído foi submetido à uma etapa de tratamento com DNase, utilizando-se 0,25 µL da *iScript DNase* e 0,75 µL da *iScript DNase Buffer*. A quantidade de RNA foi adicionada de forma a se ter um volume final por reação de 8 µL e uma quantidade de 500 ng de RNA total. O mix foi incubado no termociclador usando o seguinte protocolo: 5 minutos a 25°C, 5 minutos a 75°C e mantido a 4°C.

- III. *Confecção do cDNA*: A confecção do cDNA foi realizada pela transcrição reversa. A reação de transcrição reversa do mRNA foi realizada adicionando-se 2 µL do *iScript Reverse Transcription Supermix* à solução tratada com DNase anteriormente (*iScript cDNA Synthesis Kit* – BIO-RAD). O mix de reação completo foi incubado no termociclador usando o seguinte protocolo: 5 minutos a 25°C, 20 minutos a 46°C e em seguida 1 minuto a 95°C durante o qual ocorreu a transcrição reversa do mRNA. Após o fim da reação, o cDNA foi mantido a -20 °C.
- IV. *Reação da qPCR*: Para as reações subsequentes de amplificação, 2 µL das amostras de cDNA foram utilizados. A PCR foi realizada em um volume final de 10 µL contendo 5 µL de *Power SYBR Green PCR Master Mix 2X* (*Applied biosystems*, Foster City, CA, EUA), 1 µL de primer senso a 5 µM, 1 µL de primer anti-senso a 5 µM e 1 µL de água Milli-Q. A reação foi realizada utilizando-se o protocolo para PCR com *SYBR Green* do termociclador *StepOne PCR System* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA).

As sequências dos iniciadores utilizados foram as seguintes (Tabela 2):

Tabela 2: Iniciadores utilizados no ensaio de RT-qPCR.

Gene	Descrição	Iniciador	Sequência*
16S	Codifica pequenas subunidades das moléculas de RNA ribossômico, responsáveis pelo processo essencial de conversão de mensagens genéticas em componentes celulares funcionais por meio da tradução de mRNA em proteínas (constitutivo)	16S_senso	5'-GAGGTTGATCATGGCTCAG-3'
		16S_antisenso	5'-ACAACGCAGGTCCATCT-3'
PqsA	Catalisa a formação de antranilil-CoA, que é a etapa inicial para a entrada na via biossintética do sinal de	PqsA_senso	5'-GACCGGCTGTATTTCGATTC-3'
		PqsA_antisenso	5'- GCTGAACCAGGGAAAGAAC-3'

	quinolona de Pseudomonas (PQS).		
PvdS	Promove a biosíntese de pioverdina em condições restritas de ferro.	PvdS_senso	5'-TAACCGTACGATCCTGGTGAAGA-3'
		PvdS_antisenso	5'-ACGATCTGGAACAGGTAGCTGAG-3'

* Referência: LEE, (2009).

4.11 Determinação das taxas de *killing* e fagocitose por macrófagos murinos

Para determinar-se os índices de *killing* e fagocitose foi realizado o ensaio de proteção por gentamicina *in vitro*. Para isso foram utilizados macrófagos derivados da medula óssea de camundongos C57BL/6 (BMDMs). Células da medula óssea foram removidas dos fêmures e tíbias dos animais e cultivadas em placas de Petri contendo RPMI 1640 contendo Soro fetal bovino a 20% v/v e sobrenadante de cultura de células L929 a 30% v/v. As placas de Petri foram incubadas em estufa contendo 5% de CO₂ atmosférico a 37°C. As células da medula óssea, quando expostas ao sobrenadante de células L929 durante 7 a 8 dias, se diferenciam em macrófagos que ficam aderidos à superfície plástica da placa de Petri.

Após 7 dias, as células foram removidas da placa de Petri utilizando-se um raspador de células plástico e adicionadas em placas de 24 ou 96 poços a uma quantidade de 1x10⁶ ou 1x10⁵ células por poço em um volume de 500 ou 200 µL, respectivamente. Após 24h de incubação a 37 °C, as células foram desafiadas com 1x10⁶ ou 1x10⁷ células de *P. aeruginosa* PAO1 (MOI = 10) cultivada em caldo LB na presença ou não de metabólitos de trp. Foi adotado o tempo de 30 min de incubação. Após esse tempo, para remoção das bactérias que não foram fagocitadas, foi adicionado gentamicina (concentração final de 100 ug/mL) aos poços por 15 min para o ensaio de fagocitose e 45 min para o ensaio *killing*. Por fim, as células da placa de 96 poços foram lavadas com PBS e submetidas à lise com Triton 0,1% v/v. Diluições seriadas do lisado foram semeadas em PIA (*Pseudomonas isolation agar*) e incubadas a 37°C por 24h em aerobiose. Os índices de *killing* e fagocitose foram determinados pela contagem de UFC. Além disso, lamínulas foram adicionadas aos poços da placa de 24 poços para que, após coloração utilizando o kit panóptico rápido, as bactérias fagocitadas possam ser visualizadas ao microscópio óptico e posterior definição do índice fagocítico (Adaptado de Amiel *et al.*, 2010).

4.12 Infecção Pulmonar por *P. aeruginosa* em camundongos

Para a realização da infecção pulmonar por *P. aeruginosa*, a linhagem PAO1 crescida ou não na presença dos metabólitos de triptofano foi diluída para uma concentração de 1×10^7 UFC/40 μ L e inoculada nos animais pela via intranasal, conforme padronizado anteriormente no laboratório. Após 24h de infecção, os animais foram eutanasiados e amostras de lavado broncoalveolar (BAL) e pulmões foram coletadas para as seguintes análises (Fig. 8):

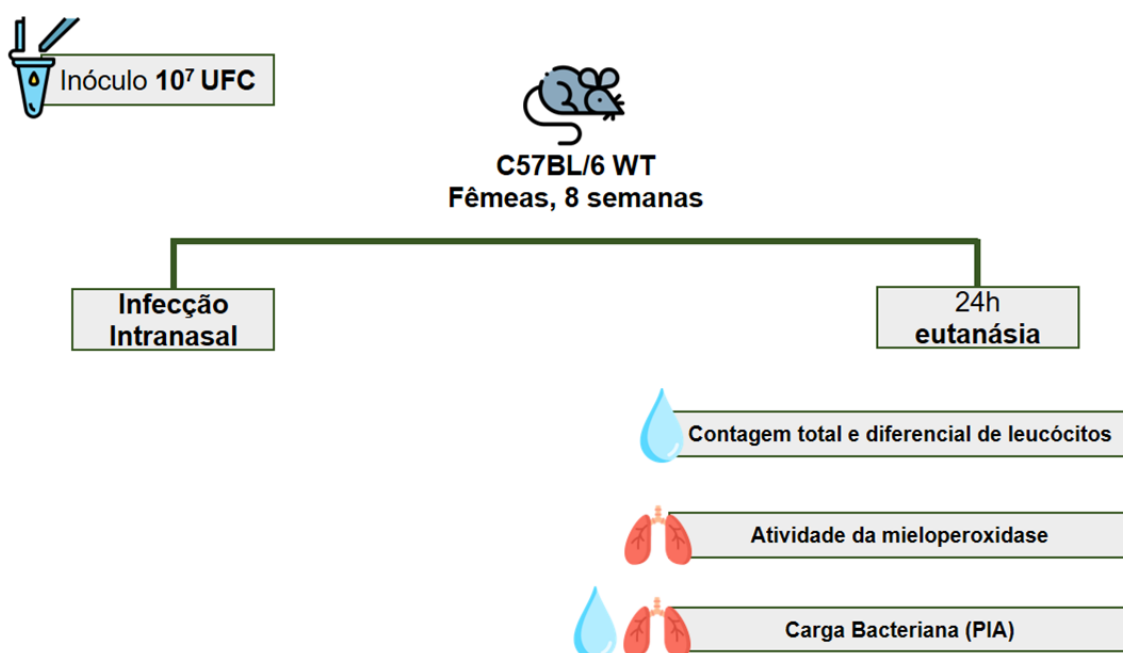


Figura 8- Esquema experimental para infecção de camundongos por *P. aeruginosa* PAO1: Os animais foram infectados pela via intranasal com 10^7 UFC da bactéria crescida previamente na presença dos metabólitos. Após eutanásia, o pulmão e o BAL foram coletados para análises.

4.12.1 Lavado bronco-alveolar e avaliação do influxo de leucócitos para o espaço alveolar:

O lavado bronco-alveolar (BAL) foi realizado para obter leucócitos presentes nos espaços alveolares. A traqueia foi exposta cirurgicamente e um catéter de polietileno de 1.7 mm de diâmetro externo foi inserido. O BAL foi realizado pela instilação de duas alíquotas de 1 mL de PBS. O número total de leucócitos foi determinado pela contagem de leucócitos em uma câmara modificada de *Neubauer* após a coloração

com corante de *Turk*. Contagens diferenciais foram obtidas por citocentrifugação (1,000 x g por 10 minutos) das células em lâminas de microscopia e consequente avaliação da porcentagem de cada leucócito em uma lâmina corada utilizando-se o kit Panóptico Rápido segundo o protocolo do fabricante (Laborclin).

4.12.2 Avaliação da carga bacteriana:

Após 24h de infecção foi quantificada a carga bacteriana no BAL e no pulmão. Para a realização, as amostras de pulmão (após obtenção de um homogenato) e BAL foram diluídas com salina 0,9% na proporção de 10% e, a partir dessa diluição, diluições seriadas foram realizadas. Após a realização da diluição, 10 uL de cada ponto foi semeado pela técnica de microgota no meio sólido *Pseudomonas isolation ágar* (PIA) e incubado por 24h a 37°C e então o número de unidades formadoras de colônia foi determinado.

4.12.3 Avaliação do influxo de neutrófilos para o parênquima pulmonar pela quantificação da atividade de mieloperoxidase (MPO):

Para se avaliar o acúmulo de neutrófilos no pulmão foi utilizado o método de quantificação da atividade da mieloperoxidase. O pulmão foi coletado, pesado e suspenso em solução salina contendo EDTA (100 mg de tecido/1mL de solução), submetido à homogeneização e centrifugação (3000 x g, por 15 minutos). O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspenso em solução de NaCl 0.2% p/v gelada e, subsequentemente, em solução de NaCl 1.6% p/v com glicose 5% p/v gelada na mesma quantidade. As amostras foram centrifugadas a 3000 x g por 15 minutos. Novamente o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em tampão fosfato (pH= 5,4) com HTAB a 5% p/v e homogeneizado por 30 segundos. As amostras foram seguidamente congeladas em nitrogênio líquido e descongeladas por três vezes, centrifugadas a 3000 x g por 15 minutos e o sobrenadante coletado para ensaio de MPO. Amostras de pulmão foram diluídas em tampão fosfato (pH= 5,4) com HTAB a 5% p/v antes do ensaio, na proporção de 1:20. A atividade de mieloperoxidase (MPO) das amostras foi determinada através de um leitor de ELISA (450 nm) usando

tetrametilbenzidina (1.6 mM) e H₂O₂ (0.5 mM). Os resultados foram expressos como O.D. em 450 nm.

4.12.4 *Peso e Letalidade*

Para avaliação do peso e percentual de sobrevivência pós infecção com 10⁷ UFC da linhagem PAO1 crescida ou não na presença dos metabólitos de triptofano, camundongos C57BL/6 WT foram acompanhados por 5 dias.

4.13 **Agrupamento hierárquico – *heatmap***

Os 30 isolados clínicos e 3 linhagens de referência (PAO1, PA14 e PA103) de *P. aeruginosa* foram agrupados usando agrupamento hierárquico com distância euclidiana e ligação de ala pelo pacote *dendextend R*, versão 1.14.0 (Galili, 2015) e o *heatmap* foi desenhado com o pacote *heatmaply R*, versão 1.2.1 (Galili et al., 2018).

4.14 **Análise estatística**

Foi realizado teste de normalidade para verificar se as amostras apresentavam distribuição Gaussiana. As comparações estatísticas entre os vários grupos foram feitas por ANOVA “one way” seguida do pós-teste de Newman-Keuls. Para comparação entre dois grupos, quando necessário, foi utilizado o teste “t de student”. A curva de letalidade e peso para a infecção em modelo murino foi avaliada pelos testes log-rank e ANOVA “two-way”, respectivamente. Os resultados foram apresentados como média±erro padrão médio. O nível de significância adotado será de P<0,05. Para a realização de todas as análises, foi utilizado o software GraphPad PRISM, GraphPad software Inc. versão 8 (San Diego, CA, USA).

5 RESULTADOS

5.1 Curva de crescimento

Observou-se que a linhagem PAO1 inicia a fase exponencial de crescimento 5h após a incubação. O término da fase exponencial ocorreu aproximadamente 15h após a incubação da bactéria crescida no veículo DMF 1%. Em contrapartida, PAO1 crescida na presença de todos os metabólitos utilizados, independentemente da concentração, entrou na fase estacionária 10h após a incubação (Fig. 9). Apesar dos metabólitos permitirem um crescimento mais acelerado da linhagem PAO1 em relação ao controle, o pico da densidade óptica atingido entre eles foi semelhante.

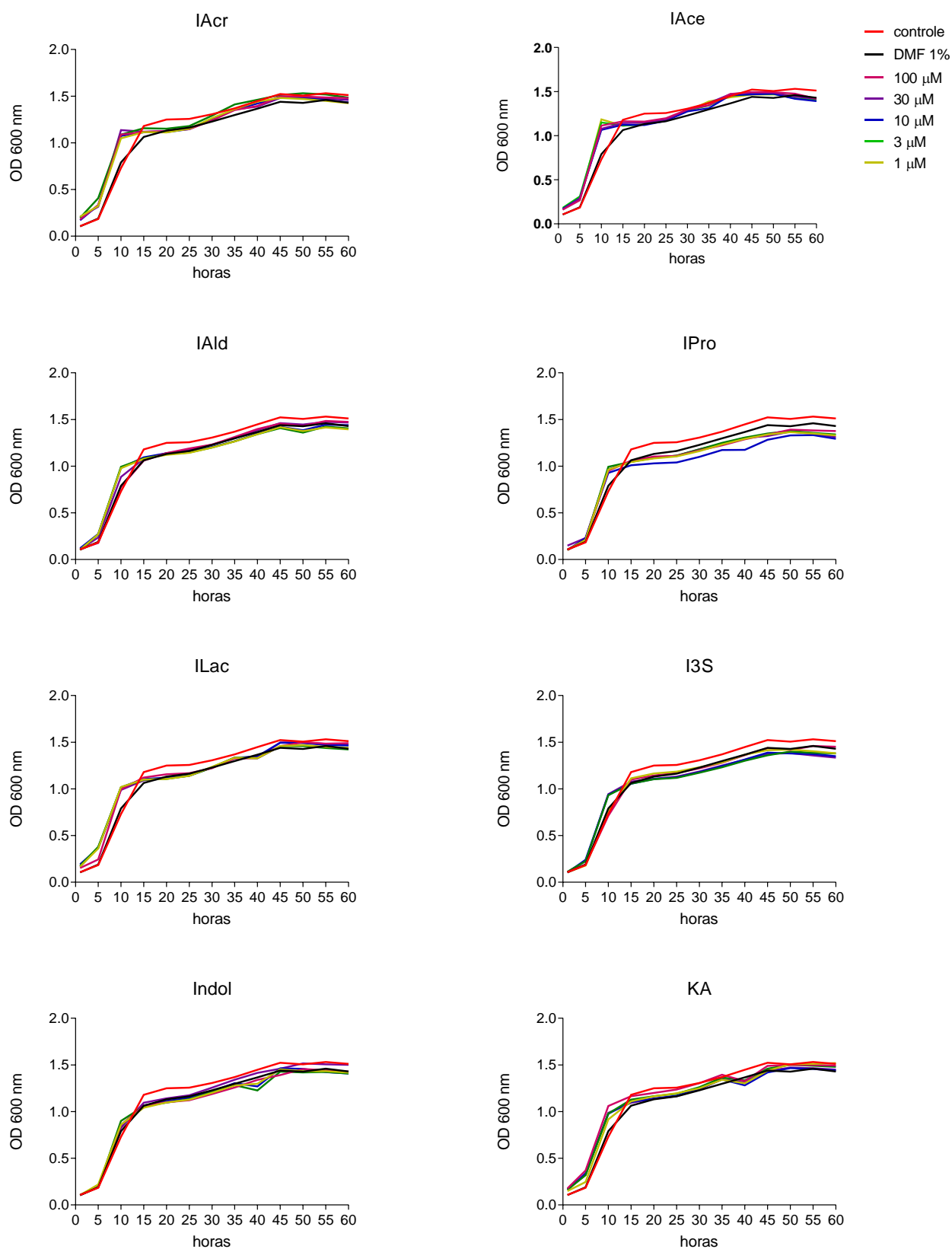


Figura 9- Curva de crescimento da *P. aeruginosa* PAO1: A linhagem PAO1 foi exposta a diferentes concentrações dos metabólitos de triptofano e teve seu crescimento avaliado por 60h. Densidade Óptica (DO).

A curva de crescimento realizada utilizando a linhagem PAO1 permitiu o melhor entendimento da cinética de crescimento da bactéria, para que, dessa forma, os experimentos seguintes pudessem ser pautados nessa dinâmica.

Uma vez que todas as concentrações de todos os metabólitos exerceram efeito semelhante sobre o crescimento da PAO1, foi escolhida a maior concentração avaliada – 100 μ M – para os experimentos subsequentes.

5.2 Capacidade de formação de biofilme por *P. aeruginosa*

A PAO1 foi capaz de formar biofilme em placas de poliestireno, o que permitiu que essa linhagem fosse utilizada para a avaliação do efeito dos metabólitos de triptofano sobre o biofilme bacteriano. A partir disso, observou-se que o indol, o ácido indolacético (IAce) e o ácido indolacrílico (IAcr) favoreceram a formação de biofilme por PAO1 na concentração de 100 μ M. O indol, em específico, aumentou em aproximadamente 3 vezes a matriz do biofilme quando comparado ao grupo que recebeu apenas o veículo (DMF 1%). Por outro lado, o ácido indol-propriônico reduziu a massa de biofilme (Fig. 10).

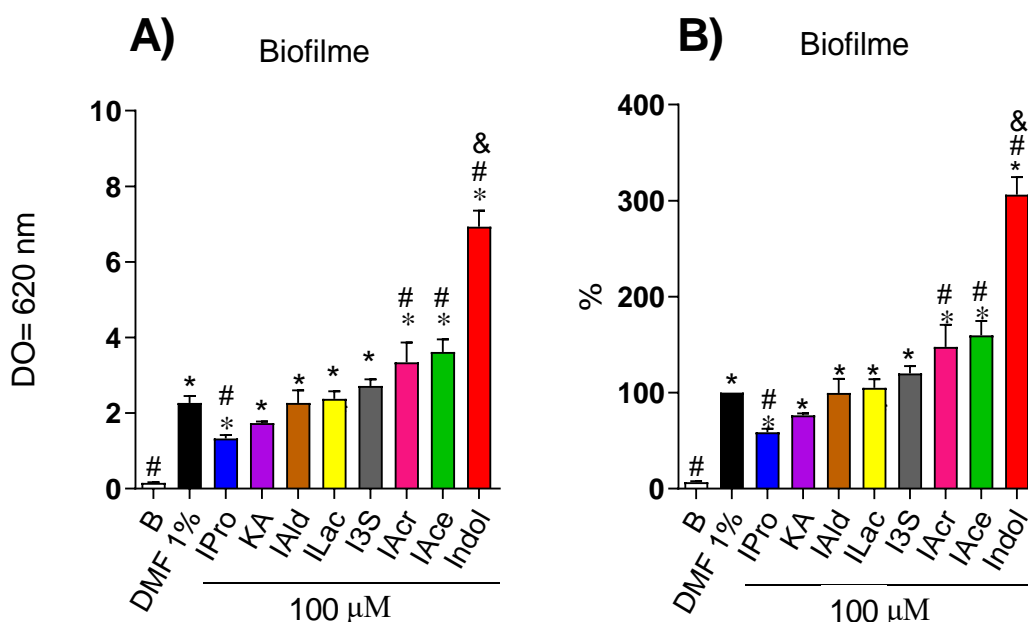


Figura 10- Capacidade de formação de biofilme por *P. aeruginosa* PAO1: A matriz do biofilme bacteriano foi exposta aos metabólitos de triptofano na concentração de 100 μ M por 24h. Branco (B); Densidade óptica (DO). *P <0,05 vs B; #P <0,05 vs DMF 1%; &P <0,05 vs todos os outros metabólitos.

Dados analisados em DO (A) e percentual (B) considerando o grupo DMF1% como 100% da capacidade de formação de biofilme.

5.3 Padrões de motilidade em *P. aeruginosa*

O efeito dos metabólitos de triptofano também foi avaliado sobre os diferentes perfis de motilidade em PAO1 Após 12h de incubação, todos os metabólitos testados na concentração de 100 μ M foram capazes de reduzir as motilidades do tipo *swimming* e *swarming* (Fig. 11A-B). Por outro lado, os metabólitos ácido indol-láctico (ILac) e indoxil-sulfato (I3S) não apresentaram o mesmo efeito na motilidade *twitching* (Fig. 11C).

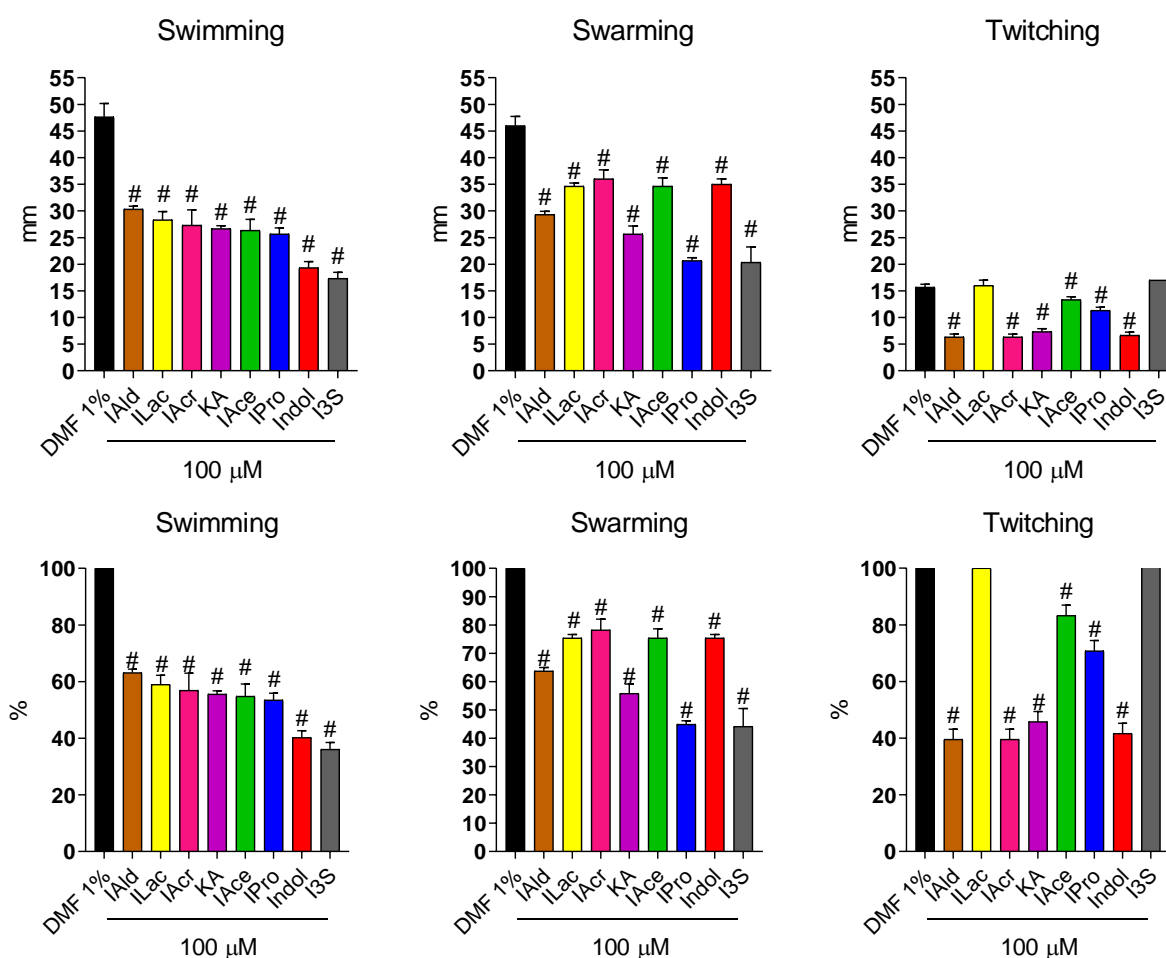


Figura 11- Padrões de motilidade em *P. aeruginosa* PAO1: O efeito dos metabólitos de triptofano foi avaliado a partir do halo dos diferentes perfis de motilidade – *swimming* (A), *swarming* (B) e *twitching* (C). Milímetros (mm). #P < 0,05 vs DMF 1%. Dados analisados em mm e percentual (%) considerando o grupo DMF1% como 100% da capacidade de motilidade.

5.4 Produção dos pigmentos piocianina e pioverdina

Observou-se que os metabólitos ácido indolacético (IAce), ácido indolacrílico (IAcr) e indol, na concentração de 100 μ M, reduziram a produção de pioverdina por *P. aeruginosa* (Fig 12A). Esse efeito estendeu-se para outros metabólitos (indol-3-aldeído (IAld), indoxil-3-sulfato (I3S), ácido indol-3-propiónico (IPro) e ácido kinurênico (KA)) quando avaliados sobre a piocianina (Fig. 12B).

Devido a discreta produção de piocianina pela linhagem PAO1 quando comparada ao controle sem adição de bactérias (branco), optou-se por avaliar os efeitos dos metabólitos de triptofano também sobre a cepa PA14, a qual apresentou níveis mais relevantes do pigmento. Nesse contexto, todos os metabólitos testados foram capazes de reduzir a produção de piocianina por *P. aeruginosa* na concentração de 100 μ M. Destaca-se o indol que apresentou efeito mais acentuado em PA14 em relação à PAO1 (Fig. 12C).

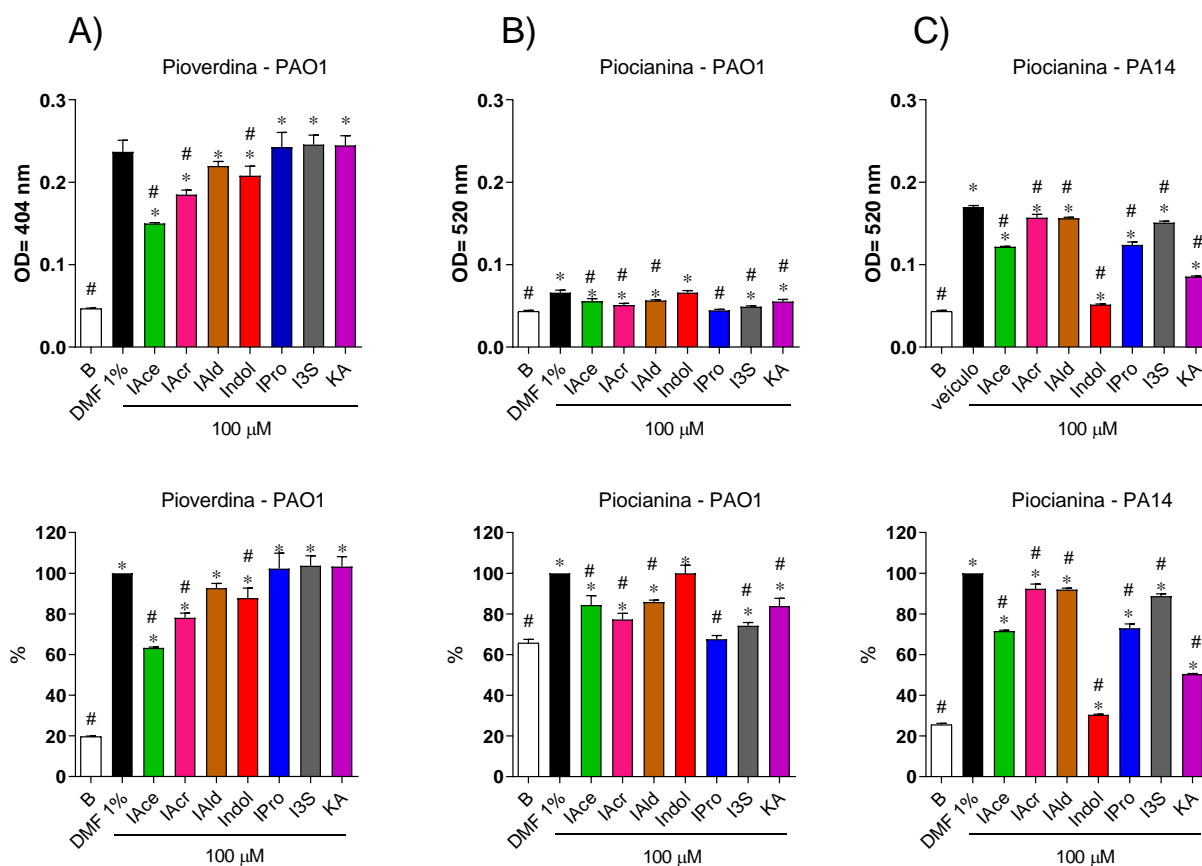


Figura 12- Produção de piocianina e pioverdina por *P. aeruginosa* PAO1 e PA14: Os níveis de pioverdina e piocianina foram determinados após 24 e 48h de incubação, respectivamente. O efeito dos metabólitos sobre a produção de pioverdina foi avaliado utilizando a cepa PAO1 (A), enquanto a

produção de piocianina foi avaliada nas linhagens PAO1 (B) e PA14 (C). Os dados foram analisados em porcentagem considerando o grupo DMF1% como 100% de produção dos respectivos pigmentos. Dados brutos expressos em densidade óptica e porcentagem. Branco (B). *P <0,05 vs B ou #P <0,05 vs DMF 1%.

5.5 Perfil de sensibilidade ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Utilizando a técnica de ágar difusão (variante poços), observou-se que o IAce, indol e KA, aumentaram o halo de inibição do crescimento de PAO1, logo, a bactéria tornou-se mais sensível ao H₂O₂ a 30% quando crescida na presença desses metabólitos na concentração de 100 µM. Ao contrário disso, PAO1 crescida na presença do I3S apresentou maior resistência ao H₂O₂ (Fig. 13).

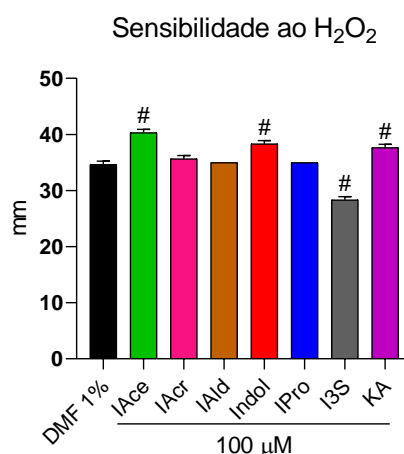


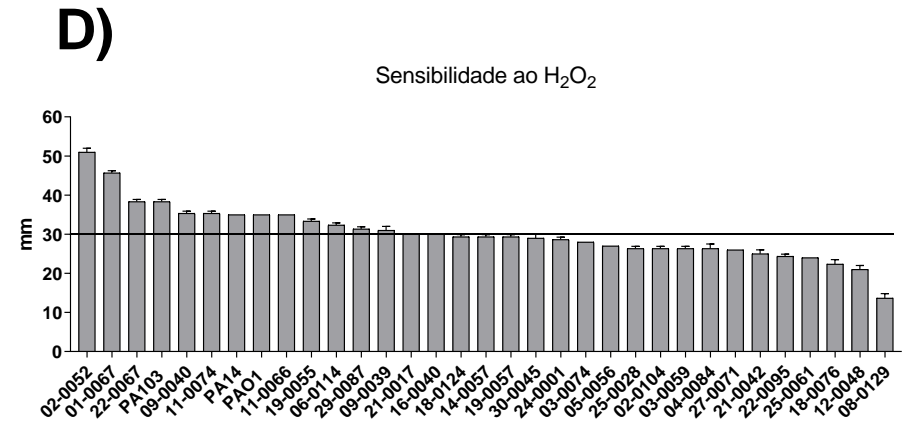
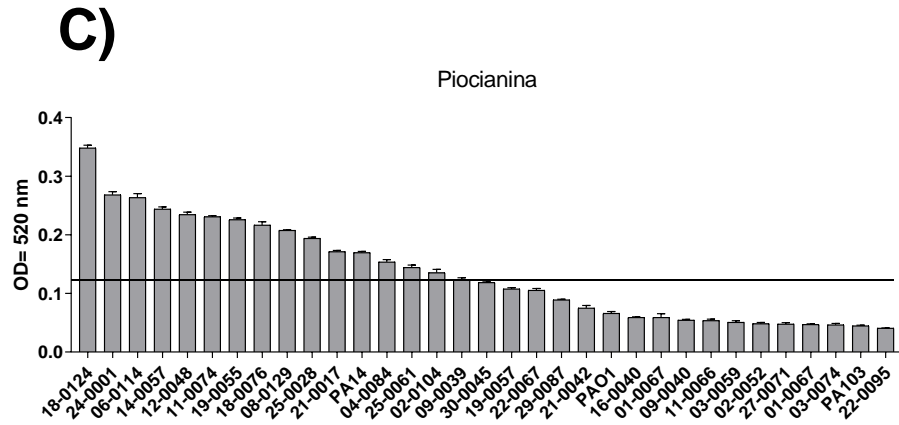
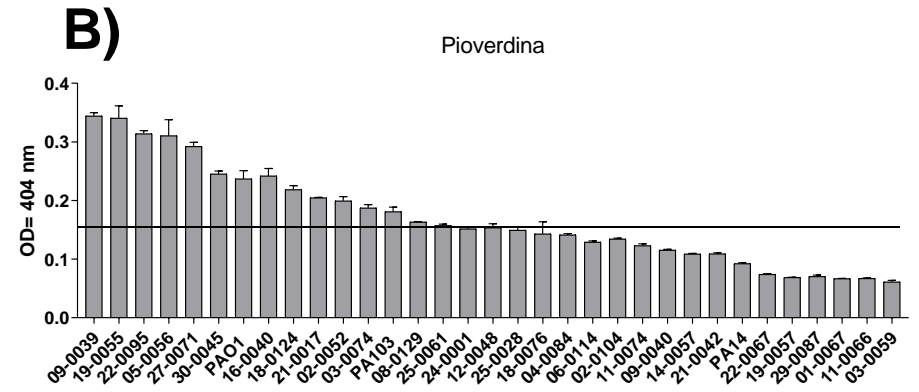
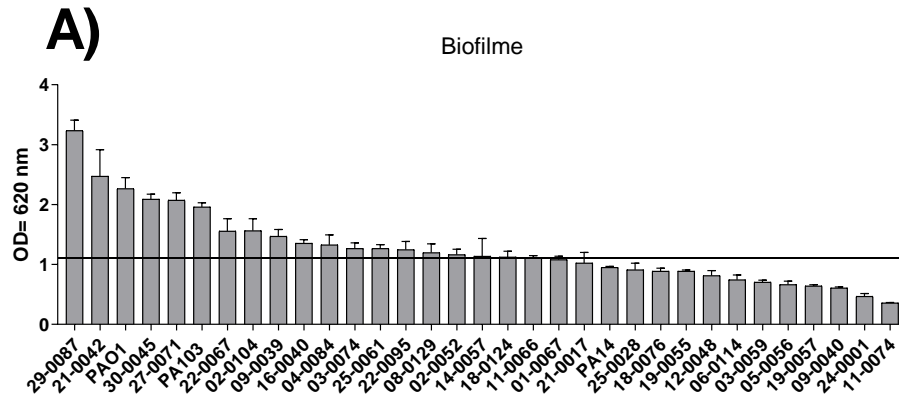
Figura 13- Perfil de sensibilidade ao H₂O₂ da *P. aeruginosa* PAO1: O efeito dos metabólitos de triptofano foi avaliado sobre o perfil de sensibilidade ao H₂O₂ 30% pela técnica de ágar difusão (variante poços). O halo de inibição do crescimento de *P. aeruginosa* foi medido em milímetros (mm). #P <0,05 vs DMF 1%.

A partir dos resultados descritos acima, dois metabólitos que apresentaram efeitos sobre todos os parâmetros de virulência da linhagem PAO1 foram selecionados para avaliação em isolados clínicos, na expressão gênica, taxas de fagocitose e *killing* e em um modelo murino de infecção pulmonar. São eles: IAce e Indol.

5.6 Efeito dos metabólitos de triptofano sobre a virulência de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*

5.6.1 Agrupamento fenotípico

A análise do perfil de virulência em isolados clínicos de *P. aeruginosa* foi realizada através dos testes de biofilme, motilidade, piocianina, pioverdina e sensibilidade ao H₂O₂. Para isso, foram selecionados 30 isolados clínicos de pacientes provenientes do Centro de Terapia Intensiva (CTI) do HRTN, independentes do sexo, idade ou sítio anatômico de isolamento.



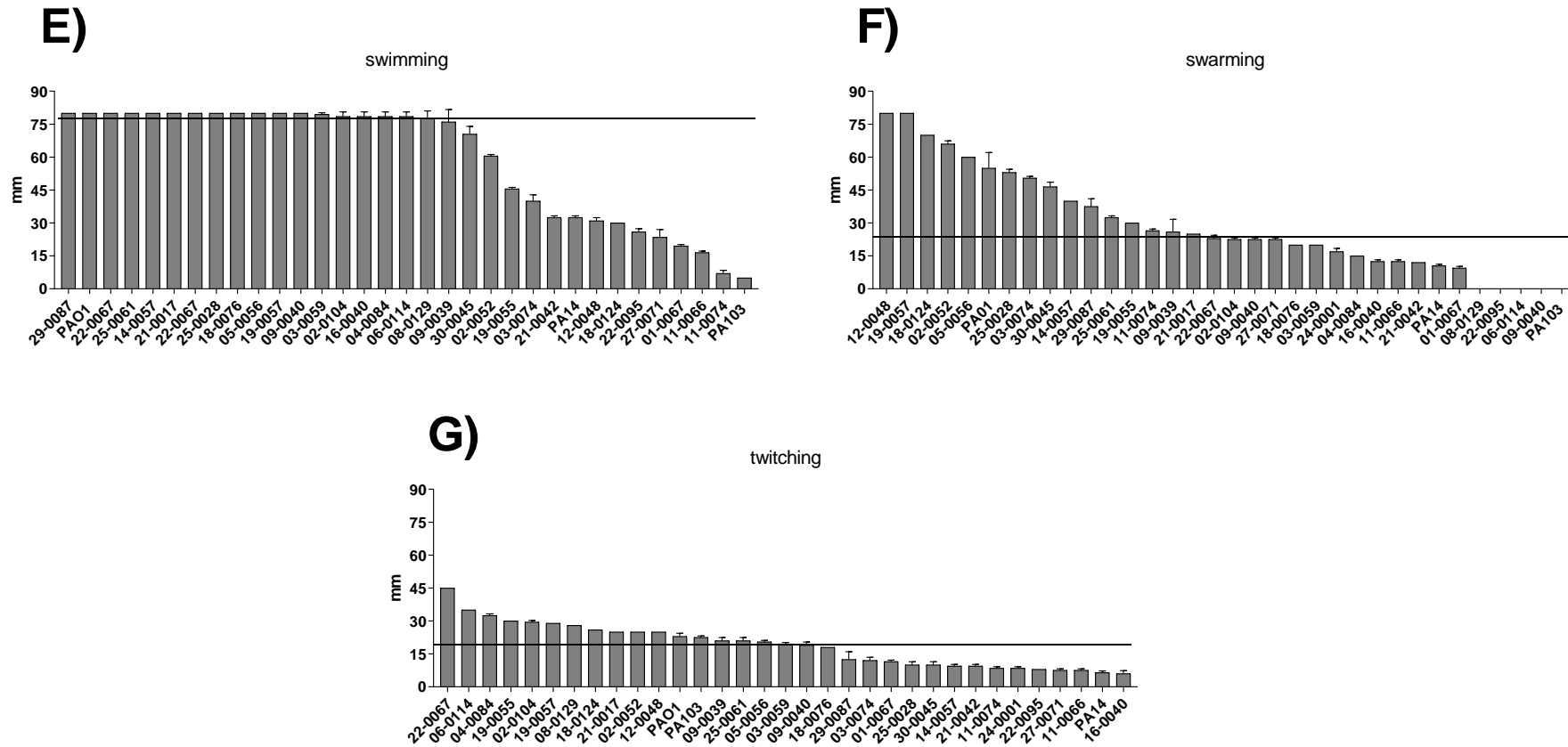


Figura 14- Caracterização fenotípica da virulência de isolados clínicos de *P. aeruginosa*: O fenótipo de virulência de 30 isolados clínicos e 3 linhagens laboratoriais foi determinado a partir dos seguintes parâmetros associados à patogenicidade de *P. aeruginosa*: Biofilme (A), pioverdina (B), piocianina (C), sensibilidade ao H₂O₂ (D) e motilidade do tipo *swimming* (E), *swarming* (F) e *twitching* (G). A linha em cada gráfico representa a mediana dos valores para cada parâmetro.

A partir dos testes de virulência adotados, observou-se uma enorme variação fenotípica nos isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* (Fig. 14). Dessa forma, viu-se a necessidade de se realizar um agrupamento das amostras de acordo com suas características fenotípicas para que, posteriormente, fossem avaliadas na presença dos metabólitos de triptofano.

Inicialmente, adotou-se o sítio de isolamento das bactérias como estratégia de agrupamento das amostras. A partir de alguns parâmetros de virulência, os isolados clínicos de *P. aeruginosa* foram divididos em dois grupos: isolados de vias áreas e isolados de outros sítios que não vias áreas (Fig. 15). Optou-se por separar os isolados clínicos provenientes de vias aéreas dos demais sítios, uma vez que em nosso estudo utilizamos um modelo murino de infecção respiratória. Entretanto, não houve diferença significativa entre os dois grupos. O sítio de isolamento não foi determinante para distinguir-se diferentes agrupamentos fenotípicos quanto a virulência de *P. aeruginosa*, logo, não é adequado para a divisão das amostras.

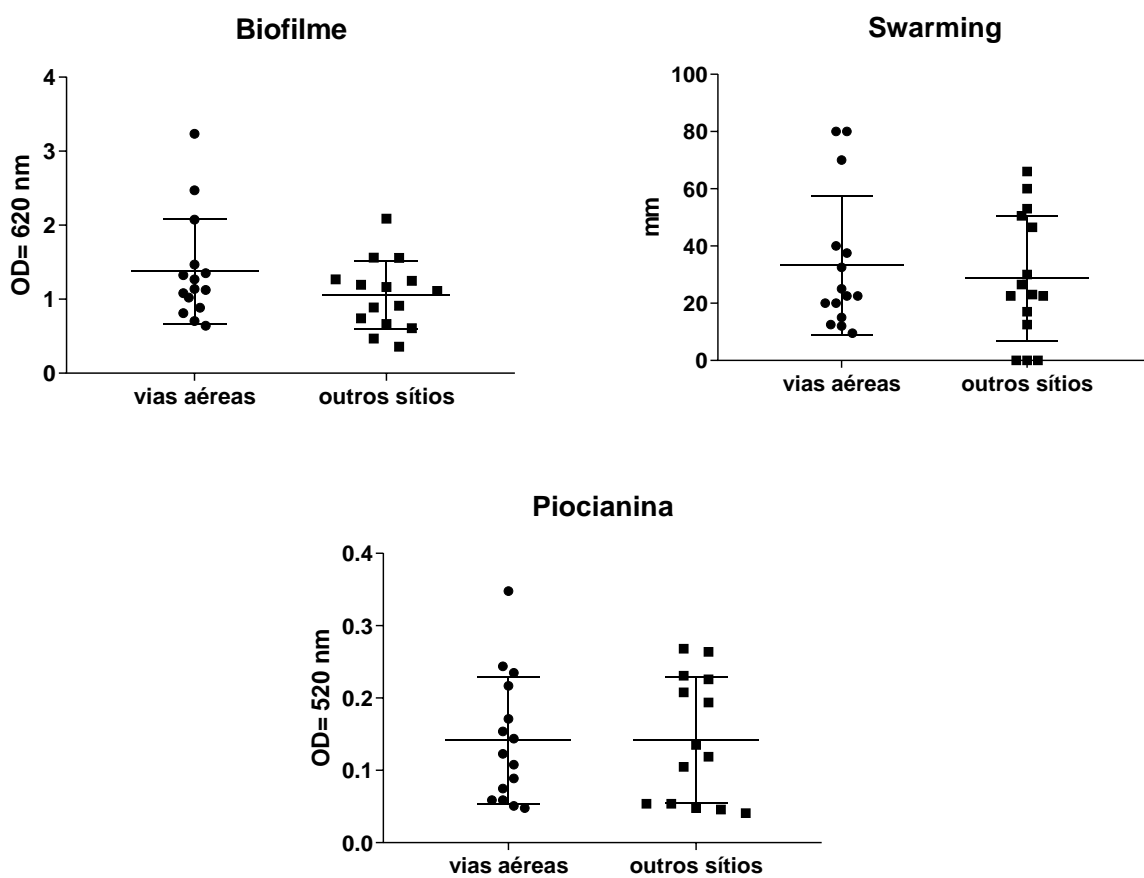


Figura 15- Agrupamento dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* quanto ao sítio de isolamento: As amostras foram divididas em isolados de vias aéreas e outros sítios que não vias aéreas.

Foi então realizada uma análise de correlação em entre os valores dos diferentes parâmetros, construindo-se um *heatmap* que permitiu o agrupamento dos isolados. A análise de correlação entre os parâmetros revelou que o biofilme, a produção de pioverdina e a sensibilidade ao H₂O₂ tendem a se agrupar (cluster azul). Observou-se que isolados clínicos de *P. aeruginosa* que produzem muito biofilme apresentam maior resistência ao H₂O₂ e requerem uma menor produção de sideróforos (pioverdina). Por outro lado, os diferentes padrões de motilidade agruparam-se com a piocianina (cluster rosa), revelando que a produção desse pigmento possa estar associada à bactéria no seu estado planctônico (Fig. 16).

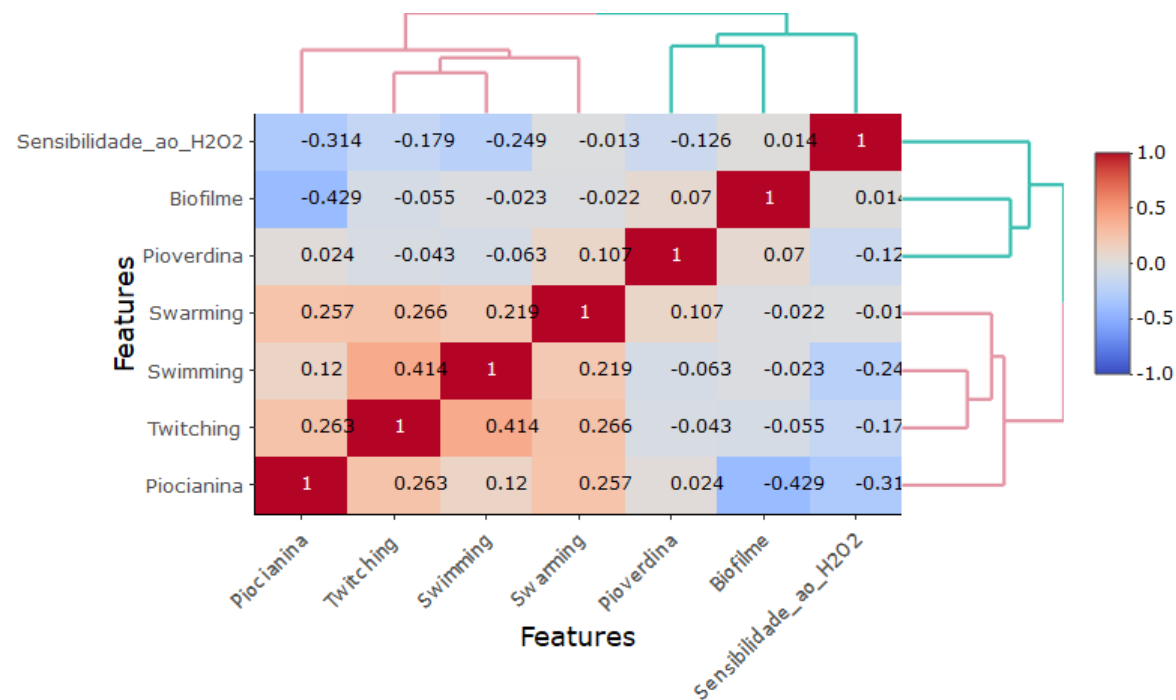


Figura 16- Mapa de correlação entre os parâmetros relacionados à virulência de *P. aeruginosa*: A variação de cor do azul (-1) ao vermelho (1) representa a correlação negativa ou positiva entre os parâmetros avaliados, respectivamente.

Com essas associações, foi possível agrupar os isolados em 6 clusters em uma escala de cor de acordo com as semelhanças quanto aos parâmetros avaliados (Fig. 17). A análise pelo *heatmap* identificou a motilidade do tipo *swimming* como o principal parâmetro divisor entre as amostras. Vale lembrar que o *swimming* está relacionado ao estilo de vida livre da bactéria e independe de *quorum sensing*. Em seguida, o isolado de *P. aeruginosa* que mais aproximou-se da mediana para um mesmo parâmetro entre as amostras de um mesmo cluster foi selecionado para avaliação do efeito do indol e do ácido indolacético (IAce) sobre o seu perfil de virulência.

A partir daqui, os isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* 21-0017 (cluster verde), 25-0061 (cluster amarelo), 02-0052 (cluster rosa), 11-0066 (cluster roxo), 16-0040 (cluster azul) e 12-0048 (cluster verde-claro) foram submetidos aos testes de biofilme, motilidade, piocianina, pioverdina e sensibilidade ao peróxido de hidrogênio na presença ou não dos metabólitos indol e IAce.

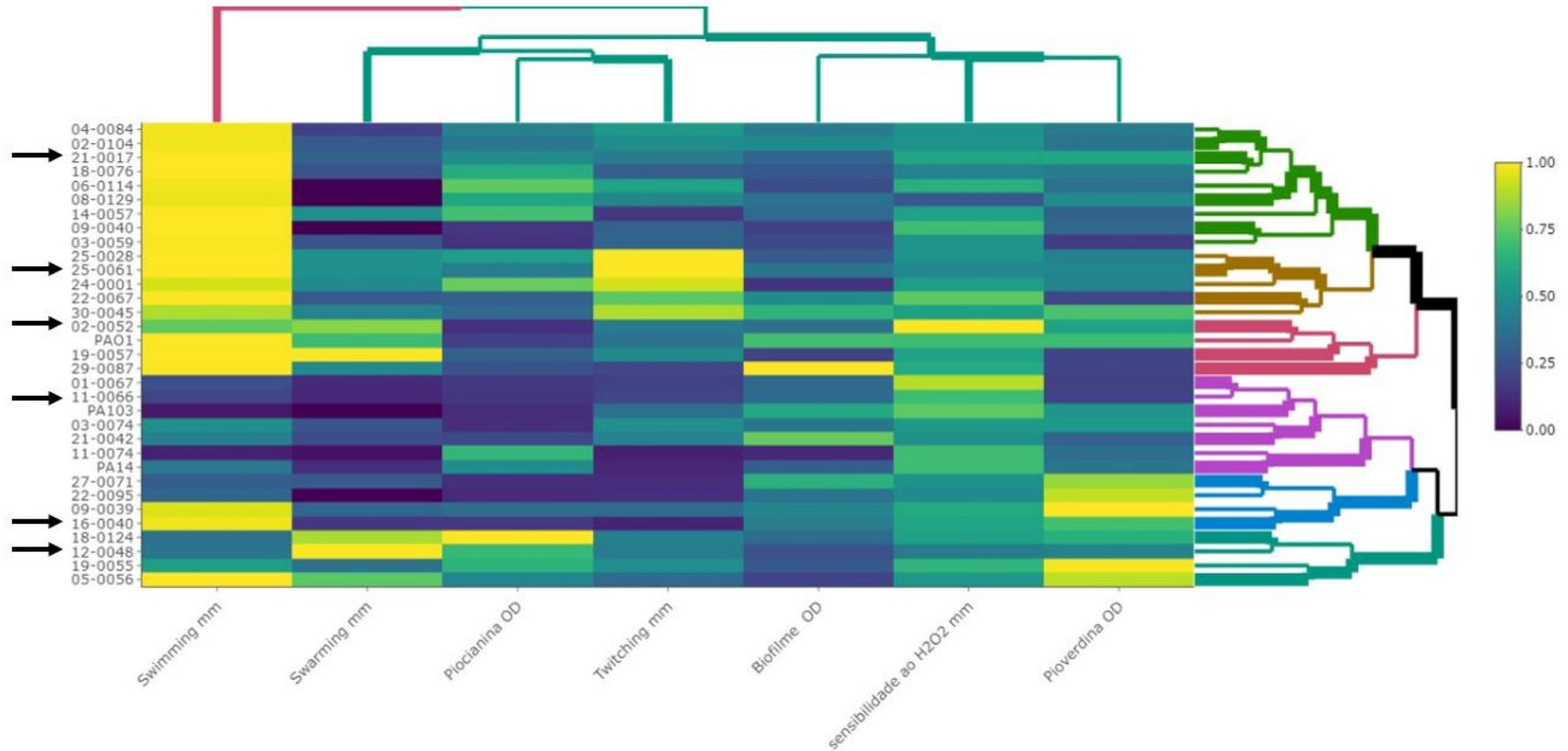


Figura 17- Heatmap e agrupamento fenotípico dos isolados clínicos de *P. aeruginosa*: Os isolados clínicos e as linhagens PAO1, PA103 e PA14 foram divididos em clusters de acordo com o fenótipo de virulência associado aos parâmetros *swimming*, *swarming*, *twitching*, *pilocianina*, *pioverdina*, *biofilme* e *sensibilidade ao H₂O₂*. A variação de cor do azul ao amarelo representa a menor e maior produção dos parâmetros avaliados, respectivamente.

5.6.2 Formação de biofilme

Assim como observado para a cepa PAO1 (Fig. 10), o indol e o IAce na concentração de 100 μ M aumentaram a formação de biofilme do isolado 11-0066. No entanto, o efeito foi bem menos pronunciado que aquele observado para PAO1. Por outro lado, os isolados 12-0048, 16-0040 e 21-0017 crescidos na presença dos metabólitos formaram menos biofilme em comparação aos isolados que receberam apenas o veículo. Não foi observado efeito significativo na formação de biofilme do isolado clínico 25-0061 (Fig. 18).

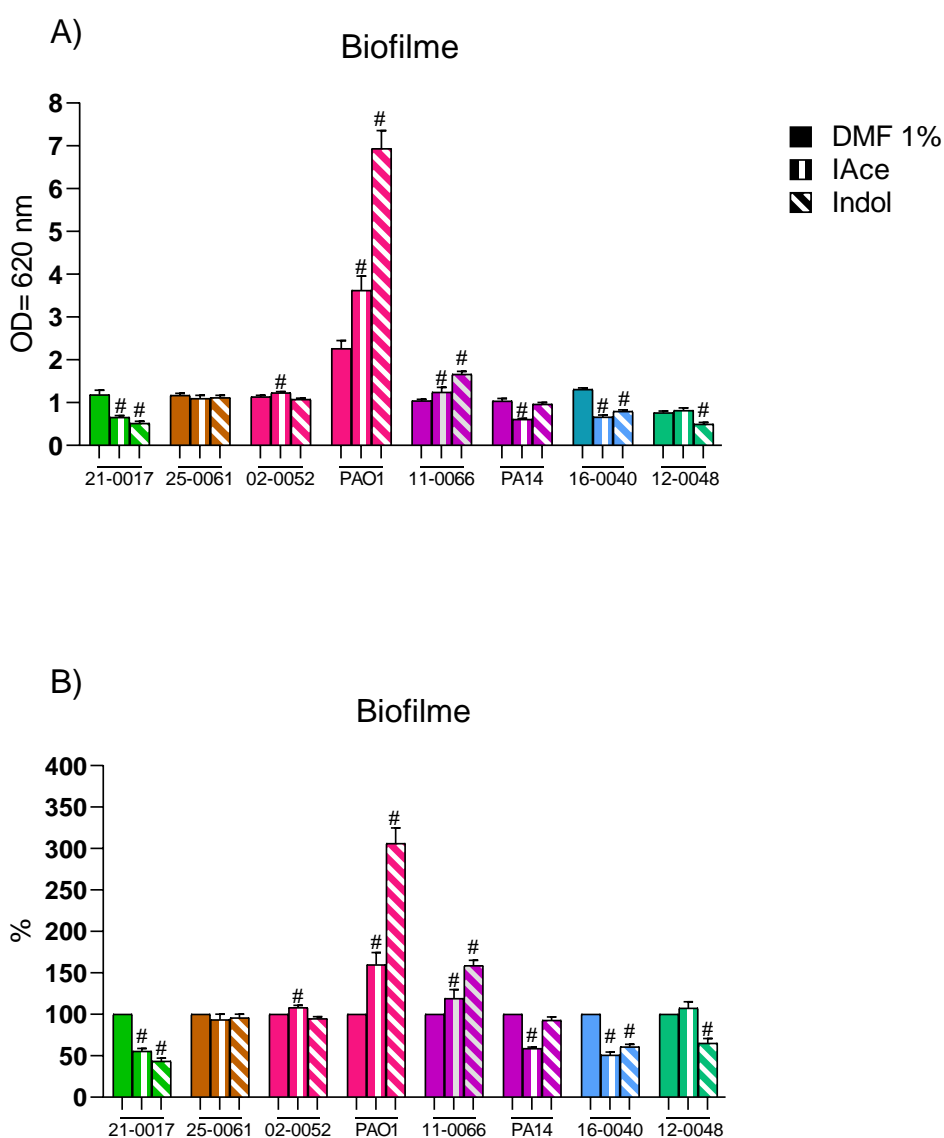
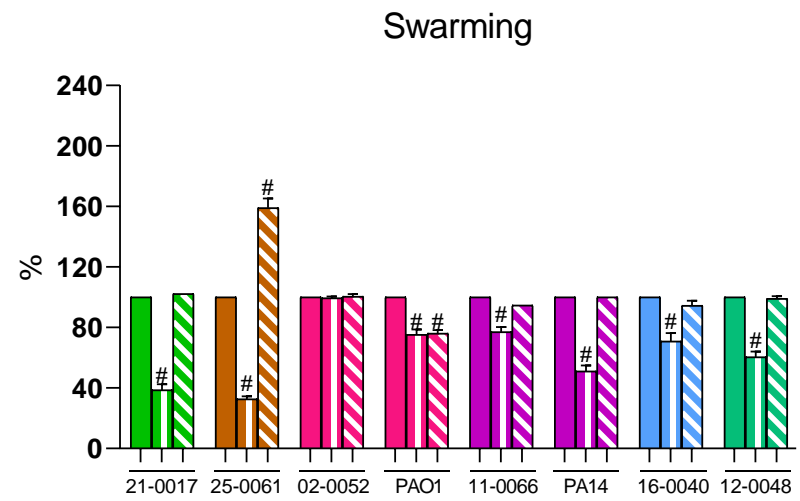
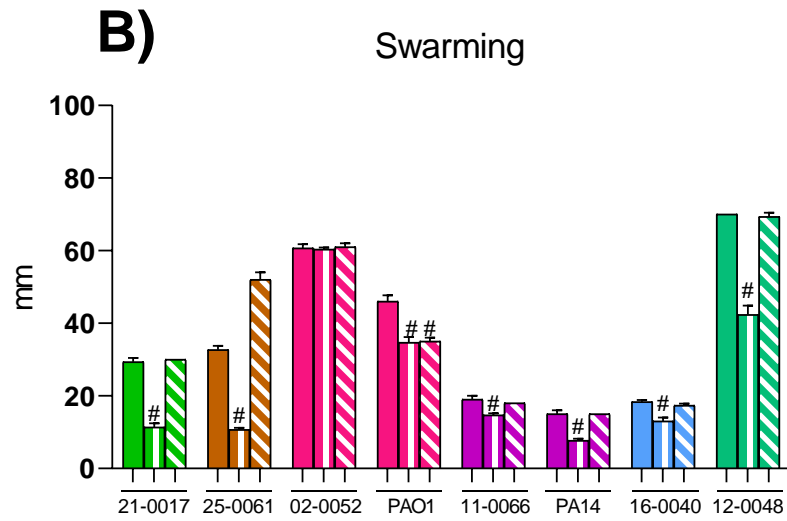
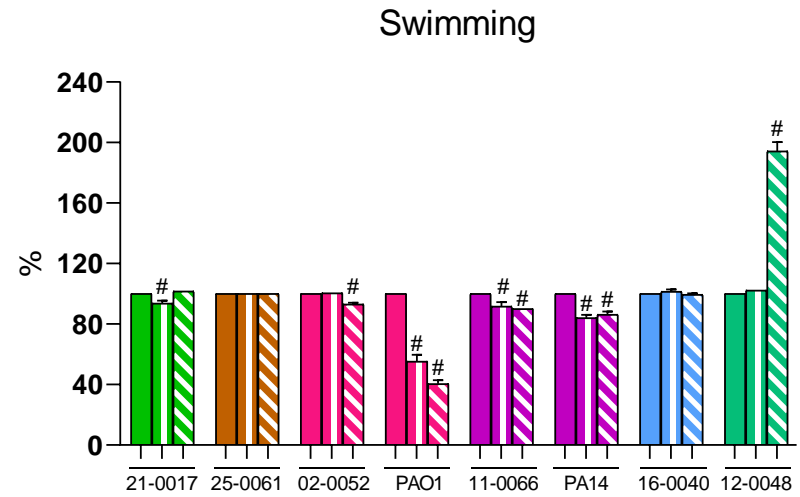
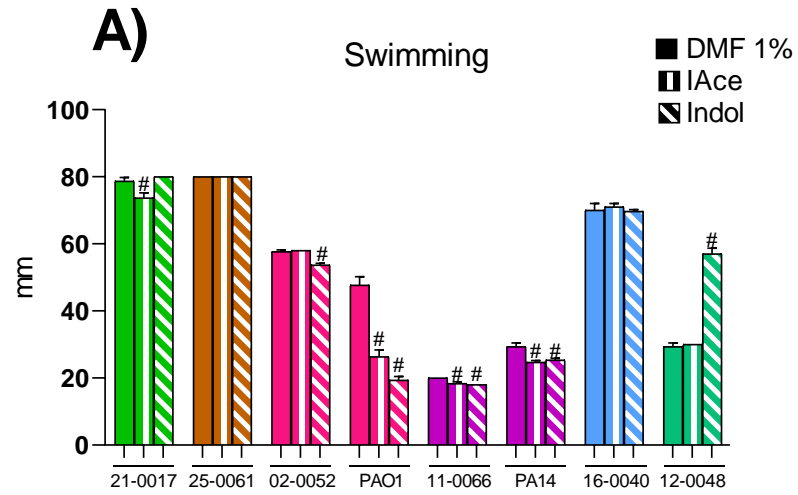


Figura 18- Efeito do indol e ácido indolacético sobre a formação de biofilme de isolados clínicos de *P. aeruginosa*: Os metabólitos de triptofano na concentração de 100 μ M apresentaram efeitos

distintos dependente do isolado estudado. Dados brutos expressos em densidade óptica (A) e em porcentagem (B). #P <0,05 vs DMF 1%.

5.6.3 Padrões de motilidade

O efeito do indol e IAce sobre a motilidade de *P. aeruginosa* também foi dependente do padrão de motilidade e isolado avaliado. O indol reduziu de forma discreta o *swimming* dos isolados 02-0052 e 11-0066 e aumentou o *swimming* e o *swarming* de 12-0048 e 25-0061, respectivamente. O IAce também foi capaz de reduzir o *swimming* dos isolados 11-0066 e 21-0017, porém mostrou efeito mais acentuado sobre o *swarming*, reduzindo de forma expressiva esse tipo de motilidade nos isolados clínicos de *P. aeruginosa*, excetuando-se o isolado 02-0052 (Fig. 19A-B). O efeito desses metabólitos sobre o *twitching* não foi observado em isolados com baixa expressão desse tipo de motilidade (11-0066 e 16-0040). Por outro lado, o indol e o IAce reduziram o *twitching* do isolado 21-0017 assim como em PAO1. O mesmo não aconteceu para os isolados 02-0062, 12-0048 e 25-0061 que tiveram o halo de motilidade aumentado em meio de motilidade suplementado com IAce (Fig. 19C).



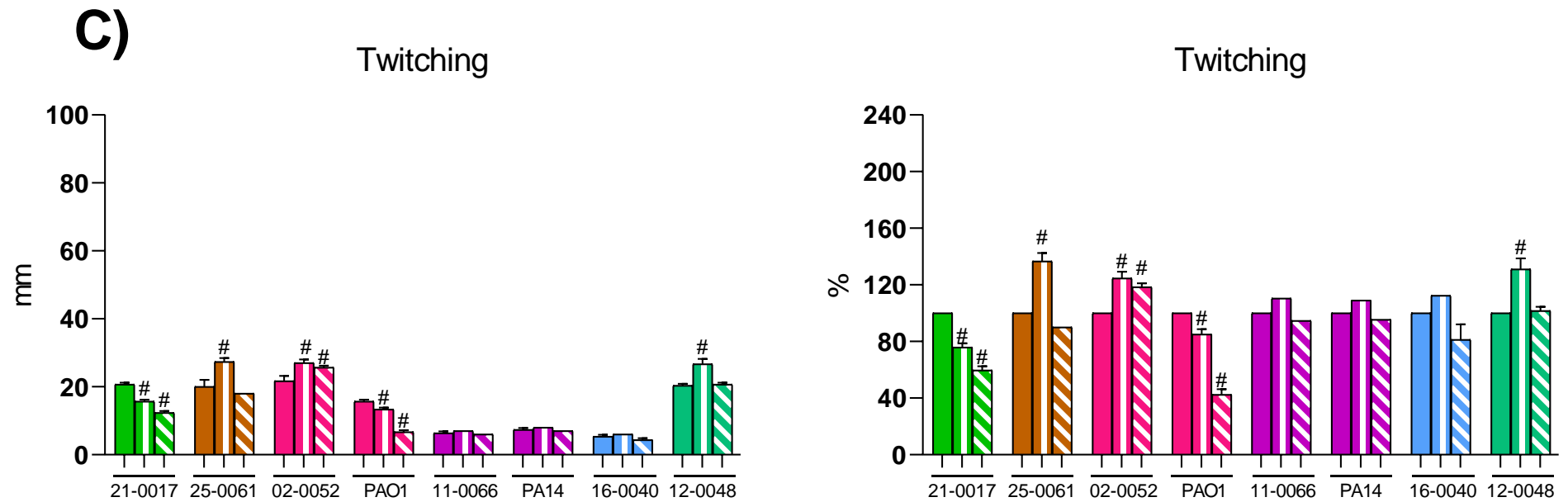


Figura 19- Efeito do indol e IAce sobre a motilidade de isolados clínicos de *P. aeruginosa*: O efeito do indol e IAce na concentração de 100 µM sobre as motilidades *swimming* (A), *swarming* (B) e *twitching* (C) de *P. aeruginosa* foi dependente do padrão de motilidade e isolado avaliado. Dados brutos expressos em milímetros e em porcentagem. #P < 0,05 vs DMF 1%.

5.9.4 Produção de pioverdina e piocianina

O indol e o IAce apresentaram efeitos inversos sobre a produção de pioverdina nos isolados 21-0017, enquanto o indol reduziu a produção do pigmento, o IAce tornou a bactéria mais apta a produzir o sideróforo pioverdina (Fig. 20A). O efeito do indol e IAce foi mais pronunciado sobre a produção de pioverdina do isolados 16-0040, no entanto esse mesmo efeito não foi observado sobre a piocianina (Fig. 20A-B). Quanto à produção de piocianina, indol e IAce reduziram o pigmento nos isolados 12-0048 e 21-0017, por outro lado a produção foi maior no isolado 25-0061 quando crescido na presença do indol (Fig. 20B). Nota-se mais uma vez que o efeito dos metabólitos é discreto em isolados com baixa expressão dos pigmentos.

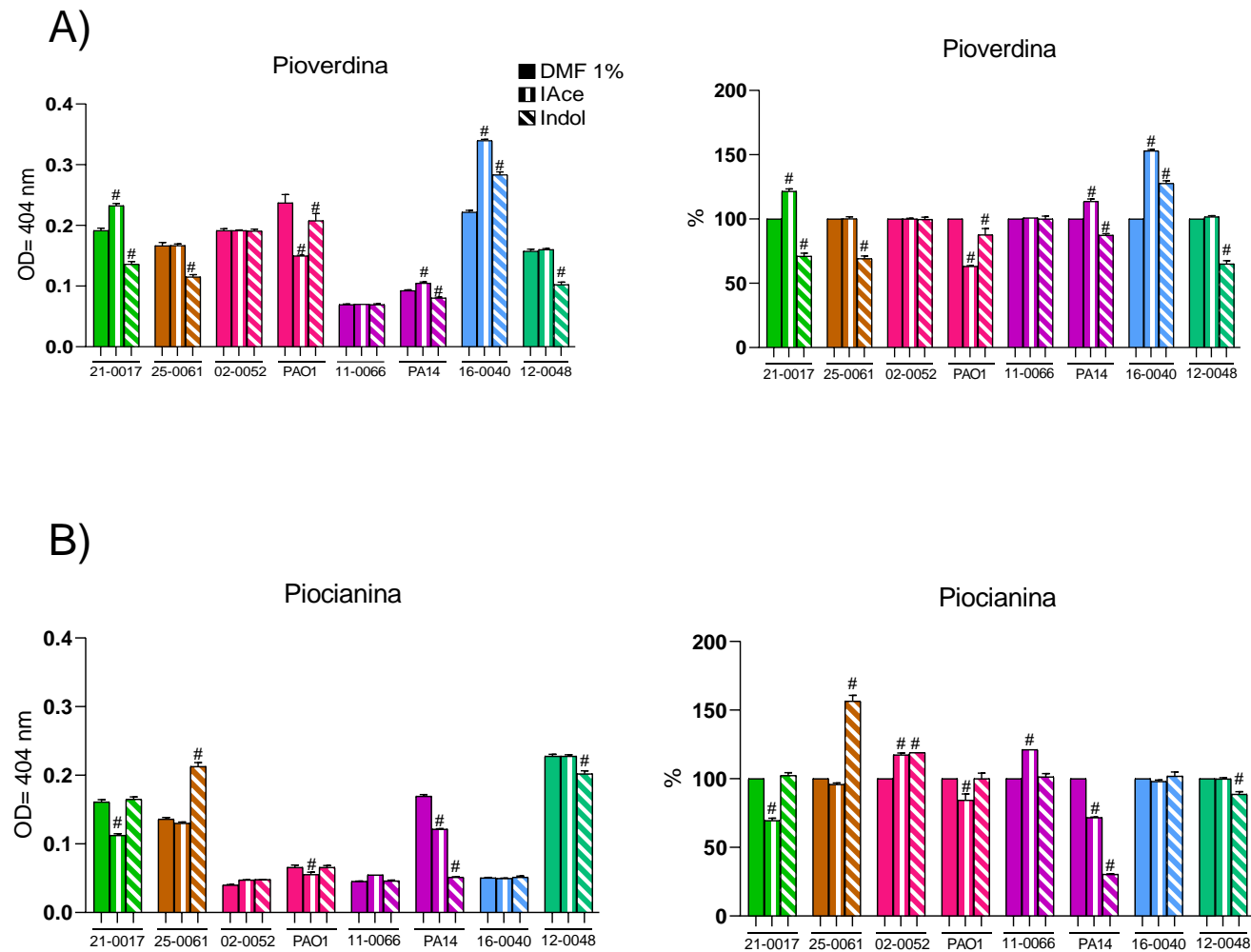


Figura 20- Efeito do indol e ácido indolacético sobre a produção de piocianina e pioverdina em isolados clínicos de *P. aeruginosa*: O efeito do indol e IAce na concentração de 100 μ M sobre a produção de pioverdina (A) e piocianina (B) em *P. aeruginosa* foi dependente do padrão de motilidade e isolado avaliado. Dados brutos expressos em densidade óptica e porcentagem. #P <0,05 vs DMF 1%.

5.6.5 Sensibilidade ao H₂O₂

O perfil de sensibilidade ao H₂O₂ observado para a cepa PAO1 também foi semelhante para os isolados clínicos. O indol e IAce foram capazes de tornar *P. aeruginosa* mais sensível à espécie reativa de oxigênio na grande maioria dos isolados. Apesar de apresentar o maior halo de sensibilidade entre as amostras avaliadas (50 mm), os metabólitos de triptofano não apresentaram efeito sobre o isolado 02-0052 (Fig. 21). Acredita-se que as limitações do teste não permitiram observar esse efeito.

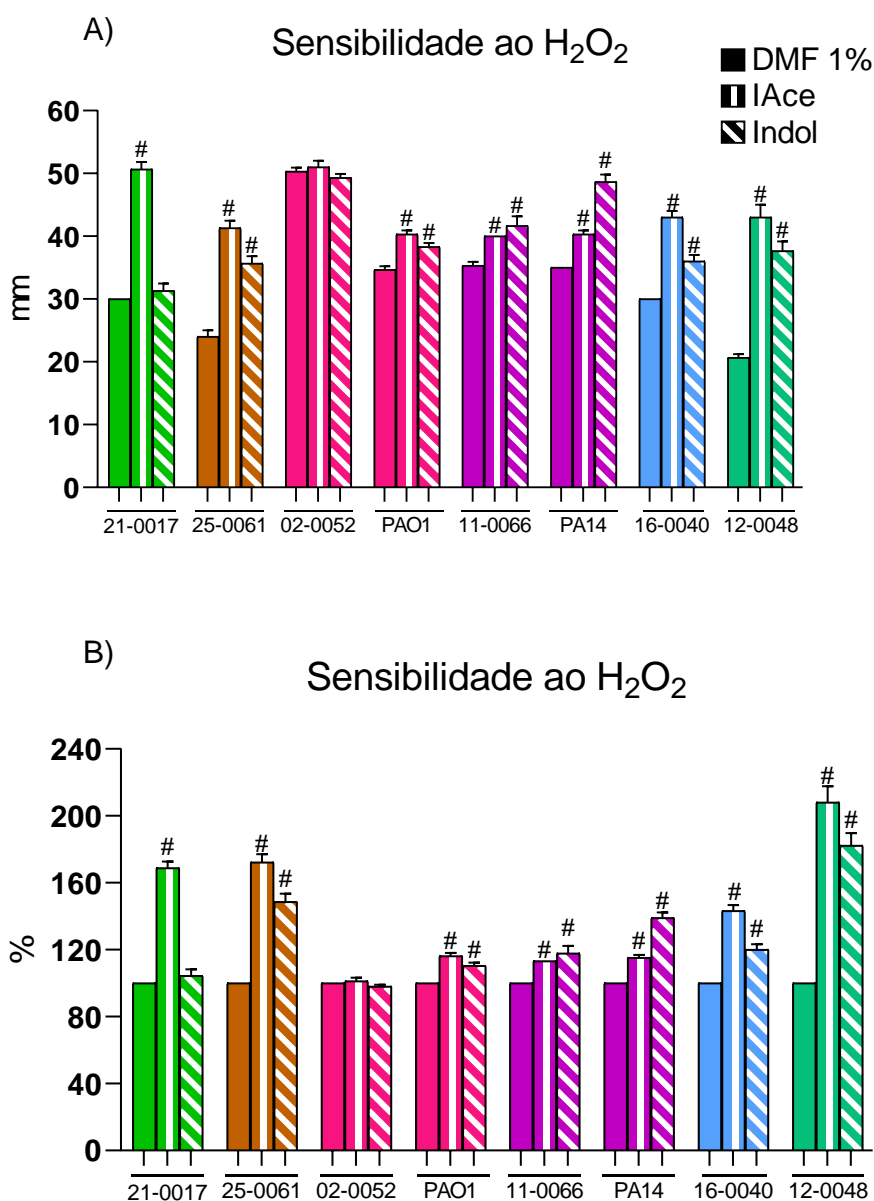


Figura 21- Efeito do indol e ácido indolacético sobre o perfil de sensibilidade ao H₂O₂ de isolados clínicos de *P. aeruginosa*: Os metabólitos de triptofano na concentração de 100 µM aumentaram o halo de inibição do crescimento ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 30% em isolados clínicos de *P. aeruginosa*. Dados brutos expressos em milímetros (A) e em porcentagem (B). #P <0,05 vs DMF 1%.

5.7 Taxas de fagocitose e *killing* da *P. aeruginosa*

A partir da análise em microscopia óptica, foi possível observar que o grupo tratado com indol apresentou um menor número de macrófagos com bactérias internalizadas. Enquanto PAO1 crescida na presença do veículo DMF 1% apresentou um índice de fagocitose de aproximadamente 80%, a bactéria que recebeu o indol durante o seu crescimento teve esse índice reduzido para 60% (Fig. 22A). Além disso, PAO1 crescida na presença do indol foi recuperada em menor quantidade do lisado de macrófagos após 30 minutos de incubação (Fig. 22B). Esse dado indica que o indol foi capaz de reduzir a taxa de fagocitose da *P. aeruginosa* por macrófagos murinos. A bactéria crescida na presença do indol foi recuperada em maior quantidade do lisado de macrófagos, o que significa que houve maior taxa de *killing* (Fig. 22C). Por outro lado, o IAce não interferiu nos índices de fagocitose da PAO1, porém, de forma surpreendente, a bactéria crescida na presença do IAce apresentou maior recuperação do lisado de macrófagos, o que significa que houve menor taxa de *killing* (Fig. 22C).

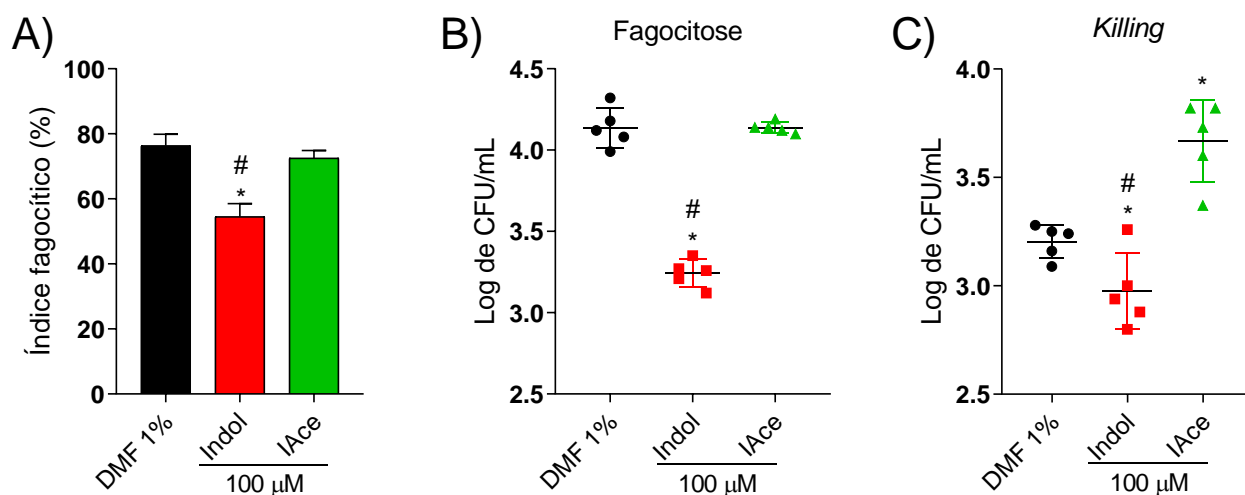


Figura 22- Taxas de fagocitose e *killing* da *P. aeruginosa* PAO1 por macrófagos murinos: Macrófagos derivados da medula óssea de camundongos C57BL/6 WT foram desafiados com *P. aeruginosa* crescida ou não na presença de metabólitos de triptofano por 30 minutos para fagocitose (A) e 75 minutos para o *killing* (B). O índice fagocítico também foi avaliado pela contagem dos fagócitos em microscopia óptica (C). Unidade Formadora de Colônia (UFC). *P <0,05 vs DMF 1%; #P <0,05 vs IAce

5.8 Infecção por *P. aeruginosa* em um modelo murino

Observou-se que os animais que receberam a PAO1 crescida na presença do veículo DMF sucumbiram a partir do 3º dia pós infecção. Os camundongos que foram infectados com a PAO1 crescida na presença do metabólito I Ace apresentaram maior percentual de sobrevivência após 5 dias de infecção. Por outro lado, os camundongos que receberam a bactéria crescida em meio de cultura suplementado com indol, apresentaram menor taxa de sobrevivência e 100% de letalidade com 4 dias pós infecção (Fig. 23B).

O perfil de letalidade acompanhou a perda de peso, visto que o grupo PAO1+IAce volta a ganhar peso a partir do segundo dia pós infecção, demonstrando um sinal de melhora nos camundongos pertencentes a esse grupo. Enquanto o grupo PAO1+Indol estende a perda de peso até o quarto dia de infecção no qual os animais sucumbem (Fig. 23A).

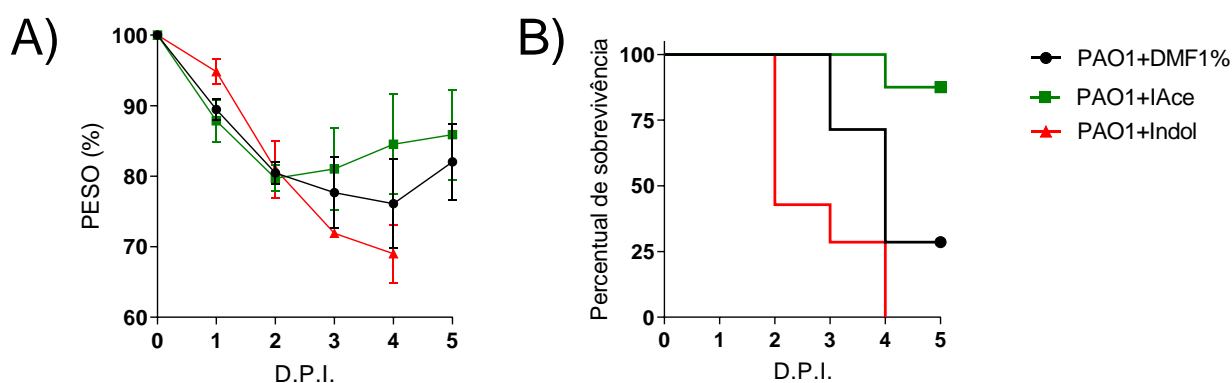


Figura 23- Peso e percentual de sobrevivência de camundongos infectados com *P. aeruginosa* PAO1: Camundongos C57BL/6 WT foram infectados com 10^7 UFC da linhagem PAO1 crescida ou não na presença dos metabólitos de triptofano via intranasal e foram acompanhados por 5 dias pós-infecção para avaliação do peso (A) e percentual de sobrevivência (B). Dias Pós-Infecção (DPI).

Após 24h de infecção, observou-se que camundongos infectados com PAO1 crescida na presença do metabólito I Ace, apresentaram maior carga bacteriana no lavado broncoalveolar em comparação a camundongos infectados com a bactéria crescida na presença do veículo DMF1% (Fig. 24A). Não houve diferença estatística da carga bacteriana no pulmão (Fig. 24B). Além disso, também não houve diferença

significativa nas análises de leucócitos total e diferencial e MPO entre os grupos tratados com os metabólitos e o grupo tratado apenas com o veículo (Fig. 24C-F).

Como podemos observar, animais submetidos a infecção com 10^7 UFC de PAO1 apresentam importante influxo de leucócitos para o espaço alveolar com 24 horas após a infecção, caracterizado principalmente por células do tipo polimorfonuclear. O recrutamento de células mononucleares não foi significativo nesse processo (Fig. 24 C-E).

De forma interessante, camundongos infectados com PAO1 crescida na presença do metabólito IAce, não apresentaram diferença estatística no influxo de células polimorfonucleares para o BAL e para o pulmão quando comparados com o grupo não infectado (Fig. 24E-F). Esses dados indicam que esse metabólito provoca alterações em *P. aeruginosa* a ponto de modificar a resposta inflamatória durante a infecção por esse patógeno a níveis comparáveis aos do hospedeiro não infectado.

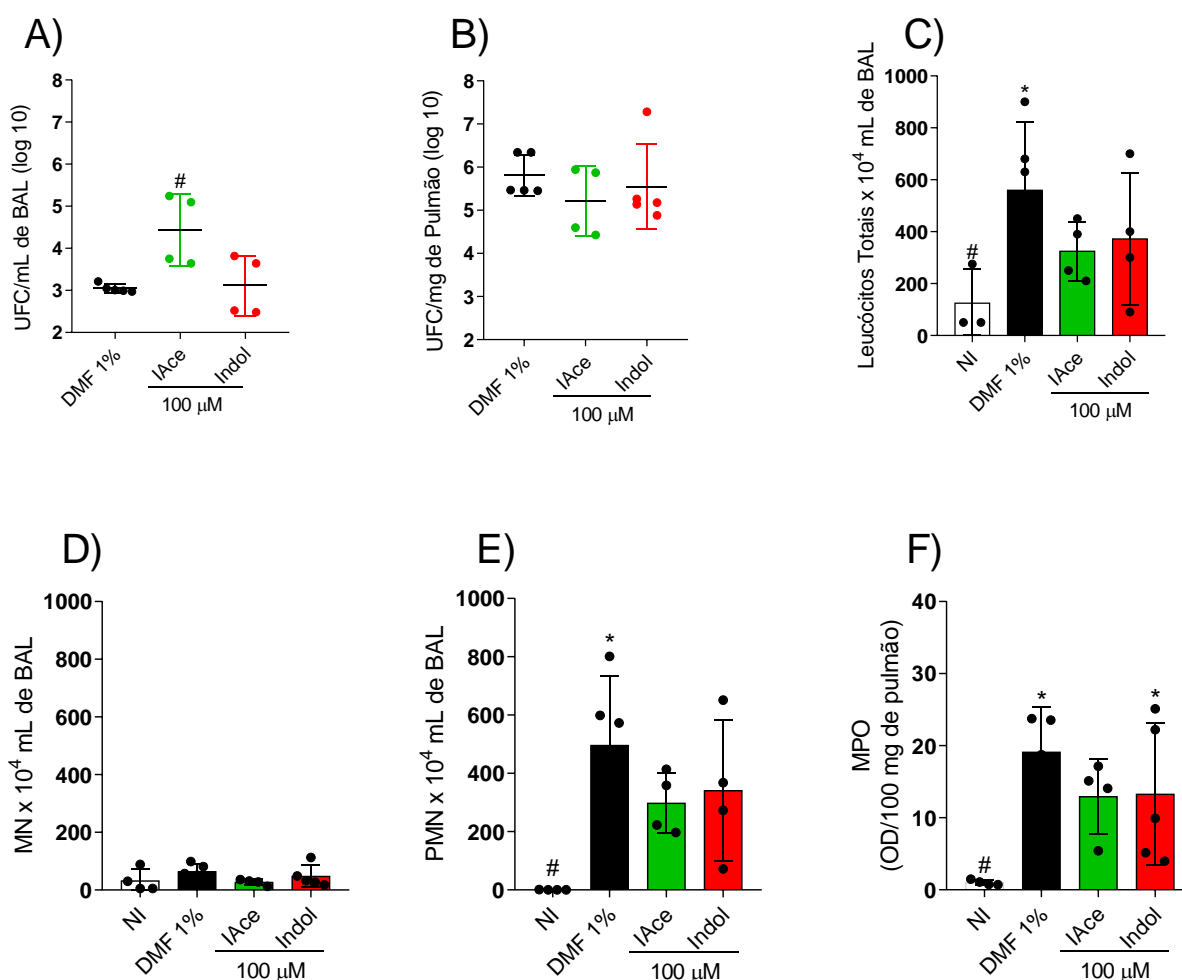


Figura 24- Infecção pulmonar por *P. aeruginosa* PAO1: Camundongos C57BL/6 WT foram infectados com 10^7 UFC da linhagem PAO1 crescida ou não na presença dos metabólitos de triptofano via intranasal. Após 24h de infecção os seguintes parâmetros foram analisados: carga bacteriana no BAL (A) e no pulmão (B), leucócitos totais (C), mononuclear (D), polimorfonuclear (E) e a atividade da MPO (F). Unidade Formadora de Colônia (UFC); Lavado Broncoalveolar (BAL); Mononuclear (MN); Polimorfonuclear (PMN); Mieloperoxidase (MPO). *P <0,05 vs NI ou #P <0,05 vs DMF 1%.

5.9 Expressão dos genes *pqsA* e *pvdS* relacionados a virulência em *P. aeruginosa*

Adotou-se o padrão de expressão do gene *housekeeping* 16S para normalizar os resultados da reação. Importante ressaltar que não houve diferença estatisticamente significativa na expressão do 16S entre a PAO1 crescida na presença do DMF 1% e crescida na presença dos metabólitos (dados não mostrados).

A partir das análises por qPCR, observou-se que o indol foi capaz de aumentar a expressão dos genes *pvdS* e *pqsA*. No entanto, essa mesma diferença não foi observada na PAO1 que recebeu o lAce (Fig. 25A e 25B).

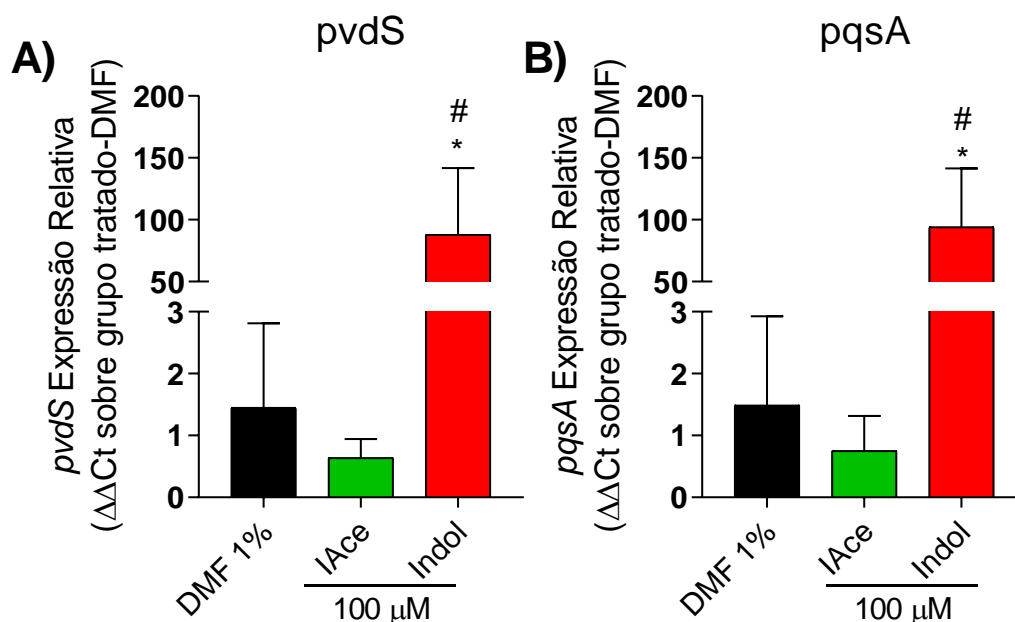


Figura 15- Efeito de metabólitos triptofano sobre a expressão de genes relacionados à virulência de *P. aeruginosa* PAO1: A atividade dos genes *pvdS* (A) e *pqsA* (B) foi avaliada na presença do indol e ácido indolacético a 100 μ M por qPCR. *P <0,05 vs DMF 1%; #P <0,05 vs lAce.

6 DISCUSSÃO

Pseudomonas aeruginosa é um microrganismo geneticamente complexo, o que faz com que ela apresente uma variedade de fatores de virulência (SUBEDI *et al.*, 2018). No presente trabalho foi avaliado o efeito de metabólitos provenientes do metabolismo do triptofano pela microbiota indígena sobre fatores relacionados à virulência de *P. aeruginosa*. Sabe-se que o metabolismo do triptofano está envolvido em diversas funções vitais ao organismo, como homeostase imunológica e a resposta inflamatória (LE FLOC'H *et al.*, 2011). Nesse sentido, a perturbação do metabolismo microbiano do triptofano pode estar associada ao desenvolvimento de diversas doenças de origem metabólica e infecciosa (SITKIN *et al.*, 2016).

O presente estudo iniciou-se a partir de um levantamento bibliográfico que demonstra o efeito do indol e do 7 hidróxi-indol sobre vários fatores de virulência controlados por QS em *P. aeruginosa* (LEE *et al.*, 2009). De acordo com Lee e colaboradores o indol reduz a produção de ramnolipídeos, PQS, pioverdina e aumenta a formação de biofilme, além de reduzir a colonização pulmonar da cepa PAO1 em cobaias. Nossos dados iniciais corroboram com esses resultados, uma vez que o indol foi capaz de reduzir os diferentes padrões de motilidade e estimular a formação de biofilme em *P. aeruginosa*.

Algumas bactérias que fazem parte da microbiota intestinal indígena, como *Escherichia coli* por exemplo, podem utilizar indol para competir contra *P. aeruginosa*, diminuindo a produção de seus sideróforos (pioverdina e pioquelina) e outros fatores de virulência (CHU *et al.*, 2012). Além disso, acredita-se que *P. aeruginosa* possa usar o indol para aumentar sua formação de biofilme no trato intestinal e escapar das defesas do hospedeiro; neste ponto, o patógeno oportunista regula os fatores de virulência com o indol para evitar a detecção até que uma densidade celular adequada seja alcançada (WILLIAMS, 2007). Nesse contexto, o indol é visto como uma molécula de sinalização interespecie e que desempenha papéis importantes na patogênese bacteriana e imunidade eucariótica (HYUNG LEE *et al.*, 2015).

A *P. aeruginosa* não produz indol, mas é capaz de degradar o metabólito ao longo do tempo. Lee e colaboradores demonstraram que após 7h de incubação de *P. aeruginosa* em meio de cultura contendo indol, a concentração do metabólito rezuiu

de 1 mM para 0,68 mM (LEE *et al.*, 2009). Os metabólitos de triptofano testados neste projeto não causaram a diminuição do crescimento da cepa PAO1, entretanto notou-se que a PAO1 crescida na presença dos metabólitos atinge a fase estacionária mais rapidamente, o que pode indicar que *P. aeruginosa* utiliza a degradação do anel indólico como fonte de carbono e energia para acelerar o seu crescimento em um efeito independente da concentração. De acordo com Lelong e colaboradores, o indol induz uma expressão prematura da proteína reguladora Crl, a qual aumenta a atividade da subunidade RpoS da RNA polimerase que controla a expressão de vários genes envolvidos na fase estacionária e em resposta a diferentes condições de estresse (LELONG *et al.*, 2007).

O efeito proeminente do indol e ácido indolacético sobre a formação de biofilme e motilidade de *P. aeruginosa* indica que esses metabólitos possam estar envolvidos na transição do estado móvel para o estado séssil em *P. aeruginosa*. A formação de biofilme bacteriano é frequentemente associada à redução do seu metabolismo, atividade do pili e flagelo e virulência. Sabe-se que linhagens bacterianas de pacientes com infecções crônicas, por exemplo, são comumente caracterizadas pela inativação do gene MucA, que codifica um regulador transcricional negativo que reprime as vias de estresse bacteriano. Isso resulta em uma conversão mucóide caracterizada pelo aumento da produção do polissacarídeo extracelular alginato que compõem o biofilme. Além disso, a inativação de MucA promove uma resposta ao estresse que reprime o metabolismo, a motilidade e a virulência bacteriana. Essa conversão mucóide está associada a um pior prognóstico em pacientes com Fibrose cística (FOLKESSON *et al.*, 2012). Já a regulação positiva do polissacarídeo Psl e a perda de flagelina e pili tipo IV também são comumente observadas e podem resultar em reconhecimento imunológico diminuído (CHANG *et al.*, 2007).

O biofilme bacteriano é uma importante estratégia de evasão a resposta imune do hospedeiro, especialmente o processo fagocítico (RASAMIRAVAKA *et al.*, 2015). Por outro lado, a presença do flagelo e pili tipo IV auxiliam na sinalização e reconhecimento do patógeno pelos fagócitos. Nesse sentido, o aumento do biofilme e redução da atividade flagelar justificam a redução do índice fagocítico de macrófagos murinos sobre a PAO1 crescida na presença do indol. Patankar e colaboradores relataram que a ativação do inflamassoma é reduzida em resposta a *P. aeruginosa* não móvel, além de induzir produção reduzida de IL-1, importante citocina pró-

inflamatória no controle da invasão bacteriana (PATANKAR *et al.*, 2013). Esses dados estão associados à dificuldade de eliminação da *P. aeruginosa* em infecções crônicas, nas quais assume esse fenótipo (FAURE *et al.*, 2018).

Diferentemente do *swimming* e *swarming* que tem participação do flagelo bacteriano, o *twitching* é mediado pelo pili TP4 (GELLATLY *et al.*, 2013). Os resultados descritos sobre os padrões de motilidade da *P. aeruginosa* revelam uma atividade reduzida dos metabólitos sobre a motilidade do tipo *twitching*. Isso sugere que metabólitos como o ácido indoláctico e indoxil-3-sulfato podem não exercer efeito sobre o pili de *P. aeruginosa*. A motilidade defeituosa reduz a capacidade de dispersão das bactérias e influenciam fortemente a morfologia do biofilme. O biofilme de bactérias não-móveis contém uma distribuição heterogênea de aglomerados bacterianos cujas posições são governadas pelos locais de fixação inicial, porque as bactérias não conseguem “rastejar” para longe dos locais de fixação (CONRAD *et al.*, 2011).

A produção de pioverdina e piocianina por *P. aeruginosa* constitui uma importante estratégia de sequestro de ferro e escape ao estresse oxidativo do hospedeiro. A expressão dos genes envolvidos na biossíntese de pioverdina é dependente do fator sigma pvdS e é secretada via sistema de secreção do tipo II (LEONI *et al.*, 2000). Nossos dados indicam que os metabólitos de triptofano são capazes de reduzir a produção desses pigmentos *in vitro*, entretanto não houve diminuição da expressão gênica de pvdS na presença dos metabólitos. Diante do efeito do IAc sobre o sistema de secreção de *P. aeruginosa* demonstrado por Shen e colaboradores, acreditamos que o efeito desse metabólito sobre a produção dos sideróforos e fenazinas possa ser a nível de secreção..

A baixa produção de piocianina e pioverdina é comumente observada em bactérias que formam muito biofilme, principalmente em infecções crônicas que o patógeno abre mão dessa estratégia para escapar do hospedeiro. A correlação entre os parâmetros de virulência corrobora com esses dados, visto que isolados clínicos que produzem muito biofilme apresentaram menor produção de pioverdina e maior resistência ao H₂O₂. De acordo com Banin e colaboradores, no meio com ferro suficiente, os mutantes que não podem obter ferro através da pioverdina formam biofilmes finos semelhantes aos formados em condições de baixo teor de ferro (BANIN *et al.*, 2005). O biofilme além de atuar como estratégia para o compartilhamento de genes e

nutrientes também é importante para a defesa contra os ataques do hospedeiro, incluindo o estresse oxidativo (HUI LI *et al.*, 2017).

Grande parte dos fatores associados a virulência de *P. aeruginosa* são regulados pelo sensor de quorum através das moléculas 3O-C12-HSL e C4-HSL e PQS, o que desperta o interesse pela busca por agentes anti-quórum (SCHUSTER *et al.*, 2003; WAGNER *et al.*, 2003). Assim como demonstrado por Lee e colaboradores, o indol parece reduzir a expressão de *pqsA*, gene que catalisa a formação de antraniloil-CoA, que é a etapa inicial para a entrada na via biossintética do sinal de quinolona de *Pseudomonas*. Isso indica que esse metabólito possa interferir na virulência de *P. aeruginosa* via sistema PQS. A regulação negativa de PqsA tem o potencial de atenuar a virulência de *P. aeruginosa* de três formas diferentes: limitando o sistema de *quorum-sensing* PQS; limitando a formação de biofilme, o que aumenta a suscetibilidade bacteriana a antimicrobianos e células do sistema imunológico; e atenuando a produção de pioverdina, o que interfere na homeostase geral do ferro no patógeno. No entanto, sabe-se que esses efeitos podem variar entre diferentes linhagens de *P. aeruginosa* (KANG *et al.*, 2018).

Além de coordenar a expressão de fatores de patogenicidade, o sistema PQS também atua na resposta ao estresse oxidativo do hospedeiro. De acordo com Haussler e colaboradores, linhagens não produtoras de PQS (*pqsA* e *pqsH* mutante) exibem uma resistência aumentada para H₂O₂ em comparação com o tipo selvagem. Esses resultados demonstram que a 4-quinolona PQS sensibiliza as bactérias para o estresse oxidativo (HAUSSLER *et al.*, 2008).

Sabe-se que as células polimorfonucleares são as principais células efetoras responsáveis pela eliminação de *P. aeruginosa* do local de infecção e uma estratégia de defesa bacteriana essencial de *P. aeruginosa* é a capacidade de resistir ao estresse oxidativo que é induzido durante a fagocitose (LAVOIE *et al.*, 2012). Nesse sentido, o sistema PQS funciona como um “treinador” celular cujo papel é mediar a seleção do mais apto e, conseqüentemente, moldar a estrutura populacional (HAUSSLER *et al.*, 2008). Logo, o aumento da sensibilidade ao H₂O₂ induzido pelos metabólitos de triptofano neste trabalho podem indicar uma possível ação sobre a via PQS e sua resposta ao estresse oxidativo. Em contrapartida, mesmo mais sensível ao H₂O₂, a bactéria tratada com I Ace foi mais resistente ao *killing* por macrófagos.

O efeito do indol e ácido indolacético sobre a virulência de *P. aeruginosa* também foi avaliado durante a infecção pulmonar em camundongos. Nesse modelo, destaca-se a maior carga bacteriana no BAL de animais que receberam a PAO1 crescida na presença do I Ace. De acordo com Shen e colaboradores, o I Ace é capaz de regular negativamente a expressão do sistema de secreção do tipo 3 em *P. aeruginosa* (SHEN *et al.*, 2008). Dessa forma, acreditamos que a redução da atividade do SST3 em *P. aeruginosa* crescida na presença do I Ace possa dificultar a difusão do patógeno para outros tecidos do hospedeiro, o que justifica seu acúmulo e maior carga bacteriana no BAL dos camundongos. Além disso, a maior carga bacteriana nesses animais pode ser secundária aos níveis reduzidos de morte por macrófagos demonstrados nos experimentos de fagocitose.

Além disso, camundongos C57BL/6 WT infectados com PAO1 crescida na presença do I Ace não apresentaram diferença significativa no influxo de células polimorfonucleares para o BAL e para o pulmão quando comparado com o grupo não infectado. Os neutrófilos são peças fundamentais para a eliminação da *P. aeruginosa*, uma vez que, no sítio infeccioso, realizarão a liberação de substâncias bactericidas como serina proteases e óxido nítrico além da eliminação da bactéria via fagocitose (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE *et al.*, 2015). Entretanto, é importante ressaltar que, apesar de necessário para o controle da carga bacteriana, o recrutamento de neutrófilos está intimamente relacionado com a lesão tecidual do sítio inflamatório (SOUZA *et al.*, 2004). A redução do número de neutrófilos durante a infecção por PAO1 crescida na presença do I Ace pode estar associada a menor lesão tecidual do hospedeiro. Nesse sentido, o perfil demonstrado em um modelo murino associado à redução da motilidade e pioverdina pode estar relacionado à menor letalidade dos camundongos infectados com a bactéria exposta a esse metabólito.

A capacidade de codificação aprimorada do genoma de *P. aeruginosa* permite grande versatilidade metabólica e alta adaptabilidade às mudanças ambientais, o que justifica sua enorme diversidade fenotípica (KLOCKGETHER *et al.*, 2011). Sabe-se que *P. aeruginosa* pode apresentar diferenças significativas da virulência de acordo com o tipo de infecção (aguda ou crônica), perfil do paciente e de sensibilidade aos antibacterianos. Dessa forma, os efeitos do indol e I Ace também foram distintos entre isolados clínicos e parâmetros analisados. Esses dados indicam que a diferença no

controle e expressão dos mecanismos de virulência em *P. aeruginosa* impactam na ação dos metabólitos.

Estudos de genômica populacional revelam extensa diversidade genética dentro dos isolados clínicos de *P. aeruginosa*, incluindo a coexistência de linhagens altamente divergentes adquiridas por transmissão paciente a paciente (KUMMERLI, 2015). As consequências clínicas não são totalmente compreendidas, porém, dada a extensa diversidade fenotípica, há implicações claras para falsos diagnósticos com base em testes de susceptibilidade antimicrobiana (WINSTANLEY *et al.*, 2016). Nesse contexto, o estudo em isolados clínicos é necessário devido à sua diversidade genotípica e de sítios de isolamento, logo, expandir a pesquisa além de linhagens laboratoriais é importante para o entendimento dos mecanismos de patogenicidade de *P. aeruginosa*.

Além disso, o efeito diversificado do indol e lAce em isolados clínicos pertencentes ao mesmo cluster do heatmap, revela que a forma de agrupamento das amostras ainda necessita ser aprimorada, tanto com a avaliação de outros parâmetros de virulência quanto novas formas de classificação. Nesse sentido, destaca-se a importância em realizar novas análises de caráter genético, bem como conhecer o perfil dos pacientes dos quais tais bactérias foram isoladas. Juntos, esses dados contribuirão para o entendimento da dinâmica de virulência da *P. aeruginosa* e novas estratégias para o desenvolvimento de terapias antivirulência.

7 CONCLUSÃO

Nossos dados sugerem que metabólitos provenientes do metabolismo do triptofano pela microbiota indígena são capazes de interferir no perfil de virulência da *Pseudomonas aeruginosa*. Inicialmente, indol e ácido indolacético (IAce) estão associados à mudança do estado planctônico para o estado sésil em PAO1.

Além disso, o presente trabalho demonstrou a enorme variedade de fenótipos de virulência em isolados clínicos de *P. aeruginosa*. Dessa forma, os efeitos do indol e IAce também foram distintos entre isolados clínicos e parâmetros analisados. Em geral, IAce apresentou um efeito anti-virulência mais expressivo em isolados clínicos que o indol. Nossas análises revelam que outras formas de agrupamento das amostras devem ser consideradas, bem como a avaliação gênica dos isolados.

As alterações na virulência da *P. aeruginosa* provocadas pelo IAce *in vitro* também foram demonstradas em um modelo de infecção pulmonar murino. Embora o IAce tenha aumentado a carga bacteriana no BAL dos animais, houve redução da resposta inflamatória para o sítio de infecção. Nesse contexto, o IAce apresentou efeito protetor em camundongos C57BL/6, cessando a perda de peso e reduzindo a taxa de letalidade.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNIHOTRI, N., GUPTA, V., JOSHI, R.M. Aerobic bacterial isolates from burn wound infections and their antibiograms—a five-year study. **Burns**. Volume 30, Issue 3, 2004.

AGUS A, PLANCHAIS J, SOKOL H; Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease. **Cell Host Microbe**. 2018 Jun 13;23(6):716-724.

ALCALDE-RICO, M., HERNANDO-AMADO, S., BLANCO, P., AND MARTÍNEZ, J. L. Multidrug efflux pumps at the crossroad between antibiotic resistance and bacterial virulence. **Front. Microbiol**. 7:1483, 2016.

ALEXEV EE, *et al.*; **Microbiota-Derived Tryptophan Metabolites Provide a Novel Pathway for Regulation of Mucosal Barrier Function**. The FASEB Journal. p.469.9-469.9 April 2017.

ALKHALAF LM, RYAN KS; Biosynthetic Manipulation of Tryptophan in Bacteria: Pathways and Mechanisms. **Chemistry & Biology**. V. 22, Issue 3, 2015.

ALLEN AP, HUTCH W, BORRE YE, KENNEDY PJ, TEMKO A, BOYLAN G, MURPHY E, CRYAN JF, DINAN TG, CLARKE G. Bifidobacterium longum 1714 as a translational psychobiotic: modulation of stress, electrophysiology and neurocognition in healthy volunteers. **Transl Psychiatry**, 6: e939, 2016

AMIEL E, LOVEWELL RR, *et al.*; *Pseudomonas aeruginosa* Evasion of Phagocytosis Is Mediated by Loss of Swimming Motility and Is Independent of Flagellum Expression. **Infect immunology**. 78(7): 2937–2945., 2010.

ARORA T, BACKHED F; The gut microbiota and metabolic disease: current understanding and future perspectives. **Journal of Internal Medicine**. 2016, vol. 280, no. 4, pp. 339– 349.

BÄCKHED F, ROSWALL J, PENG Y, *et al.*; Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. **Cell Host Microbe**. 2015 Jun 10;17(6):852.

BANIN, E. *et al.* Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. **PNAS**. 2, 102 (31), 11076-11081, 2005.

BANSAL T, ENGLERT D; Differential Effects of Epinephrine, Norepinephrine, and Indole on *Escherichia coli* O157:H7 Chemotaxis, Colonization, and Gene Expression. **Infection and Immunity**. Vol. 75, No. 9, p. 4597–4607, Sept. 2007.

BARDOEL BW, VAN DER ENT S, PEL MJ, TOMMASSEN J, PIETERSE CM, VAN KESSEL KP, VAN STRIJP JA. *Pseudomonas* evades immune recognition of flagellin in both mammals and plants. **PLoS Pathog**. 7: e1002206, 2011.

BARR HL, *et al.*; Pseudomonas aeruginosa quorum sensing molecules correlate with clinical status in cystic fibrosis. **Eur Respir J**. 2015, doi: 10.1183/09031936.00225214.

BÄUMLER AJ, SPERANDIO V; Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. **Nature**. 2016 Jul 7;535(7610):85-93.

BELIZÁRIO JE, FAINTUCH J, GARAY-MALPARTIDA M; Gut Microbiome Dysbiosis and Immunometabolism: New Frontiers for Treatment of Metabolic Diseases. **Mediators of Inflammation**. 2018 Dec; 2018:2037838.

BHAGIRATH AY, LI Y, PATIDAR R, *et al.*; Two Component Regulatory Systems and Antibiotic Resistance in Gram-Negative Pathogens. **Int J Mol Sci**. 2019 Apr 10;20(7).

BORTOLOTTI, P. *et al.* Tryptophan catabolism in Pseudomonas aeruginosa and potential for inter-kingdom relationship. *BMC microbiology*, v. 16, n. 1, p. 137, 2016.

BREIDENSTEIN, E.B., *et al.* Pseudomonas aeruginosa: all roads lead to resistance. **Trends Microbiol**. 19, pp.419-426, 2011.

BROWNE HP, NEVILLE BA, FORSTER SC, LAWLEY TD; Transmission of the gut microbiota: spreading of health. **Nat Rev Microbiol**. 2017 Sep;15(9):531-543.

BUDDEN KF, GELLATLY SL, *et al.*; Emerging pathogenic links between microbiota and the gut-lung axis. **Nature Review Microbiology**. 2017 Jan; 15(1):55-63; doi: 10.1038/nrmicro.2016.142.

CABOT, G., *et al.* Overexpression of AmpC and efflux pumps in Pseudomonas aeruginosa isolates from bloodstream infections: prevalence and impact on resistance in a Spanish multicenter study. **Antimicrob Agents Chemother**. 55, pp.1906-1911, 2011.

CHAUDHARY P, BHANDARI D, THAPA K, *et al.* Prevalence of Extended Spectrum Beta-Lactamase Producing Klebsiella Pneumoniae Isolated From Urinary Tract Infected Patients. **J Nepal Health Res Council** , 2016;14(33):111-115.

CHOI, Y., PARK, H. Y., PARK, S. J., PARK, S. J., *et al.* Growth phase-differential quorum sensing regulation of anthranilate metabolism in Pseudomonas aeruginosa. **Mol. Cells**. 32, 57–65, 2011.

CHU W., *et al.* Indole Production Promotes *Escherichia coli* Mixed-Culture Growth with *Pseudomonas aeruginosa* by Inhibiting Quorum Signaling. **Applied and Environmental Microbiology**. 78 (2), p. 411– 419, 2012.

CLARKE G, GRENHAM S, SCULLY P, *et al.*; The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. **Mol Psychiatry** 18, 666–673 (2013).

CONRAD, J.C., *et al.* Flagella and Pili-mediated near-surface single-cell motility mechanisms in *P. aeruginosa*. **Biophysical Journal**. v.100, issue 7, p1608-1616, 2011.

CORNELIS, P., DINGEMANS, J. *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. V. 3, article 75, nov. 2013.

CRYAN JF, *et al.*; The Microbiota-Gut-Brain. **Physiological Review**, 99: 1877–2013, 2019.

DONALDSON GP, LEE SM, MAZMANIAN SK; Gut biogeography of the bacterial microbiota. **Nature Reviews**. 2015, volume 14.

DRENKARD, E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect.* 5, pp.1213-1219, 2003.

FAO/WHO/UNU. Energy and Protein Requirements. Report of a joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. **Technical Report Series**, no. 724, World Health Organization, Geneva, Switzerland. 1985.

FAURE E, *et al.*, *Pseudomonas aeruginosa* in Chronic Lung Infections: How to Adapt Within the Host?. **Frontiers in Immunology**. V.9, article 2416, 2018.

FAZLI M, ALMBLAD H, RYBTKE ML, GIVSKOV M, EBERL L, TOLKER-NIELSEN T. Regulation of biofilm formation in *Pseudomonas* and *Burkholderia* species. **Environ Microbiol.** 16:1961–1981, 2014.

FENG, L., XIANG, Q., AI, Q., WANG, Z., ZHANG, Y., LU, Q. Effects of quorum sensing systems on regulatory T cells in catheter-related *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infection rat models. **Mediators Inflamm.** 2016:4012912., 2016.

FORBES JD, DOMSELAAR GV, BERNSTEIN CN; The Gut Microbiota in Immune-Mediated Inflammatory Diseases. **Frontiers in Microbiology**. 2016 Jul, 7:1081. doi: 10.3389/fmicb.2016.01081.

FURUKAWA, S., KUCHMA, S.L., O'TOOLE, G.A. Keeping Their Options Open: Acute versus Persistent Infections. **Journal of Bacteriology**. 188 (4) 1211-1217, 2006.

GALILI T., Dendextend: an R package for visualizing, adjusting and comparing trees of hierarchical clustering. **Bioinformatics**. 31 (22), 3718–3720, 2015.

GALILI T., *et al.*, heatmaply: an R package for creating interactive cluster heatmaps for online publishing. **Bioinformatics**. 34 (9), 1600–1602, 2018.

GARCÍA-CONTRERAS, R. Is quorum sensing interference a viable alternative to treat *Pseudomonas aeruginosa* infections? **Front. Microbiol.** 7:1454, 2016.

GELLATLY SL, HANCOCK REW. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. **Pathogens and disease**, v. 67, n. 3, p. 159-173, 2013.

GILBERT, K.B., KIM, T.H., GUPTA, R., GREENBERG, E.P., SCHUSTER, M. “Global position analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing transcription factor LasR”. **Molecular Microbiology**, vol. 73, no. 6, pp. 1072–1085, 2009.

GÓMEZ-HURTADO I, SANTACRUZ A, PEIRÓ G, ZAPATER P, GUTIÉRREZ A, PÉREZ-MATEO M, *et al.* Gut microbiota dysbiosis is associated with inflammation and bacterial translocation in mice with CCl₄-induced fibrosis. **PLoS ONE**. (2011) 6:e23037.

GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, CF *et al.*; Possible mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa*-associated lung disease. **International Journal of Medical Microbiology**, 2016. v. 306, n. 1, p. 20–28.

GUPTA, A. *et al.*, High Pyocyanin Production and Non-motility Correlate With Adverse Outcomes in *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia. **Open Forum Infectious Diseases**, Volume 2, Issue suppl_1, 872, 2015.

HEINTZ-BUSCHART A, WILMES P; Human Gut Microbiome: Function Matters. **Trends Microbiol.** 2018 Jul;26(7):563-574.

HIRSCH, E.B., TAM, V.H. Impact of Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. **Expert Ver Pharmacoecon Outcomes Res.** 10, pp.441-451, 2010.

HUBBARD, T. D.; MURRAY, I. A; PERDEW, G. H. Indole and Tryptophan Metabolism: Endogenous and Dietary Routes to Ah Receptor Activation. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 43, n. 10, p. 1522–1535, 2015.

HUBER P., BASSO P., REBOUD E., ATTRÉE I. *Pseudomonas aeruginosa* renews its virulence factors. **Environ. Microbiol.** Rep. 8, 564–571, 2016.

HUI-LI X, *et al.*, Anti-biofilm effects of anthranilate on a broad range of bacteria. **Scientific Reports.** 7: 8604 | DOI:10.1038/s41598-017-06540-1, 2017.

HUTTENHOWER C., GEVERS D., KNIGHT R., ABUBUCKER S., BADGER JH., CHINWALLA AT., *et al.* Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature.** 2012, 486, 207–214. doi: 10.1038/nature11234.

HYUNG LEE J, *et al.*, Roles of indole as an interspecies and interkingdom signaling molecule. **Trends. Microbiol.** Nov; 23(11):707-718, 2015

ISLAM KBMS, *et al.* Bile acid is a host factor that regulates the composition of the cecal microbiota in rats. **Gastroenterology.** 2011; 141:1773–1781. [PubMed: 21839040].

JIMENEZ, P. N., KOCH, G., THOMPSON, J. A., XAVIER, K. B., COOL, R. H., AND QUAX, W. J. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 76, 46–65, 2012.

KALUZNA-CZAPLINSKA J, *et al.*; How important is tryptophan in human health?. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition.** v. 59, 2019.

KESHAVAN ND, *et al.*; Messing with Bacterial Quorum Sensing. **MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS**, Vol. 70, No. 4 , Dec. 2006, p. 859–875.

KHAN N, MENDONCA L, DHARIWAL A, *et al.*; Intestinal dysbiosis compromises alveolar macrophage immunity to Mycobacterium tuberculosis. **Mucosal Immunol.** 2019 May;12(3):772-783.

KIM J, PARK W. Indole: a signaling molecule or a mere metabolic byproduct that alters bacterial physiology at a high concentration?. **J Microbiol.** 53, 421–428, 2015.

KIPNIS E, SAWA T, WIENER-KRONISH J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. **Med Mal Infect.** v.36, p.78–91, 2006.

KLOCKGETHER, J., CRAMER, N., WIEHLMANN, L., DAVENPORT, C.F., TUMMLER, B. *Pseudomonas aeruginosa* Genomic Structure and Diversity. **Front Microbiol.** 2, v. 150, 2011

KONINGS, A. F., MARTIN, L. W., SHARPLES, K. J., RODDAM, L. F., LATHAM, R., *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* uses multiple pathways to acquire iron during chronic infection in cystic fibrosis lungs. **Infect. Immun.** 81, 2697–2704, 2013.

KRISS M, HAZLETON KZ, NUSBACHER NM, MARTIN CG, LOZUPONE CA; Low diversity gut microbiota dysbiosis: drivers, functional implications and recovery. **Curr Opin Microbiol.** 2018 Aug; 44:34-40.

KUMAR A, SPERANDIO V; Indole Signaling at the Host-Microbiota-Pathogen Interface. **Host-Microbe Biology.** Volume 10, Issue 3, e01031-19, 2019.

KUMMERLI, R. Cheat invasion causes bacterial trait loss in lung infections. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 112, 10577–10578, 2015.

LAARMAN AJ, BARDOEL BW, RUYKEN M, FERNIE J, MILDER FJ, VAN STRIJP JA, ROOIJAKKERS SH. *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease blocks complement activation via the classical and lectin pathways. **J Immunol.** v.188, p.386–393, 2012.

LAMAS B, NATIVIDAD JM, SOKOL H. Aryl hydrocarbon receptor and intestinal immunity. **Mucosal Immunol.** 11, 1024–1038 (2018).

LAU, G.W. *et al.* The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. **TRENDS in Molecular Medicine** Vol.10 No.12 December, 2004.

LE FLOC'H N, OTTEN W, MERLOT E; Tryptophan metabolism, from nutrition to potential therapeutic applications. **Amino Acids**, 41, 1195–1205 (2011).

LEE J, *et al.*; Indole and 7-hydroxyindole diminish *Pseudomonas aeruginosa* virulence. **Microbial Biotechnology.** 2(1), 75–90, 2009.

LEE J, JAYARAMAN A, WOOD TK; Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA. **BMC Microbiol.** 7, 42 (2007).

LEE JH, WOOD TK; Roles of indole as an interspecies and interkingdom signaling molecule. **Trends in Microbiology**. v. 23, issue 11, p707-718, november, 2015.

LEE, J., ZHANG, L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. **Protein Cell**. 6(1):26–41, 2015.

LEONI L, *et al.*, Functional analysis of PvdS, an iron starvation sigma factor of *Pseudomonas aeruginosa*. **J Bacteriol**. Mar; 182(6):1481-91, 2000.

LEVY M, KOLODZIEJCZYK AA, THAISS CA, ELINAV E; Dysbiosis and the immune system. **Nature Review Immunology**. 2017 Apr; 17(4):219-232, doi: 10.1038/nri.2017.7.

LI Z, QUAN G, JIANG X, *et al.*; Effects of Metabolites Derived From Gut Microbiota and Hosts on Pathogens. **Front Cell Infect Microbiol**. 2018 Sep 14; 8:314.

LIN L, ZHANG J; Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases. **BMC Immunology**. 2017, 18:2 DOI 10.1186/s12865-016-0187-3.

MAHOWALD MA, *et al.*; Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 2009 Apr 7;106(14):5859-64.

MALHOTRA S, DON HAYES JR., WOZNIAK DJ; Cystic Fibrosis and *Pseudomonas aeruginosa*: The Host-Microbe Interface. **Clin Microbiol Rev**. 2019, 32:e00138-18.

MANN, E.E., WOZNIAK, D.J. "Pseudomonas biofilm matrix composition and niche biology," **FEMS Microbiology Reviews**. vol. 36, no. 4, pp. 893–916, 2012.

MARTIN, L. W., REID, D. W., SHARPLES, K. J., AND LAMONT, I. L. *Pseudomonas* siderophores in the sputum of patients with cystic fibrosis. **Biomaterials**. 24, 1059–1067, 2011.

MASAK J, ČEJKOVA A, SCHREIBEROVA O, REZANKA T. *Pseudomonas* biofilms: possibilities of their control. **FEMS Microbiol Ecol**; 89:1–14, 2014.

MAURICE, N.M., *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Host Response and Clinical Implications in Lung Infections. **Am J Respir Cell Mol Biol**. Vol 58, Iss 4, pp 428–439, Apr 2018.

MELANDER RJ, *et al.*; Controlling bacterial behavior with indole-containing natural products and derivatives. **Tetrahedron**. 16; 70(37): 6363–6372, sep. 2014.

MIAO EA, ANDERSEN-NISSEN E, WARREN SE, ADEREM A. TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system. **Semin Immunopathol**. 29, 275–288, 2007.

MORADALI MF, GHODS S, REHM BH; *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. **Front Cell Infect Microbiol**. 2017 Feb 15;7:39.

MULCAHY LR, ISABELLA VM, LEWIS K. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. **Microb Ecol**; 68:1–12, 2014.

NELSON, L. K., D'AMOURS, G. H., SPROULE-WILLOUGHBY, K. M., *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems are important for infection and inflammation in a rat prostatitis model. **Microbiology**. 155(Pt 8), 2612–2619, 2009.

OGUNRINOLA GA, OYEWALE JO, OSHAMIKA OO, OLASEHINDE GI; The Human Microbiome and Its Impacts on Health. **International Journal of Microbiology**. 2020 Jun; Volume 2020, Article ID 8045646.

PALMER, G.C., *et al.* The role of two *Pseudomonas aeruginosa* anthranilate synthases in tryptophan and quorum signal production. **Microbiology**. v159, p959–969, 2013.

PANG, Z. *et al.*, Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. **Biotechnology Advances**. Volume 37, Issue 1, Pages 177-192, 2019.

PAPENFORT K, BASSLER BL; Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. **Nat Rev Microbiol**. 2016 Aug 11;14(9):576-88.

PATANKAR, Y.R., *et al.*, Flagellar Motility Is a Key Determinant of the Magnitude of the Inflammasome Response to *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and Immunity**. v.81, n.6, p.2043-2052, 2013.

PIRES DE MELO, M. *et al.* Effect of Indole Acetic Acid on Oxygen Metabolism in Cultured Rat Neutrophil. **Gen. Pharmac**. Vol. 31, No. 4, pp. 573–578, 1998.

RASAMIRAVAKA, T., *et al.* The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. **BioMed Research International**. V.2015, Article ID 759348, 17 pages, 2015.

REZAIIE P, POURHAJIBAGHER M, CHINIFORUSH N, HOSSEINI N, BAHADOR A. The effect of quorum-sensing and efflux pumps interactions in *Pseudomonas aeruginosa* against photooxidative stress. **J Lasers Med Sci**. 9(3):161-167, 2018.

SADIKOT, R. T., BLACKWELL, T. S., CHRISTMAN, J. W. & PRINCE, A. S. Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **Am. J. Respir. Crit. Care Med**. 171, 1209–1223, 2005.

SAKURAGI, Y., KOLTER, R. “Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (*pel*) of *Pseudomonas aeruginosa*,” **Journal of Bacteriology**, vol. 189, no. 14, pp. 5383–5386, 2007

SCOFFONE VC, TRESPIDI G, CHIARELLI LR, *et al.*; Quorum Sensing as Antivirulence Target in Cystic Fibrosis Pathogens. **Int. J. Mol. Sci**. 2019, 20, 1838.

SHEN, D., *et al.* High-cell-density regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system: implications for tryptophan catabolites. **Microbiology society**. v. 154, i.8, 2008.

SHREINER AB, *et al.*; The gut microbiome in health and in disease. **Current Opinion in Gastroenterology**. January 2015 - Volume 31 - Issue 1 - p 69-75.

SITKIN SI, *et al.*, Metabolic dysbiosis of the gut microbiota and its biomarkers. **Eksp Klin Gastroenterol**. Jul; 12(12):6-29, 2016.

SONNENBURG ED, SONNENBURG JL; The ancestral and industrialized gut microbiota and implications for human health. **Nature Reviews Microbiology**. 2019 Jun;17(6):383-390.

SUBEDI, D., *et al.* Overviews of mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: na ocular perspective. **Clin Exp Optom**. 101, pp.162-171, 2018.

SUN, S., ZHOU, L., JIN, K., JIANG, H., AND HE, Y. W. Quorum sensing systems differentially regulate the production of phenazine-1-carboxylic acid in the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* PA1201. **Sci. Rep.** 6:30352, 2016.

TALEB, S. Tryptophan Dietary Impacts Gut Barrier and Metabolic Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. September, p. 1–7, 2019.

TOLKER-NIELSEN T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: from molecular biofilm biology to new treatment possibilities. **APMIS Suppl.** (138):1–51, 2014.

TURNER KH, EVERETT J, TRIVEDI U, RUMBAUGH KP, WHITELEY M. Requirements for *Pseudomonas aeruginosa* Acute Burn and Chronic Surgical Wound Infection. **PLoS Genet.** 10(7): e1004518, 2014.

VINCKX T, WEI Q, MATTHIJS S, CORNELIS P. The *Pseudomonas aeruginosa* oxidative stress regulator OxyR influences production of pyocyanin and rhamnolipids: protective role of pyocyanin. **Microbiology**. 156: 678–686, 2010.

VISCA, P., IMPERI, F., AND LAMONT, I. L. Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. **Trends Microbiol.** 15, 22–30, 2007

WANG C, LI Q , REN J; Microbiota-Immune Interaction in the Pathogenesis of Gut-Derived Infection. **Frontiers Immunology**. 2019, 10:1873. doi: 10.3389/fimmu.2019.01873.

WINSTANLEY C, *et al.*, *Pseudomonas aeruginosa* Evolutionary Adaptation and Diversification in Cystic Fibrosis Chronic Lung Infections. **Trends in Microbiology**, Vol. 24, No. 5, May 2016.

WOLTER, D.J., LISTER, P.D. Mechanisms of beta-lactam resistance among *Pseudomonas aeruginosa*. **Curr Pharm Des.** 19, pp.209-222, 2013.

YANO JM, YU K, *et al.*; Indigenous Bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. **Cell**. v. 161, issue 2, p264-276, april 2015.

ZELANTE T, IANNITTI RG, CUNHA C, DE LUCA A, GIOVANNINI G, *et al.* Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. **Immunity**. 2013;39(2):372–38.

ZHANG D, FRENETTE PS; Cross talk between neutrophils and the microbiota. **Blood**. 2019 May 16;133(20):2168-2177.

ZHANG LS, DAVIES SS; Microbial metabolism of dietary components to bioactive metabolites: opportunities for new therapeutic interventions. **Genome Medicine**. 8:46, 2016.