

LOHANE REIS DE OLIVEIRA

Atividade de moléculas produzidas pela microbiota intestinal humana na virulência de *Pseudomonas aeruginosa*



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

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
2020**

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação do Dr. Luis Caetano Martha Antunes e coorientação da Dra. Heidi Pauer.

CIP - Catalogação na Publicação

d48a de Oliveira, Lohane Reis Atividade de moléculas produzidas pela microbiota intestinal humana na virulência de *Pseudomonas aeruginosa* / Lohane Reis de Oliveira.
- Rio de Janeiro, 2020.
45 f.

Orientador: Luis Caetano Martha Antunes.
Coorientadora: Heidi Pauer.
Trabalho de conclusão de curso (graduação)
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2020.

1. microbiota. 2. metabólitos. 3. *Pseudomonas aeruginosa*. I. Antunes, Luis Caetano Martha , orient. II. Pauer, Heidi, coorient. III. Título.

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

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

ALUNO: **Lohane Reis de Oliveira**
 DRE: 117033023

BANCA EXAMINADORA: Prof^ª. Rosana Barreto Rocha Ferreira (Presidente)
 Dr. Felipe Lopes Teixeira
 Dra. Teca Galvão
 Prof^ª. Karla Rodrigues Miranda (Suplente)

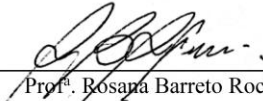
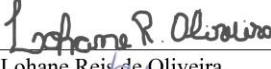


Título da Monografia: **“Atividade de moléculas produzidas pela microbiota intestinal humana na virulência de *Pseudomonas aeruginosa*”**

Local: Sala virtual [https:// meet.google.com/gtg-faak-aph](https://meet.google.com/gtg-faak-aph).
 Data e hora de início: **13 de novembro de 2020 às 10:00h**

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

Rio de Janeiro, 13 de novembro de 2020.

NOTA	Banca Examinadora:
<u>10,0</u>	Prof ^ª . Rosana Barreto Rocha Ferreira
<u>10,0</u>	Dr. Felipe Lopes Teixeira
<u>10,0</u>	Dra. Teca Galvão
_____	Prof ^ª . Karla Rodrigues Miranda

Presidente da banca	 _____ Prof ^ª . Rosana Barreto Rocha Ferreira
Aluno:	 _____ Lohane Reis de Oliveira
Orientador:	 _____ Dr. Luis Caetano Martha Antunes (Dra. Heidi Pauer – Coorientador)
Coordenador de TCC	 _____ Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marilúcia Reis e Jackson de Oliveira (*in memoriam*) por me incentivarem e mostrarem tudo o que eu poderia ser capaz de alcançar. Os meus objetivos foram criados pelas esperanças que me deram no passado. Agradeço pelos ensinamentos, aprendizado e amor.

A minha irmã Larissa Reis pelo apoio, amizade e alegria.

Ao meu sobrinho Lorenzo Reis, por trazer os sentimentos mais verdadeiros à minha vida.

Ao meu companheiro, João Paulo. Por ser meu amigo, ouvinte paciente e por me encorajar em dias difíceis. Obrigada pelos momentos e pela força.

Aos meus familiares, por estarem comigo e demonstrarem extremo cuidado no meu período de formação.

Aos meus amigos Aline de Carvalho e Thiago Carvalho (*in memoriam*) por me acompanharem, me ajudarem e me incentivarem de todas as formas possíveis. Obrigada por investirem tanto em mim.

A minha orientadora, Heidi Pauer, por construir esse trabalho comigo e ser um exemplo de profissional para mim.

Ao meu orientador, Caetano Antunes, por auxiliar no processo de criação desse trabalho, pela confiança e incentivo.

A todos os meus professores que fizeram parte da minha formação e trouxeram diversos aprendizados para a minha vida.

A todos do laboratório de Biologia de Anaeróbios por dividirem conhecimento comigo durante a minha formação.

A CAPES, CNPq e a FAPERJ por possibilitarem esse trabalho através do auxílio financeiro.

“A missão é recuperar. Cooperar e empoderar”

Leandro Roque

RESUMO

LOHANE REIS DE OLIVEIRA

ATIVIDADE DE MOLÉCULAS PRODUZIDAS PELA MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA NA VIRULÊNCIA DE *Pseudomonas aeruginosa*

Orientador: Luis Caetano Martha Antunes

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

A microbiota do trato gastrointestinal é formada por um consórcio de diferentes microrganismos, como vírus, fungos, protozoários e bactérias. Esse consórcio realiza diversas interações benéficas com o hospedeiro, como o estímulo ao sistema imunológico e a diminuição de processos infecciosos através do antagonismo microbiano, por meio da produção de metabólitos. Entretanto, pouco se sabe sobre a ação específica desses metabólitos intestinais frente a patógenos. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi observar se há modulação de fatores de virulência das cepas ATCC 27853 e PAO1 de *Pseudomonas aeruginosa*, patógeno oportunista, multirresistente a antimicrobianos e altamente prevalentes em infecções nosocomiais. Para isso, foram utilizadas moléculas que, em trabalhos anteriores do nosso grupo, foram identificadas na fração bioativa de um extrato fecal que levou à redução da expressão de genes de virulência de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium. A partir dessa identificação, as moléculas hidroquinona, pirocatecol, ácido 2-hidroxicinâmico, ácido hidrocínâmico, ácido 3,4-dimetilbenzoico, ácido fenilpirúvico, ácido m-toluilacético, acetato de benzila e ácido 2-fenilpropiónico foram aplicadas nos testes desse estudo. Nos teste de motilidade foram observados padrões diferentes de motilidade, sendo esses padrões denominados *twitching* (1% de ágar), *swarming* (0,6% de ágar) e *swimming* (0,3% de ágar). Como resultado foi observado que no teste de motilidade a molécula pirocatecol apresentou capacidade de levar à redução do padrão de motilidade de *swimming* nas cepas ATCC 27853 e PAO1 e a molécula hidroquinona apenas na cepa ATCC 27853. O padrão de *swarming* foi reduzido em ATCC 27853 pelos compostos ácido hidrocínâmico, ácido fenilpirúvico, ácido m-toluilacético, acetato de benzila e ácido 2-fenilpropiónico. Em *twitching* as moléculas hidroquinona, ácido hidrocínâmico, ácido 3,4-dimetilbenzoico, ácido m-toluilacético, acetato de benzila e ácido 2-fenilpropiónico levaram à redução da motilidade da cepa PAO1 e as moléculas pirocatecol, ácido m-toluilacético, acetato de benzila e ácido 2-fenilpropiónico levaram à redução em ATCC 27853. O teste da produção de pigmento foi realizado por meio de crescimento em caldo LB e extração de piocianina com clorofórmio, e ao analisar os resultados observamos que não houve nenhuma alteração significativa nas duas cepas avaliadas. O ensaio de formação de biofilme foi realizado em placa de 96 poços onde as amostras foram incubadas por 18 h, sendo corado com cristal violeta 0,1%. A produção de biofilme foi reduzida apenas na cepa ATCC 27853 pelas moléculas ácido 2-hidroxicinâmico, ácido fenilpirúvico, acetato de benzila e ácido 2-fenilpropiónico. O teste de atividade das proteases foi realizado através da inoculação das cepas em placa de ágar LB contendo 2% de leite e pudemos observar uma maior atividade proteolítica com algumas moléculas. Tais resultados demonstram que há regulação dos fatores de virulência das cepas ATCC 27853 e PAO1 de *P. aeruginosa* por metabólitos oriundos da microbiota

gastrointestinal, sendo este trabalho um importante passo para a elucidação do papel desses metabólitos no contexto da microbiota e para o estudo de novas possibilidades terapêuticas.

Palavras-chave: microbiota, metabólitos, *Pseudomonas aeruginosa*.

ABSTRACT**LOHANE REIS DE OLIVEIRA****ATIVIDADE DE MOLÉCULAS PRODUZIDAS PELA MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA NA VIRULÊNCIA DE *Pseudomonas aeruginosa*****Orientador: Luis Caetano Martha Antunes**

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

The microbiota of the gastrointestinal tract is formed by a consortium of different microorganisms such as viruses, fungi, protozoa, and bacteria. This consortium performs several beneficial interactions for the host, such as stimulating the immune system and reducing infectious processes through microbial antagonism, through the production of metabolites. However, little is known about the specific action of these intestinal metabolites against pathogens. Thus, the objective of this study was to determine if these metabolites modulate virulence factors of the ATCC 27853 and PAO1 strains of *Pseudomonas aeruginosa*, an opportunistic pathogen that is often multidrug-resistant and one of the most prevalent microorganisms in nosocomial infections. For this, we used molecules previously identified by our group from a bioactive fraction of a fecal extract and that lead to reduction in the expression of virulence genes of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Based on this identification, hydroquinone, pyrocatechol, 2-hydroxycinnamic acid, hydrocinnamic acid, 3,4-dimethylbenzoic acid, phenylpyruvic acid, m-tolylacetic acid, benzyl acetate, and 2-phenylpropionic acid were tested in this study. In the motility test, different motility patterns were observed, namely twitching (1% agar), swarming (0.6% agar), and swimming (0.3% agar). As a result, it was observed that pyrocatechol showed the ability to reduce swimming in both ATCC 27853 and PAO1 whereas hydroquinone did so only in ATCC 27853. Swarming was reduced in ATCC 27853 by hydrocinnamic acid, phenylpyruvic acid, m-tolylacetic acid benzyl acetate, and 2-phenylpropionic acid. With regards to twitching, hydroquinone, hydrocinnamic acid, 3,4-dimethylbenzoic acid, m-tolylacetic acid, benzyl acetate, and 2-phenylpropionic acid led to a reduction in motility of PAO1, whereas pyrocatechol, m-tolylacetic acid, benzyl acetate, and 2-phenylpropionic acid led to a reduction in ATCC 27853. Pigment production was visualized by growing strains in LB broth and extracting pyocyanin with chloroform, and the results showed that there was no significant change in either strain. Biofilm production assays were performed in 96-well plates where strains were incubated for 18 h, and stained with a 0.1% crystal violet solution. Biofilm production was reduced, only in ATCC 27853, by 2-hydroxycinnamic acid, phenylpyruvic acid, benzyl acetate, and 2-phenylpropionic. Protease activity was observed by inoculating strains on an LB agar plate containing 2% milk and we were able to observe a higher proteolytic activity with some molecules. Our results demonstrate that metabolites from the gastrointestinal microbiota regulate virulence factors of the ATCC

27853 and PAO1 strains of *P. aeruginosa*, and represent an important step towards the elucidation of the role of these metabolites in the context of the microbiota and for the study of new therapeutic alternatives.

Key-words: microbiota, small molecules, *Pseudomonas aeruginosa*.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representação dos padrões de motilidade produzidos por <i>P. aeruginosa</i>	10
Figura 2: Estrutura química das moléculas estudadas.....	16
Figura 3: Efeito do extrato fecal na motilidade de <i>P. aeruginosa</i>	21
Figura 4: Impacto de moléculas oriundas da microbiota intestinal no crescimento de <i>P. aeruginosa</i>	22
Figura 5: Imagens das placas após os testes de visualização dos padrões de motilidade	23
Figura 6: Efeito de moléculas produzidas pela microbiota na motilidade de <i>swimming</i> de <i>P. aeruginosa</i>	24
Figura 7: Efeito de moléculas produzidas pela microbiota na motilidade de <i>swarming</i> de <i>P. aeruginosa</i>	25
Figura 8: Efeito de moléculas produzidas pela microbiota na motilidade de <i>twitching</i> de <i>P. aeruginosa</i>	26
Figura 9: Imagens das placas de testes de visualização de atividade de protease.....	26
Figura 10: Efeito de moléculas produzidas pela microbiota na atividade de proteases por <i>P. aeruginosa</i> após 24 horas.	27
Figura 11: Efeito de moléculas produzidas pela microbiota na atividade de proteases por <i>P. aeruginosa</i>	28
Figura 12: Ação de moléculas da microbiota intestinal na produção de biofilme por <i>P. aeruginosa</i>	29
Figura 13: Imagem dos testes de produção de piocianina.....	29
Figura 14: Efeito de moléculas produzidas pela microbiota na atividade de piocianina por <i>P. aeruginosa</i>	30

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	v
EPÍGRAFE	vi
RESUMO	vi
ABSTRACT	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Microbiota humana.....	1
1.1 Microbiota do trato gastrointestinal	3
1.2 Metaboloma intestinal.....	5
1.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
1.4 Fatores da virulência de <i>P. aeruginosa</i>	9
2. JUSTIFICATIVA	13
3. OBJETIVO	14
3.1 Objetivo geral	14
3.2 Objetivos específicos.....	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1 Preparo de soluções dos compostos	15
4.2 Obtenção do extrato fecal.....	16
4.3 Testes fenotípicos	17
4.3.1 Condições de cultivo	17
4.3.2 Monitoramento do crescimento bacteriano	17
4.3.3 Teste de motilidade	18
4.3.4 Teste de produção de protease	18
4.3.5 Teste de formação de biofilme	19
4.3.6 Teste de produção de pigmento	19
4.4 Análises estatísticas	20
5. RESULTADOS	21
5.1 Avaliação do efeito do extrato fecal em <i>P. aeruginosa</i>	21
5.2 Monitoramento do crescimento bacteriano	21
5.3 Motilidade.....	23
5.4 Produção de proteases	26
5.5 Formação de biofilme.....	28
5.6 Produção de pigmento	29
7. CONCLUSÕES	36

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. INTRODUÇÃO

1.1 Microbiota humana

O corpo humano apresenta em suas diferentes cavidades um consórcio de microrganismos denominado microbiota, que contém em sua composição protozoários, fungos, vírus, arqueas e, em sua maioria, bactérias. É estimado que o corpo humano apresente $3,9 \times 10^{13}$ células bacterianas e $3,0 \times 10^{13}$ células humanas (Sender, Fuchs e Milo, 2016). Esse conjunto microbiano evoluiu juntamente com as diferentes cavidades do corpo humano que apresentam, de alguma forma, contato com a porção extracorpórea, sendo atualmente amplamente estudadas as microbiotas da boca, da pele, do trato urinário e do trato gastrointestinal.

A efetiva colonização microbiana, de forma a desenvolver a microbiota humana, ocorre durante e após o nascimento por meio da saída do neonato do útero (Romero, Dey e Fisher, 2014). Alguns estudos têm como hipótese a presença de microrganismos também no desenvolvimento embrionário, uma vez que foram encontrados vestígios de materiais genéticos bacterianos na placenta ou no líquido amniótico de gestantes (Perez-Muñoz *et al.*, 2017 e Walker *et al.*, 2017). Entretanto, é estabelecido que a colonização microbiana adquirida no parto e durante os dois primeiros anos do indivíduo tem papel importante nas diferentes fases do crescimento e em aspectos fisiológicos do mesmo (Milani *et al.*, 2017). Doenças inflamatórias intestinais e asma, por exemplo, já foram relacionados à presença de compostos gerados por agentes da microbiota durante a infância do indivíduo. A microbiota apresenta capacidade de diminuir o acúmulo de células T *killer* em sítios como o pulmão e colón por meio da regulação do ligante da citocina CXCL6. Tal citocina, responsável pelo acúmulo de células T *killer*, é regulada negativamente pela inibição do seu ligante por fatores microbianos (Gensollen *et al.*, 2016). Tal estudo evidencia a importância da microbiota adquirida ainda no nascimento e nos primeiros anos de vida como um fator para a saúde humana por meio da interação com o sistema imunológico. Apesar da colonização que ocorre ainda nos primeiros anos de vida ser extremamente importante e determinante para a saúde do indivíduo adulto, a constituição da microbiota humana é heterogênea quando são considerados diferentes indivíduos e pode ser modificada por estímulos ambientais e sociais. Fatores físico-químicos como o pH, temperatura, umidade e disponibilidade de nutrientes são determinantes para a distribuição da microbiota nos diferentes sítios em que esse consórcio pode se estabelecer. Entretanto, fatores individuais como idade, dieta e o estilo de vida, que pode ser exemplificado pela prática de exercícios e o hábito de fumar, também apresentam papel importante na composição e equilíbrio da microbiota humana (Conlon e Bird, 2015).

Diversos estudos nos ajudam a compreender a participação de gêneros específicos nos diferentes sítios que contém uma microbiota própria. A cavidade oral, por exemplo, apresenta mais de 700 espécies bacterianas, sendo mais comum na microbiota de indivíduos saudáveis gêneros como *Gemella*, *Granulicatella*, *Streptococcus* e *Veillonella* (Aas *et al.*, 2005). Esses gêneros podem ser alterados em sua proporção por fatores como a dieta, a idade e a higiene bucal (Rasiah *et al.*, 2005). Além disso, a necessidade metabólica de cada microrganismo e sua capacidade respiratória podem modificar os microrganismos dominantes em cada nicho da boca. Essa distribuição pode ser exemplificada pela capacidade de algumas espécies em colonizar ambientes anaeróbios da boca, como é o caso de *Fusobacterium nucleatum* no sulco gengival; enquanto outras espécies podem colonizar preferencialmente ambientes aeróbios, como é o caso de *Streptococcus mutans* na superfície do dente (Han, 2015). Essa distribuição é gerada pelo habitat e necessidade metabólica desses microrganismos, mostrando mais uma vez que a microbiota pode ser extremamente versátil e modificada por diversos fatores (Rasiah *et al.*, 2005).

Um outro nicho que pode ser usado para exemplificar a versatilidade da composição que a microbiota apresenta é a pele. A microbiota da pele é constituída predominantemente pelos filos Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria e Bacteroidetes (Grice *et al.*, 2009). A diversidade e proporção dos componentes dessa microbiota podem ser alteradas por fatores específicos de cada nicho que há na pele, como por exemplo a umidade, temperatura e a distribuição de glândulas sudoríparas e sebáceas deste órgão (Costello *et al.*, 2009). Estudos demonstram que, apesar da microbiota humana apresentar filos e gêneros específicos em seus diferentes sítios, fatores individuais e externos ao corpo humano são responsáveis pela diversidade da microbiota em cada ambiente e indivíduo (Costello *et al.*, 2009).

Os diferentes consórcios microbianos são compostos por uma microbiota residente que coloniza nichos distintos de forma efetiva, e que pode gerar efeitos benéficos ou neutros no tecido em que se estabelece. Na composição da microbiota, ainda podem existir microrganismos que apresentam um potencial patogênico, estando na maioria das vezes em menor quantidade nesse consórcio e dessa forma não são capazes de gerar infecções. Entretanto, tais microrganismos podem se apresentar como patógenos oportunistas em quadros de disbiose desse microambiente ou até mesmo não permanecer em quantidades significativas nesse ambiente em razão das condições do mesmo, e não levar a nenhum impacto maléfico à saúde humana (Al-Ghazzewi e Tester, 2014). O equilíbrio da microbiota já desenvolvida em adultos é influenciado, como já mencionado, por diversos fatores como a dieta, idade, higiene do indivíduo, estresse e fatores externos, como a utilização de fármacos. A falta de equilíbrio e o

impacto dos fatores supracitados podem levar a uma disbiose da microbiota residente, permitindo a infecção por microrganismos patogênicos.

1.1 Microbiota do trato gastrointestinal

O trato gastrointestinal alberga a maior abundância e riqueza em termos de espécies da microbiota do corpo humano, sendo esse trato colonizado por mais de 1.000 espécies microbianas (Rajilić-Stojanović e de Vos, 2014). A microbiota do trato gastrointestinal é formada em sua maioria por bactérias dos filos Bacteroidetes, Firmicutes e Actinobacteria (Rajilić-Stojanović *et al.*, 2009). A função desempenhada pela microbiota do trato gastrointestinal vem sendo cada vez mais associada a importantes aspectos fisiológicos do corpo humano, como, por exemplo, o estímulo do sistema imunológico, o aumento da absorção de nutrientes e também o metabolismo de compostos como carboidratos complexos, aminoácidos e vitaminas necessárias ao corpo humano (Hooper e Gordon, 2001).

Uma importante função atribuída à microbiota intestinal é a resistência à colonização de microrganismos externos, que podem ou não apresentar um potencial patogênico. Essa resistência pode ocorrer por meio da concorrência e depleção de nutrientes e receptores, impedindo que microrganismos exógenos consigam aderir e gerar infecção no trato gastrointestinal. Os microrganismos da microbiota intestinal ainda apresentam a capacidade de gerar compostos que inibem o crescimento de outros microrganismos, como as bacteriocinas (toxinas produzidas por bactérias que agem contra outros microrganismos) (Nissen-Meyer e Nes, 1997; Stecher e Hardt, 2011). Além disso, a microbiota intestinal humana também está envolvida no processo de estimulação do sistema imunológico que ocorre por meio do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos, como é o caso do lipopolissacarídeo (LPS). O LPS é encontrado na membrana celular de bactérias Gram-negativas presentes na microbiota e desencadeia uma resposta imune inata e adaptativa por meio do aumento da geração de uma camada de mucina pelas células caliciformes e pela produção de imunoglobulina A por células B da lâmina própria, respectivamente (Willing *et al.*, 2011). A resistência à colonização apresentada pela microbiota realça o importante papel da microbiota intestinal na proteção do ser humano contra patógenos invasores.

O estudo da microbiota permitiu entender que esse consórcio e o indivíduo co-evoluíram, de forma que diversas funções necessárias para o funcionamento adequado do corpo humano foram supridas pela alta capacidade metabólica da microbiota intestinal. Isso pode ser

exemplificado por meio da necessidade, em alguns casos, de componentes da microbiota para o processamento de moléculas, tornando possível a absorção de compostos específicos (Landman e Quévrain, 2016). Um dos papéis de simbiose que a microbiota apresenta é a capacidade de bactérias anaeróbias de fermentarem glicanas e polissacarídeos, que não são metabolizados por intermédio das células do epitélio intestinal, como carboidratos vegetais (hemicelulose e pectina) e cartilagens (glicosmanoglicanas e N-glicanas). A capacidade enzimática da microbiota de metabolizar tais componentes até a formação de ácidos graxos de cadeias curtas, como ácidos butírico, propiônico e acético, permite que essas moléculas sejam absorvidas pelas células do epitélio intestinal e utilizadas por células humanas (Koropatkin, Cameron e Martens, 2012).

A manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal é um aspecto importante, não só porque garante uma proteção local contra patógenos oportunistas, que também podem fazer parte dessa microbiota, mas também porque a quebra desse equilíbrio é crucial no processo de desenvolvimento de diversas doenças sistêmicas, como diabetes mellitus do tipo II, obesidade e patologias associadas ao sistema cardiovascular. A mudança na composição da microbiota intestinal pode levar a alterações metabólicas que são associadas a algumas doenças. Por exemplo, os ácidos graxos de cadeia curta e sua fermentação realizada por componentes da microbiota intestinal estão associados à secreção da enzima renina, que pode levar ao aumento ou diminuição da pressão arterial sanguínea, podendo gerar quadros como a hipertensão (Pluznick *et al.*, 2013; Rodríguez-Morató e Matthan, 2020). Esse balanço, por sua vez, é atribuído a comunidades bacterianas responsáveis pela fermentação desses ácidos graxos, sendo a composição microbiana essencial para a geração dessa patologia (Tang, Kitai e Hazen, 2017).

Funções associadas a componentes da microbiota intestinal são bem elucidadas, e até mesmo estudadas como alvos para a modulação desse consórcio de forma a manter uma microbiota saudável e a fisiologia do corpo como um todo (como ocorre na utilização de probióticos e prebióticos na tentativa de reestabelecer comunidades específicas já associadas à geração de componentes que desempenham importantes papéis fisiológicos). Apesar de diversas dessas funções serem bem estudadas, parte dos componentes com capacidade de trazer benefícios à saúde humana que estão dispostos nesse ambiente não tem a sua função compreendida (Sarao e Arora, 2017). Nos últimos anos, estudou-se a composição microbiana presente, principalmente, na cavidade intestinal, sendo elucidada a capacidade de interação entre determinados grupos microbianos neste ambiente. Entretanto, o metaboloma dessa microbiota ainda é pouco conhecido, assim como o seu papel contra microrganismos que podem apresentar um perfil patogênico ou até mesmo para entender as interações no corpo humano.

Esse aspecto pode dar à microbiota intestinal mais uma possibilidade para o enfoque de estudos e geração de terapias específicas.

1.2 Metaboloma intestinal

O metaboloma da microbiota intestinal humana é formado pelo conjunto de moléculas pequenas oriundas do metabolismo da microbiota que se estabelece no trato gastrointestinal, produzidos como metabólitos secundários e que podem apresentar diferentes propriedades químicas. É bem estabelecida a existência de diferentes compostos gerados por integrantes desse consórcio e também a sinalização por meio de moléculas pequenas e a sua utilização como marcadores metabólicos de processos fisiológicos do corpo humano (Han *et al.*, 2010). Entretanto, as funções relacionadas aos compostos de origem microbiana e seus impactos no hospedeiro e em outros microrganismos ainda são pouco explorados (Ursell *et al.*, 2014).

Um exemplo de moléculas que apresentam bioatividade são os hormônios. Os hormônios são moléculas que apresentam capacidade de sinalização celular, levando a uma resposta corporal após a sua liberação. Diversos hormônios podem ter ação em diferentes áreas do corpo e agir regulando funções específicas, como é o caso da colecistocinina, por exemplo. Esse hormônio é secretado por meio de estímulo gerado pelo contato do duodeno com nutrientes ricos em gordura, levando à secreção de bile nessa porção do intestino delgado (Ahlman e Nilsson, 2001). Além disso, outras moléculas que estão em contato com a microbiota parecem apresentar uma grande importância na sinalização para seres humanos. Estudos recentes mostram que a microbiota do trato gastrointestinal apresenta uma importância em processos de modificação e geração de metabólitos neuroendócrinos, como neurotransmissores e precursores de moléculas que podem apresentar alguma bioatividade, como o triptofano (Cussotto *et al.*, 2018). Dessa forma, entender o papel de moléculas como os hormônios no nosso corpo é importante para elucidar a ação de moléculas com natureza similar, como as moléculas produzidas ou modificadas pela microbiota do trato gastrointestinal, que podem apresentar benefícios à saúde humana.

Sabe-se que moléculas produzidas por microrganismos podem ter atividade de autoindução em componentes celulares específicos, agindo como comunicadores celulares. Esses autoindutores apresentam capacidade de gerar uma resposta gênica, levando à modulação da expressão de genes de virulência específicos em razão de um estímulo primário, sendo esse processo denominado *quorum sensing*. Alguns dos processos de *quorum sensing* são amplamente estudados, como os sistemas Rhl e Las que são descritos em *Pseudomonas*

aeruginosa. Além desses, foram também descobertos dois outros sistemas de sinalização por *quorum sensing* em *P. aeruginosa* e espécies relacionadas, sendo eles denominados Pqs e Iqs (Duan e Surette, 2007; Scoffone *et al.*, 2019). No caso desses sistemas mais elucidados, os autoindutores são moléculas do tipo N-acil homoserina lactonas produzidas pela célula bacteriana, e que quando acumuladas em grandes quantidades por meio do aumento da densidade celular bacteriana, se ligam e modulam reguladores, levando a uma cascata de sinalização que por fim leva à ativação transcricional de genes de virulência que auxiliam no estabelecimento desse microrganismo (Antunes *et al.*, 2010). O entendimento de como esses sistemas de *quorum sensing* bacterianos atuam é importante, uma vez que dessa forma é possível desenvolver estratégias que diminuam a virulência dessas espécies bacterianas por meio da tentativa de encontrar moléculas que possam interromper essa via de sinalização, ou que possam apresentar outro mecanismo de modulação da virulência bacteriana.

Um possível papel dos metabólitos produzidos pela microbiota intestinal na patogenicidade de microrganismos começou a ser elucidado por meio de estudos que demonstraram a bioatividade que moléculas de extratos de fezes humanas apresentam sobre genes de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (Antunes *et al.*, 2014). Em tal estudo, nosso grupo demonstrou que um extrato fecal contendo metabólitos intestinais desconhecidos levou à inibição da expressão de *hilA*, gene que codifica o principal regulador da Ilha de Patogenicidade 1 de *Salmonella* (SPI-1), na qual estão contidos genes responsáveis pelo processo de invasão celular. Essa inibição de HilA levou à diminuição da capacidade de invasão de *Salmonella* (Antunes *et al.*, 2014). Em um trabalho mais recente, o grupo submeteu o extrato fecal a diversos processos de purificação, de separação da fração bioativa e espectrometria de massas com o objetivo de identificar as moléculas responsáveis pela repressão de *hilA*. Nesse caso, foram caracterizadas dez moléculas com estrutura aromática na fração bioativa, sendo elas hidroquinona, pirocatecol, ácido 2-hidroxicinâmico, ácido hidrocinâmico, ácido 3,4-dimetilbenzoico, ácido fenilpirúvico, ácido m-toluilacético, acetato de benzila, ácido 2-fenilpropiónico e ácido m-cumárico, as quais foram testadas com relação a sua capacidade de reproduzir o efeito do extrato fecal na expressão de *hilA*. Como resultado, foi observado que o ácido 3,4-dimetilbenzoico, assim como outras moléculas estruturalmente semelhantes, exerce atividade inibitória na expressão de *hilA* (Peixoto *et al.*, 2017).

1.3 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa é uma das espécies bacterianas do gênero *Pseudomonas*, que contém mais de 140 espécies e apresenta como características principais uma alta versatilidade metabólica, apresentando espécies capazes de sobreviver em ambientes aquáticos e solos, e ainda causar infecções, tendo como hospedeiros plantas, insetos e humanos (Silby *et al.*, 2011). Além disso, tal gênero ainda é bastante empregado em estudos que abordam a eficácia de diferentes espécies na promoção do crescimento de plantas, em processos de biorremediação, e em sua capacidade saprófita (Silby *et al.*, 2011). Fenotipicamente, bactérias desse gênero são caracterizadas como microrganismos bacilares, Gram negativos, aeróbios não fermentadores e com capacidade de motilidade (Iglewski, 1996).

P. aeruginosa é amplamente distribuída no ambiente, e em humanos pode ser encontrada como patógeno por apresentar uma grande capacidade de gerar infecções oportunistas, causadas quando há uma queda na imunidade ou algum tipo de quebra na defesa primária do corpo humano (Moradali *et al.*, 2017). Um destaque desse tipo de oportunismo bacteriano é a exacerbação de quadros de fibrose cística, que segundo estudos ocorre em razão da infecção primária por *P. aeruginosa*, levando 60% dos pacientes com esta doença e que adquirem uma infecção crônica por *P. aeruginosa* a óbito (Lund-Palau *et al.*, 2016). *P. aeruginosa* também já foi descrito como um microrganismo causador de diarreias persistentes em pacientes imunossuprimidos ou hospitalizados. A causa potencial desse quadro diarreico está relacionada à utilização de antimicrobianos por um longo período por esses pacientes, demonstrando que há capacidade desse microrganismo em alcançar o trato gastrointestinal e levar a quadros infecciosos quando a microbiota local apresenta disbiose (Adlard *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2001). Já foi também descrita a presença de *P. aeruginosa* na microbiota gastrointestinal não associada a um processo de infecção ativo (Tamburini *et al.*, 2018). Além disso, a infecção crônica por esse patógeno em tecidos moles também pode ocorrer, como é observado em feridas geradas por queimaduras e lesões com decorrências diversas, podendo desenvolver uma infecção sistêmica e até um quadro de sepse ocasionando óbito por choque séptico (Wilson e Pandey, 2020). Uma infecção efetiva por *P. aeruginosa* é gerada pela capacidade dela se estabelecer em diferentes condições, possibilitando a sua permanência na microbiota da pele de forma a gerar processo infeccioso neste ou em outros tecidos por meio de uma quebra de barreiras do sistema imunológico. Esse processo ainda é auxiliado por fatores de virulência bacterianos que são encontrados em *P. aeruginosa*, como por exemplo a produção de proteases, toxinas, polissacarídeos, fimbrias, pili e sistemas de secreção. Outros fatores importantes para a formação de biofilme e sobrevivência como polissacarídeos e pigmentos também já foram descritos nessa espécie (Iglewski, 1996).

Os quadros de infecções oportunistas causados são, em sua maior parte, associados a pacientes em ambientes hospitalares. *P. aeruginosa* faz parte do grupo denominado *ESKAPE* (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* e *Enterobacter spp.*), o qual é usado para denominar o conjunto de patógenos mais prevalentes em infecções nosocomiais e ainda capazes de apresentar multirresistência a fármacos antimicrobianos como as quinolonas, os aminoglicosídeos e os β -lactâmicos (Silva *et al.*, 2017).

O genoma de *P. aeruginosa* é composto por mais de 6 Mb. Parte dele é descrito como genoma *core*, sendo essa denominação utilizada para a porção genômica conservada em diferentes cepas de *P. aeruginosa*, contendo genes responsáveis pelo seu metabolismo, processamento e armazenamento de informações e pela sinalização e processamento celular. *Clusters* de genes de virulência também são conservados entre as cepas dessa espécie, como é o caso dos genes *exoT*, *exoY*, *exoU* e *exoS*, relacionados com a produção de proteínas secretáveis pelo sistema de secreção do tipo 3 (T3SS), e também sequências genômicas relacionadas com sistemas de regulação da expressão de genes de virulência por *quorum sensing* (codificado pelos sistemas *las* e *rhl*) (Hauser, 2009; Pearson *et al.*, 1997). A outra porção do seu genoma é integrada por genes acessórios, como ilhas genômicas e profagos. Estes genes inseridos estão relacionados à mobilidade, como alguns genes *pil* que codificam para a biossíntese de pilus do tipo IV e genes responsáveis pela geração de flagelo A ou B, que pode se apresentar de forma diferente em cepas distintas. Além disso, sequências que codificam para a síntese de moléculas que podem agir como sideróforos (como a pioverdina), genes responsáveis pela geração de diferentes antígenos O e também sequências responsáveis pelo reparo e recombinação gênica (como sequências que codificam transposases, integrases e recombinases) também podem ser genes acessórios de acordo com a cepa estudada, apesar de que em alguns casos já façam parte do *core* genômico (Valot *et al.*, 2015).

Estudos comparando o genoma e o transcrito da cepa ATCC 27853 de *P. aeruginosa* (isolado de espécime sanguíneo em 1971, em um hospital de Boston, EUA) com outras cepas da mesma espécie como a PAO1 (cepa referência que se originou por meio de mutação espontânea da cepa PAO isolada de ferida em 1954, em Melbourne, Austrália, levando à resistência dessa cepa à cefalosporina), mostram que o genoma acessório adquirido ou perdido evolutivamente por essas cepas pode estar relacionado ao quadro infeccioso que essas cepas são capazes de gerar (Klockgether *et al.*, 2010; Heeb *et al.*, 2010). A comparação genômica dessas duas cepas mostrou que ATCC 27853 apresenta cinco sequências de profagos inseridos em seu genoma; entretanto, não apresenta o cluster responsável pela expressão da banda B do

antígeno O (Cao *et al.*, 2017). As diferenças no aparato gênico dessas cepas mostram como a presença de genes acessórios não diminui a infecciosidade dessa espécie, uma vez que grande parte dos seus genes de virulência está contido no genoma *core*.

1.4 Fatores da virulência de *P. aeruginosa*

Além das formas de resistência a antimicrobianos que essa espécie pode apresentar, *P. aeruginosa* também contém diversos fatores de virulência os quais são responsáveis pelo seu alto potencial patogênico. Existem duas formas pelas quais as resistências aos agentes antimicrobianos podem ser definidas, sendo elas as formas intrínseca ou adquirida (Azam e Khan, 2018). Para *P. aeruginosa*, a forma intrínseca é entendida como a capacidade do microrganismo em resistir a esses agentes, sendo aumentando a expressão de bombas de efluxo na membrana celular, dificultando a entrada dessas moléculas por diminuição da permeabilidade de membrana ou até mesmo produzindo enzimas que conseguem se ligar e clivar os antimicrobianos (Cox e Wright, 2013). Já a resistência adquirida é gerada por meio da transferência horizontal de genes ou de mutação genômica que podem levar à resistência a esses fármacos (Munita e Arias, 2016). As diferentes formas de resistência aos antimicrobianos em *P. aeruginosa* levam a uma grande dificuldade de tratamento das infecções oportunistas, como em infecções nosocomiais, que correspondem a 10% a 15% dos casos (Haghi *et al.*, 2018). O tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* é extremamente complicado, uma vez que grande parte dos antimicrobianos utilizados preferencialmente nesse tipo de infecção, como aminoglicosídeos, quinolonas, β -lactâmicos e polimixinas, são tolerados por esses microrganismos (Pang *et al.*, 2019). Com isso, surge a necessidade de novas estratégias que possam agir de forma efetiva no tratamento de processos infecciosos causados por *P. aeruginosa*.

Além da resistência ao tratamento, *P. aeruginosa* ainda apresenta uma alta capacidade de estabelecer infecções em pacientes com quadros preexistentes e levar ao agravamento desses quadros por meio da cronificação do processo infeccioso. Essa capacidade é gerada pelos fatores de virulência que auxiliam no estabelecimento dessa infecção e levam à destruição tecidual do hospedeiro durante esse processo, e também pela baixa ação do sistema imunológico de seus hospedeiros (Crousilles *et al.*, 2015). Alguns dos fatores que apresentam grande importância na virulência de *P. aeruginosa* são proteínas de superfície como é o caso do flagelo e do pilus do tipo IV. Além de serem importantes na adesão a componentes bióticos e abióticos para a geração de biofilme, também são responsáveis por diferentes padrões de motilidade

bacteriana (Burrows, 2012; Mikkelsen, Sivaneson e Filloux, 2011). Os padrões de motilidade encontrados em *P. aeruginosa* podem ser denominados como *swimming*, *swarming* ou *twitching* (Figura 1). *Swimming* e *swarming* são motilidades geradas pelo flagelo bacteriano; entretanto, no *swimming* há uma motilidade celular que é favorecida em ambientes líquidos, enquanto no *swarming* há uma motilidade multicelular que ocorre em superfícies e é considerada mais rápida (Kearns, 2010). O *twitching* também ocorre em superfícies, sendo essa motilidade gerada por meio da movimentação do pilus do tipo IV presente em *P. aeruginosa*, que tem a sua expressão regulada pelos sistemas *las* e *rhl* de *quorum sensing* (Glessner *et al.*, 1999).

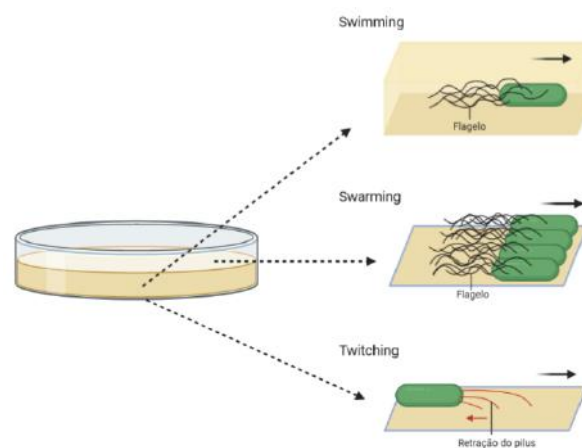


Figura 1. Representação dos padrões de motilidade produzidos por *P. aeruginosa*. Fonte: Adaptado de Kearns, 2010.

Além da motilidade, essa espécie apresenta a capacidade de se agregar em uma comunidade muito bem organizada denominada biofilme. Nessa conformação, além de uma alta quantidade de massa celular, ainda há a matriz extracelular com exopolissacarídeos (como o alginato, Psl e Pel), material genético, e compostos responsáveis pela sinalização por *quorum sensing* como N-acil homoserina lactonas (Mikkelsen, Sivaneson e Filloux, 2011, Chew *et al.*, 2014). A formação de biofilme é extremamente importante na infecção por *P. aeruginosa*, uma vez que essa estrutura garante uma resistência física, não só à penetração de compostos como antimicrobianos, como também ao rompimento desse biofilme por pressão de fluidos, como pode acontecer quando associados a cateteres em infecções nosocomiais (Demirdjian, 2019).

As fenazinas são metabólitos secundários com estrutura molecular poliaromática codificadas pelos operons *phz1* e *phz2*, e são outra categoria de compostos que tem uma grande importância na infecção produzida por *P. aeruginosa* (Cui *et al.*, 2016). Esses compostos têm ação antimicrobiana natural e aumentam a capacidade de aquisição de ferro. Além de serem

responsáveis pela coloração esverdeada das colônias de *P. aeruginosa*, as fenazinas, como a piocianina, auxiliam no processo de maturação do biofilme, uma vez que atuam melhorando a aquisição de metais necessários em processos enzimáticos celulares, e também levam a um aumento da ligação de DNA extracelular na matriz do biofilme, levando a maior viscosidade dessa matriz, além de apresentar função de sinalização interespecífica nessa conformação (Mavrodi *et al.*, 2012; Das *et al.*, 2015). Além disso, a piocianina, especificamente, ainda apresenta capacidade de levar à indução de estresse oxidativo no hospedeiro por meio da interrupção da atividade da enzima catalase do mesmo (Lau *et al.*, 2004). Uma outra atividade da piocianina *in vitro* é a capacidade de modular aspectos do sistema imunológico como por exemplo a indução de processo apoptótico em neutrófilos e também a inibição funcional de macrófagos (Lau *et al.*, 2004).

A capacidade de degradação de proteínas do hospedeiro por meio da ação de proteases também se mostra como um aspecto trivial na infecção por essa espécie bacteriana, uma vez que essa degradação auxilia no estabelecimento e manutenção da infecção (Cheng, 2016). *P. aeruginosa* pode ser capaz de produzir arsenais de proteases extracelulares que apresentam capacidade de clivar ligações peptídicas específicas sendo elas: aminopeptidase de *P. aeruginosa* (PAAP), protease pequena de *Pseudomonas* (PASP), protease A grande (LepA), protease alcalina (AP), protease IV (PIV), MucB e elastase A e B (LasA e LasB, respectivamente) (Galdino *et al.*, 2017). Em estudos *in vitro*, as proteases já citadas e também toxinas, como a toxina A, foram observadas como as primeiras exoproteínas a serem secretadas pelas células de *P. aeruginosa*, sendo elas importantes em uma geração inicial de dano tecidual (Crousilles *et al.*, 2015). Essas enzimas são secretadas pelas células por meio de sistemas de secreção dos tipos I e II, que por sua vez são expressos por meio da regulação por *quorum sensing* (Nouwens *et al.*, 2013). Esses diversos fatores de virulência de *P. aeruginosa* demonstram a capacidade nociva desse microrganismo ao hospedeiro, mostrando a necessidade de novos compostos que possam reduzir a sua virulência ou agir de forma terapêutica frente a esse microrganismo.

Tendo em vista, a alta capacidade de virulência de *P. aeruginosa*, o difícil tratamento de infecções causadas por esse microrganismo e a sua grande relevância como um patógeno principalmente em ambiente hospitalar, surge então a necessidade da busca de agentes que consigam regular tais fatores de virulência de forma a levar ao controle das infecções por esse microrganismo (Silva *et al.*, 2017). Esse trabalho surge como forma de entender a capacidade de virulência de *P. aeruginosa* e como pode ocorrer a regulação desses importantes fatores de virulência citados frente a moléculas específicas produzidas pela microbiota gastrointestinal.

2. JUSTIFICATIVA

A alta capacidade de virulência de diversos microrganismos e a dificuldade no tratamento de infecções causadas por bactérias que apresentam capacidade de aquisição de genes de resistência a antimicrobianos tornam cada vez mais necessário o desenvolvimento de estratégias alternativas para o controle microbiano, uma vez que a resistência a antimicrobianos acarreta em maior tempo de internação, maiores custos relacionados aos testes diagnósticos e maiores riscos de morbidade e mortalidade. Como mencionado anteriormente, estudos do nosso grupo de pesquisa já apontaram o potencial antivirulência de moléculas pequenas, como no caso de *Salmonella enterica*, por exemplo, em que foi observado que moléculas bioativas são capazes de reduzir a invasão a células do hospedeiro (Antunes *et al.*, 2014; Peixoto *et al.*, 2017). Além disso, estudos ainda mais recentes demonstraram que metabólitos presentes na microbiota gastrointestinal são capazes de levar à regulação da expressão gênica de outros importantes enteropatógenos, como *Vibrio cholerae* e *Clostridioides difficile* (dados não publicados). Sendo assim, esse trabalho se propõe a aprofundar o conhecimento a respeito do efeito desses metabólitos oriundos da microbiota intestinal em *P. aeruginosa*, auxiliando na busca por um perfil terapêutico que seja eficaz na modulação da virulência deste microrganismo.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

A principal proposta desse trabalho foi realizar uma análise comparativa da atividade dos metabólitos da microbiota intestinal, já identificados, em alguns dos fatores de virulência de *P. aeruginosa*.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar a atividade de um extrato fecal na motilidade de *P. aeruginosa*;
- Observar a ação de metabólitos oriundos da microbiota intestinal no crescimento de *P. aeruginosa*;
- Investigar a interferência dos metabólitos produzidos pela microbiota intestinal na motilidade de *P. aeruginosa*;
- Avaliar a atividade de proteases por *P. aeruginosa* quando em contato com metabólitos da microbiota intestinal;
- Avaliar a capacidade de formação de biofilme por *P. aeruginosa* em contato com metabólitos produzidos pela microbiota intestinal humana;
- Avaliar a produção de piocianina por *P. aeruginosa* após crescimento em contato com metabólitos produzidos pela microbiota intestinal.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Preparo de soluções dos compostos

As moléculas utilizadas nesse trabalho foram descritas anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa por apresentar efeito biológico frente à *Salmonella* (Peixoto *et al.*, 2017). São elas a hidroquinona, pirocatecol, ácido 2-hidroxicinâmico, ácido hidrocinâmico, ácido 3,4-dimetilbenzoico, ácido fenilpirúvico, ácido m-toluilacético, acetato de benzila e ácido 2-fenilpropiónico. Todas as moléculas desse estudo foram adquiridas de forma comercial (Sigma) e foram feitas soluções estoques na concentração de 100 mM. Para os testes, estas moléculas foram utilizadas a uma concentração final de 100 μ M, sendo essa a concentração em que essas moléculas apresentam atividade contra *Salmonella*, segundo testes realizados em trabalhos anteriores do nosso grupo. Os metabólitos ácido 2-hidroxicinâmico, ácido hidrocinâmico, ácido 3,4-dimetilbenzoico, ácido fenilpirúvico, ácido m-toluilacético, acetato de benzila e ácido 2-fenilpropiónico foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO), e os compostos hidroquinona e pirocatecol diluídos em água destilada (Antunes *et al.*, 2014; Peixoto *et al.*, 2017).

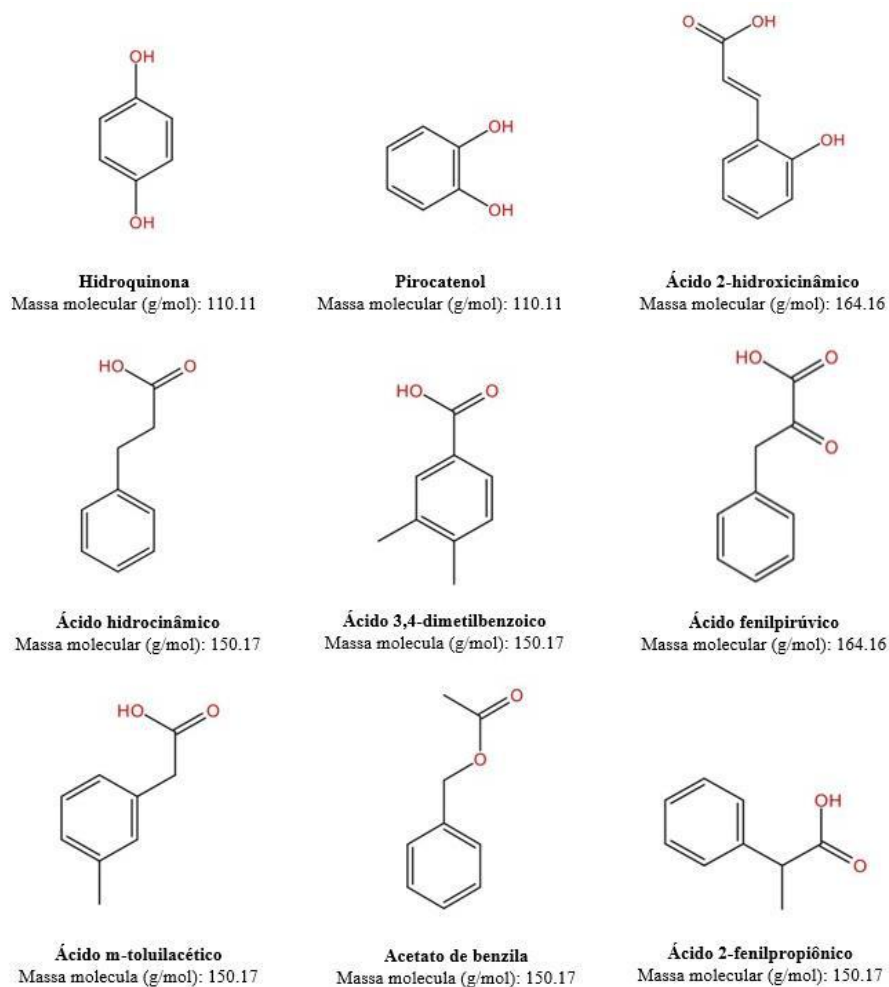


Figura 2. Estrutura química das moléculas estudadas. Fonte: Adaptado de Peixoto *et al.*, 2017.

4.2 Obtenção do extrato fecal

Para obtenção dos extratos fecais, amostras de fezes humanas de doadora do sexo feminino, com 37 anos de idade, saudável e sem a utilização de antibióticos por no mínimo 6 meses foram usadas. As amostras foram coletadas em um frasco estéril, e mantidas sob refrigeração até que fossem levadas ao laboratório, no máximo 24 horas após a coleta. As fezes foram pesadas e transferidas para um recipiente de vidro estéril, onde foi adicionado acetato de etila (Sigma) em uma razão 1:1 (p/v). A mistura foi agitada em vórtex por 5 min e depois incubada sob agitação (100 rpm) por 18 h. Em seguida foi realizada a coleta da fase orgânica do solvente em um balão de vidro e o extrato foi seco em rotavapor e então mantido a -20 °C até o uso. Como controle foi utilizado o acetato de etila seco no rotavapor suspenso em caldo LB (Luria Bertani; Sigma). Para os experimentos, os extratos secos foram suspensos diretamente em caldo LB (Luria Bertani; Sigma). O meio foi filtrado (poro de 0,45 µm) para a

retirada das partículas maiores que não solubilizaram. Em seguida foi ajustado o pH para 7,2 e então a solução foi filtrada novamente com filtro de poro de 0,22 μm para esterilizar o extrato. A concentração final do extrato fecal é de 1x, o que mimetiza a concentração dos metabólitos encontrados nas fezes.

4.3 Testes fenotípicos

Foram realizados testes fenotípicos para observar a atividade das moléculas estudadas em fatores de virulência que são importantes no processo infeccioso de *P. aeruginosa*. Testes para observar o crescimento bacteriano, a motilidade celular, a capacidade de produção de proteases, formação de biofilme e produção do pigmento piocianina foram realizados com as cepas ATCC 27853 e PAO1 de *P. aeruginosa* na presença com as moléculas de estudo.

4.3.1 Condições de cultivo

Para a realização desse estudo foram utilizadas as cepas de ATCC 27853 e PAO1 de *P. aeruginosa*. As cepas foram cultivadas inicialmente em meio LB contendo 1,5% de ágar e crescidas por 18 h a 37 °C. A pureza das amostras foi confirmada pelo espectrômetro de massas MALDI-TOF *Biotyper*® (Bruker). Após a confirmação das cepas, uma colônia de cada foi repicada para caldo LB contendo 15% de glicerol e em seguida os inóculos foram incubados a 37 °C por 18 h sob agitação (250 rpm). Após o crescimento as cepas foram estocadas a -80 °C.

4.3.2 Monitoramento do crescimento bacteriano

Para observar a atividade dos metabólitos intestinais sobre as cepas PAO1 e ATCC 27853, foi feito o monitoramento do crescimento bacteriano através de leitura da densidade óptica com auxílio de espectrofotômetro. Para isso, as cepas foram crescidas em meio LB por 18 h sob agitação (250 rpm). A curva de crescimento foi realizada em microplaca utilizando o espectrofotômetro *Infinite*® *F50* (TECAN) com leituras a cada 30 min por 24 h ($\text{DO}_{620\text{nm}}$). Em uma mesma microplaca foi adicionado caldo LB contendo as moléculas comerciais ou apenas o solvente em concentração de 100 μM , e nestes foram inoculadas as cepas de *P. aeruginosa* (diluição 1:200). Após as leituras os dados foram exportados para o programa *GraphPad Prism* 8 para a plotagem dos gráficos. As curvas foram realizadas utilizando 3 réplicas biológicas.

4.3.3 Teste de motilidade

Como forma de observar a atividade dos metabólitos sobre a motilidade das cepas estudadas, foram realizados testes que permitiram observar fenótipos de *swimming*, *swarming* e *twitching* como padrões de motilidade. Os testes de *swimming* e *swarming* foram realizados a partir de colônias isoladas das cepas crescidas inicialmente em LB com 1,5% de ágar. A partir desse crescimento, as cepas foram inoculadas com o auxílio de agulha bacteriológica (três réplicas biológicas), na superfície de meio LB semissólido com 0,3% e 0,6% de ágar contendo ou não solução das moléculas de estudo em uma concentração de 100 μ M para observar os padrões de *swimming* (0,3% de ágar) e *swarming* (0,6% de ágar). O teste de *swimming* (0,3% de ágar) na presença do extrato fecal foi realizado em uma concentração 1x de extrato. Após incubação por 18 h a 37 °C as placas foram fotografadas e a zona do diâmetro da dispersão das colônias foi medida e exportada para o programa *GraphPad Prism 8* para a análise dos resultados (Kiymaci *et al.*, 2018).

O teste de *twitching* foi realizado a partir do crescimento das cepas em placa de petri contendo meio LB com concentração de ágar de 1,5% após incubação por 18 h a 37 °C. Com o auxílio de uma agulha bacteriológica, as colônias isoladas das cepas crescidas foram inoculadas no fundo da placa de petri com LB com 1% de ágar, contendo ou não as moléculas estudadas em concentração de 100 μ M. Após o crescimento por 18 h a 37 °C, o ágar foi retirado da placa com a utilização de uma espátula e descartado. A superfície da placa foi corada com solução de cristal violeta a 1% e a zona de dispersão corada foi medida. Os resultados foram exportados para o programa *GraphPad Prism 8* para a análise dos resultados (Kiymaci *et al.*, 2018).

4.3.4 Teste de produção de protease

Para verificar a interferência das moléculas intestinais aqui estudadas na produção de proteases por *P. aeruginosa*, o teste foi realizado a partir do crescimento inicial das cepas em LB ágar na concentração de 1,5%. Após a incubação por 18 h a 37 °C, uma colônia isolada foi inoculada em 2 mL de caldo LB e incubadas por 18 h a 37 °C sob agitação (250 rpm). Em seguida, 10 μ L desse crescimento foi inoculado em placa de ágar LB contendo 2% de leite desnatado, e a solução das moléculas de estudo em uma concentração de 100 μ M. A inoculação foi realizada na superfície do meio de cultivo e, após incubação a 37 °C, as zonas de degradação do meio foram medidas com o auxílio de uma régua após 24 e 48 h (Kiymaci *et al.*, 2018).

Foram utilizadas 3 réplicas biológicas e os resultados foram analisados no programa *GraphPad Prism 8*.

4.3.5 Teste de formação de biofilme

A capacidade de formação de biofilme das cepas de *P. aeruginosa* com e sem a presença das moléculas estudadas também foi analisada. Inicialmente, as cepas de *P. aeruginosa* foram cultivadas em 2 mL de caldo LB, sendo incubadas por 18 h a 37 °C. O biofilme foi realizado em microplaca de poliestireno com 96 poços onde foram distribuídos 199 µL de meio LB, com ou sem as moléculas de interesse em uma concentração de 100 µM. Em seguida foi inoculado nos poços 1 µL da cultura bacteriana crescida por 18 h a 37 °C em LB caldo. A microplaca de 96 poços foi incubada por 24 h a 37 °C e após a incubação o conteúdo dos poços foi descartado, os poços foram lavados três vezes com tampão fosfato salino (PBS; pH 7,4) e submetidos à secagem por 60 min em estufa a 60 °C. Após o processo de secagem foram adicionados 200 µL de solução do corante cristal violeta a 0,1% por 30 minutos. Passado o tempo de ação do corante, o mesmo foi descartado e os poços lavados três vezes com solução de PBS e adicionados 200 µL de etanol absoluto para a solubilização do corante. Em seguida a absorbância (A_{570}) foi medida no espectrofotômetro *Infinite® F50* (TECAN). Nos experimentos foram utilizadas três réplicas biológicas, e na placa foram adicionados meio LB contendo as moléculas de interesse em uma concentração de 100 µM, além de controles contendo apenas os diluentes das moléculas (DMSO e água) (Silva *et al.*, 2016).

4.3.6 Teste de produção de pigmento

O ensaio de quantificação de produção de piocianina pelas cepas estudadas de *P. aeruginosa* foi realizado a partir do crescimento bacteriano inicial em LB ágar na concentração de 1,5%. Após a incubação por 18 h a 37 °C, uma colônia isolada foi inoculada em 2 mL de caldo LB sendo incubado por 48 h a 37 °C sob agitação (250 rpm) com e sem a presença dos metabólitos estudados obtendo a concentração final de 100 µM. Após a incubação foi adicionado clorofórmio na proporção de 1:2 do volume utilizado direto no inóculo e essa solução foi homogeneizada com auxílio de um *vortex* por 1 minuto. Após separação das fases da solução, foi coletado 1 mL da fase inferior. Esse conteúdo foi transferido para um microtubo com capacidade de 1,5 mL e submetido à centrifugação a 13.000 xg por 2 minutos em centrífuga para microtubos (Eppendorf). Após a centrifugação, 20 µL foram coletados da fase inferior e a

produção de piocianina foi quantificada por densidade óptica em espectrofotômetro (Ultrospec 2000 – Pharmacia Biotech) utilizando uma cubeta de quartzo de 50 μ L em um comprimento de onda de 690 nm (Devnath *et al.*, 2017).

4.4 Análises estatísticas

Os resultados desse trabalho foram analisados por meio do programa *GraphPad Prism* 8 sendo aplicado nos resultados o teste t-Student. Foram considerados os de valores $p < 0.05$ como valores estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação do efeito do extrato fecal em *P. aeruginosa*

Estudos realizados por nosso grupo têm demonstrado que o extrato fecal é capaz de modular a expressão gênica em diversas bactérias patogênicas, como *Salmonella* (Antunes *et al.*, 2014), *V. cholerae* e *C. difficile* (dados não publicados). Um importante fator de virulência modulado pelo extrato fecal em *V. cholerae* e *C. difficile* é a motilidade, que é significativamente inibida por moléculas presentes neste extrato (dados não publicados). Sendo assim, decidimos avaliar se o extrato fecal também seria capaz de modular fatores de virulência em cepas de *P. aeruginosa*. Para isso foi realizado um teste de motilidade observando o padrão de motilidade de *swimming*, em ágar de concentração igual a 0,3%. A adição do extrato fecal levou à diminuição significativa das zonas de motilidade pelas cepas ATCC 27853 e PAO1 de *P. aeruginosa* (Figura 3). Tal resultado pode sugerir que metabólitos presentes na microbiota gastrointestinal são capazes de levar à modulação de fatores de virulência de *P. aeruginosa*, levantando a hipótese de que moléculas específicas, separadas e identificadas a partir de um extrato fecal também poderiam apresentar atividade na modulação de fatores de virulência de *P. aeruginosa*.

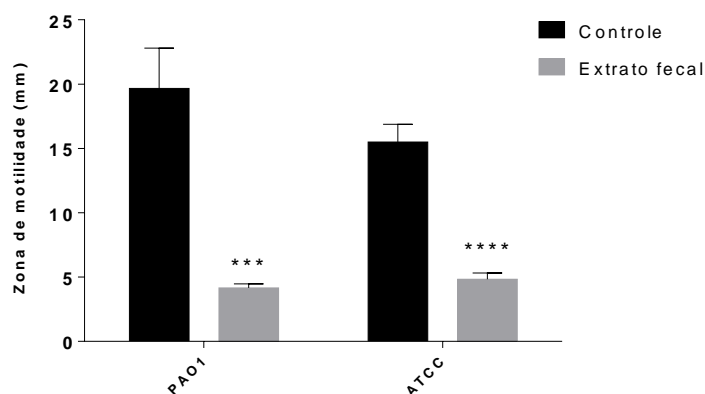


Figura 3. Efeito do extrato fecal na motilidade de *P. aeruginosa*. Placas de LB com 0,3% de ágar contendo o extrato fecal 1x foram inoculadas com *P. aeruginosa*. Após incubação por 18 h a 37 °C, as zonas de motilidade foram medidas em mm. *** $p < 0,005$; **** $p < 0,0001$.

5.2 Monitoramento do crescimento bacteriano

Após a confirmação de que o extrato fecal possui atividade contra *P. aeruginosa* decidimos testar nove moléculas, descritas anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa, e que apresentavam efeito biológico frente à *Salmonella* (Peixoto *et al.*, 2017). Para verificar se essas moléculas teriam algum efeito no crescimento de *P. aeruginosa*, realizamos testes de monitoramento do crescimento bacteriano na presença desses metabólitos intestinais. Como pode ser observado na Figura 4, as cepas ATCC 27853 e PAO1, quando em contato com grande parte dos metabólitos estudados, não demonstraram alterações em seus crescimentos (Figura 4 A-E), com exceção da molécula ácido m-toluilacético (Figura 4G), que levou uma fraca inibição no crescimento das duas cepas e as moléculas ácido fenilpirúvico (Figura 4F), acetato de benzila (Figura 4H) e ácido fenilpropiónico (Figura 4I), que levaram a uma inibição um pouco mais acentuada no crescimento da cepa PAO1. Como as moléculas não apresentaram um efeito bactericida para *P. aeruginosa* na concentração de estudo, resolvemos dar prosseguimento ao estudo destas moléculas para verificar uma possível atuação na modulação de alguns fatores de virulência deste microrganismo.

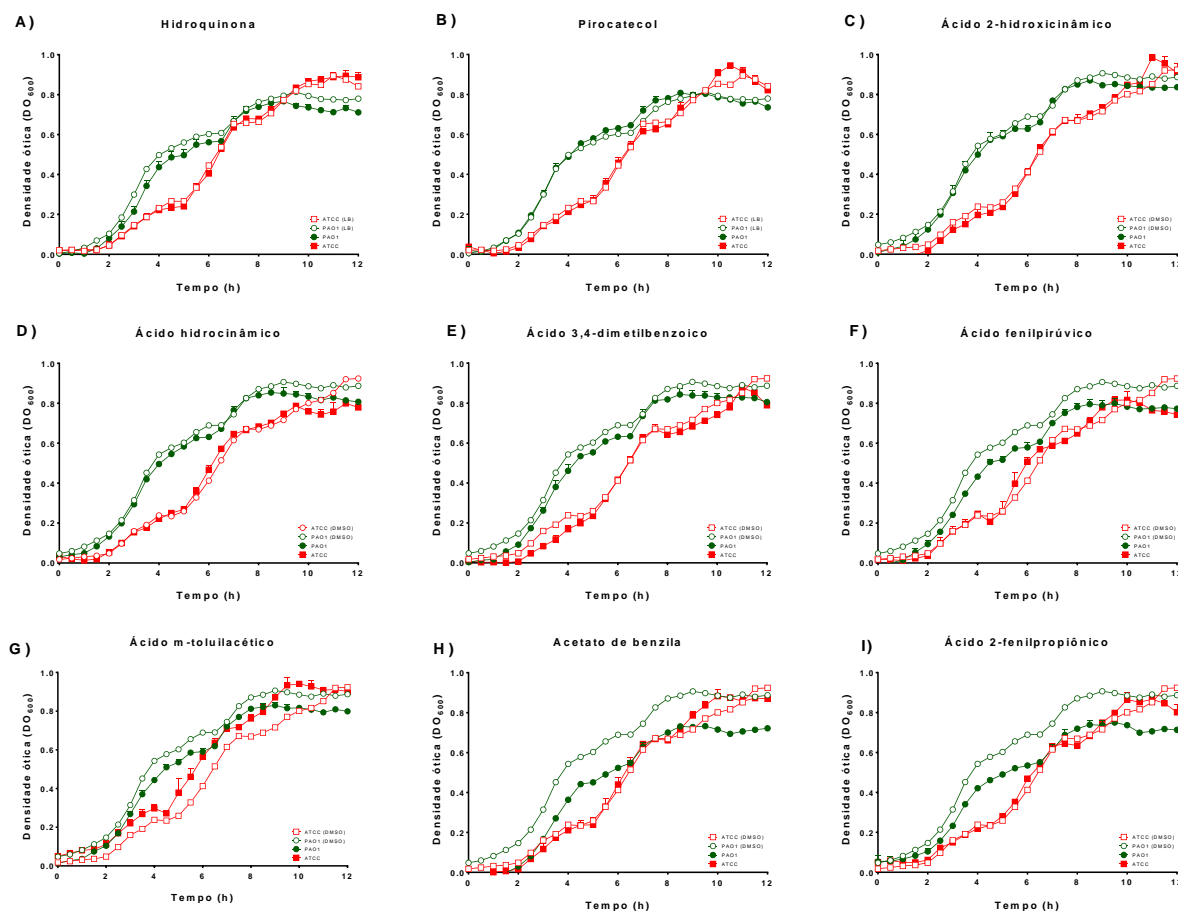


Figura 4. Impacto de moléculas oriundas da microbiota intestinal no crescimento de *P. aeruginosa*. Culturas de *P. aeruginosa* foram crescidas em meio LB com e sem as seguintes moléculas (A) Hidroquinona; (B) Pirocatecol; (C) Ácido 2-hidroxicinâmico; (D) Ácido hidrocinâmico; (E) Ácido 3,4-dimetilbenzoico; (F) Ácido fenilpirúvico; (G) Ácido m-toluilacético; (H) Acetato de benzila; (I) Ácido 2-fenilpropiónico na concentração de

100 μM . O crescimento bacteriano foi acompanhado por absorvância em microplaca (DO_{620}) por 12 h. A curva em vermelho corresponde ao crescimento da cepa ATCC e em verde ao crescimento de PAO1, já os símbolos abertos indicam o controle e os símbolos preenchidos indicam a presença das moléculas em estudo. Os resultados representam a média de 3 réplicas biológicas ($n=3$), e as barras representam o erro padrão.

5.3 Motilidade

Com o intuito de entender se as moléculas de estudo poderiam interferir em fatores de virulência de *P. aeruginosa*, foram realizados testes de motilidade com as cepas PAO1 e ATCC 27853 em padrões de motilidade diferentes, sendo eles o *swimming*, *swarming* e *twitching*, demonstrados na Figura 5.

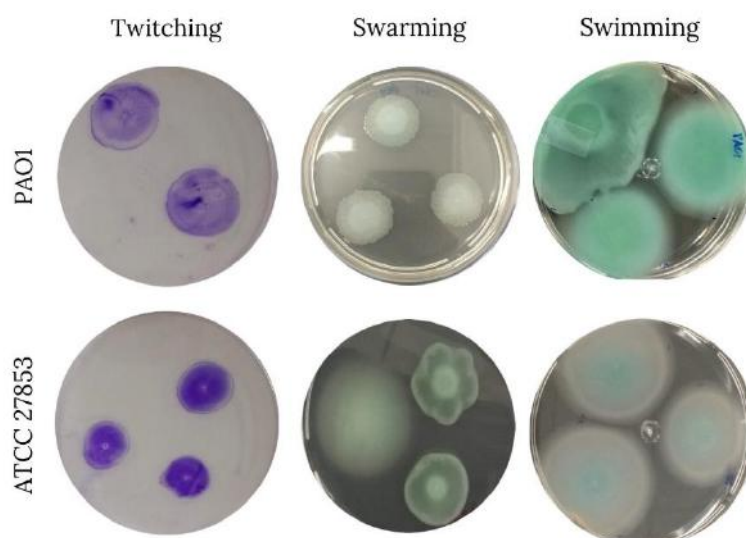


Figura 5. Imagens da placas após os testes de visualização dos padrões de motilidade. *Swimming*, *swarming* e *twitching* das cepas PAO1 e ATCC 27853 de *P. aeruginosa*.

Ao observar o padrão de motilidade de *swimming* em que a concentração de ágar é igual a 0,3%, foi demonstrado que 7 das 9 moléculas utilizadas no estudo foram capazes de levar à modulação do padrão de motilidade (Figura 6A e B). A cepa PAO1 quando inoculada com os compostos pirocatecol e ácido 3,4-dimetilbenzóico teve a sua capacidade de motilidade *swimming* aumentada (Figura 6A). Já a cepa ATCC 27853, quando inoculada com as moléculas hidroquinona e pirocatecol, teve a sua capacidade de motilidade *swimming* diminuída significativamente. Quando realizado o teste de motilidade em contato com o ácido 2-hidroxicinâmico, ácido hidrocinâmico, ácido 3,4-dimetilbenzoico, acetato de benzila e ácido 2-fenilpropiónico a cepa ATCC 27853 apresentou um aumento na sua capacidade de motilidade *swimming* (Figura 6B). Tais resultados demonstram que as moléculas de estudo apresentam a capacidade de modular aspectos de virulência de forma negativa e positiva.

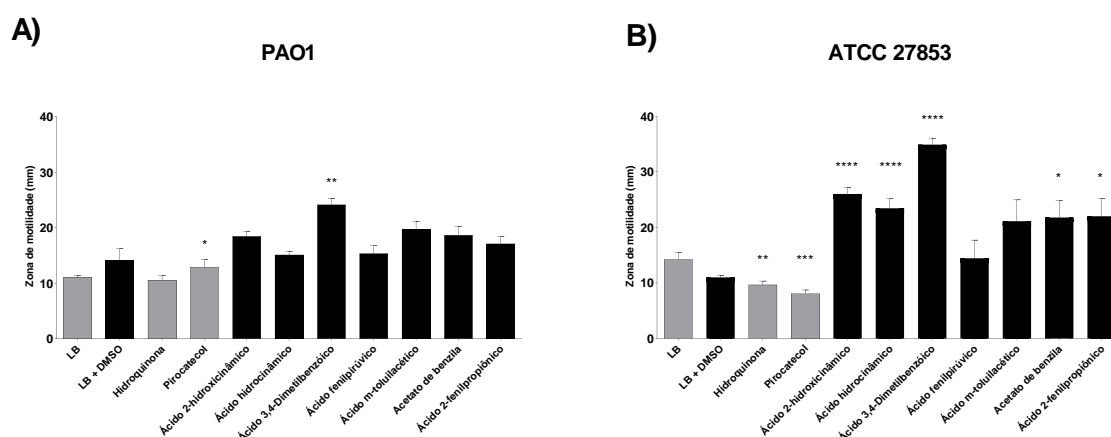


Figura 6. Efeito de moléculas produzidas pela microbiota na motilidade de *swimming* de *P. aeruginosa*. Placas de LB com 0,3% de ágar contendo as moléculas foram inoculadas com as cepas A) PAO1 e B) ATCC 27853 de *P. aeruginosa*. As zonas de motilidade foram medidas em mm. Em cinza estão as moléculas diluídas em água e em preto as moléculas diluídas em DMSO. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$. Os resultados apresentam a média de 3 experimentos diferentes ($n = 3$).

Quando observada a interação das moléculas oriundas do trato gastrointestinal na modulação do padrão de motilidade *swarming* em *P. aeruginosa* (ágar 0,6%), foi observado que na cepa PAO1 apenas duas moléculas não foram capazes de levar à modulação da sua motilidade, sendo elas as moléculas ácido 2-hidroxicinâmico e ácido hidrocinâmico (Figura 7A). As demais moléculas estudadas apresentaram capacidade de modulação desse padrão de motilidade de PAO1 e levaram ao aumento da motilidade por essa cepa (Figura 7A). No caso da cepa ATCC 27853 de *P. aeruginosa*, o ácido 3,4-dimetilbenzoico demonstrou capacidade de levar ao aumento significativo da motilidade. Entretanto, o ácido hidrocinâmico, ácido fenilpirúvico, ácido m-toluilacético, acetato de benzila e ácido 2-fenilpropiónico, tiveram efeito significativamente repressor sob o *swarming* de ATCC 27853 (Figura 7B).

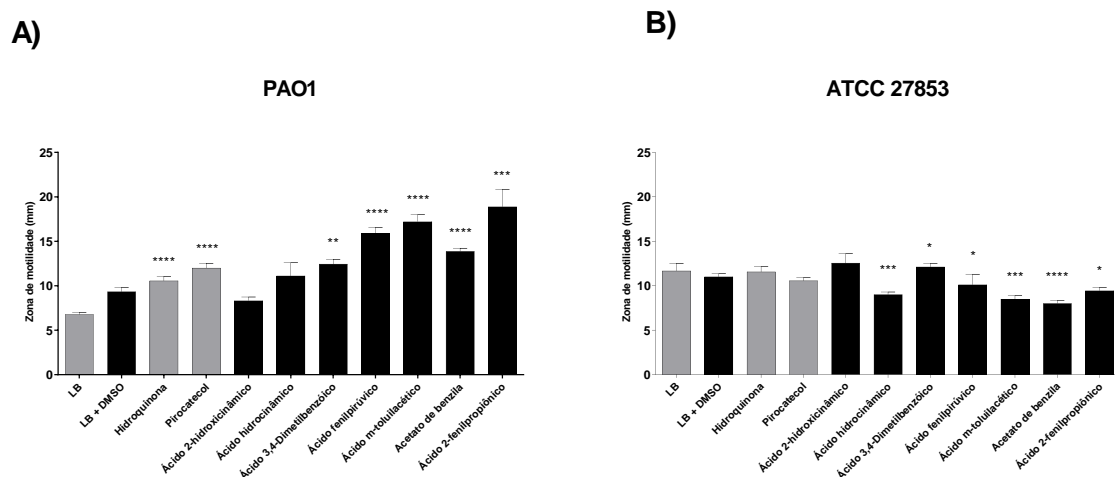


Figura 7. Efeito de moléculas produzidas pela microbiota na motilidade de *swarming* de *P. aeruginosa*. Placas de LB com 0,6% de ágar contendo as moléculas foram inoculadas com as cepas A) PAO1 e B) ATCC 27853 de *P. aeruginosa*. As zonas de motilidade foram medidas em mm. Em cinza estão as moléculas diluídas em água e em preto as moléculas diluídas em DMSO. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$. Os resultados apresentam a média de 3 experimentos diferentes (n= 3).

Ao analisar a capacidade de motilidade de *P. aeruginosa* através do padrão *twitching* (ágar 1%), foi observado que a cepa PAO1 de *P. aeruginosa* teve sua motilidade aumentada pelo ácido fenilpirúvico. Entretanto, os compostos hidroquinona, ácido hidrocinâmico, ácido 3,4-dimetilbenzoico, ácido m-toluilacético, acetato de benzila e ácido 2-fenilpropiónico, levaram a uma redução estatisticamente significativa da motilidade dessa cepa quando comparada ao controle (Figura 8A). Foi observado também que a cepa ATCC 27853 de *P. aeruginosa* teve a sua motilidade aumentada pelos compostos ácido 3,4-dimetilbenzoico e ácido fenilpirúvico. Entretanto, os compostos pirocatecol, ácido m-toluilacético, acetato de benzila e ácido 2-fenilpropiónico levaram à diminuição da zona de motilidade gerada pela cepa quando comparada ao controle (Figura 8B). Os resultados obtidos na realização dos diferentes padrões de motilidade demonstraram que as moléculas estudadas nesse trabalho apresentam uma capacidade efetiva de modular a motilidade de *P. aeruginosa*.

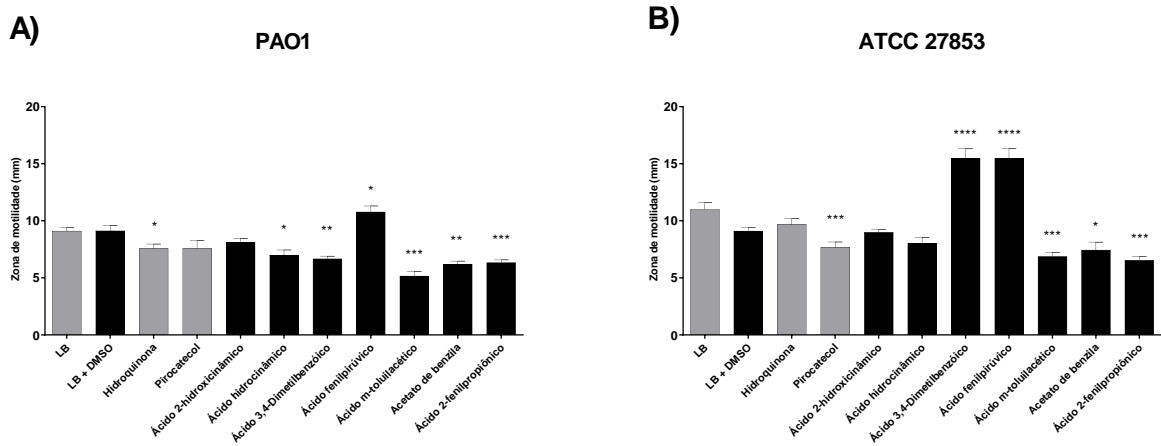


Figura 8. Efeito de moléculas produzidas pela microbiota na motilidade de twitching de *P. aeruginosa*. Placas de LB com 1% de ágar contendo as moléculas foram inoculadas com as cepas **A) PAO1 e B) ATCC 27853** de *P. aeruginosa*. As zonas de motilidade foram medidas em mm. Em cinza estão as moléculas diluídas em água e em preto as moléculas diluídas em DMSO. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$. Os resultados apresentam a média de 3 experimentos diferentes (n= 3).

5.4 Produção de proteases

A capacidade de produção de proteases por *P. aeruginosa* foi observada por meio da degradação de proteínas contidas no meio pelas cepas PAO1 e ATCC 27853 (Figura 9).

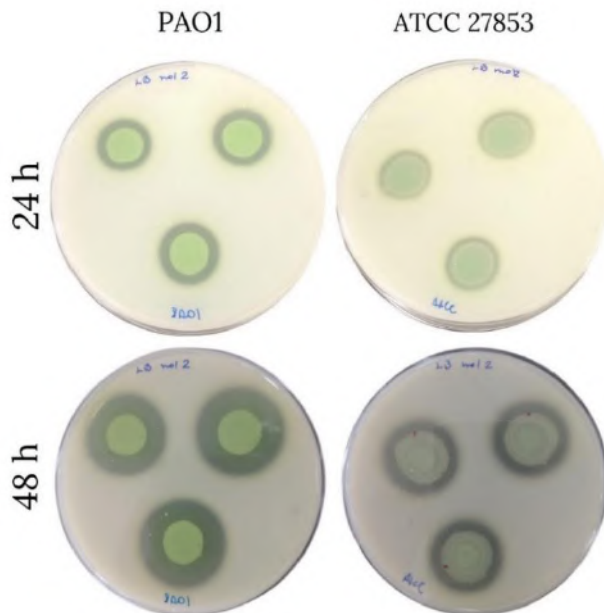


Figura 9. Imagens das placas dos testes de visualização de atividade de protease. Degradação de proteína pelas cepas PAO1 e ATCC 27853 de *P. aeruginosa* em meio LB contendo 2% de leite em 24 h e 48 h.

Após 24 h de incubação das cepas PAO1 e ATCC 27853 de *P. aeruginosa* em placas contendo LB acrescido de 2% de leite, pudemos observar que a cepa PAO1 produziu halos de degradação do leite, que indica a atividade de proteases, quando a cepa foi incubada nos meios contendo as moléculas ácido fenilpirúvico, ácido m-toluilacético, acetato de benzila e ácido 2-fenilpropiónico (Figura 10A). Na cepa ATCC 27853 de *P. aeruginosa* houve também o aumento significativo da atividade das proteases quando a cepa foi incubada com meio contendo as moléculas pirocatecol, acetato de benzila e ácido 2-fenilpropiónico (Figura 10B).

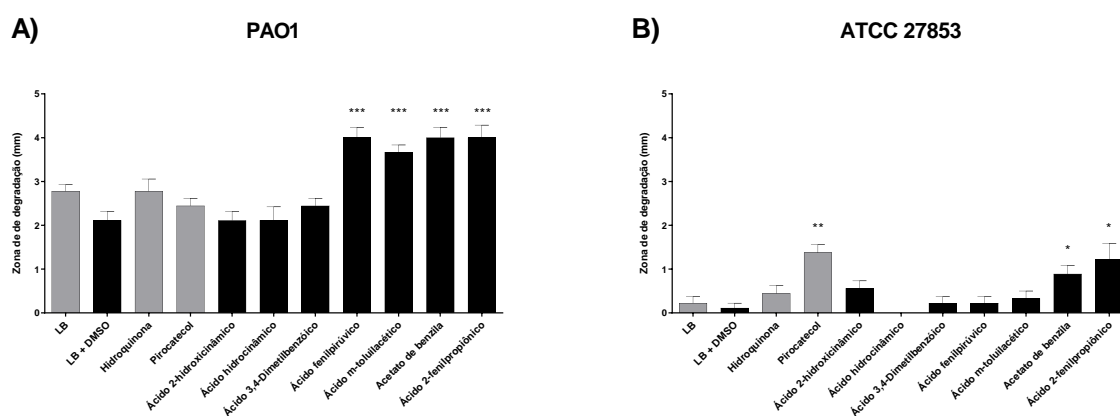


Figura 10. Efeito de moléculas produzidas pela microbiota na atividade de proteases por *P. aeruginosa* após 24 horas. Placas de LB com 2% de leite contendo as moléculas foram inoculadas com *P. aeruginosa* por 24 horas. Zonas de degradação foram medidas em mm. Em cinza estão as moléculas diluídas em água e em preto as moléculas diluídas em DMSO. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$. Os resultados apresentam a média de 3 experimentos diferentes (n= 3).

Após a incubação por 48 h, tempo necessário para uma maior produção de piocianina em *P. aeruginosa* (Devnath *et al.*, 2017), foi observado que o ácido 3,4-dimetilbenzoico, ácido fenilpirúvico, ácido m-toluilacético e acetato de benzila foram capazes de levar ao aumento da zona de degradação de proteínas em PAO1, sendo esse aumento associado a maior atividade de proteases pela cepa PAO1 de *P. aeruginosa* (Figura 11A). A cepa ATCC 27853 demonstrou também um aumento da zona de degradação de proteínas quando incubada com o pirocatecol e o ácido 2-fenilpropiónico (Figura 11B).

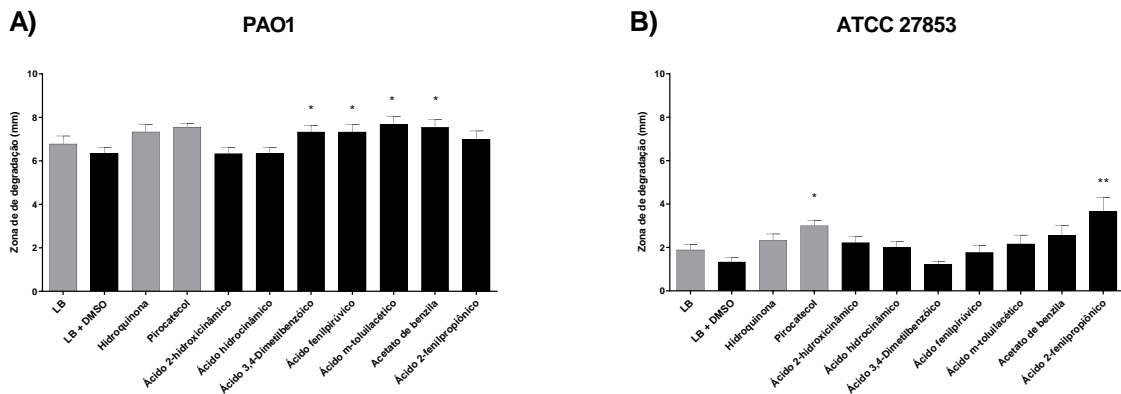


Figura 11. Efeito de moléculas produzidas pela microbiota na atividade de proteases por *P. aeruginosa* após 48 horas. Placas de LB com 2% de leite contendo as moléculas foram inoculadas com *P. aeruginosa* por 48 horas. Zonas de degradação foram medidas em mm. Em cinza estão as moléculas diluídas em água e em preto as moléculas diluídas em DMSO. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Os resultados apresentam a média de 3 experimentos diferentes ($n = 3$).

5.5 Formação de biofilme

A realização do teste de produção de biofilme pelas cepas de *P. aeruginosa* quando crescidas em contato com as moléculas de estudo demonstrou que nenhuma das moléculas identificadas foi capaz de levar à modulação significativa da formação de biofilme quando em contato com a cepa PAO1 (Figura 12A). Entretanto, a produção de biofilme pela cepa ATCC 27853 pôde ser modulada pelos compostos ácido 2-hidroxicinâmico, ácido fenilpirúvico, acetato de benzila e ácido 2-fenilpropiónico (Figura 12B), gerando a diminuição da produção de biofilme pela cepa quando em contato com tais moléculas. Tal resultado corrobora a ideia de que moléculas oriundas do trato gastrointestinal podem apresentar capacidade de modulação de fatores de virulência de espécies bacterianas com relevância clínica, entretanto mais estudos são necessários para a elucidação do papel desses compostos.

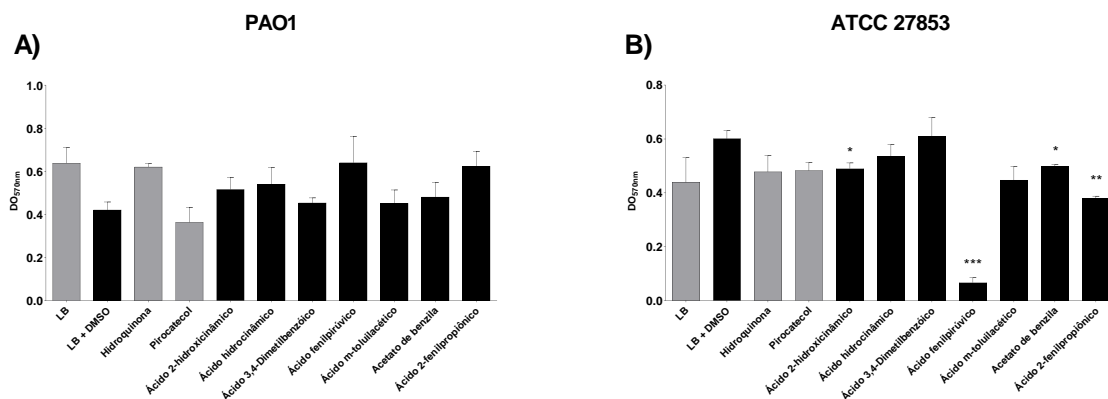


Figura 12. Ação de moléculas da microbiota intestinal na produção de biofilme por *P. aeruginosa*. Moléculas foram inoculadas com *P. aeruginosa* em placas de 96 poços *overnight* e posteriormente coradas com cristal violeta

0,1%. Densidade ótica foi quantificada em comprimento de onda de 570 nm. Em cinza estão as moléculas diluídas em água e em preto as moléculas diluídas em DMSO. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Os resultados apresentam a média de 3 experimentos diferentes (n= 3).

5.6 Produção de pigmento

Como resultado do teste de produção de piocianina pelas cepas ATCC 27853 e PAO1 de *P. aeruginosa* quando crescidas com ou sem a adição das moléculas de estudo, foi observado que, apesar da produção de pigmento apresentar diferença entre as culturas controle e as culturas das cepas em contato com as moléculas, como demonstrado na quantificação do pigmento por meio de espectrofotometria, não houveram modulações estatisticamente significativas na produção de pigmento pelas cepas de estudo (Figura 13 e Figura 14).

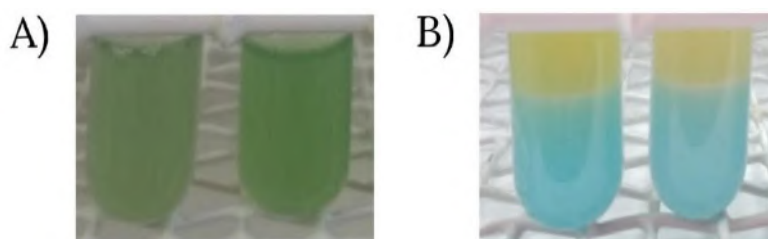


Figura 13. Imagem dos testes de produção de piocianina. Produção de piocianina pelas cepas PAO1 e ATCC 27853 de *P. aeruginosa* antes (A) e depois (B) da homogeneização com clorofórmio.

O resultado obtido indica que as moléculas podem não apresentar capacidade de modular esse fator de virulência específico. Entretanto, ainda são necessários mais testes para que haja uma melhor conclusão sobre a atividade das moléculas na modulação da produção de piocianina.

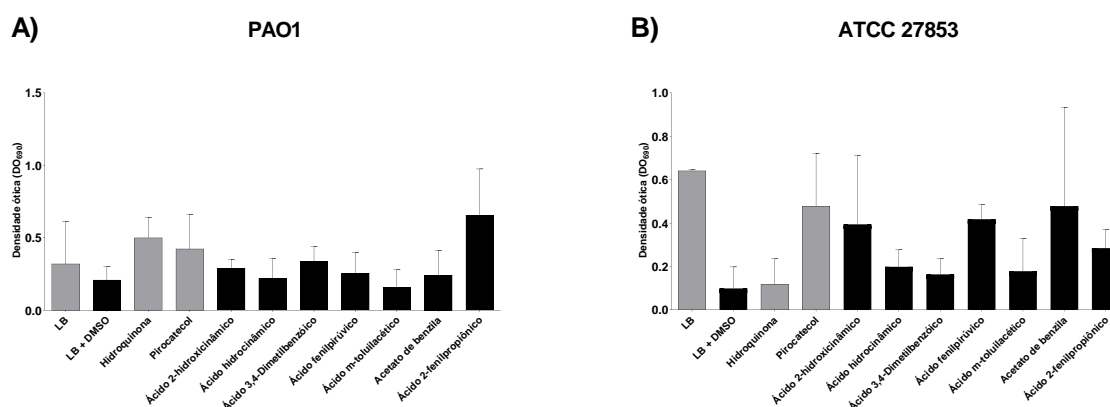


Figura 14. Efeito de moléculas produzidas pela microbiota na atividade de piocianina por *P. aeruginosa*. Piocianina foi extraída com clorofórmio após o crescimento das cepas de *P. aeruginosa* por 48 h sob agitação.

Densidade óptica foi quantificada em comprimento de onda de 690 nm. Os resultados apresentam a média de 3 experimentos diferentes (n= 3).

Os resultados obtidos indicam que as moléculas estudadas apresentam capacidade de levar a regulação de aspectos de virulência das cepas ATCC 27853 e PAO1 de *P. aeruginosa*. Os diferentes testes realizados ao longo do trabalho e os seus resultados foram utilizados para a realização da tabela abaixo (Tabela 1) .

Tabela 1. Resumo do efeito das moléculas nos testes fenotípicos

		Hidroquina	Pirocatenol	Ácido 2-hidroxicinâmico	Ácido hidrocinnâmico	Ácido 3,4-dimetilbenzoico	Ácido fenilpirúvico	Ácido m-toluilacético	Acetato de benzila	Ácido 2-fenilpropionico	
ATCC 27853	Motilidade	<i>Swimming</i>	--	---	++++	++++	++++		+	+	
		<i>Swarming</i>				---	+	-	---	----	-
		<i>Twitching</i>		---			++++	++++	---	-	---
	Protease	24 h		++						+	+
		48 h		+							+
	Biofilme				-			---		-	--
Piocianina											
PAOI	Motilidade	<i>Swimming</i>		+			++				
		<i>Swarming</i>	++++	++++			++	++++	++++	++++	+++
		<i>Twitching</i>	-			-	--	+	---	--	---
	Protease	24 h						+++	+++	+++	+++
		48 h					+	+	+	+	
	Biofilme										
Piocianina											

+ : significância das moléculas que levaram a um aumento na expressão dos fatores de virulências estudados. + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$; +++ $p < 0,005$; ++++ $p < 0,001$

- : significância das moléculas que levaram a uma redução na expressão dos fatores de virulências estudados. - $p < 0,05$; -- $p < 0,01$; --- $p < 0,005$; ---- $p < 0,001$

6. DISCUSSÃO

O microambiente da microbiota gastrointestinal pode ser entendido como uma cavidade extremamente complexa, que apresenta diversas interações entre os seus componentes. Ao longo do tempo, diferentes funções têm sido elucidadas sobre a microbiota e as suas diversas interações, com o desenvolvimento de importantes aspectos do corpo humano associado a esse consórcio, como o desafio ao sistema imunológico por microrganismos que nele estão inseridos, a proteção a patógenos ou microrganismos exógenos e até mesmo a degradação de compostos como fibras e ácidos graxos (Sekirov *et al.*, 2010). Grande parte dos impactos da microbiota gastrointestinal na saúde humana são gerados por meio de sua composição e pelo equilíbrio dessa composição que está relacionado não só a uma proteção local, como também ao desenvolvimento de distúrbios sistêmicos auxiliados pela disbiose, como pode ocorrer em doenças cardiovasculares e em doenças metabólicas como a obesidade e a diabetes (Pluznick *et al.*, 2013; Vemuri *et al.*, 2008). Esses diversos papéis que são assumidos por componentes da microbiota gastrointestinal podem indicar que as contribuições dessa microbiota, tanto de forma local como sistêmica, ainda não sejam bem elucidadas. Isso pode ser exemplificado, pela grande riqueza de metabólitos produzidos no contexto da microbiota gastrointestinal, tornando esse sítio ideal para a bioprospecção de moléculas bioativas, que poderiam atuar, inclusive sob patógenos classicamente não-entéricos, como *Pseudomonas aeruginosa* (Antunes *et al.*, 2014).

A ação de metabólitos intestinais é uma das interações que o microambiente intestinal pode apresentar e tem sido cada vez mais estudada, em razão da ação que esses compostos podem apresentar frente a microrganismos patogênicos. A importância da elucidação do papel dessas moléculas pode ser exemplificado por meio de trabalhos anteriores do nosso grupo que demonstraram a capacidade de levar à diminuição de aspectos de virulência. Estudos realizados pelo nosso grupo já demonstraram que fatores de virulência de importantes enteropatógenos, como *Vibrio cholerae* e *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, foram reprimidos quando em contato com moléculas produzidas pela microbiota do trato gastrointestinal. Em *V. cholerae*, foi observada, por meio de sequenciamento de mRNA total, a redução da expressão de genes relacionados a sua motilidade quando em contato com um extrato fecal (dados não publicados). No atual estudo, foi demonstrado que o fenótipo da redução da motilidade de cepas de *P. aeruginosa* também foi observado quando em contato com extrato fecal, evidenciando que moléculas presentes no trato gastrointestinal apresentam capacidade de modulação da motilidade de importantes patógenos.

Além disso, estudos realizados acerca da virulência de *S. enterica* demonstraram que moléculas contidas em um extrato fecal foram capazes de levar à redução da expressão de genes

de invasão celular nesse patógeno. Nesse caso a regulação ocorreu por meio da diminuição da expressão do gene que codifica HilA, o regulador da Ilha de Patogenicidade de *Salmonella* 1 (SPI-1) (Antunes *et al.*, 2014). A regulação de SPI-1 por meio da repressão de *hilA* também foi vista em estudo mais recente do nosso grupo, no qual foram identificados os metabólitos utilizados no atual estudo, sendo o ácido 3,4-dimetilbenzoico a principal molécula identificada capaz de levar à forte repressão desse regulador (Peixoto *et al.*, 2017). No trabalho atual foi observado, que a ação do ácido 3,4-dimetilbenzoico sobre a cepa PAO1 de *P. aeruginosa* levou a regulação de fenótipos importantes, o que pode ser exemplificado com o aumento dos padrões de motilidades flagelares *swimming* e *swarming* e a diminuição do padrão de motilidade *twitching*, sendo esse fator dependente do pilus do tipo IV (Kearns, 2010). Além disso, outras moléculas, que no trabalho anterior, levaram a uma baixa ou moderada redução na expressão de genes de *S. enterica* como o ácido 2-hidroxicinâmico, ácido hidrocinâmico e ácido m-toluilacético, demonstraram, no atual estudo, capacidade de reduzir fenótipos importantes em cepas de *P. aeruginosa*. O ácido hidroxicinâmico, por exemplo, levou a redução da produção de biofilme pela cepa ATCC 27853, enquanto, o ácido hidrocinâmico apresentou capacidade de levar a redução do padrão de motilidade *twitching* na cepa PAO1. Além disso, o ácido m-toluilacético também gerou uma diminuição em um fator gerado pelo pilus do tipo IV em *P. aeruginosa*, como o padrão de motilidade *twitching*, nas cepas ATCC 27853 e PAO1. Tais achados são importantes, não só por contribuem com a ideia de que a microbiota intestinal alberga compostos com grande importância para a regulação e controle de patógenos intestinais, como também permite a elucidação da capacidade de ação de moléculas específicas em diferentes microrganismos como realizado neste trabalho, mostrando a relevância desses metabólitos e impulsionando a necessidade de estudos sobre o papel dessas moléculas.

P. aeruginosa quando gera infecção, por sua vez, é um microrganismo conhecido por levar a processos patológicos infecciosos graves, sendo um patógeno oportunista; ou seja, é capaz de gerar infecções em pacientes com doenças preexistentes ou imunossuprimidos (Moradali *et al.*, 2017). Além disso, quadros infecciosos gerados por esse microrganismo ainda podem ser severos e de difícil tratamento em razão da apresentação de diversos fatores de virulência e a resistência a antimicrobianos, que seriam a forma mais eficaz para o tratamento de infecções bacterianas, podendo assim gerar infecções crônicas (Lee e Zhang, 2015). Tendo isso em vista, a necessidade de descoberta de novas formas de tratamento ou redução dos impactos fisiológicos causados pela infecção por esse microrganismo se torna extremamente evidente. Nesse trabalho, conseguimos observar que os metabólitos produzidos no contexto da microbiota intestinal apresentam capacidade de modular aspectos de virulência de cepas de *P. aeruginosa* de forma negativa e positiva. A importância desses achados se dá pelo fato de que

demonstram a capacidade de modulação de fatores de virulência por meio de moléculas bioativas identificadas na microbiota em um microrganismo que não apresenta como único sítio de infecção o trato gastrointestinal, demonstrando que a maior elucidação da ação desses compostos pode levar uma nova forma de tratamento específico aos fatores de virulência, sem levar necessariamente à morte desses microrganismos e mantendo um possível papel biológico que esse microrganismo pode apresentar nessa microbiota.

Apesar da visualização da ação moduladora dos metabólitos hidroquinona, pirocatecol, ácido 2-hidroxicinâmico, ácido hidrocinâmico, ácido 3,4-dimetilbenzoico, ácido fenilpirúvico, ácido m-toluilacético, acetato de benzila e ácido 2-fenilpropionico sob fatores de virulência de *P. aeruginosa*, ainda há necessidade de elucidar como essas modulações fenotípicas ocorrem a nível genômico. Tal necessidade se dá devido ao fato de que a regulação desses aspectos fenotípicos pode ter sido gerada pela atividade direta desses metabólitos em genes específicos. Os sistemas de *quorum sensing* de *P. aeruginosa*, por exemplo, são os principais componentes de sinalização celular que levam à regulação de fatores de virulência desse microrganismo de forma a gerar um processo infeccioso bem-sucedido (Lee e Zhang, 2015). A geração primária de moléculas que levam à sinalização por meio da alta densidade celular, e por sua vez à alta densidade dessas moléculas de sinalização, é a responsável pela ligação a receptores celulares que levam a um processo de regulação, permitindo que haja a expressão de genes associados à virulência de *P. aeruginosa*, levando à produção de enzimas de degradação, geração de polissacarídeos, propiciando o processo de formação de biofilme, entre outros processos importantes para a virulência desse microrganismo (Kostylev *et al.*, 2019). Além disso, a regulação negativa de aspectos fenotípicos como apresentada na redução da motilidade pelo padrão *swarming* na cepa ATCC 27853 e o aumento no mesmo padrão pela cepa PAO1 quando em contato com ácido fenilpirúvico, ácido m-toluilacético, acetato de benzila e ácido 2-fenilpropionico, pode ser atribuído a uma regulação diferencial frente às moléculas de estudo se considerado o aparato genômico dessas cepas, uma vez que, segundo a literatura, pode haver uma diferença na expressão gênica de *lasI* e *lasR* reguladores do sistema LasI/R de *quorum sensing* na diferentes cepas de *P. aeruginosa* mesmo sem a interferência dos metabólitos (Cao *et al.*, 2017). Dessa forma, pode-se apresentar a hipótese de que as moléculas desse estudo podem agir sobre as cepas de *P. aeruginosa* levando a um processo de regulação no sistema de *quorum sensing* através da ligação dessas moléculas em algum nível de regulação desses sistemas.

Apesar disso, o papel dos metabólitos estudados como possíveis moléculas terapêuticas é reforçado por meio dos resultados obtidos nesse trabalho. Isso se dá uma vez que o perfil

infecioso crônico de *P. aeruginosa*, considerado mais severo e de difícil tratamento, é observado quando esse microrganismo está em agregados celulares denominado biofilme (Gellatly *et al.*, 2013). Nesse trabalho além de observar a redução direta da produção de biofilme pelos compostos ácido 2-hidroxicinâmico, ácido fenilpirúvico, acetato de benzila e ácido 2-fenilpropionico quando em contato com a cepa ATCC 27853 de *P. aeruginosa*, ainda podemos correlacionar a ação dos metabólitos estudados sob os diferentes padrões de motilidade com a formação de biofilme por esse microrganismo. Isso se deve ao fato de *P. aeruginosa* ser um microrganismo descrito por apresentar uma diminuição da expressão de genes relacionados a motilidade, como o flagelo e o pilus do tipo IV, quando desempenham uma infecção crônica ao hospedeiro, como é o caso de grande parte dos processos infecciosos ao trato respiratório de pacientes com fibrose cística, por exemplo (Wolfgang *et al.*, 2004). Em contrapartida o processo de infecção crônica leva ao aumento da expressão de genes associados a formação de biofilme como o alginato e outros exopolissacarídeos (Sadikot *et al.*, 2005). Dessa forma, o aumento dos padrões de motilidade observados nesse trabalho, como visto por exemplo pelo ácido 3,4-dimetilbenzoico, que apresentou capacidade de levar ao aumento dos três perfis de motilidade na cepa ATCC 27853 pode estar relacionado com uma diminuição da capacidade de geração de um perfil infeccioso crônico por *P. aeruginosa*, demonstrando uma possível forma de redução dos impactos causados ao hospedeiro em infecções crônicas.

Esse trabalho se mostra como um caminho para a elucidação dos papéis importantes que podem ser desenvolvidos pela microbiota gastrointestinal que ainda são pouco elucidados. Nesse sentido, foi demonstrada uma potencial capacidade da regulação de patógenos oportunistas, como é o caso de *P. aeruginosa*. Experimentos que levem ao entendimento de como ocorrem as modulações observadas nesse trabalho são necessários, sendo a regulação gênica dos fatores de virulência testados uma das principais formas de projetar como ocorre a regulação desses aspectos. Além disso, a melhor elucidação desse processo de modulação se torna necessária uma vez que esses metabólitos podem apresentar um papel terapêutico frente a *P. aeruginosa*, o que se mostra de grande importância visto que tal microrganismo é estudado como um patógeno crítico em infecções oportunistas e considerado um grande problema de saúde pública em razão da sua multirresistência a antimicrobianos (Pang *et al.*, 2018).

7. CONCLUSÕES

- As moléculas estudadas não apresentam grande impacto sob o crescimento as cepas ATCC 27853 e PAO1 de *P. aeruginosa*;
- O extrato fecal é capaz de levar a uma redução significativa do padrão *swimming* de motilidade em *P. aeruginosa*;
- Os padrões de motilidade das cepas de *P. aeruginosa* foram os aspectos mais modulados pelos metabólitos desse estudo, sendo mais destacadas as ações do ácido 3,4-dimetilbenzoico, que foi capaz de regular as motilidades por *swimming*, *swarming* e *twitching* nas cepas ATCC 27853 e PAO1, e também do acetato de benzila e do ácido 2-fenilpropiónico que levaram a regulação dos três padrões de motilidade em ATCC 27853;
- As atividades das proteases foram aumentadas pelos compostos ácido 3,4-dimetilbenzóico, ácido fenilpirúvico, ácido m-toluilacético e ácido 2-fenilpropiónico na cepa PAO1 e na cepa ATCC 27853 também houve o aumento da produção de protease pelos compostos pirocatecol e acetato de benzila;
- A produção de biofilme de *P. aeruginosa* foi diminuída na cepa ATCC 27853 pelos compostos ácido 2-hidroxicinâmico, ácido fenilpirúvico, acetato de benzila e ácido 2-fenilpropiónico;
- Nenhuma molécula de estudo foi capaz de levar a regulação da produção de piocianina.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I., e Dewhirst, F. E. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol*, 43(11), 5721–5732.
- Adlard, P. A., Kirov, S. M., Sanderson, K., e Cox, G. E. (1998). *Pseudomonas aeruginosa* as a cause of infectious diarrhoea. *Epidemiology and infection*, 121(1), 237–241.
- Ahlman, H., e Nilsson (2001). The gut as the largest endocrine organ in the body. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, 12 Suppl 2, S63–S68.
- Al-Ghazzewi, F. H., e Tester, R. F. (2014). Impact of prebiotics and probiotics on skin health. *Beneficial Microbes*, 5(2), 99–107.
- Antunes, L., Ferreira, R., Buckner, M., e Finlay, B. B. (2010). Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiology*, 156(Pt 8), 2271–2282.
- Antunes, L. C., McDonald, J. A., Schroeter, K., Carlucci, C., Ferreira, R. B., Wang, M., Yurist-Doutsch, S., Hira, G., Jacobson, K., Davies, J., Allen-Vercoe, E., e Finlay, B. B. (2014). Antivirulence activity of the human gut metabolome. *mBio*, 5(4), e01183-14.
- Azam, M. W., e Khan, A. U. (2019). Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug discovery today*, 24(1), 350–359.
- Burrows, L. L. (2012). *Pseudomonas aeruginosa*: twitching motility: type IV pili in action. *Ann Rev Microbiol*, 66(1), 493–520.
- Cao, H., Lai, Y., Bougouffa, S., Xu, Z., e Yan, A. (2017). Comparative genome and transcriptome analysis reveals distinctive surface characteristics and unique physiological potentials of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. *BMC genomics*, 18(1), 459.
- Cheng, Z. (2016). A *Pseudomonas aeruginosa* - Secreted protease modulates host intrinsic immune responses, but how? *Bio Essays*, 38(11), 1084–1092.
- Chew, S. C., Kundukad, B., Seviour, T., van der Maarel, J. R., Yang, L., Rice, S. A., Doyle, P., e Kjelleberg, S. (2014). Dynamic remodeling of microbial biofilms by functionally distinct exopolysaccharides. *mBio*, 5(4), e01536-14.
- Conlon, M. A., e Bird, A. R. (2014). The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. *Nutrients*, 7(1), 17–44.
- Costello, E. K., Lauber, C. L., Hamady, M., Fierer, N., Gordon, J. I., e Knight, R. (2009). Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science (New York, N.Y.)*, 326(5960), 1694–1697.
- Cox, G., e Wright, G. D. (2013). Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *International journal of medical microbiology*, 303(6-7), 287–292.
- Crousilles, A., Maunders, E., Bartlett, S., Fan, C., Ukor, E.-F., Abdelhamid, Y., e Welch, M. (2015). Which microbial factors really are important in *Pseudomonas aeruginosa* infections? *Future Microbiology*, 10(11), 1825–1836. *ology advances*, 37(1), 177–192.
- Cui, Q., Lv, H., Qi, Z., Jiang, B., Xiao, B., Liu, L., Ge, Y., & Hu, X. (2016). Cross-Regulation between the *phz1* and *phz2* Operons Maintain a Balanced Level of Phenazine Biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *PLoS one*, 11(1), e0144447.
- Cussotto, S., Sandhu, K. V., Dinan, T. G., e Cryan, J. F. (2018). The neuroendocrinology of the microbiota-gut-brain axis: a behavioural perspective. *Frontiers in neuroendocrinology*, 51, 80–101.
- Das, T., Kutty, S. K., Tavallaie, R., Ibugo, A. I., Panchompoo, J., Sehar, S., Aldous, L., Yeung, A. W., Thomas, S. R., Kumar, N., Gooding, J. J., e Manefield, M. (2015). Phenazine virulence factor binding to extracellular DNA is important for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Scientific reports*, 5, 8398.
- Demirdjian, S., Sanchez, H., Hopkins, D., e Berwin, B. (2019). Motility-independent formation of antibiotic-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* aggregates. *Appl Environ Microbiol* 85:e00844-19

- Devnath, P., Uddin, M. K., Ahamed, F., Hossain, M. T., e Manchur M. T. (2017). Extraction, purification and characterization of pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa* and evaluation for its antimicrobial activity. *International Research Journal of Biological Sciences*, 6(5), 2278-3202
- Duan, K., e Surette, M. G. (2007). Environmental regulation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Las and Rhl quorum-sensing systems. *Journal of bacteriology*, 189(13), 4827–4836
- Galdino, A. C. M., Branquinha, M. H., Santos, A. L. S., e Viganor, L. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* and its arsenal of proteases: weapons to battle the host. *Pathophysiological Aspects of Proteases*, 381–397.
- Gensollen, T., Iyer, S. S., Kasper, D. L., e Blumberg, R. S. (2016). How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science (New York, N.Y.)*, 352(6285), 539–544.
- Glessner, A., Smith, R. S., Iglewski, B. H., e Robinson, J. B. (1999). Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of twitching motility. *Journal of bacteriology*, 181(5), 1623–1629.
- Grice, E. A., Kong, H. H., Conlan, S., Deming, C. B., Davis, J., Young, A. C., NISC Comparative Sequencing Program, Bouffard, G. G., Blakesley, R. W., Murray, P. R., Green, E. D., Turner, M. L., e Segre, J. A. (2009). Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5931), 1190–1192.
- Haghi, F., Zeighami, H., Monazami, A., Toutouchi, F., Nazaralian, S., e Naderi, G. (2018). Diversity of virulence genes in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wound infections. *Microbial Pathogenesis*, 115, 251–256.
- Han Y. W. (2015). *Fusobacterium nucleatum*: a commensal-turned pathogen. *Current opinion in microbiology*, 23, 141–147.
- Han, J., Antunes, L. C. M., Finlay, B. B., e Borchers, C. H. (2010). Metabolomics: towards understanding host–microbe interactions. *Future Microbiology*, 5(2), 153–161.
- Hauser A. R. (2009). The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nature reviews. Microbiology*, 7(9), 654–665.
- Heeb, S., Schöck, U., Pohl, T. M., Wiehlmann, L., & Tümmler, B. (2010). Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 laboratory strains. *Journal of bacteriology*, 192(4), 1113–1121.
- Hooper, L. V., e Gordon, J. I. (2001). Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5519), 1115–1118.
- Iglewski, B. H. (1996). *Pseudomonas*. In S. Baron (Ed.), *Medical Microbiology*. (4th ed.). University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Kearns D. B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nature reviews. Microbiology*, 8(9), 634–644.
- Kiymaci, M. E., Altanlar, N., Gumustas, M., Ozkan, S. A., e Akin, A. (2018). Quorum sensing signals and related virulence inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by a potential probiotic strain's organic acid. *Microbial pathogenesis*, 121, 190–197.
- Kim, S. W., Peck, K. R., Jung, S. I., Kim, Y. S., Kim, S., Lee, N. Y., e Song, J. H. (2001). *Pseudomonas aeruginosa* as a potential cause of antibiotic-associated diarrhea. *Journal of Korean medical science*, 16(6), 742–744.
- Klockgether, J., Munder, A., Neugebauer, J., Davenport, C. F., Stanke, F., Larbig, K. D., Heeb, S., Schöck, U., Pohl, T. M., Wiehlmann, L., e Tümmler, B. (2010). Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 laboratory strains. *Journal of bacteriology*, 192(4), 1113–1121.
- Koropatkin, N. M., Cameron, E. A., e Martens, E. C. (2012). How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 10(5), 323–335.
- Kostylev, M., Kim, D. Y., Smalley, N. E., Salukhe, I., Greenberg, E. P., e Dandekar, A. A. (2019). Evolution of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing hierarchy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(14), 7027–7032.
- Landman, C., e Quévrain, E. (2016). Le microbiote intestinal: description, rôle et implication physiopathologique. *La Revue de Médecine Interne*, 37(6), 418–423.
- Lau, G. W., Hassett, D. J., Ran, H., e Kong, F. (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends in molecular medicine*, 10(12), 599–606.

- Lee, J., e Zhang, L. (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & cell*, 6(1), 26–41
- Lund-Palau, H., Turnbull, A. R., Bush, A., Bardin, E., Cameron, L., Soren, O. e Davies, J. C. (2016). *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: pathophysiological mechanisms and therapeutic approaches. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 10(6), 685–697.
- Mavrodi, D. V., Parejko, J. A., Mavrodi, O. V., Kwak, Y.-S., Weller, D. M., Blankenfeldt, W., e Thomashow, L. S. (2012). Recent insights into the diversity, frequency and ecological roles of phenazines in fluorescent *Pseudomonas* spp. *Environmental Microbiology*, 15(3), 675–686.
- Mikkelsen, H., Sivaneson, M., e Filloux, A. (2011). Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, 13(7), 1666–1681.
- Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turrone, F., Mahony, J., Belzer, C., Delgado Palacio, S., Arboleya Montes, S., Mancabelli, L., Lugli, G. A., Rodriguez, J. M., Bode, L., de Vos, W., Gueimonde, M., Margolles, A., van Sinderen, D., e Ventura, M. (2017). The first microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 81(4), e00036-17.
- Moradali, M. F., Ghods, S., e Rehm, B. H. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 39.
- Munita, J. M., e Arias, C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology spectrum*, 4(2).
- Nissen-Meyer, J., e Nes, I. F. (1997). Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Archives of microbiology*, 167(2-3), 67–77.
- Nouwens, A. S., Beatson, S. A., Whitchurch, C. B., Walsh, B. J., Schweizer, H. P., Mattick, J. S., e Cordwell, S. J. (2003). Proteome analysis of extracellular proteins regulated by the *las* and *rhl* quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology*, 149(Pt 5), 1311–1322.
- O'Hara, A. M., e Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports*, 7(7), 688–693.
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J., e Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology advances*, 37(1), 177–192.
- Pearson, J. P., Pesci, E. C., e Iglewski, B. H. (1997). Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *Journal of bacteriology*, 179(18), 5756–5767.
- Peixoto, R., Alves, E. S., Wang, M., Ferreira, R., Granato, A., Han, J., Gill, H., Jacobson, K., Lobo, L. A., Domingues, R., Borchers, C. H., Davies, J. E., Finlay, B. B., e Antunes, L. (2017). Repression of *Salmonella* host cell invasion by aromatic small molecules from the human fecal metabolome. *Applied and environmental microbiology*, 83(19), e01148-17.
- Perez-Muñoz, M. E., Arrieta, M. C., Ramer-Tait, A. E., e Walter, J. (2017). A critical assessment of the "sterile womb" and "in utero colonization" hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome*, 5(1), 48.
- Pluznick, J. L., Protzko, R. J., Gevorgyan, H., Peterlin, Z., Sipos, A., Han, J., Brunet, I., Wan, L. X., Rey, F., Wang, T., Firestein, S. J., Yanagisawa, M., Gordon, J. I., Eichmann, A., Peti-Peterdi, J., e Caplan, M. J. (2013). Olfactory receptor responding to gut microbiota-derived signals plays a role in renin secretion and blood pressure regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(11), 4410–4415.
- Rajilić-Stojanović, M., e de Vos, W. M. (2014). The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS microbiology reviews*, 38(5), 996–1047.
- Rajilić-Stojanović, M., Heilig, H. G., Molenaar, D., Kajander, K., Surakka, A., Smidt, H., e de Vos, W. M. (2009). Development and application of the human intestinal tract chip, a phylogenetic microarray: analysis of universally conserved phylotypes in the abundant microbiota of young and elderly adults. *Environmental microbiology*, 11(7), 1736–1751.
- Rasiah, I. A., Wong, L., Anderson, S. A., e Sissons, C. H. (2005). Variation in bacterial DGGE patterns from human saliva: over time, between individuals and in corresponding dental plaque microcosms. *Archives of Oral Biology*, 50(9), 779–787.

- Rodríguez-Morató, J., e Matthan, N. R. (2020). Nutrition and gastrointestinal microbiota, microbial-derived secondary bile acids, and cardiovascular disease. *Current atherosclerosis reports*, 22(9), 47.
- Romero, R., Dey, S. K., e Fisher, S. J. (2014). Preterm labor: one syndrome, many causes. *Science* (New York, N.Y.), 345(6198), 760–765.
- Sadikot, R. T., Blackwell, T. S., Christman, J. W., e Prince, A. S. (2005). Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 171(11), 1209–1223.
- Sarao, L. K., e Arora, M. (2017). Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(2), 344–371.
- Scoffone, V. C., Trespidi, G., Chiarelli, L. R., Barbieri, G., e Buroni, S. (2019). Quorum sensing as antivirulence target in cystic fibrosis pathogens. *International journal of molecular sciences*, 20(8), 1838
- Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C., e Finlay, B. B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews*, 90(3), 859–904.
- Sender, R., Fuchs, S., e Milo, R. (2016). Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLOS Biology*, 14(8), e1002533.
- Silby, M. W., Winstanley, C., Godfrey, S. A. C., Levy, S. B., e Jackson, R. W. (2011). *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(4), 652–680.
- Silva, D. M., Menezes, E.M.N, Silva, E.V. e Lamounier, T.A.C. (2017). Prevalence and antimicrobial susceptibility profile of ESKAPE pathogens from the Federal District, Brazil. *J Bras Patol Med Lab*. 53, 240-245.
- Silva, K. A., Calomino, M. A., Deutsch, G., de Castilho, S. R., de Paula, G. R., Esper, L., e Teixeira, L. A. (2017). Molecular characterization of multidrug-resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a burn center. *Burns: journal of the International Society for Burn Injuries*, 43(1), 137–143.
- Stecher, B., e Hardt, W. D. (2011). Mechanisms controlling pathogen colonization of the gut. *Current opinion in microbiology*, 14(1), 82–91.
- Tamburini, F. B., Andermann, T. M., Tkachenko, E., Senchyna, F., Banaei, N., e Bhatt, A. S. (2018). Precision identification of diverse bloodstream pathogens in the gut microbiome. *Nature medicine*, 24(12), 1809–1814.
- Tang, W. H., Kitai, T., e Hazen, S. L. (2017). Gut microbiota in cardiovascular health and disease. *Circulation research*, 120(7), 1183–1196.
- Ursell, L. K., Haiser, H. J., Van Treuren, W., Garg, N., Reddivari, L., Vanamala, J., Dorrestein, P. C., Turnbaugh, P. J., e Knight, R. (2014). The intestinal metabolome: an intersection between microbiota and host. *Gastroenterology*, 146(6), 1470–1476.
- Valot B, Guyeux C, Rolland JY, Mazouzi K, Bertrand X e Hocquet D (2015) What it takes to be a *Pseudomonas aeruginosa*? The core genome of the opportunistic pathogen updated. *PLoS ONE* 10(5): e0126468.
- Vemuri, R., Gundamaraju, R., Shastri, M. D., Shukla, S. D., Kalpurath, K., Ball, M., Tristram, S., Shankar, E. M., Ahuja, K., e Eri, R. (2018). Gut microbial changes, interactions, and their implications on human lifecycle: an ageing perspective. *BioMed research international*, 2018, 4178607.
- Walker, R. W., Clemente, J. C., Peter, I., e Loos, R. (2017). The prenatal gut microbiome: are we colonized with bacteria in utero? *Pediatric obesity*, 12 Suppl 1(Suppl 1), 3–17.
- Willing, B. P., Russell, S. L., e Finlay, B. B. (2011). Shifting the balance: antibiotic effects on host-microbiota mutualism. *Nature reviews. Microbiology*, 9(4), 233–243.
- Wilson, M.G e Pandey, S. (2020). *Pseudomonas aeruginosa*. In: *StatPearls*. (Treasure Island: StatPearls Publishing)
- Wolfgang, M. C., Jyot, J., Goodman, A. L., Ramphal, R., e Lory, S. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* regulates flagellin expression as part of a global response to airway fluid from cystic fibrosis patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(17), 6664–6668.