



Ana Clara Matoso Montuori de Andrade

Avaliação dos mecanismos de proteção do probiótico *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 durante a inflamação alérgica pulmonar

Belo Horizonte – Minas Gerais

2017

Ana Clara Matoso Montuori de Andrade

Avaliação dos mecanismos de proteção do probiótico *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 durante a inflamação alérgica pulmonar

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Prof^a. Dr^a. Leda Quercia Vieira (Orientadora)

Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia
Departamento de Bioquímica e Imunologia
Universidade Federal de Minas Gerais

Dr^a. Liliane Martins dos Santos (Orientadora)

Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia
Departamento de Bioquímica e Imunologia
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte – Minas Gerais

2017

043 Andrade, Ana Clara Matoso Montuori de.

Avaliação dos mecanismos de proteção do probiótico lactobacillus delbrueckii UFV-H2b20 durante a inflamação alérgica pulmonar [manuscrito] / Ana Clara Matoso Montuori de Andrade. – 2019.

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

Orientador: Prof^a. Dr^a. Leda Quercia Vieira Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Liliane Martins dos Santos.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Lactobacillus delbrueckii. 3. Pulmão-Inflamação.

CDU: 577.1

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG



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




ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE ANA CLARA MATOSO MONTUORI DE ANDRADE. Aos quinze dias do mês de fevereiro de 2017 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Avaliação dos mecanismos de proteção do probiótico *Lactobacillus Delbrueckii* UFV-H2b20 durante a inflamação alérgica pulmonar", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof. Liliane Martins dos Santos, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Fabiana Simão Machado (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Angélica Thomaz Vieira (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Leda Quercia Vieira - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Liliane Martins dos Santos - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 15 de fevereiro de 2017.


 Dra. Fabiana Simão Machado (UFMG)


 Dra. Angélica Thomaz Vieira (UFMG)


 Dra. Leda Quercia Vieira - Orientadora (UFMG)


 Dr. Liliane Martins dos Santos - Orientadora (UFMG)


 Prof. Jader dos Santos Cruz
 Coordenador de Curso de Pós-Graduação
 em Bioquímica e Imunologia
 ICB - UFMG

AGRADECIMENTOS

A Deus, por seu infinito amor, justiça e bondade, pela oportunidade e por nunca desamparar nenhum de seus filhos. Agradeço também ao meu anjo da guarda que tanto me auxiliou e guiou durante a realização deste trabalho.

Aos meus pais Clarete e João Bosco, meus maiores incentivadores, primeiramente pela oportunidade da encarnação e também por seu apoio sempre incondicional. Mãe, obrigada pelos conselhos e conforto sempre que eu recorro a você. Eles foram fundamentais para que eu conseguisse chegar até o final deste trabalho. Quero que vocês saibam que foram meu motivo de seguir em frente muitas vezes em que pensei em não continuar. Apesar de todas as dificuldades já vividas, vocês nunca deixaram de acreditar que a maravilhosa criação dada aos seus filhos traria bons frutos. Dedico a vocês mais essa conquista da minha vida.

Ao meu amado marido Maurício, que suportou e superou todas as dificuldades comigo e fez delas suas próprias dificuldades para me entender e me apoiar sempre. Amor, eu sou muito feliz por ter você ao meu lado a cada passo que dou na minha vida profissional, desde o ensino médio e para sempre. Tudo que estou fazendo é por nós e para nós. Obrigado por entender.

Ao meu anjo Gabriel, meu irmão, meu amigo, que mesmo estando longe agora nesta reta final, nunca deixou de ser presente na minha vida. Bel, obrigada por tudo e que nós continuemos assim: haja o que houver, eu torço por você e você torce por mim!

À minha grande amiga e cunhada Karina que sempre distribuiu empatia com seu sorriso contagiante, que sempre me incentivou. Aos meus sobrinhos Amanda, Miguel e Emmanuel que me fizeram sorrir tantas vezes e me ensinaram um lado do amor que não conhecia. Não é à toa que a sigla do nome de vocês forma a palavra AME. Titia ama vocês.

Aos meus filhinhos caninos, Kiko e Simba, meus cãopanheirinhos, sem vocês minha vida seria tão mais triste. Obrigada pelos rabinhos abanando quando chego em casa, pelos latidos de alegria, pelos lambeijos e pelo amor incondicional tão puro e inocente que só um animal é capaz de ter por um ser humano.

Às minhas amadas famílias Matoso, Montuori e Andrade que sempre me incentivaram e torceram por mim. Obrigada por fazerem parte da minha vida.

Ao Augusto César Netto e sua maravilhosa equipe pelas preciosas orientações, auxílio amigo, dedicação ao próximo e principalmente por me dizer que sou capaz!

À Doutora Liliane Martins dos Santos, minha amiga Leelee, eu nunca vou conseguir expressar em palavras o agradecimento que tenho por tudo que você fez por mim durante esse mestrado. Obrigada pela oportunidade, por acreditar em mim, me incentivar e me fazer amar ainda mais a ciência. Obrigada pela paciência, por NUNCA me negar ajuda em NENHUM momento e por NENHUM motivo. Obrigada por não desistir de mim e pela sua amizade. Obrigada por ser meu exemplo. Você pode ter certeza de que se eu um dia for a metade do que você é, eu já me sentirei realizada. Absolutamente nada disso teria sido possível sem você e eu queria te agradecer de coração por tudo. Essa conquista é nossa!

À Professora Leda Quercia Vieira, também pela oportunidade e por acreditar em mim. Obrigada por me apoiar e compreender minhas indecisões me aceitando de volta ao laboratório duas vezes. Obrigada por fazer o trabalho no laboratório tão leve e nos tratar não só como alunos, mas como verdadeiros amigos. Leda, nunca vamos nos esquecer dos seus exemplos de profissionalismo, dedicação, ética e moral. Muito obrigada pelo suporte no mestrado e que venha o doutorado!

À minha querida aluna de iniciação científica Ana Elisa (Aneliseeeenha), meu braço direito, muito obrigada por todo o apoio e por fazer parte deste trabalho. Espero que possamos continuar juntas crescendo nesta profissão e alcançar muitas conquistas juntas.

Aos meus maaaravilhosos amigos do Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia (LAGI): Grazielle (Grazi); Caio, que vou ser eternamente grata por ter construído minha caixa de nebulização <3; Paula (Pauleeeenha); Débora (Debs); Diego; Alícia; Aline (Alynes); Peter; Pierre (Peepee); Rafael (Rafa); Mateus; Leonardo (Léo). Obrigada pela amizade, por fazerem meus dias felizes, pelos conselhos, pelas conversas, danças e cantorias e é claro, pelo auxílio nos experimentos onde vocês foram fundamentais e sempre tiveram paciência com minhas loucuras rs. Obrigada

por segurarem essa marimba comigo mes amours. Muito mais do que colegas de trabalho, nós somos uma família e eu dedico essa conquista também a vocês.

Aos Lagianos que saíram do LAGI, mas o LAGI não saíram deles porque são LAGIANOS de coração: Waldionê de Castro (Dionê) e Matheus Batista Heitor Carneiro (Jiló), vocês tiveram e têm uma grande importância na minha formação e eu nunca vou me esquecer disso.

Ao professor Luís Carlos Crocco Afonso primeiramente pela ideia do projeto e principalmente, obrigada a você e à sua aluna Amanda Braga de Figueiredo, pelo auxílio com relação à via purinérgica.

À minha querida amiga Nathália Luísa Sousa de Oliveira Malacco, minha Naty. Estamos juntas do começo ao fim nessa biologia. Eu agradeço por sua amizade, apoio, conselhos e carinho, não só agora no mestrado, mas desde o cursinho pré-vestibular. Nós vivemos muitos momentos felizes e difíceis nesse ICB e fora dele, mas o importante é que estamos crescendo e aprendendo juntas. Obrigada também pela paciência em me ensinar os primeiros experimentos com pulmão e por encarar um novo projeto em parceria comigo. Vamos longe miga!

Ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, aos professores, funcionários e alunos do Departamento de Bioquímica e Imunologia pela contribuição na minha formação acadêmica.

Às agências de fomento, FAPEMIG, CNPq e CAPES pelo suporte financeiro.

Aos membros que compõem essa banca, pela oportunidade de discussão deste trabalho, pelas sugestões e pela possibilidade de enriquecimento do mesmo.

Agradeço a todas as pessoas que, de alguma forma, participaram da realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de figuras.....	viii
Lista de abreviaturas.....	ix
Resumo.....	1
Abstract.....	2
1. Introdução.....	3
1.1 Inflamação Alérgica Pulmonar e Asma.....	3
1.2 Papel da CD39 e CD73 na Inflamação.....	6
1.3 Microbiota Intestinal e sistema imunológico.....	10
1.4 Microbiota intestinal na asma e doenças alérgicas.....	11
1.5 Probióticos e sistema imunológico.....	13
1.6 Probióticos na asma e doenças alérgicas.....	14
1.7 <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV-H2b20.....	15
2. Objetivos.....	18
2.1 Objetivos Gerais.....	18
2.1 Objetivos Específicos.....	18
3. Materiais e Métodos.....	19
3.1 Animais experimentais.....	19
3.2 Cultivo e Tratamento com <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV-H2b20.....	19
3.3 Indução da Inflamação Alérgica Pulmonar.....	20
3.4 Lavado Broncoalveolar (BAL).....	20
3.5 Avaliação do perfil celular e expressão de CD39 e CD73 por citometria de fluxo.....	20
3.6 Contagem total das células do BAL.....	21
3.7 Análise histológica do pulmão.....	21
3.8 Detecção de citocinas no pulmão.....	22
3.9 Análises Estatísticas.....	22
4. Resultados.....	23

4.1 Verificação da ingestão e eficácia do tratamento com o probiótico <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV-H2b20.....	23
4.2 Análise do perfil celular no BAL e Pulmão.....	26
4.3 Avaliação da expressão de CD39 e CD73 nos Linfócitos T dos pulmões.....	30
4.4 O efeito benéfico do <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV-H2b20 parece ser causado por seus metabólitos.....	33
4.4.1 Verificação da ingestão do tratamento com o sobrenadante do probiótico <i>L. delbrueckii</i> UFV-H2b20.....	33
4.4.2 Análise histológica do pulmão e contagem de células totais no BAL após tratamento com o sobrenadante do probiótico <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV-H2b20.....	35
4.4.3 O tratamento com o probiótico <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV-H2b20 pode promover um aumento na produção de IFN- γ e IL-10 no pulmão.....	37
5. Discussão.....	39
6. Conclusão.....	45
7. Referências.....	47

Lista de Figuras

Fig.1 Representação esquemática da cascata inflamatória na asma alérgica.....	5
Figura 2. CD39 e CD73 têm um importante papel na sinalização purinérgica das células imunes.....	7
Figura 3. Líquido ingerido por grupo (ml).....	24
Figura 4. Histologia do pulmão e contagem de células totais no BAL.....	25
Figura 5. Análise de monócitos inflamatórios, eosinófilos e macrófagos alveolares no BAL por citometria de fluxo.....	27
Figura 6. Análise de neutrófilos e células dendríticas no BAL por citometria de fluxo.....	28
Figura 7. Análise dos linfócitos T no pulmão por citometria de fluxo.....	29
Figura 8. Avaliação da expressão de CD39 e CD73 nos Linfócitos T CD4+ e Tregs nos pulmões.....	31
Figura 9. Avaliação da expressão de CD39 e CD73 nos Linfócitos T CD8+ nos pulmões.....	32
Figura 10. Líquido ingerido por grupo (ml) após tratamento com sobrenadante do probiótico <i>L. delbrueckii</i> UFV-H2b20.....	34
Figura 11. Histologia do pulmão e contagem de células totais no BAL após tratamento com o sobrenadante do probiótico <i>L. delbrueckii</i> UFV-H2b20.....	36
Figura 12. Dosagem de Citocinas.....	38

Lista de abreviaturas

ADP - Adenosina Difosfato

AMP - Adenosina Monofosfato

ATP - Adenosina Trifosfato

BAL - Bronchoalveolar Lavage (Lavado Broncoalveolar)

cAMP - Cyclic AMP (AMP cíclico)

CCL - CC chemokine ligands (Ligantes de receptores de quimiocinas CC)

CD - Cluster of differentiation (Grupamento de diferenciação)

CXCL - Chemokine (CXC motif) ligand (Ligante de quimiocinas com motivo CXC)

DCs - Dendritic cells (células dendríticas)

GPI - glycosylphosphatidyl inositol (glicosilfosfatidil inositol)

HE - hematoxilina-eosina

IgE - Imunoglobulina E

IL - Interleucina

IFN- γ - Interferon- γ

LDR - Leite desnatado reconstituído

MHC - Major histocompatibility complex (Complexo principal de histocompatibilidade)

OVA - Ovalbumina derivada de galinha

ROS - Reactive Oxygen Species (Espécies Reativas de Oxigênio)

PBS - Phosphate Buffered Saline (salina tamponada com fosfato 0,1 M, pH 7,3)

PRRs - Pattern recognition receptors (Receptores de reconhecimento padrão)

SBF - Soro Fetal Bovino

SPF - Specific pathogen free (livres de patógenos específicos)

TGF - Transforming growth factor (fator de transformação do crescimento)

TGI - Trato Gastrointestinal

Th - T helper

TNF - Fator de Necrose Tumoral

TLRs - Toll-like receptors (receptors do tipo Toll)

Tregs - Células T reguladoras

WAO - World Allergy Organization (Organização Mundial de Alergia)

Resumo

A inflamação dos pulmões e vias aéreas é uma das principais características da asma alérgica. A asma é uma doença heterogênea e é caracterizada por uma obstrução variável do fluxo aéreo, inflamação e diminuição das funções das vias aéreas, hiperresponsividade brônquica e remodelação tecidual. CD39 e CD73 são proteínas de membrana com atividade enzimática que desempenham um papel na regulação de sinais purinérgicos destinados a células imunes através da conversão de ADP e ATP a AMP e de AMP a adenosina. Isso leva a mudança de um ambiente pró-inflamatório induzido por ATP a um ambiente anti-inflamatório induzido por adenosina. A crescente conscientização a respeito do envolvimento da sinalização purinérgica na formação de respostas imunes e inflamatórias durante reações alérgicas tem promovido interesse científico nos papéis da CD39 e CD73 nesse contexto. O termo probiótico é definido como “microrganismos viáveis, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios para a saúde do hospedeiro”. A utilização dos probióticos vem se tornando cada vez mais estudada e recentes evidências sugeriram que os probióticos podem proporcionar benefícios terapêuticos não só na asma, mas também em outras doenças atópicas. O microrganismo *L. delbrueckii* UFV-H2b20 pode ser considerado um probiótico, pois preenche os requisitos básicos que uma estirpe microbiana necessita para ser classificada como tal. Alguns trabalhos já mostraram a capacidade de *L. delbrueckii* UFV-H2b20 de estimular o sistema imunológico do hospedeiro, mas seus mecanismos de ação permanecem desconhecidos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os mecanismos de ação pelo qual *L. delbrueckii* UFV-H2b20 exerce seu efeito protetor durante a inflamação alérgica pulmonar experimental induzida por OVA em camundongos, analisando a possível participação das moléculas CD39 e CD73 na produção deste efeito. Nossos resultados mostram que o tratamento oral com *L. delbrueckii* UFV-H2b20 inibe a resposta inflamatória nos pulmões dos camundongos BALB/c provocada pelo estímulo com OVA, diminuindo o número de monócitos inflamatórios, eosinófilos e macrófagos alveolares. Os resultados sugerem ainda que seu mecanismo de ação está relacionado a respostas de linfócitos T CD4⁺, T reguladores e T CD8⁺ e aumento da expressão de CD39 e CD73 nestas células. Por último, observamos que os metabólitos produzidos pelo probiótico podem ser responsáveis por estimular a resposta anti-inflamatória nos animais tratados.

Abstract

Lung inflammation is the most common hallmark of allergic asthma. Asthma is a heterogeneous disorder characterized by variable degree of airflow obstruction, inflammation and declining airway function, bronchial hyperresponsiveness and tissue remodeling. CD39 and CD73 are membrane proteins with enzymatic activities, which play a role in calibrating the purinergic signals delivered to immune cells through the conversion of ADP and ATP to AMP and AMP to adenosine, respectively. This drives a shift from an ATP-driven pro-inflammatory environment to an anti-inflammatory milieu induced by adenosine. The growing awareness about the involvement of purinergic signaling in shaping immune and inflammatory responses during allergic reactions has fostered scientific interest in the roles of CD39 and CD73 in this context. The term probiotic is defined as “live microorganisms which, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host”. The use of probiotics is becoming increasingly studied and recent evidence has suggested that probiotics may provide therapeutic benefits not only in asthma but also in other atopic diseases. The microorganism *L. delbrueckii* UFV-H2b20 can be considered a probiotic because it fulfills the basic requirements that a microbial strain needs to be classified as such. Some studies have already shown the ability of *L. delbrueckii* UFV-H2b20 to stimulate the host's immune system, but its mechanisms of action remain unknown. Therefore, the objective of this study was to evaluate the mechanisms of action by which *L. delbrueckii* UFV-H2b20 exerts its protective effect during experimental lung inflammation induced by OVA in mice, analyzing the possible participation of CD39 and CD73 molecules in the production of this effect. Our results show that oral treatment with *L. delbrueckii* UFV-H2b20 inhibits the inflammatory response in the lungs of treated mice, decreasing number of inflammatory monocytes, eosinophils and alveolar macrophages. Our results also suggest that its mechanism of action is related to T CD4⁺, T regulatory and T CD8⁺ lymphocytes stimuli and increased expression of CD39 and CD73 in these cells. Finally, we observed that the metabolites produced by *L. delbrueckii* UFV-H2b20 might be responsible for generating the anti-inflammatory response in treated animals.

1. Introdução

1.1 Inflamação Alérgica Pulmonar e Asma

A inflamação dos pulmões e vias aéreas é uma das principais características da asma alérgica (Lopez-Pacheco, C. *et al.*, 2016). A asma é uma doença heterogênea e complexa que possui vários fenótipos clínicos tanto em adultos quanto em crianças e é caracterizada por uma obstrução variável do fluxo aéreo, inflamação e diminuição das funções das vias aéreas, hiperresponsividade brônquica e remodelação tecidual (Busse, W.W. *et al.*, 2001; Lemanske, R.F., Jr. *et al.*, 2010; Murdoch, J.R. *et al.*, 2010). Seu início e evolução tem múltiplas causas e os fatores que desencadeiam a doença podem variar de causas genéticas (Cookson, W. 1999) a fatores ambientais como infecções virais das vias respiratórias na infância (Jackson, D.J. *et al.*, 2008) (Kusel, M.M. *et al.*, 2007), alérgenos (Halonen, M. *et al.*, 1999) e exposição ocupacional (Bush, R.K. *et al.*, 2009).

A prevalência da asma tem aumentado nas últimas décadas para proporções epidêmicas. Atualmente, estima-se que cerca de 300 milhões de pessoas sofrem pela doença e, além disso, 1 a cada 250 mortes no mundo são causadas pela asma. Estudos mostraram que, à medida que as comunidades se tornam urbanizadas e ocidentalizadas, a taxa de asmáticos tende a aumentar. Além disso, as mudanças na composição da dieta e piora na qualidade da alimentação também têm contribuído para este aumento (Global Initiative for Asthma (GINA) 2015). Alguns estudos têm investigado potenciais benefícios de certos alimentos (ex., frutas, vegetais, peixes) e nutrientes (ex., vitaminas C, D e E e ácido graxo ω -3) para o controle da asma (Barros *et al.*, 2008; Barros *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2012; Iikura *et al.*, 2013). Existe uma estimativa de que, entre as décadas de 1980 e 2009, as taxas de asma infantil mais que dobraram (Akinbami, L.J. *et al.*, 2009; Akinbami, L.J. *et al.*, 2011; Akinbami, L.J. *et al.*, 2016; Eder, W. *et al.*, 2006; Moorman, J.E. *et al.*, 2012) e até 2025 haverá mais 100 milhões de pessoas com asma no mundo (Masoli, M. *et al.*, 2004). É uma doença que representa um obstáculo à economia e ao aprendizado, visto que ocasiona milhões de faltas à escola e ao trabalho por dia (Akinbami, L.J. *et al.*, 2011), além de ser a terceira causa da hospitalização de crianças e enviar milhões de vítimas de todas as idades para a emergência anualmente (Adami, A.J. *et al.*, 2016).

A inflamação é uma resposta do sistema imunológico a lesões que, em condições normais, é benéfica para o hospedeiro. No entanto, uma resposta imune exacerbada nas vias aéreas pode levar a uma resposta inflamatória crônica relevante para a patogênese da asma (Holgate, S.T. 2008). Existem evidências de que a inflamação é um componente da asma desde a primeira autópsia realizada em um paciente com asma fatal. A autópsia identificou infiltração de neutrófilos e eosinófilos nas vias aéreas, mastócitos degranulados, espessamento da membrana basal, perda da integridade epitelial, obstrução dos brônquios por muco, hiperplasia e hipertrofia do músculo liso bronquial e hiperplasia das células de goblet. Essas características não estão presentes necessariamente em todas as formas da doença, mas mostram claramente sua natureza inflamatória. Além disso, existe outra importante evidência da resposta inflamatória na asma que é a presença de citocinas mediadoras da inflamação e citocinas quimiotáticas no lavado broncoalveolar (BAL) ou secreções pulmonares (Busse, W.W. *et al.*, 2001).

A inflamação dos pulmões e vias aéreas na asma envolve vários tipos celulares principalmente eosinófilos, linfócitos T CD4⁺ e mastócitos, sendo que a característica mais marcante é a infiltração eosinofílica (Kay, A.B. 2005). A asma associada a sensibilização alérgica tem como característica principal a habilidade das vias aéreas em reconhecer alérgenos ambientais e gerar uma resposta Th2 contra eles (Holgate, S.T. 2008). Durante a sensibilização alérgica, ocorre a absorção e processamento do alérgeno inalado pelas células dendríticas (DCs), situadas na mucosa das vias aéreas (Hammad, H. *et al.*, 2006). A absorção do alérgeno é aumentada pela ligação de imunoglobulina E (IgE) nos receptores de alta afinidade das DCs, facilitando assim, a internalização do alérgeno (Kitamura, K. *et al.*, 2007). Uma vez absorvidos pelas DCs, o processamento dos alérgenos e a posterior seleção dos peptídeos apresentados por moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II é essencial para a habilidade dessas células de atuarem como células apresentadoras de antígenos para os linfócitos T (Riese, R.J. *et al.*, 2000). Após as DCs terem capturado o alérgeno, elas recebem sinais de quimiocinas como CCL19, CCL21 ou CXCL12 para migrarem até o linfonodo onde ocorrerá a apresentação dos antígenos para as células T *naive* (Pease, J.E. *et al.*, 2006). A apresentação do peptídeo selecionado à célula T irá iniciar a sensibilização e a posterior resposta imune ao alérgeno específico (Smit, J.J. *et al.*, 2006).

A identificação das citocinas interleucina (IL)-2, IL-4 e IL-5, possibilitou a diferenciação das células T produtoras dessas citocinas em T helper (Th) 1 e Th2 (Mosmann, T.R. *et al.*, 1989). Atualmente existem evidências de que, pelo menos na asma leve a moderada, as células Th2 predominam entre as células T (Anderson, G.P. 2002) e, através da produção de citocinas, elas têm a capacidade de recrutar células efetoras secundárias como eosinófilos, basófilos e macrófagos para o infiltrado inflamatório, onde estas células serão ativadas (Holgate, S.T. 2008) (Figura1) (Bradding, P. *et al.*, 2006).

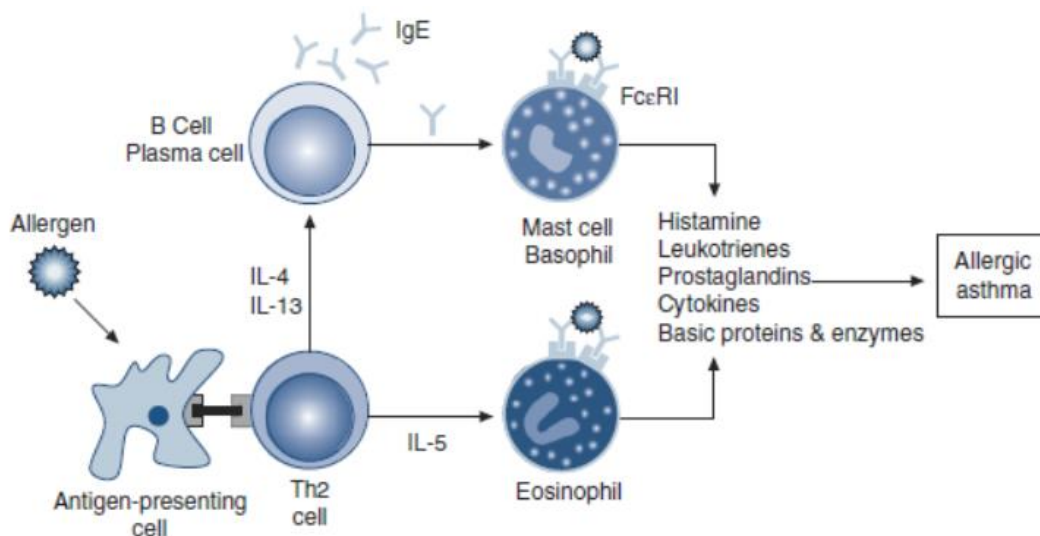


Fig. 1 Representação esquemática da cascata inflamatória na asma alérgica. (Bradding e al. 2006)

A capacidade da IL-4 e IL-5 de promoverem o recrutamento de eosinófilos e a troca de classe das células B estabeleceu uma ligação plausível entre células T expressando essas citocinas e as doenças alérgicas. Na verdade, vários trabalhos já mostraram que existe um aumento de células T produzindo citocinas de perfil Th2 no BAL e nos pulmões durante a asma (Moldaver, D.M. *et al.*, 2016).

Enquanto as células Th2 predominam na asma leve a moderada, à medida que a doença vai se agravando e cronificando, células do tipo Th1 vão sendo recrutadas. Essas células tem a capacidade de secretar fator de necrose tumoral (TNF) e interferon (IFN)- γ (Truyen, E. *et al.*, 2006). Além disso, também já foram observadas células T CD8⁺ em casos mais graves e durante intensificações de alguns casos de

asma (O'Sullivan, S.M. 2005). Esse perfil celular ajuda a explicar os danos teciduais e a agressividade nos casos mais graves da doença, apesar de os mecanismos precisos ainda continuarem em investigação (Holgate, S.T. 2008).

De fato, muitos dos processos celulares e bioquímicos que envolvem a inflamação na asma são pouco compreendidos. Embora a melhor abordagem para se investigar esses processos, identificar vias cruciais e verificar potenciais novos alvos para drogas a serem usadas como tratamento seja o estudo em humanos asmáticos, as estratégias de estudos necessárias não são aceitáveis por motivos éticos. Portanto, modelos animais possibilitam um estudo alternativo dos mecanismos e progressão da doença, apesar de ainda não ter sido desenvolvido um modelo que reproduzisse todas as características morfológicas e funcionais da asma humana pelo fato de ser uma doença complexa e multifatorial. No entanto, usam-se modelos animais para reproduzir características específicas da asma (Nials, A.T. *et al.*, 2008), a exemplo deste trabalho, onde reproduzimos a inflamação alérgica pulmonar em camundongos BALB/c utilizando ovalbumina derivada de ovo de galinha (OVA) que é um conhecido alérgeno frequentemente utilizado para induzir uma robusta inflamação alérgica pulmonar em roedores.

1.2 Papel da CD39 e CD73 na Inflamação

As ectonucleotidases ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1 ou E-NTPDase1 (CD39) e a ecto-50-nucleotidase ou Ecto50NTase (CD73) têm um importante papel na regulação da duração, magnitude e natureza química dos sinais purinérgicos transmitidos às células do sistema imune. A CD39 converte a adenosina difosfato (ADP) e a adenosina trifosfato (ATP) em adenosina monofosfato (AMP). A CD73, por sua vez, desfosforila o AMP, liberando a adenosina. Isso permite que haja uma mudança de um ambiente pró-inflamatório induzido pelo ATP para um ambiente anti-inflamatório induzido pela adenosina (Antonioli, L. *et al.*, 2013) (Figura 2).

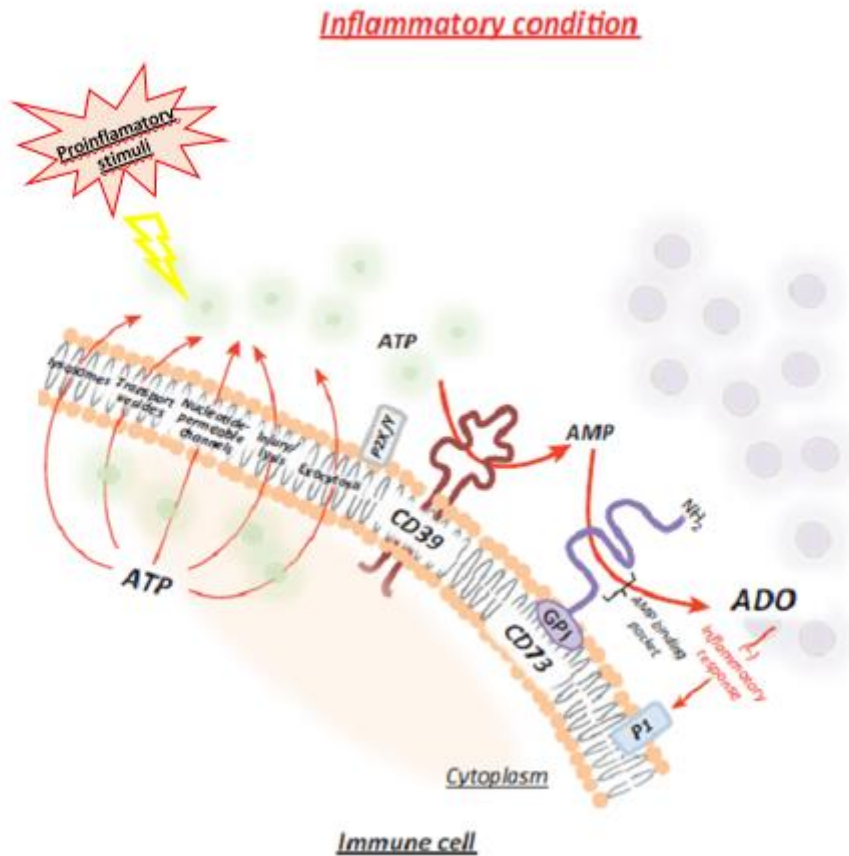


Figura 2. CD39 e CD73 têm um importante papel na sinalização purinérgica das células imunes. A ocorrência de eventos patológicos, como a inflamação, promove uma grande acumulação de ATP, que serve como um sinal de perigo, levando a uma série de respostas anti-inflamatórias. O aumento da secreção de ATP é seguido pela sua degradação sequencial pela CD39, e pela formação de adenosina (ADO) pela CD73. A adenosina promove uma ação supressora na atividade das células imunes e exerce um potente efeito anti-inflamatório. P2X/Y e P1: receptores de adenosina. (Adaptado de ANTONIOLI *et al.*, 2013).

O sistema purinérgico é um sistema que possui a função de ajustar as funções das células imunes tais como interações célula a célula, secreção de citocinas e quimiocinas, exposição de antígenos na superfície, remoção intracelular de patógenos e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Hasko, G. *et al.*, 2008; Junger, W.G. 2011; Trautmann, A. 2009). Mediadores purinérgicos como o ATP e a adenosina são liberados no espaço extracelular por células danificadas ou que sofreram estresse (Sperlagh, B. *et al.*, 1998; Sperlagh, B. *et al.*, 2004; Sperlagh, B. *et al.*, 2011) e atuam como sinais sensoriais para moldar as respostas imunes (Antonioli, L. *et al.*, 2013). O

ATP é liberado tanto por lise celular quanto por mecanismos que não envolvem lise como exocitose de vesículas contendo ATP, através de canais permeáveis a nucleotídeos, transporte de vesículas que transportam proteínas para membrana e também via lisossomo (Fredholm, B.B. *et al.*, 2011). Seguindo a liberação de ATP para o espaço extra celular, a CD39 converte o ATP a AMP e, logo após, a CD73 desfosforila AMP em adenosina (Yegutkin, G.G. 2008).

CD39 é uma proteína de membrana integral que hidrolisa ATP, e menos eficientemente ADP, de uma maneira dependente de Ca^{2+} e Mg^{2+} , para produzir AMP (Heine, P. *et al.*, 2001). É constitutivamente expressa no baço, timo, pulmão e placenta e, nesses órgãos, é associada principalmente às células endoteliais e população de células do sistema imune como Linfócitos B, natural killer, DCs, células de Langerhans, monócitos, macrófagos, células mesangiais, neutrófilos e células T reguladoras (Tregs) (Dwyer, K.M. *et al.*, 2007; Enjyoji, K. *et al.*, 1999; Kapojos, J.J. *et al.*, 2004; Mizumoto, N. *et al.*, 2002; Zimmermann, H. 1999). A expressão da CD39 é regulada por várias citocinas pró-inflamatórias, estresse oxidativo e hipóxia (Deaglio, S. *et al.*, 2011; Eltzschig, H.K. *et al.*, 2009). Recentemente, foi mostrado que existe uma forma solúvel catalítica ativa da CD39 circulando no sangue humano e murino (Yegutkin, G.G. *et al.*, 2012).

CD73 é um dímero ancorado à membrana plasmática através do resíduo C-terminal da serina, ligado ao glicosilfosfatidil inositol (GPI), sem segmentos proteicos inseridos na membrana (Strater, N. 2006). Uma forma solúvel da CD73 pode ser separada da membrana através da clivagem proteolítica ou hidrólise do GPI ancorado pela fosfolipase específica para fosfatidilinositol (Heuts, D.P. *et al.*, 2012; Yegutkin, G.G. 2008). A forma madura da CD73 consiste de 548 aminoácidos com uma massa molecular estimada de 61 kDa. O domínio N-terminal coordena a ligação de dois íons metálicos catalíticos divalentes, enquanto o domínio C-terminal forma o sítio de ligação para o AMP (Strater, N. 2006). Também é importante ressaltar que o ADP e o ATP atuam como competidores inibitórios da CD73 (Knapp, K. *et al.*, 2012; Strater, N. 2006). CD73 é encontrada em uma variedade de tecidos, incluindo cólon, cérebro, rim, fígado, pulmão e coração (Thompson, L.F. *et al.*, 2004); em leucócitos derivados de sangue periférico, baço, linfonodos, timo e medula óssea (Thompson, L.F. *et al.*, 2004); assim como também no endotélio (Lennon, P.F. *et al.*, 1998). Existem evidências de que a expressão e a função dessa enzima aumentam na presença de

alguns mediadores pró-inflamatórios como IFNs, TNF, IL-1 β e prostaglandina E2 (Beavis, P.A. *et al.*, 2012; Regateiro, F.S. *et al.*, 2011).

Após a desfosforilação de AMP em adenosina pela CD73, a mesma é liberada no espaço extracelular e se liga aos receptores extracelulares de adenosina. Nucleotídeos e nucleosídeos de adenina agem sobre células do sistema imune induzindo a ativação ou o controle da inflamação dependendo do tipo de receptor a ser ativado e da concentração extracelular do agente. Os receptores extracelulares de adenosina possuem sete domínios transmembrana e usam o AMP cíclico (cAMP) como segundo mensageiro (Fredholm, B.B. *et al.*, 2001; Hasko, G. *et al.*, 2008). Existem 4 tipos diferentes de receptores de adenosina: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ (Fredholm, B.B. *et al.*, 2001). A ação da adenosina é determinada de acordo com o tipo de receptor a que ela se ligará (Kumar, V. *et al.*, 2009) e está relacionada à promoção de reparos através de várias ações como ação citoprotetora, angiogênica e anti-inflamatória (Fredholm, B.B. 2007). Portanto, a adenosina age como um sensor, proporcionando informações ao sistema imune sobre danos teciduais ou inflamações agudas que possam estar ocorrendo no organismo (Kumar, V. *et al.*, 2009).

A crescente conscientização a respeito do envolvimento da sinalização purinérgica na formação de respostas imunes e inflamatórias durante reações alérgicas tem promovido interesse científico nos papéis da CD39 e CD73 nesse contexto (Thompson, L.F. *et al.*, 2011). Muitos trabalhos têm demonstrado a importância destas moléculas já que existe um forte dano tecidual e complicações pulmonares crônicas manifestadas nos animais deficientes dessas ectonucleotidases em resposta a alérgenos (Thompson, L.F. *et al.*, 2011). Além disso, CD39 e CD73 são altamente expressas na superfície de células Tregs, que desempenham um papel fundamental no controle das respostas inflamatórias, e vêm sido cada vez mais usadas como marcadoras de atividade de Tregs (Mandapathil, M. *et al.*, 2009; O'Garra, A. *et al.*, 2004; Schuler, P.J. *et al.*, 2011). A atividade catabólica da CD39 e CD73 é sincronizada com o estado de ativação destas células. De fato, estudos mostraram que Tregs murinas exibem aumento de atividade da CD39 somente após a ativação de seus receptores de células T e foi visto que essa enzima é inativa em células não estimuladas (Borsellino, G. *et al.*, 2007). Este aumento da atividade metabolizadora de ATP parece ser crítico para a atividade imunossupressora de Tregs

(Ernst, P.B. *et al.*, 2010), o que torna importante estudos relacionando fatores da via purinérgica a mecanismos de controle das inflamações mediados por Tregs.

1.3 Microbiota Intestinal e o sistema imunológico

O trato gastrointestinal (TGI) é colonizado por um grande número de microrganismos que, coletivamente, são chamados de microbiota intestinal. Esta microbiota desempenha uma variedade de funções fisiológicas (Backhed, F. *et al.*, 2004) e é importante na maturação do sistema imunológico (Gueimonde, M. *et al.*, 2006).

O intestino humano apresenta uma enorme comunidade microbiana, tanto quantitativamente quanto em diversidade de espécies, com cerca de 10^{13} células de aproximadamente 500 espécies de organismos procariotos (Mazmanian, S.K. *et al.*, 2006; Sender, R. *et al.*, 2016). Os principais tipos de microrganismos encontrados na microbiota intestinal pertencem ao filo *Firmicutes* (Zhernakova, A. *et al.*, 2016). Os microrganismos da microbiota intestinal estão em constante movimento, ainda que em número pequeno, entre o TGI e os linfonodos mesentéricos. Este processo de passagem da microbiota através da mucosa é chamado de translocação. Em indivíduos saudáveis, essas poucas bactérias translocadas são mortas nos linfonodos e não se espalham para outros locais como baço, fígado e corrente sanguínea. Na verdade, a presença destes poucos microrganismos na lâmina própria e linfonodos pode ser benéfica para o sistema imune do hospedeiro que passa a ser capaz de responder mais rapidamente a patógenos exógenos (Berg, R.D. 1996).

De maneira geral, a microbiota intestinal de humanos e animais representa um ecossistema complexo e em equilíbrio. Os microrganismos presentes no trato gastrointestinal podem ter papéis distintos na manutenção deste equilíbrio. Algumas bactérias intestinais podem ser potencialmente patogênicas para o hospedeiro, estarem envolvidas na putrefação intestinal e na produção de substâncias tóxicas, carcinogênicas e mutagênicas. Outros componentes da microbiota, como lactobacilos e bifidobactérias podem conferir benefícios ao hospedeiro através da diminuição de triglicérides, da estimulação imune não invasiva e da capacidade de inibição de microrganismos prejudiciais. Em indivíduos saudáveis existe um balanço entre as populações bacterianas benéficas e as potencialmente patogênicas. Fatores como terapias antibióticas ou com radiação, estresse e infecções podem levar a distúrbios

neste equilíbrio, aumentando a predisposição a um risco maior de doenças (Isolauri, E. *et al.*, 2004).

A importância da microbiota intestinal no desenvolvimento do sistema imunológico do hospedeiro foi primeiramente demonstrada em camundongos sem germes (Macpherson, A.J. *et al.*, 2004a; Round, J.L. *et al.*, 2009), que possuem tecido linfóide intestinal e mesentérico pouco desenvolvidos, diminuição na produção de IgA, deficiência na regulação das populações de células T no tecido intestinal e menor resistência a infecções. Essas diferenças na função imunológica podem ser revertidas introduzindo a microbiota intestinal nesses animais. (Gensollen, T. *et al.*, 2016; Smith, K. *et al.*, 2007).

1.4 Papel da microbiota intestinal na asma e doenças alérgicas

Muitas teorias já foram elaboradas para explicar o aumento das taxas de asma nas últimas décadas, desde que esse aumento na sua prevalência se tornou aparente. Entre as mais convincentes está a hipótese da higiene de Strachan, originalmente levantada em um estudo com a febre do feno e que também é utilizada para explicar a prevalência de diferentes doenças alérgicas. (Lynch, S.V. *et al.*, 2016; Strachan, D.P. 1989). A hipótese afirma que os ambientes cada vez mais limpos e estéreis da vida moderna têm promovido o desenvolvimento de várias doenças alérgicas, inclusive a asma, e as evidências em apoio a essa hipótese vêm aumentando desde a proposta inicial feita por Strachan (Lynch, S.V. *et al.*, 2016; Strachan, D.P. 2000). Em outras palavras, o aumento das doenças alérgicas, ao contrário do que se pensava, é uma consequência involuntária da redução na exposição ou colonização microbiana. Essa redução afeta a composição da microbiota intestinal na infância e essas mudanças alteram interações funcionais entre microbiota e hospedeiro que remodelam padrões de respostas imunes a alérgenos e infecções virais respiratórias (Lynch, S.V. *et al.*, 2016).

A ideia de que a exposição a microrganismos pode proteger contra a asma é antiga e começou durante a observação de pessoas que viviam em ambientes rurais. Morar em ambientes rurais, onde microrganismos são bastante comuns, tem sido associado à proteção contra asma (von, M.E. *et al.*, 2010) e uma variedade de estudos já concluíram que viver nestes ambientes (Braun-Fahrlander, C. *et al.*, 2002; Feng, M. *et al.*, 2016; Illi, S. *et al.*, 2012; Riedler, J. *et al.*, 2000; Sordillo, J.E. *et al.*, 2010; Von

Ehrenstein, O.S. *et al.*, 2000) e conviver com animais e sujeira (Ege, M.J. *et al.*, 2007; Riedler, J. *et al.*, 2001) pode promover proteção contra o desenvolvimento de alergias e problemas respiratórios. Pesquisas sugerem que a exposição às endotoxinas, um componente das paredes celulares de bactérias Gram negativas, está negativamente correlacionada com o desenvolvimento de asma em crianças que vivem em ambientes rurais (Karvonen, A.M. *et al.*, 2012). Recentemente, a correlação tem sido estendida não somente às endotoxinas, mas também a vários produtos bacterianos que podem promover proteção contra o desenvolvimento da asma (Karvonen, A.M. *et al.*, 2014). Estudos têm demonstrado em alguns modelos de doenças, por exemplo, o papel protetivo dos ácidos graxos de cadeia curta, que são um dos principais produtos metabólicos de bactérias comensais são derivados da fermentação de fibras alimentares (Macia, L. *et al.*, 2015). Atualmente, os pesquisadores já conhecem muitas populações de microrganismos específicos que podem proteger contra a doença. (Abrahamsson, T.R. *et al.*, 2014; Arrieta, M.C. *et al.*, 2015; Bisgaard, H. *et al.*, 2011; Chen, Y. *et al.*, 2007; Ege, M.J. *et al.*, 2011; Lynch, S.V. *et al.*, 2014). Um dos grupos de microrganismos mais bem estudados são os pertencentes ao Filo Gram positivo *Firmicutes*. Pesquisas mostraram que um maior contato com bactérias do filo *Firmicutes* leva a proteção contra a asma (Arrieta, M.C. *et al.*, 2015; Ciaccio, C.E. *et al.*, 2015; Ege, M.J. *et al.*, 2011; Lynch, S.V. *et al.*, 2014; Vael, C. *et al.*, 2011), com exceção da espécie entérica patogênica *Clostridium difficile*, que na verdade pode aumentar sua predisposição (van Nimwegen, F.A. *et al.*, 2011). A importância do filo *Firmicutes* ilustra a necessidade de se identificarem mais microrganismos em vez de apenas produtos microbianos como endotoxinas, pois, bactérias Gram positivas, como as *Firmicutes*, não possuem a membrana externa contendo endotoxina característica de bactérias Gram negativas, e a influência desses organismos não teria sido considerada nesses estudos exclusivamente avaliando a endotoxina (Adami, A.J. *et al.*, 2016).

1.5 Probióticos e o sistema imunológico

O termo probiótico é definido como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício para a saúde do hospedeiro” (Hill, C. *et al.*, 2014). De acordo com Reid um microrganismo deve possuir certos requisitos básicos para ser considerado um probiótico. São eles: ser capaz de resistir ao estresse do ambiente gastrointestinal e se estabelecer; permanecer viável no ambiente intestinal; ser seguro, não invasivo e não patogênico e exercer algum tipo de benefício ao hospedeiro (Reid, G. 1999).

Os microrganismos probióticos mais conhecidos são comumente dos gêneros *Lactobacillus* ou *Bifidobacterium*, apesar de já terem sido identificados também outras bactérias ácido-láticas e *Escherichia coli* não patogênicas que promovem benefícios à saúde (Forsythe, P. 2011). As espécies do gênero *Lactobacillus* possuem propriedades importantes, por exemplo: eficiente aderência às células epiteliais intestinais, que reduzem ou previnem a colonização de patógenos, crescimento competitivo (Tang, R.B. *et al.*, 2015) e produção de diferentes tipos de substâncias que estimulam a imunidade do hospedeiro através de diversos mecanismos (Collado, M.C. *et al.*, 2007).

Probióticos administrados oralmente podem interagir com a mucosa gastrointestinal e com o tecido linfóide associado ao intestino, onde mais de 70% das células imunes estão localizadas (Lebeer, S. *et al.*, 2010). Os probióticos interagem de diversas formas com macrófagos, DCs da mucosa e células do epitélio intestinal. Os receptores de reconhecimento padrão (PRRs) como os receptores do tipo Toll (TLRs) exercem um papel fundamental no reconhecimento e transmissão de sinais que exercem diferentes tipos de resposta. Estudos mostraram que os probióticos podem afetar a resposta T-helper (Th) tanto atingindo diretamente suas funções como indiretamente via células Tregs (Tang, M.L. 2009). Estirpes bacterianas específicas podem induzir a produção de citocinas Th1 como IL-12, IL1 β e TNF, enquanto outras podem estimular respostas Th2 desencadeando sinais de tolerância e induzindo a produção de citocinas anti-inflamatórias como TGF- β e IL-10. As DCs e os macrófagos contidos nesse meio enriquecido com IL-10 e TGF- β , podem aumentar a geração de células Tregs, que desempenham um papel fundamental na tolerância imune periférica. Além das estirpes que induzem as respostas Th1 ou Th2 existem ainda aquelas que podem desencadear uma mistura das duas respostas (Kang, H.J. *et al.*,

2015; Tang, M.L. 2009). Outro benefício ocasionado pela administração de probióticos que já foi sugerido é o aumento da produção de IgA na resposta contra antígenos orais ou parenterais. Pesquisadores encontraram um maior número de células secretoras de IgA específica para leite de vaca em lactantes que ingeriram leite de vaca suplementado com os probióticos *Lactobacillus rhamnosus* GG e *Bifidobacterium lactis* Bb-12, em comparação com o grupo placebo de lactantes (Pohjavuori, E. *et al.*, 2004; Tang, M.L. 2009).

No entanto, os microrganismos probióticos não interagem somente com a mucosa intestinal. Atualmente existem cada vez mais evidências de que probióticos administrados por via oral também são capazes de regular respostas imunes fora do TGI, como por exemplo, na mucosa respiratória (Forsythe, P. 2011).

1.6 Probióticos na asma e doenças alérgicas

Apesar de um grande número de pesquisadores estarem investigando estratégias para prevenção e tratamento da asma (Holloway, J.W. *et al.*, 2008; Martinez, F.D. 2007), muitos dos objetivos ainda não foram alcançados e estudos ainda são necessários na área. O aumento da prevalência e dos custos com a doença têm motivado a busca por tratamentos através de terapias com potencial efeito imunomodulador. O papel crítico das citocinas Th2 na asma tem levado ao desenvolvimento de vários agentes imunobiológicos para o tratamento, no entanto, os resultados nos testes clínicos vêm sendo decepcionantes. Apesar das evidências experimentais de que o bloqueio da IL-4 reduz a inflamação alérgica, uma segunda fase dos testes utilizando este método mostraram que esta terapia não provocou efeito nos pacientes (Hart, T.K. *et al.*, 2002). Estudos similares bloqueando IL-5 (Leckie, M.J. *et al.*, 2000) ou IL-13 (Flood-Page, P. *et al.*, 2007) demonstraram reduções em alguns aspectos patofisiológicos, mas nenhuma melhoria dos sintomas. Exemplos como estes levantam dúvidas a respeito da eficácia destes tratamentos que visam atingir uma só molécula em uma doença tão complexa, ilustrando assim a necessidade de novas estratégias para o controle da asma (Adami, A.J. *et al.*, 2016).

Com isso, a utilização dos probióticos vem se tornando cada vez mais investigada nesse contexto e recentes evidências sugeriram que os probióticos podem proporcionar benefícios terapêuticos não só na asma, mas também em outras doenças atópicas (Fiocchi, A. *et al.*, 2015; Madhok, V. *et al.*, 2015; Tang, R.B. *et al.*,

2015). Inicialmente, é importante ressaltar que, até agora, os estudos com humanos em risco de desenvolvimento de alergia ainda não mostraram efeitos benéficos significantes da utilização dos probióticos na incidência da doença (Vliagoftis, H. *et al.*, 2008). No entanto, existem evidências em modelos animais indicando que a administração de certos probióticos podem modular respostas alérgicas no trato respiratório (Blumer, N. *et al.*, 2007; Feleszko, W. *et al.*, 2007; Forsythe, P. *et al.*, 2007; Hougee, S. *et al.*, 2010). Estes efeitos benéficos são específicos para cada estirpe e a eficácia observada também é possivelmente influenciada pelos protocolos de sensibilização antigênica e desafio utilizados no modelo animal (Forsythe, P. 2011).

Embora os mecanismos exatos por trás da ação antialérgica destas bactérias permaneçam obscuros, vários componentes potenciais desta resposta foram destacados. Levando em consideração que a asma é uma doença inflamatória mediada por linfócitos T e há sugestões de que o sistema imune da mucosa está envolvido, com migração de linfócitos T ativados de um local da mucosa para outro, os efeitos benéficos dos probióticos aparentemente estão fortemente associados com mudanças no balanço das respostas das células T que levam a redução na atividade Th2. De fato, existem cada vez mais estudos mostrando que a habilidade de induzir classes de células Tregs que atenuam tanto a resposta Th1 quanto a Th2 pode ser um elemento essencial na ação anti-inflamatória dos organismos probióticos (Forsythe, P. 2011). Diversas populações de Tregs desempenham um papel importante regulando respostas Th2 a alérgenos e mantendo uma tolerância funcional. Tregs podem ser detectadas nos locais de inflamação e, em várias situações, sua habilidade de migrar para o tecido inflamado e permanecer nele é importante para sua função in vivo. Em modelos de asma em roedores, Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ são recrutadas para os pulmões e linfonodos drenantes e podem suprimir o excesso de secreção de muco, hiperresponsividade e eosinofilia induzida por alérgenos nas vias aéreas (Leech, M.D. *et al.*, 2007; Wilson, M.S. *et al.*, 2005).

1.7 *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20

O microrganismo *L. delbrueckii* UFV-H2b20, que primeiramente foi identificado como *Lactobacillus acidophilus* e é um pertencente do filo *Firmicutes*, pode ser considerado um probiótico pois, preenche os requisitos básicos que uma estirpe microbiana necessita para ser classificada como tal, a saber: ser capaz de resistir às

condições de estresse no trato gastrointestinal; se estabelecer e conferir benefícios ao seu hospedeiro (Neumann, E. *et al.*, 1998a). *L. delbrueckii* UFV-H2b20 é um habitante normal do trato intestinal já que foi isolado de fezes de uma criança recém-nascida na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais (Santos, N.S. 1984).

Alguns trabalhos do nosso grupo já mostraram a capacidade de *L. delbrueckii* UFV-H2b20 em estimular o sistema imunológico do hospedeiro: Neumann *et al.* demonstraram que esta estirpe bacteriana é capaz de sobreviver às condições do trato intestinal de camundongos e se manter em número elevado em todas porções do mesmo (Neumann, E. *et al.*, 1998b). Neste mesmo trabalho, também foi demonstrada a capacidade de *L. delbrueckii* UFV-H2b20 em estimular as defesas imunes do hospedeiro, visto que camundongos monoassociados mostraram uma maior capacidade fagocítica dos macrófagos, maior eliminação de bactérias Gram-negativas inoculadas via intravenosa e duas vezes mais células de Kupffer, responsáveis pelo clareamento das bactérias circulantes (Neumann, E. *et al.*, 1998a); Vieira *et al.* mostraram que *L. delbrueckii* UFV-H2b20 aumenta a eliminação de *E. coli* e a produção de citocinas inflamatórias sistêmicas, além de proteger camundongos contra a infecção por *Salmonella enterica serovar Typhimurium* (Vieira, L.Q. *et al.*, 2008); Neumann *et al.* mostraram que *L. delbrueckii* UFV-H2b20 induz a produção de citocinas Th1 por camundongos *in vitro* e *in vivo* (Neumann, E. *et al.*, 2009); Dos Santos *et al.* demonstraram que a monoassociação com *L. delbrueckii* UFV-H2b20 estimula o sistema imune e protege camundongos sem germes contra a infecção por *Listeria monocytogenes* (dos Santos, L.M. *et al.*, 2011) e, finalmente, em um outro trabalho também do nosso grupo (ainda não publicado) DOS SANTOS observou que *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 promove efeitos protetores na inflamação alérgica pulmonar em camundongos. Seus dados mostraram que o tratamento oral com o probiótico diminuiu significativamente o influxo de células para o pulmão, o número de eosinófilos, linfócitos e monócitos no BAL e de células T CD44⁺ e produção de IL-4 no pulmão em comparação com o grupo controle. Não foram observadas diferenças nos níveis de IgE anti-OVA no soro e, interessante, foi visto um aumento no número de células Tregs Foxp3⁺ no pulmão dos animais tratados com o probiótico.

Apesar de existirem estudos com resultados consistentes mostrando a ação de *L. delbrueckii* UFV-H2b20 no sistema imunológico do hospedeiro, ainda não se sabe

sobre os mecanismos de ação utilizados pelo mesmo para provocar este efeito. Portanto, levando em consideração todos os benefícios provocados por este probiótico, principalmente o fato dele provocar um aumento de células Tregs no local da inflamação e também o fato de as Tregs serem células com uma alta expressão das moléculas CD39 e CD73, importantes nos mecanismos de controle das inflamações, faz-se importante a investigação de uma possível participação de CD39 e CD73 no mecanismo de ação do probiótico *L. delbrueckii* UFV-H2b20.

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar os mecanismos de ação pelo qual *L. delbrueckii* UFV-H2b20 exerce seu efeito protetor durante a inflamação alérgica pulmonar experimental em camundongos, analisando a possível participação das moléculas CD39 e CD73 na produção deste efeito.

2.2 Objetivos Específicos

- A. Fazer uma avaliação do perfil de células imunes no BAL e pulmão dos camundongos alérgicos tratados e alérgicos não tratados com *L. delbrueckii* UFV-H2b20;
- B. Medir a expressão de CD39 e CD73 nos Linfócitos T de camundongos alérgicos tratados e alérgicos não tratados com *L. delbrueckii* UFV-H2b20;
- C. Investigar se os efeitos reguladores são promovidos diretamente pelo probiótico *L. delbrueckii* UFV-H2b20 ou através de algum metabólito produzido por ele.
- D. Avaliar um possível balanço Th1/Th2 promovido por *L. delbrueckii* UFV-H2b20 através da avaliação de citocinas.

3. Materiais e Métodos

3.1 Animais experimentais

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA/UFMG), sob o número do protocolo 139/2015. Foram utilizados camundongos livres de patógenos específicos (SPF), isogênicos, fêmeas, da linhagem BALB/cJUnib com 5-6 semanas de idade, obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os camundongos foram agrupados em quatro a cinco animais por gaiola e mantidos em condições de temperatura e fotoperíodo controlados, no biotério do Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB - UFMG, em gaiolas autoclavadas, em estantes ventiladas (Alesco, Campinas, SP, Brasil), recebendo ração, maravalha e salina esterilizadas.

3.2 Cultivo e Tratamento com *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20

O microrganismo *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 foi isolado na Universidade Federal de Viçosa (UFV) de fezes de uma criança recém-nascida e trazido para a UFMG em meio LDR (leite desnatado reconstituído) 12%. Este material foi expandido em 1 L de LDR 12% e cultivado 18 horas a 37°C. Esta cultura foi alíquotada e estas alíquotas foram usadas como cultura estoque em nossos experimentos. Para a associação dos animais, 100µL desta preparação eram inoculados em 10 ml de caldo MRS (deMan, Rogosa e Sharpe, Merck, São Paulo, SP, Brasil) e cultivados por 18 horas a 37°C. A cultura era centrifugada a 2000 x *g* a 4°C, lavada uma vez em salina 0,9% esterilizada, ressuspendida em 5 ml de salina 0,9%, e colocada na mamadeira dos animais contendo salina esterilizada 0,9% para ingestão. A concentração das culturas administradas foi calculada para que cada animal ingerisse no mínimo 10⁹ UFC por dia (Neumann, E. *et al.*, 1998a). Os animais que receberam o tratamento com o sobrenadante da cultura ou com meio de cultura de *L. delbrueckii* UFV-H2b20 ingeriram salina esterilizada 0,9% com os devidos tratamentos adicionados a 9%. Os animais dos grupos controle recebiam somente salina esterilizada 0,9%. Os tratamentos foram mantidos durante todo o período de indução da inflamação alérgica pulmonar até o dia da eutanásia dos animais. Durante o tratamento a quantidade de líquido ingerido dos grupos tratados e não tratados foi quantificada e, para isso, foram utilizados materiais devidamente esterilizados.

3.3 Indução da Inflamação Alérgica Pulmonar

Dez dias após o início do tratamento por via oral com *L. delbrueckii* UFV-H2b20, os camundongos eram sensibilizados por via subcutânea com 200 µl de uma solução contendo 1 µg de ovalbumina (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, EUA) e 1 mg de hidróxido de alumínio em salina estéril 0,9%. O grupo controle recebeu apenas hidróxido de alumínio (SEM S/A, Hortolândia, São Paulo, Brasil) na mesma concentração. Após 14 dias, os animais receberam um reforço, também por via subcutânea, contendo 1 mg de hidróxido de alumínio em 200 µl de salina. O grupo controle recebeu apenas salina. O desafio com ovalbumina por nebulização foi iniciado sete dias após o reforço. Os animais respiraram OVA 1% em salina estéril 0,9% durante 20 minutos por dia durante sete dias consecutivos e foram eutanasiados após o último desafio.

3.4 Lavado Broncoalveolar (BAL)

Após a eutanásia, a traqueia de cada animal foi exposta e canulada com um cateter de polipropileno (1,7 mm). O lavado foi realizado pela injeção de duas alíquotas de 1,2 ml de PBS (salina tamponada com fosfato 0,1 M, pH 7,3) estéril gelado, por três vezes cada uma, obtendo-se, aproximadamente, 2 ml de volume final recuperado do lavado. O fluido recolhido do lavado foi centrifugado 300 x g por 10 minutos a 4°C. O sedimento de células foi ressuscitado em 100 µl de RPMI (Gibco BRL Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) 10% de soro fetal bovino (SFB) para a contagem total e diferencial de leucócitos e análise por citometria de fluxo.

3.5 Avaliação do perfil celular e expressão de CD39 e CD73 por citometria de fluxo

O BAL e os pulmões direitos dos animais foram coletados após o último desafio com OVA para a análise do perfil celular e expressão de CD39 e CD73 por citometria de fluxo. As amostras de pulmão eram perfundidas com 5 ml de PBS pelo ventrículo direito do coração, para remoção de sangue do leito vascular pulmonar, e imediatamente removidos. Os pulmões direitos foram cortados em pedaços menores e incubados por 40min em 1 ml de meio RPMI (Gibco BRL Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) sem SFB contendo 125 µg/ml de liberase TL (ROCHE, Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) e 0,005 g/ml de desoxiribonuclease I (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, EUA). Após este período foi adicionado mais 1 ml de RPMI

contendo 10% de SFB por amostra para bloquear a reação de digestão. As amostras de pulmão foram então maceradas, e os homogenatos de pulmão e o BAL coletado foram centrifugados a 300 x g por 10 minutos a 4°C. Posteriormente, as células foram incubadas por 20 minutos a 4°C com os seguintes marcadores: anti-CD11b (clone M1/70); anti-Ly6C (clone HK1.4); anti-CD11c (clone HL3); anti-siglecF (clone E50-2440); anti-F4/80 (clone BM8); anti-Ly6G (clone 1A8); anti-MHC II (clone AF6-120.1); anti-TCR- β (clone H57-497); anti-CD3 (clone 145-2C11); anti-CD4 (clone GK1.5); anti-FOXP3 (clone MF23); anti-CD8 (clone 53-6.72); anti-CD39 (clone eBioA1); anti-CD73 (clone TY/23) e anti-CD16/CD32 (clone 24G.2) para bloqueio de receptores de Fc. Exceto quando especificado o contrário, todos os anticorpos utilizados foram da BD (BD Biosciences Pharmingen, São Jose, CA, EUA). Foi utilizado, também, o kit para avaliação de viabilidade celular LIVE/DEAD Aqua (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) seguindo as especificações do fabricante. Em seguida, adicionou-se 1 ml de PBS a 4°C e as amostras foram centrifugadas a 300 x g por 10 minutos a 4°C para remoção de excesso de anticorpos. As amostras foram analisadas logo em seguida. Duzentas mil células foram adquiridas para cada amostra, usando o citômetro de fluxo FACSCanto™ II (BD Biosciences, São Jose, CA, EUA). As análises foram realizadas no software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, EUA).

3.6 Contagem total das células do BAL

A contagem do número total de leucócitos presentes no BAL foi realizada na diluição de 1:10 empregando o corante azul de Trypan em câmara de Neubauer e visualização em microscópio óptico.

3.7 Análise histológica do pulmão

Após serem perfundidos e coletados, os pulmões esquerdos dos animais foram fixados em solução de formalina diluída a 10% em solução salina 0,9% e acondicionado até o processamento das amostras. Em seguida, as amostras foram desidratadas, diafanizadas em xilol e embebidas em blocos de parafina. Com auxílio de um micrótomo, foram obtidos cortes histológicos de 4 mm de secções dos pulmões dispostos em lâminas de microscopia. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (HE), para avaliação do infiltrado inflamatório. As análises histológicas foram realizadas sob microscopia de luz utilizando as objetivas de 10 a 400 vezes de aumento.

3.8 Detecção de citocinas no pulmão

Os pulmões esquerdos dos animais, quando não utilizados para análise histológica, eram perfundidos, coletados e congelados a -70°C para posterior dosagem de citocinas. As amostras foram adicionadas à solução para extração de citocinas: uma cápsula do inibidor de proteases (ROCHE, Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) diluída em 50 ml de PBS, na proporção de 1000 μl desta solução para 50 mg de tecido. O tecido foi, então, macerado com homogeneizador elétrico e centrifugado a $8944 \times g$ por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi recolhido, e congelado a -70°C até a realização do ELISA. As dosagens de IFN- γ e IL-10 a partir do sobrenadante do homogenato dos pulmões foram feitas com a utilização de kits (BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA) exclusivos para a detecção dessas citocinas e o procedimento foi feito exatamente como recomenda o fabricante. O limite de detecção foi de 2 ng/ml nas duas citocinas. A ELISA para detectar IL-4 foi feita utilizando o anticorpo de cobertura 11B11 mAb e BVD6 mAb biotinizada (gentilmente fornecidos pelo professor Luís Carlos Crocco Afonso, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, MG). O limite de detecção para este ensaio foi de 1ng/ml.

3.9 Análises estatísticas

A análise estatística e a construção dos gráficos foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram determinadas por análise de variância de uma via (One Way-ANOVA), seguida pelo método pós-teste Bonferroni. Resultados envolvendo dois grupos experimentais foram analisados pelo teste t de Student. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão da média. Todos os dados foram considerados estatisticamente significantes se $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1 Verificação da ingestão e eficácia do tratamento com o probiótico *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20

Primeiramente, com o objetivo de conferir se os animais estavam ingerindo satisfatoriamente o tratamento fornecido, foi realizada uma dosagem da quantidade de líquido ingerido por cada grupo. Os animais foram divididos em três grupos de cinco indivíduos. O primeiro grupo foi o grupo controle negativo (controle) que ingeriu somente salina 0,9% durante todo o experimento e não passou pela indução da inflamação alérgica pulmonar com OVA; o segundo grupo foi o grupo controle positivo (alergia) que ingeriu somente salina 0,9% durante todo o experimento e passou pela indução da inflamação alérgica pulmonar com OVA; o terceiro grupo foi o grupo tratado (alergia+LAC) que ingeriu salina 0,9% suplementada com *L. delbrueckii* UFV-H2b20 em uma quantidade suficiente para que cada animal ingerisse no mínimo 10^9 UFC por dia (Neumann, E. *et al.*, 1998a) durante todo o experimento e passou pela indução da inflamação alérgica pulmonar com OVA. Na figura 3, observa-se que todos os grupos ingeriram as mesmas quantidades de líquidos. Isso mostra que os animais tratados ingeriram o tratamento satisfatoriamente, sugerindo assim, que a solução com o probiótico não foi impalatável para os mesmos.

Após comprovada a ingestão do tratamento pelos camundongos, foram feitas análises histológicas do pulmão e contagens de células totais do BAL para a comprovação da eficácia do tratamento em diminuir o infiltrado inflamatório nos pulmões. Foi observada uma visível diminuição do infiltrado inflamatório do grupo alergia+LAC em comparação ao grupo alergia (Figura 4A), assim como o número total de células no BAL dos animais deste grupo também foram menores (Figura 4B).

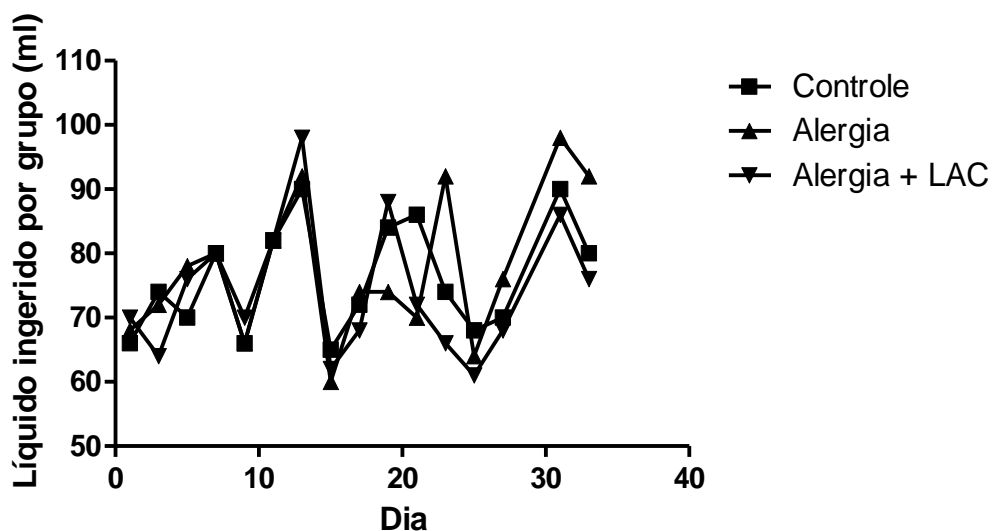


Figura 3. Líquido ingerido por grupo (ml): Os animais foram divididos em três grupos: controle (■) que ingeriu somente salina 0,9% durante todo o experimento e não passou pela indução da inflamação alérgica pulmonar com OVA; Alergia (▲) que ingeriu somente salina 0,9% durante todo o experimento e passou pela indução da inflamação alérgica pulmonar com OVA; Alergia+LAC (▼) que ingeriu salina 0,9% suplementada com *L. delbrueckii* UFV-H2b20 em uma quantidade suficiente para que cada animal ingerisse no mínimo 10^9 UFC por dia. A ausência de diferença significativa entre os grupos foi concluída com base no $p > 0,05$. (n = 5 camundongos por grupo)

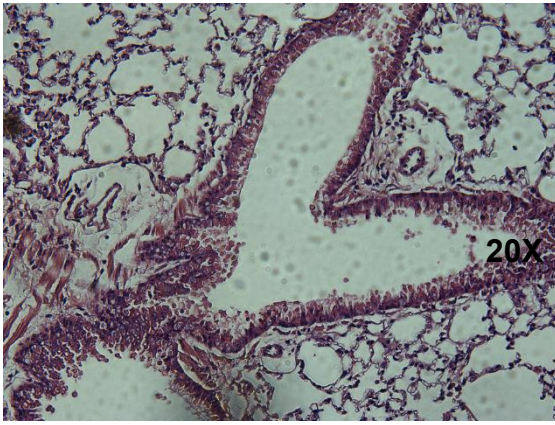
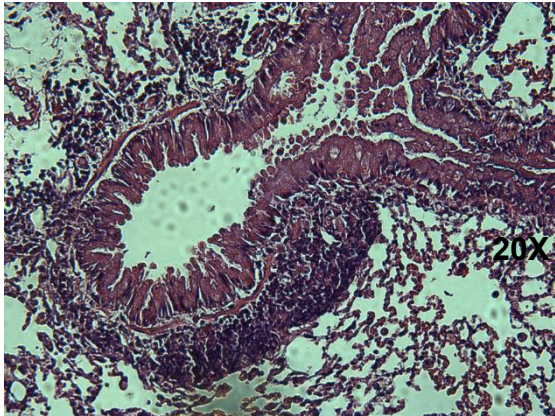
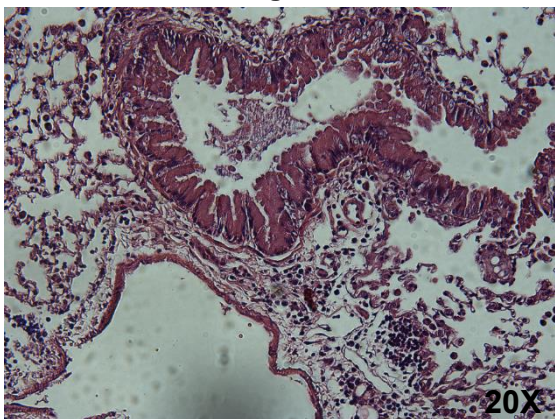
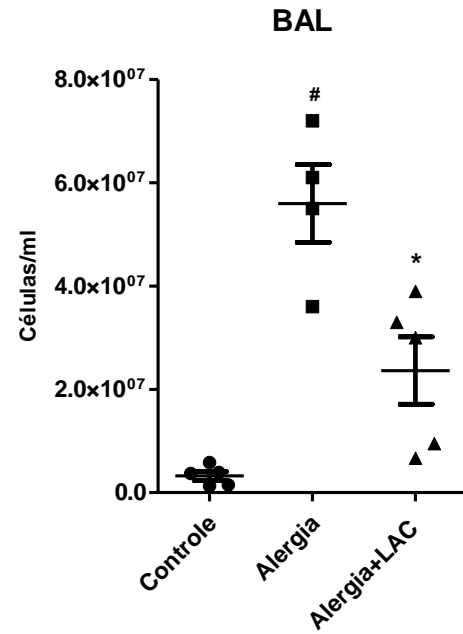
A**Controle****Alergia****Alergia+LAC****B**

Figura 4. Histologia do pulmão e contagem de células totais no BAL: Camundongos do Grupo alergia e alergia+LAC foram desafiados por nebulização com OVA 10mg/ml e o grupo controle foi nebulizado somente com salina 0,9%. O BAL e os pulmões dos animais foram coletados após o último desafio com OVA. Os pulmões esquerdos foram fixados em formol 10% e embebidos em parafina. Em seguida foram corados com hematoxilina-eosina (HE), para avaliação do infiltrado inflamatório. O BAL foi centrifugado 400 x *g* por 10 minutos a 4°C. O sedimento de células foi ressuscitado em 100 µl de RPMI (GIBCO) 10% SFB para a contagem total de células. **A)** Histologia do pulmão; **B)** Contagem de células totais do BAL. (n = 5 animais por grupo). # Diferença significativa entre Controle e Alergia; * Diferença significativa entre Alergia e Alergia+LAC (p < 0,05).

4.2 Análise do perfil celular no BAL e Pulmão

Visto que os resultados anteriores revelaram uma diminuição do infiltrado inflamatório nos pulmões dos animais alergia+LAC em relação aos animais alergia, foi verificado, em seguida, o perfil de células mielóides no BAL destes camundongos. Os dados obtidos através de citometria de fluxo mostram uma significativa redução no número de eosinófilos (Figura 5A), monócitos inflamatórios e macrófagos alveolares (Figura 5B) no BAL dos camundongos alergia+LAC em comparação com os camundongos alergia. Não foram observadas diferenças significativas nos números de neutrófilos (Figura 6A) e células dendríticas (Figura 6B) (Misharin, A.V. *et al.*, 2013). Posteriormente, foi verificado o perfil de células linfóides no pulmão destes animais. Interessantemente, a figura 7 mostra que houve um aumento de Linfócitos T CD4⁺, Linfócitos T reguladores (Figura 7A) e Linfócitos T CD8⁺ (Figura 7B) no pulmão dos animais alergia+LAC em comparação com os animais alergia, sugerindo, desta forma, que este aumento pode ser provocado pelo tratamento com *L. delbrueckii* UFV-H2b20.

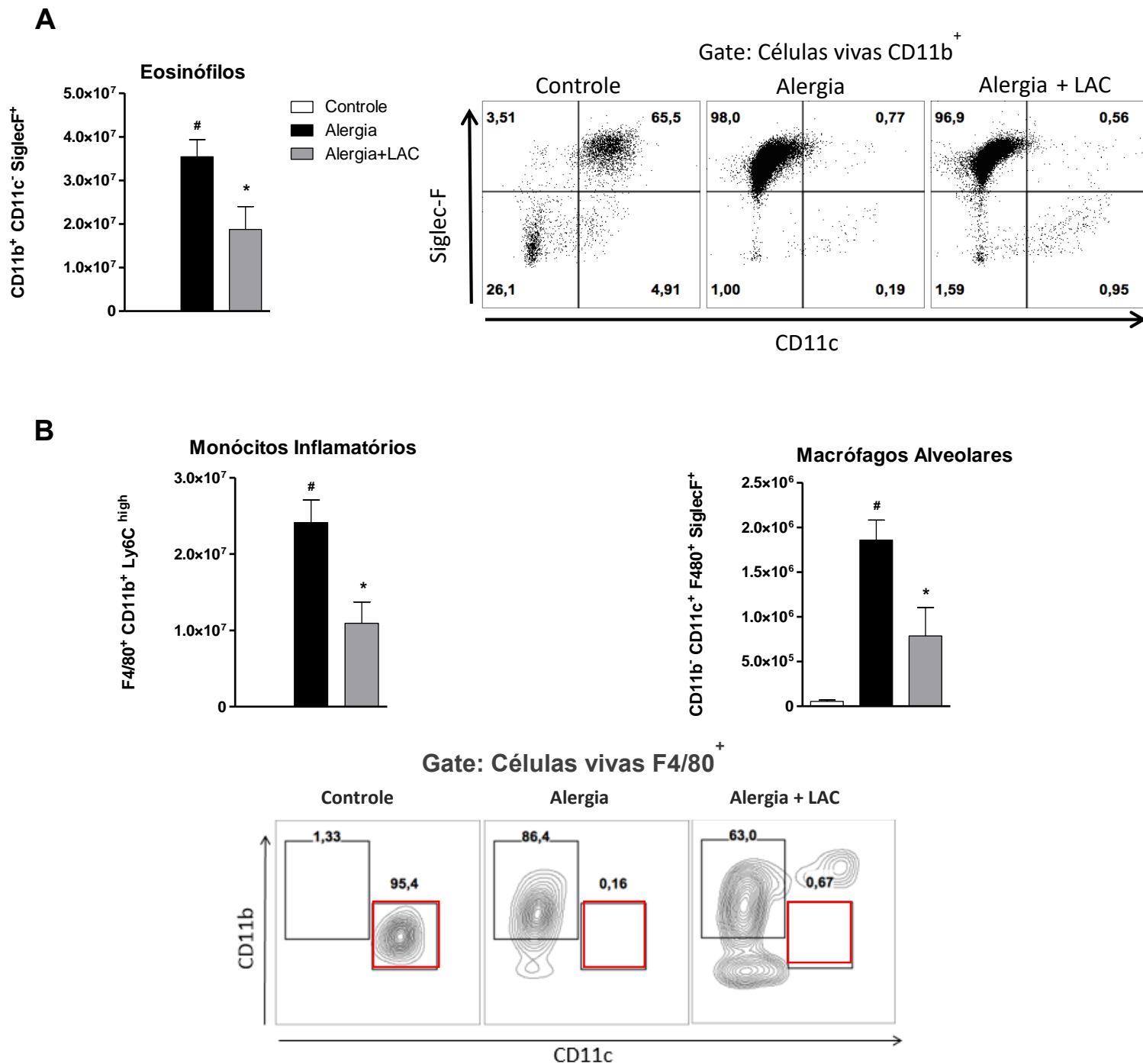


Figura 5. Análise de monócitos inflamatórios, eosinófilos e macrófagos alveolares no BAL por citometria de fluxo: Camundongos do Grupo alergia e alergia+LAC foram desafiados por nebulização com OVA 10mg/ml e o grupo controle foi nebulizado somente com salina 0,9%. O BAL dos animais foi coletado após o último desafio com OVA, centrifugado 400 x g por 10 minutos a 4°C. O sedimento de células foi ressuspensionado em 100 µl de RPMI (GIBCO) 10% SFB para análise por citometria de fluxo. **A)** Eosinófilos (CD11b⁺ CD11c⁻ SiglecF⁺); **B)** Monócitos inflamatórios (CD11b⁺ Ly6C^{high}) e Macrófagos alveolares (CD11b⁻ CD11c⁺ F480⁺ SiglecF⁺). (n = 5 animais por grupo). Quadrado vermelho: macrófagos alveolares; #Diferença significativa entre Controle e Alergia; *Diferença significativa entre alergia e alergia+LAC (p < 0,05).

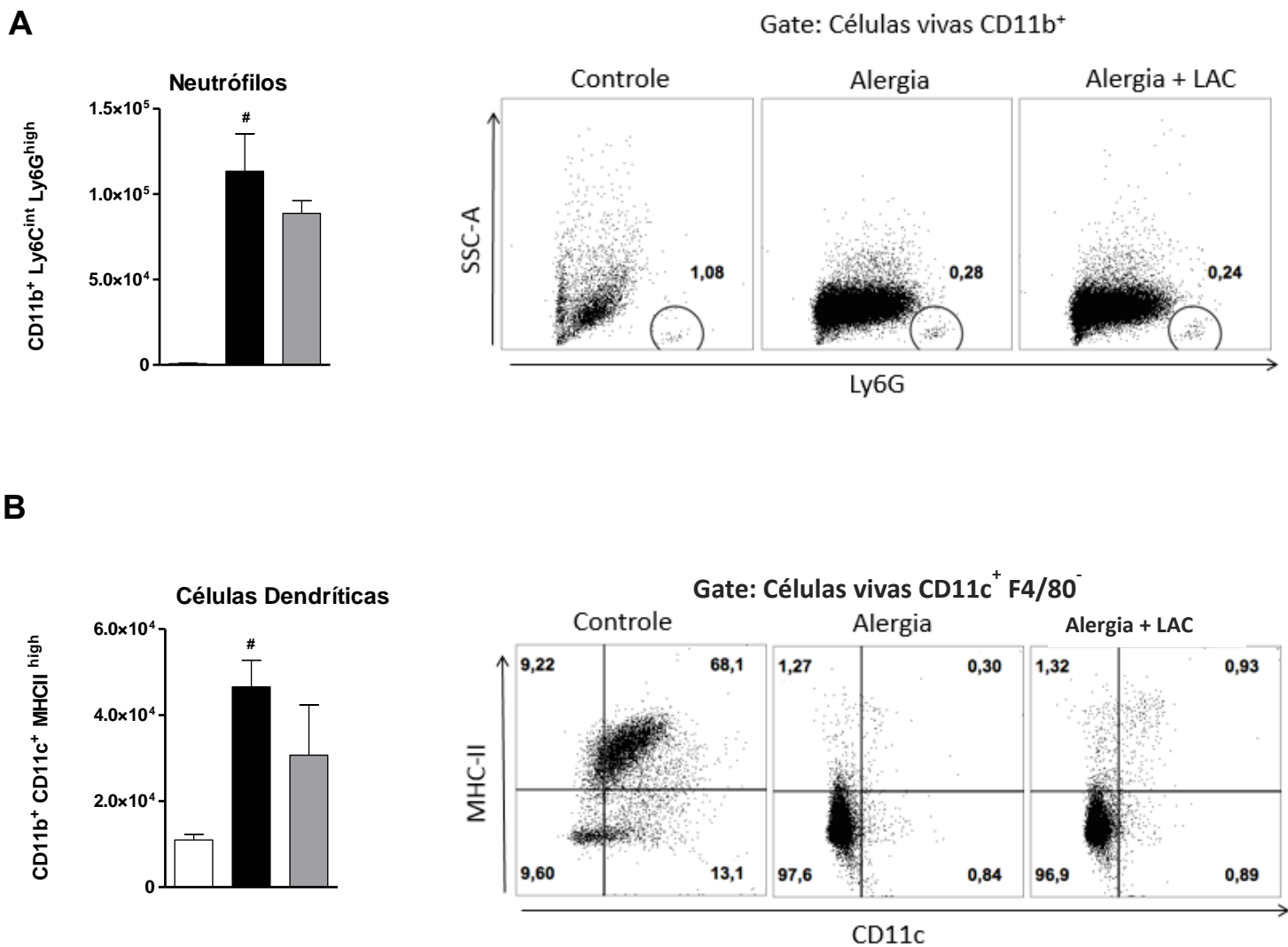


Figura 6. Análise de neutrófilos e células dendríticas no BAL por citometria de fluxo: Camundongos do Grupo alergia e alergia+LAC foram desafiados por nebulização com OVA 10mg/ml e o grupo controle foi nebulizado somente com salina 0,9%. O BAL dos animais foi coletado após o último desafio com OVA, centrifugado 400 x g por 10 minutos a 4°C. O sedimento de células foi ressuspensionado em 100 µl de RPMI (GIBCO) 10% SFB para análise por citometria de fluxo. **A)** Neutrófilos (CD11b⁺ Ly6C^{int} Ly6G^{high}); **B)** Células dendríticas (CD11b⁺ CD11c⁺ MHCII^{high}); (n = 5 animais por grupo); #Diferença significativa entre controle e alergia; (p < 0,05).

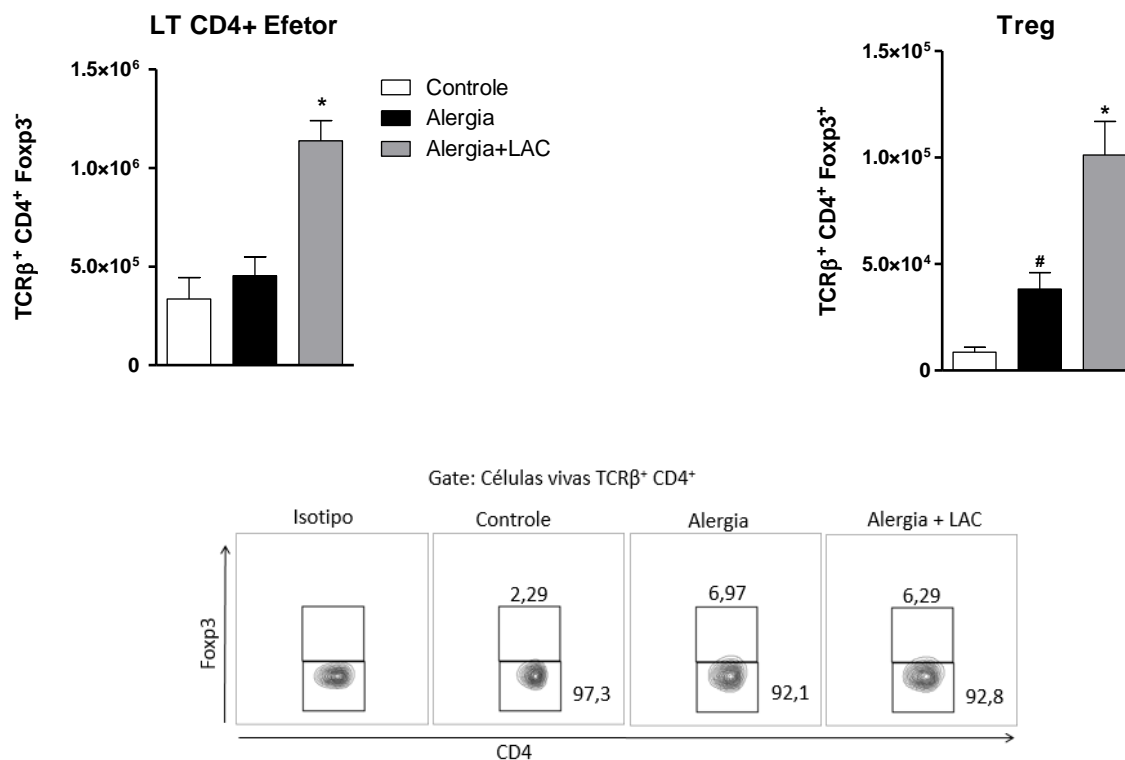
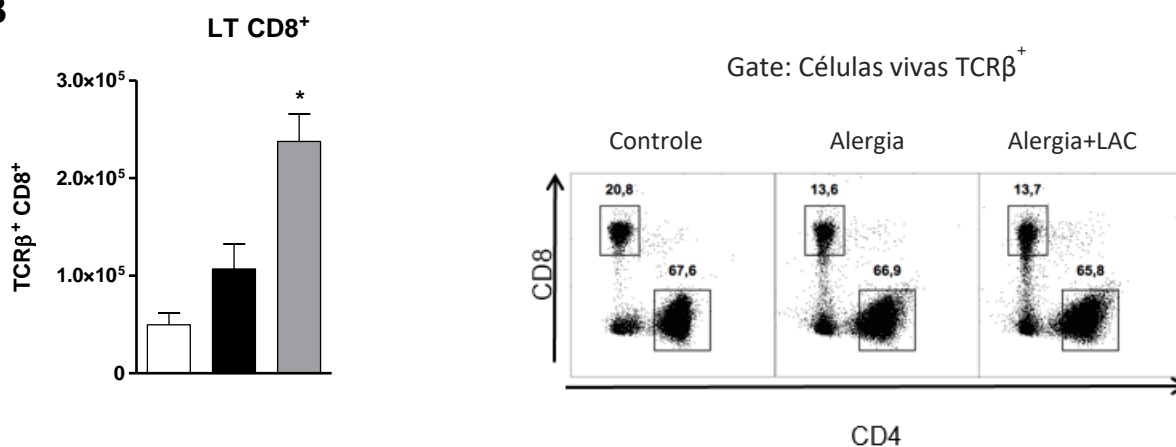
A**B**

Figura 7. Análise dos linfócitos T no pulmão por citometria de fluxo: Camundongos do Grupo alergia e alergia+LAC foram desafiados por nebulização com OVA 10mg/ml e o grupo controle foi nebulizado somente com salina 0,9%. Os pulmões dos animais foram perfundidos e coletados após o último desafio com OVA. Os pulmões direitos incubados com liberase e desoxiribonuclease I para digestão. Posteriormente as amostras foram maceradas, e os homogenatos centrifugados, plaqueados e marcados com seus receptivos marcadores. **A)** Linfócitos T CD4⁺ Efetores (TCRβ⁺CD4⁺Fxp3⁺) e Linfócitos T reguladores (TCRβ⁺CD4⁺Fxp3⁺); **B)** Linfócitos T CD8⁺ (TCRβ⁺CD8⁺); (n = 5 animais por grupo); #Diferença significativa entre controle e alergia; *Diferença significativa entre alergia e alergia+LAC (p < 0,05).

4.3 Avaliação da expressão de CD39 e CD73 nos Linfócitos T nos pulmões

Uma vez que os resultados anteriores mostraram um aumento no número de linfócitos T nos pulmões dos animais tratados, verificou-se em seguida a expressão das ectonucleotidases CD39 e CD73 nestas células. Esta análise se faz importante pelo fato de que estas moléculas tem um importante papel na regulação de sinais purinérgicos que promovem a mudança de um ambiente inflamatório para um ambiente anti-inflamatório, através da produção de adenosina (Antonioli, L. *et al.*, 2013). De fato, observa-se nas figuras 8 e 9 que existiu um aumento da expressão de CD39 e CD73 nos linfócitos avaliados. Os resultados mostraram um aumento de linfócitos T CD4⁺ (Figura 8A) e linfócitos T reguladores (Figura 8B) expressando CD39 e CD73 nos animais alergia+LAC em comparação com os animais alergia. A avaliação destas moléculas nas células Tregs se faz excepcionalmente importante, já que CD39 e CD73 são moléculas altamente expressas nestas células e têm um importante papel em seus mecanismos de regulação. Curiosamente, nossos resultados mostraram também um aumento da expressão destas moléculas, tanto em número absoluto quanto em porcentagem, nos linfócitos T CD8⁺ (Figura 9) dos animais alergia+LAC em comparação com os animais alergia.

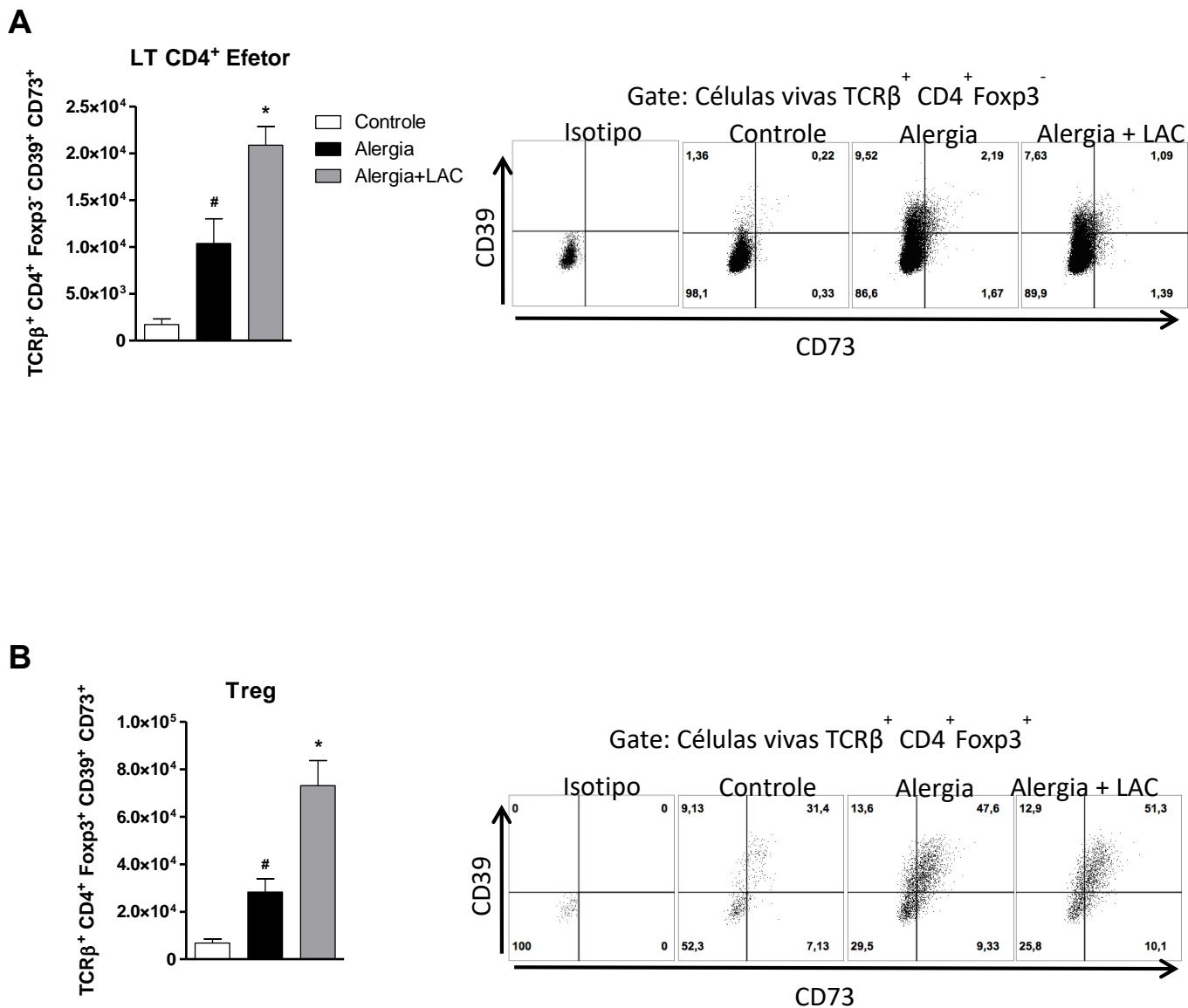


Figura 8. Avaliação da expressão de CD39 e CD73 nos Linfócitos T CD4⁺ e Tregs nos pulmões: camundongos do Grupo alergia e alergia+LAC foram desafiados por nebulização com OVA 10mg/ml e o grupo controle foi nebulizado somente com salina 0,9%. Os pulmões dos animais foram perfundidos e coletados após o último desafio com OVA. Posteriormente foram digeridos, maceradas, centrifugados, plaqueados e marcados com seus receptivos marcadores. **A)** Linfócitos T CD4⁺ (TCRβ⁺CD4⁺Fxp3⁻); **B)** Linfócitos T reguladores (TCRβ⁺CD4⁺Fxp3⁺); (n = 5 animais por grupo); # Diferença significativa entre Controle e Alergia; *Diferença significativa entre alergia e alergia+LAC (p < 0,05).

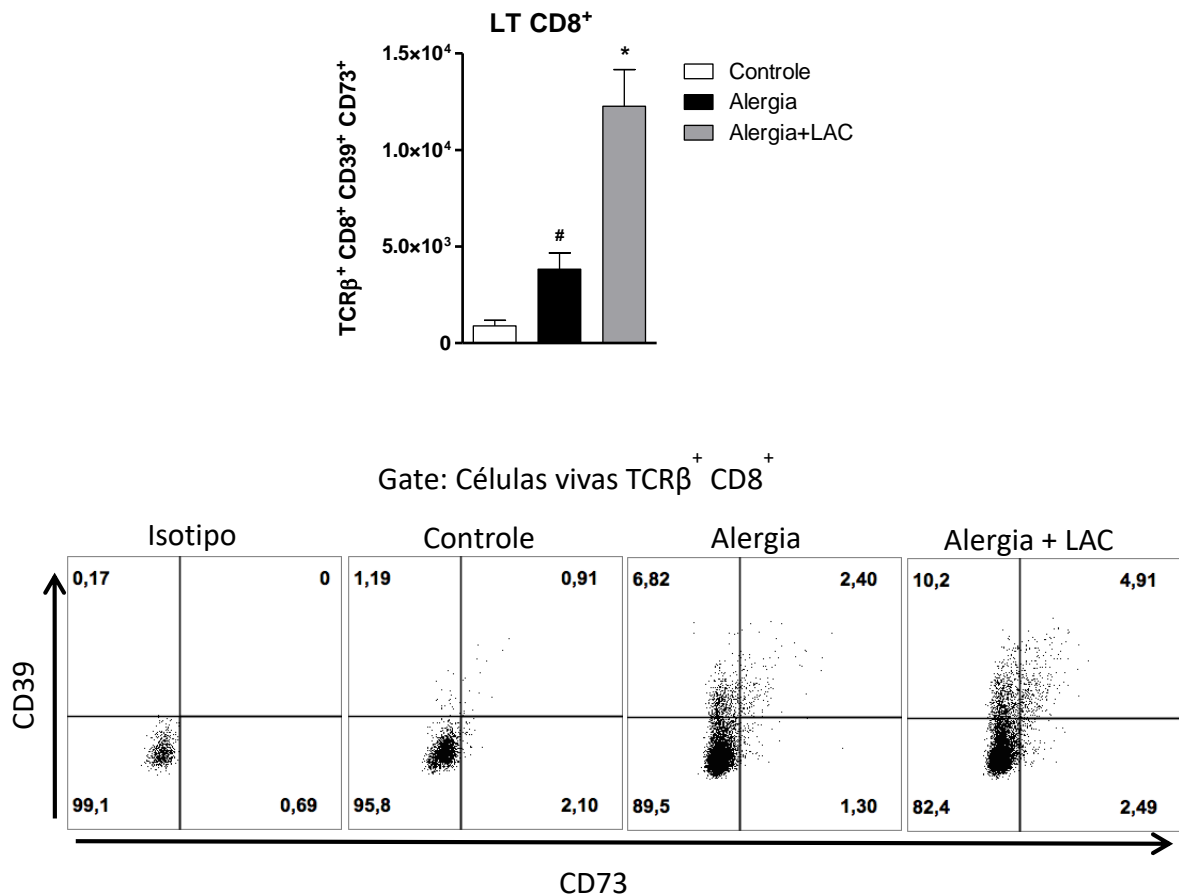


Figura 9. Avaliação da expressão de CD39 e CD73 nos Linfócitos T CD8⁺ (TCRβ⁺CD8⁺) nos pulmões: camundongos do Grupo alergia e alergia+LAC foram desafiados por nebulização com OVA 10mg/ml e o grupo controle foi nebulizado somente com salina 0,9%. Os pulmões dos animais foram perfundidos e coletados após o último desafio com OVA. Posteriormente foram digeridos, macerados, centrifugados, plaqueados e marcados com seus respectivos marcadores. (n = 5 animais por grupo); #Diferença significativa entre controle e alergia; *Diferença significativa entre alergia e alergia+LAC (p < 0,05).

4.4 O efeito benéfico do *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 parece ser causado por seus metabólitos

Após a obtenção dos resultados mostrando que os mecanismos de ação do *L. delbrueckii* UFV-H2b20 parecem estar relacionados ao aumento da expressão de CD39 e CD73 nos linfócitos, iniciou-se então uma investigação para verificar se este efeito é causado diretamente pelo microrganismo ou por algum metabólito produzido por ele. Para isso fez-se necessária a adição de mais grupos de animais ao experimento. Portanto, os próximos experimentos foram realizados com os seguintes grupos: controle, que ingeriu somente salina 0,9% durante todo o experimento e não passou pela indução da inflamação alérgica pulmonar com OVA; alergia, que ingeriu somente salina 0,9% durante todo o experimento e passou pela indução da inflamação alérgica pulmonar com OVA; alergia+meio, que ingeriu salina 0,9% suplementada com o meio de cultura do *L. delbrueckii* UFV-H2b20 (9%) adicionado à mesma e que passou pela indução da inflamação alérgica pulmonar com OVA; alergia+sobrenadante do LAC, que ingeriu salina 0,9% suplementada com o sobrenadante da cultura do *L. delbrueckii* UFV-H2b20 (9%) e que passou pela indução da inflamação alérgica pulmonar com OVA; alergia+LAC morto, que ingeriu salina 0,9% suplementada com *L. delbrueckii* UFV-H2b20 morto por calor em uma quantidade suficiente para que cada animal ingerisse no mínimo 10^9 UFC por dia; alergia+LAC vivo, que ingeriu uma solução de salina 0,9% suplementada com *L. delbrueckii* UFV-H2b20 em uma quantidade suficiente para que cada animal ingerisse no mínimo 10^9 UFC por dia. Os resultados dos experimentos a seguir são preliminares e precisam ser repetidos.

4.4.1 Verificação da ingestão do tratamento com o sobrenadante do probiótico *L. delbrueckii* UFV-H2b20

Visto que grupos foram adicionados ao experimento, fez-se necessário conferir novamente a ingestão dos tratamentos, já que existia a possibilidade dos animais dos novos grupos não se adequarem a estes tratamentos. De fato, observa-se na figura 10 que todos os grupos ingeriram aproximadamente a mesma quantidade de líquido das mamadeiras, exceto o grupo alergia+sobrenadante do LAC. Este dado pode

sugerir que provavelmente este tratamento foi menos palatável para os animais que os outros tratamentos, o que pode levar a uma menor eficiência do tratamento.

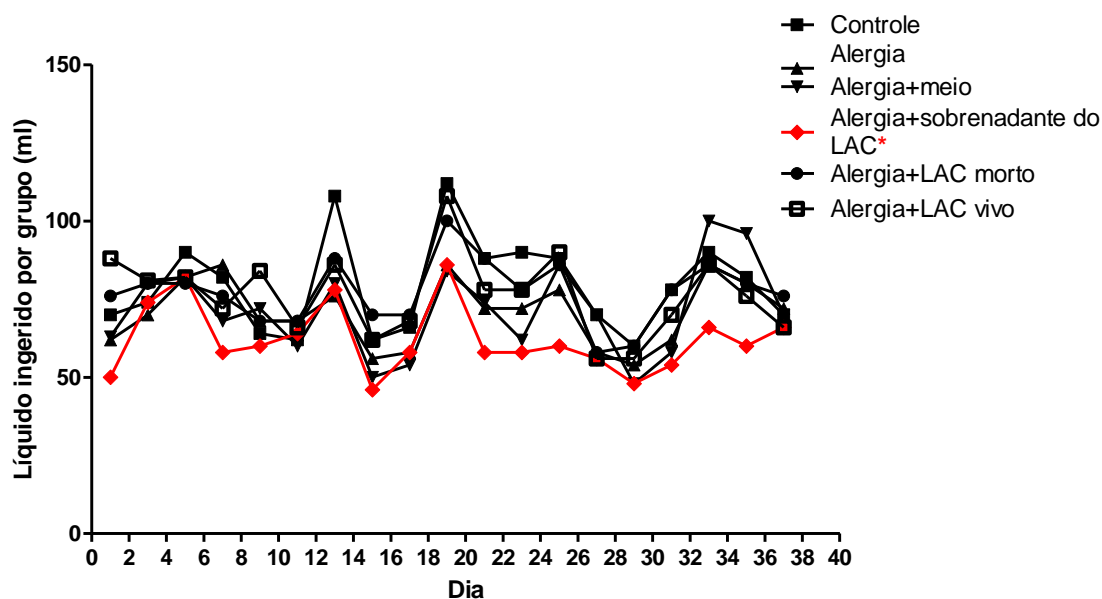
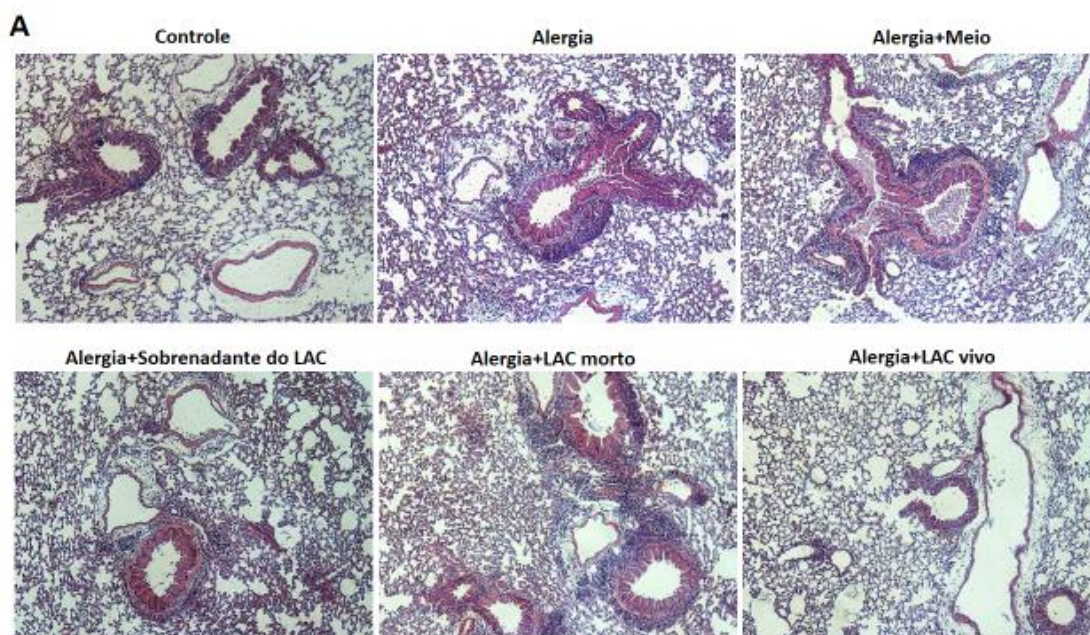


Figura 10. Líquido ingerido por grupo (ml) após tratamento com sobrenadante do probiótico *L. delbrueckii* UFV-H2b20: Os animais foram divididos em seis grupos: controle (■), que ingeriu somente salina 0,9% durante todo o experimento e não passou pela indução da inflamação alérgica pulmonar com OVA; alergia (▲), que ingeriu somente salina 0,9% durante todo o experimento e passou pela indução da inflamação alérgica pulmonar com OVA; alergia+meio (▼), que ingeriu salina 0,9% suplementada com o meio de cultura do *L. delbrueckii* UFV-H2b20 (9%) adicionado à mesma e que passou pela indução da inflamação alérgica pulmonar com OVA; alergia+sobrenadante do LAC (◆), que ingeriu salina 0,9% suplementada com o sobrenadante da cultura do *L. delbrueckii* UFV-H2b20 (9%) adicionado à mesma e que passou pela indução da inflamação alérgica pulmonar com OVA; alergia+LAC morto (●), que ingeriu salina 0,9% suplementada com *L. delbrueckii* UFV-H2b20 morto por calor em uma quantidade suficiente para que cada animal ingerisse no mínimo 10^9 UFC por dia; alergia+LAC vivo (□), que ingeriu uma solução de salina 0,9% suplementada com *L. delbrueckii* UFV-H2b20 em uma quantidade suficiente para que cada animal ingerisse no mínimo 10^9 UFC por dia. (n = 4 a 5 animais por grupo). *Diferença significativa ($p < 0,05$).

4.4.2 Análise histológica do pulmão e contagem de células totais no BAL após tratamento com o sobrenadante do probiótico *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20

Para avaliar se o consumo do sobrenadante da cultura de *L. delbrueckii* UFV-H2b20 também promove um efeito anti-inflamatório, já que contém os metabólitos produzidos pelo microrganismo, foram feitas novamente as histologias do pulmão e contagem de células totais do BAL. Observa-se nos cortes histológicos (Figura 11A) que parece haver uma diminuição do infiltrado inflamatório nos pulmões dos animais alergia+sobrenadante do LAC em comparação aos pulmões dos animais alergia, mas que não chega a ser tão intensa como a diminuição observada nos pulmões dos animais alergia+LAC vivo. Isso pode se dar tanto devido ao fato do grupo alergia+sobrenadante do LAC ter ingerido uma menor quantidade do tratamento do que o grupo alergia+LAC vivo quanto pelo fato do tratamento com o sobrenadante da cultura do probiótico ser menos eficiente do que o tratamento com o próprio probiótico vivo em si. Observa-se também, na figura 11A, que os grupos tratados somente com o meio de cultura e com o probiótico morto por calor não apresentaram diminuição no infiltrado inflamatório, mostrando, assim, que o efeito anti-inflamatório não é causado pelos componentes do meio de cultura da bactéria e também que o tratamento com a bactéria morta parece não ter eficácia.

Corroborando os resultados obtidos nas histologias, as contagens de células totais no BAL (Figura 11B) destes animais sugerem que pode estar ocorrendo uma tendência à diminuição dos números de células no BAL do grupo alergia+sobrenadante do LAC, em comparação com o grupo alergia, mas essa diminuição não chega a ser significativa ($p=0,07$) como no grupo alergia+LAC vivo ($p < 0,05$). Os grupos alergia+meio e alergia+LAC morto também não apresentam diminuição nos números de células totais no BAL, em comparação com o grupo alergia.



B

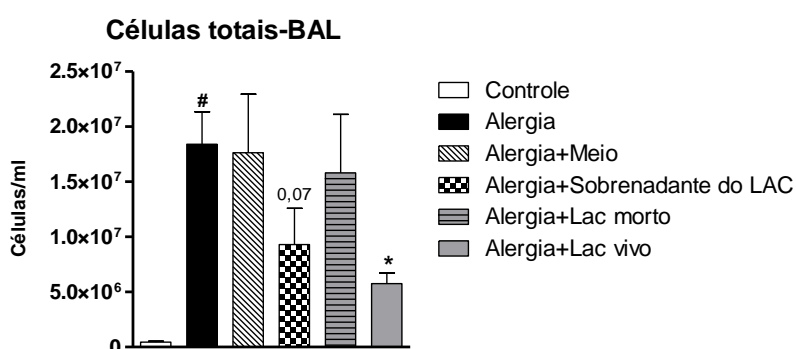
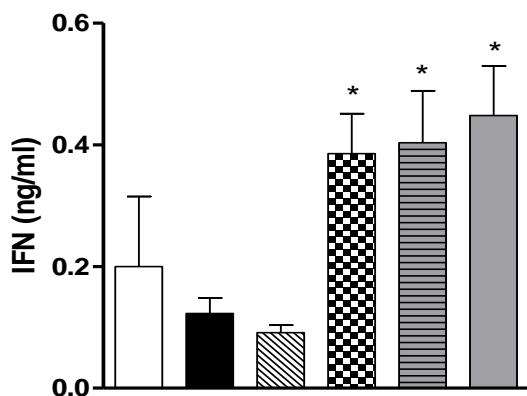


Figura 11. Histologia do pulmão e contagem de células totais no BAL após tratamento com o sobrenadante do probiótico *L. delbrueckii* UFV-H2b20: Camundongos dos Grupos alergia, alergia+meio, alergia+sobrenadante do LAC, alergia+LAC morto e alergia+LAC vivo foram desafiados por nebulização com OVA 10mg/ml e o grupo controle foi nebulizado somente com salina 0,9%. O BAL e os pulmões dos animais foram coletados após o último desafio com OVA. Os pulmões esquerdos foram fixados em formol 10% e embebidos em parafina. Em seguida foram corados com hematoxilina-eosina (HE), para avaliação do infiltrado inflamatório. O BAL foi centrifugado 400 x g por 10 minutos a 4°C. O sedimento de células foi ressuspensão em 100 µl de RPMI (GIBCO) 10% SFB para a contagem total de células. **A)** Histologia dos pulmões; **B)** Contagem de células totais no BAL. (n = 4 a 5 animais por grupo). # Diferença significativa entre controle e alergia; * Diferença significativa entre alergia e alergia+LAC (p < 0,05).

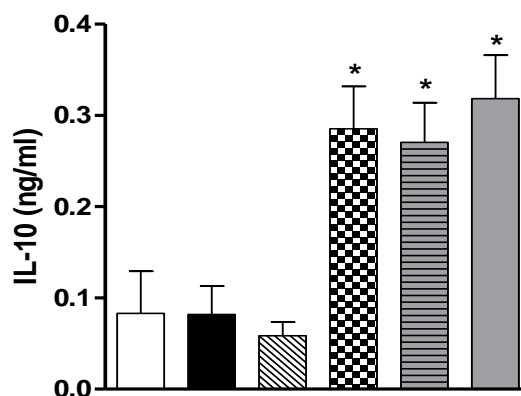
4.4.3 O tratamento com o probiótico *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 pode promover um aumento na produção de IFN- γ e IL-10 no pulmão

Estudos recentes mostram que *L. delbrueckii* UFV-H2b20 é capaz de modular a produção de citocinas no hospedeiro (dos Santos, L.M. *et al.*, 2011; Neumann, E. *et al.*, 2009). Portanto, com o objetivo de verificamos um possível balanço Th1/Th2, medimos através de ELISA, a produção das citocinas IFN- γ , IL-10 e IL-4 nos animais (figura 12). Curiosamente, os resultados mostraram que, tanto os grupos alergia+sobrenadante do LAC e alergia+LAC vivo quanto o grupo alergia+LAC morto, mostraram um aumento na produção de IFN- γ e IL-10 nos pulmões em comparação com os outros grupos (Figuras 12A e 12B), sugerindo assim que, todos os tratamentos com o probiótico, sendo ele vivo, morto ou somente contendo seus metabólitos, são capazes de induzir a produção destas citocinas. Nenhuma alteração foi observada na produção de IL-4 (Figura 12C).

A



B



C

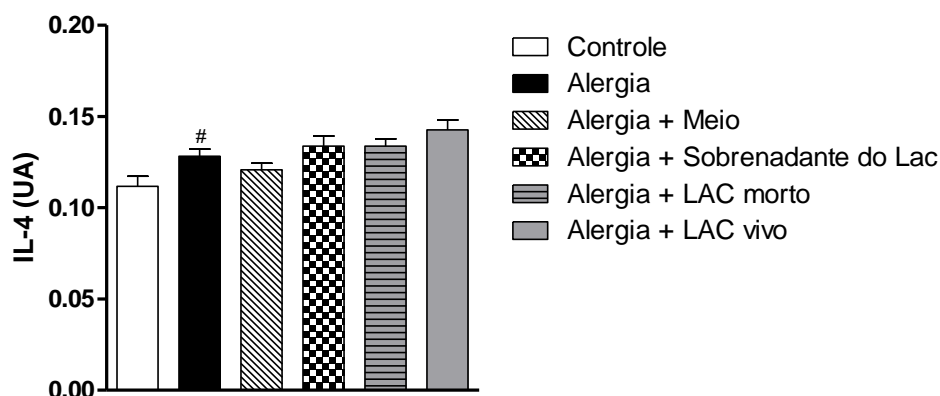


Figura 12. Dosagem de Citocinas: camundongos dos grupos alergia, alergia+meio, alergia+sobrenadante do LAC, alergia+LAC morto e alergia+LAC vivo foram desafiados por nebulização com OVA 10mg/ml e o grupo Controle foi nebulizado somente com salina 0,9%. Os pulmões dos animais foram coletados após o último desafio com OVA. Os pulmões esquerdos foram congelados a -70°C para posterior dosagem de citocinas. As amostras foram adicionadas à solução para extração de citocinas: uma cápsula do inibidor de proteases (ROCHE, Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) diluída em 50 ml de PBS, na proporção de 1000 μl desta solução para 50 mg de tecido. O tecido foi, então, macerado com homogeneizador elétrico e centrifugado a 8944 x g por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi recolhido submetido a realização do ELISA. **A)** IFN- γ ; **B)** IL-10; **C)** IL-4. (n = 4 a 5 animais por grupo). # Diferença significativa entre controle e alergia; * Diferença significativa entre alergia e alergia+LAC ($p < 0,05$).

5. Discussão

Desde o início do século XX vários efeitos benéficos têm sido atribuídos ao consumo de produtos contendo bactérias probióticas (Santosa, S. *et al.*, 2006) e algumas espécies de lactobacilos têm sido largamente utilizadas como probióticos já que possuem características essenciais para serem consideradas como tal. O microrganismo *L. delbrueckii* UFV-H2b20 pode ser considerado um probiótico pois preenche requisitos básicos para tal, como habitar normalmente o trato intestinal do hospedeiro; ser capaz de resistir às condições de estresse no trato gastrointestinal; se estabelecer e conferir benefícios ao seu hospedeiro (dos Santos, L.M. *et al.*, 2011; Neumann, E. *et al.*, 1998a; Neumann, E. *et al.*, 2009; Vieira, L.Q. *et al.*, 2008). No entanto, o tratamento só é eficiente se os níveis bacterianos permanecerem em torno de 10^9 UFC no intestino do hospedeiro (Neumann, E. *et al.*, 1998a). Durante nossos experimentos, os animais recebiam o tratamento de forma oral. O tratamento era trocado de 48 em 48 horas, de forma que todos os dias os animais ingeriam no mínimo 10^9 UFC por dia, e a ingestão do tratamento foi comprovada na figura 3.

Diversos trabalhos vêm mostrando os efeitos benéficos dos probióticos no tratamento e prevenção de doenças alérgicas como a asma. Segundo FIOCCHI *et al.* a Organização Mundial de Alergia (WAO) já sugere: o uso de probióticos em mulheres grávidas que correm risco de terem um filho alérgico; o uso de probióticos em mulheres que estão amamentando crianças que correm o risco de desenvolver alergia; o uso de probióticos em crianças que estão sendo amamentadas. No entanto, os estudos em humanos ainda são insuficientes e as recomendações são baseadas em evidências de baixa qualidade. Já em modelos murinos existem muitas evidências indicando que a administração de certos probióticos podem modular respostas alérgicas no trato respiratório. Por exemplo, BLUMER *et al.* sugeriram que *Lactobacillus rhamnosus* GG exerce efeitos benéficos no desenvolvimento da asma alérgica experimental, quando administrado na fase inicial da infância; FELESZKO *et al.* mostraram em seu trabalho que a aplicação de probióticos bacterianos inibe uma subsequente sensibilização alérgica e doença respiratória das vias aéreas em um modelo murino de asma através da indução de Tregs associada ao

aumento da produção de TGF- β ; FORSYTHE et al. demonstraram que o tratamento oral com *Lactobacillus reuteri* pode atenuar a maioria das características de uma resposta asmática em um modelo murino de inflamação alérgica das vias aéreas; HOUGEE et al. apresentaram em seu trabalho que o probiótico *Bifidobacterium breve* M-16V reduz os sintomas alérgicos em camundongos sensibilizados com OVA reduzindo o número de eosinófilos no BAL, IgE OVA-específica e IgG1 ova-específica dos animais.

Com relação ao *L. delbrueckii* UFV-H2b20, dados de um trabalho ainda não publicado do nosso grupo sugerem que esta bactéria promove efeitos protetores na inflamação alérgica pulmonar em camundongos tratados diminuindo significativamente o influxo de células para o pulmão, o número de eosinófilos e monócitos no BAL e de células T CD44⁺ no pulmão, a produção de IL-4 no pulmão e aumentando o número de células Tregs em comparação com o grupo controle. No presente trabalho, demonstramos que o tratamento com *L. delbrueckii* UFV-H2b20 realmente promove uma diminuição do infiltrado inflamatório no pulmão (Figura 4A) e uma diminuição de células totais no BAL (Figura 4B) dos animais tratados com o probiótico, em comparação com os animais não tratados. Também corroborando os dados anteriores, observamos uma diminuição significativa no número de eosinófilos (Figura 5A), monócitos inflamatórios e macrófagos alveolares (Figura 5B). Existem evidências de que o efeito anti-inflamatório dos probióticos podem estar associados a um aumento significativo na proporção de Tregs (Karimi, K. et al., 2009) e estudos já mostraram a importância destas células para suprimir a eosinofilia induzida por alérgenos em modelos de asma em roedores (Forsythe, P. 2011). Com relação à supressão dos monócitos e macrófagos, o impacto das Tregs nessas populações *in vivo* é pouco definido (Galani, I.E. et al., 2010). No entanto, trabalhos têm proposto que as Tregs podem suprimir diretamente a ativação de monócitos e macrófagos e também suas funções efetoras incluindo a produção de citocinas e expressão de moléculas de superfície co-estimuladoras (Mahajan, D. et al., 2006; Taams, L.S. et al., 2005). Essas evidências ajudam a explicar a diminuição de monócitos inflamatórios, macrófagos alveolares e eosinófilos no BAL dos animais tratados com *L. delbrueckii* UFV-H2b20. No que se refere ao número de neutrófilos (Figura 6A) e células dendríticas (Figura 6B), nossos resultados não mostraram diferenças

significativas nos números destas células entre os grupos. O modelo de inflamação alérgica pulmonar utilizado neste trabalho é um modelo predominantemente Th2 e eosinofílico (Nials, A.T. *et al.*, 2008), onde os neutrófilos não ocorrem em grandes quantidades. Portanto, já eram esperados baixos números destas células no BAL dos animais do grupo alergia, e o resultado demonstrado na figura 3D confirma que o probiótico também não altera a quantidade destas células no BAL. No caso das células dendríticas, estudos mostraram que os probióticos induzem sua maturação (Weiss, G. *et al.*, 2011), que são uma das primeiras células a reconhecerem os probióticos no intestino e podem ingerir e reter bactérias por alguns dias (Macpherson, A.J. *et al.*, 2004b). Essa ingestão induz um fenótipo tolerogênico onde há uma interação das DCs com células T e B que promove e mantém uma resposta imune anti-inflamatória através de mecanismos que incluem a indução de alguns subtipos de Tregs (Forsythe, P. 2014) tornando assim as células dendríticas importantes no mecanismo anti-inflamatório dos probióticos. No entanto isso parece ocorrer nos linfonodos mesentéricos (Forsythe, P. 2014; Kim, H.J. *et al.*, 2013), o que explicaria a ausência de diferença dos números de células dendríticas no BAL entre os grupos. Portanto, um dos objetivos futuros deste trabalho será fazer uma avaliação mais detalhada das células dendríticas nos linfonodos mesentéricos, analisando principalmente o perfil de ativação das mesmas.

Visto que asma é uma doença inflamatória mediada por linfócitos T e há sugestões de que o sistema imune da mucosa está envolvido, com a migração de linfócitos T ativados de um local da mucosa para outro, há evidências de que os efeitos benéficos dos probióticos estão associados com mudanças no balanço das respostas das células T que levam a redução na atividade da resposta Th2. Vários estudos já mostraram a capacidade dos probióticos de induzir células Tregs, que são capazes de atenuar tanto respostas Th1 quanto Th2, elemento essencial para a ação anti-inflamatória dos organismos probióticos (Forsythe, P. 2011). Leech *et al.* e Wilson *et al.* mostraram que nos modelos de asma em roedores, Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ são recrutadas para os pulmões e linfonodos drenantes e podem suprimir o excesso de secreção de muco, hiperresponsividade e eosinofilia induzida por alérgenos nas vias aéreas. *L. delbrueckii* UFV-H2b20 também promove uma indução das células

T, desencadeando um aumento no número de linfócitos T CD4⁺, linfócitos T reguladores (Figura 7A), e linfócitos T CD8⁺ (Figura 7B).

Uma gama de mecanismos regulatórios é usada para manter a homeostase do sistema imune durante uma inflamação. A via purinérgica é um desses importantes mecanismos e também tem uma grande influência na regulação das células T já que, a presença de ATP causa um aumento e a de adenosina uma supressão nas respostas mediadas por TCR (Cekic, C. *et al.*, 2016). Woehrle *et al.* sugerem que as próprias células T servem como uma fonte de ATP extracelular, já que a estimulação do TCR induz a liberação de ATP (Woehrle, T. *et al.*, 2010). Nossos resultados mostraram que os animais tratados com *L. delbrueckii* UFV-H2b20 apresentaram linfócitos T CD4⁺ (Figura 8A), linfócitos Tregs (Figura 8B) e linfócitos T CD8⁺ (Figura 9) com maior expressão de CD39 e CD73, o que estaria levando à transformação de seu ATP extracelular em adenosina, promovendo assim um feedback que resulta em um ambiente anti-inflamatório. Esta avaliação se torna interessante já que, no caso das células Tregs a alta expressão de CD39 e CD73 é tão evidente que é comumente utilizada como marcadores de Tregs. A atividade de CD73 e CD39 correlaciona-se com o estado de ativação das células Tregs. (Antonioli, L. *et al.*, 2013). Em um estudo de Deaglio *et al.* foi mostrado, em camundongos deficientes de CD39 que, em conjunto com a CD73, a CD39 facilita a geração de adenosina pericelular. A adenosina pericelular medeia uma porção substancial da atividade imunossupressora e anti-inflamatória das Tregs. Esta informação juntamente com nossos resultados mostrando o aumento da expressão de CD39 e CD73 nas Tregs dos animais tratados com *L. delbrueckii* UFV-H2b20 (Figura 8B) nos levam a sugerir que o probiótico provoca o estímulo das células Tregs e a resposta purinérgica promovida por elas. Interessantemente, o aumento da expressão destas moléculas também foi observado nas células T CD8⁺ (Figura 9), que tradicionalmente são relacionadas a citotoxicidade. No entanto, recentemente, vários trabalhos têm abordado novamente a existência de células T CD8 com funções reguladoras, uma teoria antiga que que agora vêm sido revivida por alguns autores (Wang, Y.M. *et al.*, 2009). Cone *et al.* por exemplo, mostraram que células T CD8 reguladoras podem limitar as respostas de hipersensibilidade das células T contra antígenos oculares (Cone, R.E. *et al.*, 2009). Além disso, Hu *et al.* e

Jiang et al. mostraram que a indução de células T CD8 que interagem com células T efectoras limitam as respostas imunes, permitindo a utilização de células T ativadas como vacina em camundongos. A utilização destas células T ativadas como vacina induziria uma resposta regulatória, limitando doenças em vários modelos inclusive encefalomielite autoimune experimental, o modelo murino para esclerose múltipla (Hu, D. *et al.*, 2004; Jiang, H. *et al.*, 1998). A existência destas células T CD8 reguladoras e os estudos existentes sobre elas, nos levam a sugerir que as células T CD8 com aumento da expressão das ectonucleotidases CD39 e CD73 podem também estar envolvidas na regulação da inflamação, já que com o aumento da expressão destas moléculas haveria, conseqüentemente o aumento da produção de adenosina. Isto nos auxilia a explicar a indução destas células em um ambiente onde está ocorrendo uma supressão da inflamação. No entanto, mais investigações sobre o papel destas células CD8 reguladoras no nosso modelo são necessárias.

Após confirmado o aumento da expressão de CD39 e CD73 nas células analisadas dos animais tratados com *L. delbrueckii* UFV-H2b20, começamos a avaliar se os efeitos observados após o tratamento com o probiótico são causados diretamente pelo microrganismo ou por algum metabólito produzido pelo mesmo. Macpherson et al. mostraram que produtos solúveis da degradação de bactérias componentes da microbiota intestinal alcançam a circulação sistêmica e são responsáveis pelas diferenças na organização e estrutura de tecidos linfoides e na diversidade e concentração de mediadores da resposta imune entre animais isentos de germes e animais SPF. Karvonen et al. mostraram recentemente que vários produtos bacterianos podem promover proteção contra o desenvolvimento da asma. Em nossos resultados, observamos uma tendência à diminuição do infiltrado inflamatório nos pulmões dos animais tratados com o sobrenadante da cultura de *L. delbrueckii* UFV-H2b20, que contém os metabólitos produzidos pela bactéria, em comparação com pulmões dos animais não tratados (Figura 11A). Neste grupo de animais também foi observada uma tendência à diminuição do número total de células no BAL (Figura 11B), em comparação com o BAL dos animais não tratados. No entanto, apesar deste grupo apresentar esta tendência à diminuição do infiltrado inflamatório no pulmão e do número total de células no BAL, esta diminuição não chega a ser tão intensa como a observada nos pulmões e BAL

dos animais tratados com o probiótico vivo. Como mostrado na figura 6, o grupo tratado com o sobrenadante da cultura do probiótico ingeriu uma quantidade de líquido menor, provavelmente devido a uma menor palatabilidade do sobrenadante da cultura, e isso pode ter interferido nos efeitos deste tratamento, ou seja, talvez se os animais tivessem ingerido a mesma quantidade a diminuição fosse significativa. No entanto, percebe-se ainda assim esta tendência à diminuição do infiltrado, o que pode levar a investigações futuras mais detalhadas sobre os efeitos anti-inflamatórios dos metabólitos de *L. delbrueckii* UFV-H2b20. Os mesmos efeitos não foram observados nos pulmões e BAL dos camundongos tratados com o probiótico morto, o que é mais uma evidência de que os efeitos podem estar sendo promovidos por algum metabólito de *L. delbrueckii* UFV-H2b20.

Foi demonstrado ainda neste estudo que *L. delbrueckii* UFV-H2b20 foi capaz de estimular a produção de IFN- γ (Figura 12A) nos pulmões dos animais de todos os grupos tratados com o probiótico ou com os seus metabólitos. Estudos anteriores já mostraram que *L. delbrueckii* UFV-H2b20 realmente é capaz de estimular produção de citocinas Th1 em camundongos (NEUMANN *et al.*, 2009). Além disso, também existem evidências de que os efeitos benéficos dos probióticos estejam associados com mudanças no balanço das respostas das células T que levam a redução na atividade Th2 (Forsythe, P. 2011). Estas informações se tornam interessantes para o nosso trabalho já que existem evidências de que a expressão e a função da enzima CD73 aumentam na presença de alguns mediadores pró-inflamatórios como os IFNs (Beavis, P.A. *et al.*, 2012; Regateiro, F.S. *et al.*, 2011). Além disso, dos Santos *et al.* já relataram a capacidade de *L. delbrueckii* UFV-H2b20 em estimular a produção de TNF e IFN- γ em um modelo de infecção por *Listeria monocytogenes*. Isto nos leva a sugerir que *L. delbrueckii* UFV-H2b20 estaria estimulando a produção de IFN- γ , e talvez outras citocinas Th1 que ainda não foram avaliadas neste trabalho, promovendo um aumento na expressão das ectonucleotidases, culminando na produção da adenosina e levando a atenuação da inflamação.

L. delbrueckii UFV-H2b20 foi capaz de estimular também a produção de IL-10 (Figura 12B) nos pulmões dos animais de todos os grupos tratados com o probiótico ou com seus metabólitos. Sabe-se que existem estirpes

bacterianas específicas que podem induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, enquanto outras podem estimular a produção de citocinas anti-inflamatórias desencadeando sinais de tolerância. No entanto, sabe-se também que algumas podem induzir os dois tipos de citocinas (Kang, H.J. *et al.*, 2015; Tang, M.L. 2009), o que explicaria o estímulo tanto de IFN- γ quanto de IL-10 pelo probiótico. De fato, também já foi demonstrada na literatura a capacidade deste probiótico de produzir estes dois tipos de citocinas (dos Santos, L.M. *et al.*, 2011).

Como dito no início desta discussão, dados de um trabalho ainda não publicado do nosso grupo sugerem que *L. delbrueckii* UFV-H2b20 promove uma diminuição significativa da produção de IL-4 no pulmão. Diferentemente, nos nossos resultados, não vimos diferenças significativas na produção de IL-4 entre os grupos de animais (Figura 12C). Este ensaio foi realizado uma única vez e precisa ser repetido.

6. Conclusão

Em resumo, os resultados mostram que o tratamento oral com *L. delbrueckii* UFV-H2b20 inibe a resposta inflamatória nos pulmões dos camundongos BALB/c provocada pelo estímulo com OVA, diminuindo o número de monócitos inflamatórios, eosinófilos e macrófagos alveolares nos pulmões. Nossos resultados sugerem ainda que seu mecanismo de ação está relacionado a respostas de linfócitos T CD4⁺, T reguladores e T CD8⁺ e com o aumento da expressão de CD39 e CD73 nestas células. Por último, observamos que os metabólitos produzidos por *L. delbrueckii* UFV-H2b20 podem estar sendo responsáveis por estimular a resposta anti-inflamatória nos animais tratados.

Entretanto, ainda são necessários muitos estudos para a compreensão completa destes mecanismos. As perspectivas deste trabalho são: avaliar a expressão de CD39 e CD73 na medula, linfonodo mesentérico e linfonodos drenantes do pulmão com o objetivo de investigar a resposta sistêmica provocada pelo probiótico; avaliar qual das subpopulações de células T estudadas têm maior importância na resposta e resolução da inflamação; medir a produção de outras citocinas pró e anti-inflamatórias no pulmão dos animais;

avaliar o perfil da microbiota dos animais tratados em comparação com os não tratados. Estudos futuros deverão focar-se na identificação dos antígenos provenientes do metabolismo ou degradação deste microrganismo que são capazes de ativar respostas imunes no hospedeiro.

BIBLIOGRAFIA

Abrahamsson, TR; Jakobsson, HE; Andersson, AF; Bjorksten, B; Engstrand, L and Jenmalm, MC. Low gut microbiota diversity in early infancy precedes asthma at school age. *Clin.Exp.Allergy*. 44, 842-850, June/2014.

Adami, AJ and Bracken, SJ. Breathing Better Through Bugs: Asthma and the Microbiome. *Yale J.Biol.Med*. 89, 309-324, Sept./2016.

Akinbami, LJ; Moorman, JE; Garbe, PL and Sondik, EJ. Status of childhood asthma in the United States, 1980-2007. *Pediatrics*. 123 Suppl 3, S131-S145, Mar./2009.

Akinbami, LJ; Moorman, JE and Liu, X. Asthma prevalence, health care use, and mortality: United States, 2005-2009. *Natl.Health Stat.Report*.1-14, Jan./2011.

Akinbami, LJ; Simon, AE and Rossen, LM. Changing Trends in Asthma Prevalence Among Children. *Pediatrics*. 137, Jan./2016.

Anderson, GP. The immunobiology of early asthma. *Med.J.Aust*. 177 Suppl, S47-S49, Sept./2002.

Antonioli, L; Pacher, P; Vizi, ES and Hasko, G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol.Med*. 19, 355-367, June/2013.

Arrieta, MC; Stiemsma, LT; Dimitriu, PA; Thorson, L; Russell, S; Yurist-Doutsch, S; Kuzeljevic, B; Gold, MJ; Britton, HM; Lefebvre, DL; Subbarao, P; Mandhane, P; Becker, A; McNagny, KM; Sears, MR; Kollmann, T; Mohn, WW; Turvey, SE and Finlay, BB. Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma. *Sci.Transl.Med*. 7, 307ra152-Sept./2015.

Backhed, F; Ding, H; Wang, T; Hooper, LV; Koh, GY; Nagy, A; Semenkovich, CF and Gordon, JI. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*. 101, 15718-15723, Nov./2004.

Beavis, PA; Stagg, J; Darcy, PK and Smyth, MJ. CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends Immunol*. 33, 231-237, May/2012.

Berg, RD. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol*. 4, 430-435, Nov./1996.

Bisgaard, H; Li, N; Bonnelykke, K; Chawes, BL; Skov, T; Paludan-Muller, G; Stokholm, J; Smith, B and Kroghfelt, KA. Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age. *J.Allergy Clin.Immunol*. 128, 646-652, Sept./2011.

Blumer, N; Sel, S; Virna, S; Patrascan, CC; Zimmermann, S; Herz, U; Renz, H and Garn, H. Perinatal maternal application of *Lactobacillus rhamnosus* GG suppresses allergic airway inflammation in mouse offspring. *Clin.Exp.Allergy*. 37, 348-357, Mar./2007.

Borsellino, G; Kleinewietfeld, M; Di, MD; Sternjak, A; Diamantini, A; Giometto, R; Hopner, S; Centonze, D; Bernardi, G; Dell'Acqua, ML; Rossini, PM; Battistini, L; Rotzschke, O and Falk, K. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*. 110, 1225-1232, Aug./2007.

Bradding, P; Walls, AF and Holgate, ST. The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. *J.Allergy Clin.Immunol*. 117, 1277-1284, June/2006.

Braun-Fahrlander, C; Riedler, J; Herz, U; Eder, W; Waser, M; Grize, L; Maisch, S; Carr, D; Gerlach, F; Bufe, A; Lauener, RP; Schierl, R; Renz, H; Nowak, D and von, ME. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N.Engl.J.Med*. 347, 869-877, Sept./2002.

Bush, RK and Peden, DB. Advances in environmental and occupational disorders in 2008. *J.Allergy Clin.Immunol*. 123, 575-578, Mar./2009.

Busse, WW and Lemanske, RF, Jr. Asthma. *N.Engl.J.Med*. 344, 350-362, Feb./2001.

Cekic, C and Linden, J. Purinergic regulation of the immune system. *Nat.Rev.Immunol*. 16, 177-192, Mar./2016.

Chen, Y and Blaser, MJ. Inverse associations of *Helicobacter pylori* with asthma and allergy. *Arch.Intern.Med*. 167, 821-827, Apr./2007.

Ciaccio, CE; Barnes, C; Kennedy, K; Chan, M; Portnoy, J and Rosenwasser, L. Home dust microbiota is disordered in homes of low-income asthmatic children. *J.Asthma*. 52, 873-880, 2015.

Collado, MC; Meriluoto, J and Salminen, S. Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *Lett.Appl.Microbiol*. 45, 454-460, Oct./2007.

Cone, RE; Chattopadhyay, S; Sharafieh, R; Lemire, Y and O'Rourke, J. The suppression of hypersensitivity by ocular-induced CD8(+) T cells requires compatibility in the Qa-1 haplotype. *Immunol.Cell Biol*. 87, 241-248, Mar./2009.

Cookson, W. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. *Nature*. 402, B5-11, Nov./1999.

Correa, RO; Vieira, A; Sernaglia, EM; Lancellotti, M; Vieira, AT; Avila-Campos, MJ; Rodrigues, HG and Vinolo, MA. Bacterial short chain fatty acid metabolites modulate the inflammatory response against infectious bacteria. *Cell Microbiol.* Jan./2017.

Deaglio, S and Robson, SC. Ectonucleotidases as regulators of purinergic signaling in thrombosis, inflammation, and immunity. *Adv.Pharmacol.* 61, 301-332, 2011.

dos Santos, LM; Santos, MM; de Souza Silva, HP; Arantes, RM; Nicoli, JR and Vieira, LQ. Monoassociation with probiotic *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 stimulates the immune system and protects germfree mice against *Listeria monocytogenes* infection. *Med.Microbiol.Immunol.* 200, 29-38, Feb./2011.

Dwyer, KM; Deaglio, S; Gao, W; Friedman, D; Strom, TB and Robson, SC. CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic.Signal.* 3, 171-180, Mar./2007.

Eder, W; Ege, MJ and von, ME. The asthma epidemic. *N.Engl.J.Med.* 355, 2226-2235, Nov./2006.

Ege, MJ; Frei, R; Bieli, C; Schram-Bijkerk, D; Waser, M; Benz, MR; Weiss, G; Nyberg, F; van, HM; Pershagen, G; Brunekreef, B; Riedler, J; Lauener, R; Braun-Fahrlander, C and von, ME. Not all farming environments protect against the development of asthma and wheeze in children. *J.Allergy Clin.Immunol.* 119, 1140-1147, May/2007.

Ege, MJ; Mayer, M; Normand, AC; Genuneit, J; Cookson, WO; Braun-Fahrlander, C; Heederik, D; Piarroux, R and von, ME. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. *N.Engl.J.Med.* 364, 701-709, Feb./2011.

Eltzschig, HK; Kohler, D; Eckle, T; Kong, T; Robson, SC and Colgan, SP. Central role of Sp1-regulated CD39 in hypoxia/ischemia protection. *Blood.* 113, 224-232, Jan./2009.

Enjyoji, K; Sevigny, J; Lin, Y; Frenette, PS; Christie, PD; Esch, JS; Imai, M; Edelberg, JM; Rayburn, H; Lech, M; Beeler, DL; Cszimadia, E; Wagner, DD; Robson, SC and Rosenberg, RD. Targeted disruption of *cd39*/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. *Nat.Med.* 5, 1010-1017, Sept./1999.

Ernst, PB; Garrison, JC and Thompson, LF. Much ado about adenosine: adenosine synthesis and function in regulatory T cell biology. *J.Immunol.* 185, 1993-1998, Aug./2010.

Feleszko, W; Jaworska, J; Rha, RD; Steinhausen, S; Avagyan, A; Jaudszus, A; Ahrens, B; Groneberg, DA; Wahn, U and Hamelmann, E. Probiotic-induced suppression of allergic sensitization and airway inflammation is associated with an increase of T regulatory-dependent mechanisms in a murine model of asthma. *Clin.Exp.Allergy.* 37, 498-505, Apr./2007.

Feng, M; Yang, Z; Pan, L; Lai, X; Xian, M; Huang, X; Chen, Y; Schroder, PC; Roponen, M; Schaub, B; Wong, GW and Li, J. Associations of Early Life Exposures and Environmental Factors With Asthma Among Children in Rural and Urban Areas of Guangdong, China. *Chest*. 149, 1030-1041, Apr./2016.

Ferreira, CM; Vieira, AT; Vinolo, MA; Oliveira, FA; Curi, R and Martins, FS. The central role of the gut microbiota in chronic inflammatory diseases. *J.Immunol.Res.* 2014, 689492-2014.

Fiocchi, A; Pawankar, R; Cuello-Garcia, C; Ahn, K; Al-Hammadi, S; Agarwal, A; Beyer, K; Burks, W; Canonica, GW; Ebisawa, M; Gandhi, S; Kamenwa, R; Lee, BW; Li, H; Prescott, S; Riva, JJ; Rosenwasser, L; Sampson, H; Spigler, M; Terracciano, L; Vereda-Ortiz, A; Wasserman, S; Yepes-Nunez, JJ; Brozek, JL and Schunemann, HJ. World Allergy Organization-McMaster University Guidelines for Allergic Disease Prevention (GLAD-P): Probiotics. *World Allergy Organ J.* 8, 4-2015.

Flood-Page, P; Swenson, C; Faiferman, I; Matthews, J; Williams, M; Brannick, L; Robinson, D; Wenzel, S; Busse, W; Hansel, TT and Barnes, NC. A study to evaluate safety and efficacy of mepolizumab in patients with moderate persistent asthma. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 176, 1062-1071, Dec./2007.

Forsythe, P. Probiotics and lung diseases. *Chest*. 139, 901-908, Apr./2011.

Forsythe, P. Probiotics and lung immune responses. *Ann.Am.Thorac.Soc.* 11 Suppl 1, S33-S37, Jan./2014.

Forsythe, P; Inman, MD and Bienenstock, J. Oral treatment with live *Lactobacillus reuteri* inhibits the allergic airway response in mice. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 175, 561-569, Mar./2007.

Fredholm, BB. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death.Differ.* 14, 1315-1323, July/2007.

Fredholm, BB; IJzerman, AP; Jacobson, KA; Klotz, KN and Linden, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol.Rev.* 53, 527-552, Dec./2001.

Fredholm, BB; IJzerman, AP; Jacobson, KA; Linden, J and Muller, CE. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. *Pharmacol.Rev.* 63, 1-34, Mar./2011.

Galani, IE; Wendel, M; Stojanovic, A; Jesiak, M; Muller, MM; Schellack, C; Suri-Payer, E and Cerwenka, A. Regulatory T cells control macrophage accumulation and activation in lymphoma. *Int.J.Cancer.* 127, 1131-1140, Sept./2010.

Gensollen, T; Iyer, SS; Kasper, DL and Blumberg, RS. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science.* 352, 539-544, Apr./2016.

Global Initiative for Asthma (GINA). Global Strategy for Asthma Management and Prevention. 2007. <http://www.ginasthma.org/documents/4> Date last accessed: October 6, 2015).Oct./2015.

Gueimonde, M; Sakata, S; Kalliomaki, M; Isolauri, E; Benno, Y and Salminen, S. Effect of maternal consumption of lactobacillus GG on transfer and establishment of fecal bifidobacterial microbiota in neonates. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* 42, 166-170, Feb./2006.

Halonen, M; Stern, DA; Lohman, C; Wright, AL; Brown, MA and Martinez, FD. Two subphenotypes of childhood asthma that differ in maternal and paternal influences on asthma risk. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 160, 564-570, Aug./1999.

Hammad, H and Lambrecht, BN. Recent progress in the biology of airway dendritic cells and implications for understanding the regulation of asthmatic inflammation. *J.Allergy Clin.Immunol.* 118, 331-336, Aug./2006.

Hart, TK; Blackburn, MN; Brigham-Burke, M; Dede, K; Al-Mahdi, N; Zia-Amirhosseini, P and Cook, RM. Preclinical efficacy and safety of pascolizumab (SB 240683): a humanized anti-interleukin-4 antibody with therapeutic potential in asthma. *Clin.Exp.Immunol.* 130, 93-100, Oct./2002.

Hasko, G; Linden, J; Cronstein, B and Pacher, P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat.Rev.Drug Discov.* 7, 759-770, Sept./2008.

Heine, P; Braun, N; Sevigny, J; Robson, SC; Servos, J and Zimmermann, H. The C-terminal cysteine-rich region dictates specific catalytic properties in chimeras of the ectonucleotidases NTPDase1 and NTPDase2. *Eur.J.Biochem.* 268, 364-373, Jan./2001.

Heuts, DP; Weissenborn, MJ; Olkhov, RV; Shaw, AM; Gummadova, J; Levy, C and Scrutton, NS. Crystal structure of a soluble form of human CD73 with ecto-5'-nucleotidase activity. *Chembiochem.* 13, 2384-2391, Nov./2012.

Hill, C; Guarner, F; Reid, G; Gibson, GR; Merenstein, DJ; Pot, B; Morelli, L; Canani, RB; Flint, HJ; Salminen, S; Calder, PC and Sanders, ME. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat.Rev.Gastroenterol.Hepatol.* 11, 506-514, Aug./2014.

Holgate, ST. Pathogenesis of asthma. *Clin.Exp.Allergy.* 38, 872-897, June/2008.

Holloway, JW; Yang, IA and Holgate, ST. Interpatient variability in rates of asthma progression: can genetics provide an answer? *J.Allergy Clin.Immunol.* 121, 573-579, Mar./2008.

Hougee, S; Vriesema, AJ; Wijering, SC; Knippels, LM; Folkerts, G; Nijkamp, FP; Knol, J and Garssen, J. Oral treatment with probiotics reduces allergic symptoms in ovalbumin-sensitized mice: a bacterial strain comparative study. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 151, 107-117, 2010.

Hu, D; Ikizawa, K; Lu, L; Sanchirico, ME; Shinohara, ML and Cantor, H. Analysis of regulatory CD8 T cells in Qa-1-deficient mice. *Nat.Immunol.* 5, 516-523, May/2004.

Illi, S; Depner, M; Genuneit, J; Horak, E; Loss, G; Strunz-Lehner, C; Buchele, G; Boznanski, A; Danielewicz, H; Cullinan, P; Heederik, D; Braun-Fahrlander, C and von, ME. Protection from childhood asthma and allergy in Alpine farm environments-the GABRIEL Advanced Studies. *J.Allergy Clin.Immunol.* 129, 1470-1477, June/2012.

Isolauri, E; Salminen, S and Ouwehand, AC. Microbial-gut interactions in health and disease. *Probiotics. Best.Pract.Res.Clin.Gastroenterol.* 18, 299-313, Apr./2004.

Jackson, DJ; Gangnon, RE; Evans, MD; Roberg, KA; Anderson, EL; Pappas, TE; Printz, MC; Lee, WM; Shult, PA; Reisdorf, E; Carlson-Dakes, KT; Salazar, LP; DaSilva, DF; Tisler, CJ; Gern, JE and Lemanske, RF, Jr. Wheezing rhinovirus illnesses in early life predict asthma development in high-risk children. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 178, 667-672, Oct./2008.

Jiang, H; Kashleva, H; Xu, LX; Forman, J; Flaherty, L; Pernis, B; Braunstein, NS and Chess, L. T cell vaccination induces T cell receptor Vbeta-specific Qa-1-restricted regulatory CD8(+) T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95, 4533-4537, Apr./1998.

Junger, WG. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat.Rev.Immunol.* 11, 201-212, Mar./2011.

Kang, HJ and Im, SH. Probiotics as an Immune Modulator. *J.Nutr.Sci.Vitaminol.(Tokyo).* 61 Suppl, S103-S105, 2015.

Kapojos, JJ; van den Berg, A; Borghuis, T; Banas, B; Huitema, S; Poelstra, K and Bakker, WW. Enhanced ecto-apyrase activity of stimulated endothelial or mesangial cells is downregulated by glucocorticoids in vitro. *Eur.J.Pharmacol.* 501, 191-198, Oct./2004.

Karimi, K; Inman, MD; Bienenstock, J and Forsythe, P. *Lactobacillus reuteri*-induced regulatory T cells protect against an allergic airway response in mice. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 179, 186-193, Feb./2009.

Karvonen, AM; Hyvarinen, A; Gehring, U; Korppi, M; Doekes, G; Riedler, J; Braun-Fahrlander, C; Bitter, S; Schmid, S; Keski-Nisula, L; Roponen, M; Kaulek, V; Dalphin, JC; Pfefferle, PI; Renz, H; Buchele, G; von, ME and Pekkanen, J. Exposure to microbial agents in house dust and wheezing, atopic dermatitis and atopic sensitization in early childhood: a birth cohort study in rural areas. *Clin.Exp.Allergy.* 42, 1246-1256, Aug./2012.

Karvonen, AM; Hyvarinen, A; Rintala, H; Korppi, M; Taubel, M; Doekes, G; Gehring, U; Renz, H; Pfefferle, PI; Genuneit, J; Keski-Nisula, L; Remes, S; Lampi, J; von, ME and Pekkanen, J. Quantity and diversity of environmental microbial exposure and development of asthma: a birth cohort study. *Allergy.* 69, 1092-1101, Aug./2014.

Kay, AB. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Trends Mol.Med.* 11, 148-152, Apr./2005.

Kim, HJ; Kim, YJ; Lee, SH; Kang, MJ; Yu, HS; Jung, YH; Lee, E; Seo, JH; Kwon, JW; Kim, BJ; Yu, J; Park, HM and Hong, SJ. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* on asthma with an adoptive transfer of dendritic cells in mice. *J.Appl.Microbiol.* 115, 872-879, Sept./2013.

Kitamura, K; Takeda, K; Koya, T; Miyahara, N; Kodama, T; Dakhama, A; Takai, T; Hirano, A; Tanimoto, M; Harada, M and Gelfand, EW. Critical role of the Fc receptor gamma-chain on APCs in the development of allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *J.Immunol.* 178, 480-488, Jan./2007.

Knapp, K; Zebisch, M; Pippel, J; El-Tayeb, A; Muller, CE and Strater, N. Crystal structure of the human ecto-5'-nucleotidase (CD73): insights into the regulation of purinergic signaling. *Structure.* 20, 2161-2173, Dec./2012.

Kumar, V and Sharma, A. Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. *Eur.J.Pharmacol.* 616, 7-15, Aug./2009.

Kusel, MM; de Klerk, NH; Kebabze, T; Vohma, V; Holt, PG; Johnston, SL and Sly, PD. Early-life respiratory viral infections, atopic sensitization, and risk of subsequent development of persistent asthma. *J.Allergy Clin.Immunol.* 119, 1105-1110, May/2007.

Lebeer, S; Vanderleyden, J and De Keersmaecker, SC. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat.Rev.Microbiol.* 8, 171-184, Mar./2010.

Leckie, MJ; ten, BA; Khan, J; Diamant, Z; O'Connor, BJ; Walls, CM; Mathur, AK; Cowley, HC; Chung, KF; Djukanovic, R; Hansel, TT; Holgate, ST; Sterk, PJ and Barnes, PJ. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet.* 356, 2144-2148, Dec./2000.

Leech, MD; Benson, RA; De, VA; Fitch, PM and Howie, SE. Resolution of Der p1-induced allergic airway inflammation is dependent on CD4+CD25+Foxp3+ regulatory cells. *J.Immunol.* 179, 7050-7058, Nov./2007.

Lemanske, RF, Jr. and Busse, WW. Asthma: clinical expression and molecular mechanisms. *J.Allergy Clin.Immunol.* 125, S95-102, Feb./2010.

Lennon, PF; Taylor, CT; Stahl, GL and Colgan, SP. Neutrophil-derived 5'-adenosine monophosphate promotes endothelial barrier function via CD73-mediated conversion to adenosine and endothelial A2B receptor activation. *J.Exp.Med.* 188, 1433-1443, Oct./1998.

Lopez-Pacheco, C; Soldevila, G; Du, PG; Hernandez-Pando, R and Garcia-Zepeda, EA. CCR9 Is a Key Regulator of Early Phases of Allergic Airway Inflammation. *Mediators.Inflamm.* 2016, 3635809-2016.

Lynch, SV and Boushey, HA. The microbiome and development of allergic disease. *Curr.Opin.Allergy Clin.Immunol.* 16, 165-171, Apr./2016.

Lynch, SV; Wood, RA; Boushey, H; Bacharier, LB; Bloomberg, GR; Kattan, M; O'Connor, GT; Sandel, MT; Calatroni, A; Matsui, E; Johnson, CC; Lynn, H; Visness, CM; Jaffee, KF; Gergen, PJ; Gold, DR; Wright, RJ; Fujimura, K; Rauch, M; Busse, WW and Gern, JE. Effects of early-life exposure to allergens and bacteria on recurrent wheeze and atopy in urban children. *J.Allergy Clin.Immunol.* 134, 593-601, Sept./2014.

Macia, L; Tan, J; Vieira, AT; Leach, K; Stanley, D; Luong, S; Maruya, M; Ian, MC; Hijikata, A; Wong, C; Binge, L; Thorburn, AN; Chevalier, N; Ang, C; Marino, E; Robert, R; Offermanns, S; Teixeira, MM; Moore, RJ; Flavell, RA; Fagarasan, S and Mackay, CR. Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome. *Nat.Commun.* 6, 6734-Apr./2015.

Macpherson, AJ and Harris, NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat.Rev.Immunol.* 4, 478-485, June/2004a.

Macpherson, AJ and Uhr, T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science.* 303, 1662-1665, Mar./2004b.

Madhok, V; Futamura, M; Thomas, KS and Barbarot, S. What's new in atopic eczema? An analysis of systematic reviews published in 2012 and 2013. Part 2. Treatment and prevention. *Clin.Exp.Dermatol.* 40, 349-354, June/2015.

Mahajan, D; Wang, Y; Qin, X; Wang, Y; Zheng, G; Wang, YM; Alexander, SI and Harris, DC. CD4+CD25+ regulatory T cells protect against injury in an innate murine model of chronic kidney disease. *J.Am.Soc.Nephrol.* 17, 2731-2741, Oct./2006.

Mandapathil, M; Lang, S; Gorelik, E and Whiteside, TL. Isolation of functional human regulatory T cells (Treg) from the peripheral blood based on the CD39 expression. *J.Immunol.Methods.* 346, 55-63, July/2009.

Martinez, FD. Asthma treatment and asthma prevention: a tale of 2 parallel pathways. *J.Allergy Clin.Immunol.* 119, 30-33, Jan./2007.

Masoli, M; Fabian, D; Holt, S and Beasley, R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy.* 59, 469-478, May/2004.

Mazmanian, SK and Kasper, DL. The love-hate relationship between bacterial polysaccharides and the host immune system. *Nat.Rev.Immunol.* 6, 849-858, Nov./2006.

Misharin, AV; Morales-Nebreda, L; Mutlu, GM; Budinger, GR and Perlman, H. Flow cytometric analysis of macrophages and dendritic cell subsets in the mouse lung. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 49, 503-510, Oct./2013.

Mizumoto, N; Kumamoto, T; Robson, SC; Sevigny, J; Matsue, H; Enjoji, K and Takashima, A. CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase: modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. *Nat.Med.* 8, 358-365, Apr./2002.

Moldaver, DM; Larche, M and Rudulier, CD. An update on lymphocyte subtypes in Asthma and Airway Disease. *Chest.Nov.*/2016.

Moorman, JE; Akinbami, LJ; Bailey, CM; Zahran, HS; King, ME; Johnson, CA and Liu, X. National surveillance of asthma: United States, 2001-2010. *Vital Health Stat.3.1-58*, Nov./2012.

Mosmann, TR and Coffman, RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu.Rev.Immunol.* 7, 145-173, 1989.

Murdoch, JR and Lloyd, CM. Chronic inflammation and asthma. *Mutat.Res.* 690, 24-39, Aug./2010.

Neumann, E; Oliveira, MA; Cabral, CM; Moura, LN; Nicoli, JR; Vieira, EC; Cara, DC; Podoprigora, GI and Vieira, LQ. Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 31, 1565-1573, Dec./1998a.

Neumann, E; Oliveira, MA; Cabral, CM; Moura, LN; Nicoli, JR; Vieira, EC; Cara, DC; Podoprigora, GI and Vieira, LQ. Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 31, 1565-1573, Dec./1998b.

Neumann, E; Ramos, MG; Santos, LM; Rodrigues, AC; Vieira, EC; Afonso, LC; Nicoli, JR and Vieira, LQ. *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 induces type 1 cytokine production by mouse cells in vitro and in vivo. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 42, 358-367, Apr./2009.

Nials, AT and Uddin, S. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. *Dis.Model.Mech.* 1, 213-220, Nov./2008.

O'Garra, A; Vieira, PL; Vieira, P and Goldfeld, AE. IL-10-producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage. *J.Clin.Invest.* 114, 1372-1378, Nov./2004.

O'Sullivan, SM. Asthma death, CD8+ T cells, and viruses. *Proc.Am.Thorac.Soc.* 2, 162-165, 2005.

Ohashi, Y and Ushida, K. Health-beneficial effects of probiotics: Its mode of action. *Anim Sci.J.* 80, 361-371, Aug./2009.

Pease, JE and Williams, TJ. Chemokines and their receptors in allergic disease. *J.Allergy Clin.Immunol.* 118, 305-318, Aug./2006.

Pohjavuori, E; Viljanen, M; Korpela, R; Kuitunen, M; Tiittanen, M; Vaarala, O and Savilahti, E. Lactobacillus GG effect in increasing IFN-gamma production in infants with cow's milk allergy. *J.Allergy Clin.Immunol.* 114, 131-136, July/2004.

Regateiro, FS; Howie, D; Nolan, KF; Agorogiannis, EI; Greaves, DR; Cobbold, SP and Waldmann, H. Generation of anti-inflammatory adenosine by leukocytes is regulated by TGF-beta. *Eur.J.Immunol.* 41, 2955-2965, Oct./2011.

Reid, G. The scientific basis for probiotic strains of Lactobacillus. *Appl.Environ.Microbiol.* 65, 3763-3766, Sept./1999.

Riedler, J; Braun-Fahrlander, C; Eder, W; Schreuer, M; Waser, M; Maisch, S; Carr, D; Schierl, R; Nowak, D and von, ME. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet.* 358, 1129-1133, Oct./2001.

Riedler, J; Eder, W; Oberfeld, G and Schreuer, M. Austrian children living on a farm have less hay fever, asthma and allergic sensitization. *Clin.Exp.Allergy.* 30, 194-200, Feb./2000.

Riese, RJ and Chapman, HA. Cathepsins and compartmentalization in antigen presentation. *Curr.Opin.Immunol.* 12, 107-113, Feb./2000.

Round, JL and Mazmanian, SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat.Rev.Immunol.* 9, 313-323, May/2009.

Santos, NS. Isolamento e caracterização de *Lactobacillus acidophilus* de fezes de crianças alimentadas ao seio e de bezerros, visando sua utilização como adjunto dietético. MSc Dissertation. Viçosa, MG, Brazil: Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa.1984.

Santosa, S; Farnworth, E and Jones, PJ. Probiotics and their potential health claims. *Nutr.Rev.* 64, 265-274, June/2006.

Schuler, PJ; Harasymczuk, M; Schilling, B; Lang, S and Whiteside, TL. Separation of human CD4+CD39+ T cells by magnetic beads reveals two phenotypically and functionally different subsets. *J.Immunol.Methods.* 369, 59-68, June/2011.

- Sender, R; Fuchs, S and Milo, R. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell*. 164, 337-340, Jan./2016.
- Smit, JJ and Lukacs, NW. A closer look at chemokines and their role in asthmatic responses. *Eur.J.Pharmacol.* 533, 277-288, Mar./2006.
- Smith, K; McCoy, KD and Macpherson, AJ. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Semin.Immunol.* 19, 59-69, Apr./2007.
- Sordillo, JE; Hoffman, EB; Celedon, JC; Litonjua, AA; Milton, DK and Gold, DR. Multiple microbial exposures in the home may protect against asthma or allergy in childhood. *Clin.Exp.Allergy.* 40, 902-910, June/2010.
- Sperlagh, B; Baranyi, M; Hasko, G and Vizi, ES. Potent effect of interleukin-1 beta to evoke ATP and adenosine release from rat hippocampal slices. *J.Neuroimmunol.* 151, 33-39, June/2004.
- Sperlagh, B; Hasko, G; Nemeth, Z and Vizi, ES. ATP released by LPS increases nitric oxide production in raw 264.7 macrophage cell line via P2Z/P2X7 receptors. *Neurochem.Int.* 33, 209-215, Sept./1998.
- Sperlagh, B and Vizi, ES. The role of extracellular adenosine in chemical neurotransmission in the hippocampus and Basal Ganglia: pharmacological and clinical aspects. *Curr.Top.Med.Chem.* 11, 1034-1046, 2011.
- Strachan, DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ.* 299, 1259-1260, Nov./1989.
- Strachan, DP. Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis". *Thorax.* 55 Suppl 1, S2-10, Aug./2000.
- Strater, N. Ecto-5'-nucleotidase: Structure function relationships. *Purinergic.Signal.* 2, 343-350, June/2006.
- Taams, LS; van Amelsfort, JM; Tiemessen, MM; Jacobs, KM; de Jong, EC; Akbar, AN; Bijlsma, JW and Lafeber, FP. Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Hum.Immunol.* 66, 222-230, Mar./2005.
- Tang, ML. Probiotics and prebiotics: immunological and clinical effects in allergic disease. *Nestle.Nutr.Workshop Ser.Pediatr.Program.* 64, 219-235, 2009.
- Tang, RB; Chang, JK and Chen, HL. Can probiotics be used to treat allergic diseases? *J.Chin Med.Assoc.* 78, 154-157, Mar./2015.

Thompson, LF; Eltzschig, HK; Ibla, JC; Van De Wiele, CJ; Resta, R; Morote-Garcia, JC and Colgan, SP. Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. *J.Exp.Med.* 200, 1395-1405, Dec./2004.

Thompson, LF; Picher, M and Blackburn, MR. Animal models of airway diseases. *Subcell.Biochem.* 55, 195-234, 2011.

Trautmann, A. Extracellular ATP in the immune system: more than just a "danger signal". *Sci.Signal.* 2, e6-Feb./2009.

Truyen, E; Coteur, L; Dilissen, E; Overbergh, L; Dupont, LJ; Ceuppens, JL and Bullens, DM. Evaluation of airway inflammation by quantitative Th1/Th2 cytokine mRNA measurement in sputum of asthma patients. *Thorax.* 61, 202-208, Mar./2006.

Vael, C; Vanheirstraeten, L; Desager, KN and Goossens, H. Denaturing gradient gel electrophoresis of neonatal intestinal microbiota in relation to the development of asthma. *BMC.Microbiol.* 11, 68-Apr./2011.

van Nimwegen, FA; Penders, J; Stobberingh, EE; Postma, DS; Koppelman, GH; Kerkhof, M; Reijmerink, NE; Dompeling, E; van den Brandt, PA; Ferreira, I; Mommers, M and Thijs, C. Mode and place of delivery, gastrointestinal microbiota, and their influence on asthma and atopy. *J.Allergy Clin.Immunol.* 128, 948-955, Nov./2011.

Vieira, LQ; dos Santos, LM; Neumann, E; da Silva, AP; Moura, LN and Nicoli, JR. Probiotics protect mice against experimental infections. *J.Clin.Gastroenterol.* 42 Suppl 3 Pt 2, S168-S169, Sept./2008.

Vliagoftis, H; Kouranos, VD; Betsi, GI and Falagas, ME. Probiotics for the treatment of allergic rhinitis and asthma: systematic review of randomized controlled trials. *Ann.Allergy Asthma Immunol.* 101, 570-579, Dec./2008.

Von Ehrenstein, OS; von, ME; Illi, S; Baumann, L; Bohm, O and von, KR. Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers. *Clin.Exp.Allergy.* 30, 187-193, Feb./2000.

von, ME and Vercelli, D. Farm living: effects on childhood asthma and allergy. *Nat.Rev.Immunol.* 10, 861-868, Dec./2010.

Wang, YM and Alexander, SI. CD8 regulatory T cells: what's old is now new. *Immunol.Cell Biol.* 87, 192-193, Mar./2009.

Weiss, G; Christensen, HR; Zeuthen, LH; Vogensen, FK; Jakobsen, M and Frokiaer, H. Lactobacilli and bifidobacteria induce differential interferon-beta profiles in dendritic cells. *Cytokine.* 56, 520-530, Nov./2011.

Wilson, MS; Taylor, MD; Balic, A; Finney, CA; Lamb, JR and Maizels, RM. Suppression of allergic airway inflammation by helminth-induced regulatory T cells. *J.Exp.Med.* 202, 1199-1212, Nov./2005.

Woehrle, T; Yip, L; Elkhali, A; Sumi, Y; Chen, Y; Yao, Y; Insel, PA and Junger, WG. Pannexin-1 hemichannel-mediated ATP release together with P2X1 and P2X4 receptors regulate T-cell activation at the immune synapse. *Blood.* 116, 3475-3484, Nov./2010.

Yegutkin, GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim.Biophys.Acta.* 1783, 673-694, May/2008.

Yegutkin, GG; Wieringa, B; Robson, SC and Jalkanen, S. Metabolism of circulating ADP in the bloodstream is mediated via integrated actions of soluble adenylylase-1 and NTPDase1/CD39 activities. *FASEB J.* 26, 3875-3883, Sept./2012.

Zhernakova, A; Kurilshikov, A; Bonder, MJ; Tigchelaar, EF; Schirmer, M; Vatanen, T; Mujagic, Z; Vila, AV; Falony, G; Vieira-Silva, S; Wang, J; Imhann, F; Brandsma, E; Jankipersadsing, SA; Joossens, M; Cenit, MC; Deelen, P; Swertz, MA; Weersma, RK; Feskens, EJ; Netea, MG; Gevers, D; Jonkers, D; Franke, L; Aulchenko, YS; Huttenhower, C; Raes, J; Hofker, MH; Xavier, RJ; Wijmenga, C and Fu, J. Population-based metagenomics analysis reveals markers for gut microbiome composition and diversity. *Science.* 352, 565-569, Apr./2016.

Zimmermann, H. Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function. *Trends Pharmacol.Sci.* 20, 231-236, June/1999.

BARROS, R. et al. Adherence to the Mediterranean diet and fresh fruit intake are associated with improved asthma control. *Allergy*, v. 63, n. 7, p. 917-23, 2008.

BARROS, R. et al. Dietary intake of alpha-linolenic acid and low ratio of n-6:n-3 PUFA are associated with decreased exhaled NO and improved asthma control. *Br J Nutr*, v. 106, n. 3, p. 441-50, 2011.

GUO, C. H. et al. Nutritional supplement therapy improves oxidative stress, immune response, pulmonary function, and quality of life in allergic asthma patients: an open-label pilot study. *Altern Med Rev*, v. 17, n. 1, p. 42-56, 2012.

IIKURA, M. et al. Effect of lifestyle on asthma control in Japanese patients: importance of periodical exercise and raw vegetable diet. *PLoS One*, v. 8, n. 7, p. e68290, 2013.