

ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA/PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA
MESTRADO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA

KRIST HELEN ANTUNES FERNANDES

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA
SOBRE A INFECÇÃO PELO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO**

Porto Alegre
2018

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

KRIST HELEN ANTUNES FERNANDES

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM ÁCIDOS GRAXOS DE
CADEIA CURTA SOBRE A INFECÇÃO PELO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Saúde da Criança.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Paula Duarte de Souza

Porto Alegre, 2018

Ficha Catalográfica

F363a Fernandes, Krist Helen Antunes

Avaliação dos efeitos do tratamento com ácidos graxos de cadeia curta sobre a infecção pelo vírus sincicial respiratório / Krist Helen Antunes Fernandes . – 2018. 75.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Duarte de Souza.

1. Vírus Sincicial Respiratório. 2. Ácidos Graxos de Cadeia Curta.
I. Souza, Ana Paula Duarte de. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Salete Maria Sartori CRB-10/1363

KRIST HELEN ANTUNES FERNANDES

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA SOBRE A INFECÇÃO PELO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Saúde da Criança.

Aprovado em: _____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA

Dr. Márcio Vinícius Fagundes Donadio (PUCRS)

Dr. Juliano Bordignon (ICC-FIOCRUZ)

"The mind that opens up to a new idea never returns to its original size"

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por guiar e guardar a minha vida em Suas mãos.

À minha mãe, Marcia Ferreira Antunes, por todo amor, carinho, sabedoria, força e apoio dados a mim durante todos os passos da minha vida. Por ser o meu alicerce e meu maior exemplo. Obrigada, mãe!

À minha irmã, Jheini Lis Antunes, por ser a minha melhor amiga e confidente, me amparando não só durante o Mestrado, mas ao longo da vida. Obrigada por estar sempre comigo.

Aos meus “segundos pais”, Jurema e Amauri, agradeço por me acolherem como filha de vocês. Com certeza não seria tão feliz quanto sou hoje se não contasse com o carinho e amor de vocês em minha vida.

Ao meu noivo, Nicássio Martins da Costa, por ser meu companheiro e amigo. Por me amar e me ajudar nos momentos mais difíceis já passados. Sem você nada disso seria realidade. Obrigada, meu amor, por estar sempre comigo!

À minha orientadora, Ana Paula Duarte de Souza, pela oportunidade, por ter acreditado no meu potencial, apostado nas minhas ideias e, acima de tudo, por todo apoio e transmissão de conhecimento dados a mim durante esses anos.

Ao professor Marco Aurélio Ramirez Vinolo, pela pronta colaboração, por todo auxílio prestado durante os experimentos, se tornando um dos grandes mentores deste trabalho.

A todos os colegas de laboratório e do IPB, como um todo, por todo o auxílio, risadas, companheirismo, momentos descontraídos e científicos durante essa trajetória.

Às minhas amigas Gabriela de Souza e Stéfanie Muraro pela amizade, carinho e companheirismo, desempenhando um papel fundamental nessa trajetória.

Aos colegas do laboratório de Imunoinflamação da Unicamp, em especial ao José Luís, por me auxiliarem em tudo e por me receberem de braços abertos em todas as oportunidades.

A todos, MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Introdução: O vírus sincicial respiratório (VSR) é um dos principais causadores de infecções agudas do trato respiratório inferior em crianças menores de dois anos de idade. Ainda não há uma vacina disponível para o vírus e, desse modo, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para atenuar a letalidade da doença são prioridade. Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), tais como acetato, propionato e butirato, são substratos gerados da metabolização de fibras dietéticas fermentáveis por bactérias intestinais. Recentemente, ambos AGCCs e fibras fermentáveis têm sido estudados pela sua ação na homeostase intestinal, por influenciarem em diversas funções fisiológicas, celulares e moleculares, além de exercer um papel anti-inflamatório em algumas doenças.

Objetivo: Avaliar os efeitos do tratamento com AGCCs sobre a infecção pelo VSR *In vitro* e *In vivo*, bem como investigar os efeitos gerados pela dieta rica em fibras sobre a infecção pelo VSR.

Metodologia: Células humanas de pulmão A549 e MRC-5 foram pré-tratadas com os AGCCs (acetato, propionato e butirato) em diferentes concentrações (60 μ M, 120 μ M, 200 μ M, 260 μ M) por 6h, 12h e 24h. Após, foram infectadas com VSR (1×10^4 PFU/mL) por 96h e analisadas por ensaio de citotoxicidade celular. Além disso, PCR em tempo real foi realizado para identificar a carga viral nas células A549. Foi realizada uma análise de bioinformática para identificar alvos envolvidos no mecanismo. Nos experimentos *In vivo*, para o pré-tratamento, os animais foram tratados em água com AGCCs na concentração final de 200 mM por 3 semanas e infectados intranasalmente com VSR (10^7 PFU/mL) e no quinto dia pós-infecção os dados foram coletados e analisados. Para o tratamento simultâneo à infecção os animais iniciaram o tratamento e foram infectados no mesmo dia e no quinto dia pós- infecção os dados foram analisados. Em outro experimento, os animais receberam dieta rica em fibra fermentável ou dieta controle pobre em fibras fermentáveis por 4 semanas e foram infectados como descrito previamente.

Resultados: O pré-tratamento com os AGCCs protegeu as células de morte celular causada pela infecção por VSR em todos os tempos e concentrações, especialmente em células pulmonares. Ainda, o acetato e o butirato reduziram significativamente a carga viral nas células A549. Os resultados da análise de

bioinformática indicaram que Ciclinas, IL-8 e a HDAC como sendo possíveis alvos do mecanismo envolvido com a atividade antiviral do butirato. Entretanto, vimos que o mecanismo envolvido na proteção contra o VSR dos AGCCs *In vitro* não é dependente de IL-8 e nem da modulação do ciclo celular. *In vivo*, o pré-tratamento com os AGCCs, principalmente o acetato, protegeram os animais da infecção viral, reduzindo ou abolindo a carga viral no pulmão dos animais. Além disso, o tratamento evitou a perda de peso causada pelo vírus, reduziu o número de células no lavado bronco alveolar e diminuiu a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) nos pulmões. O acetato aumentou significativamente a expressão de IFN- α nos pulmões. O tratamento simultâneo à infecção também protegeu os animais do VSR. Embora todos os AGCCs tenham protegido os animais, o acetato foi o único a abolir a carga viral nos pulmões, além de aumentar a expressão de IFN- β nos pulmões. A dieta rica em fibras também protegeu os animais da infecção pelo VSR em comparação ao grupo tratado com a dieta controle. Além disso, a dieta rica em fibras evidentemente aumentou a expressão de ambos IFNs do tipo I (IFN- α e IFN- β) nos pulmões.

Conclusão: Nosso estudo demonstrou que o tratamento com os AGCCs, bem como as fibras fermentáveis, protegem da infecção pelo VSR. O acetato se mostrou com maior efeito protetor. Este efeito protetor não é dependente da produção de IL-8 e não está associado ao aumento do ciclo celular. Nossos achados sugerem que o IFN-I está envolvido no mecanismo protetor observado. Por fim, os resultados suportam o possível uso desses compostos facilmente obtidos na dieta, como um potencial tratamento da bronquiolite viral aguda causada por VSR.

ABSTRACT

Introduction: Respiratory syncytial virus (RSV) is a major cause of acute lower respiratory tract infections in children under two years of age. There is still no vaccine available for this virus and the development of new therapeutic strategies to mitigate disease lethality are a priority. Short-chain fatty acids (SCFAs), such as acetate, propionate and butyrate, are substrates generated from the metabolization of fermentable dietary fibers by intestinal bacteria. Recently, both SCFAs and fermentable fibers have been studied for their action on intestinal homeostasis, since they influence several physiological, cellular and molecular functions, and play an anti-inflammatory role in some diseases.

Objective: To evaluate the effects of SCFAs treatment on RSV infection *In vitro* and *In vivo*, as well as to investigate the effects generated by a diet rich in fermentable fibers on RSV infection.

Methods: Human pulmonary A549 and MRC-5 cells were pretreated with the SCFAs (acetate, propionate and butyrate) in different doses (60 μ M, 120 μ M, 200 μ M, 260 μ M) for 6 h, 12 h, and 24 h. Afterward they were infected with RSV (1×10^4 PFU/ml) for 96 hours and analyzed by cellular cytotoxicity assay. In addition, real-time PCR was performed to identify viral load in A549 cells. A bioinformatics analysis was performed to identify targets involved in the mechanism. In the *In vivo* experiments, for pretreatment, the animals were pretreated in drinking water with SCFAs at the final concentration of 200mM for 3 weeks and infected intranasally with RSV (10^7 PFU/ml) and on the fifth day after infection the data were collected and analyzed. For the simultaneous treatment and infection the animals began the treatment and were infected in the same day and in the fifth-day post infection the data were analyzed. In another experiment, the animals received a diet rich in fermentable fiber or poor control diet in fermentable fibers for 4 weeks and were infected as previously described.

Results: SCFAs pretreatment protected cells from cell death caused by RSV infection at all times and concentrations, especially in pulmonary cells. In addition, acetate and butyrate significantly reduced viral load in A549 cells. The results of the bioinformatics analysis indicated that Cyclins, IL-8 and HDAC as possible targets of the mechanism involved with the antiviral activity of butyrate. However, we have seen

that the mechanism involved in protection against RSV of SCFAs *in vitro* is not dependent on IL-8 and nor on cell cycle modulation. *In vivo*, SCFAs pretreatment, especially acetate, protected the animals from viral infection, reducing or abolishing viral load in the lung. Moreover, the treatment prevented weight loss caused by the virus, reduced the number of cells in the broncho alveolar lavage and decreased the production of proinflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β) in the lungs. Acetate significantly increased the expression of IFN- α in the lungs. Simultaneous treatment and infection also protected animals from RSV infection. Although all SCFAs protected animals, acetate was the only one to abolish viral load in the lungs, in addition to increasing the expression of IFN- β in the lungs. The high-fiber diet also protected the animals from RSV infection compared to the control fiber group. In addition, the high fiber diet evidently increased the expression of both type I IFNs (IFN- α and IFN- β) in the lung.

Conclusion: Our study demonstrated that treatment with the SCFAs, as well as the fermentable fibers, appear to protect against RSV infection. In addition, acetate was shown to have a greater protective effect. Furthermore, our findings suggest that type 1 IFN is involved in the observed protective mechanism. Finally, the results support the possible use of these easily obtained compounds in the diet as a potential treatment for acute viral bronchiolitis caused by RSV.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de replicação do VSR.....	21
Figura 2: Representação esquemática das rotas metabólicas utilizadas pelas bactérias da microbiota para produção de AGCCs.	23
Figura 3: Regulação da imunidade intestinal por AGCCs.	25

LISTA DE ABREVIATURAS

A549	Células epiteliais alveolares humanas
Acetato CoA-transferase	Acetato Co-enzima A transferase
AGCCs	Ácidos graxos de cadeia curta
Butiril-CoA	Butiril-Co-enzima A
CD14	<i>Cluster of differentiation 14</i>
CD1a	<i>Cluster of differentiation 1a</i>
CD80	<i>Cluster of differentiation 80</i>
CD86	<i>Cluster of differentiation 86</i>
CDs	Células Dendríticas
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
FFAR2	<i>Free fatty acid receptor 2</i>
FFAR3	<i>Free fatty acid receptor 3</i>
FOS	Frutoligosaccarídeos
FoxP3	<i>Forkhead Box P3</i>
GPCRs	Receptores de membrana acoplados à proteína G
GPR109a	Receptor de niacina 1
GPR41	Receptor acoplado à proteína G 41
GPR43	Receptor acoplado à proteína G 43
HAT	Histona acetiltransferase
HDAC	Histona desacetilase
HDM	<i>House dust mite</i>
HEp-2	Células humanas epiteliais do tipo 2

HIF	Fator hipóxia-induzível
IFN-I	Interferon do tipo 1
IFN- α	Interferon alfa
IFN- β	Interferon beta
IFN- γ	Interferon gama
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-12p40	Interleucina 12 subunidade p40
IL-1 β	Interleucina 1 subunidade beta
IL-23	Interleucina 23
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
LBA	Lavado bronco alveolar
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
MHC II	Molécula de Histocompatibilidade principal de classe II
moDCs	Células dendríticas derivadas de monócitos
MPO	Mieloperoxidase
MRC-5	Fibroblastos de pulmão embrionário humano
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MTT	<i>3-[4,5-dimethylthiazol-2-y1]-2,-diphenyltetrazolium bromide</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor Kappa B</i>
Olf-78	Receptor olfatório 78

OVA	Ovalbumina
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pDCs	<i>Plasmacytoid dendritic cells</i>
PFU	Unidade Formadora de Placa
RNA	Ácido ribonucleico
SFB	Soro fetal bovino
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
T CD8	Célula T CD8
Th17	Célula T <i>helper</i> 17
Th2	Célula T <i>helper</i> 2
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	Célula T regulatória
VSR	Vírus sincicial respiratório

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
1. REVISÃO DE LITERATURA	18
1.1 Bronquiolite Viral Aguda.....	18
1.2 Vírus Sincicial Respiratório (VSR).....	19
1.3 Ácidos Graxos de Cadeia Curta	22
1.4 Ácidos Graxos de Cadeia Curta e Sistema imune.....	24
2. OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo geral.....	27
2.2 Objetivos específicos	27
3. HIPÓTESE	28
4. MÉTODOS	29
4.1 Vírus	29
4.2 Tratamento <i>In vitro</i>	29
4.3 Análise de Bioinformática	30
4.3.1 <i>Genes constitutivos: análise</i>	30
4.3.2 <i>Design de redes PPI e CP-PPI</i>	30
4.3.3 <i>Análise topológica de redes: Centralidades</i>	31
4.4 Ensaio de ciclo celular	31
4.5 Expressão relativa de IL-8 por PCR em tempo real.....	31
4.6 Animais	32
4.7 Modelo de Infecção com VSR	32
4.8 Tratamento com AGCC	33
4.9 Tratamento com Dietas	33
4.10 Número total de células no lavado bronco-alveolar.....	33
4.11 Citometria de Fluxo do LBA	34
4.12 Citometria de Fluxo de Células de Órgãos Linfoides Secundários.....	34
4.13 Detecção de carga viral por PCR em tempo real.....	34
4.14 Quantificação de citocinas no LBA por ELISA	35
4.15 Histopatologia e Imuno-histoquímica	35
4.16 Expressão gênica de IFN-I por PCR em tempo real	36
4.17 Análise estatística	36
5. CONCLUSÕES	37
REFERÊNCIAS	38
ANEXOS	44
ANEXO I – Aprovação CEUA/PUCRS.....	45

ANEXO II – Aprovação CEUA/UNICAMP.....	46
ANEXO III – Artigo Científico Original – Submetido à revista Nature Communications	47

INTRODUÇÃO

O VSR é o principal causador da bronquiolite viral aguda, uma das doenças mais prevalentes em crianças nos dois primeiros anos de vida, gerando um grande impacto em hospitalizações e custos para o sistema de saúde. Recentemente, estudos estimam que a taxa de mortalidade em lactentes prematuros hospitalizados infectados por VSR chega a 5% (1, 2). Até o presente momento não foi desenvolvida uma vacina eficiente contra o vírus que possa prevenir a infecção. Apenas há disponíveis alguns tratamentos profiláticos, como o anticorpo monoclonal humanizado Palivizumab, entretanto de elevado custo. Estratégias de imunoterapias e vacinas para o VSR têm sido estudadas com o objetivo de redução da infecção viral (3, 4). No entanto, pouco se sabe da utilização de uma imunoterapia que vise à diminuição da severidade dos sintomas clínicos e inflamatórios virais, os quais são os principais intensificadores da letalidade da doença. Alternativas naturais, como componentes provenientes da dieta, têm sido utilizadas em pesquisas no tratamento de doenças alérgicas e inflamatórias, com o objetivo de atenuar o quadro da doença.

Os AGCCs são os principais metabólitos resultantes da fermentação de fibras alimentares solúveis e bactérias presentes na microbiota intestinal (5, 6). Os mais abundantemente encontrados são o acetato de sódio, o propionato de sódio e butirato de sódio, respectivamente (7). Estes metabólitos são elementos essenciais na interação entre microbiota e hospedeiro. Tanto os AGCCs quanto as fibras altamente fermentáveis têm se tornado alvo de estudos que investigam seu papel em doenças e processos inflamatórios, uma vez que sua ação regulatória no sistema imune vem sendo descrita na literatura (8-10). Um estudo desenvolvido recentemente demonstrou que uma dieta rica em fibras alimentares modula a microbiota intestinal, aumentando os níveis de AGCCs, o que reduziu a capacidade das CDs de instigar a ativação de células Th2 efectoras no pulmão, diminuindo a inflamação das vias aéreas durante a inflamação de asma induzida por HDM (11).

A bronquiolite causada pelo VSR induz uma resposta altamente inflamatória do tipo Th2(12-14), apresentando um desfecho clínico com alta taxa de mortalidade e custos para a saúde pública. Assim, investigar alternativas de imunoterapia com o uso de componentes obtidos através da dieta se faz necessário, uma vez que

consistem em métodos não dispendiosos e de fácil acessibilidade em ambientes hospitalares. Ainda não se têm dados de estudos que utilizaram este modelo de terapia na infecção por VSR, o que pode remeter à maior completude e enriquecimento para as pesquisas realizadas com foco neste vírus.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Bronquiolite Viral Aguda

A bronquiolite é uma doença que acomete crianças menores de dois anos de idade e é caracterizada pela vasta inflamação e edema das vias aéreas, causando um aumento na produção de muco e necrose das células epiteliais pulmonares, especificamente os bronquíolos (15). A bronquiolite é tipicamente ocasionada por uma infecção viral, sendo o VSR (cepa A ou B) o mais frequente, representando 50- 80% das bronquiolites virais agudas (16). Entretanto, há outros vírus que podem desencadear a doença, mas em menor escala quando comparados ao VSR. São eles rinovírus, parainfluenza vírus (frequência de 5-25%), metapneumovírus, coronavírus, adenovírus (frequência de 5-10%), influenza vírus e enterovírus (frequência de 1-5%) (16).

Cerca de 30% das crianças com bronquiolite apresentam co-infecções de dois vírus, sendo, mais comumente, a combinação de VSR e rinovírus (17). A incidência do pico da infecção ocorre entre o terceiro e sexto mês de idade (17). Os sinais clínicos clássicos começam com sintomas típicos de infecção viral do trato respiratório superior, com congestão nasal, progredindo para o trato respiratório inferior em alguns dias. Quando a infecção atinge o trato inferior, a criança pode apresentar apneia, tosse persistente e taquipneia, o que aumenta a força de respiração, resultando em retrações intercostais e supraclaviculares e uso intenso dos músculos abdominais (18). Através de ausculta pulmonar, quando a bronquiolite já está instaurada, podem ser identificadas crepitações e sibilância (18).

Para causar a doença, o VSR se liga às células epiteliais e inicia a sua replicação, resultando em necrose do tecido epitelial e destruição ciliar (19). Nesse sentido, a destruição celular decorrente da infecção acarreta em uma resposta inflamatória intensa com a proliferação de células polimorfonucleares e linfócitos. A submucosa e outros tecidos pulmonares se tornam edematosos com o aumento da secreção de muco em resposta às citocinas pró-inflamatórias (19). No lúmen do bronquíolo há a formação de tampões constituídos por *debris* celular e muco,

levando a uma obstrução brônquica parcial ou completa, aprisionamento de ar e diferentes graus de colapso lobar, podendo ocasionar o óbito da criança (15).

Crianças com algumas condições pré-existentes, como prematuridade (<29 semanas de gestação), doença pulmonar crônica decorrente da prematuridade, doença congênita cardíaca podem favorecer uma bronquiolite mais severa do que as crianças sem essas condições (20). A bronquiolite severa em bebês recém-nascidos está fortemente associada ao aumento de risco para o desenvolvimento de asma durante a infância tardia, principalmente após uma bronquiolite causada por VSR, além de também aumentar o risco da asma persistir durante a vida adulta (21- 23). Uma característica singular da doença causada pelo VSR é que o hospedeiro pode ser reinfectado com o mesmo patógeno de mesma cepa viral e apresentar os mesmos sintomas (24). Reinfecções com VSR são observadas ao longo da vida, apesar da haver indução de respostas tanto de anticorpos como de células T após uma infecção primária e a ausência de uma alteração antigénica detectável nas glicoproteínas de superfície do vírus (24).

No que tange os cuidados de saúde pública, mundialmente, em 2005, o RSV causou, sozinho, cerca de 66.000 a 199.000 mortes entre crianças menores de cinco anos de idade, com um número desproporcionado dessas mortes ocorrendo em países com recursos limitados (25). Além disso, os custos com hospitalizações de crianças menores de dois anos e com bronquiolite causada por VSR ultrapassam U\$ 1,7 bilhões anuais (26, 27). Fato este que chama atenção da comunidade médica e científica para o desenvolvimento de terapias relacionadas à doença.

1.2 Vírus Sincicial Respiratório (VSR)

O vírus VSR pertence ao gênero *Pneumovirus* e a família *Paramyxoviridae*. Trata-se de um vírus envelopado que apresenta simetria helicoidal e morfologia esférica. O seu genoma é de RNA de fita simples com polaridade negativa que codifica 10 proteínas, incluindo 4 proteínas de nucleocapsídeo N, P, L e M2 que são necessárias na replicação do RNA e as proteínas de envelope transmembrana G, F e SH sendo responsáveis pela fusão da membrana com o vírus e na formação de sincício (28), e as NS1 e NS2 são proteínas não-estruturais. As proteínas F e G induzem a produção de anticorpos neutralizantes frente ao VSR. A fusão da proteína

F inicia a penetração do vírus fusionando a membrana celular e viral que facilita a passagem da disseminação viral mediante a união das células infectadas e não infectadas. A proteína G glicosilada media a união do vírus e da célula hospedeira (28). Existem descritos dois subtipos de VSR: cepa A e cepa B, sendo a primeira a que causa maior gravidade da infecção no hospedeiro (29).

Algumas proteínas do vírus VSR induzem uma resposta imunológica, incluindo as proteínas F, G, NS, M2 e SH. As proteínas não estruturais NS1 e NS2 inibem o interferon através do mecanismo de evasão viral, diminuindo a ativação e a proliferação das células T CD8 (30). Já a estrutura SH não se tem o conhecimento da sua função, mas já se sabe que esta pode inibir apoptose através da redução da sinalização de TNF- α , impedindo que ocorra a formação da resposta imune (31). Estudos anteriores demonstraram que a infecção causada por VSR ativava o NF- κ B, mas se desconhecia qual proteína era responsável por esse mecanismo(32-34). Mais tarde, foi descoberto que a proteína M2 era responsável pela ativação do NF- κ B na resposta inflamatória (35). Já a proteína F do VSR induz a secreção de citocinas inflamatórias, como IL-6, que depende da ligação com o receptor TLR4, pois a proteína F é capaz de estimular a resposta imune (35, 36).

O primeiro alvo do VSR são as células epiteliais ciliadas das vias aéreas, mas CDs e macrófagos também podem ser infectadas pelo vírus (37-39). Durante a infecção o vírus VSR interage com a nucleolina das células do hospedeiro, epitelial ou imune, através da fusão da glicoproteína do envelope viral e se liga especificamente na nucleolina na superfície apical das células. O bloqueio do receptor de nucleolina nas células infectadas foi relacionado com uma redução significativa da infecção por VSR, concluindo que a nucleolina é um receptor funcional do vírus (40).

O ciclo de replicação do vírus se inicia uma vez que o nucleocapsídeo tenha entrado no citoplasma. A partir de então a polimerase transcreve os RNAs virais e replica o genoma gerando um RNA intermediário de sentido positivo, chamado antigenoma, que atua como um molde para a síntese de RNA do genoma adicional (41, 42). Após, os genomas recém-sintetizados (e antigenomas) tornam-se encapsidados com a proteína N à medida que são sintetizados e associam-se com as proteínas da polimerase para formar novos nucleocapsídeos. Os nucleocapsídeos são transportados para a membrana plasmática onde se associam

a outras proteínas estruturais virais, e os vírions são liberados por brotamento (Figura 2).

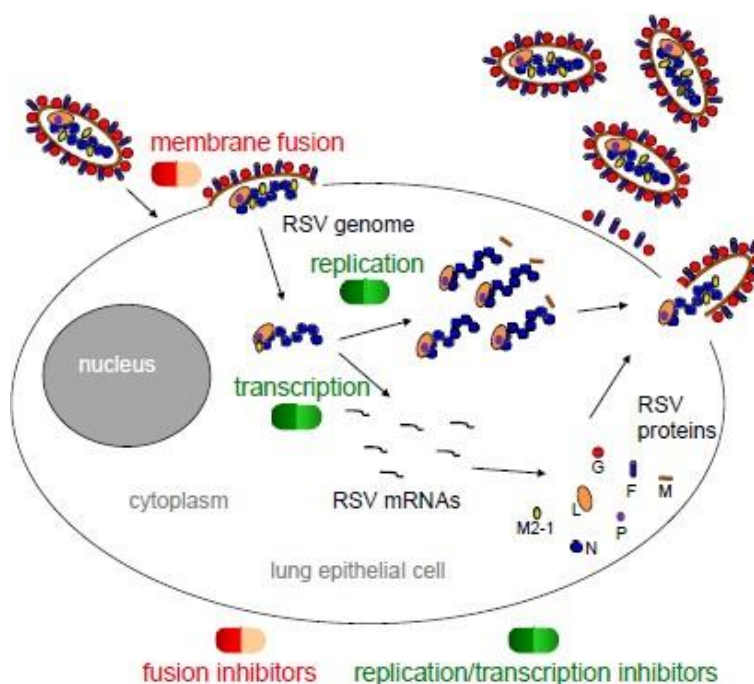


Figura 1. Ciclo de replicação do VSR. Fonte: Fearns, R. & Deval, J. *Antiviral Research*, 2016.

Ainda não foi desenvolvida uma vacina eficiente e eficaz para o VSR. Entretanto, há fármacos terapêuticos também sendo desenvolvidos e testados atualmente. Como demonstrado, cada passo do ciclo de replicação do VSR pode representar um alvo potencial para a terapêutica, os dois pontos mais comuns de intervenção são a fusão de membrana e a síntese de RNA (43). Também há diversas abordagens sendo descritas para bloquear a síntese de RNA viral durante o ciclo de replicação, incluindo o silenciamento de genes por siRNAs (44) e desativar a nucleoproteína responsável por encapsular o RNA (45-47). Poucas das estratégias citadas obtiveram sucesso ou estão em fase de testes clínicos. Portanto tratamentos para diminuir a replicação viral, e conseqüente redução na intensidade da doença, têm recebido grande atenção de pesquisadores da área.

1.3 Ácidos Graxos de Cadeia Curta

Os ácidos graxos de cadeia curta são compostos orgânicos que possuem em sua estrutura de 1 a 6 carbonos em sua cadeia. Entre 90 a 95% dos AGCCs formados são acetato, propionato e butirato, estes com dois, três e quatro carbonos respectivamente. Os 5-10% restantes são representados por isobutirato, valerato, isovalerato e caproato (48). Os AGCCs são produtos provenientes do metabolismo de carboidratos e bactérias presentes na microbiota, tais como lactobacilos, bifidobactéria e proteobactéria (49). Estes carboidratos são as fibras alimentares solúveis, e os principais componentes que produzem os AGCCs a partir da fermentação são os polissacarídeos, oligossacarídeos e amidos resistentes (50). Esses componentes podem ser encontrados em diversos alimentos regularmente presentes na dieta ocidental e oriental, como feijões, banana verde, aveia (amido resistente), maçãs, cenouras, laranjas e amoras (pectina), e cebola, alho-poró, alcachofra, centeio e aspargos (FOS e inulina) (51-53). A fermentação desses carboidratos no ceco produz uma taxa de 400-600 mM de AGCCs/dia (54) e cerca de 70 a 140 mM no cólon proximal (7).

O acetato é o AGCC mais abundante no cólon e compõe mais da metade do total desses substratos detectados nas fezes (5). Existem duas rotas metabólicas já descritas para a produção de acetato pela microbiota (Figura 2). A maioria do acetato é produzida pelas bactérias entéricas como resultado da fermentação das fibras.

O propionato, o segundo mais produzido, possui três vias diferentes utilizadas pelas bactérias para sua formação: a via do succinato, a via do acrilato e a via do propanodiol (55) (Figura 2). A abundância relativa de *Bacteroidetes* no intestino já está sendo relacionado à concentração de propionato encontrados nas fezes, sugerindo que a via do succinato é a rota dominante de metabolização dentro da microbiota intestinal (56).

Em relação ao butirato, existem duas vias conhecidas. A primeira rota é a via da butirato-quinase, que utiliza a fosfatransacetilase e a butirato-quinase para

converter butiril-CoA em butirato (57). A segunda e a mais comumente observada é a via do butiril-CoA: acetato CoA-transferase, que utiliza essa enzima relacionada ao acetato para transformar o butiril-CoA em butirato (57). Após a metabolização, os AGCCs acabam sendo liberados para exercer funções tanto no epitélio intestinal, como no restante do corpo. A maior parte do butirato metabolizado é utilizada como fonte de energia por colonócitos, enquanto que o propionato é utilizado no metabolismo hepático e o acetato, como não é absorvido em um local específico, pode ser encontrado em altas concentrações no sangue (58).

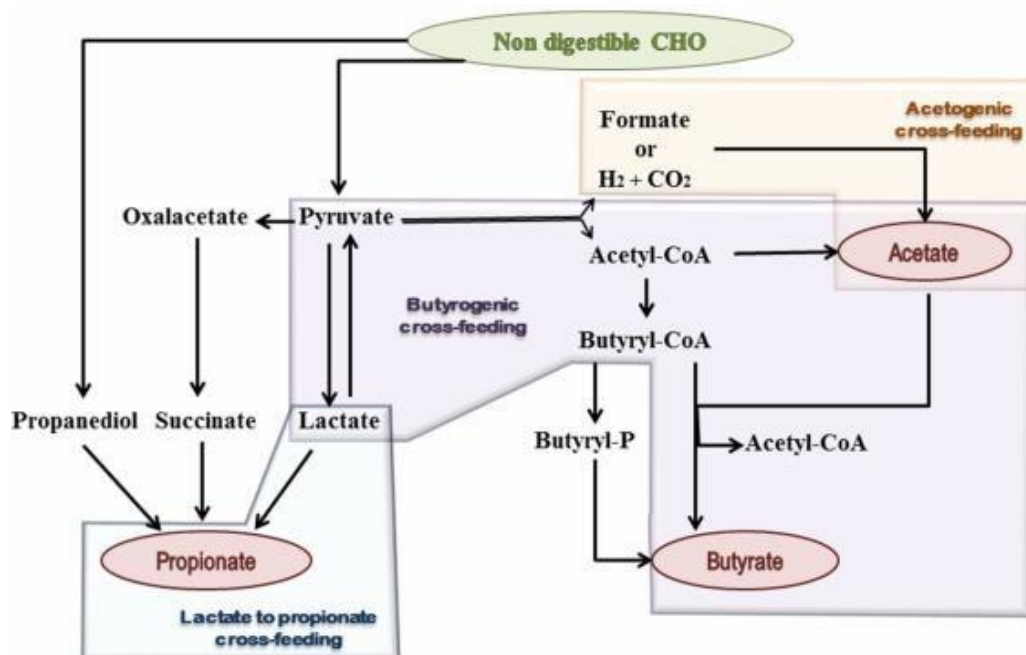


Figura 2. Representação esquemática das rotas metabólicas utilizadas pelas bactérias da microbiota para produção de AGCCs. Fonte: Rios-Covián, D. et al. *Front. Microbiol.* 2016.

A conversão das fibras dietéticas em monossacarídeos depende de diversas reações enzimáticas de microrganismos intestinais específicos, os quais produzem posteriormente os AGCCs (59). Uma grande parte de bactérias entéricas produzem o acetato, como *Akkermansia muciniphila*, *Bacteroides spp.*, *Bifidobacterium spp.* e outras (6). Já o propionato, como tem sua formação dada principalmente pela via do succinato, é produzido por *Bacteroides spp.*, *Phascolarctobacterium succinatutens*, *Dialister spp.*, e *Veillonella spp* (6, 60). O butirato é produzido por *Coprococcus comes* e *Coprococcus eutactus* (6), mas alguns outros microrganismos conseguem produzi-lo utilizando o acetato e o lactato como substrato. São eles *Anaerostipes*

spp. (utilizando o acetato e o lactato), *Coprococcus catus* (utilizando o acetato), *Eubacterium rectale* (utilizando o acetato), *Eubacterium hallii* (utilizando acetato e lactato), *Faecalibacterium prausnitzii* (utilizando o acetato), e *Roseburia spp.* (utilizando o acetato) (61).

Os AGCCs são conhecidos por modificar uma série de processos celulares, incluindo quimiotaxia, expressão gênica, diferenciação, proliferação e apoptose. Estes compostos ativam, pelo menos, quatro diferentes GPCRs. São eles os receptores de ácidos graxos livres (FFAR-2 e -3), também conhecidos como GPR43 e GPR41 respectivamente, o receptor de niacina/butirato GPR109a, também conhecido como HCA2, e o receptor olfatório Olfr-78 (62, 63). Além da ativação desses receptores, os AGCCs possuem a habilidade de modular outras vias intracelulares sem, necessariamente, haver a presença de um receptor. Alguns exemplos dessa modulação são as HDACs, principalmente HDAC1 e HDAC9 (64, 65), aumento na atividade da HAT e estabilização do HIF (66-68).

1.4 Ácidos Graxos de Cadeia Curta e Sistema imune

Baseando-se no fato de que os AGCCs regulam uma série de funções no organismo, atuando no sistema nervoso, endócrino, hematopoiético e trato gastrointestinal, não é surpresa que os mesmos também atue fortemente no sistema imune. Os AGCCs exercem a sua função de regulação no sistema imune principalmente através da ativação de GPCRs, encontrados em quase todos os tipos celulares desse sistema, como células epiteliais, células dendríticas, macrófagos e neutrófilos (69) (Figura 3).

Em locais de mucosa, metabolitos provenientes da microbiota são reconhecidos por receptores de reconhecimento padrão, como os TLRs. Os AGCCs afetam direta ou indiretamente a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-8, IL-1 β e TNF α através de TLRs em células epiteliais de mucosa (70). Em neutrófilos, estudos demonstram que, durante a inflamação, os AGCCs estimulam a migração neutrofílica através da ativação do receptor FFAR2 (71) e modula a produção de espécie reativa de oxigênio e fagocitose dessas células (72). Ainda, estes compostos aumentam a inibição de TNF- α nos neutrófilos, semelhante às células epiteliais (73). Em relação aos macrófagos, o tratamento com os AGCCs

parecem reduzir o perfil pró-inflamatório em macrófagos derivados de precursores de medula óssea estimulados com LPS, diminuindo a produção de NO, IL-6 e IL-12p40 via inibição de HDAC, mas parece não exercer ação sobre a produção de TNF α e MCP-1/CCL2 (74).

Os AGCCs parecem não apenas influenciar na secreção de citocinas, mas também nos processos de interação com as células T. Pesquisas recentes apontam a ação dos ácidos graxos em células dendríticas. Um estudo demonstrou que CDs expostas ao tratamento com butirato induzem a diferenciação de células T naive para células T regs FoxP3+, além de inibir a diferenciação de células T naive para células T produtoras de IFN- γ através da indução da expressão de enzimas imunossupressoras (75). Além disso, dados apontam que o tratamento com butirato também possui a capacidade de afetar a diferenciação moDCs, inibindo a proliferação de células T, através da diminuição da expressão de moléculas co-estimulatórias CD14, CD1a, CD80, CD83 e MHC II (76, 77). O tratamento com butirato em cultura de moDCs e CDs derivadas de precursores de medula óssea demonstrou um aumento na capacidade endocítica, redução na atividade aloestimulatória, além de promover a produção de IL-10 e IL-23 e inibir a produção de IL-12, IL-1 β e IFN- γ (9, 78, 79).

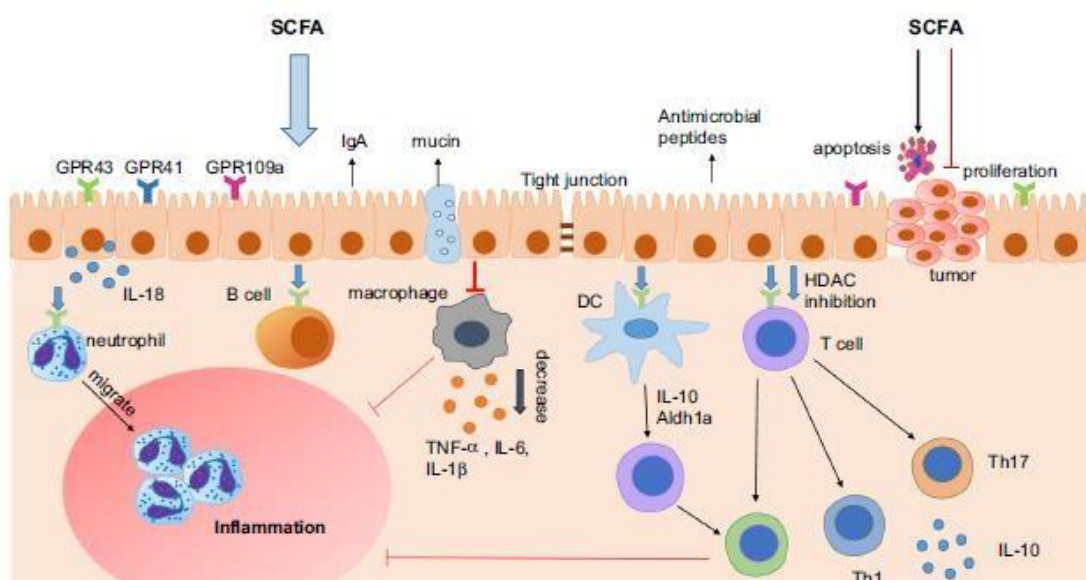


Figura 3. Regulação da imunidade intestinal por AGCCs. Fonte: Sun M, Wu W, Liu Z, Cong Y. *J Gastroenterol.* 2016.

Considerando o fato de que os AGCCs modulam células da imunidade inata, não é uma surpresa o fato de que esses compostos também modulam a ativação e

a resposta efetora de células da imunidade adaptativa. Muitos estudos têm mostrado que os AGCCs, em geral, induzem um perfil tolerogênico em linfócitos T através de sua ação de ativação e diferenciação de DCs e macrófagos, como também efeitos diretamente nos linfócitos. Um estudo demonstrou que tanto o tratamento com AGCCs como com dieta rica em fibras aumentam a expressão de FoxP3 em células T residentes no cólon via GPR43 (9). Outros dados apontam que em animais tratados com AGCCs, principalmente acetato, aumentou a produção de IL-10 em células T, incluindo os fenótipos Th1, Th17 e Treg (79). Entretanto, neste estudo a ação do acetato parece ocorrer dependente de inibição da HDAC e não de GPR43, e essa modulação se dá através da regulação da via de mTOR (79).

Atualmente o tratamento com dieta rica em fibras e/ou tratamento com AGCCs em doenças alérgicas e inflamatórias tem recebido grande atenção, uma vez que esses compostos possuem evidente ação imuno regulatória. As doenças inflamatórias intestinais são o modelo mais utilizado para investigar a ação dos AGCCs. Nestes estudos, todos os tratamentos pareceram diminuir IL-1 β , IL-16, TNF- α , MPO, além de aumentar fatores regulatórios, como IL-10 e células T FoxP3+ no intestino (10, 80-82). Outro modelo alérgico onde estudam o tratamento com esses metabólitos é a asma experimental, induzida por OVA ou OVA associada ao HDM. Durante a inflamação alérgica provocada pela asma o tratamento com AGCCs, em especial o propionato, e a administração da dieta rica em fibras (com maiores níveis circulantes de AGCCs) diminui significativamente a inflamação alérgica no pulmão, leva a uma alteração da hematopoiese que se caracteriza no aumento de precursores de CDs. Essas, por sua vez, apresentam uma habilidade diminuída em promover a diferenciação de células Th2 efectoras no pulmão (11). Além disso, já foi demonstrado que ambos, dieta rica em fibras e tratamento com AGCCs, em camundongas durante a gestação diminuiu a severidade inflamatória de asma na prole (8). Sendo assim, fibras dietéticas fermentáveis e os AGCCs podem modificar o ambiente imunológico no pulmão e intestino e, assim, influenciar na severidade de inflamações alérgicas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do tratamento com AGCCs sobre resposta pela infecção causada pelo VSR.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos do tratamento com AGCCs *In vitro* em células pulmonares A549 e MRC-5 frente à infecção pelo VSR;
- Verificar os efeitos do pré-tratamento com AGCCs na resposta imune durante a infecção pelo VSR *In vivo*;
- Verificar os efeitos do tratamento com AGCCs simultaneamente à infecção pelo VSR *In vivo*;
- Avaliar os efeitos da administração de dieta rica em fibras e dieta pobre em fibras fermentáveis na resposta à infecção pelo VSR *In vivo*.

3. HIPÓTESE

Baseando-se no fato de que os AGCCs exercem um papel importante na regulação do sistema imunológico frente a processos inflamatórios, pontualmente em doenças alérgicas pulmonares como asma, nós hipotetizamos que o tratamento com estes compostos pode atenuar a severidade da bronquiolite causada pelo VSR, modulando a resposta ao vírus.

4. MÉTODOS

4.1 Vírus

Foi utilizado o vírus sincicial respiratório (cepa A2), gentilmente doado pelo Dr. Fernando Polack (*Fundacion Infant*, Argentina). O vírus foi produzido em células HEp-2. A titulação viral foi realizada através da detecção de Unidades Formadoras de Placa (PFU) identificadas pela marcação com anticorpo anti-RSV (Millipore, MA, USA). As alíquotas virais foram armazenadas em freezer -80°C até o momento do uso.

4.2 Tratamento *In vitro*

Células epiteliais alveolares humanas (A549), fibroblastos de pulmão embrionário humano (MRC-5), células de rim de macaco verde africano (VERO) e células humanas epiteliais do tipo 2 (HEp-2) foram cultivadas em meio DMEM com baixa glicose (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil). Acetato de sódio, propionato de sódio e butirato de sódio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foram os AGCCs utilizados para os tratamentos. Para o pré-tratamento com os AGCCs, células A549 e MRC-5 (3×10^3 células/poço) foram cultivadas em placa de cultura de 96 poços e fundo “chato”. Após 24h de completa aderência, as células foram tratadas com os AGCCs em diferentes concentrações por 6h, 12h e 24h em DMEM 10% SFB e, então, foram infectadas. Para a infecção do ensaio de pré-tratamento, o meio foi completamente removido e adicionado novo meio DMEM suplementado com 5% de SFB e, após, as células foram infectadas com 10^4 PFU/mL de VSR por 96h. Para o tratamento e infecção simultâneos, as células foram plaqueadas como descritas acima. As células foram tratadas com os AGCCs e infectadas com 10^4 PFU/mL de VSR ao mesmo tempo por 96h. Após o período de incubação, foi realizado o ensaio de citotoxicidade baseado na redução de 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Molecular Probes™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) por enzimas mitocondriais. Resumidamente, 100 µL de meio foi removido e adicionado 40 µL de MTT a 5mg/mL em cada poço. Após 4h de incubação os cristais de formazan precipitados foram

dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO). Finalmente, a redução de MTT foi lida em leitor de Elisa no comprimento de ondas de 570 nm - 620 nm. A viabilidade celular foi expressa como o percentual do valor de absorbância determinada pelo controle (célula e meio apenas).

4.3 Análise de Bioinformática

4.3.1 Genes constitutivos: análise

Foi aplicada uma análise de contraste e os genes diferencialmente expressos (DEG) foram selecionados utilizando o teste de Rank Products. A técnica se baseia no cálculo de Rank Products (RP) de experimentos de replicados. Nós usamos três amostras (células A549, não tratadas, sob condições de cultura similares ao nosso modelo experimental) da base de dados GEO (acesso GSE17708), Para cada amostra foi calculada a média do sinal entre as mesmas sondas, após foi aplicado aos dados de *microarrays* normalizados utilizando o programa Limma em R/Bioconductor (83). Os parâmetros utilizados para realizar o RP foram: permutação = 1000 e valor de $p \leq 0,01$.

4.3.2 Design de redes PPI e CP-PPI

Algoritmo de Integração de Rede de Associações Múltiplas de Gene (GeneMANIA) juntamente com os dados de DEG foram usados para obter redes de interações proteína-proteína (PPI). No presente trabalho, a associação de dados do GeneMANIA foi baseado nas bases de dados PPI, onde cada interação entre proteínas é comprovada experimentalmente (84). As interações baseadas nos domínios de proteínas conhecidos, vias, perfis de coexpressão e co-localização não foram consideradas para análise, o que poderia aumentar as relações falso-positivas nas redes PPI obtidas. Após, as redes de interação químico-proteína (CP) foram obtidas da rede de PPI (rede GeneMANIA) e de dados interativos para ácidos graxos de cadeia curta (acetato de sódio, propionato de sódio e butirato de sódio) foram coletados usando o programa STITCH 4.0 [<http://stitch.embl.de/>]. Este programa permite a visualização das arestas (conexões) entre diferentes proteínas, compostos químicos e compostos-proteínas, onde cada aresta é classificada de acordo com o grau de confiança entre 0 (confiança mínima) e 1,0 (confiança máxima) (85). Neste estudo, os parâmetros selecionados foram os seguintes: todos os métodos de predição foram habilitados, incluindo mineração de dados; máximo

de 10 interações por nodo; grau de confiança, média (0,400); e uma profundidade de rede igual a 1. Em sequência, os desfechos obtidos através dessas buscas foram analisados com o Cytoscape 3.4.1 (86). Os nodos não conectados não foram incluídos nas redes.

4.3.3 *Análise topológica de redes: Centralidades*

Dois parâmetros principais das centralidades de rede (grau e intermediação) foram aplicados para identificar nodos hub (H) - bottlenecks (B) das redes CP-PPI. Para isso, o conector Cytoscape, CentiScaPe 3.2.1 foi usado (87). O grau de centralidade indica o número total de nodos adjacentes que estão conectados a um nodo exclusivo. Neste trabalho, o grau médio do nodo de uma rede foi definido como a soma de diferentes pontuações de grau de nodo dividido pelo número total de nodos que compõem toda a rede(s) (88). Por outro lado, a intermediação também foi analisada. Esse parâmetro corresponde ao número de vias mais curtas entre dois nodos que passam por um nodo de interesse (87). A média aritmética do parâmetro intermediação foi estimada de forma semelhante à média do grau de centralidade (88).

4.4 **Ensaio de ciclo celular**

Células A549 foram tratadas com 260 μ M de acetato, butirato ou propionato por 24h. Células não tratadas foram usadas como controle. Após incubação as células foram recolhidas e lavadas em PBS 1x. Então, as células foram fixadas com etanol 70% gelado por 45 minutos no gelo. As células foram lavadas duas vezes com PBS 1x e marcadas com 50 μ g/mL de Iodeto de Propídio (BD Biosciences®) por 15 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences®) e analisadas utilizando o programa FlowJo (version 7.5, Tree Star Inc., MA, USA).

4.5 **Expressão relativa de IL-8 por PCR em tempo real**

Células A549 (5×10^4 células/poço) foram pré-tratadas com 260 μ M de butirato por 24h. Após, o meio de cultura foi removido e adicionado DMEM 5% SFB e as células, então, foram infectadas com 10^4 PFU/mL de VSR por 96h. O RNA total foi extraído utilizando o reagente TRIzol (ambion™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) seguindo as instruções do fabricante e o DNA complementar (cDNA) foi

sintetizado utilizando o kit de transcrição reversa GoScrip™ (Promega™, Madison, WI, USA). A PCR em tempo real foi realizada usando 4ng de amostra do cDNA, utilizando iniciadores e sondas específicos da TaqMan (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A expressão relativa de IL-8 foi feita usando o primer humano de IL-8 (Hs00174103_m1 *Cxcl8*) como gene alvo e β -actina humana (Hs00174103_m1 *ACTB*) como gene de controle endógeno. As condições da reação foram seguidas conforme as recomendações descritas no protocolo da GoTaq™ Probe qPCR Master Mix (Promega™, Madison, WI, USA). A PCR foi conduzida usando o equipamento StepOne™ (real-time PCR system; Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). O valor do ciclo limiar (Δ Ct) foi obtido através da subtração do valor do Ct do gene endógeno pelo valor do Ct do gene alvo. A mudança na expressão foi calculada de acordo com a fórmula do $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde o $\Delta\Delta Ct$ é a diferença entre o Δ Ct do gene alvo e o Δ Ct do calibrador (amostra controle não tratada) (89).

4.6 Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c (H-2^d), fêmeas, com 6 a 8 semanas de idade, provenientes do Instituto de Biologia (IB), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) – São Paulo. Os animais foram mantidos no vivário do IB-UNICAMP em condições livres de patógenos específicos, com água e comida *ad libitum*. A manutenção das caixas para trocas de água, ração e limpeza foram realizadas duas vezes por semana. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada de 22-23°C e ciclos de claro-escuro de 12 horas. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os protocolos em projeto aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) UNICAMP, sob o número de aprovação 4022-1.

4.7 Modelo de Infecção com VSR

Os animais foram anestesiados com isoflurano a 5% e infectados por via intranasal com 10^7 PFU/mL de VSR diluído em 10 μ L de solução salina (PBS 1X). Os grupos controle (não infectados) receberam por via intranasal 10 μ L de PBS 1X apenas. Os animais foram pesados diariamente até o dia da eutanásia. A análise dos dados foi realizada no quinto dia pós-infecção.

4.8 Tratamento com AGCC

Os AGCCs utilizados foram acetato de sódio, propionato de sódio e butirato de sódio (Sigma-Aldrich, MO, USA). Os animais foram separados em 5 grupos distintos: grupo controle sem tratamento e infecção; grupo infectado sem tratamento; grupo tratamento com acetato e infectado; grupo tratamento com propionato e infectado; grupo tratamento com butirato e infectado. Para a análise de pré-tratamento com os AGCCs, os grupos tratados receberam os compostos em água de beber na concentração final de 200 mM durante 3 semanas até a infecção. Para a análise de tratamento e infecção simultâneos, os grupos tratados receberam os compostos em água de beber na concentração final de 200 mM a partir do dia 0 de infecção finalizando no quinto dia pós-infecção. A cada troca de água o volume consumido coletivamente era mensurado para identificar a ingestão correta de tratamento.

4.9 Tratamento com Dietas

Os animais foram divididos em 4 grupos distintos: grupo dieta baixa fibra; grupo dieta rica em fibras; grupo dieta baixa fibra infectado; grupo dieta rica em fibras infectado. As dietas utilizadas são provenientes da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (FEA – UNICAMP), onde foram manipuladas de acordo com as quantidades específicas previamente indicadas de cada ingrediente. A dieta baixa em fibras é composta por 10% de celulose (não sofre metabolização pelas bactérias intestinais), e a dieta rica em fibras é composta por 10% de pectina (altamente metabolizada por bactérias intestinais). Os animais foram tratados com as respectivas dietas por 4 semanas prévias e durante a infecção.

4.10 Número total de células no lavado bronco-alveolar

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com ketamina (0,4 mg/g) e xilazina (0,2 mg/g) e submetidos a traqueostomia com agulha de ponta chata. Os pulmões foram lavados duas vezes com 1 mL de meio de cultura RPMI. As células do lavado bronco-alveolar (LBA) foram centrifugadas, o sobrenadante coletado e o *pellet* de células ressuspendido em 1 mL de PBS 1x. O número total de células no LBA foi determinado através do ensaio de exclusão de azul de trypan, utilizando uma câmara de Neubauer (BOECO, HH, Germany).

4.11 Citometria de Fluxo do LBA

Células provenientes do LBA foram incubadas com *Mouse Fc Block* (BD Biosciences®) por 20 minutos. Após, as células foram coradas com anticorpos de superfície anti-CD11c, anti-CD11b, anti-I-Ad/I-Ed (aloantígeno MHC de classe II para a linhagem BALB/c), e anti-CD86 (BD Biosciences®) no escuro durante 30 minutos. As células foram lavadas e suspensas em tampão de citometria e fixadas em formaldeído 10%. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo Gallios (Beckman Coulter®). Os dados foram analisados utilizando o programa *FlowJo* (versão 7.5, Tree Star Inc., MA, USA).

4.12 Citometria de Fluxo de Células de Órgãos Linfoides Secundários

Foram coletados os órgãos linfoides secundários baço e linfonodos inguinais e submandibulares dos animais. Os tecidos foram macerados e centrifugados. Após, as hemácias foram lisadas e, então, as células obtidas foram lavadas com meio RPMI. As células foram incubadas com *Mouse Fc Block* (BD Biosciences®) por 20 minutos. Depois do bloqueio, as células foram coradas com anticorpos de superfície para identificação de diferentes populações celulares. Para ativação de células dendríticas foram utilizados os anticorpos anti-CD11c, anti-I-Ad/I-Ed, anti-CD80 e anti-CD86. Para fenótipo de células T, foram utilizados os anticorpos anti-CD4, anti-CD8, anti-CD62L e anti-CD69. Para verificação de aumento de pDCs e macrófagos, foram utilizados os anticorpos anti-PDCA-1 (eBioscience®), anti-CD11b, anti-F4/80 e anti-I-Ad/I-Ed. Para identificação de liberação de IL-4 por células T CD4, as células foram marcadas com anti-CD4. Após, para marcação intracelular, as células foram fixadas e permeabilizadas com um tampão de permeabilização e marcadas com anticorpo anti-IL4. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo Gallios (Beckman Coulter®). Os dados foram analisados utilizando o programa *FlowJo* (versão 7.5, Tree Star Inc., MA, USA).

4.13 Detecção de carga viral por PCR em tempo real

O RNA total dos pulmões dos animais foi extraído utilizando o reagente TRIzol® (ambion®, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) seguindo as instruções do fabricante. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando o kit de transcrição reversa GoScript® (Promega®, WI, USA). A qualidade do cDNA para

cada amostra foi testada por amplificação de gene normalizador ACTB (β -actina - Mm02619580_g1) utilizando iniciadores e sondas específicos do sistema TaqMan® (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific, MA, USA). As amostras que não amplificaram o gene constitutivo foram excluídas. A PCR em tempo real foi realizada para a amplificação do gene da proteína F do RSV utilizando os primers e sondas específicas: forward-5'-AACAGATGTAAGCAGCTCCGTTATC-3', reverse-5'-GATTTTTATTGGATGCTGTACATTT-3' e sonda 5'-FAM/TGCCATAGCATGACACAATGGCTCCT-TAMRA/-3'. As condições de amplificação foram selecionadas de acordo com Kuypers *et al.* (90), que sugere um ciclo de 50°C durante 2 minutos e um ciclo de 95°C durante 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos e 60°C durante 1 minuto. A reação foi realizada no equipamento StepOne® (Applied Biosystems®). A quantificação da carga viral foi calculada através da conversão dos Cts em cópias virais/mL, utilizando uma curva padrão positiva de VSR na mesma placa.

4.14 Quantificação de citocinas no LBA por ELISA

Os sobrenadantes dos LBAs foram analisados pelo método de ELISA. Foram utilizados kits específicos para cada citocinas. Foram analisadas TNF- α , IL-1 β e IL-10 (R&D Systems®, MN, USA). Resumidamente, após a adição dos anticorpos de captura e posterior incubação *overnight* as amostras e curva-padrão foram adicionadas. Foi adicionado o anticorpo de detecção e após o período de incubação, houve a adição da estreptavidina ligada a peroxidase (HRP). Após foi adicionado o substrato da peroxidase na proporção de 1:1 (solução A e B) e mantido no escuro. Em seguida foi adicionada a solução *stop* de ácido clorídrico a 10M e as amostras foram lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450nm. A quantificação das amostras foi realizada através da correlação linear relativa à curva-padrão.

4.15 Histopatologia e Imuno-histoquímica

Os pulmões dos animais foram perfundidos com formalina 10% em uma coluna de gravidade sob pressão de 20 mmHg por 3 horas. Após, o pulmão esquerdo foi removido, embebido em parafina e emblocado. Os cortes dos blocos foram realizados na espessura de 4 μ m, fixados à lâmina e realizadas as marcações para hematoxilina e eosina (H&E) ou recuperação antigênica e posterior marcação com

anticorpo anti-proteína F (Millipore, MA, USA) para detecção de antígenos relacionados ao vírus.

4.16 Expressão gênica de IFN-I por PCR em tempo real

A extração do RNA e a síntese do cDNA foi realizada de acordo com a descrição no item 5.9 dessa sessão. A PCR em tempo real foi realizada utilizando os iniciadores dos genes alvo *Ifn α 1* (Mm03030145_gH Ifna1) e *Ifn β 1* (Mm00439552_s1 Ifnb1), e como gene controle normalizador, a β -actina (Mm02619580_g1 Actb). O ensaio foi realizado utilizando iniciadores e sondas específicos do sistema TaqMan®. A reação foi realizada no equipamento StepOne® (Applied Biosystems®). Os dados foram analisados através do método comparativo do ciclo limiar (Δ Ct) conforme o item 5.5, utilizando o grupo controle não infectado como referência de diferença na expressão.

4.17 Análise estatística

Para verificar a diferença entre dois grupos em dados paramétricos foi aplicado o teste *t*. Para análise de mais de dois grupos foi aplicado teste ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni como teste *post-hoc* para identificar quais grupos se diferem. Para formulação dos gráficos e análise estatística foi utilizado o programa *GraphPad Prism* (San Diego, CA, EUA). Valores demonstrados nos gráficos são a média \pm erro padrão da média e um nível de significância de $p < 0,05$ foi estabelecido para as análises.

5. CONCLUSÕES

Os resultados demonstrados aqui indicam que os AGCCs possuem a capacidade de proteger contra a infecção pelo VSR. Além disso, o pré-tratamento foi o que mais protegeu quando comparado ao tratamento e infecção simultâneos. Os dados demonstram que o efeito antiviral conferido pelos AGCCs ocorre principalmente nas células pulmonares. O mecanismo associado com a atividade antiviral *In vitro* não é dependente de IL-8 e não está relacionado com alteração no ciclo celular e na proliferação. Uma hipótese possível é que o mecanismo de proteção contra infecção pelo VSR conferido pelos AGCCs esteja associado com a inibição de HDAC.

O acetato foi o composto com ação protetora mais evidente contra o vírus, uma vez que, foi o único a abolir a carga viral e aumentar significativamente a expressão da molécula antiviral IFN-I nos pulmões dos animais. Como este mecanismo protetor não pode ser definido como anti-inflamatório, pois os AGCCs não aumentaram a produção de IL-10 nos pulmões, uma hipótese é que a indução do IFN-I possa estar envolvida na ação antiviral.

Observamos que a dieta rica em fibras também protegeu os animais da infecção pelo VSR em comparação aos que receberam dieta controle. Entretanto, o fato mais surpreendente foi o aumento significativo na expressão de IFN-I nos pulmões dos animais alimentados com dieta rica em fibras e infectados com o VSR. Assim, o papel protetor evidenciado em ambos os tratamentos AGCCs pode ser resultado da ação, principalmente do acetato. Neste sentido, a dieta rica em fibras também pode ter aumentado a produção de AGCCs no intestino, disseminando principalmente o acetato na circulação. O acetato, então, chegaria aos pulmões e exerceria um papel protetivo envolvendo o aumento na produção de IFN-I naquele local.

Por fim, nosso estudo foi o primeiro a mostrar os efeitos dos AGCCs e da dieta rica em fibras sobre a infecção pelo VSR. Por conseguinte, encontramos uma evidente proteção conferida por estes compostos contra o VSR. Desta forma, os resultados encontrados embasam a possibilidade do desenvolvimento de novas terapias contra a bronquiolite viral aguda causada pelo VSR a partir da utilização de agentes provindos da dieta.

REFERÊNCIAS

1. Selwyn BJ. The epidemiology of acute respiratory tract infection in young children: comparison of findings from several developing countries. Coordinated Data Group of BOSTID Researchers. *Reviews of infectious diseases*. 1990;12 Suppl 8:S870-88.
2. Glezen WP, Taber LH, Frank AL, Kasel JA. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. *American journal of diseases of children*. 1986;140(6):543-6.
3. Tregoning JS, Schwarze J. Respiratory viral infections in infants: causes, clinical symptoms, virology, and immunology. *Clinical microbiology reviews*. 2010;23(1):74-98.
4. Bueno SM, Gonzalez PA, Pacheco R, Leiva ED, Cautivo KM, Tobar HE, et al. Host immunity during RSV pathogenesis. *International immunopharmacology*. 2008;8(10):1320-9.
5. Louis P, Scott KP, Duncan SH, Flint HJ. Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine. *Journal of applied microbiology*. 2007;102(5):1197-208.
6. Louis P, Hold GL, Flint HJ. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nature reviews Microbiology*. 2014;12(10):661-72.
7. Wong JM, de Souza R, Kendall CW, Emam A, Jenkins DJ. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *Journal of clinical gastroenterology*. 2006;40(3):235-43.
8. Thorburn AN, McKenzie CI, Shen S, Stanley D, Macia L, Mason LJ, et al. Evidence that asthma is a developmental origin disease influenced by maternal diet and bacterial metabolites. *Nature communications*. 2015;6:7320.
9. Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly YM, et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science*. 2013;341(6145):569-73.
10. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*. 2013;504(7480):446-50.
11. Trompette A, Gollwitzer ES, Yadava K, Sichelstiel AK, Sprenger N, Ngom-Bru C, et al. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nature medicine*. 2014;20(2):159-66.
12. Roman M, Calhoun WJ, Hinton KL, Avendano LF, Simon V, Escobar AM, et al. Respiratory syncytial virus infection in infants is associated with predominant Th-2-like response. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1997;156(1):190-5.
13. McNamara PS, Smyth RL. The pathogenesis of respiratory syncytial virus disease in childhood. *British medical bulletin*. 2002;61:13-28.
14. Durant LR, Makris S, Voorburg CM, Loebbermann J, Johansson C, Openshaw PJ. Regulatory T cells prevent Th2 immune responses and pulmonary eosinophilia during respiratory syncytial virus infection in mice. *Journal of virology*. 2013;87(20):10946-54.
15. Ralston SL, Lieberthal AS, Meissner HC, Alverson BK, Baley JE, Gadomski AM, et al. Clinical practice guideline: the diagnosis, management, and prevention of bronchiolitis. *Pediatrics*. 2014;134(5):e1474-502.

16. Meissner HC. Viral Bronchiolitis in Children. *The New England journal of medicine*. 2016;374(18):1793-4.
17. Mansbach JM, McAdam AJ, Clark S, Hain PD, Flood RG, Acholonu U, et al. Prospective multicenter study of the viral etiology of bronchiolitis in the emergency department. *Academic emergency medicine : official journal of the Society for Academic Emergency Medicine*. 2008;15(2):111-8.
18. Florin TA, Plint AC, Zorc JJ. Viral bronchiolitis. *Lancet*. 2016.
19. Aherne W, Bird T, Court SD, Gardner PS, McQuillin J. Pathological changes in virus infections of the lower respiratory tract in children. *Journal of clinical pathology*. 1970;23(1):7-18.
20. Hall CB. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *The New England journal of medicine*. 2001;344(25):1917-28.
21. Sigurs N, Aljassim F, Kjellman B, Robinson PD, Sigurbergsson F, Bjarnason R, et al. Asthma and allergy patterns over 18 years after severe RSV bronchiolitis in the first year of life. *Thorax*. 2010;65(12):1045-52.
22. Chan JY, Stern DA, Guerra S, Wright AL, Morgan WJ, Martinez FD. Pneumonia in childhood and impaired lung function in adults: a longitudinal study. *Pediatrics*. 2015;135(4):607-16.
23. Caliskan M, Bochkov YA, Kreiner-Moller E, Bonnelykke K, Stein MM, Du G, et al. Rhinovirus wheezing illness and genetic risk of childhood-onset asthma. *The New England journal of medicine*. 2013;368(15):1398-407.
24. Collins PL, Melero JA. Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: still crazy after all these years. *Virus research*. 2011;162(1-2):80-99.
25. Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA, et al. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *The New England journal of medicine*. 2009;360(6):588-98.
26. Hall CB, Weinberg GA, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA, Schultz AF, et al. Respiratory syncytial virus-associated hospitalizations among children less than 24 months of age. *Pediatrics*. 2013;132(2):e341-8.
27. Jain S, Williams DJ, Arnold SR, Ampofo K, Bramley AM, Reed C, et al. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among U.S. children. *The New England journal of medicine*. 2015;372(9):835-45.
28. Langedijk JP, de Groot BL, Berendsen HJ, van Oirschot JT. Structural homology of the central conserved region of the attachment protein G of respiratory syncytial virus with the fourth subdomain of 55-kDa tumor necrosis factor receptor. *Virology*. 1998;243(2):293-302.
29. Cane PA. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. *Reviews in medical virology*. 2001;11(2):103-16.
30. Ramaswamy M, Shi L, Varga SM, Barik S, Behlke MA, Look DC. Respiratory syncytial virus nonstructural protein 2 specifically inhibits type I interferon signal transduction. *Virology*. 2006;344(2):328-39.
31. Fuentes S, Tran KC, Luthra P, Teng MN, He B. Function of the respiratory syncytial virus small hydrophobic protein. *Journal of virology*. 2007;81(15):8361-6.
32. Bitko V, Velazquez A, Yang L, Yang YC, Barik S. Transcriptional induction of multiple cytokines by human respiratory syncytial virus requires activation of NF- κ B and is inhibited by sodium salicylate and aspirin. *Virology*. 1997;232(2):369- 78.
33. Garofalo R, Sabry M, Jamaluddin M, Yu RK, Casola A, Ogra PL, et al. Transcriptional activation of the interleukin-8 gene by respiratory syncytial virus infection in alveolar epithelial cells: nuclear translocation of the RelA transcription

factor as a mechanism producing airway mucosal inflammation. *Journal of virology*. 1996;70(12):8773-81.

34. Reimers K, Buchholz K, Werchau H. Respiratory syncytial virus M2-1 protein induces the activation of nuclear factor kappa B. *Virology*. 2005;331(2):260-8.

35. Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, et al. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nature immunology*. 2000;1(5):398-401.

36. Funchal GA, Jaeger N, Czepielewski RS, Machado MS, Muraro SP, Stein RT, et al. Respiratory syncytial virus fusion protein promotes TLR-4-dependent neutrophil extracellular trap formation by human neutrophils. *PloS one*. 2015;10(4):e0124082.

37. de Graaff PM, de Jong EC, van Capel TM, van Dijk ME, Roholl PJ, Boes J, et al. Respiratory syncytial virus infection of monocyte-derived dendritic cells decreases their capacity to activate CD4 T cells. *Journal of immunology*. 2005;175(9):5904-11.

38. Guerrero-Plata A, Casola A, Suarez G, Yu X, Spetch L, Peeples ME, et al. Differential response of dendritic cells to human metapneumovirus and respiratory syncytial virus. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2006;34(3):320-9.

39. Johnson TR, Johnson CN, Corbett KS, Edwards GC, Graham BS. Primary human mDC1, mDC2, and pDC dendritic cells are differentially infected and activated by respiratory syncytial virus. *PloS one*. 2011;6(1):e16458.

40. Tayyari F, Marchant D, Moraes TJ, Duan W, Mastrangelo P, Hegele RG. Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus. *Nature medicine*. 2011;17(9):1132-5.

41. Collins PL, Wertz GW. cDNA cloning and transcriptional mapping of nine polyadenylated RNAs encoded by the genome of human respiratory syncytial virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1983;80(11):3208-12.

42. Collins PL, Huang YT, Wertz GW. Identification of a tenth mRNA of respiratory syncytial virus and assignment of polypeptides to the 10 viral genes. *Journal of virology*. 1984;49(2):572-8.

43. Roymans D, Koul A. Respiratory syncytial virus: a prioritized or neglected target? *Future medicinal chemistry*. 2010;2(10):1523-7.

44. DeVincenzo JP. The promise, pitfalls and progress of RNA-interference-based antiviral therapy for respiratory viruses. *Antiviral therapy*. 2012;17(1 Pt B):213-25.

45. Challa S, Scott AD, Yuzhakov O, Zhou Y, Tiong-Yip CL, Gao N, et al. Mechanism of action for respiratory syncytial virus inhibitor RSV604. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(2):1080-7.

46. Chapman J, Abbott E, Alber DG, Baxter RC, Bithell SK, Henderson EA, et al. RSV604, a novel inhibitor of respiratory syncytial virus replication. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(9):3346-53.

47. Fearn R, Deval J. New antiviral approaches for respiratory syncytial virus and other mononegaviruses: Inhibiting the RNA polymerase. *Antiviral research*. 2016;134:63-76.

48. Ambroze WL, Jr., Pemberton JH, Phillips SF, Bell AM, Haddad AC. Fecal short-chain fatty acid concentrations and effect on ileal pouch function. *Diseases of the colon and rectum*. 1993;36(3):235-9.

49. Flint HJ, Duncan SH, Scott KP, Louis P. Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2015;74(1):13-22.

50. Flint HJ, Bayer EA, Rincon MT, Lamed R, White BA. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nature reviews Microbiology*. 2008;6(2):121-31.
51. Rios-Covian D, Ruas-Madiedo P, Margolles A, Gueimonde M, de Los Reyes-Gavilan CG, Salazar N. Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. *Frontiers in microbiology*. 2016;7:185.
52. Topping DL, Clifton PM. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological reviews*. 2001;81(3):1031-64.
53. Rossi M, Corradini C, Amaretti A, Nicolini M, Pompei A, Zanoni S, et al. Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. *Applied and environmental microbiology*. 2005;71(10):6150-8.
54. Bergman EN. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological reviews*. 1990;70(2):567-90.
55. Reichardt N, Duncan SH, Young P, Belenguer A, McWilliam Leitch C, Scott KP, et al. Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. *The ISME journal*. 2014;8(6):1323-35.
56. Salonen A, Lahti L, Salojarvi J, Holtrop G, Korpela K, Duncan SH, et al. Impact of diet and individual variation on intestinal microbiota composition and fermentation products in obese men. *The ISME journal*. 2014;8(11):2218-30.
57. Louis P, Duncan SH, McCrae SI, Millar J, Jackson MS, Flint HJ. Restricted distribution of the butyrate kinase pathway among butyrate-producing bacteria from the human colon. *Journal of bacteriology*. 2004;186(7):2099-106.
58. den Besten G, van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud DJ, Bakker BM. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of lipid research*. 2013;54(9):2325-40.
59. Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Backhed F. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell*. 2016;165(6):1332-45.
60. Scott KP, Martin JC, Campbell G, Mayer CD, Flint HJ. Whole-genome transcription profiling reveals genes up-regulated by growth on fucose in the human gut bacterium "Roseburia inulinivorans". *Journal of bacteriology*. 2006;188(12):4340-9.
61. Duncan SH, Barcenilla A, Stewart CS, Pryde SE, Flint HJ. Acetate utilization and butyryl coenzyme A (CoA):acetate-CoA transferase in butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *Applied and environmental microbiology*. 2002;68(10):5186-90.
62. Pluznick J. A novel SCFA receptor, the microbiota, and blood pressure regulation. *Gut microbes*. 2014;5(2):202-7.
63. Davie JR. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *The Journal of nutrition*. 2003;133(7 Suppl):2485S-93S.
64. Sekhavat A, Sun JM, Davie JR. Competitive inhibition of histone deacetylase activity by trichostatin A and butyrate. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*. 2007;85(6):751-8.
65. Thangaraju M, Cresci GA, Liu K, Ananth S, Gnanaprakasam JP, Browning DD, et al. GPR109A is a G-protein-coupled receptor for the bacterial fermentation product butyrate and functions as a tumor suppressor in colon. *Cancer research*. 2009;69(7):2826-32.

66. Vinolo MA, Rodrigues HG, Nachbar RT, Curi R. Regulation of inflammation by short chain fatty acids. *Nutrients*. 2011;3(10):858-76.
67. Vinolo MA, Hirabara SM, Curi R. G-protein-coupled receptors as fat sensors. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2012;15(2):112-6.
68. Kelly CJ, Zheng L, Campbell EL, Saeedi B, Scholz CC, Bayless AJ, et al. Crosstalk between Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids and Intestinal Epithelial HIF Augments Tissue Barrier Function. *Cell host & microbe*. 2015;17(5):662-71.
69. Brown AJ, Goldsworthy SM, Barnes AA, Eilert MM, Tcheang L, Daniels D, et al. The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(13):11312-9.
70. Lin MY, de Zoete MR, van Putten JP, Strijbis K. Redirection of Epithelial Immune Responses by Short-Chain Fatty Acids through Inhibition of Histone Deacetylases. *Frontiers in immunology*. 2015;6:554.
71. Vinolo MA, Rodrigues HG, Hatanaka E, Hebeda CB, Farsky SH, Curi R. Short-chain fatty acids stimulate the migration of neutrophils to inflammatory sites. *Clinical science*. 2009;117(9):331-8.
72. Vinolo MA, Hatanaka E, Lambertucci RH, Newsholme P, Curi R. Effects of short chain fatty acids on effector mechanisms of neutrophils. *Cell biochemistry and function*. 2009;27(1):48-55.
73. Vinolo MA, Rodrigues HG, Hatanaka E, Sato FT, Sampaio SC, Curi R. Suppressive effect of short-chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2011;22(9):849-55.
74. Chang PV, Hao L, Offermanns S, Medzhitov R. The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(6):2247-52.
75. Gurav A, Sivaprakasam S, Bhutia YD, Boettger T, Singh N, Ganapathy V. Slc5a8, a Na⁺-coupled high-affinity transporter for short-chain fatty acids, is a conditional tumour suppressor in colon that protects against colitis and colon cancer under low-fibre dietary conditions. *The Biochemical journal*. 2015;469(2):267-78.
76. Nascimento CR, Freire-de-Lima CG, da Silva de Oliveira A, Rumjanek FD, Rumjanek VM. The short chain fatty acid sodium butyrate regulates the induction of CD1a in developing dendritic cells. *Immunobiology*. 2011;216(3):275-84.
77. Liu L, Li L, Min J, Wang J, Wu H, Zeng Y, et al. Butyrate interferes with the differentiation and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Cellular immunology*. 2012;277(1-2):66-73.
78. Berndt BE, Zhang M, Owyang SY, Cole TS, Wang TW, Luther J, et al. Butyrate increases IL-23 production by stimulated dendritic cells. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2012;303(12):G1384-92.
79. Park J, Kim M, Kang SG, Jannasch AH, Cooper B, Patterson J, et al. Short-chain fatty acids induce both effector and regulatory T cells by suppression of histone deacetylases and regulation of the mTOR-S6K pathway. *Mucosal immunology*. 2015;8(1):80-93.
80. Tong LC, Wang Y, Wang ZB, Liu WY, Sun S, Li L, et al. Propionate Ameliorates Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis by Improving Intestinal Barrier Function and Reducing Inflammation and Oxidative Stress. *Frontiers in pharmacology*. 2016;7:253.

81. Sun M, Wu W, Liu Z, Cong Y. Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases. *Journal of gastroenterology*. 2016.
82. Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikiy S, van der Veeken J, deRoos P, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*. 2013;504(7480):451-5.
83. Smyth GK, Michaud J, Scott HS. Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics*. 2005;21(9):2067-75.
84. Zuberi K, Franz M, Rodriguez H, Montojo J, Lopes CT, Bader GD, et al. GeneMANIA prediction server 2013 update. *Nucleic acids research*. 2013;41(Web Server issue):W115-22.
85. Kuhn M, Szklarczyk D, Pletscher-Frankild S, Blicher TH, von Mering C, Jensen LJ, et al. STITCH 4: integration of protein-chemical interactions with user data. *Nucleic acids research*. 2014;42(Database issue):D401-7.
86. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research*. 2003;13(11):2498-504.
87. Scardoni G, Petterlini M, Laudanna C. Analyzing biological network parameters with CentiScaPe. *Bioinformatics*. 2009;25(21):2857-9.
88. Vargas JE, Puga R, de Faria Poloni J, Saraiva Macedo Timmers LF, Porto BN, Norberto de Souza O, et al. A network flow approach to predict protein targets and flavonoid backbones to treat respiratory syncytial virus infection. *BioMed research international*. 2015;2015:301635.
89. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols*. 2008;3(6):1101-8.
90. Kuypers J, Wright N, Morrow R. Evaluation of quantitative and type-specific real-time RT-PCR assays for detection of respiratory syncytial virus in respiratory specimens from children. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2004;31(2):123-9.

ANEXOS

ANEXO I – Aprovação CEUA/PUCRS



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 44/2015 - CEUA

Porto Alegre, 09 de julho de 2015.

Prezado Sr(a). Pesquisador(a),


A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 15/00453, intitulado “**Avaliação da modulação das células dendríticas por ácidos graxos de cadeia curta durante a infecção pelo vírus sincicial respiratório (VSR)**”.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está **autorizada** a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Nº de Animais	Espécie	Duração do Projeto
36	Mus musculus	06/2015 – 12/2017

Atenciosamente,


Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber
Coordenador da CEUA/PUCRS

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Ana Paula Duarte de Souza

IPB

Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central

Av. Ipiranga, 6681 – P. 99 – Portal Tecnopuc – sala 1512

CEP: 90619-900 – Porto Alegre/RS

Fone: (51) 3353-6365

E-mail: ceua@pucrs.br

ANEXO II – Aprovação CEUA/UNICAMP




CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS E RESPOSTA DO TIPO TH2 POR ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA DURANTE A INFECÇÃO PELO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO (VSR), registrada com o nº 4022-1(A), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Marco Aurélio Ramirez Vinolo / Aline Vieira / Krist Helen Antunes Fernandes, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em 23 de maio de 2016.

Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino	<input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/06/2016-30/10/2016	
Vigência da autorização para manipulação animal:	01/06/2016-30/10/2016	
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / Balb/c	
No. de animais:	98	
Peso / Idade:	02 meses / 25g	
Sexo:	fêmeas	
Origem:	CEMIB/UNICAMP	

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

Campinas, 24 de maio de 2016.



Prof. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

1 **ANEXO III – Artigo Científico Original – Submetido à revista Nature Communications**

2
3 Article

4
5 **Microbiota-derived acetate protects against respiratory syncytial virus infection through a type**
6 **1 interferon-dependent mechanism.**

7
8 Krist Helen Antunes¹, José Luís Fachi², Rosemeire de Paula², Emanuelle Fraga da Silva¹, José
9 Eduardo Vargas³, Renato Puga⁴, Fabiana Quoos Mayer⁵, Fábio Maito⁶, Carlos R. Zárata-Bladés⁷,
10 Nadim J. Ajami⁸, Marcella Ramos Sant'Ana⁹, Thamiris Candreva¹⁰, Hosana Gomes Rodrigues¹⁰,
11 Marcio Schmiele¹¹, Maria Teresa Pedrosa Silva Clerici¹², José Luiz Proença-Modena¹³, Angélica
12 Thomas Vieira¹⁴, Charles R. Mackay¹⁵, Daniel Mansur¹⁶, Mauricio T. Caballero¹⁷, Jacqui Marzec¹⁸,
13 Jianying Li¹⁸, Xuting Wang¹⁸, Douglas Bell¹⁸, Fernando P. Polack^{17,19}, Steven R. Kleeberger¹⁸, Renato
14 T. Stein²⁰, Marco Aurélio Ramirez Vinolo^{2*} and Ana Paula Duarte de Souza^{1*}.

15
16 1 Laboratory of Clinical and Experimental Immunology, Healthy Science School- Pontifical Catholic
17 University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

18 2 Laboratory of Immunoinflammation, Department of Genetics, Evolution, Microbiology and
19 Immunology - Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil.

20 3 Biological Science Institute (ICB), Passo Fundo University

21 4 Clinical Research Center, Hospital Israelita Albert Einstein HIAE, São Paulo, Brazil.

22 5 Molecular Biology Laboratory, Veterinary Research Institute Desidério Finamor, Agricultural
23 Diagnosis and Research Department, Secretariat of Agriculture, Livestock and Irrigation, Eldorado do
24 Sul, RS, Brazil

25 6 Laboratory of Pathology, Healthy Science School, Pontifical Catholic University of Rio Grande do
26 Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

27 7 Laboratory of Immunoregulation, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology,
28 Federal University of Santa Catarina, UFSC, Florianopolis, SC, Brazil

29 8 Alkek Center for Metagenomics and Microbiome Research, Department of Molecular Virology and
30 Microbiology, Baylor College of Medicine, Houston, TX 77030, United States

31 9 Laboratory of Nutritional Genomics, School of Applied Sciences, University of Campinas, Limeira,
32 São Paulo, Brazil

33 10 Laboratory of Nutrients and Tissue Repair, School of Applied Sciences, University of Campinas,
34 Limeira, São Paulo, Brazil

35 11 Institute of Science and Technology, Federal University of Jequitinhonha and Mucuri Valleys
36 (UFVJM)

37 12 Department of Food Technology, School of Food Engineering, University of Campinas (UNICAMP)
38 – Cidade Universitária Zeferino Vaz, Monteiro Lobato, 80, Campinas, São Paulo, Brazil

- 39 13 Emerging viruses study Laboratory, Department of Genetics, Evolution, Microbiology and
40 Immunology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, Brazil
41 14 Department of Biochemistry and Immunology, Federal University of Minas Gerais,
42 15 Biodiscovery Research Institute, Monash University, Clayton, Australia
43 16 Laboratory of Immunobiology, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Centro
44 de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, Brazil
45 17 Fundación INFANT uenos Aires Argentina
46 18 National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS), NIH, Research Triangle, North
47 Carolina, USA
48 19 Vanderbilt University, EUA
49 20 Department of Pediatrics, São Lucas Hospital PUCRS, Rio Grande do Sul, Brazil

50

51

52 Corresponding authors (*These authors have contributed equally to the study):

53 *Ana Paula Duarte de Souza - Address: Av. Ipiranga, 6690, 2nd floor, Sala 31, Hospital São Lucas da
54 PUCRS, Porto Alegre, RS. 90610-000, Brazil. Phone number: (+55) 51 33203000 ext. 3403, e-mail:
55 ana.duarte@pucrs.br

56

57 *Marco Aurélio Ramirez Vinolo - Address: Rua Monteiro Lobato, 255, Institute of Biology, University of
58 Campinas, Campinas, São Paulo, 13083-862, Brazil. Phone number: (+55) 19 35216270, email:
59 mvinolo@unicamp.br

60

61

62

63 **Word count (introduction, methods, results and discussion): 4987**

64

65

66 Abstract

67 Severe respiratory syncytial virus (RSV) infection is a major cause of morbidity and mortality in infants
68 under 2 years of age. Here we described that high-fiber diet protected mice from RSV infection. This
69 effect was dependent of microbiota and its production of acetate. Acetate treatment decreased viral
70 loads and pulmonary inflammation in mice infected with RSV, inducing type 1 interferon (IFN-1)
71 production and interferon-stimulated genes in the lung and this protective effect was lost in the
72 absence of IFN-1 receptor (*Ifnar*^{-/-} mice). Acetate also presented antiviral activity *in vitro* in pulmonary
73 epithelial cell lines mediated by IFNAR. In children with RSV infection, the *IFNAR1* SNP rs2257167 C
74 allele was protective for severe disease. The effect of acetate against RSV infection was abolished in
75 *Gpr43*^{-/-} mice. Our findings reveal a new antiviral effect of acetate involving the IFN-1 production in the
76 lung and engagement of GPR43 and IFNAR receptor.

77 **Abstract word count:** 149

78

79

80

81 Key words

82 Respiratory syncytial virus; short-chain fatty acids; dietary fiber; respiratory infection;

83

84

85 Respiratory syncytial virus (RSV) is a seasonal pathogen responsible for most cases of severe viral
86 bronchiolitis under two years of age (1), and has been estimated to cause up to 118,000 deaths
87 among children worldwide a year (2). In addition, there is evidence suggesting that severe RSV
88 infection in childhood may be in line with recurrent wheezing or even asthma (3, 4). Despite inducing
89 both antibody and T-cell responses following a primary infection, RSV reinfections are observed, even
90 in the absence of detectable antigenic change in virus surface glycoproteins (5). RSV has developed
91 several strategies to evade host immunity, including the modulation of the antiviral type 1 interferon
92 pathway, which is inhibited by RSV NS-1 and NS-2 proteins (6, 7). The development of novel, safe,
93 low-cost therapies to reduce the burden of RSV early in life is highly desirable.

94 Dietary habits of pregnant women have the potential to modify the severity of RSV infection in children
95 (10). Carbohydrate-rich diets are associated with severe outcomes of RSV infection; in contrast, the
96 intake of fruits and vegetables (important sources of dietary fibers) seems to confer maternal
97 protection (8). Indeed, breastfeeding (milk is rich in oligosaccharides) or infant formulas rich in soluble
98 fibers may likely have some role in protective immunity against viruses and prevent respiratory
99 infections (9). A protective effect of dietary fibers against severe RSV infection is also supported by a
100 few experimental studies; mice that received a diet containing oligosaccharides developed a Th1
101 protective immune response against RSV (10). Short-chain fatty acids (SCFAs), specifically acetate,
102 propionate, and butyrate are substrates generated through the metabolism of soluble fibers by
103 components of the intestinal microbiota, such as lactobacilli, bifidobacteria and proteobacteria (11,
104 12). These immune-modulatory metabolites are now a well-recognized link between the gut microbiota
105 and host immune cells. SCFAs produce both local and systemic effects; they modulate the activation
106 and function of immune cells (13-16) and have been shown to promote gut homeostasis and oral
107 tolerance (17-20). SCFAs have been shown to have a regulatory role in the outcome of allergic and
108 inflammatory diseases and more recently, in experimental models of respiratory infection (14, 16, 21-
109 23).

110 In the present study we investigated the mechanisms associated with the protective role of a high
111 soluble fiber diet leading to SCFA production during RSV infection. The findings indicate a novel
112 antiviral role for microbiota-derived acetate, on RSV infection, via a mechanism that involves induction
113 of type-1 IFN production.

114

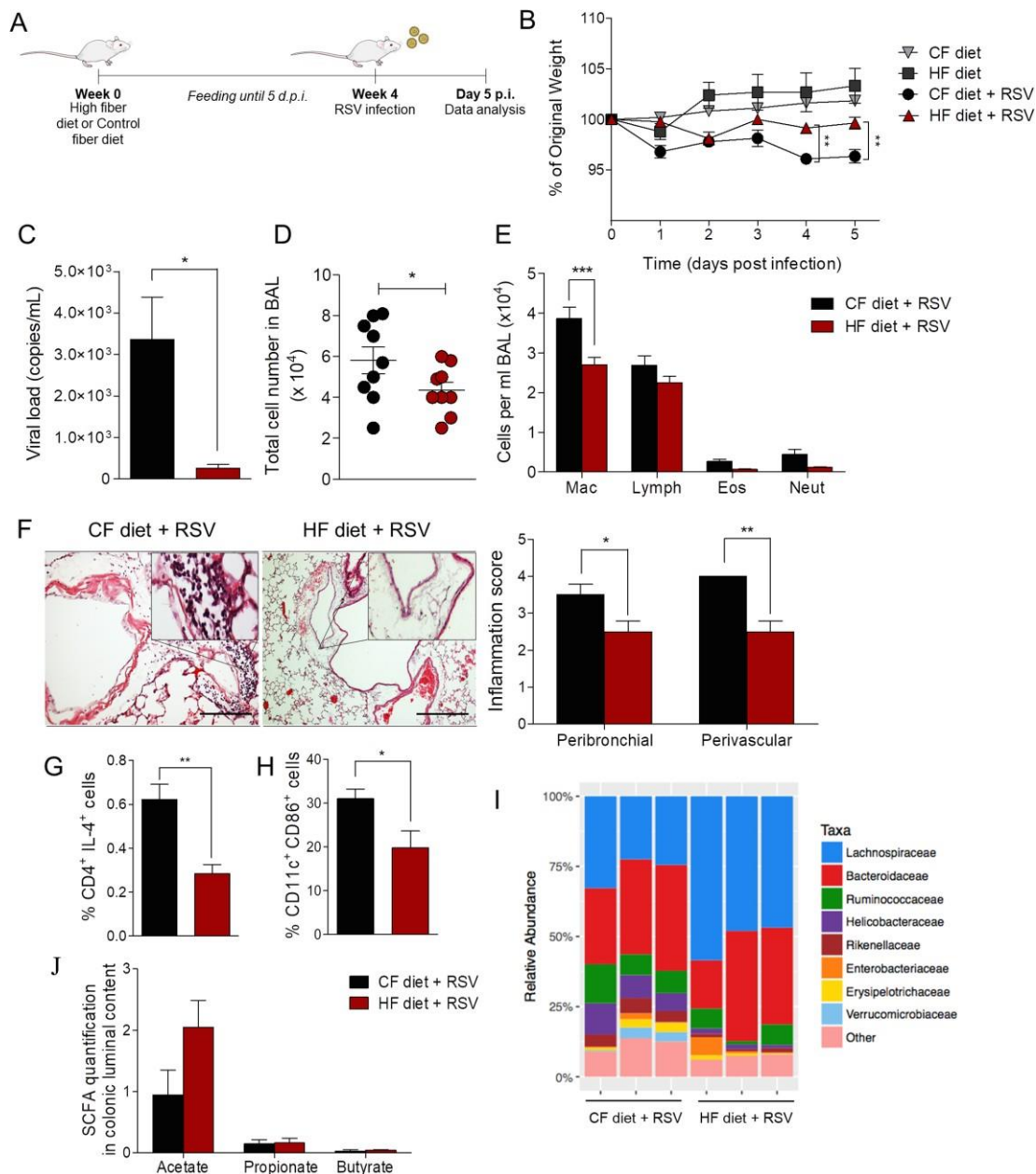
115

116 **RESULTS**

117 **HF diet protects against RSV disease by reducing viral load**

118 Mice were fed with a control diet (CF) (with cellulose (AIN-93M, American Society for Nutrition, USA)),
119 or a high-fiber diet (HF), in which, in addition to cellulose, had pectin from citrus, for 4 weeks and then
120 infected with RSV intranasally (Fig 1, A). HF diet protected RSV-induced weight loss (Fig 1, B) and
121 reduced lung viral load (Fig 1, C). There was also significant reduction in the total cell numbers in the
122 bronchoalveolar lavage (BAL) (Fig 1, D), attributed to a reduction of macrophages (Fig 1, E). Mice fed
123 with HF diet presented a reduction on of lung histological inflammatory score (Fig 1, F); and a

124 reduction of IL-4-producing CD4 T cells and CD11c⁺CD86⁺ cells (Fig 1, *G and H*) in the lymph nodes.
 125 These findings demonstrate an inhibition of RSV-induced disease by the HF diet intervention. HF diet
 126 had an effect on the composition of the gut microbiota in RSV-infected mice (Supplementary Fig 1, *A*).
 127 Although, there was no statistical difference at the phylum level (Supplementary Fig 1, *B*), we
 128 observed an increase in the relative abundance of Lachnospiraceae spp. (phylum firmicutes, class
 129 clostridia) (Fig 1, *I and* Supplementary Table 1). The Lachnospiraceae family has been associated
 130 with SCFA production (25). Indeed, we found an increase in acetate concentrations in mice fed HF
 131 (Fig 1, *J*). Acetate concentrations correlated negatively with viral loads in the lung (Supplementary Fig
 132 1, *C*).



133

134

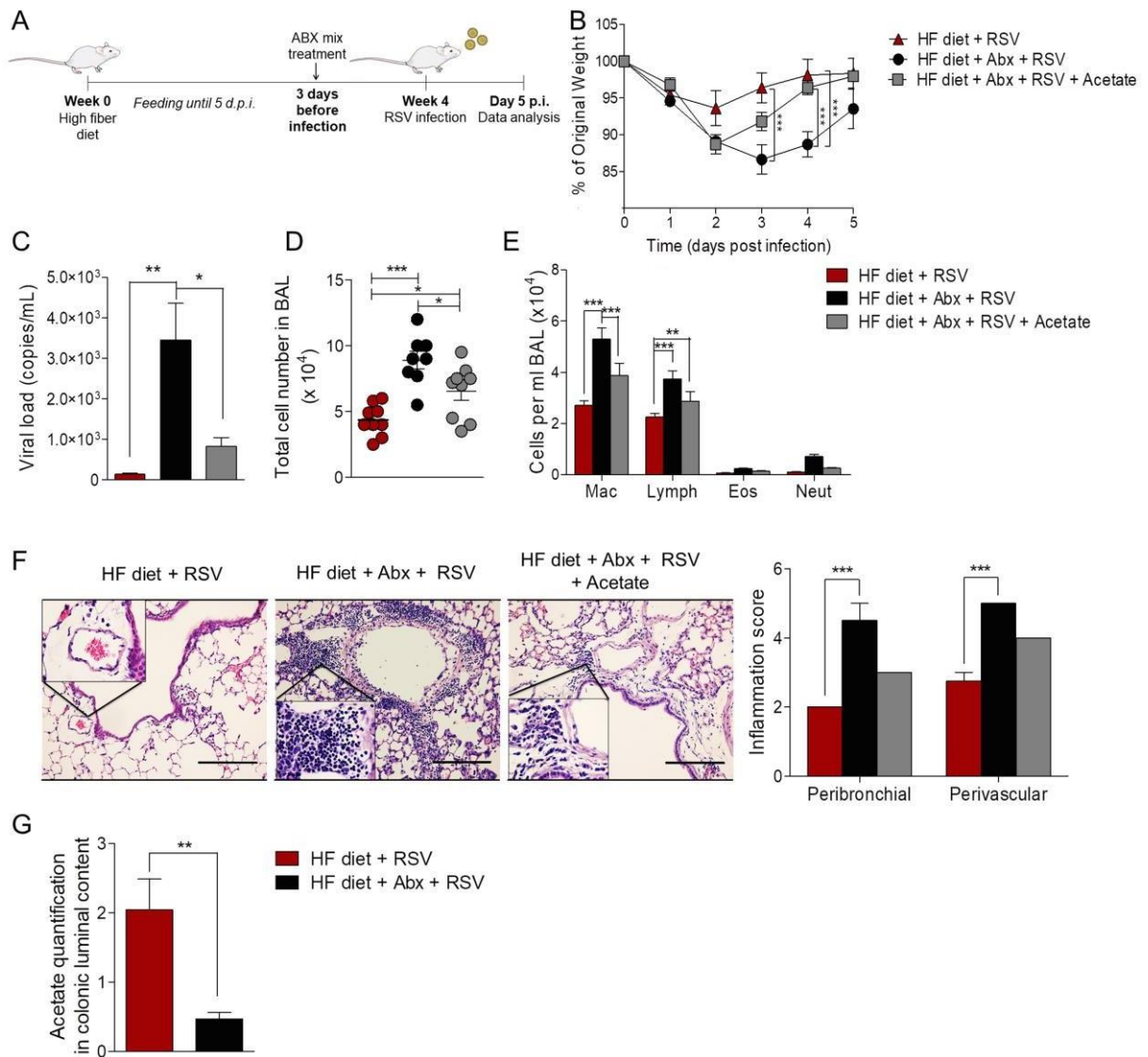
135

136 **Fig 1. High-fiber diet protects mice against RSV induced disease.** A, BALB/c mice were fed with
137 control fiber (CF) or high-fiber (HF) for four weeks before and during RSV infection. Analyses were
138 performed on day 5 post infection. B, Percentage of weight loss post infection relative to initial body
139 weight (day 0). C, RSV viral load detected in lung tissue by real-time PCR. D, Total cell number in
140 Bronchoalveolar lavage (BAL). E, Differential cell number in BAL. F, Hematoxylin and eosin (H&E)-
141 stained lung tissue images and its respective inflammation score. Scale bars in 100 μ m. G
142 Percentage of CD4⁺IL-4⁺ T cells on the lymph nodes. H, Percentage of CD11c⁺CD86⁺ cells on the
143 lymph nodes. I, Analysis of the fecal microbiota composition from mice fed with CF and HF diets
144 (infected with RSV) at the family level (relative abundance). J, SCFA quantification in colonic luminal
145 content (mg/g). Data are representative of 2 independent experiments (n= 4-6 mice per group). All
146 data are expressed as mean \pm SEM and the groups, on B and I, were compared using two-way
147 ANOVA followed by Bonferroni post hoc test and on the other Figs Student's t test was used. * p <
148 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

149

150 **Microbiota and its acetate metabolite are essential in the HF diet protection against RSV** 151 **infection**

152 We next explored whether microbiota and the acetate were involved in protection against RSV
153 infection. HF diet fed-mice were given an antibiotic cocktail in drinking water 3 days before RSV
154 inoculation (Fig 2, A); disruption of the gut microbiota by antibiotic treatment was confirmed by a
155 significant decrease in bacterial load in feces (Supplementary Fig 1, D). The protection against weight
156 loss mediated by the HF diet was abolished when mice were treated with antibiotics (Fig 2, B).
157 Similarly, the reduction in lung viral load was not observed when mice were treated with antibiotics
158 (Fig 2, C) and an increase in the total number of cells in BAL was observed (Fig 2, D), associated with
159 macrophages and lymphocytes (Fig 2, E). Also, antibiotic treatment increased the inflammatory cells
160 infiltration of the lung (Fig 2, F), reducing acetate concentrations in the colonic luminal content (Fig 2,
161 G). Thus, we hypothesized that acetate might be involved in the virus protection exerted by HF diet.
162 HF-fed RSV-infected mice with microbiota depleted that received acetate regained the protection
163 against weight loss caused by the infection (Fig 2, B) and recovered the phenotype previously
164 observed (e.g. reduction in lung viral load (Fig 2, C) and inflammatory cells infiltration of the lung (Fig
165 2, F)). These data support that HF diet protection against RSV infection is dependent of a preserved
166 intestinal microbiota and that acetate is a key mediator of these effects.
167



168

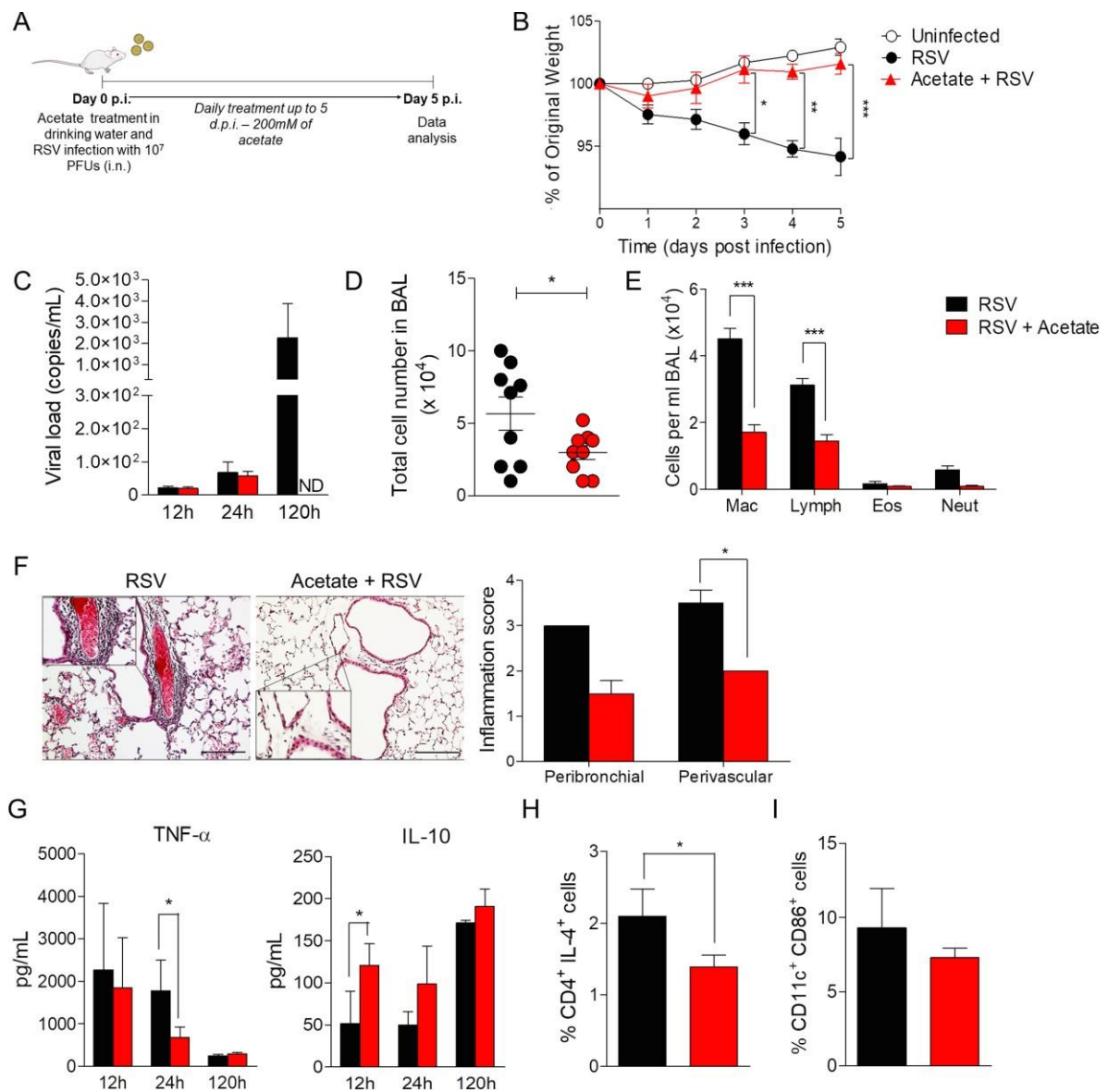
169 Fig 2. Microbiota and its metabolite acetate are necessary for the protection against RSV

170 **induced disease mediated by high fiber diet intake.** A, BALB/c mice were given high-fiber (HF) for
 171 four weeks before and during RSV infection. Three days before infection mice received an antibiotics
 172 mix (Abx) (see methods) in drinking water until the moment of RSV administration. Acetate was
 173 administered in drinking water after removal of abx treatment. Analyses were performed on day 5
 174 post infection. B, Percentage of body weight loss post infection relative to initial weight (day 0). C,
 175 RSV viral load detected in lung tissue by real-time PCR. D, Total cell number in bronchoalveolar
 176 lavage (BAL). E, Differential cell number in BAL. F, Representative hematoxylin and eosin (H&E)-
 177 stained lung tissue images and its respective inflammation score. G, Acetate quantification in colonic
 178 luminal content (mg/g). Data are representative of 2 independent experiments (n= 4-6 mice per
 179 group). All data are expressed as mean \pm SEM and the groups were compared using one-way
 180 ANOVA followed by Bonferroni post hoc test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

181

182 Acetate treatment protects mice against the RSV infection

183 Acetate was added to the drinking water before infection, similarly to the experiments performed with
184 diet (Supplementary Fig 2, *A*). The treated group presented lower weight loss after RSV infection
185 (Supplementary Fig 2, *B*), an undetectable lung viral load (Supplementary Fig 2, *C*), a reduction in
186 total cell numbers in the BAL (Supplementary Fig 2, *D*) and in inflammatory cells in the lungs
187 (Supplementary Fig 2, *E and F*). Of note, RSV-F protein was not detected in the lung tissue by
188 immunohistochemistry in the animals pre-treated with acetate, confirming the protective effect of
189 acetate against virus infection (Supplementary Fig 2, *G*). Propionate and butyrate pre-treatment
190 present similar protective effects (Supplementary Fig 2, *A-G*). These findings clearly indicate a
191 prophylactic effect of SCFAs on RSV infection. We also performed a different set of experiments,
192 treating mice with acetate in the drinking water simultaneous with intranasal RSV instillation, in order
193 to test a possible therapeutic effect of acetate (Fig 3, *A*). Notably, acetate protected mice against
194 weight loss caused by infection (Fig 3, *B*), leading to undetectable lung RSV load 5 days after infection
195 (Fig 3, *C*) and reducing the number of cells in BAL (Fig 3, *D*), associated with a significant reduction in
196 macrophage and lymphocytes numbers (Fig 3, *E*). Hence, acetate treatment reduced infiltration of
197 inflammatory score in the lung (Fig 3, *F*) and increased IL-10 and reduced TNF α concentration in BAL
198 (Fig 3, *G*). Acetate treatment also reduced IL-4-producing CD4 T cells (Fig 3, *H*) in the lymph nodes,
199 although there was no significant difference observed in CD11c⁺CD86⁺ cells (Fig 3, *I*).



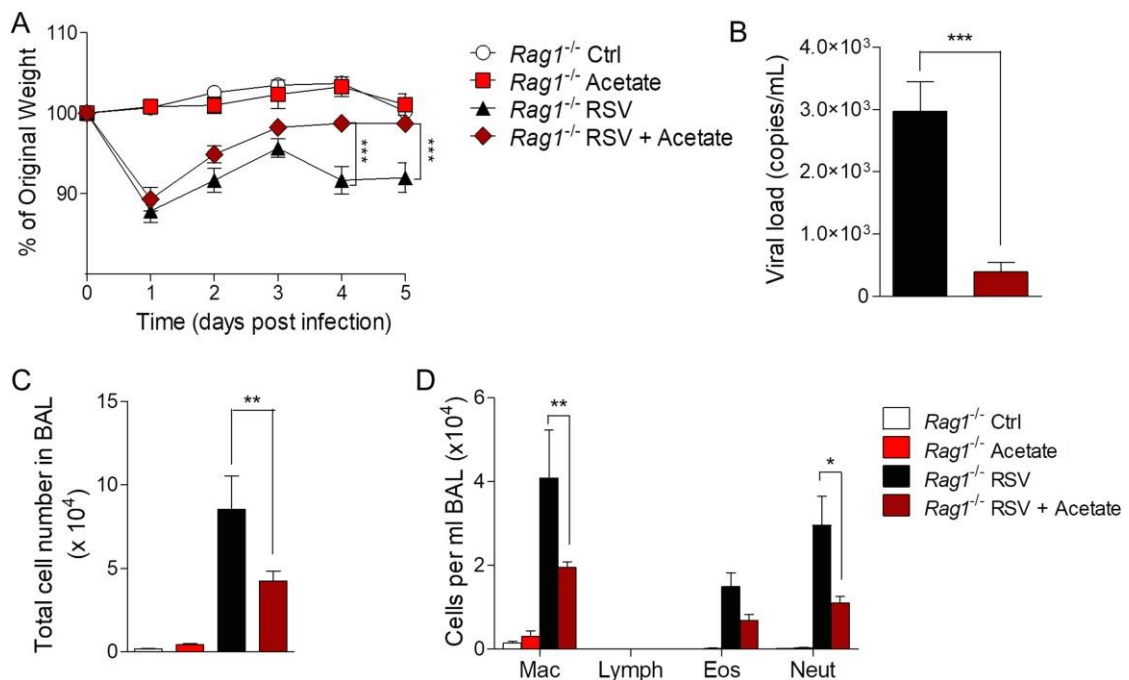
200

201 **Fig 3. Acetate treatment protects mice against RSV infection.** A, BALB/c mice were
 202 simultaneously infected with RSV and treated with acetate in drinking water. Analyses were performed
 203 on day 5 post infection. B, Percentage of body weight loss post infection relative to initial weight (day
 204 0). C, RSV viral load detected in lung tissue by real time PCR. ND, not detected. D, Total cell number
 205 in BAL fluid. E, Differential cell number in BAL fluid. F, Representative hematoxylin and eosin (H&E)-
 206 stained lung tissue images and its respective inflammation score. Scale bars in 100 μ m. G
 207 Measurement of TNF- α and IL-10 in BAL. H, Percentage of CD4+IL-4+ T cells on the lymph nodes. I,
 208 Percentage of CD11c+CD86+ dendritic cells on the lymph nodes. All the experiments are expressed as
 209 mean \pm SEM. Data are representative of 3 independent experiments (n=4-6 mice per group).
 210 Statistical significance between the groups was determined by using Student's t test except in in
 211 which two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test was used. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p <
 212 0.001.

213

214 Acetate induces IFN- β production in pulmonary cells

215 Based on the findings that HF diet and acetate reduced IL-4-producing CD4 T cells, we tested the
 216 whether T cells mediate the protective effect of acetate against RSV induced disease. *Rag1*^{-/-} mice
 217 were treated with acetate using the same protocol described in Fig 3A. Acetate treatment protected
 218 against RSV-induced body weight loss (Fig 4, A), reduced lung viral load even in the absence of B/T-
 219 lymphocytes (Fig 4, B) and decreased the number of macrophages, neutrophils, and the total number
 220 of cells in the BAL (Fig 4, C and D). These data indicate that acetate has a B/T cell independent
 221 protective effect against RSV infection.



222

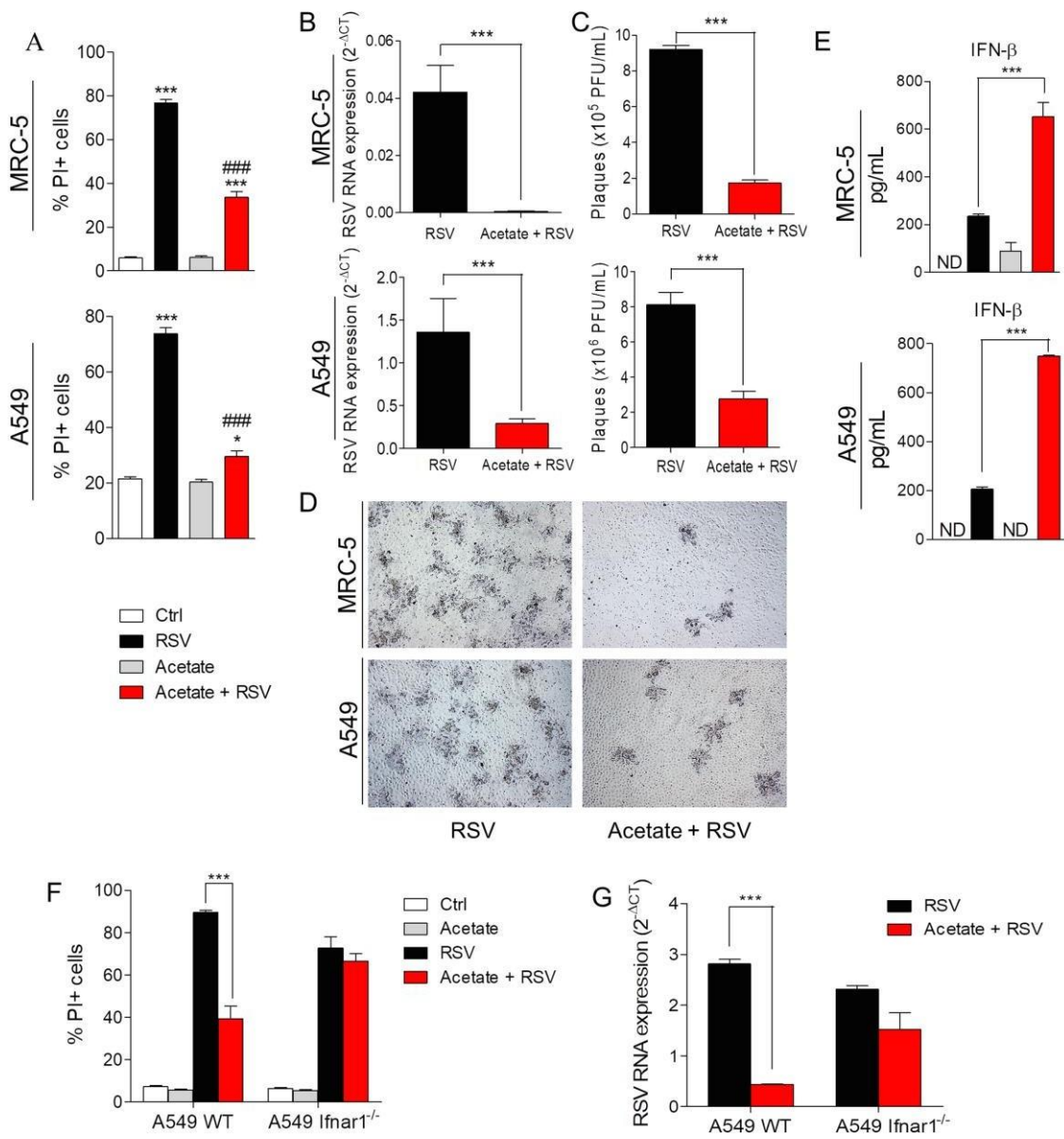
223 Fig 4. Acetate treatment protects against RSV infection independently of the presence of T

224 **cells.** A-D, *Rag1* knockout mice (background C57BL/6) were simultaneously infected with RSV and
 225 treated with acetate in drinking water. Analyses were performed on day 5 post infection. A,
 226 Percentage of body weight loss post infection relative to initial weight (day 0). Ctrl, control untreated
 227 and uninfected mice. B, RSV viral load detected in lung tissue by real-time PCR. C, Total cell number
 228 in BAL. D, Differential cell number in BAL. All the experiments are expressed as mean \pm SEM (n= 3-5
 229 mice per group). The statistical significance between the groups was determined using two-way
 230 ANOVA followed by onferroni post hoc test except in in which was used Student's t test. * $p < 0.05$,
 231 ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

232

233 We then hypothesized that acetate has a direct antiviral effect on pulmonary cells, given its significant
 234 effect on diminishing viral loads in the lung. Human pulmonary epithelial cells (A549 and MRC-5) were

235 treated with acetate at different concentrations; 6, 12 or 24h before or 2h after infection with RSV
236 (Supplementary Fig 3, A, B and C). Acetate treatment 24h before the infection protected cells from
237 cellular death caused by RSV (Fig 5, A and Fig E3. A and B), reducing the RSV F protein RNA levels
238 and viral plaque formation (Fig 5, B, C and D). We tested the same treatments on Vero cells, to
239 confirm that acetate was acting specific on pulmonary cell lines. The protective effect against cell
240 death caused by the virus was not observed in this cell line (Supplementary Fig 3, D-G). However, it is
241 important to note that Vero cells contain a mutation, which impairs the production of IFN- β (26) and
242 might be responsible for ineffectiveness of acetate to protect against RSV infection in these cells. We
243 then measured IFN- β in the supernatant of MRC-5 and A549 cells. Acetate significantly induced the
244 production of IFN- β (Fig 5, E). Accordingly, acetate was unable to protect CRISPR/Cas9 generated
245 A459 type 1 interferon receptor (*Ifnar^{-/-}*) knockout cells from cell death caused by the RSV (Fig 5, F),
246 nor to reduce virus replication (Fig 5, G). These findings indicate that the *in vitro* protective effect of
247 acetate against RSV-infection is mediated by IFN- β and IFNAR engagement.

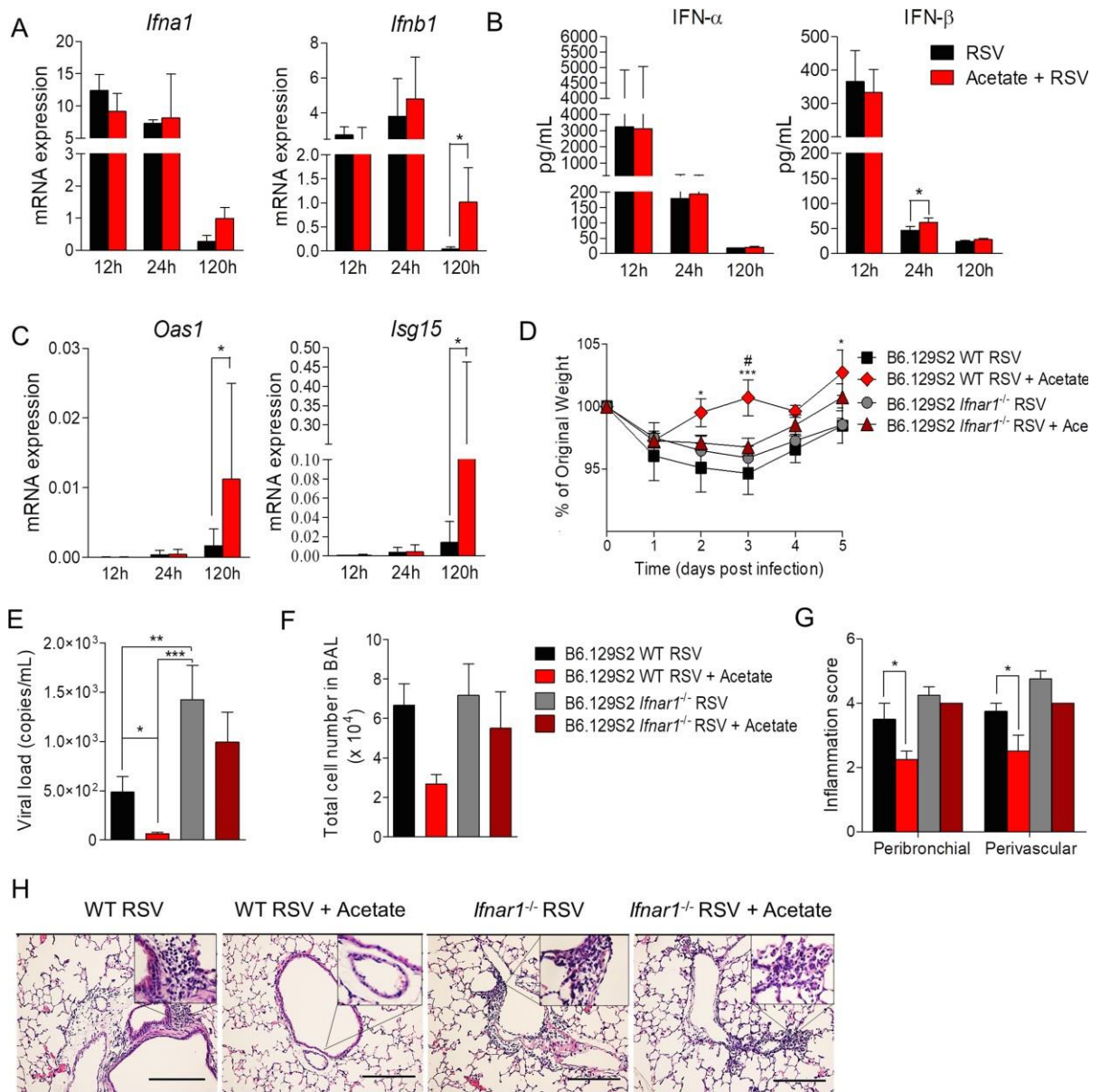


249 **Fig 5. Acetate treatment induces IFN- β production in pulmonary cells lines.** MRC-5 and A549
250 cells were pretreated with 260 μ M of acetate for 24h and infected with RSV for 96h. A, Percentage of
251 PI (propidium iodide) positive cells detected by flow cytometry. B, RSV RNA levels detected using
252 real-time PCR. C, Quantification of RSV plaque-forming units (PFU). D, Representative images of viral
253 title assay indicating the viral plaques. E, Measurement of IFN- β protein level on supernatant of MRC-
254 5 and A549 cells pretreated with 260 μ M of acetate for 24h and infected with RSV for 24h. F, Cellular
255 viability of A549 WT and A549 *Ifnar1*^{-/-} (Interferon-alpha/beta receptor subunit 1 knockout cells) was
256 assessed using PI by flow cytometry. G, RSV RNA levels detected using real-time PCR. Data are
257 shown in triplicates of 2 independent experiments. * represents significant difference relative to ctrl; #
258 represents significant difference relative to RSV. All results are expressed as mean \pm SEM. Statistical
259 significance was determined with two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test, except in B, C
260 and G in which Student's t test was used. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.
261

262

263 Acetate protects against RSV infection in an IFNAR-dependent manner

264 We found that RSV-infected mice treated with acetate presented increased expression of IFN- β in the
265 lung compared to untreated RSV-infected mice 5 days after infection (Fig 6, A). There were increased
266 concentrations of IFN- β in BAL of acetate-treated mice 24 hours after infection (Fig 6, B). Acetate
267 treatment also induced the expression of IFN-1 stimulated genes (ISGs), *Oas1* and *Isg15* (Fig 6, C).
268 HF diet induced both IFN- α and IFN- β production (Supplementary Fig 4). Similar to what we found *in*
269 *vitro*, acetate protection against RSV infection was abolished in the absence of type 1 interferon
270 receptor in mice (*Ifnar*^{-/-}). There were no observed differences for body weight loss (Fig 6, D), for lung
271 viral load (Fig 6, E), for total cell numbers in the BAL (Fig 6, F) and for lung inflammatory score (Fig 6,
272 G) between the acetate and the control group in the *Ifna*^{-/-} mice. These data confirms that the acetate
273 protection against RSV infection is dependent on *Ifnar* presence and it is possibly mediated by
274 induction of IFN- β .



275

276 **Fig 6. Acetate protects against RSV infection in an IFNAR-dependent manner.** A, *Ifna1* and *Ifnb1*
 277 genes expression of in the lung of animals 12h, 24h and 120h after acetate treatment and RSV
 278 infection. B, IFN- α and IFN- β protein detected in the AL supernatant. C, *Oas1* and *Isg15* genes
 279 expression in the lung. (D-H) Wild-type and *Ifnar*^{-/-} mice were simultaneously infected with RSV and
 280 treated with acetate in drinking water. Analyses were performed on day 5 post infection. D,
 281 Percentage of body weight loss post infection relative to initial weight (day 0). E, RSV viral load
 282 detected in lung tissue by real-time PCR. F, Total cell number in BAL. G, Inflammation score of lung
 283 histology. H, Representative hematoxylin and eosin (H&E)-stained lung tissue images. Scale bars in
 284 100 μ m. All results are expressed as mean \pm SEM (n= 3-5 mice per group). * represents significant
 285 difference between WT RSV vs. WT RSV + Acetate. # Represents significant difference between
 286 *Ifnar*^{-/-} RSV + acetate vs. WT RSV + acetate. Statistical significance between the groups was

287 determined with one-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p <$
288 0.001.

289

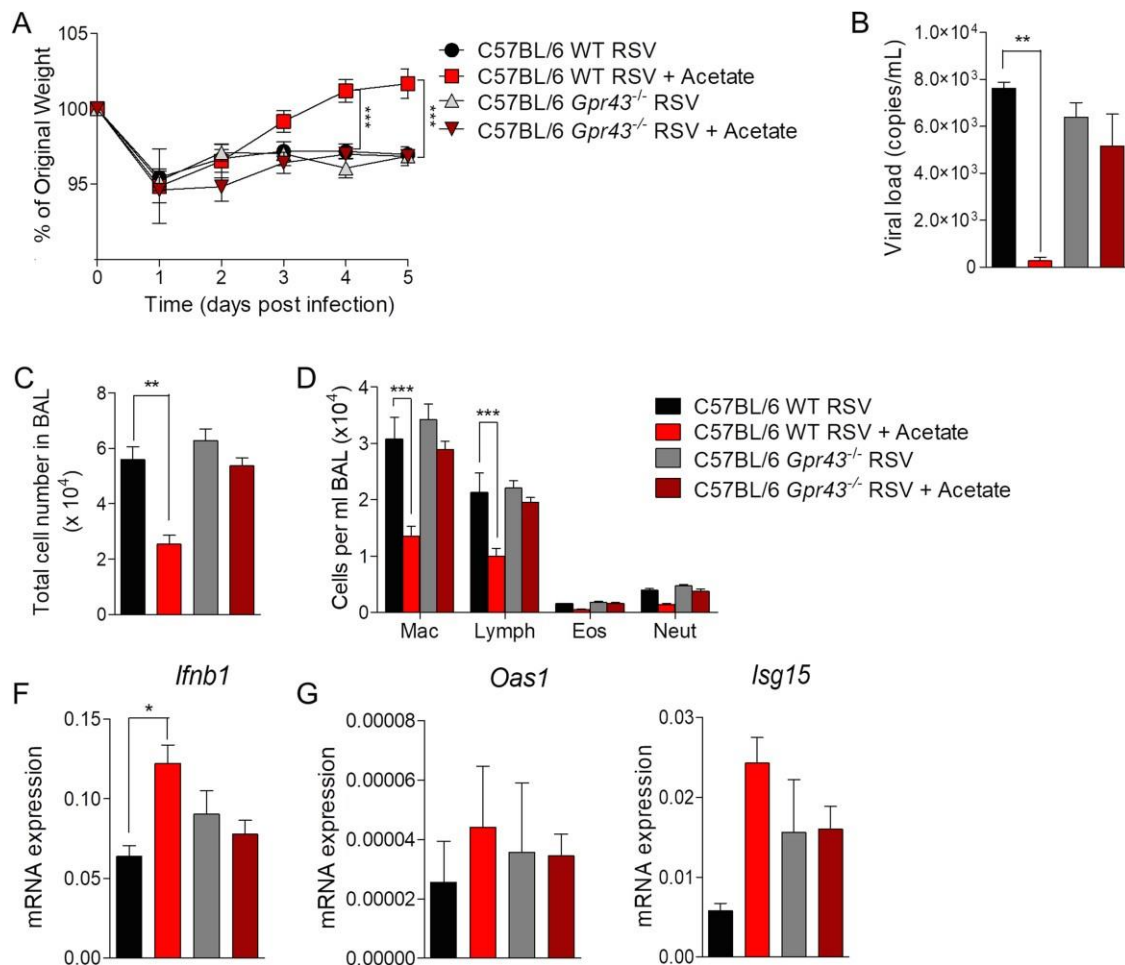
290 ***IFNAR1* SNP rs2257167 C allele was protective for severe RSV disease in infants**

291 To evaluate the translational aspects of the importance of *Ifnar* in RSV infection, we queried the
292 NIEHS TagSNP database to identify a tagSNP that provided adequate gene coverage
293 (Supplementary Fig 5); *IFNAR1* SNP rs2257167 was selected for genotyping DNA samples of children
294 from a prospective case-control study with healthy full-term infants (< 1 year of age) presenting with
295 bronchiolitis (n = 737) (24). The phenotype of interest was clinically defined as “severe” or “mild” RSV
296 disease and served as a dichotomous dependent variable. The estimated minor allele frequency
297 (MAF) for the *IFNAR1* SNP rs2257167 (located on chromosome 21:33343393) is 0.2288 in the 1000
298 genomes population. In our study population, the overall MAF was 0.2687; in the sub-population of
299 RSV-positive patients (n = 401), the MAF was 0.2681 (Supplementary Table 2). We hypothesized
300 three potential effects of this functional SNP and tested it with logistic regression models; we found
301 significant associations in all models tested (Supplementary Table 3). In testing for the variant effects,
302 we found the odds ratios were 0.5932 and 0.3549 for the “dominant model” and “recessive model” with
303 the 95% confidence interval at [0.3966, 0.8874] and [0.1694, 0.7437] respectively. Thus, the variant C
304 (Leu168) is protective against severe disease for the individuals who have been infected with RSV.
305 Incorporation of breastfeeding increased genetic effects in all three models (p-values were 0.0014,
306 0.0098, and 0.0054 respectively).

307

308 **GPR43 is necessary for acetate protection against RSV induced disease**

309 Given the importance of GPR43 in acetate responses (27), we investigated whether the antiviral effect
310 of acetate was mediated by activation of this receptor. Acetate induces GPR43 expression in the
311 pulmonary cells *in vitro* (Supplementary Fig 6). *Gpr43*^{-/-} mice were treated with acetate using the same
312 protocol as described in Fig 3A. Acetate protection against RSV-induced disease was abolished in the
313 absence of GPR43. There was no difference between the acetate and control groups for body weight
314 loss (Fig 7, A), viral load in the lung (Fig 7, B) and cellularity on the BAL (Fig 7, C and D) in these
315 *Gpr43*^{-/-} mice. In addition, in the *Gpr43*^{-/-} mice acetate was not able to induce *Ifnb*, *Oas1* and *isg15*
316 gene expression (Fig 7, F and G). These data indicate that the acetate antiviral activity against RSV,
317 which involves induction of IFN-I production, is mediated by one of the important metabolite-sensing
318 receptors, GPR43.



319

320 **Fig 7. GPR43 is necessary for acetate protection of RSV induced disease.** *Gpr43* (G-protein
 321 coupled receptor 43) knockout mice (background on C57BL/6) were simultaneously infected with RSV
 322 and treated with acetate in drinking water. Analyses were performed on day 5 post infection. **A**,
 323 Percentage of weight loss post infection relative to original weight (day 0). **B**, RSV viral load detected
 324 in lung tissue by real-time PCR. **C**, Total cell number in BAL. **D**, Differential cell count in BAL. **E**,
 325 mRNA expression of *Ifnb1* genes in the lung by real-time PCR. **F**, mRNA expression of *OAS1* and
 326 *ISG15* genes in the lung by real-time PCR. All results are expressed as mean \pm SEM (n= 3-5 mice per
 327 group). Statistical significance between the groups was determined with one-way ANOVA followed by
 328 Bonferroni post hoc test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

329

330

331 DISCUSSION

332 In this study, we demonstrated a new mechanism by which acetate, a microbiota-derived
 333 metabolite, impacts on immune responses during a lung viral infection. We have described that
 334 acetate, protected against RSV-induced disease inducing IFN- β and interferon stimulated gene (ISGs)
 335 expression in lung epithelial cells, through a mechanism that involves the activation of the membrane

336 receptors GPR43 and IFNAR. These findings together highlight the relevance of the gut microbiota
337 and its metabolites in non-intestinal inflammatory and infectious conditions. Our data also support the
338 concept of using of high-fiber diets, fiber-enriched formulas or even acetate, as inexpensive
339 interventions for prevention and treatment of bronchiolitis caused by RSV.

340 Lynch *et al* (2018) recently demonstrated a role for the intestinal microbiota and propionate, in
341 the early protection against bronchiolitis and the development of asthma in adult mice (22). In the
342 model used in our study, we similarly found a prophylactic effect after oral supplementation with
343 propionate or acetate and butyrate before RSV infection. Interestingly, we also observed beneficial
344 effects when treating mice with acetate simultaneously with infection induction. This latter result
345 indicates that acetate may be useful in the treatment to RSV infection. In contrast to Lynch *et al.*
346 (2018) (22), who showed that the propionate protection effect was dependent on Treg cells, in our
347 study the acetate effect involved mechanisms that were T cell-independent. However, found that
348 acetate induced IFN- β production *in vitro* in human pulmonary cell lines and *in vivo* in the lung of RSV-
349 infected mice. This mechanism was relevant for the protection conferred by acetate since we found, *in*
350 *vivo* and *in vitro*, that protection against RSV infection was abrogated in the absence of type 1
351 interferon receptor (IFNAR). Previous study described the participation of IFN- β during RSV infection
352 (28). In addition, the importance of the microbiota for the production of IFN-1 (29), and protection
353 against respiratory viral infection, had been demonstrated previously (21, 30, 31). Here we establish
354 the precise molecular pathways by which the gut microbiota contributes to an anti-viral response
355 mediated by acetate production and induction of IFN- β in the lung and IFNAR engagement.

356 IFN-1 is normally secreted after virus recognition and bind to IFNAR 1 or 2, and initiate a
357 signaling cascade that involves JAK/STAT pathway and induce the transcription of ISGs, which have
358 direct antiviral activity (32). Structurally, IFNAR1 has a unique extracellular four-domain architecture
359 comprised of subdomains SD1 to SD4, while IFNAR2 has only two (33). In agreement with a relevant
360 role of IFNAR in the protective effect of acetate, we found that this acetate induced the transcription of
361 well-characterized antiviral ISGs, *Oas1* (encodes oligoadenylate synthetase) and *Isg15*, in the lung of
362 RSV-infected mice. The protein encoded by the former gene (*Oas1*) has been shown to decrease
363 RSV replication (34), a mechanism that may explain acetate effects.

364 Consistent with our findings in *Ifnar-/-* mice, and confirming the importance of IFNAR on RSV
365 infection, we found that the *IFNAR1* rs2257167 C allele (a valine to leucine substitution in the SD2
366 domain) was associated with protection against severe disease in RSV positive infants. The IFNAR1
367 SD2 and SD3 interface contains a hinge center that mediates movement of the two halves upon ligand
368 engagement (35, 36). Structural modeling revealed the larger leucine residue provides a stable
369 conformation with better packing in the hydrophobic SD2 cavity (33). While it does not reside on the
370 SD2/3 interface, Leu168 may reposition critical amino acids in the ligand-binding hinge region that
371 could alter IFNAR1 signaling. While we can only speculate as to the functional impact of this variant,
372 infants with Leu168 may have altered IFNAR1 dynamics either through improvement of ligand-binding
373 or IFN- β recruitment, which confer protection from RSV disease. Importantly, the *IFNAR1* rs2257167
374 mutation is in strong linkage disequilibrium with proximal intronic and distal promoter SNPs associated

375 with viral infection (33, 37, 38). Interestingly, we found that breastfeeding increased the genetic effect
376 of C allele with protection from severe disease. Although breastfeeding increased the levels of gut
377 acetate in infants (39), the involvement of short chain fatty acids and diet on the genetic protection of
378 *IFNAR1* polymorphism is the focus of future studies.

379 Our data obtained with *Gpr43*^{-/-} mice highlighted the participation of this receptor in the
380 phenotype observed. Acetate is known to activate GPR43 (27, 40), a receptor that is expressed in the
381 membrane of different cells (19). To the best of our knowledge, this is the first study to show GPR43
382 participation in a virus infection. Based on our findings, we hypothesize that acetate activates GPR43
383 in the lung, thus inducing IFN- β production and ISGs expression. We cannot exclude the possibility
384 that oral administration of acetate also activates GPR43 in other tissues including the intestinal
385 epithelial cells or immune cells, which may indirectly contribute to IFN- β production by pulmonary
386 cells.

387 We have found that HF diet fed mice had an increase of gut bacterial components of
388 *Lachnospiraceae* spp., this is a bacterial family usually isolated from human intestinal microbiota,
389 including infants in the first year of life (41). A recent study showed a decrease in *Lachnospiraceae*
390 family following RSV infection in mice (42). Increased abundance of *Lachnospiraceae* family has also
391 been reported in other studies in which fermentable fiber was added, and was associated with
392 increased serum levels of acetate (43).

393 In conclusion, our data reveal a new mechanism for protection against RSV infection in which
394 acetate, a metabolite derived from the intestinal microbiota, induces IFN- β in the lung and the
395 mechanism of protection is mediated by GPR43 and IFNAR. This mechanism might be also relevant
396 for protection against other viruses frequently associated with respiratory infection such as influenza,
397 metapneumovirus and rhinovirus.

398

399 **METHODS**

400 **Virus**

401 RSV A2 strain was kindly provided by Dr. Fernando Polack, Fundación Infant, Argentina. Viral plaque-
402 forming units (PFU) were identified using an anti-RSV antibody (Millipore, Billerica, MA, USA).

403

404 ***In vivo* procedures**

405 *Animals and RSV infection*

406 Female BALB/c mice, male and female type 1 interferon receptor deficient (*Ifnar*^{-/-}) 129/Sv mice and
407 wild type 129/Sv mice, female Rag-1 deficient mice (*Rag1*^{-/-}), female GPR43-deficient mice (*Gpr43*^{-/-})
408 C57BL/6, all at age 6-8 weeks were used in the study. Mice were housed at the Animal Facility of the
409 Institute of Biology, University of Campinas. All animal procedures were performed in accordance with
410 protocols approved by CEUA/UNICAMP (protocols 4022-1 and 4599-1). For RSV infection mice were
411 anesthetized with 5% isoflurane and infected intranasally with 10⁷ PFU/mL of RSV A2 strain. All the

412 animals were weighed daily. Data analysis was performed 5 days post infection or as indicated in text.
413 Bronchoalveolar lavage fluid (BAL) was collected; or after perfusion with formalin left lung were
414 removed for Histopathological and Immunohistochemistry analysis.

415

416 *Diet and SCFA treatment*

417 Mice were fed with high-fiber diet (HF) or control diet (CF) for 4 weeks before infection. Both diets
418 were based in the AIN93M (American Society for Nutrition, USA) and their detailed composition is
419 presented at Supplementary Table 4. These diets were produced using same protocol previously
420 describe (2). Alternatively, high fiber diet-fed mice received an antibiotic mix (kanamycin (0.4 mg/mL),
421 gentamicin (0.035 mg/mL), metronidazole (0.045 mg/mL), vancomycin (0.045 mg/mL) and colistin
422 (0.035 mg/mL)) diluted in drinking water for three days before infection. All the antibiotics were
423 purchased from Sigma-Aldrich. Mice were given the short chain fatty acid, sodium acetate, sodium
424 propionate or sodium butyrate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in sterile drinking water at a final
425 concentration of 200 mM for 3 weeks before the RSV infection, as already described (3). Another
426 SCFAs treatment was performed starting simultaneously with the infection at the same final
427 concentration. Water volume consumption was measured daily and no difference in water intake was
428 observed between the groups.

429

430 *Histopathological and Immunohistochemistry analysis*

431 The left lung was embedded in paraffin blocks, cut into 4- μ m sections stained with H&E or submitted
432 to antigenic recovery and subsequent labeling with anti-RSV F protein antibody (Millipore, MA, USA).
433 Slide analysis was performed in a blinded manner. The peribronchial and perivascular inflammation
434 was scored according to Barends et al (4), as absent (0), minimal (1), slight (2), moderate (3), marked
435 (4), or severe (5).

436

437 *Viral load quantification*

438 Total lung RNA was extracted and complementary DNA (cDNA) was synthesized using GoScript
439 transcriptional reverse (Promega). The amplification of the RSV F protein gene was performed using
440 specific primers and probes: forward-5'-AACAGATGTAAGCAGCTCCGTTATC-3', reverse-5'-
441 GATTTTTATTGGATGCTGTACATTT-3' and probe 5' FAM/TGCCATAGCATGACACAATGGCTCCT-
442 TAMRA/-3' by real time PCR. Primer sequences, synthesized and cloned into pUC57 plasmids
443 (GenScript, Piscataway, NJ, USA), were used in order to perform a 10-fold dilution and generate a
444 standard curve for calculate the viral load.

445

446 *Flow cytometry*

447 Spleen or axillar and mesenteric lymph nodes isolated cells were incubated with Mouse Fc Block (BD
448 Biosciences®) for 20 min and then stained with surface antibodies anti-CD11c (clone HL3), anti-I-Ad/I-
449 Ed (clone 2G9), anti-CD86 (clone GL1), anti-CD8 (clone 53-6.7), anti-CD4 (clone RM4-5), and anti-
450 CD62L (clone MEL-14) (BD Biosciences®). For intracellular staining, cells were fixed with

451 cytofix/cytoperm (BD Biosciences®) and stained with anti-IL-4 antibody. Samples were acquired on a
452 flow cytometer Gallios (Beckman Coulter®). Data were analyzed using the FlowJo software (version
453 7.5, Tree Star Inc., MA, USA).

454

455 *Microbiome analysis*

456 Feces from mice fed with high fiber diet or control diet and infected with RSV, were harvested under
457 sterile conditions. Samples were stored at -80 °C. bacterial DNA was then isolated using the QiaAMP
458 DNA Stool Mini Kit (Qiagen Hilden Germany) according to the manufacturer's instructions. DNA was
459 amplified using primers selected to cover V4 region of bacterial 16s rRNA (5) with Phusion enzyme.
460 Amplicons were purified with a magnetic bead capture kit (AMPure XP; Agencourt) indexed with
461 Nextera XT indexes and normalized following Illumina protocol. Sequencing of 16s rRNA gene marker
462 was performed in Miseq platform, with v2 500 cycle kit (Illumina, CA, USA), which generates paired-
463 end reads (2 x 250 bp). The analytic pipeline used incorporates phylogenetic and alignment based
464 approaches to maximize data resolution. The read pairs were demultiplexed based on unique
465 molecular barcodes added via PCR during library generation, then merged using USEARCH
466 v7.0.1090 (6). The subsequent analysis steps of the pipeline leverage custom analytic packages
467 developed at the Alkek Center for Metagenomics and Microbiome Research (CMMR) at Baylor
468 College of Medicine to produce summary statistics and quality control measurements to characterize
469 microbial communities across large numbers of samples or sample groups. 16Sv4 rDNA sequences
470 were clustered into Operational Taxonomic Units (OTUs) at a similarity cutoff value of 97% using the
471 UPARSE algorithm (7). OTUs were subsequently mapped to an optimized version of the SILVA
472 Database (8) containing only sequences from the v4 region of the 16S rRNA gene to determine
473 taxonomies. Abundances were recovered by mapping the demultiplexed reads to the UPARSE OTUs.
474 A custom script constructs an OTU table from the output files generated in the previous two steps for
475 downstream analyses using a visualization toolkit also developed at the CMMR named ATIMA (*Agile*
476 *Toolkit for Incisive Microbial Analyses*). ATIMA is a stand-alone tool for analyzing and visualizing
477 microbiome data sets. This software provides an integrated solution for exploring relationships
478 between microbial communities and emergent properties of their hosts or environments (*manuscript in*
479 *preparation*).

480

481 *SCFAs quantification*

482 Colonic luminal content samples were harvested from mice and used for measurement of SCFAs.
483 This analysis was performed using a protocol similar to Fellows et al (9). Samples were weighted,
484 crushed and homogenized in water. Sodium chloride, citric acid, hydrochloric acid and butanol were
485 added to the samples, which were then vortexed and centrifuged and the supernatant was collected. A
486 calibration curve with SCFAs (range of 0.015–0.1 mg/mL) was used in the quantification.
487 Chromatographic analyses were performed using a gas chromatograph-mass spectrometer (model
488 GCMS-QP2010 Ultra; Shimadzu) and a fused-silica capillary Stabilwax column (Restec Corporation,
489 U.S.) with dimensions of 30 m × 0.25 mm internal diameter (i.d.) coated with a 0.25- μ m thick layer of

490 polyethylene glycol. Samples (1 μ L) were injected at 250 °C using a split ratio of approximately 25:1.
491 High-grade pure helium (He) was used as the carrier gas with a constant flow rate of 1.0 mL/min.
492 Mass conditions were as follows: ionization voltage, 70 eV; ion source temperature, 200 °C; full scan
493 mode in the 35–500 mass range with 0.2 s/scan velocity. The runtime for each analysis was
494 11.95 min.

495 *Type 1 interferon analysis*

496 Lung cDNA (synthesized as described above) was used to perform IFN- α and IFN- β relative
497 expression using primers and probes for TaqMan Assay (Mm03030145_gH *Ifna1*, Mm00439552_s1
498 *Ifnb1* Thermo Fisher Scientific) and mouse β -actin (Mm02619580_g1 *Actb*) as endogenous control
499 gene. ISGs expression was accessed using the following primer sets: *Oas1* (forward: 5'-
500 AAAAGGAGGAGCCATGGCAGT-3' reverse: 5'-CTGAGCCCAAGGTCCATCAG-3'), *Isg15* (forward:
501 5'-GAGCTAGAGCCTGCAGCAAT-3' reverse: 5'-TCACGGACACCAGGAAATCG-3'), *B2M* (forward: 5'-
502 CCCCAGTGAGACTGATACATACG' reverse: 5'-CGATCCCAGTAGACGGTCTTG'). PCR conditions
503 were recommended by GoTaq™ Probe qPCR Master Mix protocol (Promega™ Madison WI USA) or
504 SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Quantification of
505 gene expression was conducted using StepOne™ (Applied biosystems). The $\Delta\Delta C_t$ or $2^{-\Delta C_t}$ analysis
506 was used to calculate the fold change as previously described (10). IFN- α and IFN- β protein levels
507 were quantified in BAL supernatant using an IFN alpha/IFN beta 2-Plex Mouse ProcartaPlex™ Panel
508 assay kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Assays were performed
509 according to manufacturer's instructions and read on the MAGPIX b350 Multiplexing Instrument
510 (Merck Millipore, Billerica, MA).

511 ***In vitro treatment***

512
513 Vero, MRC-5, and A549, and A549 *Ifnar1*^{-/-} were pre-treated with sodium acetate, sodium propionate
514 and sodium butyrate (Sigma-Aldrich St. Louis MO USA) at different concentrations (60 μ M 120 μ M
515 200 μ M and 260 μ M) for 6 12 and 24h in DMEM containing 10% of F S and then the cells were
516 infected with 10⁴ PFU/mL of RSV in fresh medium. Alternatively, the cells were treated with SCFA 2h
517 after infection with infection. After 96h cell viability was analyzed using MTT assay or propidium iodide
518 staining using flow cytometry. The viral load was measured by real time PCR (as described above)
519 and by viral plaque assay.

520 *Viral plaque assay*

521
522 A549 and MRC-5 cells, cultured in 6-well plate were pretreated with acetate at 260 μ M for 24h and
523 then infected with 10⁴ PFU/mL of RSV for 96h. Cells were harvested and submitted to freeze-thaw
524 and were inoculated onto Vero cell monolayers. Viral plaque-forming units (PFU) were identified using
525 an anti-RSV (Millipore, Billerica, MA, USA) antibody after 4 days.

526 *Statistical analysis*

529 All *in vitro* experiments were performed in triplicates. In vivo experiments were performed at least 2
530 times (n=3-5 mice per group in each experiment). For parametric data one-way analysis of variance
531 (ANOVA) followed by Bonferroni post-test was applied to determine the statistical significance
532 between various experimental groups and Student's *t* test was applied to compare two experimental
533 group using GraphPad Prism software (San Diego, CA, USA). Values presented in graphs are mean \pm
534 standard error of mean (SEM) and a level of significance of $p < 0.05$ was considered significant.

535 Human population

536 A prospective case-control study was conducted in Buenos Aires, Argentina (2003 to 2006) with
537 healthy full-term infants (< 1 year of age) presenting with bronchiolitis. Diagnosis of RSV infection was
538 performed by trained pediatricians based on clinical outcomes (oxygen saturation, Th2 polarization,
539 RSV titer and pCO₂), and only RSV positive subjects (246 severe and 172 mild) were included for
540 study. Detailed inclusion and exclusion criteria, including clinical data and demographics have been
541 described previously (11). The Institutional Review Boards of participating hospitals in Buenos Aires
542 and Johns Hopkins University approved the protocol and the study conformed to standards indicated
543 by the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from the parents of each enrolled
544 infant.

545

546 DNA extraction and genotyping for *IFNAR1* rs2257167

547 Based on our *Ifnar1*^{+/+} and *Ifnar1*^{-/-} studies, we queried the NIEHS TagSNP database to identify a
548 *IFNAR1* tagSNP that provided adequate gene coverage (figure). DNA was extracted from whole
549 blood using the Gentra PureGene kit (Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA), characterized for
550 purity and concentration, and a 250 ng aliquot submitted for genotyping using the Illumina BeadXpress
551 assay. Briefly DNA was activated and labeled with a Cy3 or Cy5 tag, hybridized to validated *IFNAR1*
552 sequence-specific paramagnetic VeraCode beads (reverse strand: 3'-cttctacacctgaagagttttccagataa
553 [C/G] taagctatatgtaaagcttaaacatccaa-5') and the fluorescent signal scanned using the eadXpress
554 system. Clusters that passed separation and SNP call frequency were refined by additional quality
555 control measures, and analyzed using Genome Studio. Genotype calls were exported to Excel and
556 ASCII coded for association analysis. Genotyping for *IFNAR1* rs2257167 was confirmed by allelic
557 discrimination using a validated TaqMan SNP genotyping assay (Fisher Scientific, MA, USA). Five
558 percent of samples were submitted for sequencing, and calls were 100% concordant. The phenotype
559 of interest was clinically defined as "severe" or "mild" RSV disease (described above), and served as a
560 dichotomous dependent variable in our statistical model. To determine whether the *IFNAR1* tagSNP
561 associated with RSV disease severity, we formulated three hypotheses: (1) the additive effect model,
562 which contained all three genotypes: GG, GC, and CC as levels of the predictor variable; (2) a
563 dominant effect model of variant allele, the predictor variable had two levels, which corresponded to
564 GG genotype vs. GC/CC genotypes combined; (3) a recessive effect model of variant allele, the
565 predictor variable had two levels, which corresponded to GG/GC genotypes combined vs. CC
566 genotype. For each of these three hypotheses, we performed logistic regression and for the

567 dominant/recessive effect models, we derived the odds ratio of the genotype effect and its
568 corresponding 95% confident interval for each estimate. In addition to the base logistic model, we
569 also tested other factors including gender, breastfeeding, region/hospital location, and socioeconomic
570 status as covariates in the logistic model; all tests and estimates were made and adjusted for the
571 covariate accordingly.

572 Acknowledgements

573 Gessica Antunes for technical assistance.

574 **Declaration of all sources of funding:** Sao Paulo Research Foundation (FAPESP, 2012/10653-9);
575 CNPq (036270/2016)

576 **Declarations of interest:** none

577

578 Author contributions

579 A.P.D.S., M.A.R.V. and K.H.A. conceived the study and designed the experiments. K.H.A., J.L.F., R.P.
580 and M.A.R.V. performed the in vivo experiments. K.H.A. and E.F.S. performed the in vitro
581 experiments. J.E.V. and R.P. contributed to the analysis, design and data interpretation. F.Q.M.
582 carried out the bacterial 16s rRNA-seq. F.M. performed the lung histopathological and
583 immunohistochemistry analysis. C.R.Z. and N.J.A contributed to microbiota analysis. M.R.S., T.C. and
584 H.G.R. performed the SCFA measurement. M.S. and M.T.P.S.C. synthesized the diets used in this
585 study. J.L.P. contributed to the IFN-I analysis and data interpretation. A.T.V. and C.R.M. contributed to
586 the GPR43 analysis and data interpretation. D.M. contributed to the analysis and data interpretation of
587 A549 Ifnar1^{-/-} cells experiments. M.C., J.M., J.L., X.W., D.B., F.P.P. and R.S.K. performed the human
588 population analysis. F.P.P., R.S.K. and R.T.S. contributed to the human population analysis, data
589 interpretation and discussion. M.A.R.V. and A.P.D.S. supervised and designed all research. A.P.D.S.,
590 M.A.R.V. and K.H.A. wrote de manuscript. All authors reviewed and commented on the manuscript.

591

592

593 Abbreviation used

594 SCFAs: short-chain fatty acids

595 RSV: respiratory syncytial virus

596 IFN-I: type 1 interferon

597 DC: dendritic cell

598 BAL: bronchoalveolar lavage

599 CF: control fiber

600 HF: high-fiber

601 GPR43: G-protein coupled receptor 43

602 Treg: regulatory T cells

603

604

605

606

607 REFERENCES

- 608 1. Meissner HC. Viral Bronchiolitis in Children. *The New England journal of medicine*.
609 2016;374(18):1793-4.
- 610 2. Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, et al. Global burden of 611
acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic 612
review and meta-analysis. *Lancet*. 2010;375(9725):1545-55.
- 613 3. Blanken MO, Rovers MM, Bont L, Dutch RSVNN. Respiratory syncytial virus and recurrent
614 wheeze. *The New England journal of medicine*. 2013;369(8):782-3.
- 615 4. Mohapatra SS, Boyapalle S. Epidemiologic, experimental, and clinical links between
616 respiratory syncytial virus infection and asthma. *Clinical microbiology reviews*. 2008;21(3):495-504.
- 617 5. Collins PL, Melero JA. Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus:
618 still crazy after all these years. *Virus research*. 2011;162(1-2):80-99.
- 619 6. Barik S. Respiratory syncytial virus mechanisms to interfere with type 1 interferons. *Current*
620 *topics in microbiology and immunology*. 2013;372:173-91.
- 621 7. Schlender J, Bossert B, Buchholz U, Conzelmann KK. Bovine respiratory syncytial virus 622
nonstructural proteins NS1 and NS2 cooperatively antagonize alpha/beta interferon-induced antiviral 623
response. *Journal of virology*. 2000;74(18):8234-42.
- 624 8. Ferolla FM, Hijano DR, Acosta PL, Rodriguez A, Duenas K, Sancilio A, et al. Macronutrients 625
during pregnancy and life-threatening respiratory syncytial virus infections in children. *American* 626
journal of respiratory and critical care medicine. 2013;187(9):983-90.
- 627 9. Dixon DL. The Role of Human Milk Immunomodulators in Protecting Against Viral Bronchiolitis
628 and Development of Chronic Wheezing Illness. *Children*. 2015;2(3):289-304.
- 629 10. Schijf MA, Kruijsen D, Bastiaans J, Coenjaerts FE, Garssen J, van Bleek GM, et al. Specific 630
dietary oligosaccharides increase Th1 responses in a mouse respiratory syncytial virus infection 631
model. *Journal of virology*. 2012;86(21):11472-82.
- 632 11. Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Backhed F. From Dietary Fiber to Host
633 Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell*. 2016;165(6):1332-45.
- 634 12. Rios-Covian D, Ruas-Madiedo P, Margolles A, Gueimonde M, de Los Reyes-Gavilan CG, 635
Salazar N. Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. *Frontiers in* 636
microbiology. 2016;7:185.
- 637 13. Park J, Kim M, Kang SG, Jannasch AH, Cooper B, Patterson J, et al. Short-chain fatty acids 638
induce both effector and regulatory T cells by suppression of histone deacetylases and regulation of 639
the mTOR-S6K pathway. *Mucosal immunology*. 2015;8(1):80-93.

- 640 14. Trompette A, Gollwitzer ES, Yadava K, Sichelstiel AK, Sprenger N, Ngom-Bru C, et al. Gut 641
microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nature* 642
medicine. 2014;20(2):159-66.
- 643 15. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, et al. Commensal 644
microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*. 645
2013;504(7480):446-50.
- 646 16. Vieira AT, Galvao I, Macia LM, Sernaglia EM, Vinolo MA, Garcia CC, et al. Dietary fiber and 647
the short-chain fatty acid acetate promote resolution of neutrophilic inflammation in a model of gout in 648
mice. *Journal of leukocyte biology*. 2017;101(1):275-84.
- 649 17. Correa-Oliveira R, Fachi JL, Vieira A, Sato FT, Vinolo MA. Regulation of immune cell function
650 by short-chain fatty acids. *Clinical & translational immunology*. 2016;5(4):e73.
- 651 18. den Besten G, van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud DJ, Bakker BM. The role of 652
short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. 653
Journal of lipid research. 2013;54(9):2325-40.
- 654 19. Tan J, McKenzie C, Vuillermin PJ, Goverse G, Vinuesa CG, Mebius RE, et al. Dietary Fiber 655
and Bacterial SCFA Enhance Oral Tolerance and Protect against Food Allergy through Diverse 656
Cellular Pathways. *Cell reports*. 2016;15(12):2809-24.
- 657 20. Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly YM, et al. The microbial 658
metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science*. 659
2013;341(6145):569-73.
- 660 21. McFarlane AJ, McSorley HJ, Davidson DJ, Fitch PM, Errington C, Mackenzie KJ, et al. Enteric 661
helminth-induced type I interferon signaling protects against pulmonary virus infection through 662
interaction with the microbiota. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2017;140(4):1068-78 663 e6.
- 664 22. Lynch JP, Werder RB, Loh Z, Sikder MAA, Curren B, Zhang V, et al. Plasmacytoid dendritic 665
cells protect from viral bronchiolitis and asthma through semaphorin 4a-mediated T reg expansion. 666
The Journal of experimental medicine. 2017.
- 667 23. Thorburn AN, McKenzie CI, Shen S, Stanley D, Macia L, Mason LJ, et al. Evidence that 668
asthma is a developmental origin disease influenced by maternal diet and bacterial metabolites. 669
Nature communications. 2015;6:7320.
- 670 24. Caballero MT, Serra ME, Acosta PL, Marzec J, Gibbons L, Salim M, et al. TLR4 genotype and 671
environmental LPS mediate RSV bronchiolitis through Th2 polarization. *The Journal of clinical* 672
investigation. 2015;125(2):571-82.

- 673 25. Meehan CJ, Beiko RG. A phylogenomic view of ecological specialization in the 674
Lachnospiraceae, a family of digestive tract-associated bacteria. *Genome biology and evolution*. 675
2014;6(3):703-13.
- 676 26. Emeny JM, Morgan MJ. Susceptibility of various cells treated with interferon to the toxic effect
677 of poly(rI).poly(rC) treatment. *The Journal of general virology*. 1979;43(1):253-5.
- 678 27. Le Poul E, Loison C, Struyf S, Springael JY, Lannoy V, Decobecq ME, et al. Functional 679
characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell 680
activation. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(28):25481-9.
- 681 28. Demoor T, Petersen BC, Morris S, Mukherjee S, Ptaschinski C, De Almeida Nagata DE, et al. 682
IPS-1 signaling has a nonredundant role in mediating antiviral responses and the clearance of 683
respiratory syncytial virus. *Journal of immunology*. 2012;189(12):5942-53.
- 684 29. Kawashima T, Kosaka A, Yan H, Guo Z, Uchiyama R, Fukui R, et al. Double-stranded RNA of 685
intestinal commensal but not pathogenic bacteria triggers production of protective interferon-beta. 686
Immunity. 2013;38(6):1187-97.
- 687 30. Abt MC, Osborne LC, Monticelli LA, Doering TA, Alenghat T, Sonnenberg GF, et al. 688
Commensal bacteria calibrate the activation threshold of innate antiviral immunity. *Immunity*. 689
2012;37(1):158-70.
- 690 31. Steed AL, Christophi GP, Kaiko GE, Sun L, Goodwin VM, Jain U, et al. The microbial 691
metabolite desaminotyrosine protects from influenza through type I interferon. *Science*. 692
2017;357(6350):498-502.
- 693 32. Schoggins JW. Interferon-stimulated genes: roles in viral pathogenesis. *Current opinion in*
694 *virology*. 2014;6:40-6.
- 695 33. Zhou J, Smith DK, Lu L, Poon VK, Ng F, Chen DQ, et al. A non-synonymous single nucleotide 696
polymorphism in IFNAR1 affects susceptibility to chronic hepatitis B virus infection. *Journal of viral* 697
hepatitis. 2009;16(1):45-52.
- 698 34. Dhar J, Cuevas RA, Goswami R, Zhu J, Sarkar SN, Barik S. 2'-5'-Oligoadenylate Synthetase- 699
Like Protein Inhibits Respiratory Syncytial Virus Replication and Is Targeted by the Viral Nonstructural 700
Protein 1. *Journal of virology*. 2015;89(19):10115-9.
- 701 35. Thomas C, Moraga I, Levin D, Krutzik PO, Podoplelova Y, Trejo A, et al. Structural linkage
702 between ligand discrimination and receptor activation by type I interferons. *Cell*. 2011;146(4):621-32.
- 703 36. Li H, Sharma N, General IJ, Schreiber G, Bahar I. Dynamic Modulation of Binding Affinity as a
704 Mechanism for Regulating Interferon Signaling. *Journal of molecular biology*. 2017;429(16):2571-89.

- 705 37. Song le H, Xuan NT, Toan NL, Binh VQ, Boldt AB, Kremsner PG, et al. Association of two 706
variants of the interferon-alpha receptor-1 gene with the presentation of hepatitis B virus infection. 707
European cytokine network. 2008;19(4):204-10.
- 708 38. He XX, Chang Y, Jiang HJ, Tang F, Meng FY, Xie QH, et al. Persistent effect of IFNAR-1 709
genetic polymorphism on the long-term pathogenesis of chronic HBV infection. *Viral immunology*. 710
2010;23(3):251-7.
- 711 39. Bridgman SL, Azad MB, Field CJ, Haqq AM, Becker AB, Mandhane PJ, et al. Fecal Short- 712
Chain Fatty Acid Variations by Breastfeeding Status in Infants at 4 Months: Differences in Relative 713 versus
Absolute Concentrations. *Frontiers in nutrition*. 2017;4:11.
- 714 40. Brown AJ, Goldsworthy SM, Barnes AA, Eilert MM, Tcheang L, Daniels D, et al. The Orphan 715
G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain 716
carboxylic acids. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(13):11312-9.
- 717 41. Sagheddu V, Patrone V, Miragoli F, Puglisi E, Morelli L. Infant Early Gut Colonization by
718 Lachnospiraceae: High Frequency of *Ruminococcus gnavus*. *Frontiers in pediatrics*. 2016;4:57.
- 719 42. Groves HT, Cuthbertson L, James P, Moffatt MF, Cox MJ, Tregoning JS. Respiratory Disease
720 following Viral Lung Infection Alters the Murine Gut Microbiota. *Frontiers in immunology*. 2018;9:182.
- 721 43. Hashemi Z, Fohse J, Im HS, Chan CB, Willing BP. Dietary Pea Fiber Supplementation
722 Improves Glycemia and Induces Changes in the Composition of Gut Microbiota, Serum Short Chain
723 Fatty Acid Profile and Expression of Mucins in Glucose Intolerant Rats. *Nutrients*. 2017;9(11).

724

725

726

727

728



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br