

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

Camila Bernardo de Brito

**Papel da Microbiota Disbiótica no Metabolismo de Triptofano pelo Hospedeiro  
e seu Impacto na Infecção Pulmonar por *Pseudomonas aeruginosa***

Belo Horizonte

2022

Camila Bernardo de Brito

**Papel da Microbiota Disbiótica no Metabolismo de Triptofano pelo Hospedeiro  
e seu Impacto na Infecção Pulmonar por *Pseudomonas aeruginosa***

Versão final

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

Orientador: Profa. Dra. Danielle da Glória de Souza.

Coorientador: Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes

Belo Horizonte

2022

043

Brito, Camila Bernardo de.

Papel da microbiota disbiótica no metabolismo de triptofano pelo hospedeiro e seu impacto na infecção pulmonar por *Pseudomonas aeruginosa* [manuscrito] / Camila Bernardo de Brito. – 2022.

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

Orientação: Profa. Dra. Danielle da Glória de Souza. Coorientação: Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes.

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

1. Microbiologia. 2. Microbiota. 3. Inflamação. 4. Triptofano. 5. Pneumonia. 6. *Pseudomonas aeruginosa*. I. Souza, Danielle da Glória de. II. Fagundes, Caio Tavares. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



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

### ATA DE DEFESA DE TESE

#### ATA DA DEFESA DE TESE DE CAMILA BERNARDO DE BRITO

Nº REGISTRO: 2017773225

Às 09:00 horas do dia **27 de abril de 2022**, reuniu-se remotamente, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Daniel de Assis Santos (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Marco Aurélio Ramirez Vinolo (UNICAMP), Luciana Pádua Tavares (Harvard Medical School), Lirlândia Pires de Souza (UFMG), a Profa. Dra. Daniele da Glória de Souza – Orientadora e o Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes, para julgar o trabalho final **“Papel da Microbiota Disbiótica no Metabolismo de Triptofano pelo Hospedeiro e seu Impacto na Infecção Pulmonar por *Pseudomonas aeruginosa*.”**, da aluna **Camila Bernardo de Brito**, requisito final para a obtenção do Grau de **DOUTORA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Dra. Daniele da Glória de Souza, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da tese ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 27 de abril de 2022.

Membros da Banca:

Prof. Dr. Daniel de Assis Santos

Dr. Marco Aurélio Ramirez Vinolo

Dra. Luciana Pádua Tavares

Dra. Lirlândia Pires de Souza

De acordo:

Profa. Dra. Daniele da Glória de Souza

(Orientador)

Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes

(Coorientador)

Profa. Dra. Erna Geessien Kroon

(Decana do Departamento de Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Padua Tavares, Usuário Externo**, em 28/04/2022, às 13:09, 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 **Marco Aurélio Ramirez Vinolo, Usuário Externo**, em 28/04/2022, às 15:10, 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 28/04/2022, às 16:12, 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 **Daniel de Assis Santos, Professor do Magistério Superior**, em 29/04/2022, às 08:04, 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 Gloria de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 29/04/2022, às 11:51, 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 **Lirlandia Pires de Sousa, Professora do Magistério Superior**, em 02/05/2022, às 16:14, 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 **Erna Geessien Kroon, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 03/05/2022, às 08:05, 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](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1415921** e o código CRC **2FA006F5**.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de fazer um agradecimento para todas as pessoas que, de alguma forma, participaram da construção dessa tese.

Primeiramente agradeço à minha mãe e aos meus irmãos por todo apoio durante este período. Obrigada por acreditarem em mim! Sem vocês isso não seria possível. Essa vitória é nossa!

Aos meu cunhados e sobrinho por toda a paciência durante este período.

Ao meu namorado Rafael, que foi um companheiro maravilhoso nesses últimos meses, muito obrigada por todo o apoio e compreensão!

Aos meus orientadores Dani e Caio, por todos os ensinamentos. Vocês me inspiram! Foram 9 anos de muito aprendizado. Muito obrigada por todas as oportunidades, conversas científicas e pessoais. Sou muito grata por ter sido formada por pesquisadores tão competentes.

À Raquel, Zélia e Renata por toda amizade e companheirismo. Pelas parcerias nos experimentos e na vida. Nossas conversas tornaram tudo mais leve. Posso dizer que durante essa jornada ganhei amigas para a vida.

À Raquel por todo apoio pessoal e científico. Tenho certeza que nossas conversas científicas me tornaram uma cientista melhor. Você tem uma participação imensa na elaboração dessa tese. Sou muito grata por poder compartilhar minha vida acadêmica com você! Você foi essencial na minha formação como pesquisadora. Obrigada!!!!

Aos meus “pupilos” Rafael e Carlos por todas as ajudas nos experimentos. Essa tese não sairia sem a ajuda de vocês. Gostaria de agradecer-los também pelo privilégio da co-orientação durante e iniciação científica. Isso foi uma peça essencial para a minha formação.

Às técnicas do laboratório, Frank e Gil, por todo apoio técnico ao longo desses anos e também por todos os momentos especiais que compartilhamos.

Aos meus colegas de laboratório Ian, Carla, Bárbara, Rafa, Thaianne, Micheli e Brenda por toda a amizade e paciência ao longo desses anos. A todos os meus amigos do LIMHO por todos os momentos maravilhosos compartilhados. Vocês tornaram tudo muito mais leve. Sou grata por ter compartilhado esses anos com vocês.

A todo o grupo Imunofar pelas conversas científicas ao longo desses anos. Sinto-me privilegiada por fazer parte de um grupo de pesquisa com tantas pessoas competentes.

## RESUMO

A *Pseudomonas aeruginosa* é um microrganismo oportunista que acomete principalmente pacientes hospitalizados e com uso prévio de antimicrobianos de amplo espectro. O uso prolongado de antimicrobianos está associado a quadros de disbiose que, por sua vez, está associada a alteração dos níveis intestinais e sistêmicos de metabólitos produzidos pela microbiota intestinal, dentre eles, os metabólitos do triptofano. O triptofano é um aminoácido essencial adquirido pela dieta e seu catabolismo é realizado pela microbiota intestinal, gerando derivados de indol, e pelo hospedeiro, gerando as quinurenina, dentre outros catabólitos, pela ação da enzima indolamina-2,3-dioxigenase 1 (IDO1). Estes catabólitos funcionam como agonistas do receptor de hidrocarbonetos aromáticos (AhR), que desempenha diversas funções imunomoduladoras. O objetivo desse trabalho é avaliar se a disbiose intestinal interfere no metabolismo de triptofano e se isso tem impacto na infecção pulmonar por *Pseudomonas aeruginosa*. Para isso, induzimos a disbiose em camundongos selvagens (WT) e deficientes para a enzima IDO1 (IDO1<sup>-/-</sup>) e deficientes para o receptor AHR (AHR<sup>-/-</sup>) com um coquetel de antimicrobianos, por 14 dias, quando os animais foram inoculados pela via intranasal com *P. aeruginosa* (PAO1 ou PA103). Camundongos que receberam os antimicrobianos apresentaram disbiose intestinal com redução de bactérias totais, incluindo bactérias produtoras de indol. A disbiose foi acompanhada do aumento da concentração sérica de triptofano e da redução da concentração de quinurenina, indicando uma alteração do metabolismo de triptofano pela via da IDO1. Ainda, camundongos disbióticos infectados apresentaram maior letalidade quando comparados a camundongos eubióticos, bem como maior carga bacteriana no lavado broncoalveolar (BAL). Após a infecção, camundongos disbióticos apresentaram maior acúmulo de quinurenina no pulmão e maior expressão e ativação do receptor AHR. Por meio do uso de antagonista de AHR ou animais deficientes para o receptor (AHR<sup>-/-</sup>) observamos que a ausência da ativação de AHR em animais disbióticos resultou em menor carga bacteriana quando comparado a animais disbióticos que receberam veículo. De maneira interessante, camundongos (IDO1<sup>-/-</sup>) ou animais tratados com um inibidor de IDO1 também se mostraram resistentes à infecção, mesmo após indução da disbiose. Além disso, macrófagos alveolares de camundongos IDO1<sup>-/-</sup> e AHR<sup>-/-</sup> disbióticos apresenta.....



maior capacidade fagocítica quando comparados às células de animais WT disbióticos. Assim, podemos concluir que a disbiose induzida pelo tratamento prolongado com antimicrobianos interfere no metabolismo de triptofano, resultando em maior susceptibilidade à infecção por *P. aeruginosa*. Essa maior susceptibilidade de animais disbióticos está associada a uma maior atividade da enzima IDO1, levando ao acúmulo de quinurenina e maior ativação do receptor AHR, inibindo assim a fagocitose da *Pseudomonas aeruginosa*.

Palavras chaves: Microbiota. Inflamação. Triptofano. Pneumonia. *Pseudomonas aeruginosa*.

## ABSTRACT

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic microorganism that affects mainly hospitalized patients who previously used broad spectrum antimicrobials. Prolonged use of antimicrobials is associated with changes in intestinal and systemic levels of metabolites produced by the intestinal microbiota, including tryptophan metabolites. Tryptophan is an essential amino acid supplied by diet. It is catabolized by the intestinal microbiota to indole derivatives, and by the host, generating kynurenines among other catabolites, through the activity of the indoleamine-2,3-dioxygenase 1 (IDO1) enzyme. These catabolites are agonists of the aromatic hydrocarbon receptor (AHR), which exerts various immunomodulatory functions. The aim of this study is to evaluate whether intestinal dysbiosis alters tryptophan metabolism and if this metabolic shift plays any role in the susceptibility to pulmonary infection by *Pseudomonas aeruginosa*. For this, we induced dysbiosis in wild type (WT) and mice deficient for the IDO1 enzyme (IDO1<sup>-/-</sup>) or for the AHR receptor (AHR<sup>-/-</sup>) with an antimicrobial cocktail for 14 days, when animals were inoculated intranasally with *P. aeruginosa* (PAO1 or PA103 strains). Mice that received antimicrobials had intestinal dysbiosis with reduced total bacteria, including indole-producing bacteria. Dysbiosis was accompanied by increased serum tryptophan concentration and decreased kynurenine concentration, indicating a change in tryptophan metabolism. Furthermore, infected dysbiotic mice showed higher lethality rates when compared to eubiotic mice, as well as higher bacterial load in the bronchoalveolar lavage (BAL). Also, dysbiotic mice presented increased kynurenine amounts in the lung after infection. Interestingly, dysbiosis was able to induce increased AHR expression and activation. Using an AHR antagonist and AHR knockout mice we observed that the absence of AHR activation in dysbiotic animals resulted in lower bacterial load when compared to dysbiotic animals that received vehicle. Interestingly, IDO1<sup>-/-</sup> mice or animals treated with an IDO1 inhibitor were resistant to infection even after induction of dysbiosis. Thus, it can be concluded that dysbiosis resulting from prolonged antimicrobial treatment interferes with tryptophan metabolism, resulting in greater susceptibility to *P. aeruginosa* infection. This increased susceptibility of dysbiotic animals is associated with increased IDO1 enzyme activity, heightened kynurenine accumulation and greater AHR receptor activation, disrupting *Pseudomonas aeruginosa* phagocytosis.

Key words: Inflammation. Microbiota. Tryptophan. Pneumonia. *Pseudomonas aeruginosa*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Via de metabolismo de triptofano pela <i>P. aeruginosa</i> .....	18
Figura 2 - Fatores de virulência da <i>P.aeruginosa</i> .....	21
Figura 3 - Resposta imune inata frente a infecção por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ...	24
Figura 4 - Maturação do sistema imune local e sistêmico pela microbiota Intestinal .....	28
Figura 5 - Metabolismo do triptofano .....	34
Figura 6 - Via de ativação canônica do receptor AHR .....	36
Figura 7 - Planejamento experimental para a indução da disbiose e posterior infecção pela <i>P. aeruginosa</i> .....	42
Figura 8 - Estratégia para a análise da citometria de fluxo .....	47
Figura 9 - Camundongos que receberam o coquetel de antimicrobianos apresentam cargas bacterianas reduzidas de diferentes grupos na microbiota fecal .....	51
Figura 10 - Camundongos expostos a antimicrobianos apresentam alteração do metabolismo de triptofano .....	52
Figura 11 - Camundongos tratados com coquetel de antimicrobianos são mais susceptíveis à infecção pela linhagem PA103 .....	53
Figura 12 - Camundongos que receberam antimicrobianos são mais susceptíveis à infecção pela linhagem PAO1 .....	54

Figura 13 - Camundongos que receberam antimicrobianos apresentam menor infiltrado inflamatório no pulmão .....	55
Figura 14 - Camundongos que receberam antimicrobianos apresentam alteração da contagem de leucócitos no espaço alveolar após infecção pulmonar por <i>P. aeruginosa</i> .....	56
Figura 15 - Camundongos que receberam antimicrobianos apresentam alteração na concentração de citocinas frente a infecção pulmonar por <i>P. aeruginosa</i> .....	57
Figura 16 - Macrófagos alveolares de camundongos tratados com antimicrobianos apresentam menor capacidade fagocítica de <i>P. aeruginosa</i> .....	58
Figura 17 - Há menor quantidade de neutrófilos produtores de ROS nos pulmões de animais que receberam antimicrobianos e infectados com <i>P. aeruginosa</i> .....	59
Figura 18 - A infecção por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> induz alteração metabolismo de triptofano no pulmão .....	61
Figura 19 - A inibição farmacológica da enzima IDO1 interfere no controle da carga bacteriana no BAL de animais disbióticos infectados por <i>P. aeruginosa</i> .....	63
Figura 20 - Camundongos IDO1 <sup>-/-</sup> disbióticos apresentam maior recrutamento de neutrófilos e menor carga bacteriana após a infecção por <i>P. aeruginosa</i> .....	65
Figura 21 - Neutrófilos de camundongos disbióticos apresentam maior expressão de AHR de maneira dependente de IDO1 .....	67
Figura 22 - O receptor AHR interfere no controle da carga bacteriana em animais disbióticos infectados por <i>P. aeruginosa</i> .....	68
Figura 23 - Animais AHR <sup>-/-</sup> disbióticos apresentam menor carga bacteriana no pulmão .....	69

Figura 24 - Macrófagos alveolares de animais IDO1 <sup>-/-</sup> e AHR <sup>-/-</sup> disbióticos apresentam maior capacidade fagocítica .....	71
Figura 25 - Macrófagos alveolares deficientes para a enzima IDO1 apresentam maior capacidade de fagocitar e matar a <i>P. aeruginosa</i> .....	72
Figura 26 - Macrófagos derivados de medula óssea deficientes para a enzima IDO1 apresentam maior capacidade de fagocitar e matar a <i>P. aeruginosa</i> .....	72
Figura 27 - O tratamento de macrófagos com quinurenina foi capaz de reduzir a capacidade de macrófagos de fagocitar e matar <i>P. aeruginosa</i> .....	73
Figura 28 - Animais que receberam quinurenina antes da infecção apresentam aumento da carga bacteriana .....	74
Figura 29 - Participação do metabolismo de triptofano pela microbiota disbiótica na patogênese da infecção pela <i>P. aeruginosa</i> .....	85

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Divisão dos grupos experimentais .....	43
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

1-MT	1-metil-D-triptofano
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AHLs	Lactonas de acil homoserina
AHR	Receptor de hidrocarbonetos aromáticos
ArAT	Aminoácido-aromático-aminotransferase
ARNT	Translocador nuclear de AHR
BAL	Lavado bronco-alveolar
CFTR	Regulador de Condutância Transmembrana em Fibrose Cística
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay – ensaio imunossorvente ligado a enzima
ExoT	Exotoxina T
ExoU	Exotoxina U
ExoY	Exotoxina Y
GALTs	Tecidos linfoides associados ao intestino
HSP90	Proteína de choque térmico de 90 kDa
I3S	Sulfato de indoxil
IA	Ácido indol-acrílico
IPA	Ácido indol-3-propiónico
IAA	Ácido indol-3-acético
IAld	Ácido indol-3-acetaldeído
IAM	Indol-3-acetamida
IBD	Doenças inflamatórias intestinais
IDO1	indolamina-2,3-dioxigenase 1
ILA	Ácido indol-3-láctico
IPIA	Indol-3-piruvato
Kyn	Quinurenina
MAMPS	Padrão moleculares associado a microrganismos
MDR	Multidroga resistente



MPO	Mieloperoxidase
NLRC4	<i>Nod like receptor</i> contendo domínio CARD 4
NLRs	<i>Nod like receptor</i>
PAF	Fator de agregação plaquetária
PIA	<i>Pseudomonas isolation</i> ágar
PRR	Receptor de reconhecimento de padrão
QS	<i>Quorum sensing</i>
TDO	triptofano-2,3-dioxigenase
TLRs	receptores do tipo toll
TMO	Triptofano-2-monoxigenase
TnA	Triptofanase A
TrD	Triptofano-descarboxilase
Treg	Células T regulatórias
Trp	Triptofano
TSS	Sistema de secreção do tipo
UTI	Unidade de terapia intensiva
SRA	Receptores sequestradores

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>20</b>
1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	20
1.1.1 Resposta imune frente a infecção pulmonar por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	25
1.2 Microbiota intestinal .....	28
1.3 Metabolismo de triptofano.....	34
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>40</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>41</b>
3.1 Objetivo geral.....	41
3.2 Objetivos específicos .....	41
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>42</b>
4.1 Animais .....	42
4.2 Indução da disbiose .....	42
4.2.1 Avaliação da composição da microbiota por plaqueamento das fezes em meios de cultura .....	42
4.2.2 Avaliação da produção de indol pela microbiota fecal.....	43
4.2.3 Dosagem de metabólitos de triptofano pela técnica de LC-MS.....	43
4.3 Infecção por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	44
4.4 Avaliação do efeito da disbiose na patogênese da infecção pulmonar por <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> .....	45
4.5 Determinação da quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC) de <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> .....	46
4.6 Lavado bronco-alveolar .....	46
4.7 Influxo de neutrófilos pela quantificação da atividade de mieloperoxidase (MPO) .....	47
4.8 Quantificação de citocinas e quimiocinas por ELISA.....	47
4.9 Análise histológica .....	48

4.10 Citometria de fluxo .....	49
4.11 Avaliação da produção de ROS.....	50
4.12 Fagocitose de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por macrófagos alveolares <i>in vivo</i>	51
4.13 Diferenciação de macrófagos derivados de medula (BMDM) .....	51
4.14 Extração de macrófagos alveolares.....	52
4.15 Ensaio de fagocitose e <i>killing</i> da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	52
4.16 Análise estatística .....	53
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>54</b>
5.1 O uso prolongado a um coquetel de antimicrobianos altera a microbiota intestinal de camundongos: .....	54
5.2 O uso de antimicrobianos induz alteração do metabolismo de triptofano .....	54
5.3 Camundongos que receberam antimicrobianos são mais susceptíveis à infecção por <i>P. aeruginosa</i> : .....	56
5.4 Neutrófilos de animais que receberam antimicrobianos apresentam menor produção de ROS: .....	61
5.5 Camundongos que receberam antimicrobianos apresentam maior atividade da enzima IDO1 após a infecção por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : .....	63
5.6 A ausência da enzima IDO1 altera o perfil de susceptibilidade à infecção por <i>P. aeruginosa</i> de animais disbióticos: .....	65
5.7 A ausência do receptor AHR alterou o perfil de susceptibilidade de animais disbióticos à infecção por <i>P. aeruginosa</i> :.....	71
5.8 A ausência da enzima IDO1 e do receptor AHR alterou a fagocitose de <i>P. aeruginosa</i> por macrófagos alveolares <i>in vivo</i> :.....	73
5.9 A presença de altas concentrações de quinurenina interfere na capacidade fagocítica da <i>P. aeruginosa</i> por macrófagos:.....	74
5.10 O tratamento prévio com quinurenina leva ao aumento da carga bacteriana em animais eubióticos: .....	77
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>79</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>87</b>

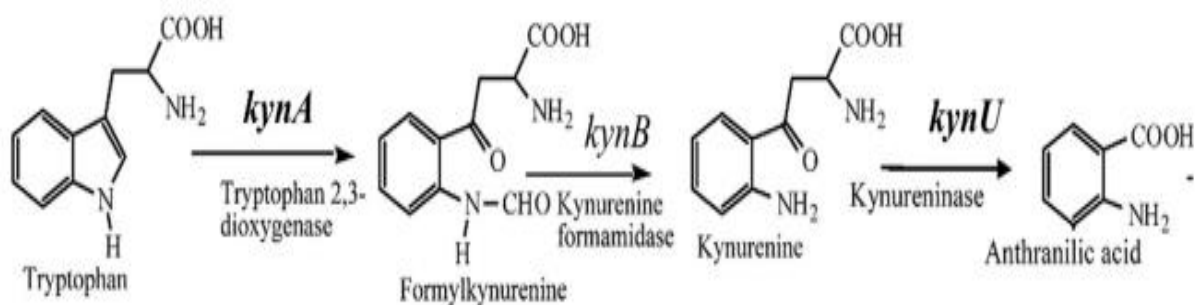
REFERÊNCIAS.....	89
------------------	----

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* é um bastonete Gram-negativo aeróbico que apresenta flagelos monotriques e pili em sua superfície, sendo que os pili contribuem para aderência da bactéria ao epitélio pulmonar (SADIKOT *et al.*, 2005). *P. aeruginosa* é um microrganismo ubíquo, podendo crescer em diversos nichos ecológicos como solo, águas superficiais, esgoto, plantas e vários alimentos, como folhas e sucos de frutas frescas. Essa capacidade de crescer em nichos ecológicos altamente diversos está associada à sua versatilidade metabólica, como capacidade de utilizar diferentes fontes de carbono no seu metabolismo, utilização de nitrogênio como aceptor final de elétrons e crescimento em altas temperaturas (KUNG; OZER; HAUSER, 2010; SADIKOT *et al.*, 2005). *P. aeruginosa* também pode ser encontrada na microbiota normal humana, sendo frequentemente transferido por profissionais da área da saúde para pacientes (SADIKOT *et al.*, 2005).

Devido a sua alta versatilidade metabólica, *P. aeruginosa* é um dos poucos patógenos capazes de metabolizar o triptofano através da via da quinurenina, gerando como metabólito final o antranilato. Nesta via, o triptofano sofre ação da enzima triptofano 2,3-dioxigenase (kynA), uma enzima homóloga a enzima humana IDO1, sendo convertido ao metabólito intermediário formilquinurenina. Em seguida, a enzima quinurenina formamidase (kynB) irá metabolizar a formilquinurenina em quinurenina. Na última etapa da via, a quinurenina será convertida pela quinureninase (kynU) a antranilato (Fig.1) (GENESTET *et al.*, 2014).



**Figura 1- Via de metabolismo de triptofano por *P. aeruginosa*:** O triptofano pode ser metabolizado por *P. aeruginosa* através da via das quinureninas, tendo como produto final o antranilato. Inicialmente a enzima *kynA* metaboliza o triptofano em formilquinurenina, que em seguida será metabolizada em quinurenina pela enzima *kynB*. No último passo da via, a quinurenina será catabolizada em ácido antranílico. Fonte: GENESTET et al., 2014.

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 é um mecanismo compartilhado por muitas bactérias que permite uma adaptação coordenada de uma população bacteriana a mudanças ambientais, incluindo a adaptação ao ambiente pulmonar e a comunicação célula-célula. Em *P. aeruginosa*, o quórum-sensing regula aproximadamente 10% dos seus genes, coordenando várias funções como formação de biofilme, modulação da resposta imune, motilidade e produção de outros fatores de virulência. Todas essas funções são mediadas pelas moléculas chamadas autoindutores (GELLATLY; HANCOCK, 2013; KARIMINIK; BASERI-SALEHI; KHEIRKHAH, 2017).

A regulação de fatores de virulência por QS em *P. aeruginosa* pode seguir quatro caminhos: Las (3-oxo-C12-homoserina lactona), Rhl (N-butyryl homoserina lactona), PQS (sinal de quinolona de *Pseudomonas*) e IQS (integrando o sinal de quórum) (SCOFFONE et al., 2019). Em resposta a estresses/estímulos específicos, como hipóxia, depleção de ferro e estresse oxidativo, cada via sintetiza diferentes autoindutores. A concentração das moléculas autoindutoras aumenta à medida que a densidade celular (população bacteriana) aumenta e, ao atingir uma concentração limiar, os autoindutores interagem com reguladores transcricionais para ativar ou alterar a expressão gênica de diversos fatores de patogenicidade de *P. aeruginosa* (MORADALI; GHODS; REHM, 2017).

Outro fator de patogenicidade de *Pseudomonas aeruginosa* é a capacidade de injetar na célula do hospedeiro uma grande variedade de enzimas e toxinas para atacar a célula do hospedeiro, através de cinco sistemas de secreção ( TSS I, II, III, V e VI)(SAINZ-MEJÍAS; JURADO-MARTÍN; MCCLEAN, 2020). O sistema de secreção do tipo III está associado a infecções agudas e invasivas, e que está implicado no aumento da mortalidade pela infecção (GELLATLY;HANCOCK,2013). O TSS3 é um aparato em formato de agulha que permite que a bactéria injete no interior da célula eucariótica quatro importantes proteínas efetoras, sendo elas ExoS, ExoT, ExoU e ExoY (SADIKOT *et al.*, 2005). A maioria das amostras de *P. aeruginosa* expressam uma das duas exotoxinas ExoU ou ExoS, mas raramente uma cepa apresenta concomitantemente ambas as exotoxinas. Já as toxinas ExoY e ExoT são encontradas na maioria das amostras, porém essas toxinas possuem papel menos conhecido na virulência bacteriana (ANANTHARAJAH; MINGEOT-LECLERCQ; VAN BAMBEKE, 2016; GELLATLY; HANCOCK, 2013; MALLET DE LIMA *et al.*, 2014).

A ExoU é uma citotoxina potente com atividade de fosfolipase A2 e que está associada com a persistência da bactéria no pulmão, com a capacidade de atingir a corrente sanguínea e levar à morte do hospedeiro (GELLATLY; HANCOCK, 2013; MALLET DE LIMA *et al.*, 2014. Após a injeção no citosol da célula hospedeira, a ExoU é direcionada para a membrana plasmática, onde realiza a clivagem dos fosfolipídios de membrana, resultando em lise e morte rápida de células epiteliais, macrófagos e neutrófilos. Além disso, a atividade de fosfolipase pode resultar também na liberação de ácido araquidônico e lisofosfolipídios que podem ser utilizados para a síntese de mediadores pró-inflamatórios (ANANTHARAJAH; MINGEOT-LECLERCQ; VAN BAMBEKE, 2016; GELLATLY; HANCOCK, 2013; MALLET DE LIMA *et al.*, 2014).

Dentre esses mediadores inflamatórios, podemos destacar o fator de agregação plaquetário (PAF), que, ao se ligar ao receptor PAFR, induz a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, aumentando a expressão de PAFR em células não infectadas, amplificando os efeitos da ExoU como, ativação da cascata de coagulação e inibindo a via fibrinolítica (MALLET DE LIMA *et al.*, 2014; PLOTKOWSKI *et al.*, 2015). Além disso, foi demonstrado que a ExoU é capaz de inibir a produção de mediadores pró-

inflamatórios processados por caspase-1 (ENGEL; BALACHANDRAN, 2009). A ExoU também pode clivar os lipídeos presentes no surfactante pulmonar e na barreira epitelial pulmonar (ENGEL; BALACHANDRAN, 2009). Em um modelo murino, a ExoU mostrou ter um papel importante na susceptibilidade do hospedeiro frente à infecção, assim como na indução de inflamação sistêmica característica de sepse aumentando a permeabilidade vascular, ativação plaquetária e alteração do turnover da fibrina (PLOTKOWSKI, *et al.*, 2015). Assim, essa exotoxina tem importante papel na invasão do microrganismo e no estabelecimento de uma infecção sistêmica.

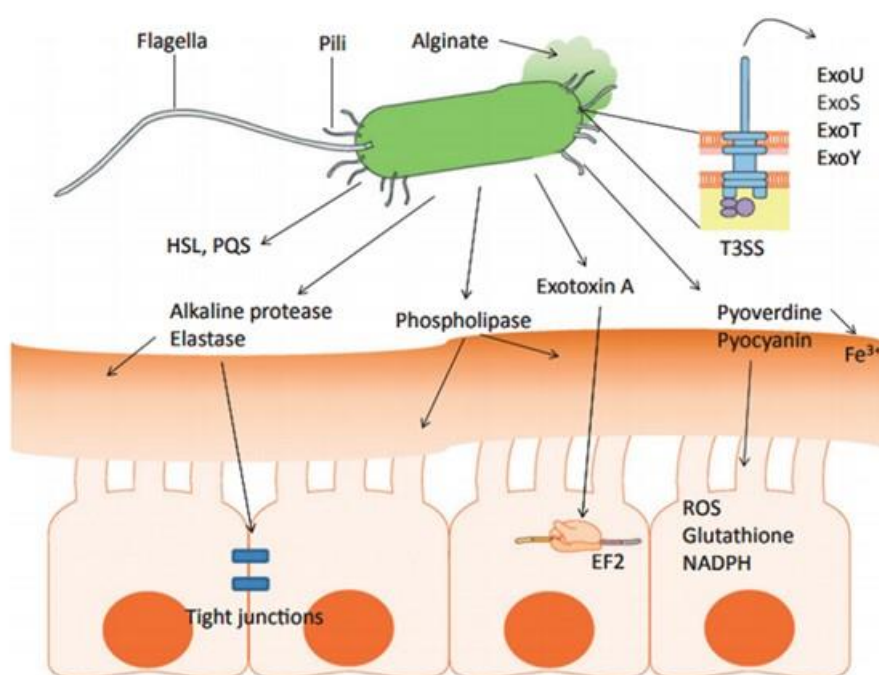
As toxinas ExoS e ExoT possuem domínios GTPase (GAP) e ADP ribosiltransferase (ADPRT). A atividade do domínio GAP leva a desorganização do citoesqueleto de actina, induzindo o arredondamento e desprendimento de células e a inibição da migração celular e fagocitose. Na ExoS, a atividade dos domínios ADPRT induz a citotoxicidade e apoptose, inibe a síntese do DNA, altera a endocitose, o tráfico vesicular e a formação de nódulos e favorece a multiplicação intracelular. ExoS também interrompe a barreira pulmonar-vascular *in vivo*, levando à disseminação bacteriana e a danos pulmonares (GELLATLY; HANCOCK, 2013; MALLET DE LIMA *et al.*, 2014). A ExoY foi descrita pela primeira vez como uma adenilato ciclase capaz de elevar a concentração de cAMP, mas também foi relatado a elevação dos níveis intracelulares de outros nucleotídeos cíclicos (cCMP, cGMP, cUMP). Como consequência, ExoY provoca desorganização do citoesqueleto da actina, necrose celular e alteração da integridade da barreira das células endoteliais após lesão pulmonar (ANANTHARAJAH; MINGEOT-LECLERCQ; VAN BAMBEKE, 2016).

Um outro mecanismo de virulência de *P. aeruginosa* envolve sua capacidade de adquirir ferro dos tecidos do hospedeiro. Para isso, *P. aeruginosa* produz dois principais sideróforos: pioverdina e piroquil. Estes sideróforos ligam o ferro de forma eficiente e são então absorvidos pela bactéria através de receptores específicos da sua superfície celular. Os sideróforos são fatores de virulência importantes não só para fornecer ferro para processos metabólicos bacterianos, mas também para controlar a expressão de outros fatores de virulência de *P. aeruginosa*. Além da pioverdina, *P. aeruginosa* também é capaz de produzir o pigmento piocianina, que é responsável por dar a cor azul-esverdeado para as colônias bacterianas. Além disso,



a piocianina exerce papel pró-inflamatório durante a infecção, lesa o epitélio brônquico, prejudica a função ciliar e também facilita o dano oxidativo pulmonar através da inibição da atividade da enzima catalase (SADIKOT *et al.*, 2005).

*P. aeruginosa* apresenta também outros fatores de virulência, como fimbrias, pili, flagelos e polissacarídeos que irão facilitar a colonização do tecido e enzimas extracelulares como, elastase, proteases alcalinas, hemolisinas (fosfolipase e lecitinase) e citotoxinas (leucocidina) que estão envolvidas com a invasão do tecido pulmonar (SADIKOT *et al.*, 2005) (Fig.2).



**Figura 2- Fatores de virulência da *P.aeruginosa*:** *Pseudomonas aeruginosa* possui uma variedade de fatores de virulência que são necessários para a instalação da infecção. Os flagelos e o pili tipo 4 são as principais adesinas, que junto com lipopolissacarídeo, são altamente inflamatórios. Uma vez ocorrido o contato com o epitélio do hospedeiro, o TSS3 pode ser ativado, levando a injeção de citotoxinas diretamente no citosol da célula hospedeira. Além disso, *P. aeruginosa* produz e libera várias proteases que podem degradar fatores do complemento do hospedeiro, mucinas e romper as junções entre os epitélios, levando à disseminação da bactéria. As lipases e fosfolipases podem ter como alvo os lipídios presentes no surfactante pulmonar, bem como a membrana celular. A piocianina, um pigmento azul-esverdeado, pode interferir nas vias de transporte de elétrons da célula hospedeira e no ciclo redox. A pioverdina captura  $Fe^{3+}$  para processos metabólicos. Fonte: Gellatly & Hancock, 2013.

Em humanos, a infecção por *Pseudomonas aeruginosa* pode causar uma variedade de condições clínicas como bacteremia, infecções do trato urinário ou pneumonia,

principalmente em pacientes imunossuprimidos hospitalizados e com uso prévio de antimicrobianos de amplo espectro (GELLATLY; HANCOCK, 2013; ROBAK *et al.*, 2018). Dentro do ambiente hospitalar, *P. aeruginosa* apresenta ainda um papel protagonista dentro de Unidades de Terapia Intensiva (UTI). Estima-se que aproximadamente 60% dos pacientes que dão entrada na UTI desenvolvem uma doença infecciosa. Destas, 11% estão associadas à infecção por *P. aeruginosa*, perdendo apenas para *Klebsiella pneumoniae* (27%) e *Escherichia coli* (20%) (CHOUDHURI; CHAKRAVARTY; UPPAL, 2017). Ainda, vale ressaltar que 64% a 71% dos pacientes internados em UTIs recebem antibioticoterapia, dentre eles, antimicrobianos de amplo espectro (ROBAK *et al.*, 2018), sendo o uso desses medicamentos um dos fatores de risco para infecção hospitalar pela *P. aeruginosa* (GOMILA *et al.*, 2018).

Em um estudo de coorte observacional retrospectivo, o uso de antimicrobianos por 30 ou 90 dias em UTIs foi considerado um fator agravante para a infecção por *P. aeruginosa* (GOMILA *et al.*, 2018; SHINDO *et al.*, 2013). Ainda, um estudo demonstrou que 41,9% dos pacientes com ventilação mecânica que adquirem infecções por *P. aeruginosa* evoluem ao óbito e dentre os fatores de risco para a infecção está o uso inadequado de antimicrobianos (TIMSIT *et al.*, 2017)

Devido a tais características epidemiológicas e fisiológicas e associado ao seu perfil de resistência a múltiplas drogas, a Organização Mundial da Saúde (OMS) incluiu *P. aeruginosa* no grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa*, e *Enterobacteriaceae*) (BHAGIRATH *et al.*, 2019), onde estão reunidos os principais patógenos para os quais a descoberta de novos agentes antimicrobianos é de extrema urgência (WHO, 2017).

#### 1.1.1 Resposta imune frente a infecção pulmonar por *Pseudomonas aeruginosa*

As infecções por *P. aeruginosa* geralmente estão associadas ao trato respiratório, como, por exemplo, à pneumonia. Após a infecção do trato respiratório, *Pseudomonas aeruginosa* destrói a integridade da barreira epitelial alveolar, levando a rápida necrose do epitélio pulmonar e disseminação da bactéria para a circulação. A resposta imune inata é essencial para o controle da infecção por *P. aeruginosa*. Essa resposta

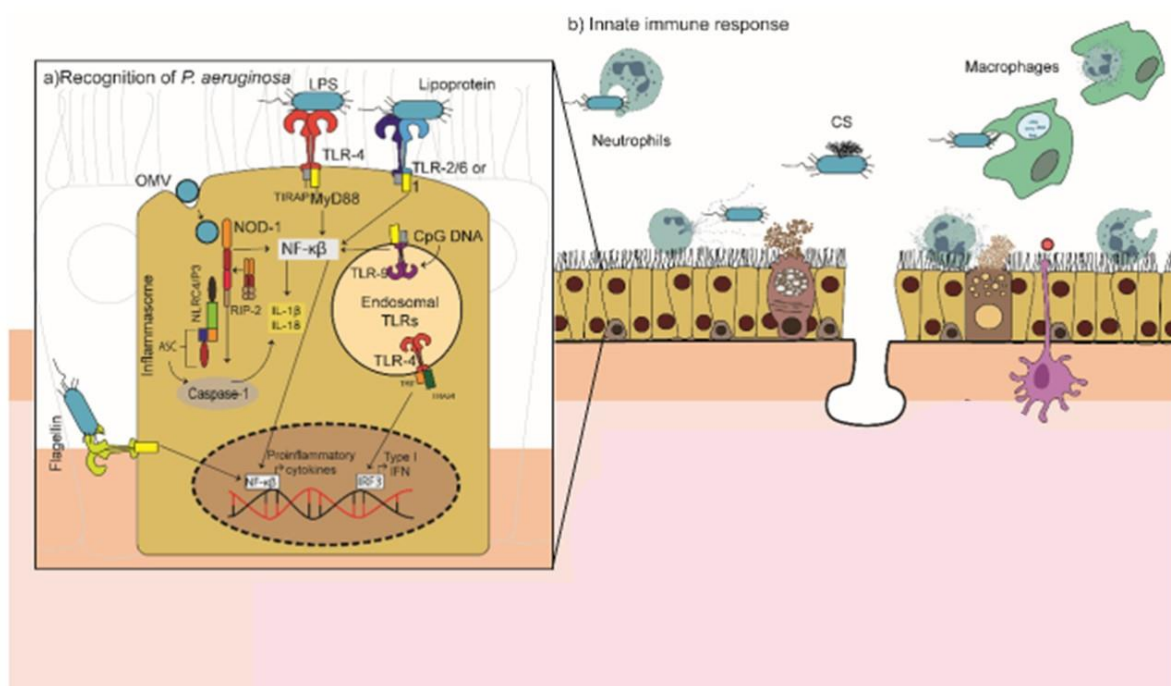
inclui a produção de mediadores inflamatórios, recrutamento celular e depuração fagocítica por neutrófilos e macrófagos (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE *et al.*, 2016).

Os macrófagos alveolares funcionam como a primeira linha de defesa contra patógenos pulmonares, sendo importantes para coordenar a resposta inflamatória frente a infecção. Os macrófagos alveolares irão atuar na fagocitose e *killing* de *Pseudomonas aeruginosa*, no recrutamento de neutrófilos e na fagocitose de neutrófilos mortos, limitando o dano tecidual (SAINZ-MEJÍAS; JURADO-MARTÍN; MCCLEAN, 2020). O processo de fagocitose bacteriana é mediado por meio do contato e ligação da bactéria ao fagócito, mediado pelo reconhecimento baseado em receptores (LOVEWELL; PATANKAR; BERWIN, 2014). O contato inicial entre o microrganismo e o fagócito é acompanhado por sinais intracelulares que irão desencadear diversos processos celulares como, rearranjo do citoesqueleto, alterações no tráfico de membrana, ativação de mecanismos para o *killing* bacteriano e produção de mediadores inflamatórios (UNDERHILL; OZINSKY, 2002). A fagocitose de *Pseudomonas aeruginosa* pode acontecer por duas principais vias, pela bactéria opsonizada e mediada por receptores independentes de opsonização. A fagocitose por meio da bactéria opsonizada é impulsionada pela ligação da bactéria envolvida por anticorpos a receptores Fc ou a receptores de complemento. Diversos receptores independentes da opsonização têm sido demonstrado desempenhar importante papel para a fagocitose de *P. aeruginosa* como, SRA (CD204), MARCO (CD206), CFTR e receptores do tipo toll (TLRs) (LOVEWELL; PATANKAR; BERWIN, 2014).

Além da fagocitose, os macrófagos alveolares e as células residentes, irão realizar o reconhecimento de alguns fatores de virulência de *P. aeruginosa* através dos receptores de reconhecimento de padrão (PRRs). Como por exemplo, receptores do tipo TLR-4 e TLR-5, que são ativados por LPS e por flagelina, respectivamente. Esse reconhecimento induz ativação da via do NF- $\kappa$ B e induz a liberação das citocinas TNF e IL-6 e da quimiocina CXCL1, que participa do recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório. Além disso, alguns fatores de virulência de *P. aeruginosa*, como proteínas do TSS3 e vesículas de membrana externa, podem induzir a ativação dos inflamassomas NLRC4 e NLRP3 respectivamente, no citosol da célula do hospedeiro,

levando a ativação de caspase-1 e produção de IL-1 $\beta$  além da indução da piroptose (Fig.3) (FRANCHI *et al.*, 2009; SAINZ-MEJÍAS; JURADO-MARTÍN; MCCLEAN, 2020).

O recrutamento massivo de neutrófilos é uma característica importante da infecção por *P. aeruginosa*. Sendo que este recrutamento se dá principalmente por ligação das quimiocinas CXC nos receptores CXCR1 e CXCR2 (SAINZ-MEJÍAS; JURADO-MARTÍN; MCCLEAN, 2020). Uma vez recrutado para o sítio infeccioso, os neutrófilos exercem importante papel na eliminação da bactéria através da fagocitose, liberação de serina-proteases e espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, que atuam como bactericidas (LAVOIE *et al.*, 2012 e GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE *et al.*, 2015). De maneira interessante, estudos em modelo animal tem demonstrado que a microbiota intestinal interfere de forma significativa no reconhecimento e na resposta inflamatória orquestrada frente a infecção pela *Pseudomonas aeruginosa*. (ROBAK *et al.*, 2018; TSAY; CHEN; CHEN, 2019).



**Figura 3- Resposta imune inata frente a infecção por *Pseudomonas aeruginosa*:** a) PRRs localizados nas células residentes (TLR2, TLR4, TLR5, TLR9) reconhecem os PAMPs de *P. aeruginosa* (lipoproteínas, LPS, flagelina e CpG-DNA respectivamente) e desencadeiam a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Vesículas de membrana externa irão sofrer endocitose e ativar a via de NFκB e o inflamassoma. (b) Neutrófilos, recrutados em resposta a liberação de quimiocinas após o reconhecimento da bactéria irão fagocitar e matar *Pseudomonas aeruginosa*. Macrófagos, participam da fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios e na limpeza de neutrófilos apoptóticos levando a

resolução da inflamação e o remodelamento tecidual. Modificado de: SAINZ-MEJÍAS; JURADO-MARTÍN; MCCLEAN, 2020

## 1.2 Microbiota intestinal

Imediatamente após o nascimento, os mamíferos iniciam um longo processo de colonização por microrganismos (eubactérias, arqueobactérias, vírus e eucariotos unicelulares) que colonizam as superfícies mais expostas como pele, boca, intestinos e vagina (RINNINELLA *et al.*, 2019; ROUND; MAZMANIAN, 2009; WINTER; LOPEZ; BÄUMLER, 2013). O trato gastrointestinal é o sítio mais amplamente colonizado, abrigando trilhões de bactérias simbiotes benéficas, chegando a ter uma população composta por cerca de 500 a 1000 espécies distintas (FUNG; ARTIS; SONNENBERG, 2014). No entanto, podemos observar que, ao longo do trato gastrointestinal, essa microbiota sofre alterações tanto em abundância quanto em diversidade (BUDDEN *et al.*, 2016; ECKBURG, 2005; SEKIROV; RUSSELL; ANTUNES, 2010). Na porção proximal do intestino, o duodeno, onde encontramos uma alta concentração de oxigênio, pH baixo e presença de enzimas digestivas, encontramos a menor concentração de microrganismos do trato gastrointestinal, cerca de  $10^1$ - $10^3$  UFC/mL de bactérias. Nas porções terminais do intestino delgado, essa quantidade aumenta, chegando a abrigar cerca de  $10^4$ - $10^8$  UFC/mL. Já no intestino grosso, órgão mais abundante, encontramos cerca de  $10^{11}$ - $10^{13}$  UFC/mL (MARTINEZ-GURYN; LEONE; CHANG, 2019).

Em relação a sua composição, os anaeróbios obrigatórios compreendem a maior parte da microbiota intestinal em adultos (MAHOWALD *et al.*, 2009), sendo composta principalmente pelos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, que representam cerca de 70% da microbiota total (BÄUMLER; SPERANDIO, 2016; ECKBURG, 2005; LAY *et al.*, 2005; RINNINELLA *et al.*, 2019). Apesar da microbiota intestinal ser altamente semelhante entre indivíduos a nível de filo, podemos observar uma grande variação em nível de espécies entre cada indivíduo, podendo ser comparada à impressão digital de uma pessoa (IEBBA *et al.*, 2016). Essa variação entre indivíduos ocorre devido a diversos fatores ambientais tais como estilo de vida e dieta ou pode ocorrer também devido a fatores genéticos (DANG; MARSLAND, 2019).

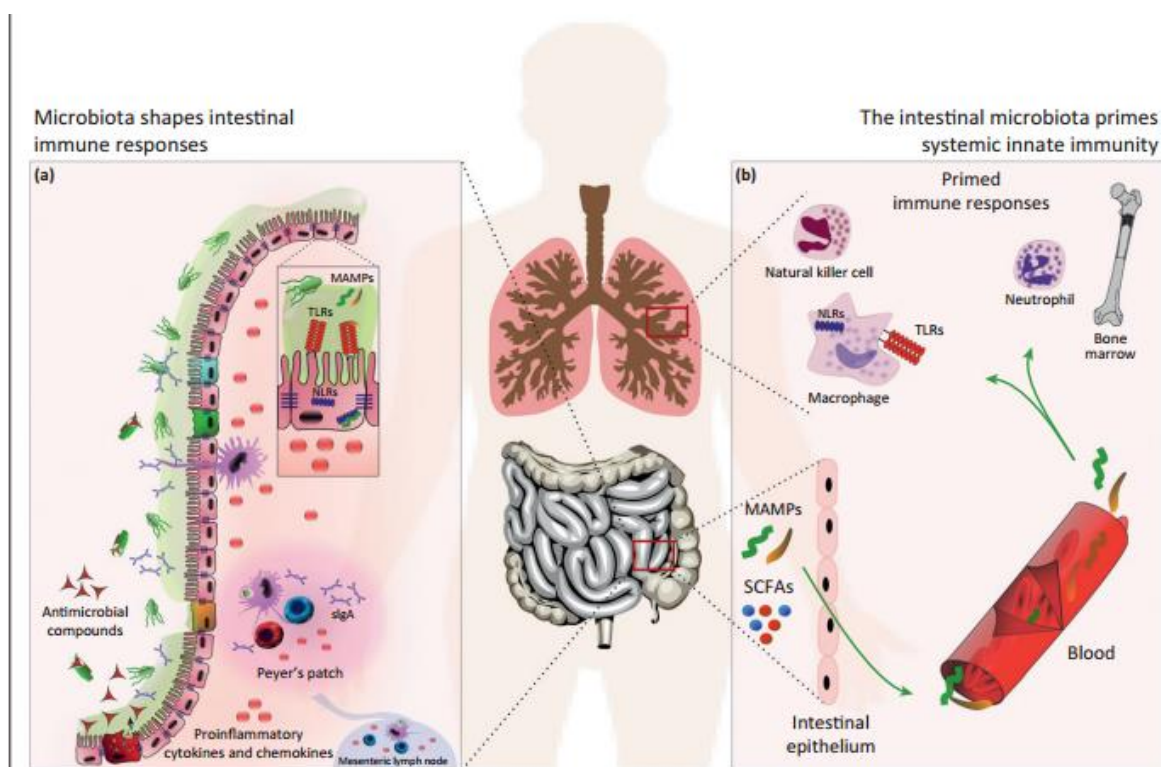
Em condições fisiológicas normais, a microbiota intestinal apresenta diversas funções vitais e inter-relações importantes para a saúde do hospedeiro, como manutenção da barreira epitelial intestinal, síntese e absorção de vários nutrientes e metabólitos, incluindo ácidos biliares, lipídeos, aminoácidos, vitaminas e ácidos-graxos de cadeia curta (AGCC), e proteção contra patógenos, através da secreção de substâncias bactericidas e pela competição por nicho e nutrientes (SCHUIJT *et al.*, 2013; BRESTOFF *et al.*, 2013; SHREINER *et al.*, 2015; TAKIISHI; FENERO; CÂMARA, 2017). Além disso, a microbiota possui papel importante na maturação do sistema imune, participando da maturação dos GALTs (tecidos linfoides associados ao intestino), do recrutamento de células secretoras de IgA e na ativação de células T na mucosa (SCHUIJT *et al.*, 2012; BRESTOFF *et al.*, 2013; SHREINER *et al.*, 2015). Ao longo dos anos, trabalhos do nosso grupo de pesquisa têm demonstrado que a microbiota intestinal também é essencial na montagem e manutenção da resposta inflamatória frente a estímulos inflamatórios infecciosos e estéreis (MENEZES-GARCIA *et al.*, 2020; CISALPINO *et al.*, 2017; FAGUNDES *et al.*, 2012;; SOUZA *et al.*, 2004).

A maturação do sistema imune local pela microbiota se dá através da expressão de estruturas moleculares denominadas padrão moleculares associado a microrganismos (MAMPS), dentre os quais podemos citar lipopolissacarídeos, flagelinas, peptidoglicanos e ácidos nucleicos que são reconhecidos por PRRs, incluindo TLRs e NLRs, que são expressos por várias células intestinais. Esse reconhecimento orchestra uma resposta imune predominantemente reguladora, com a produção de produtos antimicrobianos e a liberação de citocinas e quimiocinas, que é crucial para a defesa do hospedeiro (CERF-BENSUSSAN & GABORIAU-ROUTHIAU, 2010; ROOKS & GARRETT, 2016; SCHUIJT *et al.*, 2013).

Além disso, os MAMPs citados anteriormente podem ser transportados através da circulação sanguínea, funcionando como um meio de comunicação entre a microbiota intestinal e o pulmão, o que é denominado como eixo intestino-pulmão (WYPYCH; WICKRAMASINGHE; MARSLAND, 2019). Além dos MAMPs, nutrientes e metabólitos derivados da microbiota intestinal, como AGCCs, também podem alcançar a circulação sanguínea (Fig.4). Dentre estes metabólitos, podemos destacar o acetato,

o butirato e o propionato, que são os mais abundantes metabólitos presentes no intestino e que exercem papel importante na regulação das células do sistema imune inato e adaptativo (ROOKS & GARRETT, 2016; SCHUIJT *et al.*, 2016). Além desses metabólitos, outros metabólitos oriundos da microbiota como indol, niacina, poliaminas e ácidos orgânicos, que apresentam propriedades imunomoduladoras, também podem alcançar a circulação sistêmica. No entanto, apesar desses metabólitos exercerem importante papel na imunidade e homeostase intestinal, ainda não se sabe se essas moléculas exercem papel importante no eixo intestino-pulmão (WYPYCH *et al.*, 2019).

Historicamente, o pulmão era considerado um órgão estéril devido a dificuldades de cultivo de bactérias isoladas desse sítio. No entanto, através da utilização de técnicas mais modernas, como o sequenciamento do rRNA 16S, foi possível detectar a existência da microbiota pulmonar. A microbiota pulmonar apresenta uma baixa carga bacteriana, cerca de  $10^3$  a  $10^5$  UFC/g de tecido, sendo encontrada principalmente os filos Proteobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes, incluindo os 5 principais gêneros: *Prevotella*, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Fusobacterium* e *Haemophilus*. Acredita-se que a fonte da microbiota pulmonar é um equilíbrio entre a migração microbiana do trato respiratório superior (aspiração da saliva) e a eliminação microbiana por macrófagos alveolares e pelo transporte mucociliar, com pouca contribuição da reprodução local dos microrganismos, fazendo assim que a microbiota pulmonar seja uma microbiota transitória. Estudos ainda precisam ser realizados para entender a contribuição da microbiota pulmonar na manutenção da resposta imune pulmonar. No entanto, tem sido demonstrado que a microbiota é importante na maturação de células dendríticas (AMATI *et al.*, 2022; WYPYCH; WICKRAMASINGHE; MARSLAND, 2019; BUDDEN *et al.*, 2017).



**Figura 4- Maturação do sistema imune local e sistêmico pela microbiota intestinal:** A Microbiota intestinal expressa MAMPs que são reconhecidos pelos receptores de reconhecimento de padrões, incluindo receptores TLRs e receptores NLRs. O reconhecimento de metabolitos e MAMPs por PRR de células intestinais orquestra uma resposta imune que resulta em uma liberação contínua de mediadores inflamatórios, compostos antimicrobianos e formação de uma camada de muco. Produtos derivados da microbiota, incluindo nutrientes, ácidos graxos de cadeia curta e MAMPs são translocados do intestino, alcançando a circulação sistêmica e modulando a resposta inflamatória em sítios distantes. Fonte: Schuijt *et al.*, 2013.

Devido à importante relação entre a colonização do tecido intestinal e a modulação do sistema imune a nível sistêmico, vários estudos têm demonstrado o papel da microbiota na modulação da resposta inflamatória frente a infecções (COSTA *et al.*, 2016; DUMAS *et al.*, 2018; FAGUNDES *et al.*, 2012; KHAN *et al.*, 2016; SCHUIJT *et al.*, 2016). Um trabalho do nosso grupo demonstrou que camundongos isentos de germe são mais susceptíveis à infecção por *Klebsiella pneumoniae*. Esses animais apresentaram uma maior disseminação da bactéria e maior taxa de letalidade em consequência de um menor recrutamento de neutrófilos para o pulmão e menor produção de mediadores inflamatórios, como TNF e CXCL1, associando assim, a hiporresponsividade inflamatória apresentada por esses animais à capacidade de proliferação de *K. pneumoniae* no hospedeiro (FAGUNDES *et al.*, 2012). Ainda, um trabalho recente demonstrou que a microbiota intestinal apresenta papel importante



na patogênese da infecção por *P. aeruginosa*. Utilizando-se de camundongos isentos de germe e da depleção da microbiota através do uso de antimicrobianos, Robak e colaboradores, 2018, demonstraram que a ausência da microbiota resulta no aumento da carga bacteriana no pulmão e no espaço bronco alveolar, assim como menor produção de mediadores inflamatórios. Outros trabalhos utilizando antimicrobianos para a depleção da microbiota também demonstraram o papel da microbiota em outros modelos de infecção pulmonar como os causados por Influenza, *Streptococcus pneumoniae* e *Mycobacterium tuberculosis* (KHAN *et al.*, 2016).

Como descrito no item anterior, uma microbiota saudável é importante para uma série de funções fisiológicas do hospedeiro, como metabolismo de nutrientes e modulação da resposta imune. Esse estado de ecossistema balanceado da microbiota intestinal é denominado eubiose. O estado de eubiose intestinal é caracterizado por uma microbiota diversa, com predominância de espécies bacterianas pertencentes aos dois principais filos, Firmicutes e Bacteroidetes (IEBBA *et al.*, 2016; RINNINELLA *et al.*, 2019). Entretanto, o desequilíbrio da microbiota intestinal, denominado disbiose, pode contribuir para o desenvolvimento de diversas doenças, como, por exemplo, as doenças inflamatórias intestinais (IBDs), a asma, a diabetes e a obesidade (LEVY *et al.*, 2017; ROUND; MAZMANIAN, 2009). Além disso, a disbiose intestinal também favorece o crescimento da *Klebsiella pneumoniae* no pulmão, em um modelo experimental (SAMUELSON *et al.*, 2017). Assim, a disbiose pode ser definida como uma alteração na composição e na função da microbiota que pode ser causada por um conjunto de fatores ambientais (por exemplo, a exposição a antimicrobianos) ou relacionados ao hospedeiro (estilo de vida e fatores genéticos) que perturbam o ecossistema microbiano (LEVY *et al.*, 2017). VANGAY *et al.*, 2015 descreveu 4 tipos de disbiose: (1) perda de táxons-chaves, (2) perda da diversidade, (3) expansão de patobiontes e (4) mudança na capacidade metabólica.

O uso de antimicrobianos é um dos principais indutores da disbiose intestinal. Normalmente, os antimicrobianos são prescritos e administrados com o objetivo de eliminar bactérias patogênicas em quadros de infecções bacterianas. No entanto, alguns antimicrobianos não apresentam seletividade, sendo capazes de também eliminar microrganismos não patogênicos pertencentes a microbiota intestinal,

levando ao quadro de disbiose (NEUMAN *et al.*, 2018). A alteração da microbiota intestinal pelo uso de antimicrobianos depende da classe do antimicrobiano, da dose, período de uso, do mecanismo de ação e dos alvos bacterianos (RINNINELLA *et al.*, 2019). A exposição a antimicrobianos, mesmo por curtos períodos de tempo e especialmente durante a infância tem efeitos duradouros sobre a microbiota, podendo alterar as características taxonômicas, genômicas e funcionais da microbiota, afetando sua riqueza e diversidade (PUPIN *et al.*, 2018). Seus efeitos podem ser transitórios ou, às vezes, permanentes, podendo estar associados à predisposição a diversas doenças, como asma, diabetes, obesidade, além de induzir maior suscetibilidade à infecção por *Clostridium difficile*, por *Salmonella enterica* serovar Typhimurium e por *Citrobacter rodentium* (SOMMER *et al.*, 2017). Além do uso de antimicrobianos, a hospitalização do paciente já é capaz de levar a disbiose da microbiota intestinal (BARTOSCH *et al.*, 2004; BRAUN *et al.*, 2017). Um estudo recente comparou o microbioma de pacientes idosos saudáveis e pacientes idosos hospitalizados que não receberam antibioticoterapia. Este estudo demonstrou uma redução nos grupos *Bacteroides* e *Prevotella* e aumento no grupo Enterobacteriaceae no grupo de pacientes hospitalizados (BARTOSCH *et al.*, 2004).

Um estudo em humanos demonstrou que voluntários saudáveis tratados por 1 semana ou menos com antimicrobianos apresentaram uma alteração na microbiota intestinal que persistiu de 6 meses a 2 anos após o fim do tratamento. A disbiose nesses voluntários foi caracterizada por perda na diversidade microbiana, aumento de amostras resistentes a antimicrobianos e regulação positiva de genes de resistência a antimicrobianos (LANGDON; CROOK; DANTAS, 2016). Ainda, através de análises metabolômicas, estudos também demonstraram que a exposição a altas concentrações de antimicrobianos reduz ou elimina a maioria dos produtos do metabolismo bacteriano como os AGCC e ácidos biliares secundários e levam ao acúmulo de seus precursores (incluindo oligossacarídeos, poliois e ácidos biliares primários). Além disso, vários compostos das vias metabólicas dos ácidos biliares, esteróides e o triptofano são significativamente alterados pelo tratamento com antimicrobianos (BECATTINI; TAUR; PAMER, 2016; LANGDON; CROOK; DANTAS, 2016).

Esses metabólitos produzidos pela microbiota intestinal disbiótica podem ser capazes de modular fatores de virulência de agentes patogênicos. O succinato, por exemplo, tem importante papel na regulação de genes de virulência de patógenos intestinais como, *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC), *Clostridium difficile* e *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Curtis, 2014, demonstrou que a presença da bactéria comensal *Bacteroides thetaiotaomicron* é capaz de induzir a expressão da ilha de patogenicidade LEE em EHEC devido à sua capacidade de produzir altas concentrações de succinato. Já na infecção por *C. difficile*, estudos demonstraram que o succinato produzido pela microbiota após o tratamento com antimicrobianos aumenta a capacidade desse patógeno em se multiplicar. Além disso, FERREYRA *et al.*, 2014 demonstraram que camundongos tratados com antimicrobianos e colonizados com *Bacteroides thetaiotaomicron* apresentam maior lesão e maior carga bacteriana após a infecção com *C. difficile*. Essa maior susceptibilidade a infecção é devido a maior produção de succinato pelo *B. thetaiotaomicron* e pela capacidade do *C. difficile* em utilizar o succinato para sua nutrição (FERREYRA *et al.*, 2014). Por fim, outros metabólitos como o butirato, o acetato e o propionato também foram capazes de regular genes de virulência em patógenos intestinais (CURTIS & SPERANDIO, 2011).

### 1.3 Metabolismo de triptofano

O triptofano é um aminoácido essencial adquirido somente através da dieta devido a incapacidade de síntese pelo hospedeiro (ZHANG; DAVIES, 2016). O triptofano é encontrado em uma variedade de alimentos como peixes, frutas, ovos, carnes, leite e chocolate. Atualmente, recomenda-se a ingestão de aproximadamente 250 a 425 mg/d/adulto, mas geralmente ocorre a ingestão de aproximadamente 900 a 1000mg/d/adulto (ZHANG, L. S.; DAVIES, 2016; Dehghani, 2019). 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; OTTEN; MERLOT, 2011).

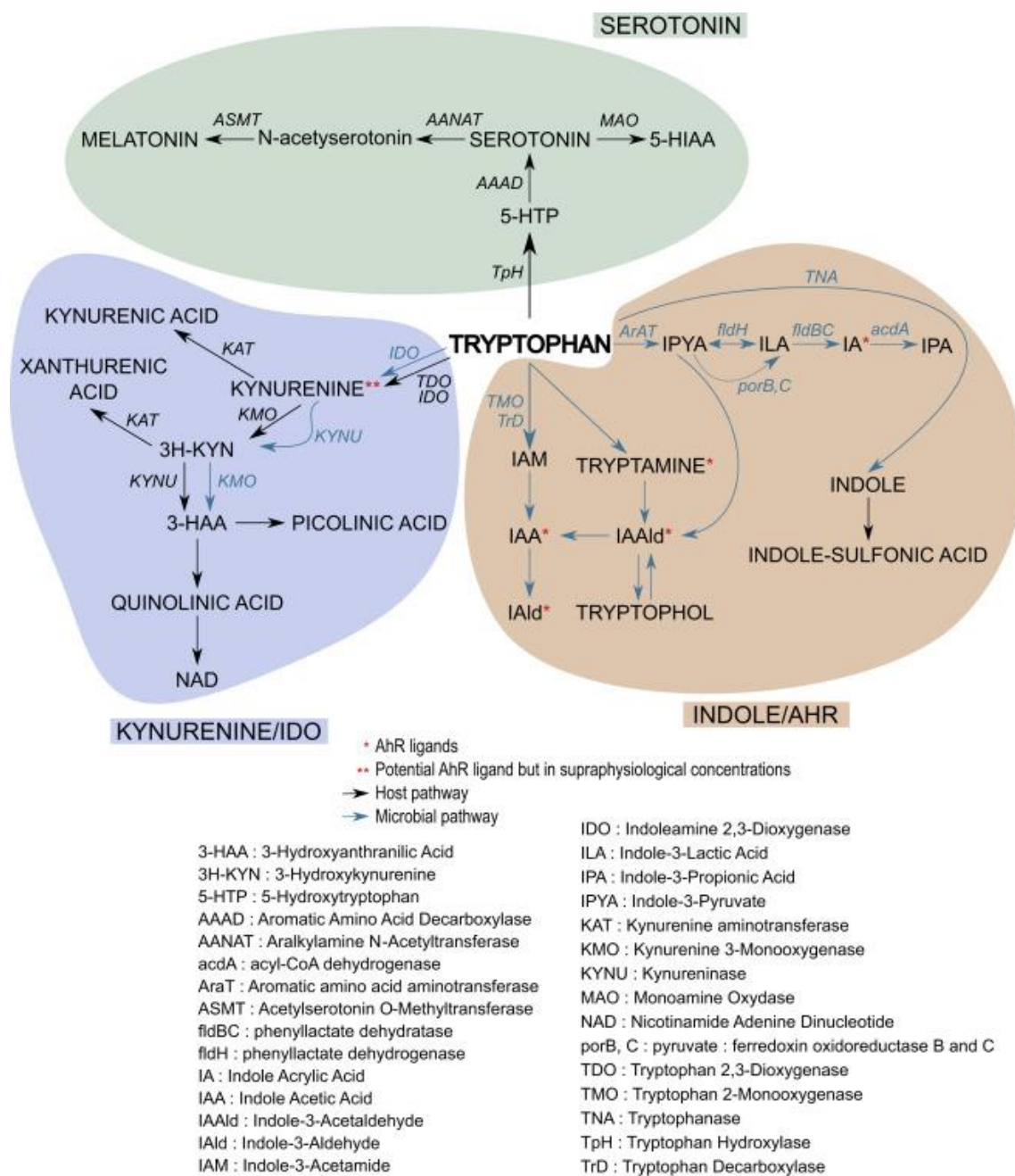
No hospedeiro, o triptofano é principalmente utilizado para a formação de proteínas. No entanto, o triptofano ainda pode ser catabolizado por duas principais vias: a via da serotonina e a via das quinureninas (Kyn). A via das Kyn é responsável pelo metabolismo de aproximadamente 90% do triptofano livre. No primeiro passo dessa via, o triptofano é metabolizado pelas enzimas triptofano-2,3-dioxigenase (TDO) ou indolamina-2,3-dioxigenase 1 (IDO1) em quinurenina. A enzima TDO é encontrada principalmente em células hepáticas enquanto a enzima IDO1 é encontrada principalmente em células do sistema nervoso, do sistema imune e em células epiteliais intestinais. Em seguida, a quinurenina será convertida em ácido quinurênico e em 3-hidroxiquinurenina que serão catabolizados produzindo NAD (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo), ácido picolínico e ácido xanturênico (Fig.5) (AGUS; PLANCHAIS; SOKOL, 2018; TALEB, 2019). Na mucosa intestinal e em ambientes tumorais, a enzima IDO1 tem se mostrado essencial para induzir uma resposta imune anti-inflamatória imunossupressora e a proliferação celular (GAO et al., 2018). Dessa forma, a enzima IDO1 tem apresentado papel importante em diversas doenças, como alergias, doenças autoimunes, doenças psíquicas e neurodegenerativas e doenças infecciosas, como HIV e tuberculose (SHUN LOTT, 2020; WANG *et al.*, 2015).

A microbiota intestinal pode também influenciar no metabolismo de triptofano do hospedeiro. Diversos trabalhos têm demonstrado que na ausência da microbiota intestinal ocorre uma alteração do metabolismo de triptofano, com diminuição dos níveis circulantes de quinurenina. De maneira interessante, essa diminuição do metabolismo de triptofano pela via das quinureninas está relacionado, pelo menos em parte, com uma menor ativação do sistema imune, uma vez que a ativação dos receptores do tipo TLRs pela microbiota intestinal são essenciais para a produção das quinureninas (GAO *et al.*, 2018). Além disso, outros metabólitos produzidos pela microbiota intestinal, como os SCFAs, também são capazes de modular a via da quinureninas. O butirato pode regular negativamente a expressão da IDO1 por dois mecanismos distintos: o primeiro se dá através da inibição da fosforilação de STAT1 dependente de IFN gama e, conseqüentemente, diminuição da transcrição da IDO; o segundo mecanismo se dá através da regulação negativa da transcrição da IDO, agindo como um inibidor de histona desacetilase. Dessa forma, pela inibição da atividade da IDO, o butirato suprime a produção de quinurenina a partir do triptofano (GAO, K. *et al.*,

2020). Além de interferir no metabolismo de triptofano pelo hospedeiro, a microbiota intestinal pode também metabolizar o triptofano, produzindo diversos metabólitos indólicos (Fig.5) (GAO *et al.*, 2018).

Uma das vias presentes principalmente em bactérias Gram-negativo ocorre através da enzima triptofanase (TnA), produzindo como produto final o indol, que pode ser detectado no intestino de humanos e camundongos em uma concentração que varia de 250-1100µM (HUBBARD; MURRAY; PERDEW, 2015). Após sofrer essa metabolização inicial pela microbiota intestinal, o indol atinge a circulação hepática, onde 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 em concentrações entre 10–200 µM, atuando como um forte agonista de AHR (receptor de hidrocarbonetos aromáticos) (HUBBARD; MURRAY; PERDEW, 2015).

Além desse metabolismo, 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). Estes, por sua vez, são precursores de metabólitos como, ácido indol-3-láctico (ILA), ácido indol-acrílico (IA), ácido indol-3 propiônico (IPA), ácido indol-acético (IAA) e ácido indol-3-acetaldeído (IAld) (AGUS; PLANCHAIS; SOKOL, 2018; HUBBARD; MURRAY; PERDEW, 2015).



**Figura 5- Metabolismo do triptofano:** O triptofano pode ser metabolizado diretamente por bactérias da microbiota intestinal, produzindo indol e seus derivados ou pelo hospedeiro através da via das quinureninas, formando como produto final NAD e da serotonina. Fonte: Agus *et al.*, 2018.

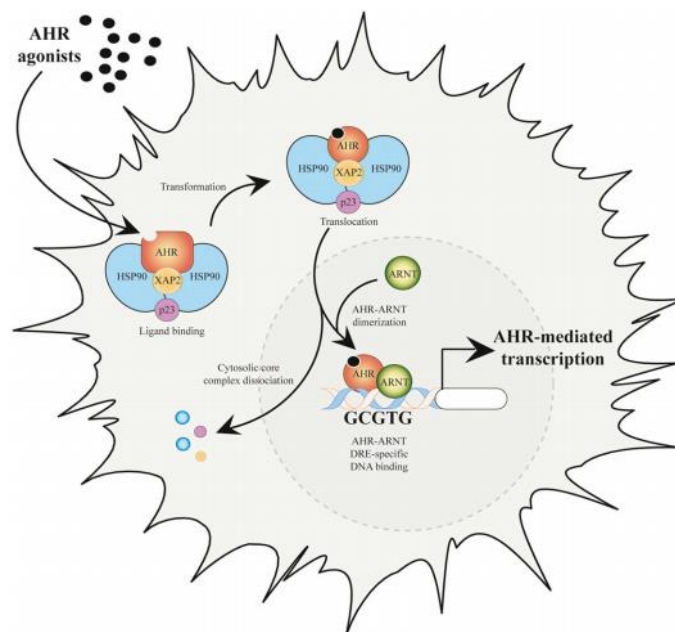
Tanto as quinureninas quanto alguns metabólitos de triptofano de origem microbiana são capazes de ativar o receptor de hidrocarbonetos aromáticos (AHR) (Fig.5). O AHR é um fator de transcrição que é amplamente expresso em diversos tipos celulares, incluindo células imunes, como macrófagos, neutrófilos e células B, além de células

epiteliais e algumas células tumorais (TAKAMURA *et al.*, 2010; HUBBARD *et al.*, 2015).

Quando inativo, o receptor AHR reside no citosol como parte de um complexo proteico que inclui outras proteínas, como a proteína de choque térmico de 90 kDa (HSP90), a proteína de interação do AHR, p23, e a proteína c-SRC quinase, que serão responsáveis por proteger o receptor da proteólise e por manter o receptor em uma conformação adequada. Após a ligação dos agonistas ao receptor, ocorre uma alteração conformacional que resulta na dissociação do AHR das proteínas e na exposição de sua sequência de localização nuclear. Após essa etapa, o AHR transloca-se para o núcleo onde dimeriza com o translocador nuclear de AHR (ARNT) para formar um complexo de ligação ao DNA que irá controlar a expressão de genes-alvo que contêm elementos de resposta xenobiótica (XREs) em suas regiões promotoras como as enzimas do citocromo P450 1a1, 1a2 e 1b2, que são importantes para o metabolismo de toxinas (Fig.6) (JARONEN; QUINTANA, 2014). Ainda, a ativação do receptor AHR resulta em uma resposta de imunossupressão, induzindo a geração de células T reguladoras (Treg) e diferenciação em Th17, em doenças autoimunes, além de indução de IL-22, que é de extrema importância para a manutenção da barreira epitelial intestinal (JULLIARD; FECHNER; MEZRICH, 2014).

De maneira interessante, recentemente o receptor AHR foi proposto como um PRR para o reconhecimento de *P. aeruginosa*. Foi demonstrado que o receptor AHR é capaz de reconhecer diversos fatores da *P. aeruginosa* como, o pigmento piocianina e moléculas de quórum sensing, fazendo com que este receptor seja importante para uma resposta imune adequada e, conseqüentemente, controle da carga bacteriana (MOURA-ALVES *et al.*, 2014; MOURA-ALVES *et al.*, 2019).

Diante do exposto, a hipótese do presente trabalho é que a disbiose da microbiota intestinal pelo uso de antimicrobiano torna o hospedeiro mais susceptível a infecção por *P. aeruginosa* por alterar o metabolismo de triptofano e, conseqüentemente, a resposta do hospedeiro à infecção através da ativação do receptor AHR.



**Figura 6- Via de ativação canônica do receptor AHR:** Após a interação com o ligante, o AHR no citosol transloca para o núcleo, onde se associa com o translocador nuclear de AHR (ARNT). O heterodímero AHR/ARNT formado se liga a uma sequência consenso de DNA nas regiões promotoras e inicia a transcrição de genes, incluindo aqueles que codificam as enzimas envolvidas no metabolismo de toxinas. Fonte: Hubbard *et al.*, 2015



## 2 JUSTIFICATIVA

*Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno oportunista altamente prevalente em infecções respiratórias em pacientes hospitalizados, principalmente em unidades de terapia intensiva ou em imunocomprometidos. A *P. aeruginosa* é responsável por aproximadamente 10% de todas as infecções hospitalares e apresenta uma taxa de mortalidade de cerca de 50%. No âmbito da UTI, a *Pseudomonas aeruginosa* é a terceira bactéria mais prevalente em infecções e está associada a 41,7% dos casos de pneumonia associada a ventilação mecânica. Devido a sua alta prevalência hospitalar e sua grande resistência a antimicrobianos, a infecção por *Pseudomonas aeruginosa* constitui um problema de saúde pública.

Dentre os fatores que predispõe a infecção por *P. aeruginosa* podemos destacar o uso de antimicrobianos que pode estar associado tanto a alteração do perfil de resistência do patógeno como alteração na microbiota normal do hospedeiro (disbiose). De fato, grande parte de pacientes hospitalizados em UTIs estão expostos a uso de antimicrobianos, tornando o estudo desse tema extremamente importante. Diante disso, torna-se relevante o entendimento dos mecanismos envolvidos na maior susceptibilidade do hospedeiro em uso de antimicrobianos a infecção por *P. aeruginosa*. A disbiose está associada a várias alterações metabólicas no hospedeiro, entre elas alterações no metabolismo do triptofano. De forma interessante, estudos anteriores associam metabólitos desse aminoácido com fatores de patogenicidade da *P. aeruginosa*. Entretanto, nenhum estudo prévio demonstra como a relação da disbiose intestinal e o metabolismo de triptofano interfere na resposta do hospedeiro frente a infecção.

Diante disso, a hipótese do trabalho é que a disbiose da microbiota intestinal pelo uso de antimicrobianos torna o hospedeiro mais susceptível a infecção por *P. aeruginosa* por alterar o metabolismo de triptofano e, conseqüentemente, a resposta do hospedeiro à infecção através da ativação do receptor AHR.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o papel do metabolismo de triptofano na patogênese da infecção pulmonar por *Pseudomonas aeruginosa* após indução de disbiose da microbiota intestinal com antibioticoterapia.

#### 3.2 Objetivos específicos

O presente projeto tem como objetivos específicos:

1. Implementar um modelo de disbiose da microbiota intestinal induzida pelo o uso de antimicrobianos;
2. Avaliar se a disbiose intestinal altera o metabolismo de triptofano pela microbiota intestinal e pelo o hospedeiro;
3. Compreender como a disbiose induzida pelo uso de antimicrobianos interfere na resposta do hospedeiro frente a infecção pulmonar por *Pseudomonas aeruginosa*;
4. Entender se o metabolismo de triptofano está alterado em animais eubióticos e disbióticos após a infecção por *Pseudomonas aeruginosa*.
5. Avaliar o papel da enzima IDO1 durante a infecção por *Pseudomonas aeruginosa* em animais eubióticos e disbióticos
6. Avaliar a expressão de AHR em neutrófilos de animais eubióticos e disbióticos infectados com *Pseudomonas aeruginosa*;
7. Avaliar a ativação de AHR no pulmão de animais eubióticos e disbióticos infectados com *Pseudomonas aeruginosa*;
8. Avaliar o papel do receptor AHR durante a infecção por *Pseudomonas aeruginosa* em animais eubióticos e disbióticos;
9. Avaliar a participação do receptor AHR e da enzima IDO1 na fagocitose *in vivo* de *Pseudomonas aeruginosa* em animais eubióticos ou disbióticos.
10. Avaliar o efeito da quinurenina na fagocitose da *Pseudomonas aeruginosa* por macrófagos.
11. Avaliar o efeito do tratamento com quinurenina na infecção *in vivo* por *Pseudomonas aeruginosa*.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 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), camundongos deficientes para o receptor de hidrocarbonetos aromáticos (AhR<sup>-/-</sup>) ou deficientes para a enzima Indolamina-2,3-dioxigenase (IDO1<sup>-/-</sup>) obtidos do biotério do Laboratório de Imunofarmacologia, do Departamento de Bioquímica e Imunologia, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. 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 02/2019.

### 4.2 Indução da disbiose

Para a indução da disbiose, os camundongos receberam, por 14 dias, um coquetel de antimicrobianos, dissolvidos na água de beber, composto por: Ampicilina (1g/L), Vancomicina (500mg/L), Ciprofloxacino (200mg/L), Imipenem (250mg/L), Metronidazol (1g/L) e Nistatina (120mg/L). Os antimicrobianos foram trocados duas vezes por semana. Durante todo o protocolo os animais foram mantidos em isoladores com água e ração autoclavados. Após o final do protocolo, as fezes e soro foram coletadas para as seguintes análises:

#### *4.2.1 Avaliação da composição da microbiota por plaqueamento das fezes em meios de cultura*

Amostras de fezes dos camundongos submetidos ou não ao protocolo de disbiose foram coletadas ao final do tratamento com antimicrobianos para avaliar a capacidade do tratamento em induzir a disbiose. As amostras coletadas, foram pesadas e diluídas em NaCl 0,9% p/v e cultivadas nos meios de cultura Ágar MacConkey (avaliação de enterobactérias), Ágar MRS (ágar De Man, Rogosa e Sharpe para a avaliação de bactérias ácido lácticas) e Ágar BHI (quantificação de bactérias totais). Os meios MacConkey e BHI foram cultivados por 24h a 37°C em aerobiose enquanto o meio MRS foi cultivado por 48 horas também em aerobiose. Após o tempo de incubação,

foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônia e multiplicado pela diluição para encontrar-se o número de unidades formadoras de colônia por g de fezes.

#### *4.2.2 Avaliação da produção de indol pela microbiota fecal*

Para avaliar a produção de indol pela microbiota fecal, um pellet de fezes de cada animal foi coletado e cultivado em 15mL de caldo LB por 48h. Após o final do período de incubação, os tubos foram centrifugados a 300 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado para a dosagem de indol pelo método de Erlich. Para isso, 160µL das amostras, em duplicata, foram adicionadas em uma placa de 96 em fundo U. Em seguida foi adicionado 10µL de ácido tricloroacético 30% v/v e incubado a 50°C por 30 minutos sob agitação. Após os 30 minutos, a placa foi centrifugada a 450 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida 100µL do sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços de fundo chato e foi adicionado 100µL do reagente de Erlich (4-(dimetilamino)-benzaldeído 1,2% p/v em ácido acético glacial) e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente com agitação. A absorbância foi lida em leitor de ELISA com filtro para comprimento de onda de 540nm. Concomitantemente foi realizada a curva padrão de Indol, utilizando o padrão adquirido da Sigma-Aldrich Brasil com 96% de pureza.

#### *4.2.3 Dosagem de metabólitos de triptofano pela técnica de LC-MS*

Primeiramente, as amostras de soro foram submetidas ao protocolo de precipitação de proteínas, onde 150µL de metanol contendo 100ng/mL de fenacetina foi adicionado a 50µL de amostra. Em seguida, as amostras foram vortexadas e centrifugadas a 3000 x g por 10 minutos. Após esta etapa, foi adicionado à resina de C18 que foi responsável por remover os compostos hidrofóbicos. Em seguida, 50µL do sobrenadante foi seco em *speedvac*, reconstituído em água e transferido para tubos específicos. As amostras de curva padrão foram submetidas ao mesmo processo.

As análises por LC-MS foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida de alto desempenho Nexera (UHPLC) (Shimadzu, Kyoto, Japão) acoplado em um espectrômetro de massa de tempo de voo (ESI-QTOF) de alta resolução com eletropulverização por eletromicálise (Bruker, Billerica, MA) e controlado pelo pacote de software Compass 1.7 (Bruker).

A calibração e os dados da amostra foram pós-processados e analisados pelo software QuantAnalysis (Bruker), que extrai os cromatogramas de íons de alta resolução (EICs) dos metabólitos alvo listados e integra os picos cromatográficos nas janelas de tempo de retenção, de acordo com os registros das curvas de calibração dos respectivos padrões. Os fatores de regressão da curva dentro dos intervalos de concentração correspondentes foram 0,995 ou superiores. A detecção dos metabólitos nas amostras foi confirmada por suas massas monoisotópicas ( $m/z$  calc.  $\pm 0,005\text{Da}$ ), tempo de retenção cromatográfica e, se detectável, seus fragmentos na fonte. Os padrões de triptofano, de quinurenina e de ácido kinurênico, assim como o controle interno, fenacetina, foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich com 96% de pureza.

### **4.3 Infecção por *Pseudomonas aeruginosa***

No presente trabalho foram utilizadas duas diferentes cepas de *P. aeruginosa* para a realização do modelo de infecção pulmonar, as cepas PA103 e PAO1. Para preparar o inóculo, as linhagens previamente armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  foram inoculadas no meio de cultura *Pseudomonas isolation agar* e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 14-16 horas. Após o crescimento, com o auxílio de uma alça bacteriológica, colônias foram adicionadas a 1mL de salina 0,9% v/v para a preparação de uma solução bacteriana concentrada. Em seguida, a solução foi diluída seriadamente em uma proporção de 1:2 a fim de se obter uma absorbância de 0,1 a 600nm no leitor de ELISA. A OD de 0,1 equivale a uma concentração de  $2 \times 10^8$  a  $6 \times 10^8$  UFC/mL. Para a infecção, camundongos C57/BL6 fêmeas de 8 semanas de idade foram anestesiados com uma solução contendo cetamina (80 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) e infectados pela via intranasal com  $10^4$  UFC/20 $\mu\text{L}$  da linhagem PA103 ou com  $10^7$  UFC/40 $\mu\text{L}$  da linhagem PAO1 e, após 6h ou 24h da realização da infecção, os animais foram eutanasiados para as análises.

#### 4.4 Avaliação do efeito da disbiose na patogênese da infecção pulmonar por *P. aeruginosa*

Para isso, camundongos C57BL/6 foram submetidos a 14 dias do protocolo de disbiose, conforme descrito no item 4.2. Ao fim do protocolo, os antimicrobianos foram retirados e, após aproximadamente 12h, os animais foram submetidos ao protocolo de infecção (item 4.3), conforme demonstrado na figura 7 e agrupados de acordo com a tabela 1. Com a finalidade de avaliar o papel do receptor AHR após a disbiose, 1h antes da infecção, camundongos receberam pela via subcutânea o antagonista seletivo CH223191 na dose de 10mg/kg (NEAMAH *et al.*, 2019). Para avaliar o papel da enzima IDO1 após a disbiose, os camundongos receberam por via intraperitoneal o inibidor 1-metil-triptofano (1-MT) na dose de 70mg/kg (LAUGERAY *et al.*, 2016) também 1h antes da infecção. Para avaliar o papel do excesso de quinurenina na infecção, animais WT receberam via intraperitoneal, uma hora antes da infecção a quinurenina na dose de 25mg/kg. Uma outra estratégia para avaliar o papel da enzima IDO1 e do receptor AHR foi através do uso de camundongos IDO1<sup>-/-</sup> e AHR<sup>-/-</sup>.

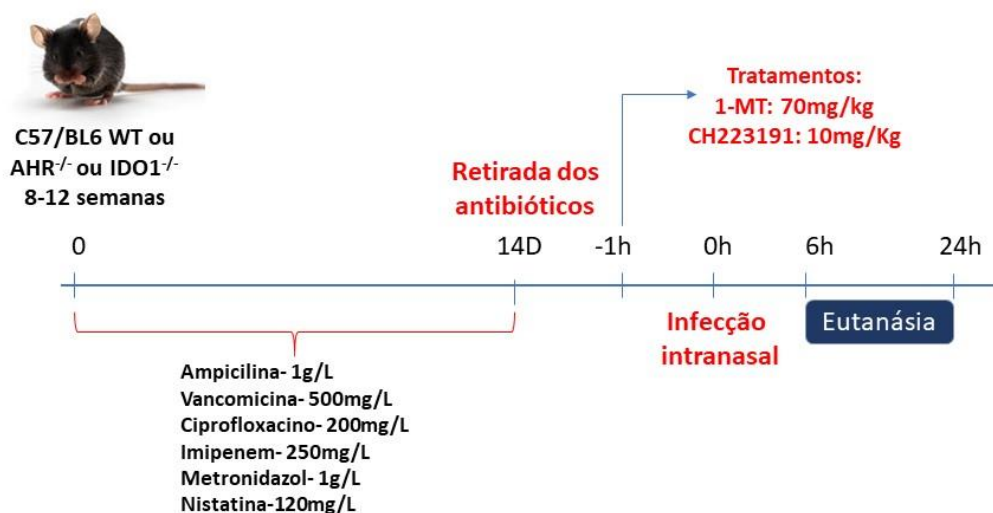


Figura 7: Planejamento experimental para a indução da disbiose e posterior infecção por *P. aeruginosa*: Camundongos C57/BL6 WT, AHR<sup>-/-</sup> ou IDO1<sup>-/-</sup> receberam um coquetel de antimicrobianos

na água de beber 14 dias. No 14º dia os antimicrobianos foram retirados e 12h após a retirada os animais foram infectados via intranasal com *Pseudomonas aeruginosa*. 6 ou 24 horas após a infecção os animais foram eutanasiados e os tecidos coletados. Para avaliar o papel da enzima IDO1 1h antes da infecção animais WT receberam o inibidor de IDO1 1-MT via intraperitoneal na dose de 70mg/kg. Para avaliar o papel do receptor AHR, animais WT receberam o antagonista de AHR CH via subcutânea na dose de 10mg/kg.

GRUPO	DESCRIÇÃO
Eubiótico NI	receberam água e não foram infectados
Eubiótico PAO1	receberam água e foram infectados com a linhagem PAO1
Disbiótico NI	receberam coquetel de antimicrobianos e não foram infectados
Disbiótico PAO1	receberam coquetel de antimicrobianos e foram infectados com a linhagem PAO1

**Tabela 1- Divisão dos grupos experimentais e descrição.**

#### **4.5 Determinação da quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC) de *P. aeruginosa***

A carga bacteriana foi quantificada no pulmão, no lavado bronco-alveolar e no sangue dos animais infectados. No momento da eutanásia, o sangue dos camundongos foi coletado por punção da veia cava. Para a realização do plaqueamento, o pulmão, o BAL e o sangue foram homogeneizados e diluídos com NaCl 0,9% p/v na proporção de 1:10 e a partir dessa diluição, diluições seriadas foram realizadas. Após a realização da diluição, 10µL de cada ponto foi plaqueado em triplicata no meio sólido *Pseudomonas isolation ágar* (PIA) e incubado por 24h a 37°C e então o número de unidades formadoras de colônia foi contado.

#### **4.6 Lavado bronco-alveolar**

O lavado bronco-alveolar (BAL) foi realizado para obter leucócitos presentes nos espaços alveolares. A traqueia foi exposta e um cateter de polietileno de 1.7mm de diâmetro externo foi inserido. O BAL foi realizado pela instilação de duas alíquotas de 1mL de PBS (3 vezes cada uma). O número total de leucócitos foi determinado por contagem de leucócitos em uma câmara modificada de Neubauer após a coloração com corante de Turk, na diluição de 1:10. Contagens diferenciais foram obtidas por

preparações de *Cytospin* e consequente avaliação da porcentagem de cada leucócito em uma lâmina corada pelo kit panótico da empresa RenyLab.

#### **4.7 Influxo de neutrófilos pela quantificação da atividade de mieloperoxidase (MPO)**

Para avaliar o acúmulo de neutrófilos no pulmão foi utilizado o método de quantificação da atividade de mieloperoxidase. O pulmão foi coletado e pesado e suspenso em salina EDTA (100mg de tecido/1mL de salina), submetido à homogeneização e centrifugação (3000 x g, 15 minutos). O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspenso em solução NaCl 0.2% p/v gelada e 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 com HTAB a 5% p/v e homogeneizado por 30 segundos. As amostras foram seguidamente congeladas e descongeladas três vezes em nitrogênio líquido, centrifugadas (3000 x g, 15 minutos a 4°C) e o sobrenadante foi coletado para ensaio de MPO. A atividade de mieloperoxidase (MPO) das amostras foi determinada em leitor de ELISA (450 nm) usando tetramethylbenzidine (1.6 mM) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.5 mM). Os resultados foram expressos como O.D. a 450 nm.

#### **4.8 Quantificação de citocinas e quimiocinas por ELISA**

A dosagem de citocinas e quimiocinas foi realizada a partir do sobrenadante do lavado bronco-alveolar e do extrato de pulmão. Para obtenção do extrato de tecido, amostras de tecido foram homogeneizadas numa solução de PBS contendo inibidor de proteases (0,1 mM “phenylmethilsulfonyl fluoride”, 0,1 mM “benzethonium chloride”, 10 mM “EDTA” e 80 KI de aprotinina A) e 0,05% v/v de “Tween 20”, na proporção de 0,1 g de tecido para cada 1 mL de solução, utilizando-se o homogeneizador Power Gen 125 (Fischer Scientific Pennsylvania, USA). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3000 x g por 10min a 4°C (em centrífuga BR4, Jouan Winchester VA, USA) e os sobrenadantes recolhidos e estocados em microtubos (Tubo 3810, eppendorf do Brasil, São Paulo, SP, Brasil) a -20°C, para posterior análise. Para realização do ensaio, as concentrações utilizadas para os anticorpos e reagentes foi baseada nos protocolos dos fabricantes (R&D Systems). Inicialmente, placas de 96



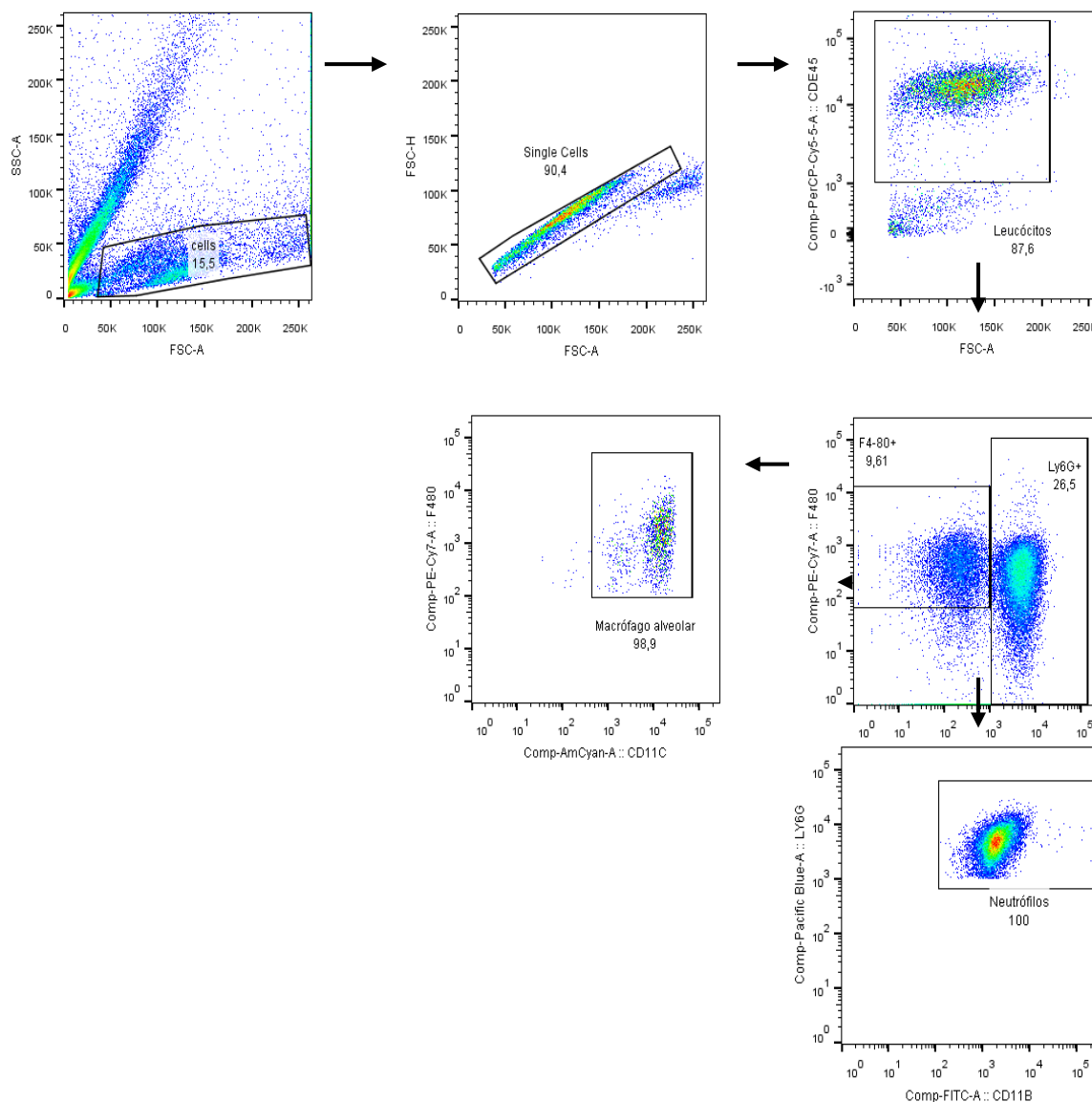
poços (Nunc. Immunosorb, Naperville, IL) foram recobertas com anticorpos purificados específicos para as moléculas em análise (IL-1  $\beta$ , IL-10, TNF e CXCL1), sendo 50 $\mu$ L/poço, em PBS, e incubadas por 18 horas a 4°C. Numa segunda etapa, as placas foram lavadas com PBS acrescido de Tween 20 0,1% v/v, e bloqueadas pela adição de BSA 1% p/v em PBS (100 $\mu$ L/poço) por 2 horas, sob agitação. Após nova lavagem, amostras de sobrenadante de extrato de tecidos diluídas em BSA 1% p/v em PBS foram adicionadas em duplicada (50 $\mu$ L/poço), e, então, incubadas por 18 horas a 4°C. Após lavagem, foi adicionado anticorpo específico biotilado e, após incubação por 2 horas à temperatura ambiente e nova lavagem, foi utilizada uma solução de estreptavidina acoplada à enzima peroxidase, seguido de incubação por 20 minutos sob agitação, à temperatura ambiente. Após lavagem, a reação foi realizada pela adição de 50 $\mu$ L/poço do cromógeno OPD (Sigma) a 0,4mg/mL, contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,2 $\mu$ L de uma solução a 30% v/v em cada mL de tampão) em tampão citrato (pH 5,0). A reação foi interrompida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1M e a absorbância foi lida em leitor de ELISA com filtro para comprimento de onda de 492nm (Status-labsystems, multiskan RC, Uniscience do Brasil). Os dados foram expressos em pg/mL ou pg/100mg de tecido de acordo com curva padrão realizada nas mesmas condições.

#### **4.9 Análise histológica**

O pulmão foi isolado e imerso em formol tamponado a 10% para fixação durante 48 horas. Em seguida, os tecidos foram desidratados e incluídos em blocos de parafina. Cortes de 5 milímetros de espessura foram dispostos em lâminas de microscopia e coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) para diferenciação de porções basófilas e acidófilas e categorização comparativa da inflamação. A análise histopatológica foi realizada após o exame das lâminas ao microscópio por um patologista experiente, de forma cega ao desenho experimental. O escore histopatológico foi realizado com base em Hovart JC *et al.*, 2007 avaliando: a inflamação nas vias aéreas e nos vasos - 0 (ausente) a 4 (grave); inflamação no parênquima - 0 (ausente) a 5 (muito grave); e infiltrado de PMN - 0 (ausente) a 5 (muito grave). Sendo 0 o escore mínimo e 14 o escore máximo.

#### 4.10 Citometria de fluxo

Para a realização da marcação para citometria de fluxo, as células recuperadas no lavado foram adicionadas em placas de 96 poços com fundo em U e, após centrifugação e descarte do sobrenadante, incubadas ao abrigo da luz a 4°C por 20 minutos com um mix de anticorpos contendo os seguintes anticorpos conjugados a fluorocromos: anti-mouse CD45 (clone 30-F11, diluição 1:200), anti-mouse CD11b (clone M1/70, diluição: 1:50), anti-mouse Ly6G (clone 1A8, diluição 1:, anti-mouse ), F4/80 (clone BM8, diluição 1:100), anti-mouse CD206 (clone C068C2, diluição 1:100) e anti-mouse CD11c (Cat. 03212-40-10 0, diluição 1:50) . Após a incubação, as amostras foram lavadas com 150µl de PBS contendo 0,5% p/v de BSA e centrifugadas por 10 minutos a 4° C a 400 x g. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 200 µL de solução de fixação (formaldeído a 4% v/v em PBS) e incubados por 20 minutos ao abrigo da luz a 4°C. Após incubação, as amostras foram novamente centrifugadas e lavadas com PBS. Em seguida, foi realizado a permeabilização das células para marcação intracelular através da adição de 200µL do tampão de permeabilização (eBioscience) e incubadas ao abrigo da luz a 4°C por 20 minutos. Após essa permeabilização as amostras foram lavadas com tampão de permeabilização e foi adicionado o anticorpo não conjugado rat-anti-mouse AhR (clone W16012A, diluição: 1:100) por 20 minutos a temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram lavadas com tampão de permeabilização e foi adicionado o anticorpo anti-rat IgG conjugado a fluorocromos e incubado por 20 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram lavadas e em seguida fixadas com formaldeído a 4% v/v em PBS. As amostras foram adquiridas no citômetro FACSCanto II (BD Biosciences) e analisadas no software FlowJo V10 (Tree Star Inc). Na figura 8 demonstramos qual foi a estratégia de análise utilizada no trabalho.



**Figura 8- Estratégia para a análise da citometria de fluxo:** Primeiramente foi realizado o gate SSC-AxFSC-A para a definição morfológica das células. Em seguida foi realizado o gate FSC-HxFSC-A para a definição de células individualizadas e em seguida a população de leucócitos através do gate de CD45xFSC-A. O próximo passo da estratégia foi realizar os gates de células F4/80<sup>+</sup> e Ly6G<sup>+</sup>. Dentro do gate de células Ly6G<sup>+</sup> foi realizado o gate Ly6Gx CD11b, onde células duplo positivas foram consideradas neutrófilos. Já para a caracterização dos macrófagos alveolares, foi analisado o gate F4/80xCD11c dentro do gate de células F4/80<sup>+</sup>. Foi considerado macrófago alveolar, as células que apresentaram dupla marcação para F4/80 e CD11c.

#### 4.11 Avaliação da produção de ROS

Para a marcação de ROS, as células recuperadas do BAL foram incubadas em RPMI 1640 contendo 10% de FBS com 5  $\mu$ M CellROX™ 31 Deep Red Reagent (Invitrogen) a 37°C por 30 min. Em seguida, as células foram incubadas ao abrigo da luz a 4°C

por 20 minutos com um mix de anticorpos contendo os seguintes anticorpos conjugados a fluorocromos: anti-mouse CD45, anti-mouse CD11b, anti-mouse Ly6G, anti-mouse F4/80 e anti-mouse CD11c. Após a incubação, as amostras foram lavadas com 150µl de PBS contendo 0,5% p/v de BSA, centrifugadas por 10 minutos a 4° C a 400 x g e ressuspendidas em PBS. As amostras foram lidas e adquiridas no citômetro FACSCanto II e analisadas no software FlowJo V10 (Tree Star Inc).

#### 4.12 Fagocitose de *Pseudomonas aeruginosa* por macrófagos alveolares *in vivo*

Para a realização do ensaio de fagocitose *in vivo*, camundongos C57/BL6 WT, IDO1<sup>-/-</sup> e AHR<sup>-/-</sup> foram infectados com 10<sup>7</sup> UFC da linhagem PAO1 de *Pseudomonas aeruginosa* conforme o item 4.3 desta seção. 2h após a infecção, os camundongos foram eutanasiados e o BAL coletado para a análise da fagocitose e avaliação da expressão de CD206 por citometria de fluxo, conforme o item 4.11 dessa seção. Para a avaliação da fagocitose, primeiramente foi realizada a contagem dos leucócitos presentes no BAL ao microscópio óptico. Em seguida, o citospin foi realizado contendo 1x10<sup>4</sup> células. Para a contagem dos macrófagos contendo bactérias internalizadas e determinação do índice fagocítico, as lâminas foram coradas pelo kit panótico da empresa RenyLab. Para o cálculo do índice fagocítico, foi realizado a contagem de macrófagos, macrófagos contendo bactérias internalizadas e o número de bactérias internalizadas em cada macrófago e em seguida o seguinte cálculo foi realizado:

$$\text{Índice fagocítico} = \left( \frac{\text{n}^\circ \text{ de bactérias internalizadas}}{\text{n}^\circ \text{ total de macrófagos contados}} \right) \times \left( \frac{\text{n}^\circ \text{ de macrófagos com bactéria internalizadas}}{\text{n}^\circ \text{ total de macrófagos contados}} \right) \times 100$$

#### 4.13 Diferenciação de macrófagos derivados de medula (BMDM)

Para a obtenção de macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs, do inglês *Bone Marrow Derived Macrophages*), camundongos C57/BL6 selvagens (WT) e IDO1<sup>-/-</sup> foram eutanasiados por overdose de anestésico seguido de deslocamento cervical. O fêmur e a tíbia de cada pata foram isolados e limpos de tecidos adjacentes para subsequente lavagem com o meio de cultura DMEM com antibiótico e sem qualquer suplementação (DMEM 0%) para remoção da medula óssea. Em seguida, a suspensão contendo as células da medula óssea foi centrifugada a 400g por 10

minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o remanescente (células) ressuspenso. As células foram contadas em câmara de Neubauer e cultivadas em placas de Petri na concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL em volume total de 10 mL de meio DMEM contendo 20% de soro fetal bovino (SFB), 30% de sobrenadante de células L929 e 50 µg/mL de gentamicina. O sobrenadante L929 deriva de uma linhagem de células de fibroblastos de camundongos (L929) que produzem o fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), um fator de crescimento que desempenha papel crítico na sobrevivência e diferenciação da linhagem de células hematopoiéticas. As placas foram incubadas em estufa de células primárias em câmara de CO<sub>2</sub> a 5% a 37°C, por um período total de 7 dias. A cada 48 horas foram adicionados mais 5 mL de DMEM 20/30 em cada placa. Após 7 dias de diferenciação, as células foram removidas da placa de Petri utilizando-se um raspador de células de plástico e adicionadas em placas de 96 poços a uma concentração de  $1 \times 10^5$  células por poço.

#### **4.14 Extração de macrófagos alveolares**

Primeiramente camundongos C57BL/6 WT e IDO1<sup>-/-</sup> foram anestesiados e eutanasiados. Após a eutanásia, a traqueia foi exposta e um cateter de polietileno de 1.7mm de diâmetro externo foi inserido. A extração dos macrófagos alveolares foi realizada pela instilação de 5 alíquotas de 1ml de PBS + 0,06mM EDTA. Após a remoção, foi realizado a contagem das células recuperadas e  $1 \times 10^5$  células por poço foram adicionadas em placas de 96 poços. Antes da realização dos experimentos foi aguardado 24h para que as células aderissem ao fundo da placa.

#### **4.15 Ensaio de fagocitose e *killing* da *Pseudomonas aeruginosa***

Para a realização do ensaio de fagocitose e *killing*, macrófagos derivados de medula óssea e macrófagos alveolares foram desafiados com *Pseudomonas aeruginosa* (linhagem PAO1) na MOI de 10 por 30 minutos. Após esse tempo os macrófagos foram incubados com 100 µg/ml de gentamicina por 15 minutos. Para a análise de Killing, os macrófagos derivados de medula foram incubados com gentamicina por 60 minutos e os macrófagos alveolares por 120 minutos. Após a incubação, foram realizadas 3 lavagens com PBS1x. Em seguida, os macrófagos foram lisados com 0.1% v/v Triton X-100 in PBS. Diluições seriadas do lisado foram semeadas em PIA

(Pseudomonas isolation agar) e incubadas a 37°C por 24h em aerobiose. A fagocitose e o *killing* foram determinados pela contagem de UFC.

#### **4.16 Análise estatística**

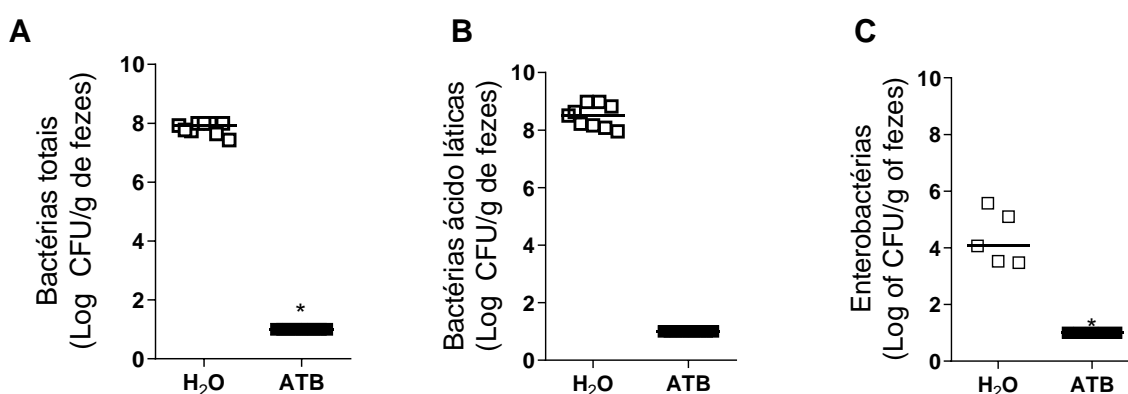
Foi realizado teste de normalidade para verificar se as amostras apresentavam distribuição Gaussiana. As comparações estatísticas entre os vários grupos foram feitas por ANOVA “one way” seguida de pós-teste Newman-Keuls. Para comparação entre dois grupos, quando necessário, foi utilizado o teste “t de Student”. Os resultados foram apresentados como média±erro padrão médio ou como mediana. O nível de significância adotado foi de  $P < 0,05$ . Para a realização de todas as análises, foi utilizado o software GraphPad PRISM, GraphPad software Inc. (San Diego, CA, USA).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 O uso prolongado a um coquetel de antimicrobianos altera a microbiota intestinal de camundongos:

Para o estabelecimento do modelo de disbiose, animais C57BL/6 receberam, por 14 dias, um coquetel de antimicrobianos na água de beber. Como podemos observar, as fezes de animais que receberam apenas água apresentam uma grande quantidade de bactérias aeróbias totais (Fig.9A), bactérias produtoras de ácido láctico (Fig. 9B) e enterobactérias (Fig. 9C), o que é característico de uma microbiota intestinal saudável.

Por outro lado, animais que receberam o coquetel de antimicrobianos apresentaram uma redução de todos esses grupos bacterianos (Fig. 9 A, B e C), demonstrando que o protocolo de antibioticoterapia utilizado foi capaz de reduzir os grupos bacterianos avaliados na microbiota intestinal.

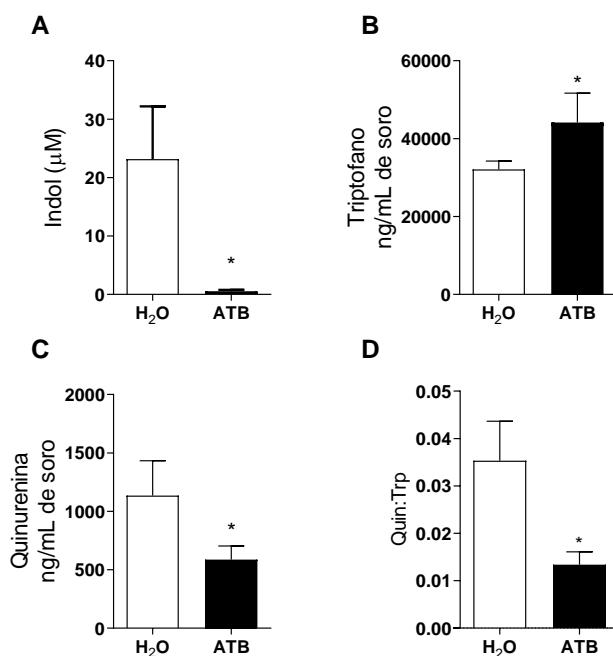


**Figura 9- Camundongos que receberam o coquetel de antimicrobianos apresentam cargas bacterianas reduzidas de diferentes grupos na microbiota fecal:** Camundongos C57/BL6 receberam um coquetel de antimicrobianos por 14 dias. Após o 14° dia, as fezes foram coletadas para análise dos seguintes grupos bacterianos: bactérias aeróbias totais (A), bactérias produtoras de ácido láctico (B) e enterobactérias (C). A análise estatística foi realizada através do teste t de Student. \*P<0,05 vs H<sub>2</sub>O. N experimental: 5 a 8.

### 5.2 O uso de antimicrobianos induz alteração do metabolismo de triptofano

Uma vez que a microbiota intestinal possui um papel importante no metabolismo de triptofano (GAO *et al.*, 2018), nosso próximo passo foi avaliar se o nosso protocolo de

tratamento com antimicrobianos era capaz de alterar o metabolismo de triptofano no hospedeiro. Através da cultura de bactérias fecais em meio líquido rico observamos que as bactérias fecais de animais controle eram capazes de metabolizar o triptofano, produzindo indol. No entanto, em animais que recebem antimicrobianos, a produção de indol foi significativamente abolida (Fig.10A). Além disso, animais tratados com antimicrobianos também apresentaram aumento dos níveis séricos de triptofano (Fig.10B) e redução dos níveis de quinurenina (Fig.10C) quando comparados a animais que receberam água. Isso resultou em uma menor razão quinurenina/triptofano no plasma de animais que receberam antimicrobianos, indicando uma alteração da atividade de enzimas que convertem o triptofano a quinurenina nesses animais.

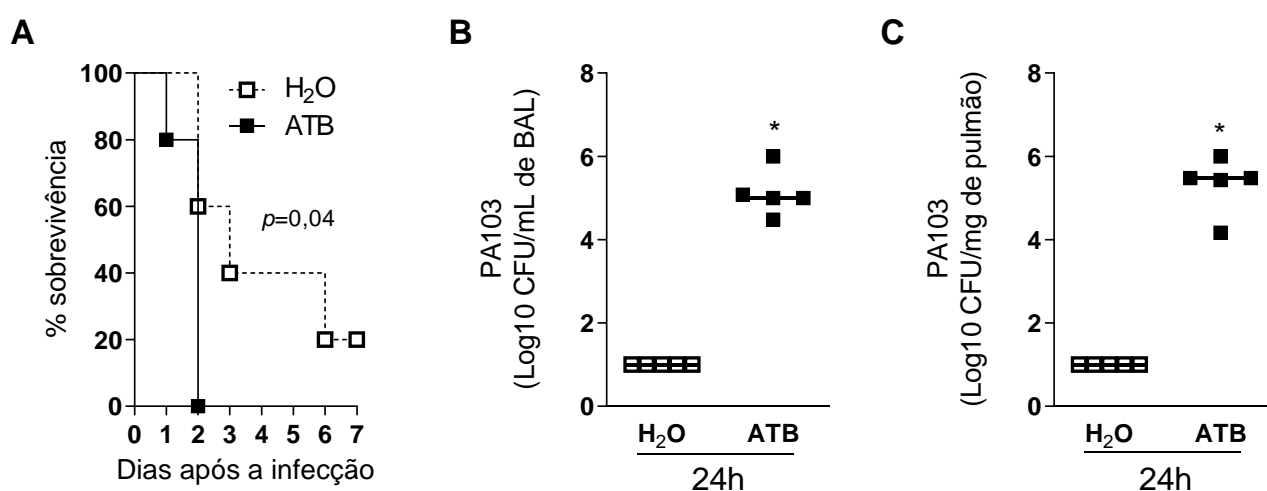


**Figura 10- Camundongos que receberam antimicrobianos apresentam alteração do metabolismo de triptofano:** Camundongos C57/BL6 foram submetidos ao protocolo de tratamento com antimicrobianos. Ao final do protocolo, os animais foram eutanasiados e as fezes e soro foram coletados para análise da produção de indol por bactérias da microbiota fecal (A), análise da concentração de triptofano (B) e quinurenina (C) no soro, pela técnica de HPLC e cálculo da razão kin:trp (D). A análise estatística foi realizada através do teste t de Student. \*P<0,05 vs H<sub>2</sub>O. N experimental: 5 a 6.



### 5.3 Camundongos que receberam antimicrobianos são mais susceptíveis à infecção por *P. aeruginosa*:

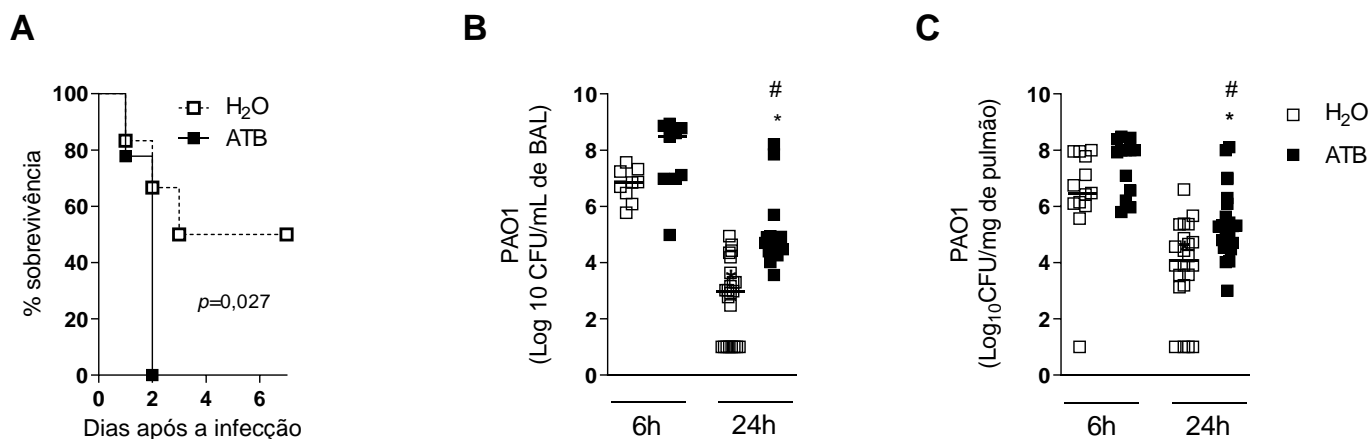
Enquanto camundongos que receberam água apresentaram 80% de taxa de letalidade após 7 dias frente a infecção pela linhagem PA103 ( $10^4$  UFC), camundongos que receberam antimicrobianos apresentaram 100% de letalidade 2 dias após a infecção (Fig. 11A). Além disso, 24h após a infecção, camundongos que receberam antimicrobianos apresentaram maior carga bacteriana no BAL (Fig. 11B) e no pulmão (Fig. 11C) quando comparado a animais que receberam água.



**Figura 11- Camundongos tratados com coquetel de antimicrobianos são mais susceptíveis à infecção pela linhagem PA103:** Camundongos C57/BL6 foram submetidos ao protocolo de tratamento com antimicrobianos. Ao final do protocolo, os animais foram infectados pela via intranasal com  $10^4$  UFC da linhagem PA103 e foram acompanhados por 7 dias para análise da taxa de sobrevivência (A). Um outro grupo de animais foi submetido ao mesmo protocolo, no entanto a eutanásia foi realizada 24h após a infecção para a análise da carga bacteriana no BAL (B) e no pulmão (C). A análise estatística para a comparação das curvas de sobrevivência foi realizada através do teste Log-rank (Mantel-cox) test (A). A análise estatística foi realizada através do teste t de Student (B e C). \* $P < 0,05$  vs H<sub>2</sub>O no mesmo tempo de infecção. N experimental: 5 a 6.

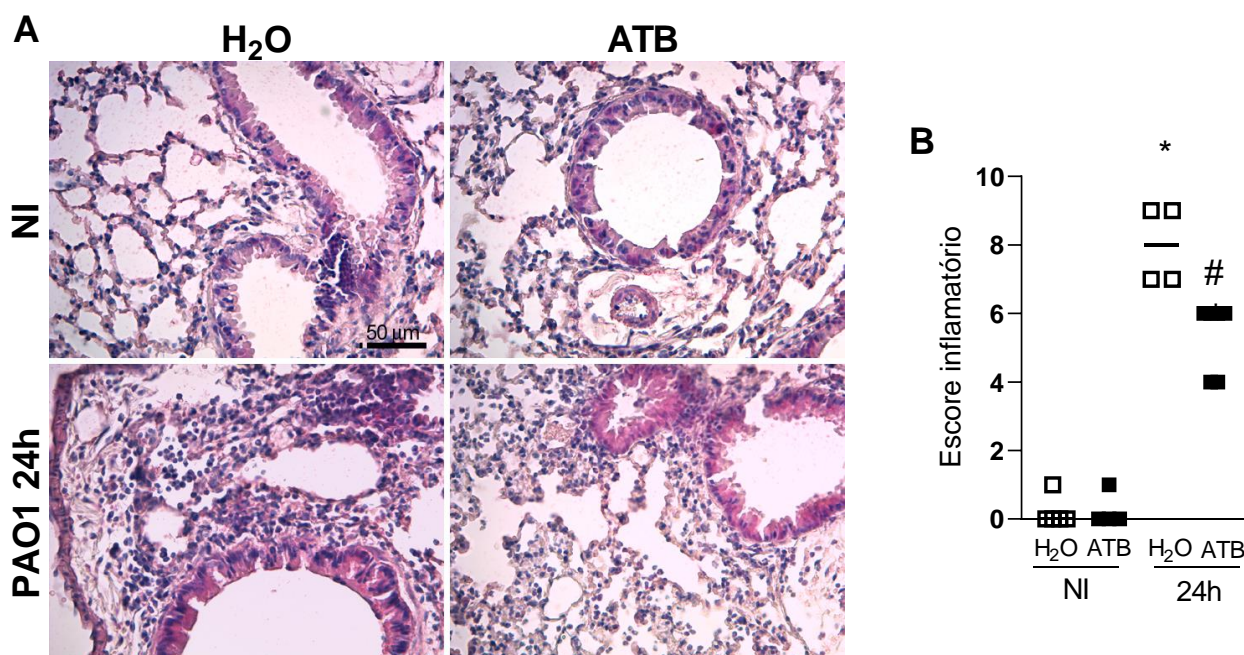
De maneira semelhante, após a inoculação de  $10^7$  UFC da linhagem PAO1, animais que receberam água apresentaram aproximadamente 50% de letalidade até 7 dias pós-infecção, enquanto animais que receberam antimicrobianos apresentaram 100% de letalidade até 48h após a infecção (Fig. 12A). Corroborando com a maior taxa de letalidade, animais que receberam antimicrobianos apresentaram maior carga bacteriana no espaço alveolar (Fig. 12B) e no pulmão (Fig. 12C), 24h após a infecção.

Não foi observada diferença entre os grupos 6h após a infecção (Fig.12 B e C). Devido à semelhança dos resultados entre as duas linhagens diferentes, decidimos que os demais experimentos seriam realizados apenas com a linhagem PAO1.



**Figura 12- Camundongos que receberam antimicrobianos são mais susceptíveis à infecção pela linhagem PAO1:** Camundongos C57/BL6 foram submetidos ao protocolo de tratamento com antimicrobianos. Ao final do protocolo, os animais foram infectados pela via com  $10^7$  UFC da linhagem PAO1 e foram acompanhados por 7 dias para análise da taxa de sobrevivência (A). Um outro grupo de animais foi submetido ao mesmo protocolo, no entanto a eutanásia foi realizada 6h ou 24h após a infecção para a análise da carga bacteriana no BAL (A) e no pulmão (B). A análise estatística para a comparação das curvas de sobrevivência foi realizada através do teste Log-rank (Mantel-cox) test (A). A análise estatística foi realizada através do teste t de Student (B e C) \**P*<0,05 vs H<sub>2</sub>O no mesmo tempo de infecção. N experimental: 5 a 6. Em E e F, junção de 3 experimentos independentes com o mesmo perfil.

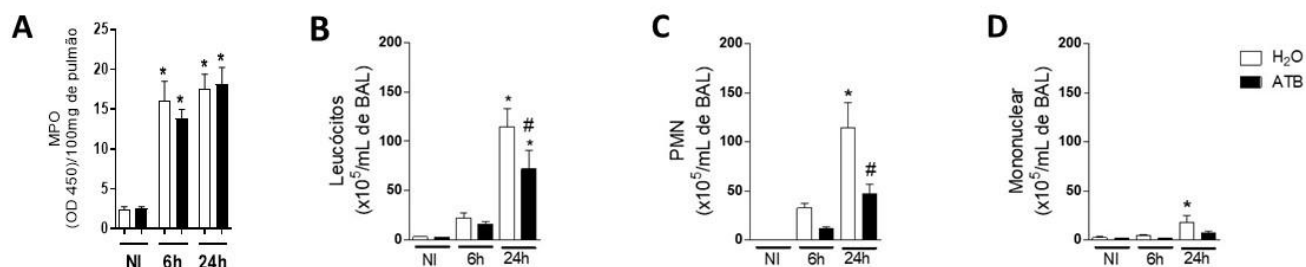
24h após a infecção com a linhagem PAO1, animais que receberam água apresentaram intenso infiltrado inflamatório para o pulmão (Fig.13A), que foi quantificado através do score inflamatório (Fig.13B). De maneira interessante, animais que receberam o coquetel de antimicrobianos apresentaram um menor recrutamento de células inflamatórias para o pulmão (Fig.13A), resultando em um menor score (Fig.13B) quando comparado a animais infectados que receberam água.



**Figura 13- Camundongos que receberam antimicrobianos apresentam menor infiltrado inflamatório no pulmão:** Camundongos C57/BL6 foram submetidos ao protocolo de tratamento com antimicrobianos. Ao final do protocolo, os animais foram infectados pela via intranasal com  $10^7$  UFC da linhagem PAO1 e 24h após a infecção, a eutanásia foi realizada e os pulmões foram coletados para a análise histológica (representativo) (A), graduada em (B). A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA one way não paramétrico seguida de pós-teste Dunn's. \* $P < 0,05$  vs respectivo NI # $P < 0,05$  vs H<sub>2</sub>O. N experimental: 4 a 5.

Além disso, pudemos observar que tanto os animais que receberam água quanto os animais que receberam antimicrobianos infectados apresentaram aumento da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), uma medida indireta do influxo de neutrófilos para o pulmão, quando comparados a animais NI em ambos os tempos analisados (Fig.14A). No entanto, nenhuma diferença na atividade de MPO foi observada entre animais infectados que receberam água ou antimicrobianos. Ainda, animais infectados que receberam água apresentaram importante influxo de leucócitos (Fig. 14B) para o espaço alveolar 24 horas após a infecção, sendo essas células predominantemente neutrófilos (Fig.14C). Em animais que receberam antimicrobianos, 24h após a infecção, podemos observar um aumento de influxo de leucócitos para o espaço alveolar (Fig.14B), também com o predomínio de neutrófilos (Fig.14C). No entanto, de forma interessante, o influxo de neutrófilos para o pulmão de animais que receberam antimicrobianos é significativamente menor do que o observado em animais que receberam água (Fig.14B e 14C).

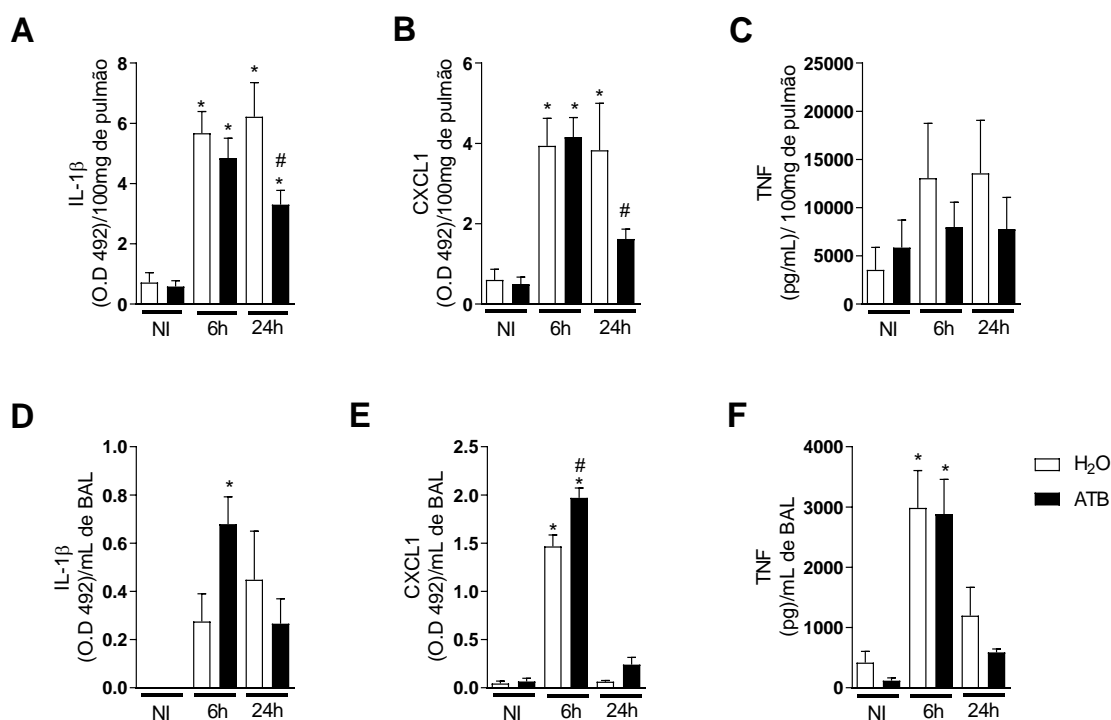
De maneira surpreendente, animais infectados que receberam água apresentaram uma maior contagem de células mononucleares (Fig.14D) que animais não infectados. Fato que não ocorre em animais tratados com antimicrobianos (Fig.14D). Nenhuma diferença foi observada entre os grupos no tempo de 6h após a infecção.



**Figura 14- Camundongos que receberam antimicrobianos apresentam alteração da contagem de leucócitos no espaço alveolar após infecção pulmonar por *P. aeruginosa*:** Camundongos C57/BL6 foram submetidos ao protocolo de tratamento com antimicrobianos. Ao final do protocolo, os animais foram infectados pela via intranasal com  $10^7$  UFC da linhagem PAO1 e, 6h ou 24h após a infecção, a eutanásia foi realizada e o BAL e o pulmão coletados para quantificação da atividade da enzima MPO no pulmão (A), contagem de leucócitos totais (B), polimorfonucleares (C) e mononucleares (D) no BAL. A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA one way seguida de pós-teste Newman-Keuls. \* $P < 0,05$  vs NI # $P < 0,05$  vs H<sub>2</sub>O. N experimental: 8.

De maneira semelhante, ambos grupos de animais infectados apresentaram aumento das concentrações de CXCL1 e IL-1 $\beta$  no pulmão após 6h de infecção quando comparado a animais NI (Fig.15A e 15B). No entanto, em animais que receberam água, as concentrações das citocinas se mantiveram elevadas após 24h de infecção enquanto nos animais que receberam antimicrobiano as concentrações dessas citocinas foram reduzidas (Fig. 15A e 15B). Não houve diferença na concentração de TNF nos pulmões de nenhum dos grupos avaliados (Fig. 15C). Em relação ao espaço alveolar, podemos observar que animais que receberam água não apresentaram aumento nas concentrações de IL-1 $\beta$  quando comparado a animais NI 6h P.I. No entanto, nesse mesmo tempo animais que receberam antimicrobianos já apresentaram um aumento em relação ao seu grupo NI (Fig.15D). 24h P.I as concentrações de IL-1 $\beta$  já haviam retornado aos níveis basais em ambos os grupos infectados (Fig.15D). Ademais, tanto os animais infectados que receberam água quanto os animais infectados que receberam antimicrobianos apresentaram aumento das concentrações de CXCL1 6h P.I (Fig.15E). No entanto, em animais infectados que

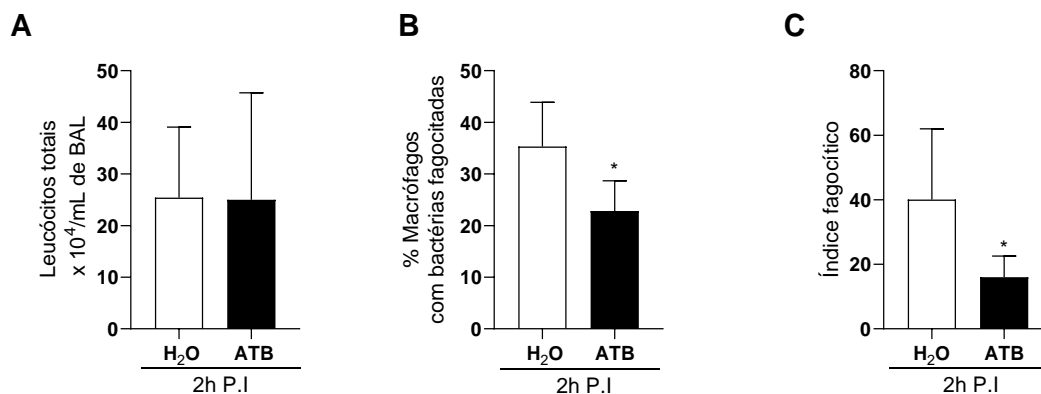
receberam antimicrobianos esse aumento foi significativamente maior do que em animais infectados que receberam água (Fig.15E). 24h P.I em ambos os grupos infectados as concentrações de CXCL1 já retornaram aos níveis basais. Ambos os grupos apresentam perfil similar de produção de TNF no BAL, com aumento dessa citocina 6 horas após a infecção e redução após 24 horas de infecção (Fig. 15F).



**Figura 15- Camundongos que receberam antimicrobianos apresentam alteração na concentração de citocinas frente a infecção pulmonar por *P. aeruginosa*:** Camundongos C57/BL6 foram submetidos ao protocolo de tratamento com antimicrobianos. Ao final do protocolo, os animais foram infectados pela via intranasal com 107 UFC da linhagem PAO1 e, 6h ou 24h após a infecção, a eutanásia foi realizada e o BAL e pulmão foram coletados para a análise da produção dos mediadores inflamatórios IL-1 $\beta$  (A e D), CXCL1 (B e E) e TNF (C e F). A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA one way seguida de pós-teste Newman-Keuls. P<0,05 vs NI #P<0,05 vs H<sub>2</sub>O. N experimental:8.

Em seguida, pudemos observar *in vivo* que os macrófagos alveolares de animais tratados com antimicrobianos apresentam uma menor capacidade de fagocitar *P. aeruginosa* (Fig.16). Após 2h de infecção com a linhagem PAO1, observamos que animais que receberam água e tratados com antimicrobianos apresentam a mesma quantidade de leucócitos recuperados no BAL (Fig.16A). Vale ressaltar, que neste tempo pós-infecção, a maioria das células recuperadas no BAL são macrófagos

alveolares (dados não mostrados). No entanto, observamos que animais tratados antimicrobianos apresentam menor porcentagem de macrófagos com bactérias internalizadas (Fig.16B) e menor índice fagocítico (Fig.16C).

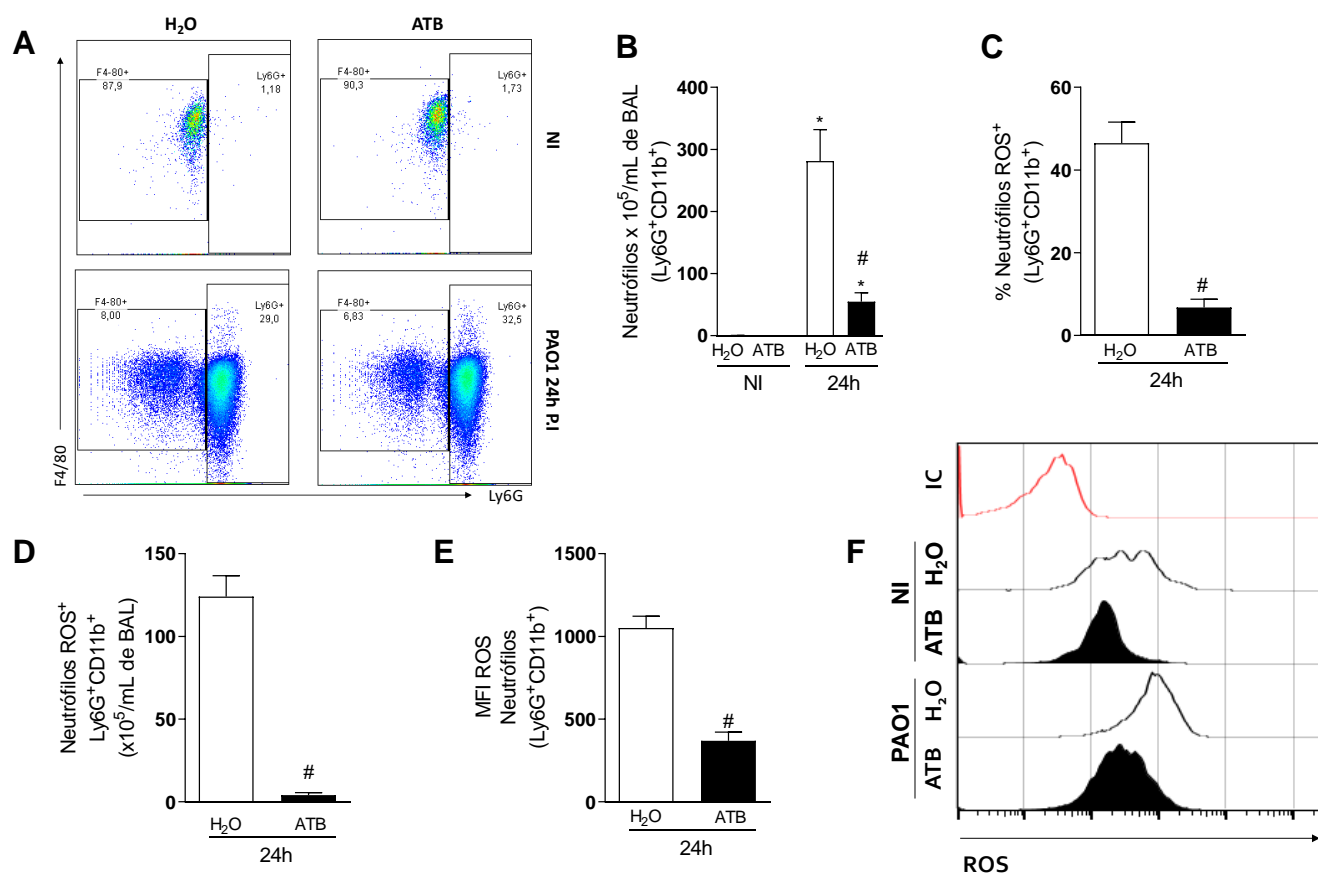


**Figura 16- Macrófagos alveolares de camundongos tratados com antimicrobianos apresentam menor capacidade fagocítica de *P. aeruginosa*:** Camundongos C57/BL6 foram submetidos ao protocolo de tratamento com antimicrobianos. Ao final do protocolo, os animais foram infectados pela via intranasal com  $10^7$  UFC da linhagem PAO1 e 2h após a infecção, a eutanásia foi realizada e o BAL coletados para a contagem de leucócitos totais (A) e realização do citospin para: contagem da porcentagem de macrófagos com bactérias internalizadas (B) e cálculo do índice fagocítico (C). A análise estatística foi realizada através do teste t de Student. \*  $P < 0,05$  vs H<sub>2</sub>O. N experimental: 6.

#### 5.4 Neutrófilos de animais que receberam antimicrobianos apresentam menor produção de ROS:

Através da técnica de citometria de fluxo, pudemos observar que após a infecção por *Pseudomonas aeruginosa* ocorre uma alteração do perfil de células presentes no espaço alveolar (Fig.17A). No painel 17A podemos observar que nos animais NI encontramos um predomínio de células F4/80<sup>+</sup> (99% macrófagos alveolares F4/80<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>), enquanto em animais infectados encontramos um predomínio de células Ly6G<sup>+</sup> (100% neutrófilos Ly6G<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>). Além disso, indo de acordo com o observado pela técnica de citospin, tanto animais não tratados quanto animais tratados com antimicrobianos apresentam um aumento no influxo de neutrófilos (Ly6G<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) para o espaço alveolar. No entanto, o influxo de neutrófilos em animais que receberam antimicrobianos é significativamente menor do que em animais não tratados (Fig.17B). De maneira interessante, animais infectados que receberam antimicrobianos apresentam uma redução significativa na porcentagem

(Fig.17C) e no número (Fig.17D) de neutrófilos ROS<sup>+</sup> quando comparados a animais infectados que receberem água. Além disso, o MFI da expressão de ROS em neutrófilos também está drasticamente reduzida em animais que receberam antimicrobianos (Fig.17E e 17F).



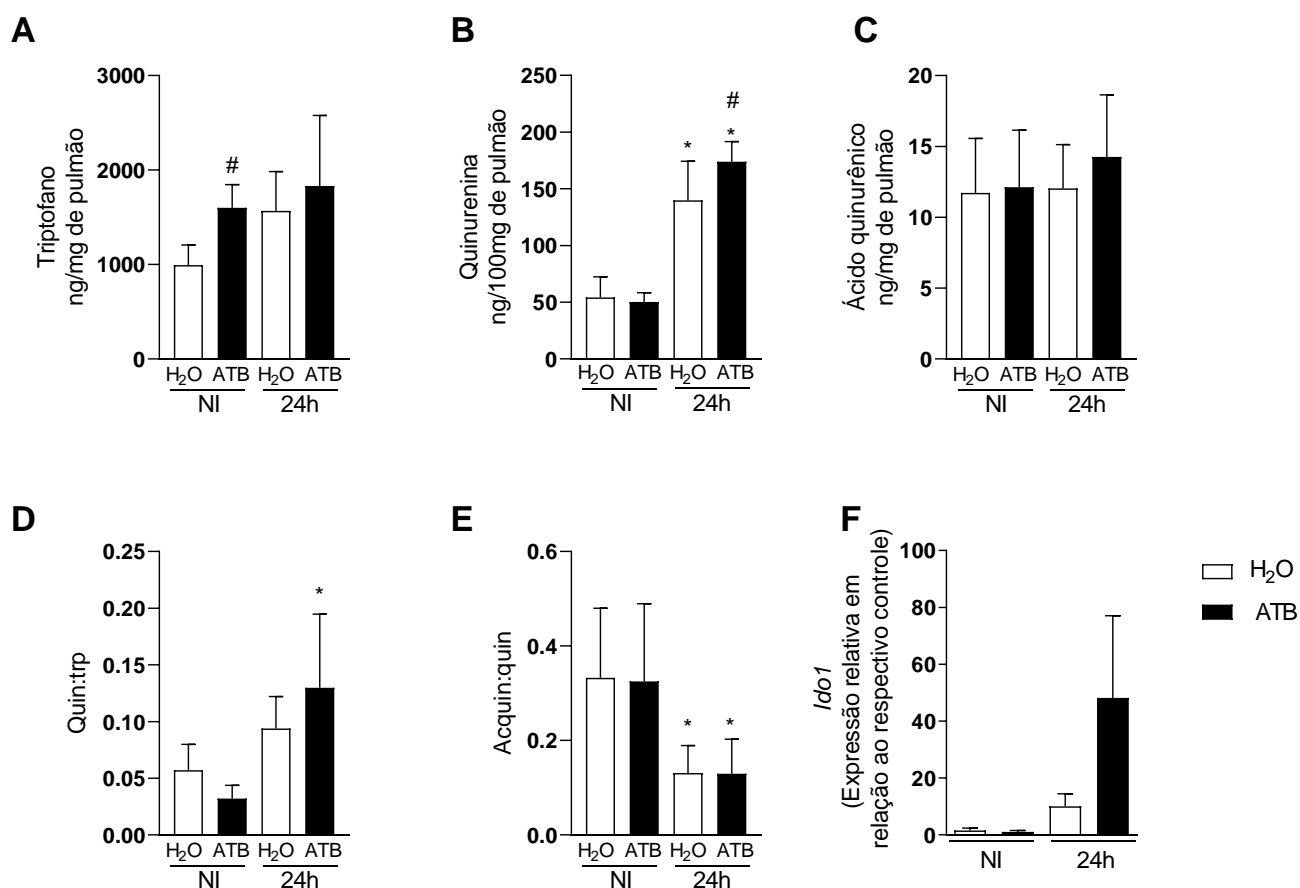
**Figura 17- Há menor quantidade de neutrófilos produtores de ROS nos pulmões de animais que recebem antimicrobianos e infectados com *P. aeruginosa*:** Camundongos C57/BL6 foram submetidos ao protocolo de tratamento com antimicrobianos. Ao final do protocolo, os animais foram infectados pela via intranasal com 10<sup>7</sup> UFC da linhagem PAO1 e 24h após a infecção, a eutanásia foi realizada e o BAL coletado para: avaliação do fenótipo celular por citometria de fluxo (A e B), porcentagem de neutrófilos ROS<sup>+</sup> (C), número absoluto de neutrófilos ROS<sup>+</sup> (D) e intensidade média de fluorescência de ROS em neutrófilos (E e F). A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA one way seguida de pós-teste Newman-Keuls (B e C). A análise estatística foi realizada através do teste t de Student (D e E). \*P<0,05 vs NI #P<0,05 vs H<sub>2</sub>O. N experimental: 4.

### **5.5 Camundongos que receberam antimicrobianos apresentam maior atividade da enzima IDO1 após a infecção por *Pseudomonas aeruginosa*:**

Além da alteração sérica do metabolismo de triptofano, observamos que animais receberam antimicrobianos não infectados apresentam um aumento na concentração de triptofano no pulmão quando comparados a animais controle (Fig.18A). Ainda, a infecção por *P. aeruginosa* em animais não tratados e tratados com antimicrobianos foi acompanhada do aumento da concentração de quinurenina no pulmão (Fig.18B). De maneira interessante, animais infectados que receberam antimicrobianos apresentaram uma maior concentração de quinurenina no pulmão quando comparados a animais não tratados também infectados (Fig.18B). Nenhuma diferença foi observada nas concentrações de ácido quinurênico após a infecção (Fig.18C).

Adicionalmente, camundongos infectados que receberam antimicrobianos apresentam uma maior razão kin:trp quando comparados a animais NI, indicando maior atividade da IDO1, fenômeno não observado em animais infectados que receberam água (Fig. 18D). Por outro lado, podemos observar que a infecção com *P. aeruginosa* tanto em animais não tratados quanto em animais tratados com antimicrobianos leva a uma redução da razão Ackin:kin quando comparados a animais NI, indicando uma redução da atividade da enzima quinurenina aminotransferase após a infecção (Fig.18E). Além disso, nenhuma diferença foi observada na expressão da enzima *Ido1* após a infecção com *Pseudomonas aeruginosa* (Fig.18F).





**Figura 18- A infecção por *Pseudomonas aeruginosa* induz alteração do metabolismo de triptofano no pulmão:** Camundongos C57/BL6 foram submetidos ao protocolo de tratamento com antimicrobianos. Ao final do protocolo, os animais foram infectados pela via intranasal com  $10^7$  UFC da linhagem PAO1 e 24h após a infecção, a eutanásia foi realizada e o pulmão coletado para análise da concentração de triptofano (A), quinurenina (B) e ácido quinurênico (C), pela técnica de HPLC e cálculo da razão kin:trp (D) e Acquin:kin (E). Além disso o pulmão foi coletado para a análise da expressão de *Ido1* por qPCR (F). A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA one way seguida de pós-teste Newman-Keuls. \* $P < 0,05$  vs respectivo NI; # $P < 0,05$  vs H<sub>2</sub>O 24h. N experimental: 5 a 6.

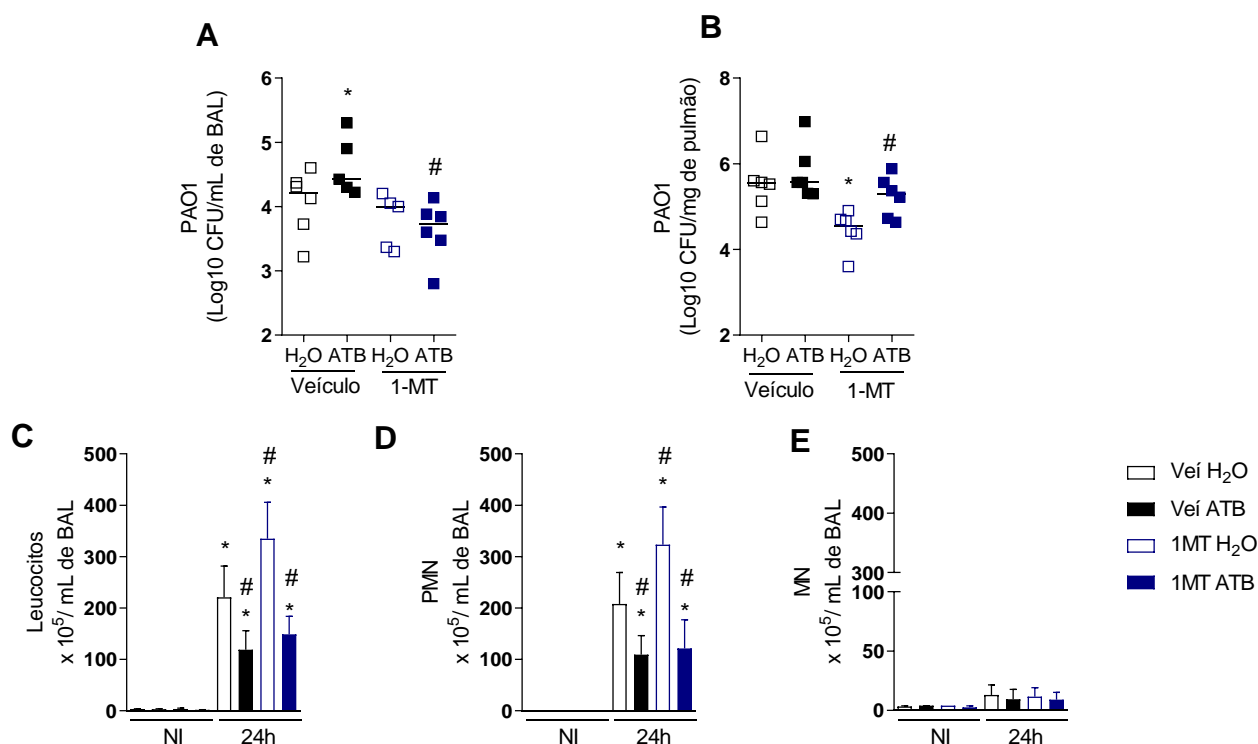
O grupo de resultados demonstrados até o momento indica que o tratamento com antimicrobianos leva a alteração da composição da microbiota, mudança do metabolismo de triptofano e interferência na resposta a infecção pulmonar por *P. aeruginosa*. Em conjunto, esses dados comprovam a eficiência do tratamento com antimicrobiano em induzir disbiose na microbiota intestinal. Dessa maneira, animais que foram tratados com antimicrobianos passarão a ser tratados como animais disbióticos, ao passo que animais que não foram tratados com antimicrobianos

(receberam água) passarão a ser referidos como animais eubióticos conforme detalhado na tabela 1.

### **5.6 A ausência da enzima IDO1 altera o perfil de susceptibilidade à infecção por *P. aeruginosa* de animais disbióticos:**

Uma vez que animais disbióticos apresentaram uma maior atividade da enzima IDO1, buscamos avaliar o papel dessa enzima durante a infecção de animais disbióticos com *P. aeruginosa*. Como estratégia experimental para avaliar o papel da enzima IDO1 na susceptibilidade de animais disbióticos frente à infecção, realizamos a inibição farmacológica da enzima, utilizando a droga 1-metil-triptofano (1-MT). Como demonstrado anteriormente, animais disbióticos que receberam o veículo apresentam aumento da carga bacteriana no BAL quando comparados a animais eubióticos que também receberam o veículo (Fig.19A). No entanto, animais disbióticos tratados com 1-MT apresentaram carga bacteriana no espaço alveolar similar a animais eubióticos também tratados com 1-MT (Fig.19A). Não foi observada diferença na carga bacteriana no pulmão de animais disbióticos tratados ou não com a droga (Fig. 19B). Além disso, camundongos eubióticos tratados com 1-MT apresentaram uma redução da carga bacteriana no pulmão quando comparados a animais eubióticos tratados com o veículo (Fig. 19B). Essa menor carga bacteriana em animais eubióticos tratados com 1-MT foi associada a um maior influxo de neutrófilos para o espaço alveolar quando comparado a animais eubióticos tratados com o veículo (Fig.19C e 19D). Ainda, animais disbióticos que receberam o veículo apresentaram um menor recrutamento de leucócitos, mais especificamente, neutrófilos para o espaço alveolar.

No entanto, o tratamento com 1-MT não foi capaz de restaurar o influxo de leucócitos em animais disbióticos (Fig.19C e 19D). Nenhuma diferença foi observada em relação ao número de células monucleares entre os grupos (Fig.19D).



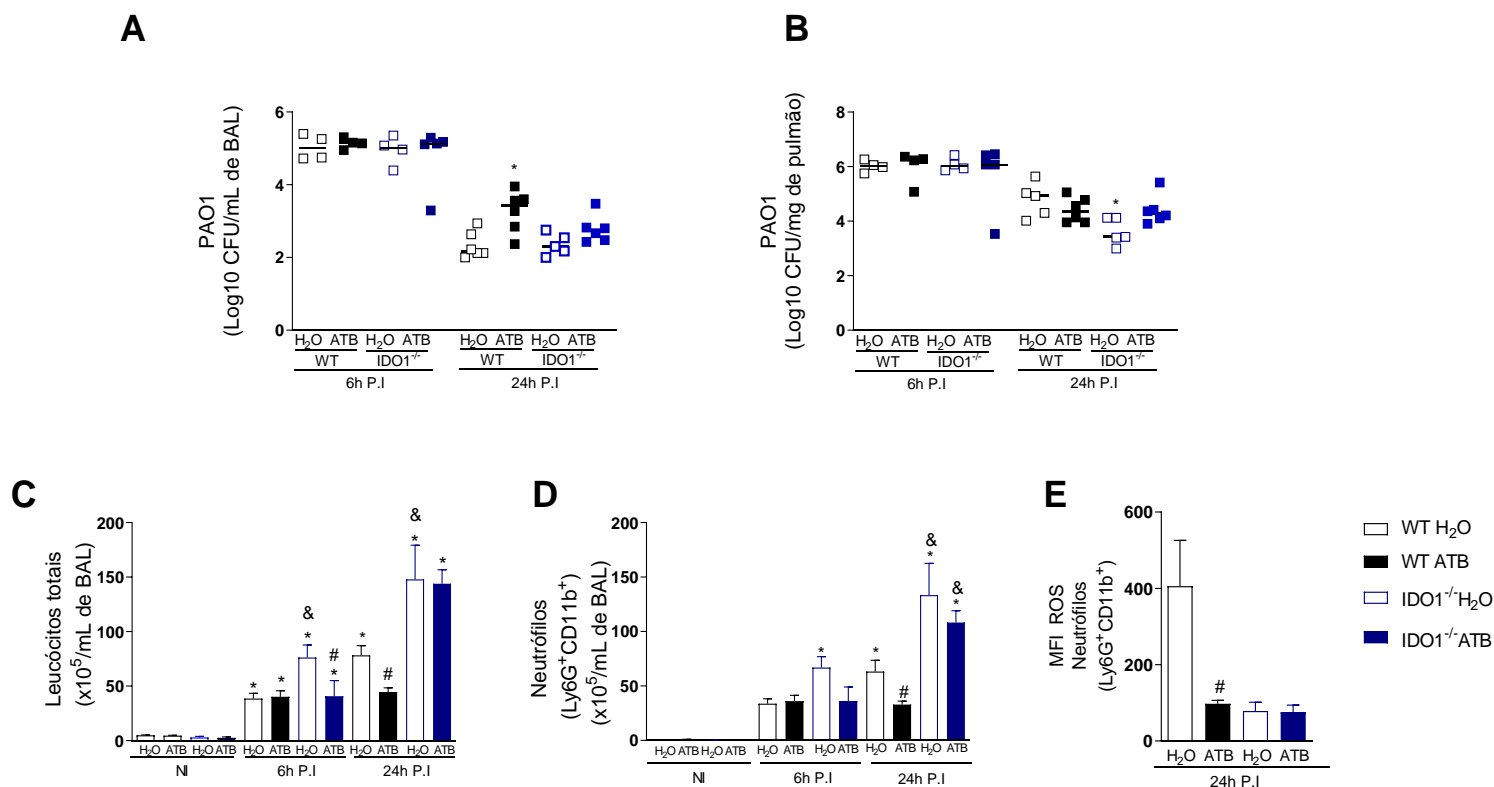
**Figura 19- A inibição farmacológica da enzima IDO1 interfere no controle da carga bacteriana no BAL de animais disbióticos infectados por *P. aeruginosa*:** Camundongos C57BL/6 foram submetidos ao protocolo de disbiose intestinal. Ao final do protocolo, os animais receberam, 1h antes da infecção, 70mg/kg de 1-MT ou o veículo, pela via intraperitoneal. Em seguida, os animais foram infectados pela via intranasal com  $10^7$  UFC da linhagem PAO1 e, após 24h, foram eutanasiados para a coleta do BAL e do pulmão para a quantificação da carga bacteriana (A e B) e contagem total (C) e diferencial (D-E) de leucócitos no BAL. A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA one way seguida de pós-teste Newman-Keuls. Carga bacteriana: \* $P < 0,05$  vs H<sub>2</sub>O, # $P < 0,05$  vs veículo ATB, &  $P < 0,05$ ; vs H<sub>2</sub>O 1MT; Leucócitos: \* $P < 0,05$  vs NI, # $P < 0,05$  veículo água infectado. N experimental 3 a 6.

Outra estratégia experimental para avaliar o papel da enzima IDO1 na susceptibilidade de animais disbióticos frente à infecção foi o uso de animais deficientes para a enzima IDO1. Como demonstrado anteriormente, 6h após a infecção, animais WT eubióticos e disbióticos apresentam carga bacteriana similar no BAL (Fig.20A) e no pulmão (Fig.20B). Neste mesmo tempo, nenhuma diferença foi observada entre a carga bacteriana de animais IDO1<sup>-/-</sup> durante a eubiose e a disbiose (Fig.20A e 20B). De maneira interessante, animais IDO1<sup>-/-</sup> eubióticos apresentam um aumento no número de leucócitos, em sua maioria neutrófilos, recrutados para o espaço alveolar quando comparados a animais WT eubióticos 6 horas pós-infecção

(Fig.20C e 20D). No entanto, camundongos IDO1<sup>-/-</sup> disbióticos apresentam um menor recrutamento de leucócitos e neutrófilos para o BAL quando comparados a animais IDO1<sup>-/-</sup> eubióticos com 6 horas pós infecção (Fig.20C-D).

De maneira interessante, 24h após a infecção, animais IDO1<sup>-/-</sup> eubióticos apresentaram menor carga bacteriana no pulmão quando comparados a animais WT eubióticos (Fig.20B). No entanto, nenhuma alteração na carga bacteriana foi observada no BAL (Fig.20A). Além disso, neste tempo, animais IDO1<sup>-/-</sup> eubióticos também apresentaram aumento no recrutamento de leucócitos (Fig.20C) e de neutrófilos (Fig.20D) quando comparados a animais WT também eubióticos. Ao submeter esses animais ao protocolo de disbiose, observamos que, diferentemente de animais WT, animais IDO1<sup>-/-</sup> não apresentaram aumento na recuperação de carga bacteriana no BAL (Fig. 20A). Ainda, camundongos IDO1<sup>-/-</sup> disbióticos não apresentaram diminuição no influxo de leucócitos (Fig.20C), fato que ocorre em animais WT disbióticos 24h após a infecção. Ademais, camundongos IDO1<sup>-/-</sup> disbióticos apresentam um aumento no influxo de neutrófilos quando comparado a animais WT também disbióticos (Fig.20D).

Como descrito anteriormente, neutrófilos de animais WT disbióticos apresentam uma redução na produção de ROS 24h após a infecção por *P. aeruginosa* (Fig.20E). Apesar do maior controle da carga bacteriana após a indução da disbiose em animais IDO1<sup>-/-</sup>, observamos que tanto animais IDO1<sup>-/-</sup> eubióticos quanto disbióticos apresentam menor produção de ROS quando comparados a animais WT (Fig.20E), sugerindo, que esse não seria o mecanismo responsável pelo controle da carga bacteriana nesses animais.



**Figura 20- Camundongos IDO1<sup>-/-</sup> disbióticos apresentam maior recrutamento de neutrófilos e menor carga bacteriana após a infecção por *P. aeruginosa*:** Camundongos WT e IDO1<sup>-/-</sup> foram submetidos ao protocolo de disbiose. Ao final do protocolo, os animais foram infectados pela via intranasal com 10<sup>7</sup> UFC da linhagem PAO1 e, após 6h e 24h, foram eutanasiados para a coleta do BAL e do pulmão para a quantificação da carga bacteriana (A e B) e contagem total de leucócitos no BAL (C) e quantificação do número de neutrófilos (D) e da produção de ROS por citometria de fluxo (E). A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA one way seguida de pós-teste Newman-Keuls. Carga bacteriana: \* $p < 0,05$  vs H<sub>2</sub>O, # $p < 0,05$  vs ATB; Leucócitos e ROS: \* $p < 0,05$  vs NI, # $p < 0,05$  em relação ao respectivo grupo eubiótico, & $p < 0,05$  em relação ao grupo WT H<sub>2</sub>O. A análise estatística foi realizada de forma tempo independente. N experimental: 4 a 6.

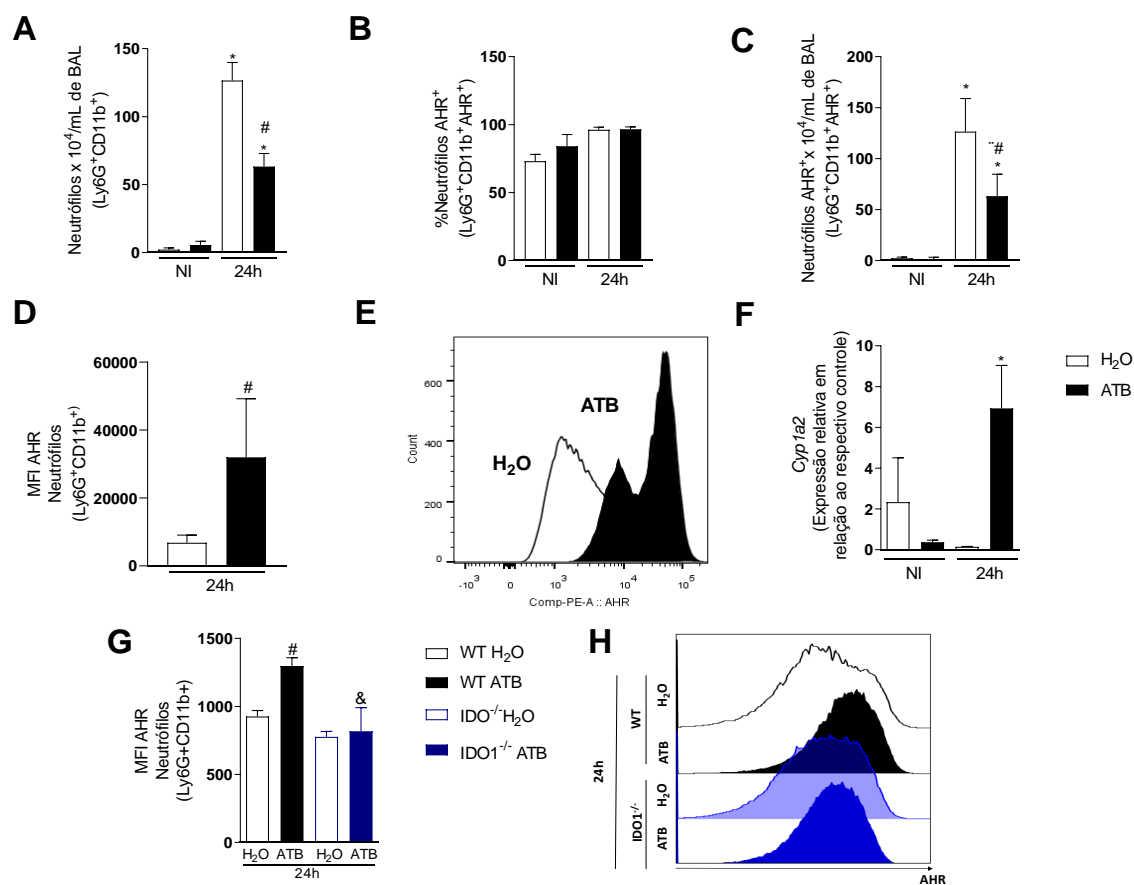
### 5.7 Há maior ativação de AHR em animais disbióticos infectados e o aumento da expressão de AHR durante a disbiose é dependente da enzima IDO1

Como descrito anteriormente, camundongos disbióticos infectados apresentam uma diminuição do influxo de neutrófilos para o espaço alveolar quando comparado a animais eubióticos (Fig.21A). No entanto, apesar de animais infectados apresentarem aumento do recrutamento de neutrófilos, nenhuma diferença é observada na porcentagem de neutrófilos AHR<sup>+</sup> recrutados para o espaço alveolar (Fig.21B). Apesar

disso, podemos observar que a infecção com PAO1 aumenta o número absoluto de neutrófilos AHR<sup>+</sup> recrutados. Ainda, camundongos disbióticos apresentam um menor influxo de neutrófilos AHR<sup>+</sup> quando comparados a animais eubióticos infectados (Fig.21C).

No entanto, neutrófilos de camundongos disbióticos apresentam um aumento na MFI de AHR (Fig.21D), indicando que os neutrófilos de animais disbióticos apresentam maior expressão de AHR, que pode também ser observada pelos histogramas no painel E da figura 20 (Fig.21E). Camundongos disbióticos apresentaram também aumento da expressão de *Cyp1a2* quando comparado a animais disbióticos não infectados, um indicativo de que a atividade transcricional de AHR está acentuada nesses animais após a infecção (Fig.21F).

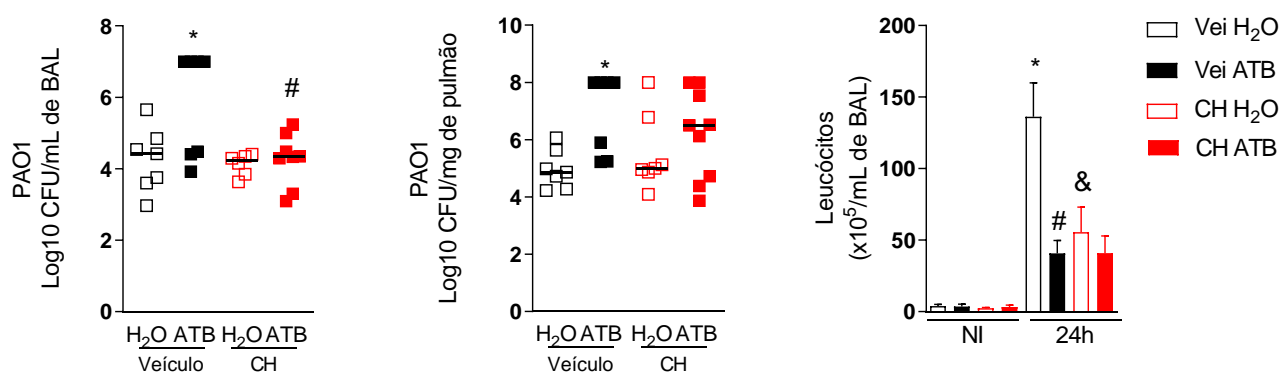
Uma vez que a expressão de AHR estava aumentada em neutrófilos de animais WT disbióticos, nosso próximo passo foi avaliar como estaria a expressão de AHR em animais deficientes para a enzima IDO1. De maneira interessante, camundongos IDO1<sup>-/-</sup> disbióticos apresentam a expressão de AHR similar ao observado em animais IDO1<sup>-/-</sup> eubióticos. Ainda, a expressão de AHR em neutrófilos no BAL de camundongos IDO1<sup>-/-</sup> disbióticos é significativamente menor quando comparado às células no BAL de animais WT também disbióticos (Fig.21G E Fig.21 H).



**Figura 21- Neutrófilos de camundongos disbióticos apresentam maior expressão de AHR de maneira dependente de IDO1:** Camundongos C57/BL6 foram submetidos ao protocolo de disbiose por antimicrobianos. Ao final do protocolo, os animais foram infectados pela via intranasal com 10<sup>7</sup> UFC da linhagem PAO1 e 24h após a infecção, a eutanásia foi realizada e o pulmão e o BAL coletados para realização da citometria de fluxo de células recrutadas para o BAL para a quantificação do número total de neutrófilos (A) porcentagem de neutrófilos AHR<sup>+</sup> (B) número de neutrófilos AHR<sup>+</sup> (C), MFI da expressão de AHR em neutrófilos (D) e confecção do histograma relativo a expressão de AHR em neutrófilos (E). Além disso, o pulmão foi utilizado para extração de RNA e para análise da expressão do gene *Cyp1a2* (F). Camundongos C57/BL6 WT e IDO1<sup>-/-</sup> foram submetidos ao mesmo protocolo de disbiose e de infecção e 24h após a infecção, a eutanásia foi realizada e o BAL coletado para a quantificação da expressão de AHR em neutrófilos por citometria de fluxo (G) e confecção do histograma representativo (H). A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA one way seguida de pós-teste Newman-Keuls (A-C, F e G). A análise estatística foi realizada através do teste t de Student (D). \*P<0,05 vs respectivo NI, # vs respectivo grupo eubiótico, & vs WT disbiótico. N experimental: 4 a 7.

### 5.7 A ausência do receptor AHR alterou o perfil de susceptibilidade de animais disbióticos à infecção por *P. aeruginosa*:

Visto que animais disbióticos apresentam aumento na expressão de AHR em neutrófilos e que a enzima IDO1 cataboliza o triptofano em quinurenina, que é um ligante de AHR, nosso próximo passo foi avaliar se a ativação do receptor AHR durante o processo de disbiose era importante para o perfil de susceptibilidade desses animais. Animais disbióticos que receberam veículo apresentaram aumento da carga bacteriana no BAL e no pulmão quando comparados com animais eubióticos também tratados com o veículo (Fig. 22A e 22B). De maneira interessante, nenhuma diferença foi observada entre animais eubióticos e disbióticos que receberam o antagonista seletivo de AHR (CH223191) (Fig. 22A e 22B). Em relação ao influxo de leucócitos, animais disbióticos que receberam o veículo apresentaram uma redução do influxo de leucócitos para o BAL quando comparado a animais eubióticos (Fig. 22C). De maneira oposta, podemos observar que animais eubióticos que receberam o antagonista CH apresentaram uma redução no influxo de leucócitos para o BAL quando comparado a animais eubióticos que receberam o veículo (Fig. 22C). No entanto, nenhuma diferença foi observada entre animais eubióticos e disbióticos que receberam o antagonista (Fig. 22C).

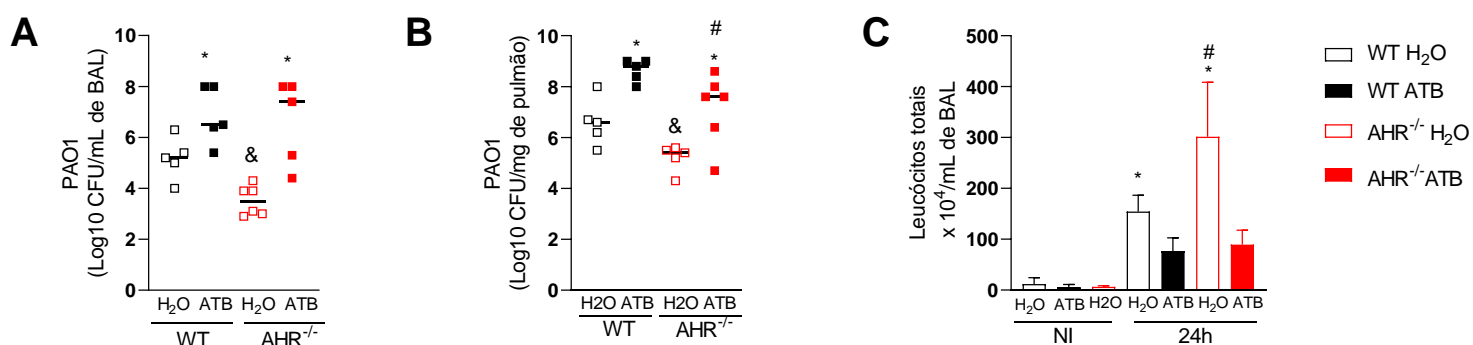


**Figura 22- O receptor AHR interfere no controle da carga bacteriana em animais disbióticos infectados por *P. aeruginosa*:** Camundongos C57BL/6 foram submetidos ao protocolo de disbiose intestinal. Ao final do protocolo, os animais receberam, 1h antes da infecção, 10 mg/kg do antagonista de AHR CH223191 ou o veículo, pela via subcutânea. Em seguida, os animais foram infectados pela via intranasal com 10<sup>7</sup> UFC da linhagem PAO1 e, após 24h, foram eutanasiados para a coleta do BAL e do pulmão para a quantificação da carga bacteriana (A e B) e contagem total (C) de leucócitos no



BAL. A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA one way seguida de pós-teste Newman-Keuls. Gráficos de CFU: \*P<0,05 vs H<sub>2</sub>O veículo, #P<0,05 vs ATB veículo. Gráfico de leucócitos: \*P<0,05 vs NI, #P<0,05 vs H<sub>2</sub>O, &P<0,05 vs H<sub>2</sub>O veículo. N experimental: 9.

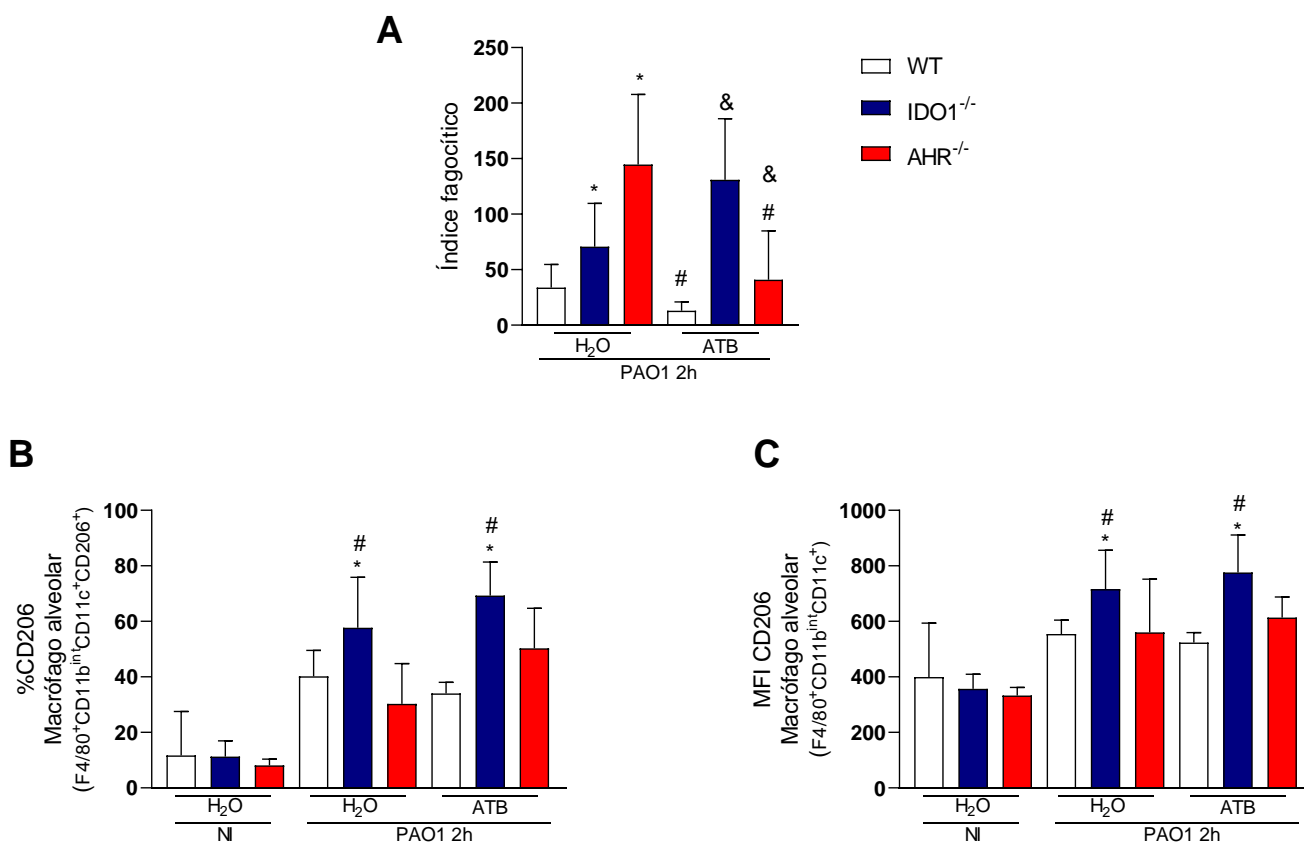
Outra estratégia para avaliar o papel do receptor AHR no controle da carga bacteriana durante a disbiose foi o uso de animais deficiente para AHR. Podemos observar que animais AHR<sup>-/-</sup> eubióticos apresentam menor carga bacteriana no BAL (Fig.23A) e no pulmão (Fig.23B) quando comparados a animais WT eubióticos. A menor carga bacteriana em animais AHR<sup>-/-</sup> eubióticos foi acompanhada do aumento do recrutamento de leucócitos para o espaço alveolar (Fig.23C). Além disso, animais WT e AHR<sup>-/-</sup> disbióticos apresentaram aumento da carga bacteriana no BAL (Fig.23A) e no pulmão (Fig.23B) quando comparado a animais eubióticos. No entanto, a carga bacteriana recuperada no pulmão de animais AHR<sup>-/-</sup> disbióticos foi significativamente menor do que a recuperada em animais WT disbióticos, demonstrando que a ausência do receptor AHR acentua o controle da carga bacteriana mesmo após a indução da disbiose.



**Figura 23- Animais AHR<sup>-/-</sup> disbióticos apresentam menor carga bacteriana no pulmão:** Camundongos WT e AHR<sup>-/-</sup> foram submetidos ao protocolo de disbiose. Ao final do protocolo, os animais foram infectados pela via intranasal com 10<sup>7</sup> UFC da linhagem PAO1 e, após 24h, foram eutanasiados para a coleta do BAL e do pulmão para a quantificação da carga bacteriana (A e B) e contagem total de leucócitos no BAL (C). A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA one way seguida de pós-teste Newman-Keuls. \*P<0,05 vs H<sub>2</sub>O, #P<0,05 vs WT H<sub>2</sub>O, & P<0,05 vs WT H<sub>2</sub>O. N experimental: 5 a 6.

### **5.8 A ausência da enzima IDO1 e do receptor AHR alterou a fagocitose de *P. aeruginosa* por macrófagos alveolares *in vivo*:**

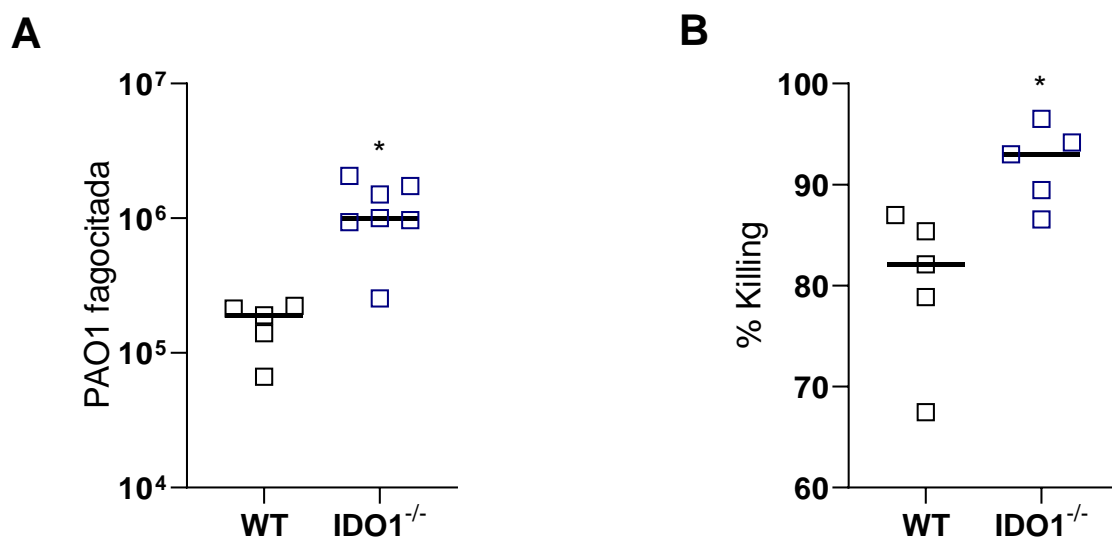
Como demonstrado anteriormente, a indução da disbiose em animais WT foi associada a uma menor capacidade fagocítica da *P. aeruginosa* por macrófagos alveolares *in vivo*. Assim, nosso próximo passo foi avaliar se a melhor capacidade de controlar a carga bacteriana durante a disbiose em animais IDO1<sup>-/-</sup> e AHR<sup>-/-</sup> estava associada a reversão do prejuízo na capacidade fagocítica dos macrófagos alveolares. Como podemos observar, macrófagos de animais IDO1<sup>-/-</sup> e AHR<sup>-/-</sup> eubióticos apresentam maior índice fagocítico quando comparados a células de animais WT também eubióticos (Fig.24A). Além disso, em animais IDO1<sup>-/-</sup> eubióticos, o aumento da capacidade fagocítica dos macrófagos foi associado a um aumento na porcentagem de macrófagos alveolares com alta expressão de CD206 (Fig.24B) e aumento no MFI de CD206 (Fig.24C) quando comparados às células de animais IDO1<sup>-/-</sup> não infectados. Ainda, podemos observar que enquanto em animais WT a indução da disbiose foi acompanhada de uma redução da capacidade fagocítica por macrófagos alveolares, células de animais IDO1<sup>-/-</sup> disbióticos apresentam capacidade fagocítica similar aos macrófagos de animais IDO1<sup>-/-</sup> eubióticos e superior a animais WT disbióticos (Fig.24A). Ademais, apesar de animais AHR<sup>-/-</sup> disbióticos apresentarem uma redução da capacidade fagocítica quando comparado a animais AHR eubióticos, a capacidade fagocítica de células de animais AHR<sup>-/-</sup> disbióticos é significativamente superior à de células de animais WT disbióticos (Fig.24A). Ainda, podemos observar que animais IDO1<sup>-/-</sup> disbióticos apresentam aumento na porcentagem de macrófagos com alta expressão de CD206 e do MFI de CD206 quando comparado à de macrófagos de animais IDO1<sup>-/-</sup> não infectados. No entanto, nenhuma diferença foi observada na expressão de CD206 em macrófagos de camundongos WT e AHR<sup>-/-</sup> (Fig.24B e 24C). Vale ressaltar que neste tempo de infecção todos os grupos apresentam a mesma quantidade de leucócitos no espaço alveolar (dados não mostrados).



**Figura 24- Macrófagos alveolares de animais IDO1<sup>-/-</sup> e AHR<sup>-/-</sup> disbióticos apresentam maior capacidade fagocítica:** Camundongos WT, IDO1<sup>-/-</sup> e AHR<sup>-/-</sup> foram submetidos ao protocolo de disbiose. Ao final do protocolo, os animais foram infectados pela via intranasal com 10<sup>7</sup> UFC da linhagem PAO1 e, após 2h após a infecção, foram eutanasiados para a coleta do BAL para a realização do citospin e contagem do número de macrófagos contendo bactérias internalizadas, para o cálculo do índice fagocítico (A). As células do BAL foram utilizadas para análise da expressão de CD206 em macrófagos alveolares (B e C). A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA one way seguida de pós-teste Newman-Keuls: \*P<0,05 vs WT H<sub>2</sub>O, #P<0,05 vs respectivo grupo H<sub>2</sub>O, & P<0,05 vs WT ATB.

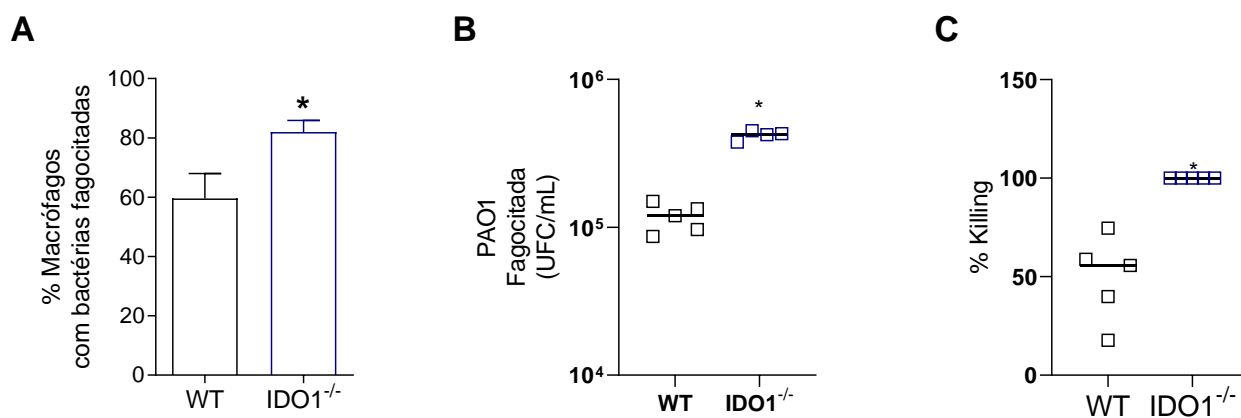
### 5.9 A presença de altas concentrações de quinurenina interfere na capacidade fagocítica da *P. aeruginosa* por macrófagos:

Nosso próximo passo foi avaliar como estava a capacidade fagocítica de macrófagos na ausência da enzima IDO1 *in vitro*. Para isso, usamos dois modelos experimentais: macrófagos alveolares e macrófagos derivados de medula (BMDM). Nos gráficos A e B da figura 25 podemos observar que macrófagos alveolares de animais IDO1<sup>-/-</sup> apresentam uma maior fagocitose e atividade de *killing* da *P. aeruginosa* quando comparados a macrófagos alveolares de animais WT.



**Figura 25 - Macrófagos alveolares deficientes para a enzima IDO1 apresentam maior capacidade de fagocitar e matar a *P. aeruginosa*:** Macrófagos alveolares de animais WT e IDO1<sup>-/-</sup> foram retirados e plaqueados em placas de 96 poços para a realização do ensaio de fagocitose e *killing* para a determinação do CFU de *P. aeruginosa* fagocitada (A) e porcentagem de *killing* (B). A análise estatística foi realizada através do teste t de Student. \*P<0,05 vs WT. N experimental: 5 a 7.

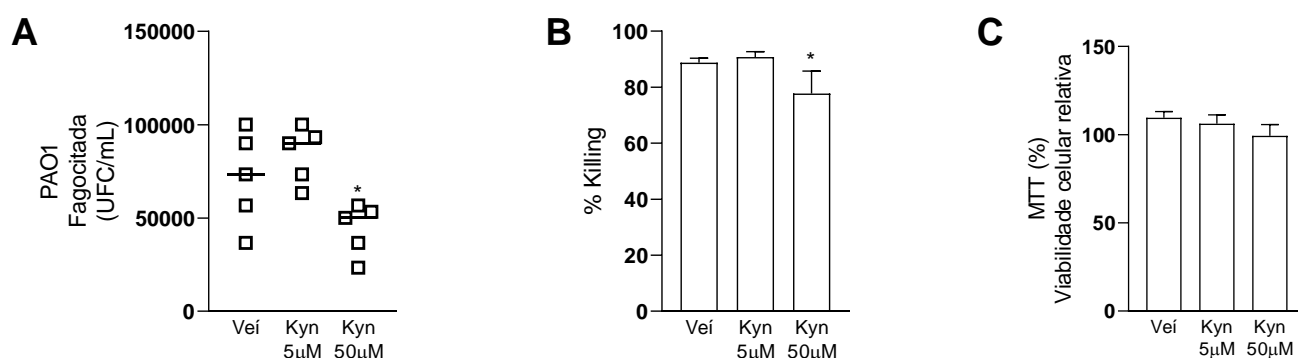
De maneira similar ao que ocorreu com macrófagos alveolares, macrófagos derivados de medula de animais IDO1<sup>-/-</sup> apresentam uma maior fagocitose e capacidade de *killing* quando comparados a macrófagos derivados da medula de animais WT (Fig.26A e Fig.26B). Como obtivemos resultados similares com os dois modelos experimentais, nossos próximos experimentos foram realizados utilizando-se BMDMs.



**Figura 26- Macrófagos derivados de medula óssea deficientes para a enzima IDO1 apresentam maior capacidade de fagocitar e matar a *P. aeruginosa*:** Células da medula óssea de animais WT e

IDO1<sup>-/-</sup> foram coletadas e diferenciadas em macrófagos por 8 dias. No sétimo dia de diferenciação, o ensaio de fagocitose foi realizado para a contagem de macrófagos com bactérias fagocitadas (A), determinação do CFU de *P. aeruginosa* fagocitada (B) e porcentagem de *killing* (C). A análise estatística foi realizada através do teste t de Student. \*P<0,05 vs WT. N experimental: 4 a 5.

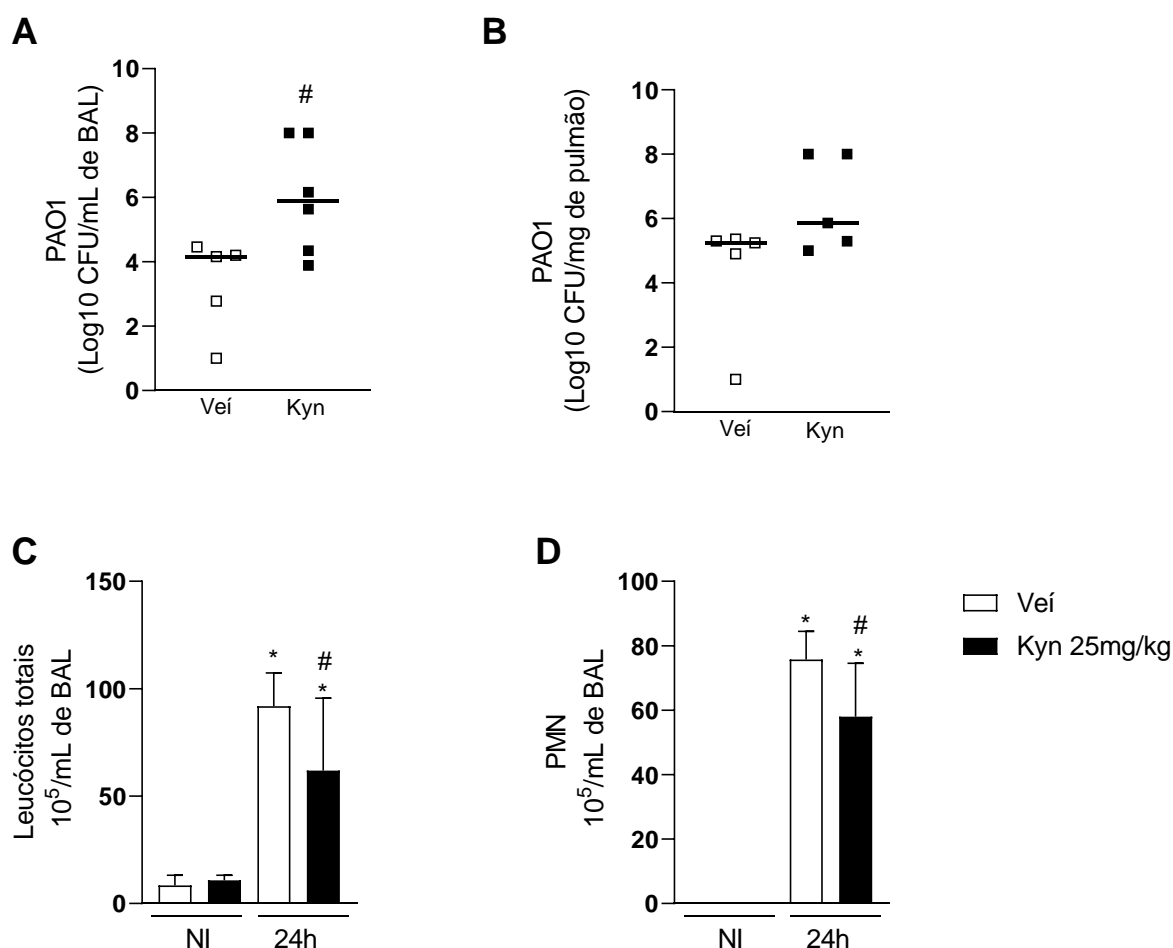
A enzima IDO1 é a enzima responsável por metabolizar o triptofano em quinurenina. Uma vez que a ausência da enzima IDO1 acentuou a capacidade de macrófagos de fagocitarem a *P. aeruginosa in vivo* e *in vitro*, nosso próximo passo foi avaliar se a presença de quinurenina é prejudicial para a fagocitose da *P. aeruginosa* por macrófagos *in vitro*. Como podemos observar, o tratamento das células com 5µM de quinurenina não alterou a capacidade de macrófagos derivados de medula de fagocitar (Fig.26A) e matar (Fig.26B) a *P. aeruginosa*. No entanto, o tratamento com 50µM foi capaz de alterar significativamente a capacidade dos macrófagos de fagocitar (Fig.26A) e matar (Fig.26B) a *P. aeruginosa*. É importante ressaltar que nenhum dos tratamentos foram capazes de alterar a viabilidade das células (Fig.26C).



**Figura 27- O tratamento de macrófagos com quinurenina foi capaz de reduzir a capacidade de macrófagos de fagocitar e matar *P. aeruginosa*:** Células da medula óssea de animais WT e IDO1<sup>-/-</sup> foram coletadas e diferenciadas em macrófagos por 8 dias. 1h antes do ensaios, os macrófagos receberam um tratamento com quinurenina nas concentrações de 5 ou 50µM. Após 1h de tratamento os ensaios de fagocitose e killing foram realizados para determinação do CFU de *P. aeruginosa* fagocitada (A), porcentagem de *killing* (B) e teste de viabilidade celular pela técnica de MTT (C). \*P<0,05 vs veículo. A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA one way seguida de pós-teste Newman-Keuls. N experimental: 5.

### 5.10 O tratamento prévio com quinurenina leva ao aumento da carga bacteriana em animais eubióticos:

Para avaliar o papel do aumento da concentração de quinurenina no curso da infecção com *Pseudomonas aeruginosa*, tratamos animais eubióticos com quinurenina antes da infecção. Animais eubióticos que receberam o tratamento com quinurenina apresentaram aumento na carga bacteriana no BAL quando comparado a animais que receberam o veículo (Fig.28A). No entanto, o excesso de quinurenina não foi capaz de alterar a carga bacteriana no pulmão (Fig.28B). Além disso, animais que receberam quinurenina apresentaram um menor recrutamento de leucócitos (Fig.28C), mais especificamente PMN (Fig.28D) no espaço alveolar quando comparado a animais que receberam o veículo.



**Figura 28- Animais que receberam quinurenina antes da infecção apresentam aumento da carga bacteriana:** Camundongos C57BL/6 receberam, 1h antes da infecção, 25 mg/kg de quinurenina ou o veículo, pela via intraperitoneal. Em seguida, os animais foram infectados pela via intranasal com 10<sup>7</sup> UFC da linhagem PAO1 e, após 24h, foram eutanasiados para a coleta do BAL e do pulmão para a

quantificação da carga bacteriana (A e B) e contagem leucócitos totais (C) e de polimorfonucleares (D) no BAL. A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA one way seguida de pós-teste Newman-Keuls. Gráficos de CFU: #P<0,05 vs veículo. Gráfico de leucócitos: \*P<0,05 vs NI, #P<0,05 vs infectado tratado com veículo. N experimental: 4-6.

## 6 DISCUSSÃO

O estudo do eixo intestino-pulmão vem sendo explorado ao longo dos anos, demonstrando o papel importante da microbiota intestinal na imunidade pulmonar. Dessa forma, tem sido demonstrado que alterações da composição da microbiota intestinal perturbam a relação microbiota-hospedeiro, levando a alterações da resposta imune e fazendo com que o hospedeiro seja mais susceptível a doenças inflamatórias e infecciosas (DANG; MARSLAND, 2019). No presente trabalho, demonstramos que a disbiose da microbiota intestinal induzida por administração de antimicrobianos aumenta a susceptibilidade de camundongos a infecção pulmonar por *Pseudomonas aeruginosa* por alterar de forma significativa a resposta inflamatória do hospedeiro ao insulto infeccioso. Essa alteração da resposta inflamatória foi decorrente do desbalanço no metabolismo de triptofano, levando ao acúmulo de quinurenina no pulmão e aumento da expressão e ativação do receptor AHR. Além disso, demonstramos que a enzima IDO1 e o receptor AHR participam do controle da carga bacteriana de animais disbióticos, em parte, por controlar a capacidade de macrófagos alveolares de fagocitar a *P. aeruginosa*. Ainda, demonstramos que a enzima IDO1 parece interferir na fagocitose da bactéria por controlar negativamente a expressão do receptor fagocítico CD206.

Primeiramente, demonstramos que a disbiose induzida por antimicrobianos foi capaz de alterar o metabolismo de triptofano tanto pela microbiota intestinal quanto pelo hospedeiro. Já está bem demonstrado na literatura que a microbiota intestinal pode modular diretamente e indiretamente o metabolismo endógeno do hospedeiro. Animais isentos de germe apresentam altos níveis circulantes de triptofano e baixos níveis de quinurenina e serotonina (GAO, J. *et al.*, 2018; GETSELTTER; KOREN; ELLIOTT, 2019). No nosso modelo de disbiose, observamos que o uso de antimicrobianos reduziu a carga de bactérias importantes para o metabolismo de triptofano, como enterobactérias e bactérias produtoras de ácido láctico, o que poderia justificar o porquê do aumento dos níveis séricos de triptofano. Ainda, pela diminuição dos níveis séricos de quinurenina em animais disbióticos pode-se inferir uma baixa atividade da enzima IDO1. Corroborando os nossos resultados, estudos anteriores



demonstram que células epiteliais intestinais expressam grande quantidade da enzima IDO1, sendo essa expressão foi controlada de forma dependente da microbiota intestinal (GAO, J. *et al.*, 2018). Sendo assim, esses três eventos podem colaborar para o aumento das concentrações circulantes de Triptofano observado nos animais disbióticos.

Uma vez caracterizado o modelo de disbiose, nosso próximo passo foi avaliar como esse processo interfere no curso da infecção pulmonar por *P. aeruginosa*. A maior susceptibilidade de animais disbióticos frente a infecção por *P. aeruginosa* foi associada a um aumento da carga bacteriana no espaço alveolar e no pulmão. De maneira semelhante, Robak e colaboradores (2018) demonstraram que a depleção da microbiota por uso de antimicrobianos induziu uma maior letalidade frente a infecção pela linhagem PA103, associada a maior carga bacteriana tanto no pulmão quanto no espaço broncoalveolar. Tsay *et al.*, 2019 também demonstraram que o uso prévio de antimicrobianos era capaz de aumentar a carga bacteriana no pulmão de camundongos infectados com a *P. aeruginosa*. Além disso, Khan e colaboradores 2019 demonstraram que a disbiose intestinal por uso de antimicrobianos alterou também o perfil de susceptibilidade de camundongos frente à infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, levando ao aumento da carga bacteriana no pulmão e no baço.

De forma interessante, a infecção de camundongos disbióticos foi acompanhada de um menor recrutamento de neutrófilos para o espaço alveolar e de reduzido infiltrado inflamatório para o pulmão conforme avaliado pela análise histológica. Ainda, demonstramos que animais disbióticos infectados apresentam atividade da enzima MPO similar a animais eubióticos. Esses dados a princípio são conflitantes, no entanto, apesar da medição da atividade da enzima MPO poder ser usado como um indício do influxo de neutrófilos (SOUZA *et al.*, 2001), a enzima MPO é liberada após a ativação do neutrófilo, durante a sua degranulação, sendo também um indício do estado de ativação celular (FRANCK *et al.*, 2021). Em conjunto, esses dados indicam que apesar de animais disbióticos apresentarem uma redução do influxo de neutrófilos para o pulmão, a disbiose não altera a ativação do neutrófilo nesse sítio.

Os neutrófilos são peças fundamentais para a eliminação da *P. aeruginosa*. RYU *et al.*, 2017 demonstraram que a administração de um anticorpo anti-Ly6G, que resulta na depleção de neutrófilos, resultou em aumento da carga bacteriana e lesão pulmonar de animais infectados por *P. aeruginosa*. Uma vez recrutado para o sítio infeccioso, os neutrófilos realizarão a liberação de substâncias bactericidas como serina-proteases e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que serão responsáveis pela eliminação bacteriana (LAVOIE *et al.*, 2012 e GONÇALVES-DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2015).

Demonstramos que animais disbióticos apresentaram uma diminuição na produção de ROS por neutrófilos no espaço alveolar, o que pode justificar, pelo menos em parte, o menor controle da carga bacteriana nestes animais. De fato, as ROS são importantes para a morte da bactéria e controle da carga bacteriana *in vivo*. Neutrófilos de camundongos NOX2<sup>-/-</sup>, que não apresentam a NADPH-oxidase 2 e por isso menor produção de superóxido, apresentaram uma menor capacidade de matar a *Pseudomonas aeruginosa*. Ainda, camundongos NOX2<sup>-/-</sup> apresentaram uma maior carga bacteriana no BAL e no pulmão, o que resultou em uma maior letalidade após a infecção com *Pseudomonas aeruginosa* (RYU *et al.*, 2017). Além disso, dados não publicados do nosso grupo de pesquisa demonstram que animais GP91phox<sup>-/-</sup>, um componente do complexo da NADPHoxidase 2, também são mais susceptíveis a infecção por *P. aeruginosa*. Em conjunto, esses achados demonstram que a produção de ROS é essencial para o controle da *Pseudomonas aeruginosa* (ARIFA, R.D.N; SOUZA, D.G em preparação).

Os macrófagos alveolares são a primeira linha de defesa contra a infecção pulmonar por microrganismos, incluindo a *Pseudomonas aeruginosa* (LAVOIE *et al.*, 2011). A microbiota intestinal tem se mostrado essencial na primagem e ativação dessas células, impactando de forma significativa na sua capacidade fagocítica (ENAUD *et al.*, 2020). Assim, diversos trabalhos tem demonstrado que a modulação da microbiota pelo uso de antimicrobianos, afeta de forma significativa a fagocitose de microrganismos por macrófagos alveolares (KHAN *et al.*, 2019; TSAY *et al.*, 2018; TSAY; CHEN; CHEN, 2019; WU *et al.*, 2014). O uso de antimicrobianos por 6 dias já foi capaz de alterar a capacidade fagocítica da *P.*

*aeruginosa* por macrófagos alveolares em dois modelos diferentes de infecção pulmonar (TSAY *et al.*, 2018; TSAY; CHEN; CHEN, 2019). Indo de acordo com o descrito na literatura, demonstramos que o uso prolongado (14 dias) de antimicrobianos induziu uma menor fagocitose da *P. aeruginosa* por macrófagos alveolares. Além do papel importante no *killing* da bactéria, o reconhecimento e fagocitose da *P. aeruginosa* por macrófagos alveolares é importante para a secreção de citocinas e quimiocinas, como IL-1 $\beta$  e CXCL1, responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos para o sítio infeccioso (LAVOIE *et al.*, 2011). Dessa forma, a menor fagocitose da *P. aeruginosa* por macrófagos alveolares de animais disbióticos pode contribuir para a menor produção de citocinas e menor recrutamento de neutrófilos para os alvéolos em animais disbióticos 24h após a infecção.

A enzima IDO1 é expressa em células dendríticas e macrófagos e sua expressão é altamente regulada em ambientes inflamatórios, uma vez que mediadores inflamatórios como interferons do tipo I e II, TNF, bem como componentes microbianos, como o LPS, são fortes indutores da sua expressão (AMOBÍ *et al.*, 2017; MELLOR *et al.*, 2017). A infecção por diversos microrganismos, como o vírus influenza A e as bactérias *Chlamydia muridarum*, *Chlamydia pneumoniae* e *Mycobacterium tuberculosis* induzem um aumento da atividade da enzima IDO1, levando ao acúmulo de quinurenina no sítio infeccioso (COLLINS *et al.*, 2020; HUANG *et al.*, 2013; LIN; LIN; YEH, 2020; VIROK *et al.*, 2019). De maneira semelhante, demonstramos que a infecção por *Pseudomonas aeruginosa* induz acúmulo de quinurenina no pulmão e que esse acúmulo é ainda maior em animais disbióticos. Ainda, observamos uma maior atividade da enzima IDO1 nesses animais e uma queda da atividade da enzima quinurenina aminotranferase, que está a jusante na via das quinureninas, o que sugere um outro evento envolvido no acúmulo de quinurenina nesses animais.

Corroborando com a nossa hipótese, demonstramos que a enzima IDO1 parece exercer papel importante no descontrole da carga bacteriana após a infecção por *P. aeruginosa*. Usando duas diferentes estratégias experimentais, inibição farmacológica e uso de camundongos geneticamente modificados, demonstramos que a ausência da enzima acentuou o controle da carga bacteriana pulmonar durante a eubiose e a

disbiose. A IDO1 apresenta importante papel na modulação da resposta inflamatória, funcionando principalmente como imunossupressor. Dentre essas funções, podemos destacar diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> em células Treg bem como sua ativação, fazendo com que essa enzima tenha papel importante na autoimunidade e na resposta imune ao câncer (AMOBÍ et al., 2017; MBONGUE et al., 2015). Além dessas doenças, a enzima também possui papel importante em doenças infecciosas. Tem sido descrito que o vírus do HIV induz a expressão de IDO1 para impedir as funções pró-inflamatórias de células T CD4<sup>+</sup>, estimulando assim respostas imunossupressoras por células Treg. Além disso, o vírus Epstein-Barr induz a expressão de IDO1 em carcinoma para fornecer um ambiente imunossupressor para facilitar a infecção (MBONG et al., 2015). Ainda, animais deficientes para a enzima IDO1 se mostraram mais resistentes a infecção pelo vírus influenza A (LIN; LIN; YEH, 2020) e a inibição farmacológica da enzima IDO1 resultou no melhor controle da carga bacteriana e nos sinais clínicos da doença em um modelo de infecção pulmonar por *Mycobacterium tuberculosis* (GAUTAM et al., 2018). Até hoje na literatura percebemos que os diversos mecanismos descritos para a ação da IDO1 na imunossupressão se dão através de mecanismos envolvidos na imunidade ligada a células T, no entanto, no presente trabalho, demonstramos que a ausência da enzima IDO1 resultou em um maior recrutamento de neutrófilos para o sítio bacteriano durante a eubiose e a disbiose. No entanto, mais experimentos são necessários para entender melhor quais os mecanismos podem estar envolvidos no restabelecimento no maior influxo de neutrófilos para o sítio infeccioso em animais IDO1<sup>-/-</sup>.

Já está bem descrito na literatura que produtos derivados da *Pseudomonas aeruginosa* podem levar à ativação do receptor AHR. A infecção por *Pseudomonas aeruginosa* induziu um aumento da expressão de *Cyp1a1*, uma enzima induzida pela ativação de AHR, em células do BAL 8h após a infecção (MOURA-ALVES et al., 2014). No entanto, no nosso modelo só observamos aumento na expressão de *Cyp1a2* em animais disbióticos, sugerindo que o receptor AHR está mais ativo nesses animais. De maneira interessante, enquanto animais WT disbióticos apresentaram aumento da expressão de AHR em neutrófilos, animais disbióticos deficientes para IDO1 apresentaram a expressão similar a animais IDO1<sup>-/-</sup> eubióticos. No entanto, mais

experimentos serão necessários para demonstrar que animais IDO1<sup>-/-</sup> disbióticos apresentam também menor ativação do receptor AHR.

Essa diferença no perfil de expressão de AHR em animais IDO1<sup>-/-</sup> disbióticos nos levou a criar a hipótese de que o receptor AHR poderia estar envolvido no descontrole da carga bacteriana em animais disbióticos. Além disso, a quinurenina, que está aumentada em animais disbióticos, é um dos ligantes endógenos do AHR. De fato, a inibição farmacológica do receptor AHR em animais disbióticos reverteu o aumento da carga bacteriana no pulmão de animais infectados induzido pela antibioticoterapia. Através do uso de animais geneticamente modificados, demonstramos que animais AHR<sup>-/-</sup> apresentaram menor carga bacteriana no pulmão após a disbiose. Além disso, demonstramos que, durante a eubiose, camundongos deficientes para o receptor AHR apresentaram menor carga bacteriana no pulmão e no BAL quando infectados pela *Pseudomonas aeruginosa*. De maneira oposta, Moura-Alves *et al.*, 2014 demonstraram de maneira elegante que os pigmentos da *P. aeruginosa*, piocianina e pioquelina, eram capazes de ativar o receptor AHR do hospedeiro e que esse receptor seria crucial para a defesa do hospedeiro frente a infecção. A ausência do receptor AHR resultou em aumento da carga bacteriana no pulmão, menor recrutamento de neutrófilos para o pulmão e para o espaço alveolar e menor liberação das quimiocinas CXCL1 e CXCL2 (MOURA-ALVES *et al.*, 2014).

Apesar de controlar melhor o aumento da carga bacteriana, percebemos que animais AHR disbióticos ainda apresentaram um menor recrutamento de leucócitos para o espaço alveolar, o que sugere que o restabelecimento do recrutamento de leucócitos não seria determinante para redução da carga bacteriana pulmonar no contexto estudado. De maneira surpreendente, demonstramos que macrófagos alveolares de animais IDO1<sup>-/-</sup> e AHR<sup>-/-</sup> fagocitam mais que animais WT durante a eubiose e disbiose, o que poderia explicar a menor carga bacteriana encontrada nesses animais. Ainda, através do uso de duas diferentes linhagens de macrófagos em experimentos *in vitro*, demonstramos que a ausência da enzima IDO1 resultou em uma maior fagocitose e *killing* da *Pseudomonas aeruginosa* e que a exposição a elevadas concentrações de quinurenina impactou de forma negativa a fagocitose e o *killing* da bactéria por BMDM. Por fim, demonstramos que o excesso de quinurenina *in vivo* levou a um descontrole

da carga bacteriana e diminuição do recrutamento de neutrófilos. Esses dados, em conjunto, reforçam a hipótese de que o excesso de quinurenina pode ser o responsável pela menor fagocitose da *P. aeruginosa* e descontrole da carga bacteriana em animais disbióticos.

Corroborando essa hipótese, um estudo demonstrou que a maior expressão de *Cyp1a1*, enzima induzida pela ativação de AHR, foi relacionada com a menor capacidade fagocítica da bactéria *Escherichia coli* (TIAN *et al.*, 2020). De maneira similar, um estudo demonstrou que o uso de um agonista de AHR foi capaz de alterar a expressão de *Cyp1a1* e diminuir a capacidade de internalização da bactéria *Listeria monocytogenes* em hepatócitos (SHI *et al.*, 2009). Um outro estudo recente demonstrou que a inibição da enzima quinolato fosforibosiltransferase, o último passo da via das quinureninas para a produção de NAD<sup>+</sup>, diminuiu a capacidade de macrófagos de fagocitar a bactéria *E. coli* (MINHAS *et al.*, 2019). Assim, a quinurenina poderia inibir a fagocitose ao induzir a expressão de enzimas do complexo Cyp1 ou por servir como precursora dos metabólitos da via de síntese de NAD<sup>+</sup>.

O receptor CD206 é um receptor de manose que é abundantemente expresso em macrófagos alveolares e em macrófagos derivados de monócitos. O receptor CD206 está envolvido no reconhecimento de uma série de microrganismos, sendo implicado na fagocitose e endocitose dos mesmos (AZAD *et al.*, 2014). No presente trabalho, demonstramos que a enzima IDO1 parece regular negativamente a expressão de CD206, o que indica uma interferência no reconhecimento da *Pseudomonas aeruginosa* pelos macrófagos alveolares. O aumento da expressão de CD206 em animais IDO1<sup>-/-</sup> pode estar implicado na maior fagocitose da bactéria encontrada nos nossos experimentos.

O sucesso de uma infecção acontece por uma junção da falha da imunidade inata do hospedeiro e por fatores da bactéria que seriam capazes de escapar do sistema imune do hospedeiro. Como descrito anteriormente, a *P. aeruginosa* é uma bactéria capaz de metabolizar o triptofano gerando a quinurenina, que irá levar a síntese de antranilato e quinolonas, duas moléculas sinalizadoras de quórum importantes na regulação de diversos fatores de virulência. De maneira interessante, um estudo

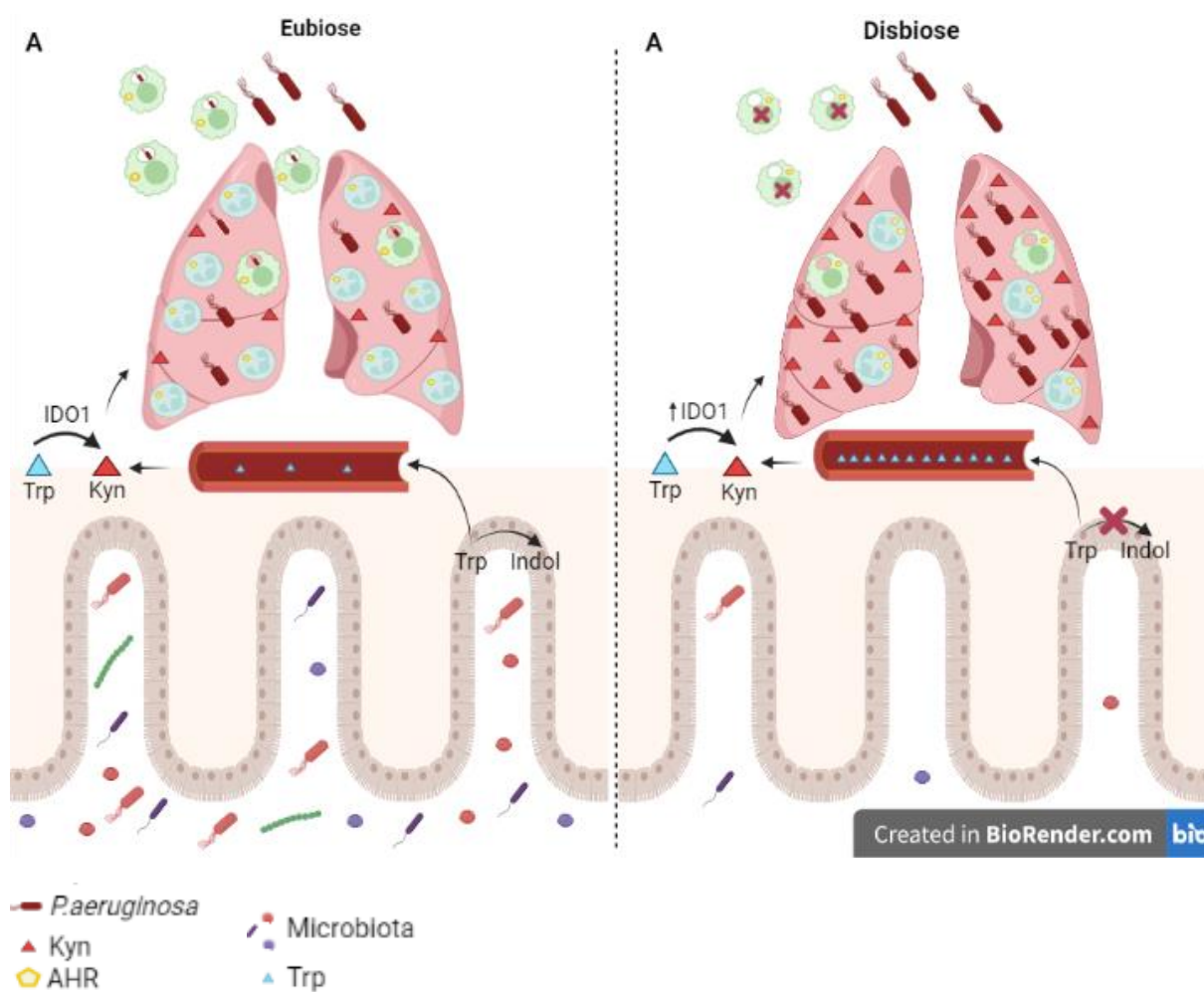
demonstrou que a produção de quinurenina pela *P. aeruginosa* funciona como um eliminador da produção de ROS, fazendo com que a bactéria consiga escapar do *killing* de neutrófilos (GENESTET et al., 2014). Dessa forma, um excesso de quinurenina no hospedeiro, além de ter ação na resposta imune do hospedeiro, poderia também tornar o ambiente mais favorável para a permanência da bactéria e a torná-la mais virulenta. No entanto, essa premissa ainda precisa ser testada experimentalmente.

## 7 CONCLUSÃO

Através do presente trabalho podemos inferir as seguintes conclusões:

- 1) A disbiose por uso de antimicrobianos induz um aumento nas concentrações séricas e pulmonares de triptofano. Com o estímulo inflamatório induzido pela infecção pela *P. aeruginosa*, ocorre um aumento na atividade da enzima IDO1, levando ao catabolismo do excesso de triptofano e ao acúmulo de quiinurenina em animais disbióticos. Ainda, a infecção em animais disbióticos induz um aumento da expressão de AHR de maneira dependente da expressão de IDO1. Esse acúmulo de quiinurenina leva a uma maior ativação do receptor AHR, causando um prejuízo na fagocitose da bactéria, favorecendo a permanência e expansão da *P. aeruginosa* no sítio da infecção, e induzindo uma maior letalidade (Fig.28).
- 2) Durante a eubiose, a IDO1 parece inibir a fagocitose e o *killing* da *Pseudomonas aeruginosa*, através da inibição da expressão do receptor CD206. Esse controle da fagocitose interfere no recrutamento de neutrófilos e controle da carga bacteriana no pulmão.





**Figura 29- Participação do metabolismo de triptofano pela microbiota disbiótica na patogênese da infecção pela *P. aeruginosa*:** (A) Eubiose: Durante a eubiose a microbiota intestinal irá metabolizar o triptofano em metabólitos indólicos, deixando o triptofano em concentrações séricas normais. Durante a infecção por *P.aeruginosa*, com o estímulo inflamatório, o triptofano será convertido em quinurenina, aumentando a concentração de quinurenina no pulmão. Após o reconhecimento por células residentes, a *P.aeruginosa* será fagocitada por macrófagos alveolares que irão orquestrar uma resposta inflamatória com o recrutamento massivo de neutrófilos. Os neutrófilos irão fagocitar e eliminar a bactéria, controlando a carga bacteriana no órgão alvo. (B) Disbiose: Durante o uso de antimicrobianos ocorrerá a disbiose da microbiota intestinal, com redução de grupos bacterianos que metabolizam o triptofano em indol fazendo com que a concentração sérica de triptofano fique elevada. Com o estímulo infeccioso, ocorrerá o aumento da atividade de IDO1 levando ao aumento da concentração de quinurenina no pulmão. Esse excesso de quinurenina irá ativar o receptor AHR impedindo que a *Pseudomonas aeruginosa* seja fagocitada por macrófagos alveolares. Esse prejuízo na fagocitose fará com que ocorra uma redução no influxo de neutrófilos. Além disso, os neutrófilos recrutados apresentam aumento da expressão de AHR, que pode ser ativado pela quinurenina em excesso, atrapalhando a fagocitose da bactéria. **Criado com Biorender.com**

## REFERÊNCIAS

- AGUS, Allison; PLANCHAIS, Julien; SOKOL, Harry. Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease. **Cell Host and Microbe**, [s. l.], v. 23, n. 6, p. 716–724, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.05.003>
- ALKHALAF, Lona M.; RYAN, Katherine S. Biosynthetic manipulation of tryptophan in bacteria: Pathways and mechanisms. **Chemistry and Biology**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 317–328, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.02.005>
- AMATI, Francesco *et al.* Lung Microbiome in Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Other Interstitial Lung Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 1–16, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms23020977>
- ANANTHARAJAH, Ahaliyah; MINGEOT-LECLERCQ, Marie Paule; VAN BAMBEKE, Françoise. Targeting the Type Three Secretion System in *Pseudomonas aeruginosa*. **Trends in Pharmacological Sciences**, [s. l.], v. 37, n. 9, p. 734–749, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.05.011>
- BARTOSCH, Sabine *et al.* Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 70, n. 6, p. 3575–3581, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3575-3581.2004>
- BÄUMLER, Andreas J.; SPERANDIO, Vanessa. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. **Nature**, [s. l.], v. 535, n. 7610, p. 85–93, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature18849>
- BECATTINI, Simone; TAUR, Ying; PAMER, Eric G. Antibiotic-Induced Changes in the Intestinal Microbiota and Disease. **Trends in Molecular Medicine**, [s. l.], v. 22, n. 6, p. 458–478, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.04.003>
- BORTOLOTTI, Perrine *et al.* Tryptophan catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* and potential for inter-kingdom relationship. **BMC microbiology**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 137, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0756-x>
- BRAUN, Tzipi *et al.* Fecal microbial characterization of hospitalized patients with suspected infectious diarrhea shows significant dysbiosis. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01217-1>
- BUDDEN, Kurtis F. *et al.* Emerging pathogenic links between microbiota and the gut–lung axis. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 55–63, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.142>
- CERF-BENSUSSAN, Nadine; GABORIAU-ROUTHIAU, Valérie. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 10, n. 10, p. 735–744, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nri2850>
- CHOUDHURI, Anirban Hom; CHAKRAVARTY, Mitali; UPPAL, Rajeev. Influence of

Admission Source on the Outcome of Patients in an Intensive Care Unit. **Indian journal of critical care medicine : peer-reviewed, official publication of Indian Society of Critical Care Medicine**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 213–217, 2017. Disponível em: [https://doi.org/10.4103/IJCCM.IJCCM\\_7\\_17](https://doi.org/10.4103/IJCCM.IJCCM_7_17). Acesso em: 1 mar. 2022.

CISALPINO, Daniel *et al.* Microbiota-Induced Antibodies Are Essential for Host Inflammatory Responsiveness to Sterile and Infectious Stimuli. **The Journal of Immunology**, [s. l.], 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600852>

COLLINS, Jeffrey M. *et al.* Tryptophan catabolism reflects disease activity in human tuberculosis. **JCI Insight**, [s. l.], v. 5, n. 10, p. 1–16, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.137131>

COSTA, Marliete Carvalho *et al.* The absence of microbiota delays the inflammatory response to *Cryptococcus gattii*. **International Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 306, n. 4, p. 187–195, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.03.010>

DANG, Anh Thu; MARSLAND, Benjamin J. Microbes, metabolites, and the gut–lung axis. **Mucosal Immunology**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 843–850, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41385-019-0160-6>

DUMAS, Alexia *et al.* The host microbiota contributes to early protection against lung colonization by mycobacterium tuberculosis. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 9, n. NOV, p. 1–12, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02656>  
ECKBURG, P. B. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. **Science**, [s. l.], v. 308, n. 5728, p. 1635–1638, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1110591>

ENAUD, Raphaël *et al.* The Gut-Lung Axis in Health and Respiratory Diseases: A Place for Inter-Organ and Inter-Kingdom Crosstalks. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 10, n. February, p. 1–11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00009>

ENGEL, Joanne; BALACHANDRAN, Priya. Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. **Current Opinion in Microbiology**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 61–66, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.12.007>

FAGUNDES, C. T. *et al.* Transient TLR Activation Restores Inflammatory Response and Ability To Control Pulmonary Bacterial Infection in Germfree Mice. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 188, n. 3, p. 1411–1420, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101682>

FERREYRA, Jessica A. *et al.* Gut microbiota-produced succinate promotes *C. Difficile* infection after antibiotic treatment or motility disturbance. **Cell Host and Microbe**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. 770–777, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.11.003>

FRANCHI, Luigi *et al.* The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. **Nature Immunology**, [s. l.],

v. 10, n. 3, p. 241–247, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ni.1703>  
FRANCK, Thierry *et al.* Muscle derived mesenchymal stem cells inhibit the activity of the free and the neutrophil extracellular trap (Net)-bond myeloperoxidase. **Cells**, [s. l.], v. 10, n. 12, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells10123486>

FUNG, Thomas C.; ARTIS, David; SONNENBERG, Gregory F. Anatomical localization of commensal bacteria in immune cell homeostasis and disease. **Immunological Reviews**, [s. l.], v. 260, n. 1, p. 35–49, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/imr.12186>

GAO, Jing *et al.* Impact of the Gut Microbiota on Intestinal Immunity Mediated by Tryptophan Metabolism. [s. l.], v. 8, n. February, p. 1–22, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00013>

GAO, Kan *et al.* Tryptophan Metabolism: A Link between the Gut Microbiota and Brain. **Advances in Nutrition**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 709–723, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/advances/nmz127>

GAUTAM, Uma S. *et al.* In vivo inhibition of tryptophan catabolism reorganizes the tuberculoma and augments immune-mediated control of Mycobacterium tuberculosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 115, n. 1, p. E62–E71, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1711373114>

GELLATLY, Shaan L.; HANCOCK, Robert E.W. Pseudomonas aeruginosa: New insights into pathogenesis and host defenses. **Pathogens and Disease**, [s. l.], v. 67, n. 3, p. 159–173, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12033>

GENESTET, Charlotte *et al.* Scavenging of reactive oxygen species by tryptophan metabolites helps Pseudomonas aeruginosa escape neutrophil killing. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 73, p. 400–410, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.06.003>

GETSELTER, Dmitriy; KOREN, Omry; ELLIOTT, Evan. Role of Tryptophan in Behavior : Evidence From Tryptophan Depletion Study. [s. l.], v. 13, n. June, p. 1–10, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00123>

GOMILA, Aina *et al.* Risk factors and prognosis of complicated urinary tract infections caused by Pseudomonas aeruginosa in hospitalized patients : a retrospective multicenter cohort study. [s. l.], p. 2571–2581, 2018.

GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, Cassiano Felipe *et al.* Possible mechanisms of Pseudomonas aeruginosa-associated lung disease. **International Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 306, n. 1, p. 20–28, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2015.11.001>

HUANG, Lei *et al.* Induction and Role of Indoleamine 2,3 Dioxygenase in Mouse Models of Influenza A Virus Infection. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 6, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066546>

HUBBARD, Troy D; MURRAY, Iain a; PERDEW, Gary H. Indole and Tryptophan

Metabolism: Endogenous and Dietary Routes to Ah Receptor Activation. **Drug Metabolism and Disposition**, [s. l.], v. 43, n. 10, p. 1522–1535, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1124/dmd.115.064246>

IEBBA, Valerio *et al.* Eubiosis and dysbiosis : the two sides of the microbiota. [s. l.], p. 1–12, 2016.

JARONEN, Merja; QUINTANA, Francisco J. Immunological relevance of the coevolution of IDO1 and AHR. [s. l.], v. 5, n. October, p. 1–7, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00521>

JULLIARD, Walker; FECHNER, John H; MEZRICH, Joshua D. The aryl hydrocarbon receptor meets immunology : friend or foe ? A little of both. [s. l.], v. 5, n. October, p. 1–6, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00458>

KARIMINIK, Ashraf; BASERI-SALEHI, Majid; KHEIRKHAH, Babak. Pseudomonas aeruginosa quorum sensing modulates immune responses: An updated review article. **Immunology Letters**, [s. l.], v. 190, p. 1–6, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.07.002>

KHAN, Nargis *et al.* Alteration in the gut microbiota provokes susceptibility to tuberculosis. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 7, n. NOV, p. 1–10, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00529>

KHAN, Nargis *et al.* Intestinal dysbiosis compromises alveolar macrophage immunity to Mycobacterium tuberculosis. **Mucosal Immunology**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 772–783, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41385-019-0147-3>

KUNG, Vanderlene L.; OZER, Egon A.; HAUSER, Alan R. The Accessory Genome of Pseudomonas aeruginosa . **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s. l.], v. 74, n. 4, p. 621–641, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mnbr.00027-10>

LANGDON, Amy; CROOK, Nathan; DANTAS, Gautam. The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation. **Genome Medicine**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 39, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0294-z>

LAUGERAY, A. *et al.* Chronic treatment with the IDO1 inhibitor 1-methyl-Dtryptophan minimizes the behavioural and biochemical abnormalities induced by unpredictable chronic mild stress in mice - Comparison with fluoxetine. **PLoS ONE**, 2016.

LAY, Christophe *et al.* Design and validation of 16S rRNA probes to enumerate members of the Clostridium leptum subgroup in human faecal microbiota. **Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 7, n. 7, p. 933–946, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00763.x>

LE FLOC'H, Nathalie; OTTEN, Winfried; MERLOT, Elodie. Tryptophan metabolism, from nutrition to potential therapeutic applications. **Amino Acids**, [s. l.], v. 41, n. 5, p. 1195–1205, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0752-7>

LIN, Yi Tsen; LIN, Chih Feng; YEH, Te Huei. Influenza A virus infection induces indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression and modulates subsequent inflammatory mediators in nasal epithelial cells. **Acta Oto-Laryngologica**, [s. l.], v. 140, n. 2, p. 149–156, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00016489.2019.1700304>

LOVEWELL, Rustin R.; PATANKAR, Yash R.; BERWIN, Brent. Mechanisms of phagocytosis and host clearance of *Pseudomonas aeruginosa*. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, [s. l.], v. 306, n. 7, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajplung.00335.2013>

LUGADE, Amit A. Tryptophan Catabolism and Cancer Immunotherapy Targeting IDO Mediated Immune Suppression. [s. l.], 2017.

MAHOWALD, M. A. *et al.* Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 106, n. 14, p. 5859–5864, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0901529106>

MALLET DE LIMA, Carolina Diettrich *et al.* Central role of PAFR signalling in ExoU-induced NF- $\kappa$ B activation. **Cellular Microbiology**, [s. l.], v. 16, n. 8, p. 1244–1254, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/cmi.12280>

MARTINEZ-GURYN, Kristina; LEONE, Vanessa; CHANG, Eugene B. Regional Diversity of the Gastrointestinal Microbiome. **Cell Host and Microbe**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 314–324, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.08.011>

MELLOR, Andrew L *et al.* Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Tolerance: Where Are We Now? [s. l.], v. 8, n. October, p. 1–6, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01360>

MENEZES-GARCIA, Zélia *et al.* Colonization by Enterobacteriaceae is crucial for acute inflammatory responses in murine small intestine via regulation of corticosterone production. **Gut Microbes**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 1531–1546, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1765946>

MORADALI, M. Fata; GHODS, Shirin; REHM, Bernd H.A. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 7, n. FEB, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00039>

MOURA-ALVES, Pedro *et al.* Host monitoring of quorum sensing during *Pseudomonas aeruginosa* infection. **Science**, [s. l.], v. 366, n. 6472, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.aaw1629>

NEUMAN, Hadar *et al.* Antibiotics in early life : dysbiosis and the damage done. [s. l.], n. June, p. 1–11, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy018>

PEDRO MOURA-ALVES<sup>1\*</sup>, KELLEN FAE<sup>1\*</sup>, ERICA HOUTHUYS<sup>1\*</sup>, ANCA

DORHOI1\*, ANNIKA KREUCHWIG2, JENS FURKERT2, Nicola Barison3 *et al.* AhR sensing of bacterial pigments regulates antibacterial defence. [s. l.], 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature13684>

PLOTKOWSKI, Maria Cristina *et al.* Contribution of the platelet activating factor signaling pathway to cerebral microcirculatory dysfunction during experimental sepsis by ExoU producing *Pseudomonas aeruginosa*. [s. l.], n. July, p. 1–11, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv046>

PUPIN, Caio *et al.* Antibiotic-induced dysbiosis effects on the murine gastrointestinal tract and their systemic repercussions. **Life Sciences**, [s. l.], v. 207, n. June, p. 480–491, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.06.030>

RINNINELLA, Emanuele *et al.* What is the Healthy Gut Microbiota Composition ? A Changing Ecosystem across Age , Environment , Diet , and Diseases. [s. l.], 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010014>

ROBAK, Oliver H *et al.* Antibiotic treatment – induced secondary IgA deficiency enhances susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. [s. l.], v. 128, n. 8, p. 3535–3545, 2018.

ROOKS, Michelle G.; GARRETT, Wendy S. Gut microbiota, metabolites and host immunity. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. 341–352, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nri.2016.42>

ROUND, June L.; MAZMANIAN, Sarkis K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. 600–600, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nri2614>

RYU, J. C. *et al.* Neutrophil pyroptosis mediates pathology of *P. aeruginosa* lung infection in the absence of the NADPH oxidase NOX2. **Mucosal Immunology**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 757–774, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/mi.2016.73>

SADIKOT, Ruxana T. *et al.* Pathogen-host interactions in *pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, [s. l.], v. 171, n. 11, p. 1209–1223, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1164/rccm.200408-1044SO>

SAINZ-MEJÍAS, Maite; JURADO-MARTÍN, Irene; MCCLEAN, Siobhán. Understanding *Pseudomonas aeruginosa*-Host Interactions: The Ongoing Quest for an Efficacious Vaccine. **Cells**, [s. l.], v. 9, n. 12, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells9122617>

SAMUELSON, Derrick R. *et al.* Alcohol-associated intestinal dysbiosis impairs pulmonary host defense against *Klebsiella pneumoniae*. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 1–25, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006426>

SCHUIJT, Tim J *et al.* The gut microbiota plays a protective role in the host defence against pneumococcal pneumonia. **Gut**, [s. l.], v. 65, n. 4, p. 575–583, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309728>

SCHUIJT, Tim J. *et al.* The intestinal microbiota and host immune interactions in the critically ill. **Trends in Microbiology**, [s. l.], v. 21, n. 5, p. 221–229, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.02.001>

SEKIROV, Inna; RUSSELL, SI; ANTUNES, Lcm. Gut microbiota in health and disease. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 90, n. 3, p. 859–904, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2009>.

SHAUN LOTT, J. The tryptophan biosynthetic pathway is essential for *Mycobacterium tuberculosis* to cause disease. **Biochemical Society Transactions**, [s. l.], v. 48, n. 5, p. 2029–2037, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BST20200194>

SHINDO, Yuichiro *et al.* Risk Factors for Drug-Resistant Pathogens in Community-acquired and Healthcare-associated Pneumonia. [s. l.], n. 1, Disponível em: <https://doi.org/10.1164/rccm.201301-0079OC>

SOMMER, Felix *et al.* The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.58>

SOUZA, Danielle G. *et al.* Effects of inhibition of PDE4 and TNF- $\alpha$  on local and remote injuries following ischaemia and reperfusion injury. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704336>

SOUZA, Danielle G. *et al.* The essential role of the intestinal microbiota in facilitating acute inflammatory responses. **Journal of Immunology**, [s. l.], 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.6.4137>

TAKIISHI, Tatiana; FENERO, Camila Ideli Morales; CÂMARA, Niels Olsen Saraiva. Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life. **Tissue Barriers**, [s. l.], v. 5, n. 4, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21688370.2017.1373208>

TALEB, Soraya. Tryptophan Dietary Impacts Gut Barrier and Metabolic Diseases. [s. l.], v. 10, n. September, p. 1–7, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02113>

TIAN, Li Xing *et al.* Cytochrome P450 1A1 enhances inflammatory responses and impedes phagocytosis of bacteria in macrophages during sepsis. **Cell Communication and Signaling**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 1–16, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12964-020-0523-3>

TSAY, Tzyy Bin *et al.* *Lactobacillus salivarius* reverse antibiotic-induced lung defense impairment in a ventilator model. **Journal of Translational Medicine**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 1–15, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1597-1>

TSAY, Tzyy Bin; CHEN, Pei Hsuan; CHEN, Lee Wei. Aryl hydrocarbon receptor ligands enhance lung immunity through intestinal IKK $\beta$  pathways. **Journal of**



**Translational Medicine**, [s. l.], p. 1–14, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12967-019-2043-8>

UNDERHILL, David M.; OZINSKY, Adrian. Phagocytosis of microbes: Complexity in action. **Annual Review of Immunology**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 825–852, 2002.

Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.103001.114744>

Vangay, P., Ward, T., Gerber, J. S., & Knights, D. (2015). Antibiotics, pediatric dysbiosis, and disease. *Cell host & microbe*, 17(5), 553-564.

VIROK, Dezső P. *et al.* Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity in Chlamydia muridarum and Chlamydia pneumoniae Infected Mouse Lung Tissues. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. JUN, p. 1–12, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00192>

WANG, Qiongxin *et al.* Deregulated tryptophan-kynurenine pathway is linked to inflammation, oxidative stress, and immune activation pathway in cardiovascular diseases. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, [s. l.], v. 20, p. 1116, 2015.

WINTER, Sebastian E; LOPEZ, Christopher A; BÄUMLER, Andreas J. The dynamics of gut-associated microbial communities during inflammation. **EMBO reports**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 319–327, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/embor.2013.27>

WU, Ying Ying *et al.* Toll-like receptor stimulation induces nondefensin protein expression and reverses antibiotic-induced gut defense impairment. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 82, n. 5, p. 1994–2005, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.01578-14>

WYPYCH, Tomasz P; WICKRAMASINGHE, Lakshanie C; MARSLAND, Benjamin J. health. **Nature Immunology**, [s. l.], Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0451-9>

ZHANG, Linda S.; DAVIES, Sean S. Microbial metabolism of dietary components to bioactive metabolites: opportunities for new therapeutic interventions. **Genome Medicine**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 46, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0296-x>