



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

JULIANA DE LIMA ALVES

**EFEITO ADJUVANTE DA *LACTOCOCCUS LACTIS* NCDO2118 NA INDUÇÃO DE
TOLERÂNCIA ORAL**

Belo Horizonte
2021

JULIANA DE LIMA ALVES

**EFEITO ADJUVANTE DA *LACTOCOCCUS LACTIS* NCDO2118 NA INDUÇÃO DE
TOLERÂNCIA ORAL**

Versão Final

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Prof. Dra. Ana Maria Caetano de Faria

**Belo Horizonte
2021**

043

Alves, Juliana de Lima.

Efeito adjuvante da *Lactococcus lactis* NCDO2118 na indução de tolerância oral [manuscrito] Juliana de Lima Alves. – 2021.

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

Orientadora: Dra. Ana Maria Caetano de Faria.

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

1. Bioquímica e imunologia. 2. Tolerância Imunológica. 3. *Lactococcus lactis*.
I. Faria, Ana Maria Caetano de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1



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 TESE DE DOUTORADO DE JULIANA DE LIMA ALVES. Aos vinte dias do mês de setembro de 2021 às 14:00 horas, reuniu-se de forma “on line” pela plataforma “Zoom”, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Efeito adjuvante da *Lactococcus lactis* NCDO2118 na indução de tolerância oral", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Ana Maria Caetano de Faria, 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: Dr. Valbert Nascimento Cardoso (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Cláudia Brodskyn (Instituto de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ/BA), aprovada; Dra. Adriana César Bonomo (Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/RJ), aprovada; Dra. Angélica Thomaz Vieira (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Ana Maria Caetano de Faria - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA
 REPROVADA

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, 20 de setembro de 2021.

Dr. Valbert Nascimento Cardoso (UFMG)

Valbert N. Cardoso

Dra. Cláudia Brodskyn (Instituto de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ/BA)

Cláudia Brodskyn

Dra. Adriana César Bonomo (Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/RJ)

Adriana César Bonomo

Dra. Angélica Thomaz Vieira (UFMG)

Angélica Thomaz Vieira

Ana Maria Caetano de Faria

Dra. Ana Maria Caetano de Faria - Orientadora (UFMG)

Leda Quercia Vieira

Profª Leda Quercia Vieira
 Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
 em Bioquímica e Imunologia

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Imunobiologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Apoio Financeiro: Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Dedico este trabalho ao Senhor da minha
vida, Jesus Cristo!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar, por ser meu melhor amigo, meu conselheiro, meu ajudador em cada dia de experimento, aquele que me relaciono a cada dia e que me deu discernimento e sabedoria pra pensar e escolher cada etapa desse doutorado, aquele que esteve ao meu lado enquanto ninguém mais estava, enquanto eu estive sozinha chorando, lá estava ele, meu Pai, meu Deus, me acalmando e me tranquilizando, fazendo milagres também em experimentos que eu tinha certeza que dariam errado. Ele é o único que conhece meu coração, é o único que sabe tudo o que passei. Obrigada meu Deus!

Aos meus pais, obrigada por me incentivarem a entrar na pesquisa, por todos os conselhos nos momentos certos que me fizeram sentir paz e estímulo para prosseguir.

A minha irmã, Geórgia, pelo apoio diário com suas doces palavras de incentivo, seu ombro amigo e seu exemplo de luta e garra que fazem a diferença na minha vida. Você me ensina a ver a vida mais leve!

Ao meu marido e companheiro, João Gabriel, pelo impulso necessário em cada momento, pela paciência nos dias de aflição, pelos conselhos cheios de amor e incentivo que me ajudam a crescer a cada dia.

Ana Faria, como uma mãe, tão meiga e firme ao mesmo tempo. Obrigada por me acolher, me ensinar com paciência, me ajudar a superar cada erro e vibrar comigo os meus acertos. Aprendi muito com você! Você é um exemplo pra mim!

Tatiani Maioli, se hoje estou aqui foi porque você me deu a oportunidade de conhecer a pesquisa experimental. Obrigada.

Ao pessoal do LIB, agradeço por todo o aprendizado, em especial ao Mauro pelas sugestões e críticas construtivas, por me ajudar em todos os experimentos e ficar comigo no laboratório até de madrugada com toda a dedicação.

Aos meus colaboradores, principalmente Renato Elias, Ágata, Fillipe Carmo e Gregório Cavalcanti.

Daniela Reis, obrigada por me ensinar e pela ajuda especial nas citometrias de fluxo.

Ilda, Hermes, dona Carminha e Ilma, agradeço por facilitarem a nossa vida científica deixando o biotério e o laboratório impecáveis.

Aos funcionários da pós graduação obrigada por toda a eficiência em tornar tudo mais fácil.

Às agências financiadoras, por possibilitarem financeiramente essa pesquisa.

“Àquele que é capaz de fazer infinitamente mais do que tudo o que pedimos ou pensamos, de acordo com o seu poder que atua em nós, a ele seja a glória na igreja e em Cristo Jesus, por todas as gerações, para todo o sempre!”

Eféios 3:20,21

RESUMO

A tolerância imunológica é um dos fenômenos pelos quais o organismo consegue tolerar autoantígenos ao invés de reagir de forma inflamatória contra eles. A tolerância oral (TO) é um mecanismo análogo à autotolerância e é definida como a supressão de respostas imunes humorais e celulares contra antígenos específicos, gerada pela administração prévia desses antígenos por via oral. A TO tem um grande potencial terapêutico para doenças inflamatórias intestinais, hipersensibilidades alimentares e doenças autoimunes, porém ainda existem algumas dificuldades para sua implementação na prática clínica tais como doses ideais e redução da sua eficácia após a sensibilização. Para resolver essas dificuldades, é importante encontrarmos protocolos otimizados para potencializarmos a indução de TO pela ação de agentes adjuvantes como a *Lactococcus lactis*. O efeito adjuvante da *L. lactis* NCDO2118 na inibição de doenças inflamatórias tem sido estudado em alguns modelos pelo nosso grupo de pesquisa e por colaboradores, como encefalomielite autoimune experimental (EAE), artrite, colite e mesmo na inflamação induzida pela infecção por *Leishmania* quando esta bactéria é administrada juntamente com a proteína HSP65 e em modelo de GVHD quando ela é administrada juntamente com um aloantígeno. O objetivo do presente estudo foi avaliar os componentes da *L. lactis* envolvidos no efeito adjuvante da administração de *L. lactis* associada à ovalbumina (OVA) na indução de tolerância oral em camundongos C57BL/6. Usamos um protocolo subotimo de TO. Camundongos que ingeriram OVA associada à *L. lactis* NCDO2118 por via oral apresentaram níveis mais baixos de IgG1 e IgE anti-OVA no soro; frequência aumentada de células dendríticas tolerogênicas (CD11c⁺CD11b⁻CD103⁺), de macrófagos residentes CX3CR1⁺, de células Treg (CD4⁺LAP⁺) e de ILC2 na mucosa intestinal e nos linfonodos mesentéricos (MLNs) proximais. Observamos alteração no perfil da microbiota e de seus metabólitos produzidos no lumen intestinal, principalmente um aumento na produção de lactato, um ácido orgânico produzido em grande quantidade pela *L. lactis*. Sinergicamente houve um aumento na expressão de receptores de lactato no intestino, tais como GPR31 e principalmente GPR81 que, quando inibido por seu antagonista, gerou perda da TO. Em modelo de alergia alimentar à OVA, a *L. lactis* reduziu o número de eosinófilos melhorando

parâmetros inflamatórios da doença. Concluimos que a *L. lactis* NCDO2118 desencadeou modulação da microbiota intestinal e mecanismos imunes inatos que melhoram a indução de TO a OVA, o que a torna essa bactéria um excelente adjuvante desse fenômeno.

Palavras-chave: Tolerância imunológica. *Lactococcus lactis*

ABSTRACT

Immunological tolerance is one of the phenomena by which the body can tolerate self-antigens instead of inducing inflammatory responses against them. Oral tolerance (OT) is a mechanism analogous to self-tolerance and it is defined as the suppression of humoral and cellular immune responses against specific antigens, generated by the previous oral administration of these antigens. OT is an advantageous therapy in inflammatory bowel diseases, food hypersensitivity and autoimmune diseases, but there are still some difficulties in implementing OT in clinical practice such as optimal doses and reduction in efficacy after sensitization. Therefore, it is important to find optimized protocols to enhance OT induction using adjuvant agents such as *Lactococcus lactis*. The adjuvant effect of *L. lactis* NCDO2118 has been studied in some models by our research group and collaborators, such as experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), arthritis, colitis and the inflammatory reaction induced by *Leishmania* infection, administered together with the HSP65 protein and in a GVHD model, administered together with an alloantigen. The aim of the present study was to identify the components of *L.lactis* involved in its adjuvant effect in the induction of oral tolerance in C57BL/6 mice. We used a suboptimal OT protocol. Mice that ingested OVA associated with *L. lactis* NCDO2118 orally had lower levels of anti-OVA IgG1 and IgE serum; increased frequency of tolerogenic dendritic cells (CD11c⁺CD11b⁻CD103⁺), of CX3CR1⁺ resident macrophages, of Treg cells (CD4⁺LAP⁺) and of ILC2 in the intestinal mucosa and in the proximal mesenteric lymph nodes (MLNs). We observed changes in the profile of the microbiota and its metabolites produced in the intestinal lumen, especially an increase in lactate, an organic acid produced in large quantities by *L. lactis*. Synergistically, there was an increase in the expression of lactate receptors in the intestine, such as GPR31 and especially GPR81, which when inhibited by its antagonist, generated a loss of OT. In a food allergy model to OVA, *L. lactis* reduced the number of eosinophils improving the inflammatory parameters of the disease. We conclude that components of *L. lactis* NCDO2118 such as lactate triggered microbiota modulation and innate immune mechanisms that improve induction of OT to OVA, which makes it an excellent adjuvant for this phenomenon.

Keywords: Immune tolerance. *Lactococcus lactis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de indução de TO.....	25
Figura 2. Efeitos mucosos e sistêmicos da TO.....	30
Figura 3. Desenho representativo do protocolo experimental da TO a OVA.....	40
Figura 4. Desenho representativo do protocolo experimental da alergia a OVA.....	41
Figura 5. Protocolo experimental do modelo de colite induzida por DSS.....	42
Figura 6. Estratégia de <i>gating</i> para as análises de células dendríticas e macrófagos residentes.....	51
Figura 7. Estratégia de <i>gating</i> para as análises de ILCs.....	52
Figura 8. Estratégia de <i>gating</i> para as análises de células Thelper.....	53
Figura 9. Estratégia de <i>gating</i> para as análises de células Treg.....	54
Figura 10. Efeito da administração de <i>L.lactis</i> NCDO2118 na colite induzida por DSS.....	60
Figura 11. Padronização do protocolo subótimo de indução de tolerância oral.....	64
Figura 12. Análise de componentes bacterianos que podem auxiliar na TO.....	67
Figura 13. Análise do papel dos receptores do lactato GPR81 e GPR31 na TO.....	69
Figura 14. Frequência de células dendríticas e linfócitos T CD4 ⁺ LAP ⁺ nos MLN compartimentalizados após submissão ao protocolo de TO.....	71
Figura 15. Frequência de células dendríticas e macrófagos residentes na LP após indução de TO.....	73
Figura 16. Efeito da <i>L.lactis</i> NCDO2118 no perfil de linfócitos Th e células linfoides inatas na LP após a indução de TO.....	75
Figura 17. Efeitos da administração de <i>L.lactis</i> NCDO2118 na mucosa intestinal e nos MLN de camundongos naive.....	77
Figura 18. Análise de perfil microbiano intestinal por meios seletivos.....	79
Figura 19. Análise do perfil da microbiota intestinal por qPCR.....	81
Figura 20. Análise de ácidos orgânicos nas fezes e meios seletivos de bactérias intestinais.....	84

Figura 21. Análise do efeito adjuvante da <i>L. lactis</i> NCDO2118 na indução de tolerância oral em modelo de alergia alimentar a OVA.....	86
Figura 22. Resumo gráfico da hipótese de trabalho e dos resultados.....	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Pontuações relativas ao escore macroscópico da colite.....	44
Tabela 2: Relação dos anticorpos utilizados na citometria de fluxo, seus marcadores e seus fabricantes.....	49
Tabela 3: Sequência de genes utilizados para qPCR.....	55
Tabela 4: Sequência de genes utilizados para análise da microbiota por qPCR.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag - Antígeno
Al(OH)₃ - hidróxido de alumínio
APC- Célula apresentadora de antígeno
Breg – Células B reguladoras
CDs – células dendríticas
cTECs -Células epiteliais do córtex do timo
DSS – Dextran sulfato de sódio
DTH - Reação de hipersensibilidade tardia
EAE - Encefalomielite autoimune experimental
FDA - *Food and Drug Administration*
FMO- *Fluorescence minus one*
Foxp3 - *forkhead box P3*
GALT - Tecido Linfóide Associado ao Intestino
GFP – Proteína verde fluorescente
GRAS - *Generally Regarded as Safe*
GVHD – Doença do enxerto versus hospedeiro
HPLC - Cromatografia Líquida de alta eficiência
HSP - *Heat shock proteins*
i.p. – Intraperitoneal
IBD - Doença inflamatória intestinal
IELs – Linfócitos intraepiteliais
Igs – Imunoglobulinas
ILC - Innate lymphoid cells
iTreg – linfócitos T reguladores induzidos
L. lactis – *Lactococcus lactis*
LAB – Bactéria ácido láctica
LAP - *latency-associated peptide*
LPS - Lipopolissacáride
MLN – Linfonodos mesentéricos
nTreg – linfócitos T reguladores naturais
OPD - Ortofenileno-diamino

OVA – Ovalbumina

PCR - *Polymerase chain reaction*

PP – Placa de Peyer

ROR γ t - RAR-related orphan receptor gamma t

SCFAs – Ácidos graxos de cadeia curta

SIgA- Imunoglobulina A Secretória

TCR – Receptores de células T

TO - Tolerância Oral

Treg – Linfócitos T reguladores

UFC- Unidades Formadoras de Colonias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1- Tolerância imunológica e Tolerância Oral.....	18
1.2- Mecanismos imunológicos da TO na mucosa intestinal.....	20
1.3- Microbiota intestinal e tolerância.....	26
1.4- A indução de tolerância como alternativa terapêutica.....	29
1.5- <i>Lactococcus lactis</i> NCDO2118: uma bactéria produtora de ácido láctico.....	33
2. OBJETIVOS.....	37
2.1- Objetivo Geral.....	37
2.2- Objetivos Específicos.....	37
3. METODOLOGIA.....	38
3.1- Animais.....	38
3.2- Tratamento com <i>Lactococcus lactis</i>	38
3.3- Inativação das bactérias.....	38
3.4- Extração de proteínas de superfície bacteriana.....	39
3.5- Administração de lactato via oral.....	39
3.6- Administração do antagonista e do agonista de GPR81 via oral.....	40
3.7- Indução de tolerância oral a OVA.....	40
3.8- Modelo experimental de alergia alimentar a OVA.....	41
3.9- Modelo de Colite induzida por DSS.....	41
3.10- Avaliação do peso corporal dos animais em modelo de colite.....	42
3.11- Teste de permeabilidade intestinal em modelo de colite.....	43
3.12- Escore inflamatório da colite.....	43
3.13- Obtenção de sangue para análise das imunoglobulinas anti OVA.....	44
3.14- Ensaio imunoenzimático (ELISA) para medida de IgG1 anti OVA.....	44
3.15- Ensaio imunoenzimático (ELISA) para medida de IgE anti OVA.....	45
3.16- Ensaio imunoenzimático (ELISA) para medida de IgA secretória (SIgA).....	46
3.17- Preparo de suspensões de células.....	47
3.18- Citometria de fluxo.....	47
3.19- <i>Polymerase chain reaction</i> (PCR) em tempo real de amostras do intestino.....	55

3.20-	Análise da microbiota por PCR em tempo real.....	56
3.21-	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	57
3.22-	Análise do perfil da microbiota por meios seletivos.....	57
3.23-	Fixação dos tecidos para análises morfológicas.....	58
3.24-	Coloração das lâminas histológicas.....	58
3.25-	Contagem de eosinófilos.....	58
3.26-	Análise estatística.....	58
4.	RESULTADOS.....	59
4.1-	<i>Lactococcus lactis</i> NCDO2118 tem papel anti-inflamatório na colite por DSS.....	59
4.2-	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO2118 apresentou papel adjuvante na indução de tolerância à OVA.....	61
4.3-	O efeito adjuvante da <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO2118 envolveu o lactato e seus receptores.....	65
4.4-	O efeito adjuvante da <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO2118 envolveu aumento na frequência das células dendríticas tolerogênicas e dos macrófagos residentes.....	70
4.5-	O efeito adjuvante da <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO2118 envolveu aumento na frequência das ILC2 e não alterou populações de linfócitos Th.....	74
4.6-	A administração de <i>L. lactis</i> NCDO2118 altera a frequência de células na mucosa intestinal de camundongos naive.....	76
4.7-	A administração de <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO2118 alterou o perfil da microbiota intestinal.....	78
4.8-	A administração de <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO2118 modulou a produção de metabólitos nas fezes dos camundongos.....	82
4.9-	Tratamento com <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO2118 melhorou parâmetros da alergia alimentar a OVA.....	85
5.	DISCUSSÃO.....	88
6.	CONCLUSÃO.....	96
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

1. INTRODUÇÃO

1.1- Tolerância imunológica e Tolerância Oral

A tolerância imunológica é um dos fenômenos críticos para a homeostase do organismo já no início da vida. A partir dela, o organismo consegue tolerar autoantígenos ao invés de reagir de forma inflamatória contra eles. A tolerância imunológica tem sido definida como um mecanismo pelo qual o sistema imune previne a autoreatividade patológica contra o *self*, impedindo assim a autoimunidade (Rezende & Weiner, 2017). Os mecanismos envolvidos na geração da tolerância imunológica dependem dos órgãos linfoides primários, como o timo. O timo é o órgão linfóide primário para geração de células T. Os mecanismos de tolerância no timo asseguram que as células T autorreativas sejam eliminadas ou se tornem células T com propriedades reguladoras antes de migrarem para a periferia. A tolerância tímica acontece por dois mecanismos: (1) Seleção positiva, que é mediada pelas células epiteliais do córtex do timo (cTECs) que selecionam timócitos expressando receptor de células T (TCR) que possuem afinidade intermediária para o complexo MHCII- peptídeo expresso na superfície das cTECs. (2) Seleção negativa, mediada por células apresentadoras de antígeno (APCs) residentes na junção córtico-medular do timo (células epiteliais medulares e células dendríticas - CDs) que iniciam a morte celular programada de timócitos que expressam TCRs com alta afinidade por autoantígenos, removendo essas células da população de células T naive que irão migrar para tecidos linfoides periféricos (Handel et al., 2018).

A seleção tímica é importante para se estabelecer tolerância a autoantígenos e a quebra dessa tolerância imunológica pode desencadear doenças autoimunes como diabetes tipo 1, esclerose múltipla, artrite dentre outras.

Um outro mecanismo, análogo à auto-tolerância, é reponsável pela tolerância a diversos antígenos que entram em contato por via oral, como os antígenos da dieta e da microbiota, e é conhecido como Tolerância Oral (TO) (Ana M C Faria & Weiner, 2005).

A TO é definida como a supressão de respostas imunes humorais e celulares contra antígenos específicos, gerada pela administração prévia destes antígenos por via oral (Ana M.C. Faria & Weiner, 2006; Ana M C Faria & Weiner, 2005). Esse fenômeno já foi bem descrito tanto para animais experimentais quanto para

humanos (Andrade et al., 2006; Mestecky et al., 1996; Round et al., 2010; Vaz et al., 1977)

O nome “tolerância” foi proposto em 1953 por Peter Medawar que demonstrou em modelo experimental de transplantação que a injeção de células de camundongos de uma linhagem em embriões de outra linhagem de camundongos durante a gestação era capaz de evitar a rejeição de transplantes de pele alogênicos entre essas linhagens (Billingham et al., 1953). Mais tarde, esse termo foi incorporado por Burnet (Burnet, 1959) em sua clássica Teoria de Seleção Clonal. O conceito de tolerância de Burnet envolvia três suposições básicas, onde (i) a função primária do sistema imune seria proteger o organismo de patógenos ou de componentes não próprios; (ii) para realizar esta função, a resposta imune deveria ser uma resposta inflamatória; e (iii) a tolerância seria uma resposta negativa do sistema imune devido à exclusão de "clones proibidos" auto reativos durante o período embrionária e perinatal.

Nos anos 70, ficou claro que a tolerância natural aos autocomponentes era um fenômeno mais complexo. Esse fenômeno foi caracterizado como um evento imunológico que envolvia a ação supressora de linfócitos Treguladores (Treg) (A.M.C. Faria & Weiner, 1999). Estudos derivados desta nova abordagem demonstraram que a tolerância é um processo ativo que depende da atividade de Treg auto-reativos capazes de suprimir os linfócitos T efetores na periferia (Cohen & Young, 1991; Sakaguchi, 2004). Em analogia à essa reatividade não inflamatória natural do sistema imune contra componentes próprios, o nome “tolerância oral” foi cunhado para a tolerância a antígenos que acessam o corpo por via oral, por serem reconhecidos como próprio (Vaz et al., 1977). Apesar disso, somente na década de 80 é que surgiram os primeiros estudos clínicos que usaram modelos animais de doenças autoimunes mostrando o potencial uso clínico da via oral para inibir doenças inflamatórias.

Assim, a tolerância oral é classicamente definida como a supressão específica de células e / ou respostas imunes humorais a um antígeno por administração prévia desse antígeno por via oral (Vaz et al., 1977). Presumivelmente, evoluiu como um análogo da autotolerância para prevenir reações de hipersensibilidade a proteínas alimentares e antígenos bacterianos comensais presentes na mucosa intestinal.

Experimentalmente, a TO é realizada por meio da administração de um antígeno alvo, via oral, seguido da administração desse antígeno por via não fisiológica. Animais tolerantes apresentam um estado de hiporresponsividade inflamatória humoral e celular, o que não é observado em animais que não são previamente tratados com o antígeno pela via oral (Ana M C Faria & Weiner, 2005; Weiner et al., 2011)

A falha em estabelecer a tolerância oral ou a quebra de um estado de tolerância já existente pode provocar a indução de reações de hipersensibilidade aos antígenos da dieta ou da microbiota e desencadear alergias alimentares e doenças inflamatórias intestinais (Saurer & Mueller, 2009).

A TO é gerada principalmente por indução de células Treg, produtoras de citocinas anti-inflamatórias, como TGF- β e IL-10 (Ana M C Faria & Weiner, 2005). Os efeitos locais e sistêmicos das células Treg previnem reações de hipersensibilidade danosas aos antígenos inofensivos originados do intestino, por isso tais células são cruciais para a homeostase imune (O. Pabst & Mowat, 2012). Além disto, as células Treg induzidas pela administração oral de antígenos induzem tolerância sistêmica e são capazes de inibir respostas imunes em todo o corpo. Vários antígenos alvo em doenças autoimunes já foram testados por via oral e a sua ingestão se mostrou-se muito eficaz na prevenção de modelos experimentais de encefalomielite autoimune experimental, artrite, colite, uveíte, tireoidite, entre outras (Ana M.C. Faria & Weiner, 2006).

Dessa forma, é importante estudar maneiras eficazes que favoreçam a tolerância prevenindo doenças causadas pela quebra da homeostase tecidual.

1.2- Mecanismos imunológicos da TO na mucosa intestinal

A mucosa intestinal representa a maior área do organismo de contato com o meio ambiente e possui 32m² (Helander & Fändriks, 2014). Trata-se de uma única camada de células epiteliais absorptivas fazendo a interface entre o lúmen (ambiente externo) e a lâmina própria (LP) (ambiente interno). Dessa perspectiva, pode-se dizer que a anatomia da mucosa intestinal não é propícia para que ela atue como uma barreira estrita, mas sim para funcionar como interface de forma a permitir a absorção de nutrientes e concomitantemente abrigar trilhões de microorganismos comensais (Mucida et al., 2009; Weiner et al., 2011). A mucosa intestinal representa

a maior superfície de contato com o meio externo e é a rota primária pela qual nós somos expostos a antígenos diariamente (Weiner et al., 2011). Sob condições fisiológicas a microbiota e os antígenos alimentares são fontes naturais de estimulação do GALT (Tecido Linfóide Associado ao Intestino) (Ana Maria Caetano Faria et al., 2013). O GALT é composto pelas placas de Peyer (PP), pelos folículos linfoides isolados e o apêndice. Juntos, o GALT, os linfócitos intra-epiteliais (IELs) e os linfócitos da LP (Mowat, 2003) representam o maior órgão linfóide do corpo. Associado ao GALT, uma cadeia de linfonodos mesentéricos (MLN) drena os vários segmentos do intestino delgado e grosso funcionando como sítio de migração, diferenciação e expansão de linfócitos ativados na mucosa intestinal (P Brandtzaeg, 2009; Esterházy et al., 2019). Essas estruturas são essenciais para o reconhecimento imune de antígenos do lúmen sendo que os MLN são essenciais para o desenvolvimento da TO (Spahn et al., 2002; Worbs et al., 2006).

É estimado que um indivíduo adulto ingere aproximadamente 30Kg de proteínas por ano provenientes da dieta e, destas, 130 a 190g são absorvidas diariamente no intestino. Além disso, o número de bactérias que colonizam o trato gastrointestinal pode chegar até 10^{12} no cólon sendo uma fonte adicional de estimulação antigênica. (Mowat, 2003; Rezende & Weiner, 2017). O contato do GALT com esses antígenos é crucial para a maturação do sistema imune, desenvolvimento da TO e para a manutenção da homeostase (da Silva Menezes et al., 2003). Portanto, a TO é uma forma de tolerância periférica a agentes externos que ganham acesso ao corpo via uma rota natural oral e que são reconhecidos como parte do *self*.

A indução de tolerância às bactérias comensais e às proteínas da dieta representa o maior evento imunológico que acontece no intestino em condições fisiológicas. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a hiporresponsividade a antígenos alimentares. Baixas doses de antígenos administrados oralmente ativam a supressão através da geração de células T reguladoras (Treg), enquanto que altas doses podem desencadear anergia ou deleção clonal (Weiner et al., 2011). Estudos têm demonstrado que a utilização de ovalbumina (OVA) em protocolos de TO em camundongos é um método eficiente para verificar seus efeitos homeostáticos na mucosa intestinal, com a redução de imunoglobulinas (Igs) anti-OVA no soro, geração de células Treg e produção de

citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β no intestino e nos órgãos linfoides drenantes (R. P. Oliveira et al., 2015).

Além disso, sabemos também que o número de plasmócitos secretores de Igs presentes no intestino excede, em inúmeras vezes, o número encontrado nos outros órgãos linfoides juntos (Shevach, 2009). Então, esse contato antigênico iniciado na mucosa intestinal tem importante impacto na ativação do sistema imune e desenvolvimento de TO (Rezende & Weiner, 2017).

Está claro que a captação e apresentação de antígenos pelas células dendríticas (CDs) presentes na LP do intestino é importante para o desenvolvimento de tolerância a antígenos solúveis no intestino delgado. As células dendríticas que expressam CD103 são fundamentais para a TO, pois possuem a habilidade de produzir ácido retinóico, um metabólito gerado a partir da oxidação de vitamina A proveniente da dieta (Kelsall, 2008). Tal função se deve à capacidade das CDs CD103⁺ de expressar enzimas responsáveis pelo metabolismo da vitamina A, como a ALDH, que oxida vitamina A em retinaldeído, e a RALDH, que oxida o retinaldeído em ácido retinóico. A capacidade de produzir ácido retinóico juntamente com a citocina TGF- β torna essa população de CDs capaz de induzir a diferenciação de Treg CD4⁺ Foxp3⁺ (*forkhead box P3*), células que irão iniciar o processo de tolerância oral (Coombes et al., 2007; Mucida & Cheroutre, 2007; Scott et al., 2011). A citocina TGF- β é secretada principalmente pelas CDs CD103⁺ expressando mRNA para *tgfb1* bem como o *tissue plasminogen activator* e o *latent TGF- β binding protein 3*, que são capazes de ativar o TGF- β latente. As CDs CD103⁺ migram para os linfonodos mesentéricos de maneira dependente de CCR7, induzem a diferenciação de células Treg CD4⁺Foxp3⁺ que expressam moléculas direcionadoras da sua migração para a mucosas, como o receptor de quimioquina CCR9 e a integrina $\alpha 4\beta 7$, estimulados pela presença de ácido retinóico. Estas Treg se tornam capazes de migrar para a LP, onde elas se expandem sob influência de macrófagos residentes CX3CR1⁺ produtores de IL-10 e outras células produtoras de IL-10 e TGF- β , auxiliando no fenômeno da tolerância oral (Mazzini et al., 2014). Macrófagos residentes CX3CR1⁺ absorvem antígenos luminiais solúveis e podem transferir esses antígenos para células dendríticas CD103⁺ (Mazzini et al., 2014; Takada et al., 2010) que migram para os MLNs, onde apresentam antígenos para células T naive. A produção de ácido retinóico e TGF- β pelas DCs CD103⁺ também permite a elas

conduzir a produção de IgA pelas células B (Mucida & Cheroutre, 2007; Scott et al., 2011).

Dentre as células Treg $CD4^+Foxp3^+$, as Treg naturais derivadas no timo (nTreg) são abundantes tanto na mucosa intestinal quanto em outros órgãos linfóides. Essas células são importantes para controlar com eficiência a reatividade aos autocomponentes, evitando a instauração de doenças autoimunes, porém não são essenciais para a indução de tolerância oral. Verificou-se que camundongos duplo transgênicos OVA-HA que possuem linfócitos T reativos à OVA e linfócitos B reativos à hemaglutinina, não são capazes de produzir nTregs, mas são capazes de desenvolver TO a OVA. Esses camundongos duplo transgênicos OVA-HA, geneticamente deficientes em *Foxp3* e deficientes em produzir iTregs, não foram capazes de desenvolver TO a OVA (Curotto de Lafaille et al., 2008). Isso indica que as Tregs induzidas (iTregs) pela periferia que expressam *Foxp3*, são necessárias para a indução de tolerância oral, mas não as nTregs (Mucida et al., 2005), que podem ser distinguidas pela expressão da molécula de Neuropilina (Shevach & Thornton, 2014; Weiss et al., 2012).

A população de iTregs envolvida na indução de tolerância oral é heterogênea. Além das iTregs clássicas $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, outro subtipo de Treg que é abundante na mucosa intestinal é a $CD4^+LAP^+$, que expressa o *latency-associated peptide* (LAP), chamado TGF- β de membrana (Oida & Weiner, 2010). Essas células exercem seu papel supressor de maneira dependente de TGF- β (Ochi et al., 2006) e a neutralização delas por administração intravenosa do anticorpo anti-LAP impede a indução de tolerância oral em modelos murinos de encefalomielite autoimune experimental (EAE) (Da cunha et al., 2015; Rezende et al., 2013) e artrite (Gusmao-Silva et al., 2020).

Foi proposto que o mecanismo principal desencadeado pela ação das iTregs é a produção de citocinas inibitórias, como IL-10, TGF- β e IL-35 (Cao et al., 2007; Ana M.C. Faria & Weiner, 2006). No entanto, o papel do anti-inflamatório das citocinas na tolerância oral é uma questão de debate. Sabemos que IL-10 é uma citocina crítica para a homeostase intestinal já que camundongos geneticamente deficientes para IL-10 desenvolvem colite espontânea. Porém esses animais podem se tornar tolerantes por meio de protocolos otimizados de TO (Gomes-Santos et al., 2012; Rizzo et al., 1999). Já a citocina TGF é crucial para a diferenciação de iTreg, que possui papel importante na TO (Edwards et al., 2014).

Sabemos que os mecanismos que ocorrem nos linfonodos mesentéricos são cruciais para o desenvolvimento de TO (**Figura 1**). Um estudo demonstrou que a remoção cirúrgica dos linfonodos mesentéricos prejudicou a indução de TO (Worbs et al., 2006). Outro estudo demonstrou que camundongos deficientes em CCR7, um receptor essencial para migração celular do intestino para os linfonodos, falham em desenvolver TO (Förster et al., 2008).

Recentemente, foi descrito que a cadeia de MLN é dividida em linfonodos que drenam cada parte do intestino e orquestram as respostas imunes diferenciadas aos antígenos luminiais. Esses linfonodos são imunologicamente distintos e suportam diferentes respostas imunológicas, dependendo do segmento intestinal que eles drenam (Esterházy et al., 2019; Houston et al., 2016). Essa descoberta gerou a classificação dos linfonodos específicos que drenam cada compartimento do intestino: duodeno, jejuno, íleo e cólon. Os MLN que drenam regiões proximais do intestino, como o duodeno e o jejuno, locais onde ocorrem a absorção e processamento dos alimentos, estão mais relacionados ao desenvolvimento da TO (Esterházy et al., 2019). Tais linfonodos proximais possuem maior frequência de CDs tolerogênicas $CD103^+CD11b^-$ e de Treg $Foxp3^+$ após a administração de antígeno oral. Por outro lado, os linfonodos que drenam regiões distais do intestino, íleo e colon, onde a maior parte da microbiota intestinal está localizada, abriga altas frequências de células dendríticas pró-inflamatórias, linfócitos Th17 efetores e células relacionadas ao RAR-related orphan receptor gamma t ($ROR\gamma t$) após desafio de antígeno no íleo. Logo, concluímos que o local de ocorrência das respostas mais importantes para indução de TO se concentra nos linfonodos proximais, enquanto os linfonodos distais favorecem as respostas pró-inflamatórias (Esterházy et al., 2019).

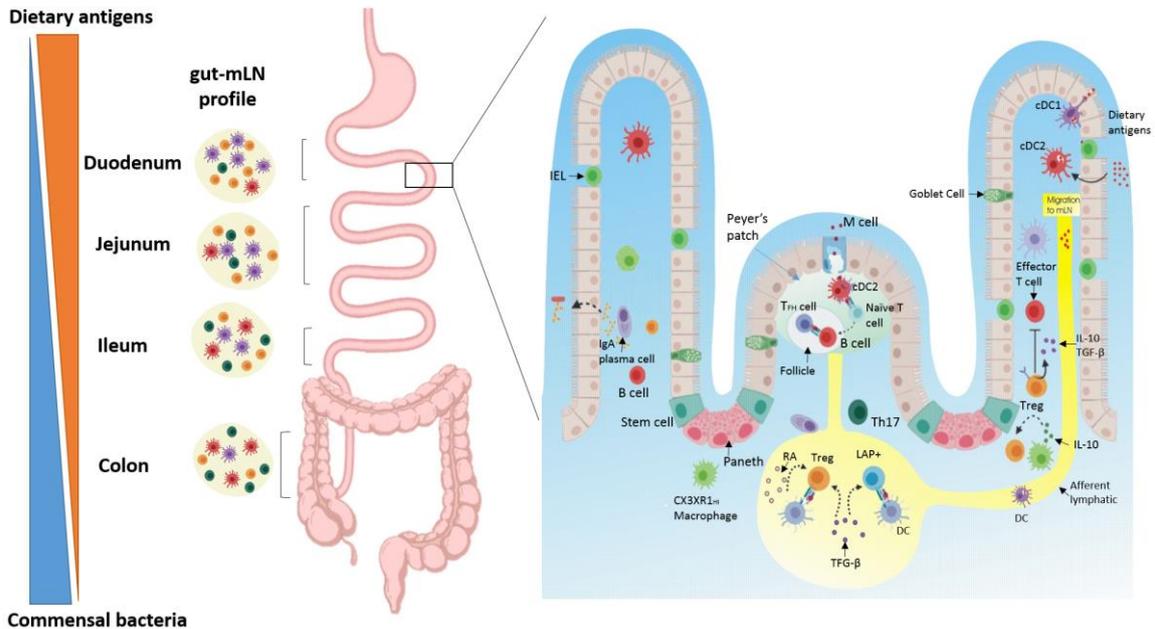


Figura 1. Mecanismos de indução de TO. O contato com antígenos da dieta diminui gradativamente da parte proximal para a parte distal o intestino, enquanto o número de bactérias aumentam nos segmentos distais. Linfonodos que drenam cada segmento do intestino são imunologicamente distintos e adaptados às regiões que drenam. Linfonodos duodenais possuem altas frequências de Treg Foxp3⁺ e DCs tolerogênicas quando comparados com linfonodos distais. DCs derivadas da LP e linfonodos proximais produzem grandes quantidades de ácido retinóico e TGF-β, que durante a interação com células T, induzem a expressão de CCR9 e α4β7, convertendo linfócitos T *naive* em iTreg Foxp3⁺, enquanto suprime a diferenciação Th17. Por outro lado, linfonodos distais abrigam altas frequências de células Th17 e iTreg RORγT⁺. A captação do antígeno ocorre por meio de uma variedade de mecanismos, incluindo o transporte dos antígenos através das células M em placas de peyer, por DCs que capturam antígenos, ou após a transferência de antígeno por macrófagos CX3CR1 que captam antígenos luminiais. CCR7⁺CD103⁺ DCs são mais eficientes em induzir iTregs e tolerância após serem carregadas de antígeno e migrarem para MLN. A presença de TGFβ induz Tregs LAP⁺ por ação da integrina αvβ8. Tregs medeiam a supressão pela produção de citocinas inibitórias, como IL-10 e TGF-β. A produção de IL-10 por macrófagos CX3CR1 residentes contribui para expandir iTregs FOXP3⁺ na LP. Antígenos da microbiota comensal também podem ser transportados por DCs para os MLN para induzir iTregs. Além disso, SIgA secretada pelas células plasmáticas e presente no muco bloqueia a adesão de bactérias comensais e patógenos para o epitélio intestinal; também neutraliza toxinas e lipopolissacarídeos bacterianos que penetram no epitélio (Pinheiro-Rosa et al., 2021).

Portanto, a captação de antígenos pelas CDs e pelos macrófagos residentes CX3CR1⁺ no GALT, a migração de CDs para os linfonodos mesentéricos e a indução de células Treg com a participação de citocinas antiinflamatórias parecem ser etapas fundamentais durante as quais a TO é induzida (Mazzini et al., 2014; O. Pabst & Mowat, 2012).

As *Innate lymphoid cells* (ILCs) também são conhecidas por participarem da imunidade protetora e da regulação da homeostase e da inflamação. São células semelhantes a linfócitos, porém não expressam receptores de diversidade antigênica ou fazem rearranjo gênico como linfócitos B ou T. Essas células são abundantes na mucosa intestinal (LP) e supõe-se que participem no desenvolvimento da TO, condicionando o meio intestinal a um perfil tolerogênico. As ILC1s expressam o fator de transcrição T-bet, produzem IFN- γ e TNF e são ativadas por IL-12 derivada de células dendríticas (Vivier et al., 2018).

As ILC2s expressam GATA-3 e têm um papel crítico nas respostas alérgicas e anti-helmínticas mas também secretam anfiregulina, uma molécula envolvida na reparação de tecidos (Arpaia et al., 2015). Um estudo demonstrou o papel da ILC2 em resposta ao succinato, um ácido orgânico presente no intestino, o qual gerou remodelamento tecidual ao estimular *stem cells* (Schneider et al., 2018).

As ILC3s expressam ROR γ t⁺ e secretam IL-22, uma citocina importante para a homeostase da mucosa, e GM-CSF, um fator que promove a produção de moléculas como ácido retinóico e IL-10 por DCs tolerogênicas (Mortha et al., 2014). No entanto, em condições patológicas, essas mesmas células podem ter efeitos pró-inflamatórios. Estudos demonstram que GM-CSF derivado de ILC3 pode promover colite (Song et al., 2015) e IL-22 e IL-17 derivadas de ILC3 agravam IBD em humanos (Zeng et al., 2019). Portanto, parece que as citocinas derivadas de ILC são importantes na regulação da tolerância e inflamação e mais estudos precisam ser feitos para entender melhor seu papel na tolerância oral (Pinheiro-Rosa et al., 2021).

1.3- Microbiota intestinal e tolerância

A colonização microbiana no intestino dos mamíferos começa logo após o nascimento, e esse fenômeno é essencial para a maturação de estruturas associadas ao GALT, como MLN, PP e folículos linfoides isolados (Maynard et al., 2012). Ao longo do trato gastro intestinal a concentração de microorganismos comensais aumenta progressivamente, chegando a atingir até 1 trilhão de bactérias na região do colon (Mowat, 2018).

A microbiota tem um papel importante em modular funções imunes, e respostas inflamatórias. É descrito que camundongos *germ free* possuem o sistema imune imaturo e órgãos linfoides pouco desenvolvidos, como o timo (Östman et al.,

2006). Assim também, um sistema imune bem modulado permite que a microbiota resida no intestino, sem ser detectada como potencial patógeno. Isso ocorre devido à tolerância fisiológica que permite ao sistema imune reconhecer o conteúdo microbiano intestinal como *self* (Mowat, 2018).

Se alguns desses microrganismos escapassem do lúmen intestinal e entrassem em contato com outras partes do corpo, eles se tornariam altamente patogênicos. Por isso, existe uma imunidade protetora que impede que aconteça o acesso da microbiota ao sistema imunológico sistêmico. Isso acontece por meio de barreiras físicas como a camada de muco intestinal, a camada epitelial mantida pelas *Tight Junctions* e defesas inatas que também protegem o epitélio intestinal (O. Pabst & Mowat, 2012).

Foi descrito que grande quantidade de anticorpos IgA secretores (SIgA) presentes no intestino são direcionados principalmente para as bactérias que compõem a microbiota (Crabbé et al., 1968). Foi então sugerido que o papel da SIgA era prevenir o acesso de bactérias comensais ao corpo, e estudos subsequentes demonstraram que uma proporção substancial de bactérias comensais no cólon são revestidas com IgA (Per Brandtzaeg, 1998; Van Der Waaij et al., 1996). Na década de 90, Fiona Powrie e outros demonstraram que o sistema imune normal também continha células T efectoras que poderiam reconhecer a microbiota (Powrie et al., 1993), mas que os microrganismos comensais são mantidos sob controle pelas células Treg, que atuam por meio da produção de IL-10 (Asseman et al., 1999) ou TGF β (Li et al., 2007) no lumen. Essas citocinas previnem o desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais, como a colite espontânea desenvolvida em camundongos IL-10 knockout (Gomes-Santos et al., 2012). Sabemos então que as respostas imunes à microbiota são concentradas na mucosa intestinal e envolvem a geração de células Treg e a produção de SIgA.

Um mecanismo importante da microbiota é seu papel na produção de ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs) como acetato, propionato e butirato, além de ser capaz de produzir também outros ácidos orgânicos como lactato (Ríos-Covián et al., 2016).

Naturalmente, a microbiota comensal mantém uma concentração local de 10mM de lactato e a proporção de 60:20:20mM de acetato, propionato e butirato respectivamente (Errea et al., 2016; Iraporda et al., 2015).

Os SCFAs são ácidos graxos voláteis produzidos no cólon pela microbiota através da fermentação de componentes alimentares não digeridos no intestino delgado. Eles são caracterizados por conter menos de 6 carbonos em conformação reta de cadeia ramificada e por seu efeito modulador do ambiente intestinal e sistêmico (Macfarlane & Macfarlane, 2012). Os SCFAs reduzem o pH intestinal, prevenindo a sobrevivência de microorganismos patogênicos e aumentando a absorção de nutrientes. Eles também têm a função de aumentar a produção de mucina, melhorar as integridades das *tight junctions* e atuar na biossíntese e no metabolismo de lipídios (Peng et al., 2009).

Os SCFAs e o lactato são os principais metabólitos da fermentação intestinal de bactérias anaeróbias e se ligam a receptores acoplados à proteína G, GPRs (GPR43, GPR41, GPR81 e GPR31) em leucócitos e em células epiteliais. A ligação dos SCFA produzidos por essas bactérias aos receptores GPR43 é capaz de modular a microbiota intestinal e mediar efeitos anti-inflamatórios locais e sistêmicos protegendo contra a colite, artrite, asma e gota experimentais (Maslowski et al., 2009; Vieira et al., 2015). Um papel importantíssimo do butirato e do propionato é inibir histonas desacetilases, gerando aumento na expressão do fator de transcrição *foxp3*, estimulando a produção de Treg FOXP3⁺ (Arpaia et al., 2013). No intestino, os SCFA também estimulam a secreção de SIgA, a diferenciação de linfócitos intraepiteliais e a produção de IL-10 por macrófagos residentes no cólon (Smole et al., 2017). Sinergicamente, o lactato inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias em células mielóides e epiteliais e exibe um papel regulador crucial na mucosa intestinal através do seu receptor GPR81 (Iraporda et al., 2015). Camundongos GPR81 knockout apresentam uma mucosa colônica mais inflamada e são mais susceptíveis em modelo de colite por DSS (Ranganathan et al., 2018). Outro estudo demonstrou que a presença de GPR31 nos macrófagos residentes CX3CR1⁺ aumentou a captação de antígenos no lumen por seus dendritos (Morita et al., 2019). É descrito o papel do lactato de forma local em experimentos *in vitro* com organoides Lgr5+, demonstrando seu efeito direto nas células tronco intestinais (*Stem cells*) e na modulação epitelial intestinal (Y. S. Lee et al., 2018). Esses trabalhos sugerem um papel importante dos ácidos orgânicos na homeostase intestinal e no equilíbrio da microbiota. Portanto SCFAs possuem papel regulador na mucosa intestinal não só por estimular a geração de Treg, mas também por modular células inatas como macrófagos e DCs.

Sabemos que a produção de SCFAs e lactato dependem do perfil da dieta e das espécies microbianas presentes no lumen. Portanto, a presença de disbiose, definida como distúrbios na composição da microbiota intestinal, pode levar à alteração da produção de ácidos orgânicos e à perda de elementos chave na manutenção do equilíbrio da homeostase intestinal com repercussões sistêmicas que podem influenciar na quebra da tolerância. Por outro lado, a administração de probióticos é promissor em modular o perfil microbiano e a concentração de metabólitos produzidos no lumen, impedindo que ocorra a disbiose e consequentemente contribuindo para a manutenção da tolerância sistêmica.

1.4- A indução de tolerância como alternativa terapêutica

Sob circunstâncias patológicas, a homeostase intestinal e a TO são quebradas, resultando em condições inflamatórias como a hipersensibilidade alimentar e doenças inflamatórias intestinais. O número de casos de alergias em crianças cresceu 18% na última década. Ao mesmo tempo, a prevalência de doenças inflamatórias intestinais crônicas como a doença de Crohn ou a colite ulcerativa tem aumentado em várias regiões como Estados Unidos, Europa, Ásia e América Latina. Essas doenças desencadeadas pela quebra da tolerância precisam de alternativas terapêuticas para melhorar sobrevivência e qualidade de vida desses indivíduos (A.M.C. Faria et al., 2012).

Protocolos de TO a antígenos específicos têm sido utilizados em modelos experimentais para prevenção da reatividade e da autoreatividade. A TO pode ser usada como ferramenta terapêutica em condições autoimunes e a justificativa para seu uso é que ela fornece um tipo de supressão específica evitando os efeitos colaterais da imunossupressão não específica, como em terapias medicamentosas imunomoduladoras, por exemplo. Suas vantagens incluem a geração eficiente e sistêmica de Treg sem efeitos colaterais, além de ser um modelo de fácil administração (**Figura 2**).

Em modelos de artrite, colite, aterosclerose e diabetes, a ingestão de autoantígenos via oral previne as manifestações clínicas e imunes da doença. Além da vantagem da utilização de antígenos alvo específicos já conhecidos em várias doenças autoimunes, por exemplo, a supressão cruzada de um evento inflamatório através de um antígeno administrado via oral não relacionado ao antígeno alvo fornece um caminho que contorna a necessidade de um antígeno específico para a

indução de TO. Foi observado que a indução de células reguladoras através da ingestão oral de um antígeno (Ag) pode suprimir respostas imunes estimuladas por outros diferentes antígenos. Isso resolveu o maior problema conceitual na escolha do Ag específico ou na terapia para doenças autoimunes, as quais o autoantígeno é desconhecido ou apresentam reatividade a múltiplos autoantígenos no tecido alvo. Células reguladoras induzidas por antígenos orais (como é o caso da proteína HSP65) secretam citocinas não específicas que suprimem inflamação no microambiente aonde o Ag alimentado é localizado. Então, para doenças inflamatórias órgão específicas não é necessário conhecer o Ag específico que origina a doença, mas somente alimentar o indivíduo com Ag capazes de induzir células reguladoras, que migram para o tecido alvo e suprimem a inflamação (Ana M.C. Faria & Weiner, 2006).

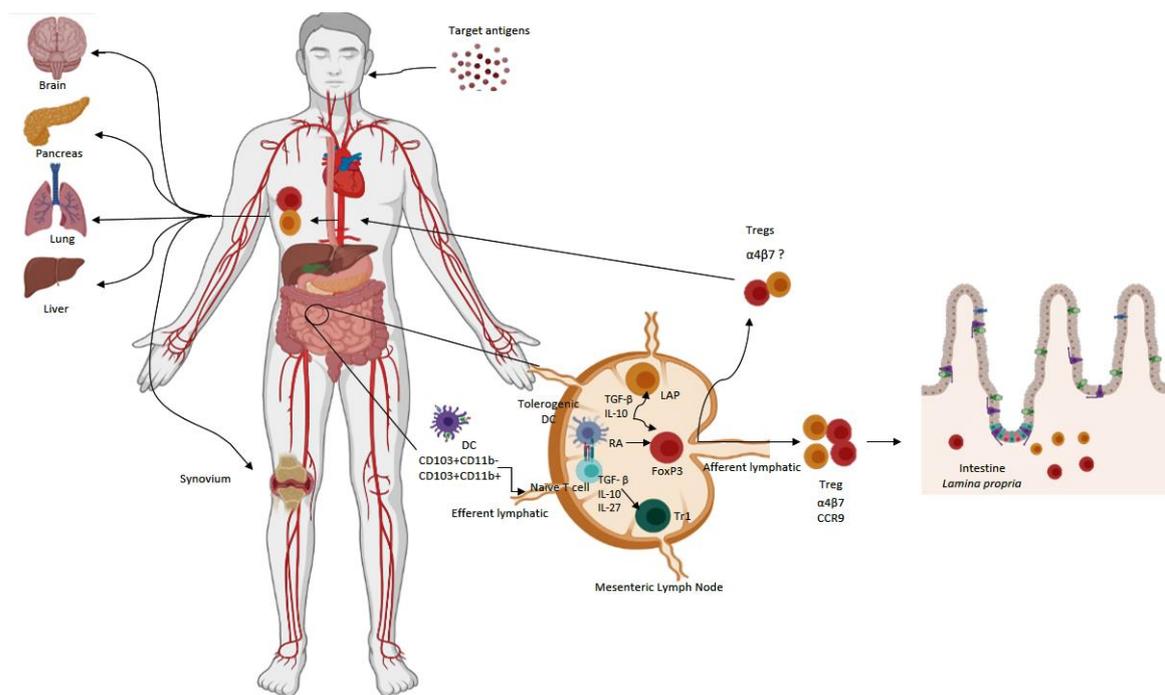


Figura 2. Efeitos mucosos e sistêmicos da TO. Nos linfonodos proximais, diferentes tipos de iTregs (CD4+Foxp3+, CD4+LAP+, Tr1) se diferenciam e adquirem receptores de *homing*, como $\alpha 4\beta 7$ e CCR9/CCR10, que os ajudam a migrar de volta para a LP da mucosa intestinal, onde se expandem e funcionam como reguladores da homeostase intestinal. As iTregs expressam os receptores de *homing* da mucosa ($\alpha 4\beta 7$) e os receptores de quimiocinas após a ativação, e migram através do sistema linfático eferente para o ducto torácico e posteriormente para a circulação sanguínea para tecidos inflamados por todo o corpo (Pinheiro-Rosa et al., 2021).

A TO induzida para a ovalbumina (OVA) é um modelo experimental que tem sido usado para estudar os mecanismos intestinais da indução de tolerância periférica. Muitos aspectos da resposta imune são inibidos por esse protocolo, como a produção de imunoglobulinas específicas ao antígeno, as reações de hipersensibilidade do tipo tardia, proliferação celular e produção de citocinas pró-inflamatórias. Entretanto, existe uma completa rede de interações entre os antígenos e as APCs, o papel dos subconjuntos de linfócitos T e B, das células epiteliais intestinais e de outros componentes do sistema imune que ainda estão sendo estudados na TO, representando a complexidade e o dinamismo desse fenômeno (R. P. Oliveira et al., 2015).

Estudos realizados por nosso grupo avaliaram a administração via oral de bactérias *L. lactis* recombinantes secretoras de HSP65 em protocolos de doenças inflamatórias crônicas. Essas proteínas de choque térmico (*Heat shock proteins*-HSPs) participam da resposta celular ao estresse e estão altamente expressas em condições inflamatórias no corpo, portanto podem ser usadas como antígeno via oral que irá auxiliar o desenvolvimento da tolerância à doenças autoimunes. Esse tem sido um tratamento utilizado recentemente para reestabelecer a TO em modelos experimentais de doenças inflamatórias intestinais. Em modelo de colite induzida por DSS em camundongos, a administração prévia de *L. lactis* HSP65 reestabeleceu a homeostase da mucosa intestinal (Gomes-Santos et al., 2017). Outro estudo do nosso grupo de pesquisa demonstrou que a administração dessa bactéria recombinante *L. lactis* HSP65 preveniu o desenvolvimento da encefalomielite autoimune experimental (EAE) em camundongos. O infiltrado celular na medula espinhal nos grupos tratados com *L. lactis* HSP65 se manteve semelhante ao grupo de animais naive (sem a doença) (Rezende et al., 2013). Em modelo de artrite experimental, a administração da *L. lactis* HSP65 preveniu o desenvolvimento da doença, mantendo o escore clínico da doença a níveis bastante reduzidos (Gusmao-Silva et al., 2020). Recentemente, Guimarães e colaboradores e Guerra e colaboradores demonstraram o efeito terapêutico da mesma cepa recombinante. Camundongos sensibilizados para a indução de EAE foram tratados com *L. lactis* HSP65 e seu efeito terapêutico pode ser observado na redução do escore clínico da EAE posteriormente (Guimarães et al., 2021). Além disto, a administração de *L. lactis* HSP65 quatro semanas após a infecção por *Leishmania braziliensis* reduziu o tamanho das lesões e a carga parasitária com aumento de IL-10 e redução de IFN- γ

(Guerra et al., 2021). Esses estudos demonstraram que os efeitos da administração de um antígeno alvo (HSP65) por via oral, antes ou durante o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas, preveniu a reatividade inflamatória através da geração de células Treg. É importante acrescentar que essa inibição da resposta inflamatória em contextos variados de doenças não implica em imunossupressão generalizada já que a resposta imune à infecção por *Salmonella thyphimurim* mostrou-se intacta com altos títulos de IgG específica para a bactéria nos estudos usando o modelo de EAE (Rezende et al., 2013) e a carga parasitária estava reduzida nos estudos usando o modelo de Leishmania (Guerra et al., 2021). Além disto, observamos que, em alguns desses estudos com a bactéria carreando o antígeno HSP65 para o intestino, os animais do grupo controle que receberam apenas a bactéria contendo o plasmídeo vazio também tiveram uma certa ação anti-inflamatória inespecífica discreta.

Avaliando essa possibilidade, Mercadante e colaboradores avaliaram os efeitos tolerogênicos dessa cepa selvagem *L. lactis* NCDO2118 no modelo da doença do enxerto versus hospedeiro (do inglês *graft-versus-host disease*, GVHD). A cepa foi coadministrada com extrato de células do doador (rico em antígenos reativos) em camundongos doadores de medula óssea desencadeando o aumento do percentual de células B reguladoras (Breg) CD19⁺ LAP⁺. A transferência dessas células para os camundongos receptores semi-alogênicos induziu a geração de células Treg Foxp3⁺ nesses animais prevenindo o desenvolvimento da GVHD nesses animais. O tratamento mostrou-se capaz de melhorar o percentual de sobrevivência dos animais doentes após o transplante e de reduzir o escore inflamatório da doença (Mercadante et al., 2014). É importante destacar que a ingestão de *L. lactis* reverteu a doença somente quando administrada juntamente com o antígeno (extrato de células do doador), revelando seu efeito como adjuvante da TO (aquele que potencializa o efeito supressor gerado pela TO).

Os modelos experimentais nos auxiliam a entender tanto os mecanismos envolvidos na indução de TO assim como suas possibilidades terapêuticas na prática clínica em doenças autoimunes e alergias que envolvem antígenos alvo. Muitos estudos clínicos e pré-clínicos tem investigado em mais detalhes a administração oral de antígenos alvo como alternativa terapêutica para atenuar sinais clínicos de alergias, esclerose múltipla, artrite reumatoide, uveíte e outras doenças inflamatórias. (Pinheiro-Rosa et al., 2021). Essa intervenção é chamada

imunoterapia oral, onde é utilizada a rota oral para modular condições inflamatórias geradas por essas doenças, através da geração de mecanismos imunoregulatórios específicos e inespecíficos (Inobe et al., 1998; Slavin et al., 2001). Porém, existe uma discussão que faz com que esse protocolo não seja tão bem estabelecido e certo na clínica humana: o fato de que não conseguimos tolerizar bem indivíduos já sensibilizados, ou seja, indivíduos que já tiveram contato com aquele antígeno prévio em algum momento da vida. Por isso, estudos buscando um protocolo mais potente com a utilização de adjuvantes da TO podem nos auxiliar no estabelecimento de um tratamento clínico eficaz.

O uso de moléculas adjuvantes na tolerância oral foi inicialmente descrito em modelo de DTH *in vivo*, onde uma injeção i.p. de RANKL associada à uma dose oral de OVA potencializou a indução de tolerância, aumentando a expressão de IL-10 em células dendríticas tolerogênicas. Camundongos que foram tratados com RANKL e alimentados com baixa dose de OVA exibiram uma reação de hipersensibilidade tardia (DTH) reduzida em comparação com a reação desenvolvida por camundongos alimentados apenas com OVA (Williamson et al., 2002).

Atualmente nosso grupo e colaboradores têm estudado os efeitos de agentes adjuvantes da TO, ou seja, componentes que atuam juntamente com os antígenos via oral e potencializam ainda mais o desenvolvimento da TO.

Sendo assim, o uso de bactérias antiinflamatórias selvagens, particularmente da cepa *L. lactis* NCDO2118, é uma nova alternativa como adjuvante da TO, se administrada juntamente com o antígeno via oral.

1.5- *Lactococcus lactis* NCDO2118: uma bactéria produtora de ácido lático

As bactérias produtoras de ácido lático (LAB) compreendem um grupo de organismos gram-positivos, primariamente anaeróbicos, sem esporulação e que produzem ácido lático como principal produto final da fermentação do açúcar (Cavanagh et al., 2015).

Desde a sua descoberta, há muitos anos, as LAB têm sido utilizadas como pioneiras na fermentação de alimentos, principalmente queijos e iogurtes, sendo assim classificadas e reconhecidas como GRAS (do inglês *Generally Regarded as*

Safe) pela FDA (*Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos (Donohue & Gueimonde, 2011; FAO/WHO, 2002)

As LAB ficaram mais conhecidas após a divulgação da “Teoria da longevidade” de Metchnikoff em 1910. O pesquisador relacionou o elevado consumo diário de iogurte à maior longevidade de povos búlgaros, que viviam além dos 100 anos. Assim, a causa dessa longevidade foi atribuída às bactérias fermentadoras presentes no iogurte (Gasbarrini et al., 2016). Sua alta capacidade de fermentação permite a geração de produtos finais que, além de contribuírem com as propriedades organolépticas e preservação do alimento, constituem no maior fator responsável pelo desenvolvimento de um meio antimicrobiano na matriz alimentar (Papadimitriou et al., 2015).

Além de fornecer vantagens para a indústria alimentar, a mucosa intestinal também se beneficia da fermentação das LAB já que o lactato, ácido acético, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono e bacteriocinas produzidos garantem um equilíbrio no crescimento de bactérias patogênicas e benéficas do intestino, contribuindo para a homeostase da microbiota ali presente (Ishida et al., 2005).

Outra característica vantajosa para o trato gastrointestinal é o fato de as LAB serem acidofílicas (possuem pH ótimo de crescimento entre 3,5 e 6,5) e terem a capacidade de melhorar sua resistência ao pH ácido do estômago criando estratégias de produção de metabólitos alcalinos. É conhecido que as LAB também são capazes de acumular altas quantidades intracelulares de zinco, manganês e selênio (Pessione, 2012).

Muitas LAB têm sido estudadas como probióticas – “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002) – por apresentarem tais atividades anti-inflamatórias, principalmente alguns tipos de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, bastante descritas por seus efeitos anti-inflamatórios (Ishida et al., 2005; Sanders, 2009).

Alguns tipos de bactérias classificadas como LAB e que vem ganhando grande importância são as *Lactococcus lactis*. A *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) é a bactéria mais importante dentre as LAB usadas comercialmente; tem formato de cocos e é homoláctea – o produto da sua fermentação é 100% ácido láctico. Ela é comumente isolada de plantas ou produtos lácteos (Stiles & Holzapfel, 1997).

As *L. lactis* produzem alguns tipos de bacteriocinas, sendo a principal chamada nisina, uma bacteriocina de amplo espectro que atua também em bactérias gram positivas como o *Clostridium botulinum* e seus esporos (Stiles & Holzapfel, 1997).

As *L. lactis* foram as primeiras cujo genoma foi completamente sequenciado, são bactérias de fácil manipulação genética, são gram-positivas não produzem endotoxinas, LPS ou qualquer outro produto metabólico tóxico (Bolotin et al., 2001; De Moreno De Leblanc et al., 2015). É estimado que um indivíduo humano ingere 10^{18} células lactocócicas por ano (Mills et al., 2010), em grande parte devido ao seu amplo uso na fermentação industrial, fato que contribuiu para que a *L. lactis* seja reconhecida como GRAS, como citado anteriormente neste trabalho. Apesar de não serem residentes naturais do TGI, as *L. lactis* são capazes de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal (Cavanagh et al., 2015; Wegmann et al., 2007).

Por esses motivos, a partir do avanço da biologia molecular, essa bactéria tem sido amplamente utilizada como GM-LAB (LAB geneticamente modificadas) com o objetivo de carregar materiais de interesse, como DNA e proteínas, via trato gastrointestinal (TGI) para uma finalidade específica (De Moreno De Leblanc et al., 2015). Elas podem carregar biomoléculas de alto peso molecular que interagem com as células M e células dendríticas intestinais (Berlec et al., 2011). Steidler e colaboradores mostraram que uma *L. lactis* geneticamente construída para secretar a citocina IL-10, previne a colite em camundongos quando administrada por via oral (Steidler et al., 2000). Frossard e colaboradores retrataram que a mesma cepa de *L. lactis* secretora de IL-10 foi capaz de reduzir os sintomas de anafilaxia induzidos pela alergia alimentar em camundongos tratados previamente o contato com o alérgeno (Frossard et al., 2007). Outro trabalho demonstrou que o *L. lactis* produtor de lacticina 3147, uma bacteriocina, inibe infecção por *Clostridium difficile* em pacientes com doença inflamatória intestinal (IBD) (Rea et al., 2011). Outro estudo comparou o efeito de bactérias *L. lactis* secretoras de IL-10 e *L. lactis* selvagem na alergia à proteína do leite de vaca, B-lactoglobulina. Os achados indicam que camundongos tratados com a bactéria produtora de IL-10 tiveram níveis de imunoglobulinas reduzidos, porém a bactéria selvagem também foi capaz de reduzir tais imunoglobulinas a níveis intermediários (Frossard et al., 2007). Como citado anteriormente também vemos grandes respostas anti-inflamatórias em trabalhos do nosso grupo de pesquisa com *L. lactis* produtora de HSP65 em modelos de doenças

autoimunes (Gomes-Santos et al., 2017; Gusmao-Silva et al., 2020; Rezende et al., 2013)

Apesar desse sucesso no desenvolvimento dos GM-LAB, busca-se resgatar estudos que demonstrem os efeitos de algumas cepas de bactérias *L. lactis* selvagens. Inúmeros trabalhos foram utilizados com GM-LAB, mas os efeitos dos *L. lactis* selvagens ainda são pouco conhecidos.

Neste contexto, um trabalho realizado por nosso grupo identificou atividades anti-inflamatórias da cepa selvagem *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO2118, quando administrada durante a fase de remissão da colite induzida por DSS em camundongos. A cepa foi capaz de melhorar os sinais clínicos da doença, manter a integridade epitelial, reduzir a produção de algumas citocinas pró- inflamatórias, além de aumentar a expressão de células Treg LAP⁺ nos MLN e baço, e de aumentar a população de células dendríticas CD103⁺ CD11b⁻ CD11c⁺ no baço dos animais tratados (Luerce et al., 2014).

Nossa **hipótese de trabalho** é que algumas cepas de bactérias com propriedades probióticas e antiinflamatórias podem auxiliar na indução da TO quando co-administrados por via oral. Neste trabalho, investigamos o efeito da cepa *L. lactis* subsp *lactis* NCDO2118 (L. C. Oliveira et al., 2014) como adjuvante da TO à OVA e buscamos identificar os componentes dessa cepa de *L. lactis* responsáveis por esse efeito.

2. OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

Avaliar os efeitos da administração de *L. lactis lactis* NCDO2118 na indução de tolerância oral a ovalbumina em camundongos C57BL/6.

2.2- Objetivos específicos

- Confirmar os efeitos anti-inflamatórios da bactéria *L.lactis* NCDO2118 utilizando o modelo de colite induzida por DSS;
- Estudar efeitos imunológicos da administração por via oral de *L. lactis* juntamente com o antígeno (OVA) na indução de tolerância oral em camundongos adultos;
- Analisar reatividade imunológica específica a ovalbumina em camundongos C57BL/6 tratados com as *L. lactis*, usando como parâmetros a medida de anticorpos séricos dos isotipos IgG1 anti- OVA e IgE anti- OVA
- Identificar mudanças no perfil de células da imunidade inata (DCs, macrófagos e células linfoides inatas) e dos linfócitos Th efetores e reguladores na lâmina própria do intestino e nos linfonodos mesentéricos;
- Analisar efeitos da administração de *L. lactis* NCDO2118 na microbiota intestinal e seus metabólitos
- Avaliar o efeito adjuvante da *L. lactis* NCDO2118 em modelo experimental de alergia alimentar a OVA.

3. METODOLOGIA

3.1- Animais

Camundongos C57BL/6 fêmeas de 10 semanas de idade foram obtidos do Biotério Central - UFMG. Durante os experimentos, os camundongos foram mantidos em microisoladores ventilados ou gaiolas abertas no Biotério do Laboratório de Imunobiologia do ICB-UFMG, alimentados com ração padrão para camundongos, água *ad libitum* e ciclo de luz de 12 horas. Os procedimentos experimentais utilizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG- CEUA # 340/2017.

3.2- Tratamento com *Lactococcus lactis*

A cepa de bactéria utilizada foi *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO2118 selvagem, estocada em densitometria ótica (DO600) de aproximadamente 2,5 e glicerol na proporção de 3:1. 25ul do estoque foi cultivado em 25ml meio M17 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) contendo glicose 0,5% por 20-24 horas em temperatura de 30°C e, logo em seguida, administrada aos camundongos em mamadeira *ad libitum*.

Para administração do sobrenadante, o cultivo foi centrifugado a 8000g durante 10 minutos em temperatura ambiente, o sobrenadante foi recolhido e filtrado em filtro estéril de 0,22um e então administrado aos animais (5ml por dia por animal). O pellet foi utilizado para a extração de proteínas de superfície (conforme explicado no tópico 3.4 dessa seção).

3.3- Inativação das bactérias

Para inativação das bactérias por irradiação, após seu crescimento (conforme explicado no tópico 3.1) foi utilizado o protocolo de irradiação a 10kilograys durante 3 horas.

Para inativação por calor, após seu crescimento, as bactérias foram aquecidas a 100°C por 15 minutos.

Para confirmação da inativação, as bactérias foram colocadas em meio M17 novo por 24h antes de serem administradas. Após conferência de que não havia aumentado a OD (densidade ótica) do meio e não haviam crescido bactérias, essas foram administradas aos camundongos. Bactérias inativadas foram centrifugadas durante 10 minutos a 8000g em temperatura ambiente, o pellet foi diluído em 25ml de salina 1x (pH:7,2) para serem administradas aos camundongos na mamadeira *ad libitum*.

3.4- Extração de proteínas de superfície bacteriana

Bactérias foram cultivadas em tubos de 50ml com meio M17 e 40ml foram centrifugadas a 8000g, em temperatura ambiente, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com 20ml de solução tampão PBS1x (pH7,4). Os tubos foram centrifugados novamente a 8000g, 4°C, por 10 minutos. A lavagem foi repetida mais 2 vezes e o sobrenadante descartado. Foi adicionado 4ml de solução de cloreto de guanidina 5M e as amostras foram incubadas em banho maria à 50°C por 15 minutos. As amostras foram transferidas para tubos ependorffes de 2ml e centrifugados a 21000g por 20 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi recuperado com uma seringa e injetado em um cassete de diálise (MWCO 10.000). As amostras foram dialisadas em 2 litros de água destilada por 3 horas a 4°C sob agitação. A água foi substituída por 2 litros de tampão PBS1x (pH7,4) e a amostra foi dialisada por mais 24 horas sob agitação. Após 24 horas, a solução foi recuperada do cassete com o auxílio de uma seringa e armazenada à 20°C.

Os camundongos receberam as proteínas extraídas por gavagem, durante 4 dias.

3.5- Administração de lactato via oral

Solução de ácido láctico (DL-Lactic Acid 90% - Sigma- Aldrich, cat:69785) foi diluída em água de beber na concentração de 15mM ou 50mM e foi administrada aos camundongos durante 4 dias na mamadeira (5ml/animal/dia). Ao final do quarto dia, foi iniciado o protocolo experimental de indução de TO à OVA.

3.6- Administração do antagonista e do agonista de GPR81 via oral

Os camundongos foram tratados com 10mg/kg do agonista ou do antagonista de GPR81 (GPR81 Agonist, 3CI-5OH-BA, Calbiochem, cat. 371758-100MG; (+/-)-Sodium 3-hydroxybutyrate, $\geq 99.0\%$ (NT), Sigma Aldrich, cat. 54965-10G-F), diluído em solução salina, administrado por gavagem durante 4 dias. Ao final do quarto dia, foi iniciado o protocolo experimental de TO a OVA.

3.7- Indução de tolerância oral a OVA

Para indução de TO a OVA, cada animal recebeu uma gavagem de 1mg, 5mg ou 10mg de OVA (Albumin Chicken egg Ovalbumin grade VII, Sigma-Aldrich, cat: A-7641) por gavagem, diluída em solução salina 1x (pH:7,2). Três dias após a gavagem de OVA, a imunização primária foi realizada por via intraperitoneal (i.p.), utilizando 10ug de OVA e 1mg de $Al(OH)_3$ (hidróxido de alumínio comercial) diluídos em 0,2 mL de salina fisiológica (0,85%). Após 14 dias, os camundongos receberam uma imunização secundária contendo 10ug de OVA diluídos em 0,2 mL de salina, sem adjuvante, por via i.p. Após 7 dias os animais foram eutanasiados para processamento das análises. (**Figura 3**)

Animais do grupo experimental receberam a solução contendo *L. lactis* NCDO2118 ou seus produtos na mamadeira *ad libitum* por 4 dias consecutivos antes da gavagem com OVA. Animais do grupo controle imune (salina) receberam uma gavagem de solução salina no lugar da OVA.

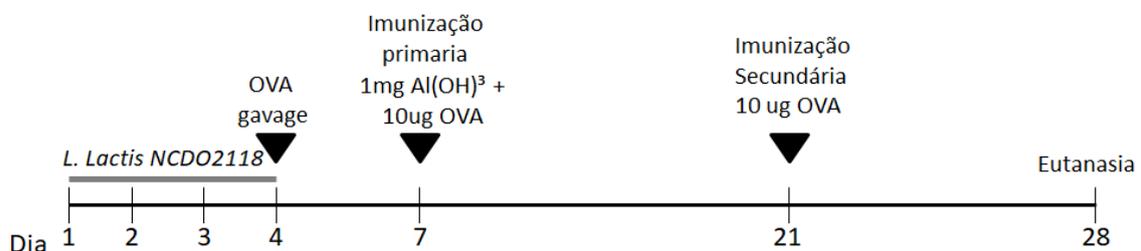


Figura 3: Desenho representativo do protocolo experimental da TO a OVA. Camundongos receberam o tratamento com *L. lactis* NCDO2118 na mamadeira por 4 dias. Ao final do quarto dia, receberam uma gavagem de OVA. Ao sétimo dia receberam a imunização primária e após 14 dias foram imunizados novamente. A eutanásia foi realizada 7 dias após a imunização secundária.

3.8- Modelo experimental de alergia alimentar a OVA

Para indução de alergia a OVA, cada animal recebeu uma gavagem de 5mg de OVA (Albumin Chicken egg Ovalbumin grade VII, Sigma-Aldrich, cat: A-7641) por gavagem, diluída em solução salina 1x (pH:7,2). Três dias após a gavagem de OVA, a imunização primária foi realizada por via intraperitoneal (i.p.), utilizando 10ug de OVA e 1mg de $Al(OH)^3$ (hidróxido de alumínio comercial) diluídos em 0,2 mL de salina fisiológica (0,85%). Após 14 dias, os camundongos receberam uma imunização secundária contendo 10ug de OVA diluídos em 0,2 mL de salina, sem adjuvante, por via i.p. Após 7 dias os animais foram desafiados durante 2 semanas por via oral com clara de ovo diluída em água de beber 20%. Os animais foram eutanasiados logo após o desafio oral. (**Figura 4**)

Animais do grupo experimental receberam a solução contendo *L. lactis* NCDO2118 ou seus produtos na mamadeira *ad libitum* por 4 dias consecutivos antes da gavagem com OVA. Animais do grupo controle alérgico (salina) receberam uma gavagem de solução salina no lugar da OVA.

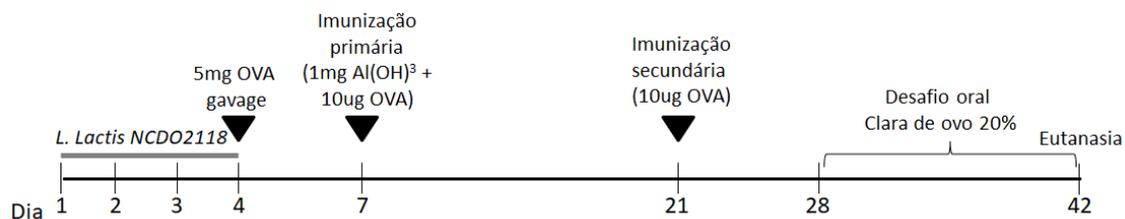


Figura 4: Desenho representativo do protocolo experimental da alergia a OVA. Camundongos receberam o tratamento com *L. lactis* NCDO2118 na mamadeira por 4 dias. Ao final do quarto dia, receberam uma gavagem de OVA. Ao sétimo dia receberam a imunização primária e após 14 dias foram imunizados novamente. 7 dias após a imunização secundária os animais foram desafiados oralmente com solução de clara de ovo 20% e então eutanasiados.

3.9- Modelo de Colite induzida por DSS

A indução da colite ulcerativa aguda foi realizada por meio da administração de solução de Sulfato de Sódio Dextrano (DSS) a 2% diluído em água filtrada, ofertada na mamadeira, como única fonte líquida durante sete dias (Melgar et al., 2007; Okayasu, 1990).

As garrafas contendo solução de DSS eram renovadas e o consumo dos animais foi mensurado diariamente durante o período de indução da colite. O DSS usado foi da marca MP Biomedicals, lote Q4299, com peso molecular entre 36-50 kDa.

Os camundongos receberam doses de gavagem de 1×10^9 UFC (Unidades Formadoras de Colônia) de bactérias diluídas em 100ul de salina 1x, durante sete dias concomitantemente à administração de DSS.

A ANVISA determina que a quantidade diária mínima viável para consumo de probióticos deve estar na faixa de 10^8 a 10^9 UFC (BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2017). Por essa razão, visando observar efeitos anti-inflamatórios destas bactérias, optou-se por utilizar a concentração de 10^9 UFC/camundongo.

Ao final de sete dias de tratamento, os camundongos foram sacrificados como mostrado na **Figura 5**.

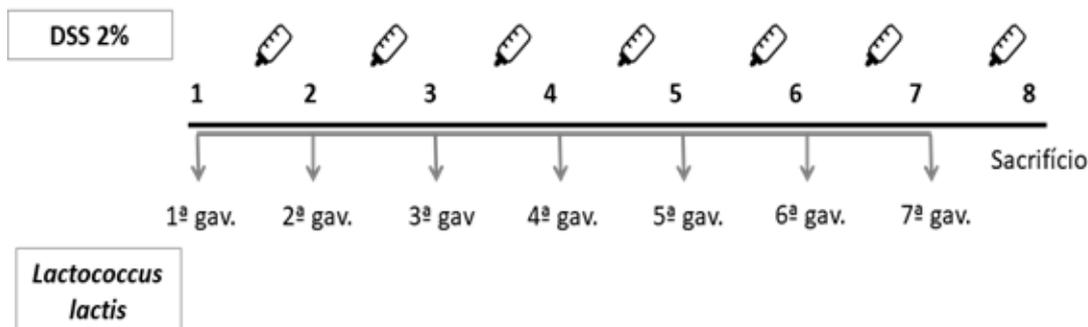


Figura 5: Protocolo experimental do modelo de colite induzida por DSS. Os animais receberam solução de DSS na concentração de 2% continuamente durante todo o experimento. Uma gavagem diária de 1×10^9 UFC de *Lactococcus lactis* foi administrada a cada animal, durante 7 dias. No oitavo dia, os animais foram sacrificados.

3.10- Avaliação do peso corporal dos animais em modelo de colite

Durante o período experimental, os camundongos foram pesados diariamente sempre no mesmo horário, em balança de precisão 0,25-2000g. Foi calculado o percentual de variação de peso, o qual também foi utilizado para obtenção do escore macroscópico da doença.

3.11- Teste de permeabilidade intestinal em modelo de colite

A análise da permeabilidade intestinal foi realizada no sétimo dia de tratamento com DSS. Os animais receberam por gavagem 100ul de solução contendo 18,5 Megabecquerel (MBq) de ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) marcado com o radioisótopo tecnécio (^{99m}Tc -DTPA). O ^{99m}Tc - DTPA trata-se de um complexo inerte e hidrossolúvel com peso molecular aproximadamente de 500 daltons apresentando características ideais para avaliação da permeabilidade intestinal (Diniz et al., 2005).

Quatro horas após a gavagem, o sangue foi coletado da veia axilar em tubos de poliestireno para contagem da radioatividade em aparelho contador de radiação gama (Perkinelmer Wallac, 1480 Wizard 3) e determinação da PI. Esse aparelho mede a quantidade de isótopos radioativos com emissão de raios gama (Generoso et al., 2015; Maioli et al., 2014).

Os resultados obtidos foram comparados com o padrão da dose. O padrão da dose, que corresponde a uma alíquota de igual volume de ^{99m}Tc -DTPA oferecido aos animais, foi utilizado para correção do decaimento radioativo do ^{99m}Tc e teve a radioatividade determinada no mesmo tempo dos demais tubos.

O percentual da dose foi calculado de acordo com o peso do sangue (%dose por g de sangue) a partir da seguinte fórmula:

$$\% \text{ dose de } ^{99m}\text{Tc-DTPA no sangue} = [(cpm \text{ do sangue} \times 100) / cpm \text{ da dose (Padrão) administrada}]$$

Onde: cpm= contagem por minuto

3.12- Escore inflamatório da colite

Os parâmetros macroscópicos para avaliação da gravidade da colite induzida por DSS foram listados na Tabela 3. O índice macroscópico representa a soma de cada parâmetro ranqueado (% de perda de peso, diarreia e sangramento). O índice máximo possível é igual a 12 (Kang et al., 2006).

Escore	% perda de peso	Diarréia	Sangramento
0	nenhuma	nenhuma	Ausente
1	1 a 5		
2	5 a 10	moderada	Oculto
3	11 a 15		
4	>15	grave	Visível

Tabela 1: Pontuações relativas ao escore macroscópico da colite. (Cooper et al., 1993)

3.13- Obtenção de sangue para análise das imunoglobulinas anti OVA

Os camundongos foram anestesiados utilizando 100µl de solução de Cloridrato de Ketamina (1,7 mg/Kg) e Xilazina (0,33mg/Kg). Em seguida, o sangue foi coletado através de uma incisão na veia axilar e coletado em tubos de poliestireno. O sangue foi centrifugado por 15 minutos a 10000 RPM, o soro foi coletado e usado para mensurar a concentração de IgG1 e IgE anti OVA.

3.14- Ensaio imunoenzimático (ELISA) para medida de IgG1 anti OVA

A avaliação dos anticorpos específicos anti-OVA presentes no soro dos camundongos foi realizada através do método ELISA (*Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*). Microplacas de poliestireno de 96 poços (Nunc, Roskilde, Denmark) foram incubadas *overnight* a 4°C com 100ul de uma solução de OVA (20ug/ml para anticorpos séricos) em tampão de cobertura (tampão carbonato pH9,6). No dia seguinte, as microplacas foram lavadas duas vezes com salina-Tween (salina contendo 0,05% Tween-20 – SIGMA Chemical Co) e em seguida bloqueadas com 200ul de PBS-caseína (0,25% caseína diluída em PBS) e incubadas por uma hora à temperatura ambiente. Após a incubação, as placas foram lavadas novamente duas vezes em salina-Tween e incubadas com soro dos camundongos em diluição seriada de 1:100 a 1:12800 em PBS-caseína sem diluir durante uma hora a 37°C.

Como controle positivo e negativo, foram utilizados um soro imune e um soro normal, respectivamente. Em seguida, as placas foram lavadas seis vezes com salina-Tween e incubadas com 100ul de uma solução de anticorpo de cabra anti-IgG1 de camundongo conjugado à peroxidase (Southern Biotechnology Ass, Inc.) na diluição de 1:15000 por uma hora à 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas seis vezes com salina-Tween. A reação enzimática foi então revelada incubando-se as placas, no escuro, com 100ul de uma solução contendo 0,2ul/ml de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e 4 mg/ml de ortofenileno-diamino (OPD) em tampão citrato (pH 5,0) até o desenvolvimento de uma coloração amarelo-escuro.

Após essa etapa, as reações foram interrompidas pela adição de 20ul/poço de uma solução de ácido sulfúrico 2N (H₂SO₄). A absorbância ($\lambda = 490$ nm) de cada poço foi obtida pela leitura em leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader). Resultados expressos como ELISA* (ELISA-score), obtido através do somatório das densidades ópticas das 8 diluições (1/100 a 1/12800) multiplicadas por 1000. Essa forma de expressar os resultados é equivalente a mostrar curvas de titulação ou selecionar a absorbância em uma diluição particular como representativa, como já descrito em trabalhos anteriores do nosso laboratório (Carvalho, *et al.*, 1994). Os resultados expressos nos gráficos foram obtidos pelo cálculo da média de cada grupo experimental (\pm erro padrão).

3.15- Ensaio imunoenzimático (ELISA) para medida de IgE anti OVA

As placas foram incubadas com solução (50ul/poço) contendo anticorpo de rato anti-IgE de camundongos 0,5 mg/mL (Southern Biotechnology) e diluídos (1:250) em tampão carbonato (pH=9,6) por, no mínimo, 18 horas a 4°C. O bloqueio foi feito com uma solução de PBS-0,25% caseína por uma hora a temperatura ambiente (200ul/poço). Posteriormente, as placas foram lavadas com solução salina-0,05%Tween por duas vezes. O soro dos animais (50 μ L) foi incubado por 2h em temperatura ambiente. Na sequência, as placas foram novamente lavadas e realizada a incubação com Ovalbumina (OVA) biotinizada, 1ug/50uL PBS/poço, por 1h. As placas foram lavadas por seis vezes com solução salina-0,05%Tween e incubadas com peroxidase associada a estreptavidina (Sigma), 50uL/poço na concentração de 1:15000, por 1 hora. A reação enzimática foi então revelada incubando-se as placas, no escuro, com uma solução contendo 0,2ul/ml de H₂O₂ e

4 mg/mL de ortofenileno-diamino (OPD) em tampão citrato (pH 5,0) até o desenvolvimento de uma coloração amarelo-escuro. Após essa etapa, as reações foram interrompidas pela adição de 20ul/poço de uma solução de ácido sulfúrico 2N. A absorbância ($\lambda= 490$ nm) de cada poço foi obtida pela leitura em leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader).

3.16- Ensaio imunoenzimático (ELISA) para medida de IgA secretória (SIgA)

O conteúdo fecal foi coletado em tubos de poliestireno e macerado juntamente com salina 1x na proporção de 1ml para 100mg de tecido. Os tubos foram centrifugados a 10000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado para análise de SIgA. A avaliação da SIgA presente nas fezes dos camundongos foi realizada através do método ELISA (*Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*). Microplacas de poliestireno de 96 poços (Sarstedt) foram incubadas overnight a 4°C com 100µl de uma solução contendo anticorpo anti Ig (Southern Biotechnology) na concentração de 1:10000 em tampão carbonato (pH=9,6). No dia seguinte, as microplacas foram lavadas cinco vezes com salina-Tween (salina contendo 0,05% Tween-20 – SIGMA Chemical Co) e em seguida bloqueadas com 200µl de PBS-caseína (0,25% caseína diluída em PBS) e incubadas por uma hora à temperatura ambiente. Após a incubação, as placas foram lavadas novamente duas vezes em salina-Tween. As amostras foram adicionadas e a placa foi incubada em diluição seriada de 1:100 a 1:12800 em PBS-caseína durante uma hora à temperatura ambiente. As placas foram lavadas por cinco vezes com solução salina-0,05%Tween. Foi adicionada solução contendo anticorpo goat anti-mouse IgA biotilado (Southern Biotechnology) na proporção de 1:10000 em PBS-0,25% caseína e a placa foi incubada por 1 h a 37°C. Após lavadas seis vezes com salina-Tween, as placas foram incubadas novamente com estreptavidina-peroxidase (Southern Biotechnology) na concentração de 1:10000 em PBS-0,25% caseína, durante 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas seis vezes com salina-Tween. A reação enzimática foi então revelada incubando-se as placas, no escuro, com 100µl de uma solução contendo 0,2 µl/ml de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e 4 mg/ml de ortofenileno-diamino (OPD) em tampão citrato (pH 5,0) até o desenvolvimento de uma coloração amarelo-escuro. Após essa etapa, as reações foram interrompidas pela adição de 20 µl/poço de uma solução de ácido

sulfúrico 2N (H₂SO₄). A absorbância ($\lambda = 490$ nm) de cada poço foi obtida pela leitura em leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader).

3.17- Preparo de suspensões de células

Para obtenção das células, os órgãos foram colocados diretamente em todos falcons de 15ml contendo meio RPMI 1640 completo estéril. Utilizou-se meio RPMI 1640 (GIBCO BRL) acrescido de 10% de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 20 μ g/mL de sulfato de gentamicina, 25 mM de HEPES (Sigma, St. Louis, Missouri) e 50mM de mercaptoetanol (Amersham Pharmacia Biotech), pH 7,2.

Os órgãos foram macerados com o auxílio de um macerador de vidro estéril para o baço e duas lâminas de vidro de superfície áspera para os linfonodos. As células foram centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos sob refrigeração a 4°C e o sobrenadante foi descartado.

As hemácias do baço foram lisadas acrescentando-se 9ml de água destilada estéril seguida de 1 ml de PBS concentrado 10X (diluição 1:10). Após a lise, a cápsula do baço foi retirada e descartada com o auxílio de uma pipeta de vidro estéril. As células do baço foram novamente centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos sob refrigeração a 4°C e o sobrenadante foi descartado.

As células de baço e linfonodos foram ressuspendidas em 1 ml e 500ul de meio RPMI 1640 completo, respectivamente. Alíquotas dessa suspensão foram diluídas em solução de azul de tripan a 4% em PBS1x filtrada, para contagem do número de células viáveis em câmara de Neubauer no microscópio óptico.

3.18- Citometria de fluxo

Em tubos de poliestireno para leitura de FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter), foram colocados 1×10^6 células obtidas da suspensão celular e 200ul de PBS-Wash para lavagem das células. Os tubos foram centrifugados a 1200rpm, durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 10 ul de anticorpos (na diluição padronizada), para marcação de moléculas superfície, conjugados com fluorocromos que se ligam às moléculas de interesse expressas nas células de camundongos (**Tabela 1**). As amostras foram vortexadas, encubadas a 4°C durante 30 minutos e decorrido esse tempo foram então acrescentados 200ul

de PBS-wash em cada tubo para lavagem das células, que foram centrifugadas a 4°C durante 10 minutos a 1200rpm. O sobrenadante foi descartado, as amostras foram homogenizadas.

Para marcação intracelular de Foxp3, as amostras foram incubadas por 30 minutos com 100ul da solução de fixação/permeabilização (eBioscience) na concentração de 1:3 (concentrado:diluído). As amostras foram lavadas duas vezes com o tampão de permeabilização (eBioscience) diluído 10x em água destilada. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 10ul de anticorpo (na diluição padronizada) conjugado com o fluorocromo APC (Allofocianina). As amostras foram incubadas por mais 30 minutos a 4°C e lavadas duas vezes com o tampão de permeabilização (eBioscience).

O sobrenadante foi descartado, as amostras foram vortexadas, incubadas por 30 minutos com 200ul de paraformaldeído 1% e lavadas uma vez com PBS-wash. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente, o *pellet* foi ressuscitado em PBS-wash e as suspensões foram armazenadas a 4°C protegidas de luz até aquisição dos dados no equipamento BD FACScantoll.

Foram feitos controles individuais (*singles*) contendo apenas um anticorpo marcado em cada tubo para a realização da compensação no aparelho.

Para melhor determinação da região (*gate*) ideal foram feitos controles do tipo fluorescência menos um (FMO- *Fluorescence minus one*) em que todos os anticorpos do *pool* estão presentes menos aquele de interesse para a marcação em questão (Herzenberg et al., 2006). A estratégia de *gating* e os controles FMO estão demonstrados na Figura 2. A aquisição dos dados foi realizada utilizando um BD FACScantoll de 9 cores. A porcentagem de células positivas e a média de intensidade de fluorescência foram analisadas com o auxílio do programa FlowJo versão 10.0 (TreeStar).

Marcador	Fluorocromo	Fabricante	Catálogo
Anti-mouse CD4 Clone: GK 1.5	FITC (<i>fluorescein</i> isothiocyanate)	eBioscience®	11-0041-82
Anti-mouse CD25 Clone 3C7	Percp/Cyanine 5.5	BioLegend	101912
Anti-mouse CD25 Clone eBio3C7	Pacific Blue (efluor450)	eBioscience®	48-025380
Anti-mouse LAP (TGF-b1) Clone TW7- 16B4	PE (Phycoerythrin)	BioLegend®	141404
Rat anti-mouse FOXP3 Clone R16-715	Alexa flúor 647	BD Biosciences	563486
Anti-mouse CD11c Clone HL3	APC	BD Biosciences Pharmingen	550261
Rat anti-mouse CD103 Clone M290	BV421 (Brilliant Violet)	BD Biosciences®	566297
Anti-mouse CD103 Clone 2E7	PE	BioLegend®	121420
Anti-mouse MHCII I-Ad Clone AMS- 32.1	APC (Allophycocyanin)	eBioscience®	17-5323-80
Rat anti-mouse CD4 Clone RM4-5	APC (Allophycocyanin)	BD Biosciences	553051

Mouse anti-mouse CD45.2 Clone 104	Biotina	BD Biosciences	553771
Streptavidina	APC-Cy7 (e-fluor 780)	eBioscience®	47-431782
Anti-mouse GATA3 Clone L50-823	PeCy7	BD Biosciences	560405
Anti mouse T-BET Clone O4-46	BV421	BD Biosciences	563318
Anti-mouse RORγT Clone Q31-378	Pe	BD Biosciences	562607
Anti-mouse CX3CR1 Clone SA011F11	PE (Phycoerythrin)	BioLegend	149006
Rat anti-mouse F4/80 Clone BM8	APC	eBioscience	17-4801-82
Anti-mouse CD19 Clone eBio1D3	Percp/Cyanine 5.5	eBioscience	35-0193-82
Anti-mouse CD3 Clone 17A2	Percp/Cyanine 5.5	BioLegend	100218
Rat anti-mouse CD11b clone M1/70	Percp/Cyanine 5.5 (CyChrome)	BD Biosciences®	550993
Anti-mouse CD127 Clone A7R34	Brilliant Violet 605	BioLegend	135041

Tabela 2: Relação dos anticorpos utilizados na citometria de fluxo, seus marcadores e seus fabricantes.

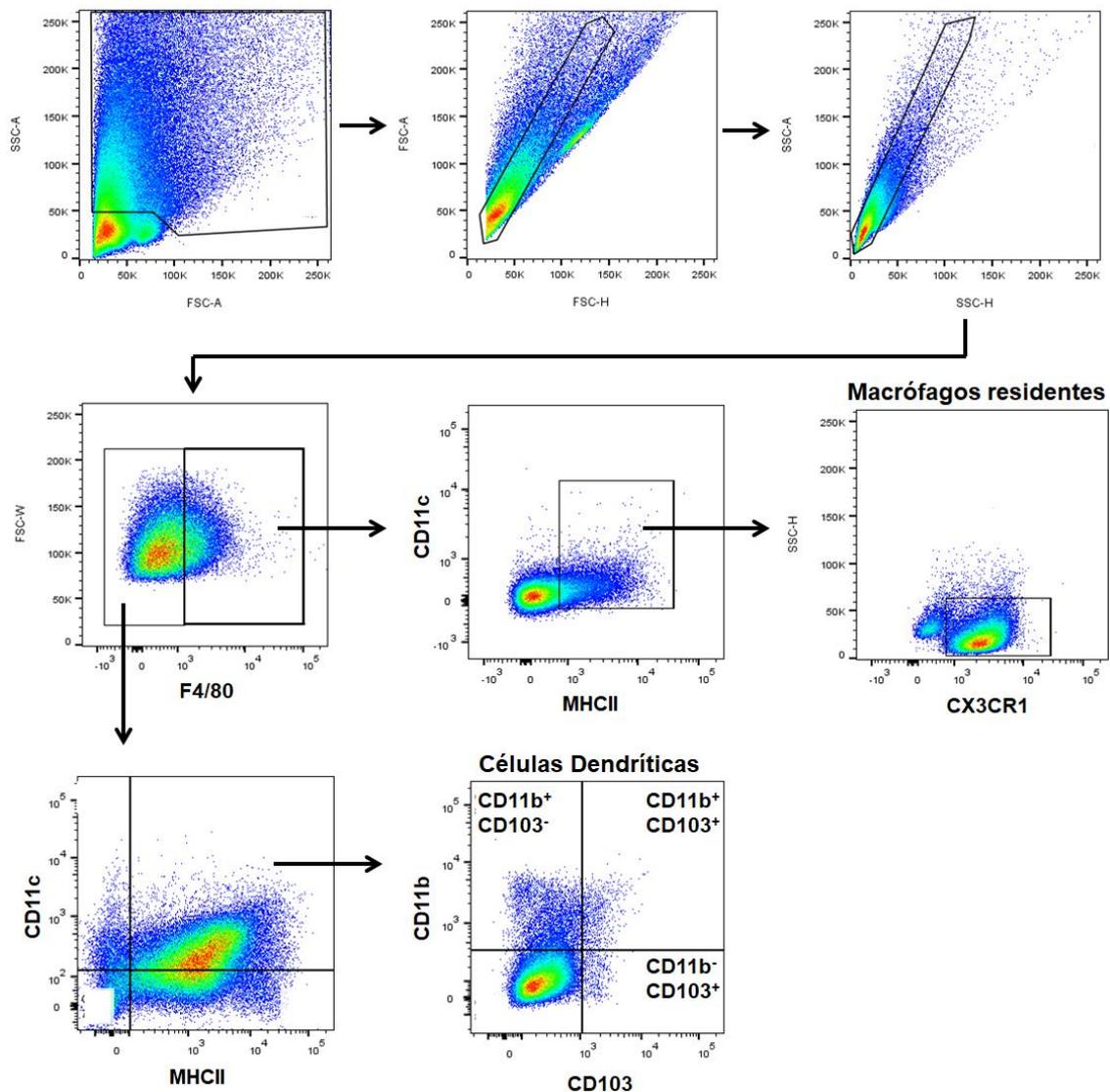


Figura 6: Estratégia de *gating* para as análises de células dendríticas e macrófagos residentes. Células de LP foram coletadas e submetidas a análise de citometria de fluxo. A região de granulócitos foram estabelecidas com base no tamanho relativo (*forward light scatter*) e complexidade citoplasmática (*side angle scatter*). A definição das regiões (*gate*) de interesse foi baseada em controles de fluorescência menos um (do inglês *fluorescence minus one* – FMO) onde as células são marcadas com todos os anticorpos menos aquele de interesse para o *gating*.

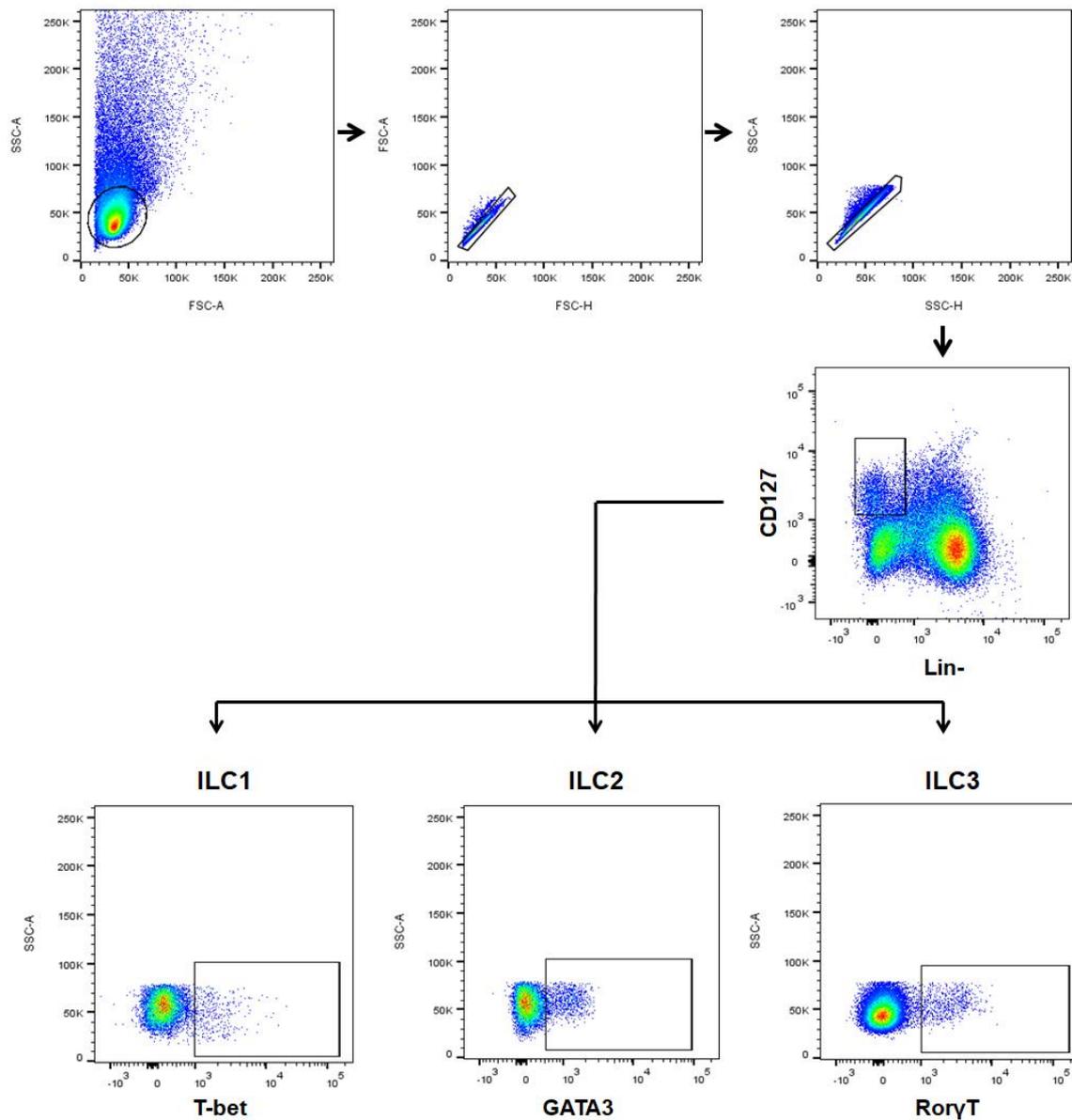


Figura 7: Estratégia de *gating* para as análises de ILCs. Células de LP foram coletadas e submetidas a análise de citometria de fluxo. A região dos linfócitos foi estabelecida com base no tamanho relativo (*forward light scatter*) e complexidade citoplasmática (*side angle scatter*). A definição das regiões (*gate*) de interesse foi baseada em controles de fluorescência menos um (do inglês *fluorescence minus one* – FMO) onde as células são marcadas com todos os anticorpos menos aquele de interesse para o *gating*.

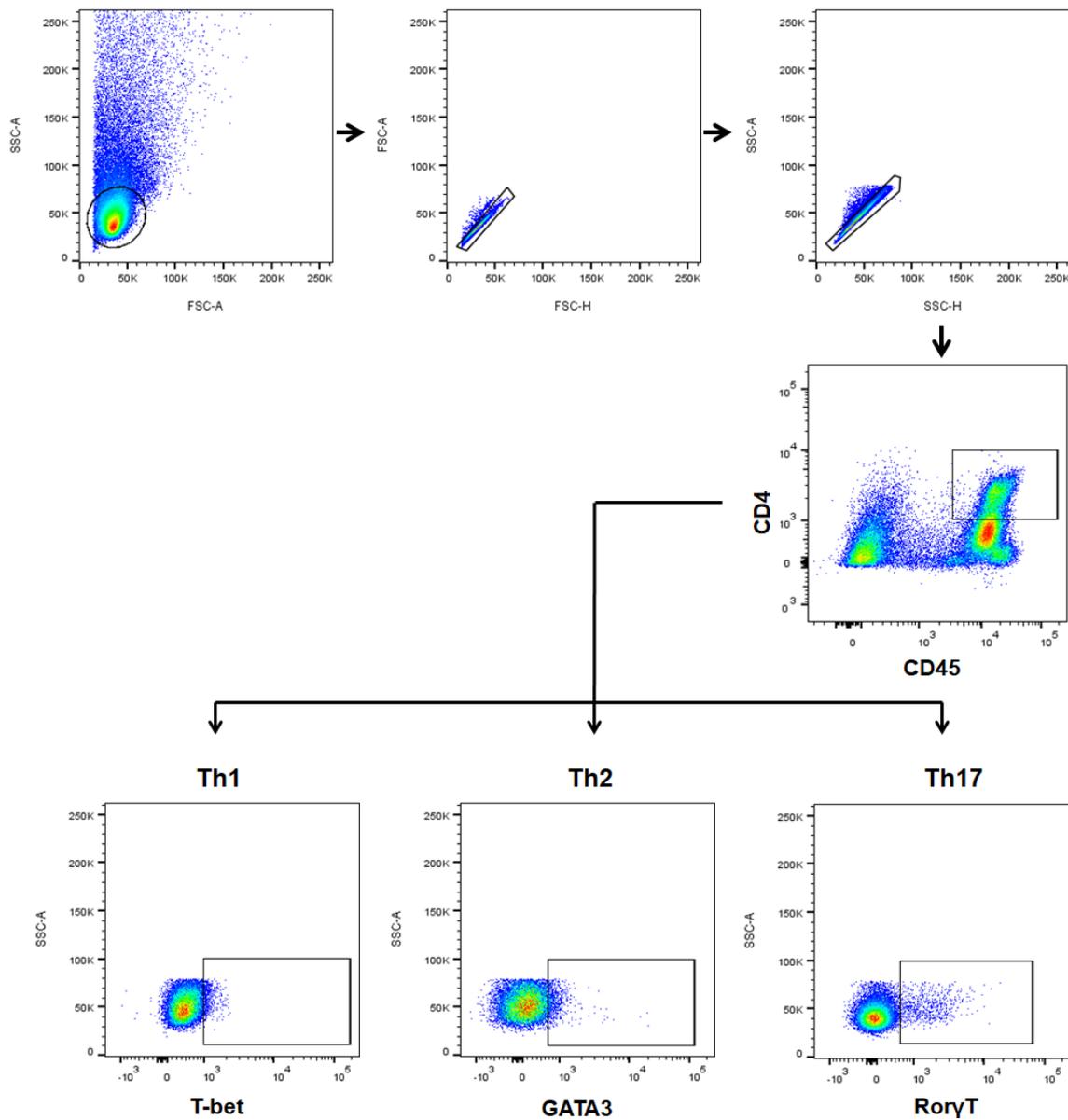


Figura 8: Estratégia de *gating* para as análises de células Thelper. Células de LP foram coletadas e submetidas a análise de citometria de fluxo. A região dos linfócitos foi estabelecida com base no tamanho relativo (*forward light scatter*) e complexidade citoplasmática (*side angle scatter*). A definição das regiões (*gate*) de interesse foi baseada em controles de fluorescência menos um (do inglês *fluorescence minus one* – FMO) onde as células são marcadas com todos os anticorpos menos aquele de interesse para o *gating*.

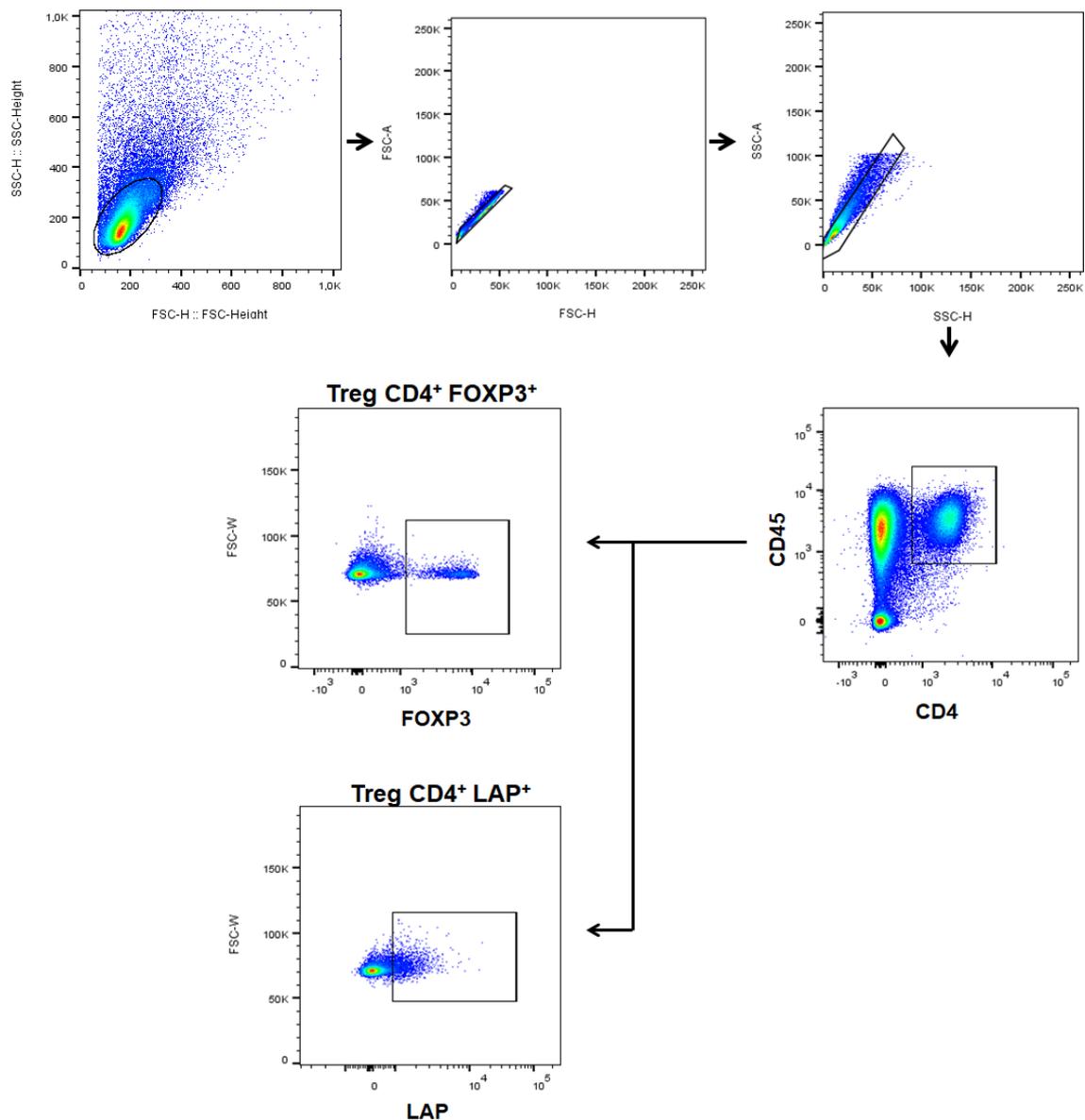


Figura 9: Estratégia de *gating* para as análises de células Treg. Células de LP foram coletadas e submetidas a análise de citometria de fluxo. A região dos linfócitos foi estabelecida com base no tamanho relativo (*forward light scatter*) e complexidade citoplasmática (*side angle scatter*). A definição das regiões (*gate*) de interesse foi baseada em controles de fluorescência menos um (do inglês *fluorescence minus one* – FMO) onde as células são marcadas com todos os anticorpos menos aquele de interesse para o *gating*.

3.19- *Polymerase chain reaction (PCR) em tempo real de amostras do intestino*

Para extração de RNA, foram utilizadas amostras de intestino delgado. O órgão foi macerado em tubos ependorfes de 2ml, com trizol na concentração de 1ml para cada 100mg de tecido. As amostras foram deixadas em temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente 200ul de corofórmio foram adicionados e os tubos foram agitados por inversão durante 15 segundos. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 12000g, 4°C. A fase aquosa foi transferida para outro tubo RNase free com cuidado para não pegar material da interfase branca.

O RNA recolhido foi precipitado com 500ul de álcool isopropílico 100% gelado. Os tubos foram agitados por inversão novamente por 15 segundos e foram incubados por 10 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos, a 12000g, a 4°C.

O sobrenadante foi dispensado e o pellet de RNA foi lavado com 1ml de etanol 75% gelado. Os tubos foram vortexados e centrifugados por 5min, a 7500g, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em 20ul de água ultrapura e o RNA foi quantificado. Nessa etapa as amostras foram armazenadas no freezer -80°C até a realização da próxima etapa.

O kit usado para a RT-PCR pertence a marca *Biosystems*. Foram acrescentados 2ul do buffer, 0,8ul dos dNTP, 1ul da transcriptase reversa, 1ul do inibidor de RNase, 3.2ul de água nuclease free e 2ul do primer (**Tabela 2**). As amostras foram quantificadas e analisadas.

Gene	Sequência
GPR81	GGCTGAGAAAAGCGGTATGA TCGTTAACTCTCTCCGAGCTAGA
GPR31	AGTCTGACAAACAGCCCAGG CACTAGGCAGGAAGCACAGTC

Tabela 3: Sequência de genes utilizados para qPCR.

3.20- Análise da microbiota por PCR em tempo real

Para mensuração das bactérias presentes nas fezes dos animais foi performada a quantificação absoluta em PCR em tempo real (Mackay, 2004). Assim, as reações foram realizadas em duplicata a partir de: 10 µL do agente intercalante SYBR® Green (Kapa Biosystems, São Paulo, Brasil), 1µL de DNA (12,5 ng), 8,2 µL de água e, 0,4 µL da solução primers (10 µM) que tiveram como alvo regiões do gene rRNA 16S que conferem assinaturas específicas aos grupos de interesse (**Tabela 3**). No controle negativo, foi adicionado 1,0 µL de água ao invés do DNA. As condições de ciclagem foram: 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, sendo a captação da fluorescência feita na temperatura de 60°C. Todas as reações foram realizadas em duplicata no aparelho CFX 96TM Real time system (BioRad).

Alvo	Sequência (5'-3')
Eubacteria	AAACTCAAAGKAATTGACGG CTCACRRCACGAGCTGAC
Filo Firmicutes	GGAGYATGTGGTTTAATTCTGAAGCA AGCTGACGACAACCATGCAC
Filo Bacteroidetes	CRAACAGGATTAGATACCCT GGTAAGGTTCTCGCGTAT
Filo Actinobacteria	TACGGCCGCAAGGCTA TCRTCCCCACCTTCTCCG
Gênero Lactobacillus	AGCAGTAGGGAATCTTCCA CACCGCTACACATGGAG
Gênero Enterococos	CCCTTATTGTTAGTTGCCATCAT ACTCGTTGTACTTCCCATTGT

Tabela 4: Sequência de genes utilizados para análise da microbiota por qPCR.

Para definição do número de células bacterianas foi utilizado cálculo estabelecido por Kim e Colaboradores (2013) e adaptações de Moreira Júnior e Colaboradores (2019), no qual, compara-se o ct de uma curva padrão com amostras

de DNA conhecido dos representantes dos grupos bacterianos em diluição em série com fator 10 com o ct das amostras de DNA bacteriano extraídas das fezes animais de cada grupo experimental. A extração do DNA nas amostras de fezes foi realizada utilizando o QIAamp® DNA Stool Mini Kit (QIAGEN®, São Paulo, Brasil).

Na comparação é determinado o número de cópias do gene rRNA 16S em cada amostra. Para quantificação do número de células bacterianas, esse número é dividido pela quantidade de cópias do gene rRNA 16S presentes especificamente em cada grupo analisado. Esse número foi obtido no banco de dados rrnDB versão 5.7 (<https://rrndb.umms.med.umich.edu/>) (Z. M. P. Lee et al., 2009; Stoddard et al., 2015). Os números de rrn utilizados estão representados na tabela 2.

3.21- Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A dosagem de SCFA foi feita a partir de extrato aquoso de fezes de camundongos. As fezes foram pesadas e padronizadas a 100mg. Foi adicionado 1ml de água acidificada (ph 2) e centrifugadas a 14000rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado, filtrado em filtro de 0,22um e armazenado em freezer -20°C. Um volume de 300ul de amostra foi colocado em tubos de vidro de 1ml.

Os SCFA dosados foram acetato, propionato, butirato e lactato através de HPLC-UV/Vis 210nm. A coluna utilizada é SUPELCOGEL#C-610H (59320-U). Essa coluna utiliza como método cromatográfico a exclusão iônica. A técnica foi padronizada com 6 pontos de calibração de cada SCFA: 25000 µM, 12500 µM, 5000 µM, 1000 µM, 125 µM, 5 µM.

Características da corrida: **Fase móvel:** H₂SO₄ 0,01N, **Volume injetado:** 80 µL, **Temperatura:** 40°C, **Fluxo:** 0,6 mL/min, **Pressão:** 23 kgf/cm²

3.22- Análise do perfil da microbiota por meios seletivos.

O conteúdo intestinal foi coletado de todo o trato gastrointestinal dos animais e diluído em 4 concentrações (2x, 4x, 6x e 8x) em PBS 1x. As diluições foram plaqueadas em placas petri contendo meios de cultura seletivos e deixados 24h em estufa de anaerobiose ou aerobiose em temperatura ambiente. Após 24h as unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas e analisadas. Para plaqueamento foram utilizados os meios BBE (*Bacteroides Bile Esculina*), BHI (*Brain Heart Infusion*) suplementado com extrato de levedura, Ágar sangue suplementado

com extrato de levedura, Ágar MacConkey, Manitol, Ágar Sabouraud com cloranfenicol, MRS (*Agar de Man Rogosa e Sharpe*).

3.23- Fixação dos tecidos para análises morfológicas

Os intestinos delgados dos camundongos foram coletados, armazenados em cassetes previamente identificados e embebidos em solução de formol 10%. Os tecidos foram desidratados com etanol e xilol, incluídos em parafina e cortados em micrótomo em secções histológicas de 4 µm, que foram coradas para as análises.

3.24- Coloração das lâminas histológicas

Para coloração com HE, os tecidos foram desparafinizados em xilol, e rehidratados e banhos de concentrações decrescentes de etanol e corados com hematoxilina e eosina.

3.25- Contagem de eosinófilos

Imagens foram capturadas pelo *scanner* das lâminas histológicas coradas com HE. A contagem dos eosinófilos infiltrados na mucosa do jejuno proximal foi realizada no aumento de (40X) em 5 campos aleatórios. O resultado foi expresso como a média dos eosinófilos de cada animal.

3.26- Análise estatística

As medidas realizadas foram comparadas, estatisticamente, através da análise de variância (ANOVA), utilizando o teste de Tukey para calcular a significância entre os grupos. O valor P considerado com diferença significativa foi > 0,05. Foi utilizada o teste T student para comparação de gráficos contendo apenas 2 grupos.

4. RESULTADOS

4.1- *Lactococcus lactis* NCDO2118 tem papel anti-inflamatório na colite por DSS

O modelo de colite induzida por DSS é considerado adequado para investigar algumas características da patogênese e terapias de tratamento eficazes, já que causa a ruptura na homeostase intestinal. Terapias com bactérias probióticas estão sendo usadas para tratar a colite e reverter seus sintomas deletérios na mucosa intestinal, portanto resolvemos verificar o papel anti-inflamatório da cepa *L. lactis* NCDO2118 na colite induzida por DSS (**Figura 10A**). Camundongos receberam solução de DSS 2% *ad libitum* durante 7 dias concomitante com a administração oral de *L. lactis* NCDO2118 via gavagem, e ao 8º dia foram sacrificados (**Figura 10A**). Esse modelo mimetizou a colite ulcerativa aguda em humanos e nos ajudou a avaliar se a administração de bactérias probióticas possui efeito antiinflamatório na fase onde os sintomas são mais severos e mais presentes.

Um dos parâmetros clínicos alterados durante a colite ulcerativa é o peso corporal (Melgar et al., 2007). A indução da doença levou à queda de cerca de 10-15% de peso corporal após 7 dias de ingestão exclusiva de DSS. Camundongos tratados com *L. lactis* apresentaram menor perda de peso no sétimo dia (5-10%) quando comparados ao grupo DSS (**Figura 10B**).

O aumento da permeabilidade intestinal é uma das características que indica ruptura da barreira epitelial e, conseqüentemente, desequilíbrio da homeostase tecidual (Diniz et al., 2005). Camundongos tratados com DSS possuem aumento significativo da permeabilidade do intestino, porém notou-se que a bactéria preveniu o aumento da permeabilidade, quando administrada durante o desenvolvimento da doença (**Figura 10D**).

O escore inflamatório macroscópico é o conjunto dos sinais mais importantes e característicos da colite ulcerativa experimental, e leva em consideração: a intensidade do sangramento presente nas fezes/reto, o grau de diarreia e o nível de perda de peso corporal (McCafferty et al., 2000). Como se esperava, o grupo naive (não manipulado) apresentou escore igual a zero. O grupo doente (DSS) apresentou o maior escore, enquanto os animais tratados com as *L. lactis* apresentaram um escore intermediário em relação aos grupos controles (Naive e DSS). O grupo naive não apresentou escore inflamatório, já que não possui a doença. Ao se comparar os

parâmetros do escore, separadamente, o tratamento com a *L. lactis* teve efeito preventivo sob os três parâmetros (Figura 10C e 10E).

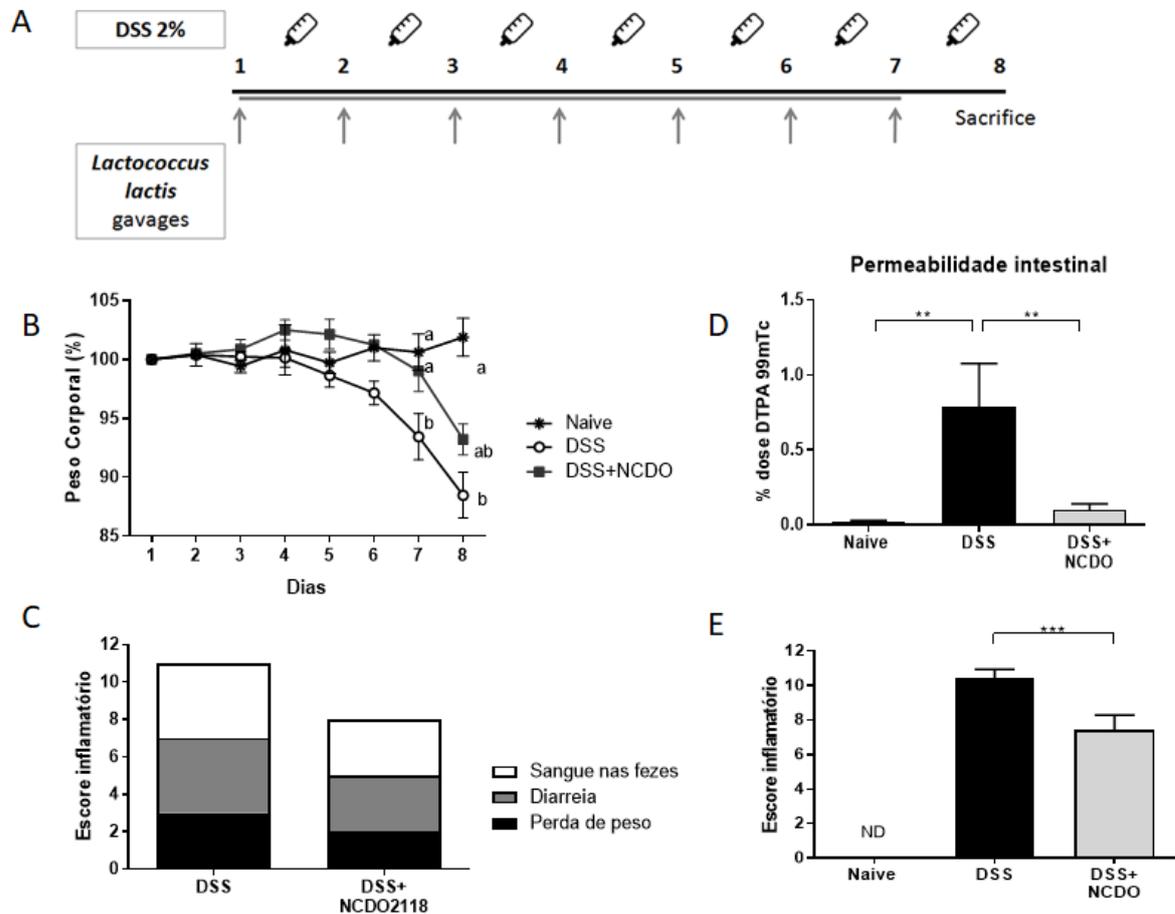


Figura 10. Efeito da administração de *L.lactis* NCDO2118 na colite induzida por DSS. (A) Camundongos C57/BL6 foram submetidos ao modelo de colite ulcerativa induzida por DSS durante 7 dias e tratados concomitantemente com a cepa *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO2118. O peso dos animais foi aferido diariamente. O grupo naive consistiu de animais não manipulados que não receberam nenhum tratamento, também pesados. (B) A variação do peso diário foi obtida a partir da subtração com o peso do primeiro dia, expresso em gramas. Para análise estatística, os grupos foram comparados entre si em cada tempo experimental. (C) O gráfico em barras é dividido em cores que representam cada parâmetro do escore. O sangue nas fezes (branco) e a diarreia (cinza) foram avaliados após a retirada do cólon no dia do sacrifício. A perda de peso (preto) foi obtida comparando-se os valores do peso do primeiro e do último dia. Foi dado um escore de 0 a 4 para cada parâmetro analisado. (E) O escore total foi obtido a partir da soma dos três parâmetros. n= 5. (D) 4 horas antes da eutanásia, os camundongos receberam uma solução contendo ^{99m}Tc -DTPA por gavagem. Após 4 horas da administração de ^{99m}Tc -DTPA, os camundongos foram sacrificados e a permeabilidade intestinal foi mensurada no sangue através da quantidade de radiação apresentada em cada amostra. Realizou-se o teste two way ANOVA e a diferença estatística foi representada por letras e apontada com valor $p < 0,05$. Valores representam média \pm dp.

4.2- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO2118 apresentou papel adjuvante na indução de tolerância à OVA

Sabendo que a *L. lactis* NCDO2118 possui efeito anti-inflamatório na mucosa intestinal, resolvemos investigar se ela também possui efeito tolerogênico, utilizando um modelo de TO à OVA.

O efeito tolerogênico seria caracterizado pela ação sinérgica na supressão da imunidade humoral e celular anti-OVA, desencadeada pela administração oral de *L. lactis* NCDO2118 associada à OVA previamente a imunizações i.p. contendo o antígeno. O objetivo, então, foi testar se a *L. lactis* atuaria em conjunto com a OVA otimizando a indução de tolerância a esta proteína e atuando, então, como “adjuvante” da TO.

Para testar esse efeito, desenhamos inicialmente um protocolo subótimo de indução de TO à OVA que permitisse a identificação do efeito adjuvante da *L. lactis* NCDO2118.

É descrito que o sucesso da TO depende de vários fatores, dentre eles: (1) a dose do antígeno administrado via oral; (2) o número de vezes que o antígeno é administrado; (3) a forma de administração oral por gavagem ou por continuous feeding (R. P. Oliveira et al., 2015).

Sabemos que a administração oral de doses altas do antígeno desencadeiam a TO de forma ótima, enquanto doses baixas não são tão eficazes para o desenvolvimento da TO. Doses múltiplas de gavagem também são mais eficientes em gerar a TO, se comparadas com uma dose singular do antígeno via oral. Além disso, também sabemos que a administração do antígeno por *continuous feeding* na mamadeira tem muito mais eficácia do que a gavagem (R. P. Oliveira et al., 2015).

Portanto, optamos por utilizar uma dose única de gavagem de OVA e testamos 3 concentrações baixas (1mg, 5mg e 10mg) para encontrarmos o protocolo menos eficiente na indução de TO, que chamamos aqui de “protocolo subótimo”.

Seria necessário um protocolo subótimo para observarmos o efeito de um adjuvante que o otimizasse, portanto analisamos se a ingestão de *L. lactis* como adjuvante associada a uma única dose OVA em baixa concentração seria um tratamento eficaz para a indução de TO a OVA.

Seria também necessário que a *L. lactis* fosse administrada em conjunto com o antígeno (OVA) por via oral para que o efeito adjuvante fosse visualizado e alcançássemos a indução ótima da TO, mesmo frente a um protocolo subótimo.

Diversos modelos experimentais do nosso grupo de pesquisa, como colite (Luerce et al., 2014), encefalomielite (Rezende et al., 2013) e artrite (Gusmao-Silva et al., 2020) utilizaram a administração oral de 4 dias de bactéria na mamadeira *ad libitum* e obtiveram respostas anti-inflamatórias e tolerantes.

Dessa forma, a *L. lactis* foi administrada durante 4 dias e ao final do quarto dia, uma gavagem de OVA foi dada aos animais. Após 3 dias da administração do antígeno, foram realizadas 2 imunizações com intervalo de 2 semanas entre elas. Os animais foram eutanasiados uma semana após a última imunização (**Figura 11A**). O grupo salina recebeu apenas solução salina por gavagem e, posteriormente, as imunizações. O grupo OVA recebeu apenas a OVA por gavagem e as imunizações. Já o grupo OVA+NCDO recebeu todo o protocolo completo. O grupo naive foi utilizado como um controle negativo, no qual os animais beberam água durante todo o experimento e não sofreram nenhuma intervenção (**Figuras 11B-C**).

O principal parâmetro analisado na TO à OVA é seu efeito na supressão da resposta imune humoral específica, ou seja, na produção de imunoglobulinas anti-OVA. A redução nos níveis dessas imunoglobulinas específicas para o antígeno utilizado na imunização são um parâmetro importante para a confirmação do estabelecimento da TO. Optamos por analisar as imunoglobulinas das classes IgE e IgG1 anti-OVA no soro, por serem imunoglobulinas produzidas após a ação do adjuvante em questão, Al(OH)₃ (R. P. Oliveira et al., 2015). Para a padronização do protocolo, foram testadas doses de 1mg, 5mg e 10mg de OVA por gavagem. A dose de 5mg foi a escolhida para testar o papel adjuvante da *L. lactis* já que ela não era capaz de induzir TO. No entanto, observamos redução estatisticamente significativa na concentração de IgG1-antiOVA no soro dos animais tratados com 5mg de OVA e *L.lactis* NCDO2118 quando comparados com os animais do grupo tratado somente com 5mg de OVA (**Figuras 11B**).

A administração de *L.lactis* NCDO2118 associada à OVA reduziu o nível de IgG1 e IgE anti-OVA no soro dos camundongos (**Figuras 11B-C**). Para confirmar que a cepa específica *L. lactis* NCDO2118 tem papel singular na TO, administramos também uma cepa comercial utilizada como probiótica, *L. lactis* G25, associada à

OVA, que não mostrou o mesmo efeito na redução da resposta imune anti-OVA (**Figura 11H**). Portanto, podemos afirmar que o papel da *L. lactis* NCDO2118 foi cepa específica.

Para confirmar que o efeito supressor da bactéria nesse protocolo de TO é tolerogênico, testamos a administração da *L. lactis* na ausência de OVA oral. Fizemos um grupo que não recebeu OVA por gavagem, mas apenas 4 dias de bactéria na mamadeira, logo depois, recebeu normalmente as imunizações de acordo com o protocolo (**Figura 11H**). Observamos nesse grupo, que a concentração de anticorpos IgG1-antiOVA se manteve alta, demonstrando que a bactéria sozinha não teve efeito na TO, mas somente a sua administração associada à OVA foi capaz de induzir a TO. Concluímos com esse experimento que a *L. lactis* NCDO2118 tem efeito tolerogênico quando administrada em conjunto com a OVA via oral previamente às imunizações. Portanto, podemos definir aqui a *L. lactis* NCDO2118 como adjuvante da TO a OVA.

O aumento de células T reguladoras é uma característica importante no estabelecimento da TO, por ter função de suprimir células efetoras. Camundongos tolerantes a OVA possuem frequências de células Treg LAP⁺ ou Foxp3⁺ aumentadas (R. P. Oliveira et al., 2015).

Sabendo disso, verificamos a frequência dessas células (CD4⁺CD25⁺LAP⁺ e CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) nos linfonodos mesentéricos, órgãos linfóides que drenam diretamente o intestino delgado, e no baço, já que a TO tem um efeito tanto local quanto sistêmico. Verificamos que apenas a frequência de células Treg LAP⁺ esteve aumentada no grupo OVA+NCDO2118, mas não houve alteração na frequência de células Treg FOXP3⁺ (**Figuras 11D-G**). Concluímos com esse experimento que a bactéria estudada aqui auxilia no processo de indução de TO via células Treg CD4⁺CD25⁺LAP⁺, o que confirma seu papel como adjuvante da TO a OVA. Esse aumento de células Treg LAP⁺ foi semelhante ao encontrado em experimentos prévios realizados em nosso laboratório com a administração da *L. lactis* NCDO2118 em outros modelos experimentais (Luerce et al., 2014).

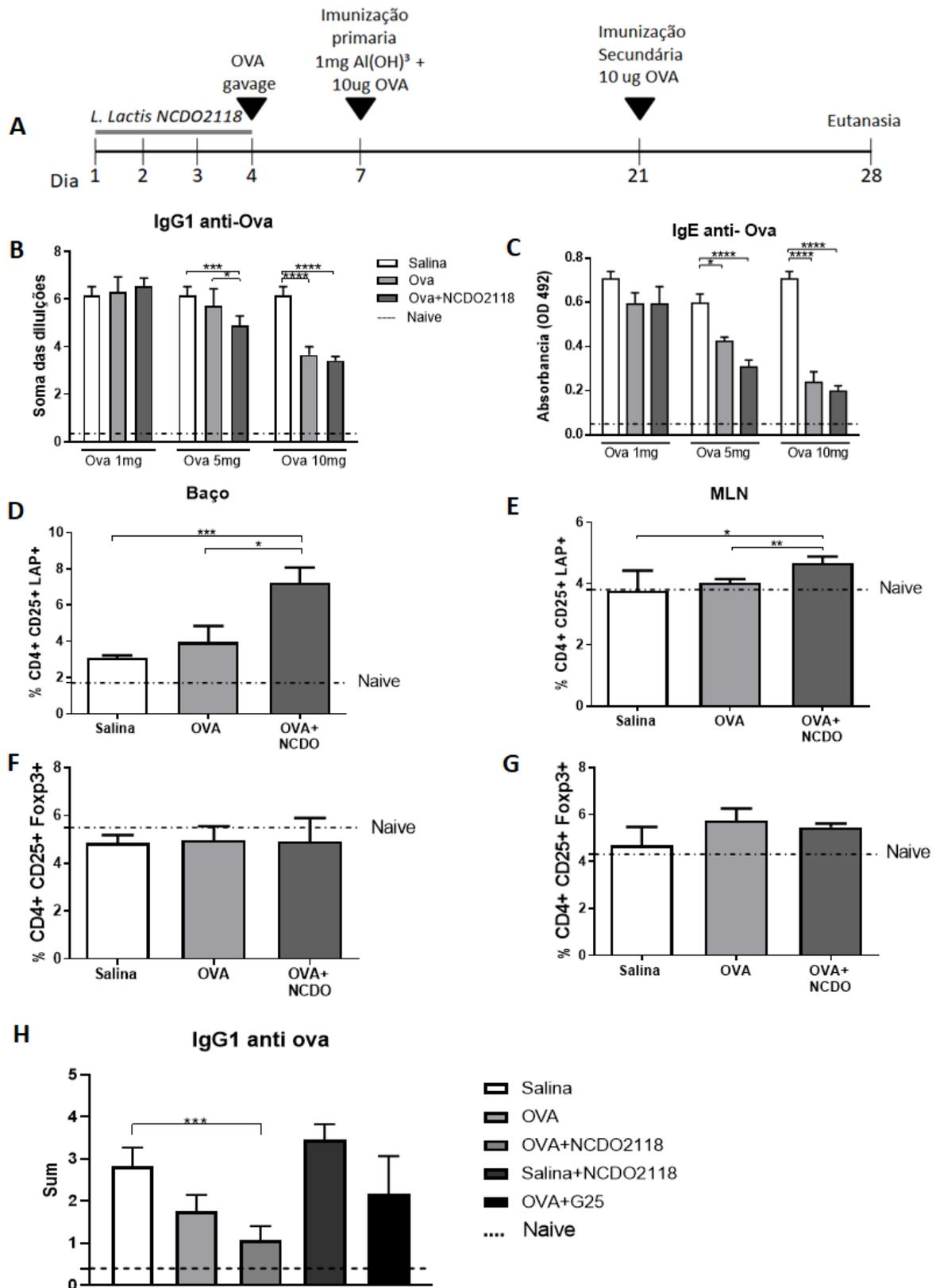


Figura 11. Padronização do protocolo subótimo de indução de tolerância oral. (A) Camundongos C57BL/6 foram imunizados i.p. com 10ug de OVA + 1mg de Al(OH)₃, 14 dias depois receberam imunização secundária com 10ug de OVA + 200ul de salina e foram eutanasiados 7 dias após a imunização secundária. O grupo naive consistiu de animais não manipulados. Os animais do grupo salina receberam

gavagem de solução salina 7 dias antes da imunização. Os animais do grupo OVA receberam gavagem de OVA e os animais dos grupos OVA+NCDO2118 e OVA+G25 receberam administração da bactéria *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO2118 ou da bactéria de uso comercial *L. lactis* subsp. *lactis* G25 na mamadeira durante 4 dias, respectivamente, e a gavagem de OVA no 4º dia sendo imunizados 7 dias depois. **(B,C)** Níveis de IgG1 e IgE anti-OVA no soro dos animais foram medidos por ELISA após a eutanásia. Foram testadas 3 doses de OVA (1mg, 5mg e 10mg) para padronização do protocolo. As barras representam a média + erro padrão da média (e.p.m). (n= 5) da absorvância obtida ou da somatória das absorvâncias. ****P< 0,0001; ***P= 0,0008; *P =0,0180. Os resultados representam a soma de três experimentos independentes. **(D-G)** Frequência de linfócitos CD4⁺CD25⁺LAP⁺ e CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ no baço e MLN dos camundongos. **(H)** Níveis de IgG1 anti-OVA no soro dos animais após o protocolo de TO com dose de 5mg de OVA comparando a administração da bactéria *L. lactis* subsp. *lactis* G25 de uso comercial e grupo salina + NCDO2118. Os resultados foram expressos através da média + e.p.m, (n=5), *p=0,005. A média do grupo Naive é representada como uma linha para referência, não interferindo na análise estatística.

4.3- O efeito adjuvante da *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO2118 envolveu o lactato e seus receptores

Sabendo-se que a cepa *L. lactis* NCDO2118 tem efeito tolerogênico na TO auxiliando na geração de células Treg LAP⁺, decidimos analisar qual seria o componente principal presente nessa bactéria responsável por esse efeito.

Para extrairmos os compostos produzidos/secretados pela *L. lactis* NCDO2118, a bactéria foi cultivada durante 20h, e o sobrenadante da cultura foi coletado para ser administrado aos animais. Alí continuam os produtos secretados pela *L. lactis* diluídos no meio de crescimento. O meio foi centrifugado para que não houvesse presença da bactéria alí. Acrescentamos esse grupo (OVA+Sobrenadante) para verificar se algum produto secretado pela bactéria no momento do cultivo poderia ter efeito semelhante no desenvolvimento da TO. Os animais receberam 4 dias de sobrenadante na mamadeira *ad libitum* previamente ao protocolo de TO. Conforme demonstrado estatisticamente, a administração de sobrenadante associado à gavagem de OVA foi eficaz na supressão da resposta de IgG1 e IgE anti-OVA se comparado ao grupo OVA+NCDO2118 **(Figuras 12A e 2B)**.

Sabemos que o maior produto secretado pela *L. lactis* é o lactato, por ser uma bactéria que realiza fermentação láctica. A *L. lactis* é homoláctea, ou seja, cem por cento do seu produto de fermentação consiste em ácido láctico (Donohue &

Gueimonde, 2011). Assim, investigamos o efeito do principal componente secretado no meio de cultivo da bactéria: o lactato. Conforme observado em estudo de modelo de injúria intestinal, a administração de lactato *ad libitum* aos camundongos na concentração de 15mM apresentou efeitos anti-inflamatórios e protetores da mucosa intestinal (Watanabe et al., 2009). Portanto administramos o lactato em 2 doses diferentes (15mM e 50mM) na mamadeira (**Figura 12F**). Apenas o grupo OVA+Lactato50mM teve uma resposta estatisticamente significativa na supressão de IgG1 anti-OVA, sendo semelhante ao grupo OVA+NCDO2118. Porém o grupo OVA+Lactato15mM não teve papel tolerogênico. Isso indica que apenas na concentração de 50mM o lactato foi capaz de atuar como adjuvante da TO (**Figura 12F**).

Para verificar se algum outro componente da *L. lactis* NCDO2118 que não é secretado, mas está presente em sua parede celular também tem efeito tolerogênico, administramos a bactéria morta por irradiação ou por calor (**Figuras 12D-E**) (Adams, 2010; Rachmilewitz et al., 2004). A bactéria morta por calor se desnatura, se rompe e expõe o que está em seu citoplasma. Já a bactéria morta por irradiação mantém sua parede celular intacta, o que permite a exposição de todos os antígenos presentes em sua superfície (Adams, 2010; Rachmilewitz et al., 2004). Verificamos que os dois tratamentos também auxiliam na supressão de IgG1 e IgE anti-OVA e são semelhantes ao grupo tratado com a bactéria viva (OVA+NCDO2118) (**Figuras 12D-E**).

Então, extraímos essas proteínas de superfície e administramos via gavagem nos camundongos (OVA+SPtn) previamente ao protocolo para verificar se elas também auxiliam na TO (**Figura 12C**). Não obtivemos diferenças estatisticamente significativas nesse grupo.

Esses dados sugerem que pode existir mais de um componente da *L. lactis* NCDO2118 atuando em conjunto para que ocorra a indução de TO. Por isso, acrescentamos mais um grupo onde foram administradas as proteínas de superfície associadas ao Lactato15mM (OVA+SPtn+Lactato15mM), onde também não verificamos nenhum efeito supressor na IgG1 anti-OVA (**Figura 12C**).

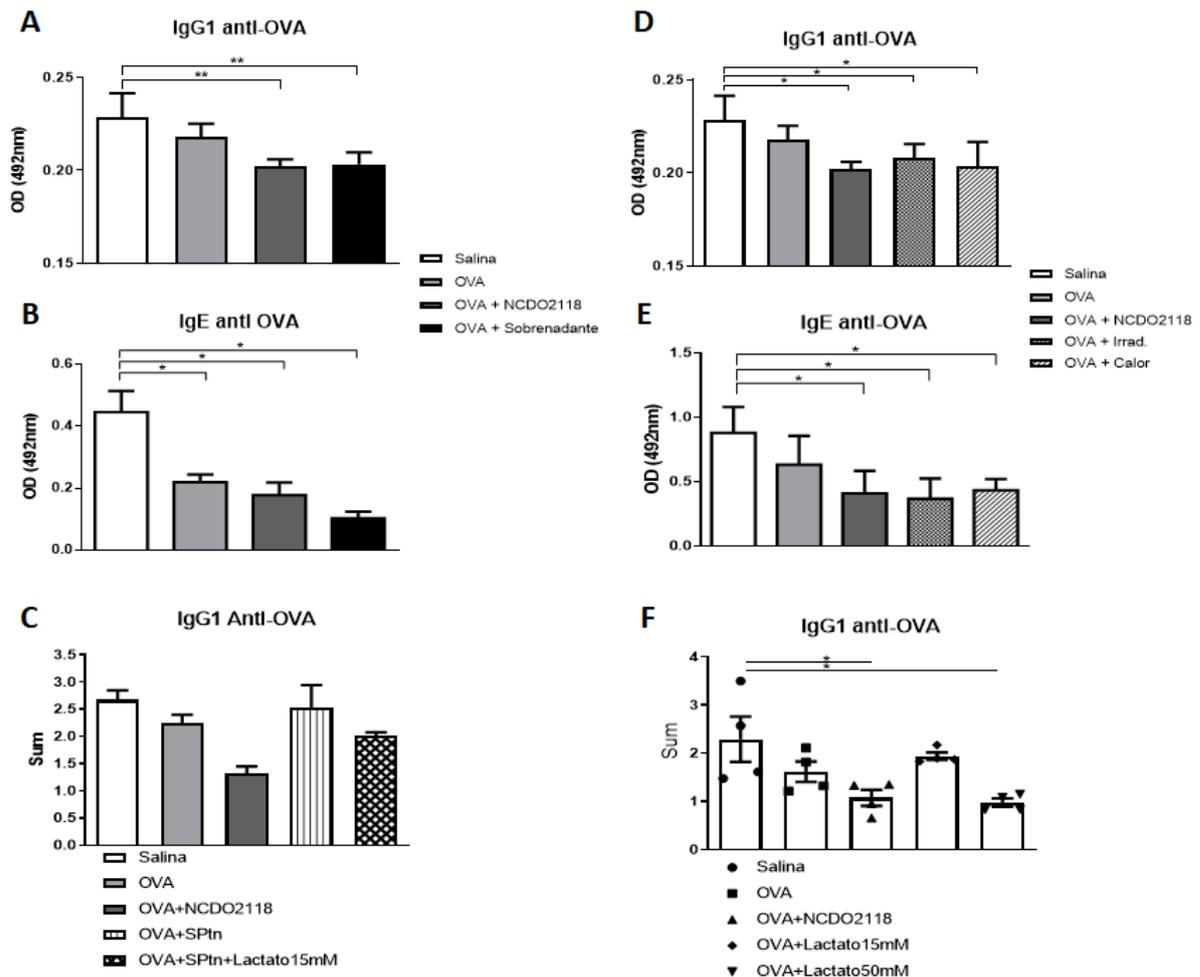


Figura 12. Análise de componentes bacterianos que podem auxiliar na TO. Camundongos C57BL/6 foram imunizados para a indução de TO a OVA. O grupo salina recebeu gavagem de solução salina e foi imunizado. O grupo OVA recebeu gavagem de OVA e foi imunizado. O grupo OVA+NCDO2118 recebeu administração da bactéria *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO2118 na mamadeira durante 4 dias, uma gavagem com 5mg de OVA/animal, posteriormente, foi imunizado. A significância da diferença entre os grupos foi calculada pelo teste ANOVA.* $p < 0,1$; ** $p < 0,05$; *** $p < 0,01$. **(A-F)** Concentração de IgG1 e IgE anti-ova no soro dos animais medidos por ELISA em comparação com os grupos controle. **(A,B)** O grupo OVA+sobrenadante recebeu o meio filtrado após cultivo da bactéria; **(D,E)** o grupo OVA+Irrad recebeu as bactérias mortas por irradiação diluídas em salina; o grupo OVA+Calor recebeu as bactérias mortas por calor diluídas em meio salina; **(C)** o grupo OVA+SPTn recebeu as proteínas de superfície das bactérias diluídas em salina, por gavagem; o grupo OVA+SPTn+Lactato15mM recebeu as proteínas de superfície das bactérias diluídas em solução de lactato 15mM; **(F)** o grupo OVA+Lactato15mM recebeu a solução de lactato 15mM diluída na água de beber dos camundongos *ad libitum*; o grupo OVA+Lactato50mM recebeu a solução de lactato 50mM diluída na água de beber dos camundongos *ad libitum* (n=5).

Sabendo que o efeito adjuvante da bactéria está relacionado tanto com componentes presentes na sua membrana quanto com produtos secretados por ela,

optamos por aprofundar nossas análises com foco no lactato, já que é um ácido orgânico que está sendo bastante estudado por seus efeitos antiinflamatórios na mucosa intestinal. Camundongos geneticamente deficientes em GPR81 (receptor do lactato) apresentam uma mucosa intestinal naturalmente inflamada, com maior infiltrado celular. Em modelo de colite por DSS com esses animais, eles apresentam um escore histológico mais alto e uma baixa capacidade na diferenciação de células Treg, o que reforça papel anti-inflamatório do lactato e do seu receptor (Ranganathan et al., 2018).

Recentemente foi descrito que outro receptor do lactato, GPR31, presente em macrófagos residentes que expressam CX3CR1 tem papel importante em estimular a captação de antígenos do lumem para que essas células entreguem às células dendríticas presentes na LP. Esse estudo demonstrou que na presença de ácido láctico esses macrófagos intensificam o seu papel imune no intestino (Morita et al., 2019). Concluimos que esses dois receptores são importantes para que o lactato exerça seu papel na mucosa intestinal. Sabendo disso, analisamos a sua expressão no intestino delgado (**Figuras 13A-B**). Observamos que os animais do grupo OVA+NCDO2118 apresentaram maior expressão dos dois receptores, sugerindo o envolvimento destes na TO a OVA (**Figura 13A-B**).

Ao avaliar o papel do receptor do lactato GPR81 na homeostase intestinal, um estudo utilizou o agonista do receptor em camundongos submetidos ao modelo de colite por dextran sulfato de sódio. Concluiu-se que a ativação de GPR81 suprimiu a inflamação intestinal promovendo funções reguladoras nas células apresentadoras de antígenos e aumentando a indução de células Treg principalmente produtoras da citocina IL-10 (Ranganathan et al., 2018).

Em nossos resultados prévios, a expressão de GPR81 estava aumentada em camundongos tolerantes para OVA, portanto resolvemos avaliar se a inibição ou ativação desse receptor está envolvido com prejuízos ou benefícios na indução de TO a OVA. Sendo assim, os camundongos foram tratados com o agonista do GPR81 juntamente com a administração oral de OVA previamente às imunizações (OVA+agonista). Outro grupo de animais recebeu o antagonista de GPR81 associado à administração oral de bactéria e OVA para avaliarmos se a bactéria perde seu efeito adjuvante quando a ativação do GPR81 é inibida (OVA+NCDO2118+Antagonista) (**Figura 13C**).

Ao analisarmos a produção de IgG1 anti-OVA, observamos que a administração do agonista de GPR81 associada à OVA foi suficiente para a indução eficaz de TO. Da mesma forma, o antagonista inibiu o efeito tolergênico da bactéria impedindo a supressão da resposta anti-OVA mesmo na presença da bactéria (**Figura 13C**). Assim, concluímos que o lactato e seus receptores GPR81 e GPR31 são essenciais para o efeito adjuvante da *L.lactis* na indução de TO à OVA.

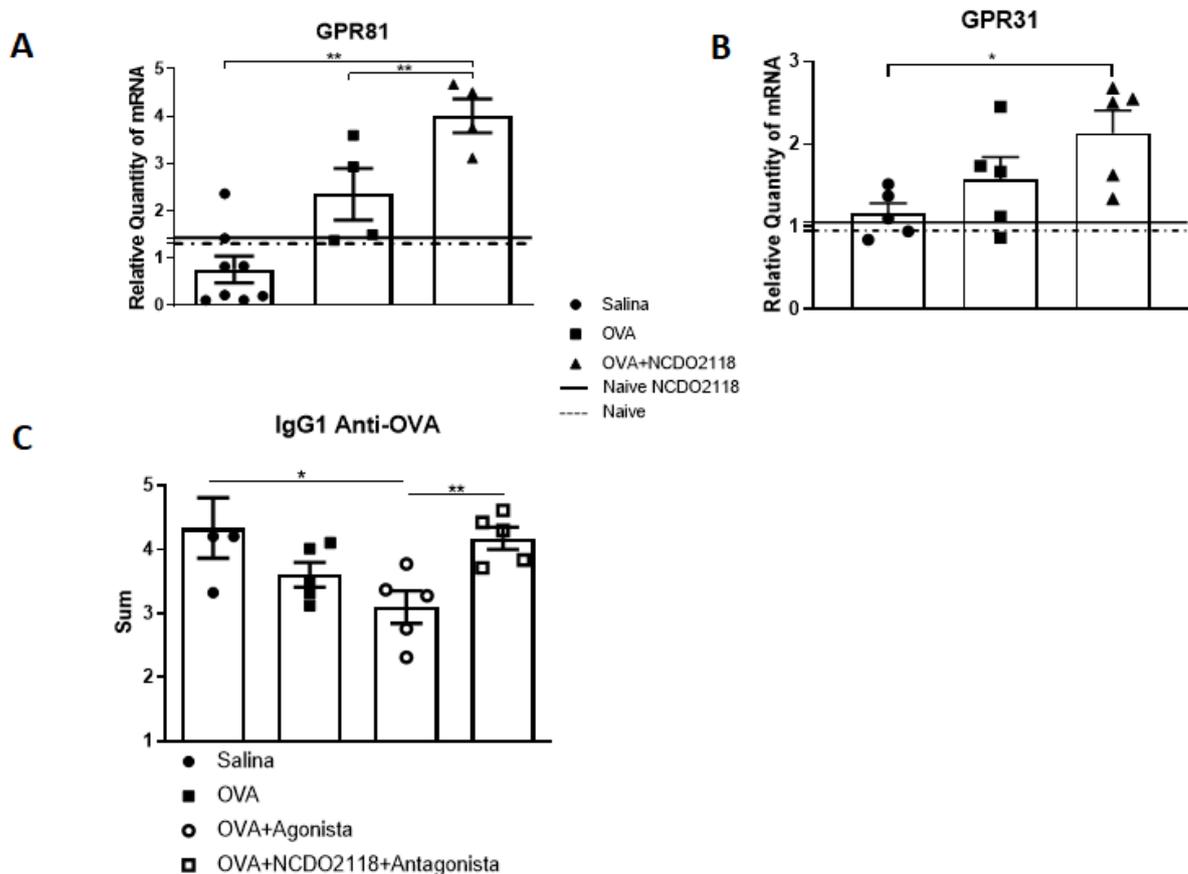


Figura 13. Análise do papel dos receptores do lactato GPR81 e GPR31 na TO. Camundongos C57BL/6 foram imunizados para a indução de TO a OVA. O grupo salina recebeu gavagem de solução salina e foi imunizado. O grupo OVA recebeu gavagem de OVA e foi imunizado. O grupo OVA+NCDO2118 recebeu administração da bactéria *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO2118 na mamadeira durante 4 dias, uma gavagem com 5mg de OVA/animal, posteriormente, foi imunizado. A significância da diferença entre os grupos foi calculada pelo teste ANOVA.* $p < 0,1$; ** $p < 0,05$; *** $p < 0,01$. **(A)** Expressão de genes do receptor GPR81 e **(B)** GPR31 no intestino delgado dos camundongos. O grupo Naive NCDO2118 representa animais que receberam 4 dias de bactéria *ad libitum* na mamadeira e foram eutanasiados ao final do 28º dia juntamente com os outros grupos. O grupo naive consistiu de animais não manipulados e que beberam água durante todo o experimento. A média dos grupos Naive e Naive+NCDO2118 foi representada como uma linha para referência, não interferindo na análise estatística. **(C)** Animais foram tratados com o antagonista ou o agonista do GPR81 via gavagem antes da administração de OVA. (n=5)

4.4- O efeito adjuvante da *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO2118 envolveu aumento na frequência das células dendríticas tolerogênicas e dos macrófagos residentes

Entre os principais subconjuntos de células dendríticas CD11c⁺, estão as subpopulações de DCs residentes (CD8α⁺CD11b^{low}CD103⁺ e CD8α⁻CD11b⁺CD103⁻) e as DCs migratórias convencionais (CD103⁺CD11b⁻, CD103⁺CD11b⁺, CD103⁻CD11b⁺) (Joeris et al., 2017; Kelsall, 2008). Inicialmente mensuramos aqui as populações de DC migratórias nos MLN compartimentalizados de camundongos submetidos ao protocolo de TO.

As células dendríticas intestinais de perfil tolerogênico são conhecidas por expressar a integrina CD103 em sua superfície. É descrito que essas células dendríticas tolerogênicas (CD103⁺CD11b⁻) são muito importantes para o desenvolvimento da TO (L. C. Oliveira et al., 2014). Elas são responsáveis por captar antígenos no lúmen intestinal e apresentá-los aos linfócitos Tnaive presentes nos MLN, induzindo a diferenciação desses linfócitos em Treg. Nossos resultados prévios demonstraram que a *L. lactis* NCDO2118 foi capaz de induzir o aumento na frequência de células Treg CD4⁺LAP⁺ nos linfonodos mesentéricos (**Figura 11E**). Portanto, investigamos se esse aumento na frequência de Treg se deveu à presença de células dendríticas tolerogênicas e qual é o local do intestino onde esse aumento ocorre. Um estudo prévio do nosso grupo demonstrou que o principal segmento do intestino envolvido na diferenciação de células Treg é o duodeno (Esterházy et al., 2019). Sabendo disso, resolvemos analisar os linfonodos drenantes de cada região do intestino (duodeno, jejuno, íleo e cólon) para visualizarmos a região intestinal onde a *L.lactis* NCDO2118 atuaria preferencialmente (**Figura 14**).

Observamos uma maior frequência de células CD4⁺LAP⁺ no duodeno e no jejuno nos grupos OVA+NCDO2118 e OVA+Lactato50mM, regiões proximais do intestino (**Figura 14D**).

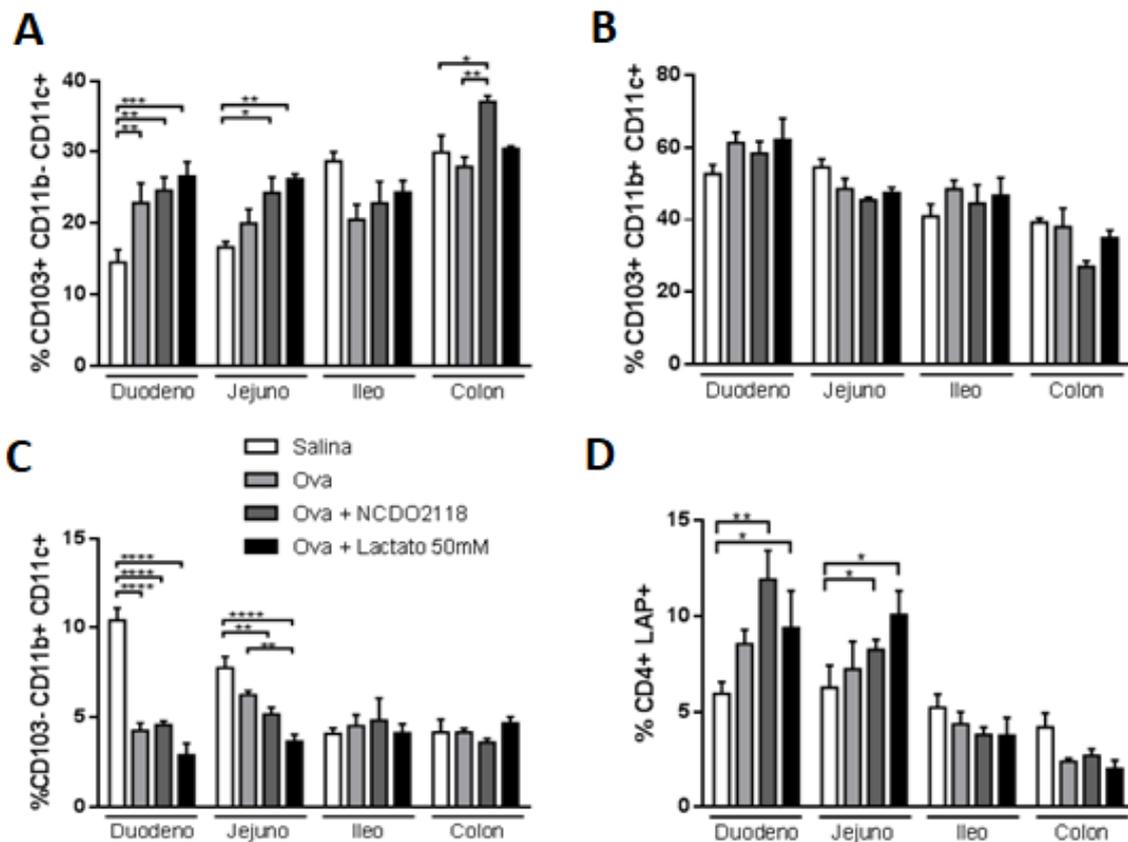


Figura 14. Frequência de células dendríticas e linfócitos T CD4⁺LAP⁺ nos MLN compartimentalizados após submissão ao protocolo de TO. Camundongos C57BL/6 foram imunizados para a indução de TO a OVA. O grupo salina recebeu gavagem de solução salina e foi imunizado. O grupo OVA recebeu gavagem de OVA e foi imunizado. O grupo OVA+NCDO2118 recebeu administração da bactéria *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO2118 na mamadeira durante 4 dias, uma gavagem com 5mg de OVA/animal, posteriormente, foi imunizado. O grupo OVA+Lactato50mM recebeu lactato na mamadeira durante 4 dias, uma gavagem com 5mg de OVA/animal, posteriormente, foi imunizado. A significância da diferença entre os grupos foi calculada pelo teste ANOVA. *p<0,1; ** p<0,05; *** p<0,01. Citometria de fluxo foi usada para identificação fenotípica das células. **(A-C)** Frequência de perfis de células dendríticas, CD103⁺CD11b⁻CD11c⁺ **(A)**, CD103⁺CD11b⁺CD11c⁺ **(B)** e CD103⁻CD11b⁺CD11c⁺ **(C)** nos linfonodos compartimentalizados. **(D)** Frequência de células Treg CD4⁺LAP⁺ nos linfonodos compartimentalizados

A frequência de células dendríticas tolerogênicas (CD103⁺CD11b⁻) estavam aumentadas não só nos linfonodos duodenais, como também no jejunum dos camundongos que receberam tratamento com *L.lactis* NCDO2118 e Lactato (**Figura 14A**). Já a frequência das células dendríticas pró-inflamatórias (CD103⁻CD11b⁺) apresentaram uma redução também nos linfonodos que drenam o duodeno e o jejunum nos grupos OVA+NCDO2118 e OVA+Lactato50mM (**Figura 14C**).

A frequência de células dendríticas intermediárias (CD103⁺CD11b⁺) não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos (**Figura 14B**). Essa célula é conhecida como mais plástica e pode se diferenciar tanto em pró-inflamatórias quanto em anti-inflamatórias (Price et al., 2015).

Já que essas células estavam aumentadas nos linfonodos proximais, avaliamos em seguida a frequência dessas células na LP de camundongos submetidos ao protocolo de TO a OVA (**Figura 15**). Observamos que houve um aumento na frequência de células CD103⁺CD11b⁻ e CD103⁺CD11b⁺ na LP dos animais que receberam administração de *L. lactis* NCDO2118 (**Figura 15A-B**), enquanto as células dendríticas pró-inflamatórias (CD103⁻CD11b⁺) apresentaram redução (**Figura 15C**). Para avaliarmos se houve aumento na apresentação de antígenos, fizemos a intensidade média de fluorescência do MHCII dessas células na LP onde não observamos diferenças estatísticas (**Figura 15D-E**).

Com esses dados podemos concluir que a *L. lactis* NCDO2118 atuou nas regiões proximais do intestino (duodeno e jejuno), principalmente, aumentando a frequência de células Treg LAP⁺, das células dendríticas tolerogênicas que expressam CD103⁺, e reduzindo células dendríticas proinflamatórias CD103⁻.

Concluimos que houve uma maior apresentação de antígeno não devido à um aumento da expressão de MHCII, mas sim devido à maior frequência de células dendríticas tolerogênicas, sugerindo que este pode ser um mecanismo responsável pelo aumento da frequência de células Treg LAP⁺.

Sabe-se que macrófagos CX3CR1⁺ residem em locais como a LP, e tem a característica de não migrar, mas auxiliar a apresentação de antígenos. Esses macrófagos captam antígenos no lumen intestinal, processam esses antígenos e os entregam às CD CD103⁺ para que então elas migrem aos MLN e os apresente aos linfócitos naive (Mazzini et al., 2014; O. Pabst & Mowat, 2012). Além disso, esses macrófagos possuem capacidade de secretarem citocinas antiinflamatórias IL10 (Takada et al., 2010), e na presença de TGF-β, contribuem para a manutenção da homeostase intestinal (Denning et al., 2007; Smith et al., 2011). Por isso, esses macrófagos podem ter papel importante na geração de Treg na TO a OVA.

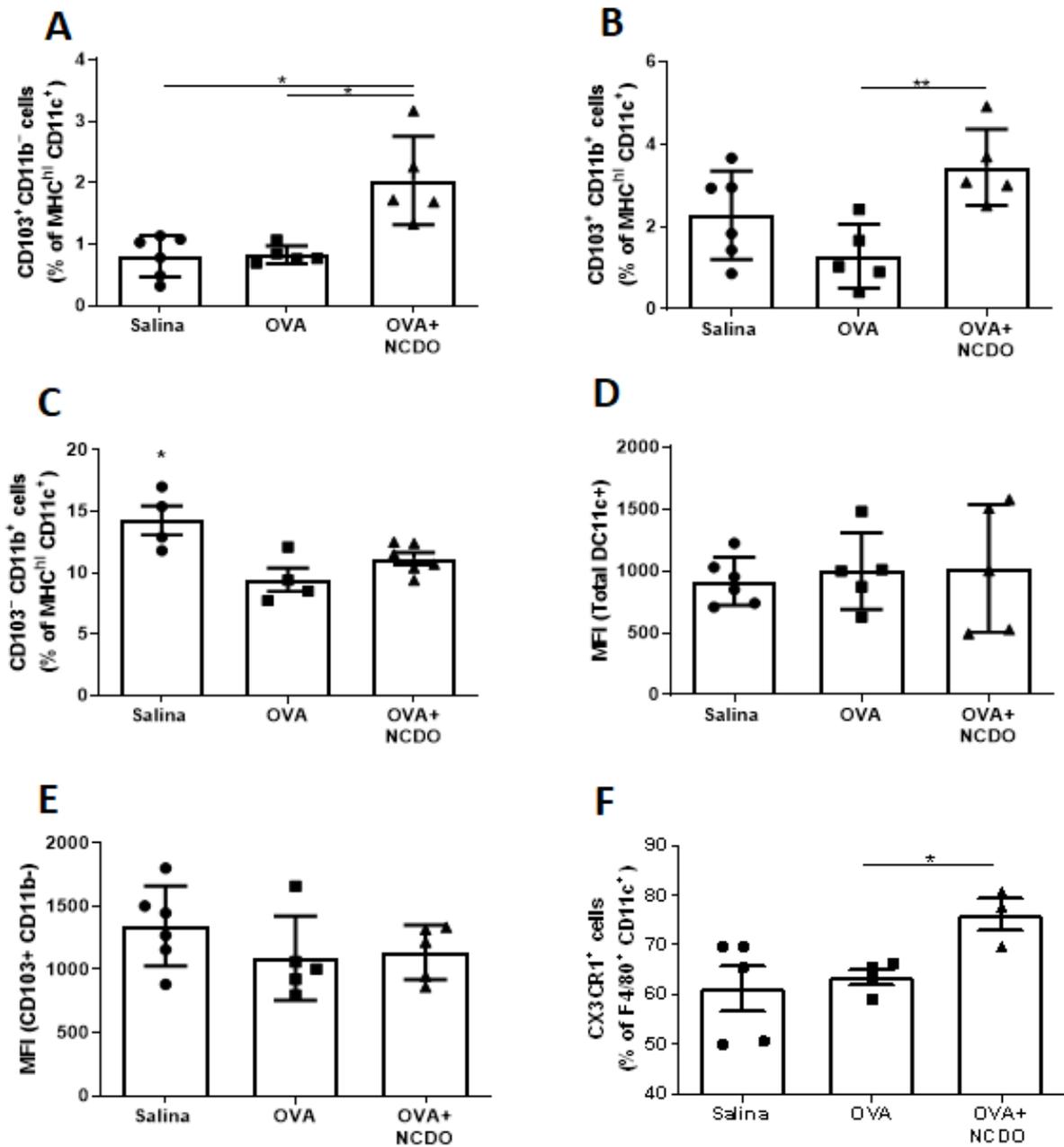


Figura 15. Frequência de células dendríticas e macrófagos residentes na LP após indução de TO. Camundongos C57BL/6 foram imunizados para a indução de TO a OVA. O grupo salina recebeu gavagem de solução salina e foi imunizado. O grupo OVA recebeu gavagem de OVA e foi imunizado. O grupo OVA+NCDO2118 recebeu administração da bactéria *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO2118 na mamadeira durante 4 dias, uma gavagem com 5mg de OVA/animal, posteriormente, foi imunizado. A significância da diferença entre os grupos foi calculada pelo teste ANOVA. * $p < 0,1$; ** $p < 0,05$; *** $p < 0,01$. Citometria de fluxo foi usada para identificação fenotípica das células. **(A-C)** Frequência de perfis de células dendríticas, CD103⁺CD11b⁻CD11c⁺ **(A)**, CD103⁺CD11b⁺CD11c⁺ **(B)** e CD103⁻CD11b⁺CD11c⁺ **(C)** na lâmina própria. **(D-E)** Intensidade média de fluorescência de células dendríticas na LP. **(F)** Frequência de macrófagos residentes CX3CR1⁺ na LP.

Portanto, analisamos a população de macrófagos residentes intestinais CX3CR1⁺ (**Figura 15F**) e observamos aumento na frequência dessas células na LP de camundongos tratados com OVA+NCDO2118.

Além disso, um estudo prévio demonstrou que um dos receptores do lactato, GPR31, está expresso nesses macrófagos residentes intestinais CX3CR1⁺, e que na presença desse ácido orgânico seu papel de captação de antígeno foi exacerbado (Morita et al., 2019). Verificamos que a expressão desse receptor GPR31 estava aumentada (**Figura 13B**) no intestino de camundongos do grupo OVA+NCDO2118.

Esses dados demonstram que as alterações celulares geradas pela *L. lactis* envolvem CD tolerogênicas e macrófagos residentes que são APCs importantíssimas para a geração de células Treg e para que a indução de TO ocorra de maneira eficaz.

4.5- O efeito adjuvante da *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO2118 envolveu aumento na frequência das ILC2 e não alterou populações de linfócitos Th

Em uma próxima etapa, resolvemos avaliar as populações celulares de células Thelper (**Figuras 16A-C**) e as ILCs (**Figuras 16D-F**).

Sabemos que as CD convencionais são células apresentadoras profissionais que direcionam não só a diferenciação de células T CD4⁺ reguladoras, mas também das efectoras, incluindo Th1, Th2, Th17, além de células T CD8⁺ também (Coomes & Powrie, 2008). Já as ILCs são células semelhantes a linfócitos que não expressam receptores de diversidade antigênica ou fazem rearranjo gênico como linfócitos B ou T, mas parecem ser particularmente importantes na regulação das barreiras epiteliais. Elas são classificadas em ILC1s, ILC2s e ILC3s, e suas funções são análogas àquelas das células Th1, Th2 e Th17 respectivamente (Klose & Artis, 2016).

Análises estatísticas demonstraram que não houve diferença nas frequências de células Th1, Th2 e Th17 entre os grupos (**Figuras 16A-C**). Dentre as ILCs, apenas a ILC2 apresentou aumento na frequência em camundongos que ingeriram a *L. lactis* NCDO2118 (**Figuras 16E**). As frequências de ILC1 e ILC3 não foram comparáveis entre os grupos (**Figura 16D e F**).

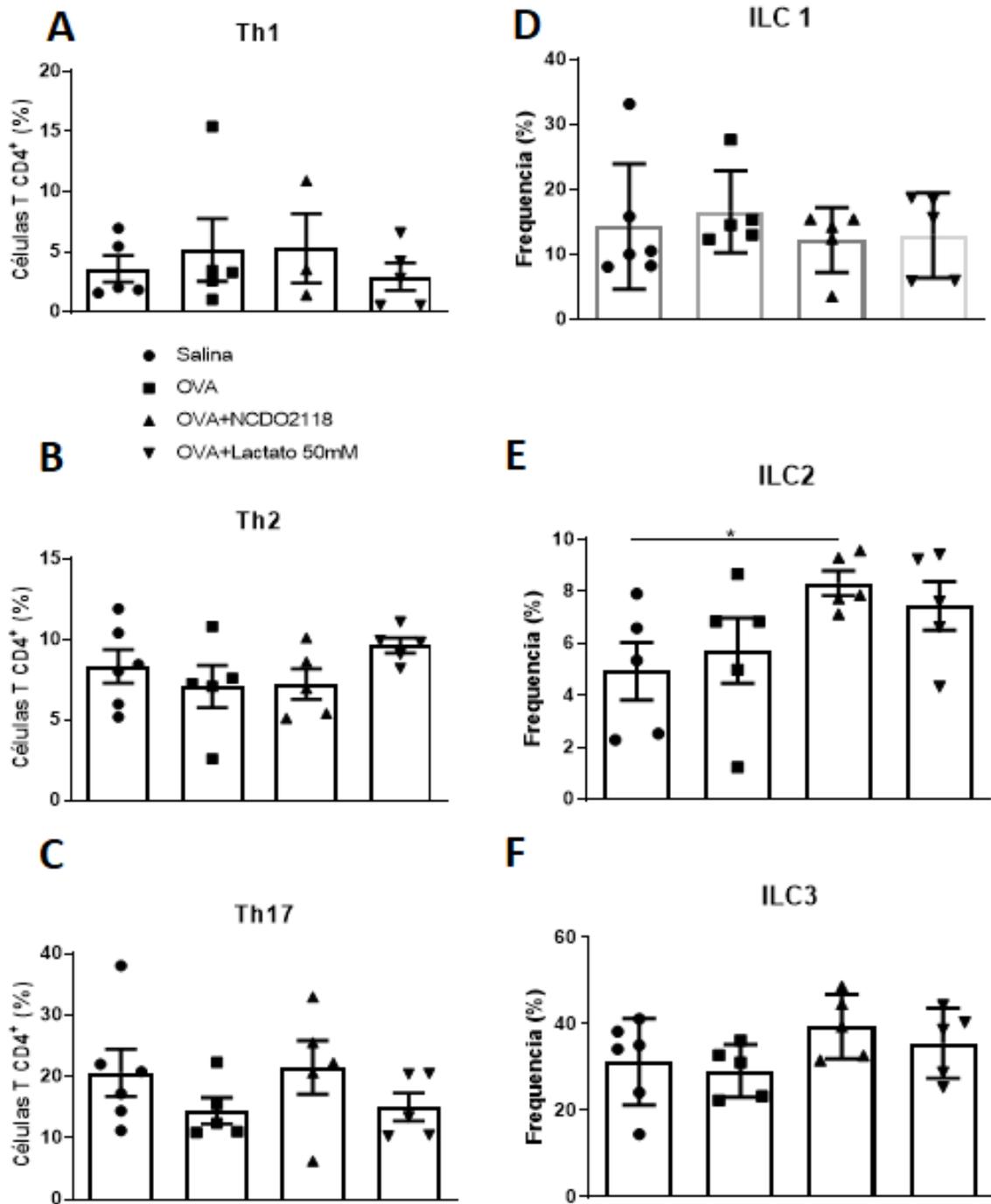


Figura 16. Efeito da *L.lactis* NCDO2118 no perfil de linfócitos Th e células linfoides inatas na LP após a indução de TO. Camundongos C57BL/6 foram imunizados para a indução de TO a OVA. O grupo salina recebeu gavagem de solução salina e foi imunizado. O grupo OVA recebeu gavagem de OVA e foi imunizado. O grupo OVA+NCDO2118 recebeu administração da bactéria *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO2118 na mamadeira durante 4 dias, uma gavagem com 5mg de OVA/animal, posteriormente, foi imunizado. O grupo OVA+Lactato50mM recebeu lactato na mamadeira durante 4 dias, uma gavagem com 5mg de OVA/animal, posteriormente, foi imunizado. Citometria de fluxo foi usada para identificação

fenotípica de célula inatas e adaptativas. A significância da diferença entre os grupos foi calculada pelo teste ANOVA. * $p < 0,1$; ** $p < 0,05$; *** $p < 0,01$. **(A-C)** Frequência de células adaptativas Tbet⁺ TCD4⁺ (Th1) **(A)**, GATA3⁺ TCD4⁺ (Th2) **(B)** e ROR γ T⁺TCD4⁺ (Th17)**(C)** na LP. **(D-F)** Frequência de células inatas ILC1 **(D)**, ILC2 **(E)** e ILC3 **(F)** na LP.

Estudos demonstram que as ILC2 estão relacionadas ao remodelamento intestinal por ser estimulada de maneira indireta por ácidos orgânicos da microbiota intestinal (Schneider et al., 2018).

Até aqui, os resultados indicam que os mecanismos adjuvantes da bactéria envolvem prioritariamente células da imunidade inata como CDs, ILC2 e macrófagos residentes CX3CR1⁺. Tais dados confirmam um efeito da bactéria que envolve células responsáveis pela homeostase intestinal e está relacionado com apresentação e captação de antígenos, o que é um mecanismo importante para o desenvolvimento da TO.

4.6- A administração de *L. lactis* NCDO2118 altera a frequência de células na mucosa intestinal de camundongos naive

Para conhecermos melhor os mecanismos pelos quais a *L. lactis* atua de forma independente, foi necessário avaliarmos seu efeito sem a presença de um protocolo de doença ou intervenção experimental. Por isso, administramos a bactéria durante 4 dias *ad libitum* na mamadeira em camundongos naive. Após 24 dias os animais foram eutanasiados. A frequência de CD, ILCs, linfócitos Treg LAP⁺ e macrófagos residentes CX3CR1⁺ foram avaliadas **(Figura 17)**.

A frequência de CD tolerogênicas (CD103⁺CD11b⁻) estavam aumentadas nos linfonodos jejunais, indicando que pode existir uma atuação prévia da *L. lactis* NCDO2118 na homeostase intestinal **(Figura 17A)**. Não foram observadas diferenças nas frequências de outras populações de CDs **(Figura 17B-C)**.

Ao analisar as ILCs, observamos aumento apenas na frequência de ILC2 após a ingestão exclusiva de *L. lactis* NCDO2118 **(Figura 17D)**.

Observamos também um aumento na frequência de macrófagos residentes no jejuno e na LP de camundongos naive que receberam a administração exclusiva de *L. lactis* NCDO2118 durante 4 dias **(Figura 17E-F)**.

Avaliamos o perfil de células Treg LAP⁺ (**Figura 17G-H**) no baço e nos MLN compartimentalizados de camundongos naive que receberam apenas a bactéria via oral, porém não observamos nenhuma diferença estatística.

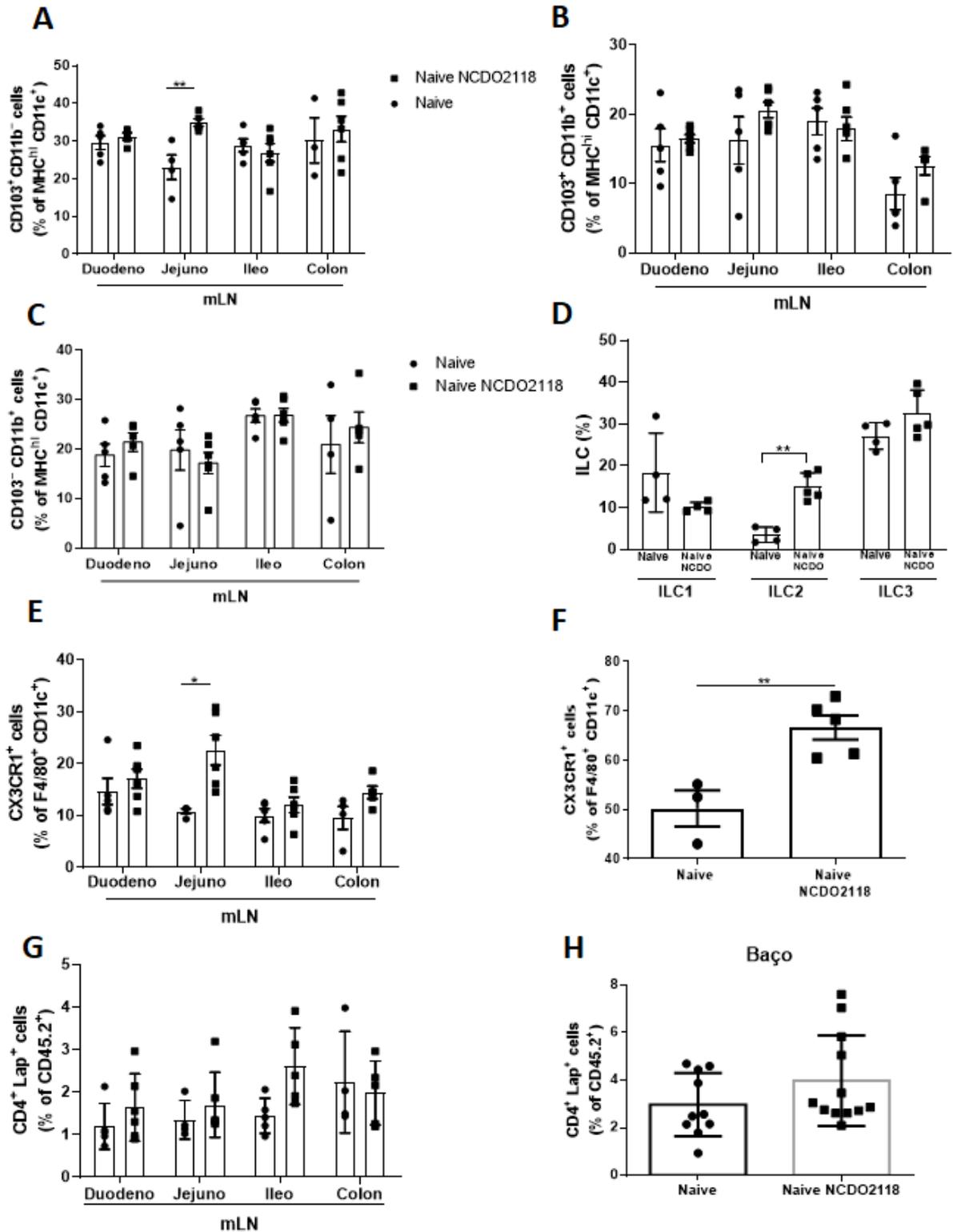


Figura 17. Efeitos da administração de *L.lactis* NCDO2118 na mucosa intestinal e nos MLN de camundongos naive. Camundongos C57BL/6 receberam 4 dias de *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO2118 *ad libitum* na mamadeira. Ao final do 4º dia, a mamadeira foi substituída por água e os animais foram sacrificados após 24 dias (grupo Naive NCDO2118). O grupo naive consistiu de animais não manipulados que beberam água durante todo o experimento. Citometria de fluxo foi usada para identificação fenotípica de CD, Innate lymphoid Cells (ILC), macrófagos residentes (CX3CR1⁺) e Treg CD4⁺LAP⁺. A significância da diferença entre os grupos foi calculada pelo teste ANOVA. *p<0,1 e teste T student para comparar grupos Naive e Naive NCDO2118. *p<0,1; ** p<0,05; *** p<0,01. **(A-C)** Frequência de perfis de células dendríticas, CD103⁺CD11b⁻CD11c⁺ **(A)**, CD103⁺CD11b⁺CD11c⁺ **(B)** e CD103⁻CD11b⁺CD11c⁺ **(C)** nos linfonodos compartimentalizados. **(D)** Frequência de células inatas ILC1, ILC2 e ILC3 na LP. **(E)** Frequência de macrófagos residentes CX3CR1⁺ nos linfonodos compartimentalizados e na **(F)** LP. **(G)** Frequência de células Treg CD4⁺LAP⁺ nos linfonodos compartimentalizados e no **(H)** baço.

Esses resultados sugerem que a *L. lactis* NCDO2118 pode ter um papel no estabelecimento de um ambiente mais tolerogênico no intestino que contribuiria na indução de TO quando o antígeno for administrado pela via oral.

Experimentos realizados com *L. lactis* marcado com GFP (proteína verde fluorescente) observaram que a *L. lactis* se aloja no intestino por apenas 48h (Mancha-Agresti et al., 2017), não sendo mais possível visualizar sua presença ali 72h depois. Isso indica que, em nosso estudo, no momento da eutanásia (24 dias depois), a bactéria *L.lactis* não se encontrava mais no intestino e a alteração na frequência de células observada pode se explicar por modificações que a *L. lactis* promoveu na mucosa intestinal e possivelmente no perfil microbiano intestinal.

Para testar essa hipótese, avaliamos o perfil da microbiota e o perfil de ácidos orgânicos produzidos no intestino, já que, de alguma forma a *L. lactis* promoveu modificações duradouras na mucosa intestinal mesmo depois de seu desaparecimento (**Figuras 18 e 19**).

4.7- A administração de *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO2118 alterou o perfil da microbiota intestinal

Sabemos que a base para diversas doenças humanas pode estar relacionada à dieta e às ações de microorganismos comensais intestinais e seus metabólitos (Errea et al., 2016). Além disso, é descrito que a administração de bactérias probióticas e antiinflamatórias levam à modulação intestinal (Azad et al., 2018).

Portanto, resolvemos analisar o efeito da *L. lactis* NCDO2118 no perfil da microbiota e na concentração de ácidos orgânicos intestinais.

Analisamos o perfil microbiano dos animais de duas formas. A microbiota foi primeiramente analisada pela metodologia microbiológica de crescimento de bactérias em meios seletivos (Charlet et al., 2018) para avaliarmos se havia alteração no perfil microbiano geral. Animais do grupo OVA apresentaram total de colônias maior do que os demais grupos (**Figura 18A**), com destaque no crescimento aumentado de microorganismos aeróbios no meio manitol (onde crescem *Staphylococcus* patogênicos) e no ágar sangue (onde crescem variados tipos de bactérias, fungos e leveduras) (**Figura 18C**). O fato do grupo OVA+NCDO apresentar um perfil microbiano semelhante ao grupo Naive demonstra que há uma restauração da homeostase intestinal possivelmente desequilibrada pela administração do antígeno OVA via oral (**Figura 18C**).

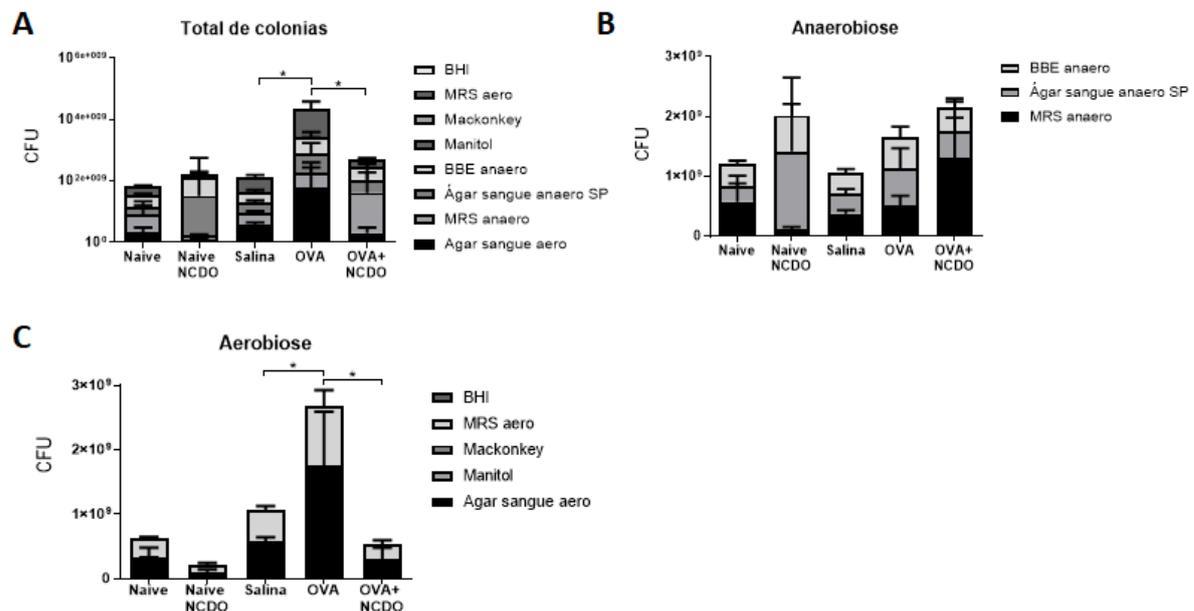


Figura 18. Análise de perfil microbiano intestinal por meios seletivos. Animais submetidos ao protocolo de TO a OVA. O grupo naive consistiu de animais não manipulados. O grupo Naive NCDO2118 foram animais naive que receberam a bactéria na mamadeira por 4 dias como única intervenção. O grupo salina recebeu gavagem de solução salina e foi imunizado. O grupo OVA recebeu gavagem de OVA e foi imunizado. O grupo OVA+NCDO recebeu administração da bactéria *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO2118 na mamadeira durante 4 dias, uma gavagem com 5mg de OVA/animal, posteriormente, foi imunizado. Todos os animais foram eutanasiados no 28º dia. As barras representam a média + erro padrão da média (e.p.m). (n= 5) da absorvância obtida ou da somatória das absorvâncias. A significância da diferença entre os grupos foi calculada pelo teste ANOVA. **P= 0,05; *P <0,1. **(A-C)** Foi

realizado teste de crescimento microbiano através de cultivo do conteúdo intestinal em meios seletivos. Gráficos representativos contendo a quantidade de CFU cultivada em **(A)** todos os meios ou **(B)** em meios mantidos em anaerobiose ou **(C)** em aerobiose por 24h.

Um ponto importante a ser destacado é que a OVA utilizada não era livre de lipopolissacáride (LPS), uma endotoxina com comprovados efeitos estimulatórios em células imunes (Tsuchiya et al., 2012). Assim, pode ser que a contaminação do antígeno administrado por via oral por LPS tenha exercido um efeito no perfil de microbiota patogênica no grupo tratado com OVA via oral. Mesmo assim, a administração da bactéria *L.lactis* NCDO2118 foi capaz de manter a homeostase da microbiota no grupo OVA+NCDO.

Ao avaliarmos os meios em anaerobiose não foram encontradas diferenças estatísticas **(Figura 18B)**.

Sabendo então que houve certa alteração no perfil da microbiota, passamos para uma análise mais específica de filos e gêneros de bactérias nas fezes pelo método de qPCR (Miranda et al., 2019). Observamos que o total de bactérias presentes no grupo OVA+NCDO estava aumentado se comparado com o grupo OVA **(Figura 19A)**. Isso pode demonstrar que o perfil microbiano observado por meios seletivos provavelmente estava aumentado no grupo OVA devido à outros microorganismos (leveduras e fungos) que não sejam bactérias **(Figura 18A)**.

Ao avaliarmos os filos bacterianos, observamos aumento em Bacteroidetes no grupo OVA+NCDO quando comparado aos grupos controles **(Figura 19D)** e redução de Firmicutes quando comparado ao grupo Naive **(Figura 19C)**.

Os dois filos bacterianos mais importantes e abundantes no trato gastrointestinal são os Firmicutes e os Bacteroidetes, que representam 90% de toda a microbiota intestinal. A razão Firmicutes/Bacteroidetes (F/B) possui uma influência importante na manutenção da homeostase intestinal normal. Geralmente quando ela está aumentada ou reduzida, há disbiose e conseqüentemente susceptibilidade a várias patologias (Stojanov et al., 2020). Estudos com disbiose causada por obesidade indicam que indivíduos que possuem uma razão F/B maior que 1 são mais prováveis de possuir sobrepeso do que aqueles que possuem razão F/B menor que 1 (Koliada et al., 2017).

Notamos que houve diminuição na razão F/B de animais que ingeriram a *L.lactis* NCDO2118 se comparados aos grupos controle, o que está relacionado à

modulação da microbiota intestinal (**Figura 19E**). A razão Firmicutes/Bacteroidetes dos camundongos se manteve próximo de 1.

Não houve diferenças estatisticamente significativas no filo Actinobacteria (**Figura 19B**).

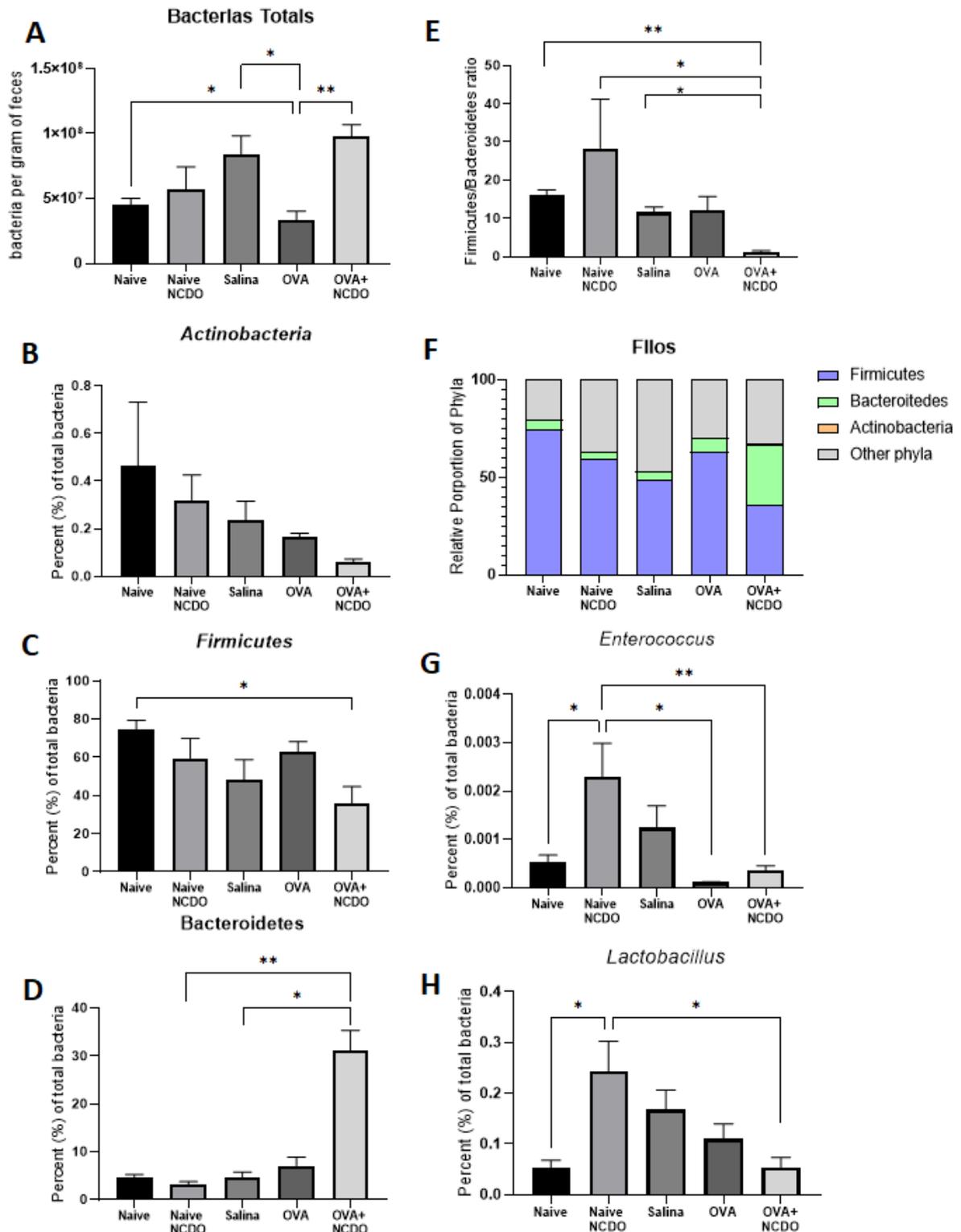


Figura 19. Análise do perfil da microbiota intestinal por qPCR. Camundongos C57BL/6 foram imunizados i.p. com 10ug de OVA + 1mg de Al(OH)₃, 14 dias depois receberam imunização secundária: 10ug de OVA + 200ul de salina e foram eutanasiados 7 dias após a imunização secundária. O grupo naive consistiu de animais não manipulados. O grupo naive NCDO2118 recebeu apenas o tratamento com bactéria e foi sacrificado. O grupo salina recebeu gavagem de solução salina e as imunizações. O grupo OVA recebeu gavagem de OVA e foi imunizado. O grupo OVA+NCDO2118 recebeu administração da bactéria *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO2118, receberam a gavagem de OVA e posteriormente foram imunizados. As barras representam a média + erro padrão da média (e.p.m). (n= 5) da absorvância obtida ou da somatória das absorvâncias. A significância da diferença entre os grupos foi calculada pelo teste ANOVA. **P= 0,05; *P <0,1 **(A)** Quantificação de bactérias nas fezes dos camundongos foram avaliadas por análises de qPCR. Abundância relativa de Actinobactéria **(B)**, Firmicutes **(C)** e Bacteroidetes **(D)** nas fezes dos camundongos. **(E)** Razão firmicutes bacteroidetes. **(F)** Gráfico representativo demonstrando a alteração de perfil dos filos entre os grupos. **(G-H)** Abundância relativa de gêneros bacterianos de *Enterococcus* e *Lactobacillus*.

Na análise de gêneros, verificamos que *Enterococcus* e *Lactobacillus* são dois dos gêneros que estavam diminuídos dentro do filo Firmicutes no grupo OVA+NCDO se comparado aos controles **(Figura 19G-H)**. Porém observamos aumento nessas bactérias em camundongos naive que receberam a bactéria **(Figura 19G-H)**. As análises demonstram que a *L. lactis* modula a microbiota intestinal dependendo do efeito desencadeado pelo sistema imune. Entretanto, serão necessárias mais análises com gêneros de outros filos para compreendermos melhor esse perfil microbiano modulado pela *L. lactis* NCDO2118.

4.8- A administração de *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO2118 modulou a produção de metabólitos nas fezes dos camundongos

Sabemos que a microbiota é capaz de fermentar fibras dietéticas e produzir compostos metabólicos no trato gastrointestinal. O lactato é um sal derivado do ácido lático, um ácido orgânico formado a partir do produto de fermentação das bactérias da microbiota. É descrito na literatura que encontramos naturalmente uma concentração de 10mM de lactato no nosso intestino (Errea et al., 2016) e que sua administração por via oral apresenta efeitos antiinflamatórios (Watanabe et al., 2009). Além disso, sabe-se que a microbiota também é capaz de produzir ácidos graxos de cadeia curta, conhecidos como acetato, propionato e butirato, e que sua

concentração intestinal normal é em média 60:20:20mM (acetato:propionato:butirato) (Iraporda et al., 2015). Esses compostos são capazes de modular funções celulares através da inibição da atividade desacetilase em histonas e afeta a transcrição gênica através da ativação dos receptores acoplados à proteínas G (“sensores metabólicos”) (Macia et al., 2015). A administração desses metabólitos produzidos por algumas bactérias da microbiota por via oral também apresentam efeitos antiinflamatórios em diversos modelos de doença (Macia et al., 2015; Watanabe et al., 2009).

Inicialmente investigamos se tais ácidos orgânicos estavam alterados nas fezes dos camundongos através do método de HPLC. Animais naive que receberam apenas o tratamento com a bactéria apresentaram aumento na concentração de acetato, lactato, butirato e propionato nas fezes (**Figuras 20A-D**). Porém, observamos que a concentração de acetato reduziu nos grupos OVA+NCDO e OVA+Lactato submetidos ao protocolo de TO em comparação ao grupo salina (**Figura 20A**). Por outro lado, a concentração de propionato e de lactato aumentaram nesses grupos em comparação ao grupo salina (**Figura 20B e 11D**). Não houve alterações nas concentrações de butirato em nenhum grupo submetido ao protocolo de TO (**Figura 20C**).

Uma hipótese para esse resultado é que o perfil da microbiota intestinal é modulado de forma que estimule o crescimento das bactérias que consomem acetato e daquelas que produzem propionato e lactato (MOENS et al, 2017).

Analizamos a produção de ácidos orgânicos pela própria *L. lactis* NCDO2118 em seu meio de cultura (**Figura 20E-G**) para verificar se ela por si só já consegue ter um efeito anti-inflamatório, sem levar em consideração sua influência na modulação da microbiota intestinal. Foi observado redução na concentração de acetato (**Figura 20E**) e aumento no lactato do meio (**Figura 20F**). Não foram encontrados níveis de butirato e propionato no meio. Esse resultado indica que provavelmente a *L. lactis* consome acetato do meio para realizar a sua fermentação e produzir lactato, porém não produz butirato ou propionato.

Observamos que, se administrada em camundongos naive, a bactéria tem o papel de aumentar a concentração dos ácidos orgânicos intestinais através da modulação da microbiota, gerando um ambiente anti-inflamatório. Já na presença do antígeno OVA, a *L. lactis* NCDO2118 tem a capacidade de modular a microbiota de forma diferente, provavelmente levando a sobrevivência de um perfil microbiano que

consome acetato e produz propionato e lactato. Provavelmente esse perfil está relacionado com o papel tolerogênico da *L. lactis* NCDO2118. Serão necessárias mais análises para confirmar essa hipótese.

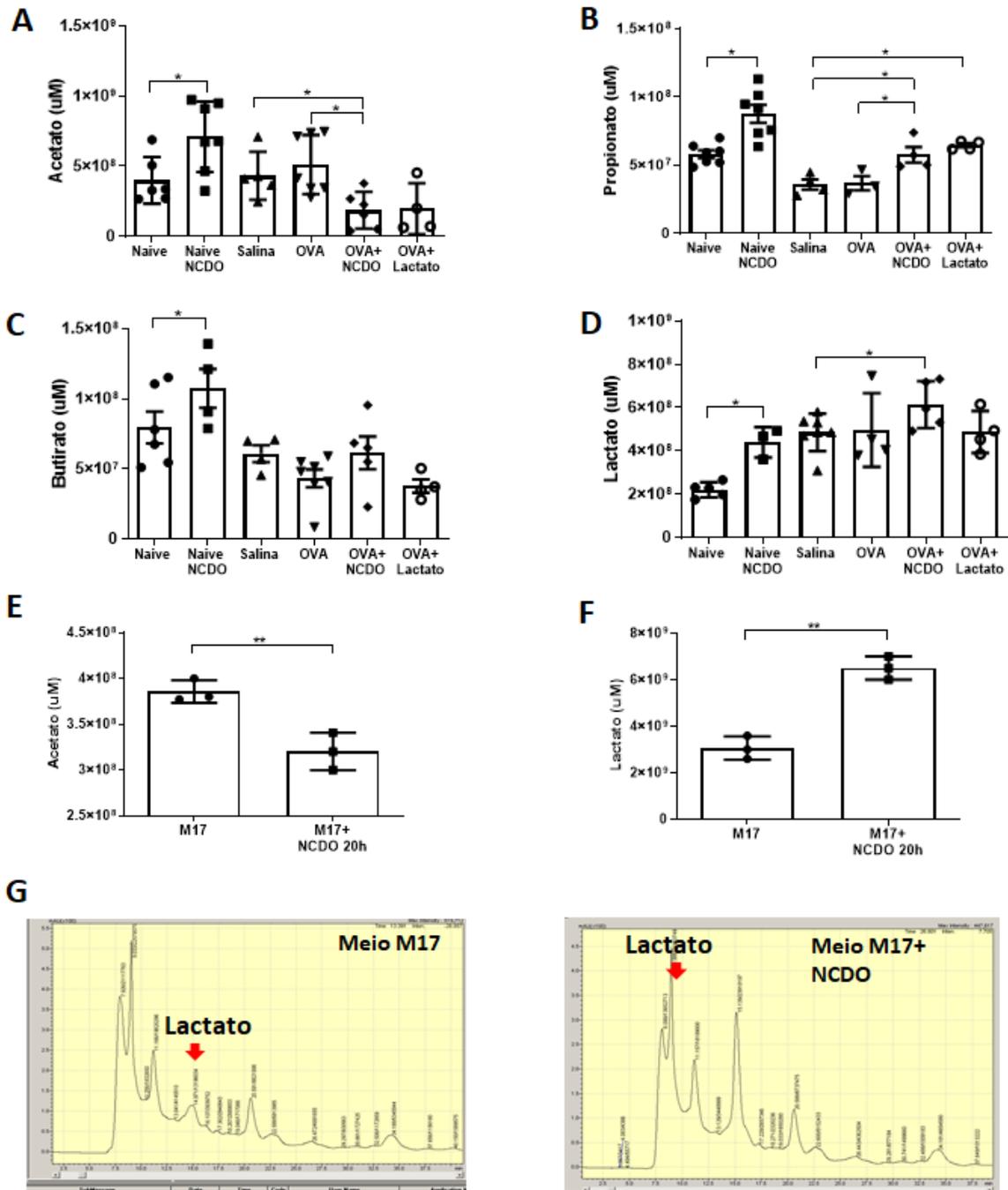


Figura 20. Análise de ácidos orgânicos nas fezes e meios seletivos de bactérias intestinais. Animais submetidos ao protocolo de TO a OVA. O grupo naive consistiu de animais não manipulados. O grupo Naive NCDO2118 foram animais naive que receberam a bactéria na mamadeira por 4 dias como única intervenção. O grupo salina recebeu gavagem de solução salina e foi imunizado. O

grupo OVA recebeu gavagem de OVA e foi imunizado. O grupo OVA+NCDO2118 recebeu administração da bactéria *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO2118 na mamadeira durante 4 dias, uma gavagem com 5mg de OVA/animal, posteriormente, foi imunizado. O grupo OVA+Lactato recebeu 50mM de lactato na mamadeira ad libitum antes da gavagem de OVA. Todos os animais foram eutanasiados no 28º dia. As barras representam a média + erro padrão da média (e.p.m). (n= 5) da absorvância obtida ou da somatória das absorvâncias. A significância da diferença entre os grupos foi calculada pelo teste ANOVA. **P= 0,05; *P <0,1. **(A-D)** Análise da concentração de ácidos orgânicos foi feita por HPLC. Concentração de **(A)** acetato, **(B)** propionato, **(C)** butirato e **(D)** lactato no extrato das fezes dos animais. Concentração de **(E)** acetato e **(F)** lactato presentes no meio de cultivo da *L. lactis* NCDO2118 após 20h de crescimento, comparado com o meio M17 sem a presença de *L. lactis* NCDO2118. Não foram encontrados valores para butirato e propionato nesta análise. **(G)** Desenho representativo demonstrando a curva da HPLC com o pico do lactato.

4.9- Tratamento com *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO2118 melhorou parâmetros da alergia alimentar a OVA

Ao observarmos papel adjuvante da *L. lactis* NCDO2118 na TO, avaliamos esse efeito em modelo de alergia alimentar a OVA.

Camundongos receberam administração de *L. lactis* na mamadeira durante 4 dias e ao final do quarto dia, uma gavagem de OVA foi dada aos animais. Após 3 dias da administração do antígeno, foram realizadas 2 imunizações com intervalo de 2 semanas entre elas. 1 semana após a ultima imunização, os animais foram desafiados oralmente com solução contendo clara de ovo 20%. Os animais foram eutanasiados ao final do desafio oral (**Figura 21A**). O grupo salina recebeu apenas solução salina por gavagem e, posteriormente, as imunizações. O grupo OVA recebeu apenas a OVA por gavagem e as imunizações. Já o grupo OVA+NCDO recebeu todo o protocolo completo. O grupo naive foi utilizado como um controle negativo, no qual os animais beberam água durante todo o experimento e não sofreram nenhuma intervenção

A administração de *L.lactis* NCDO2118 associada à OVA reduziu o nível de IgE total e IgG1 total no soro dos camundongos (**Figuras 21B-C**) se comparados ao grupo salina, confirmando seu efeito adjuvante. A frequência das células Treg LAP⁺ (**Figura 21D**) aumentaram, enquanto Foxp3⁺ (**Figura 21E**) não alteraram em grupos tratados com a bactéria. Esses dados indicam potente efeito da bactéria na supressão da alergia alimentar.

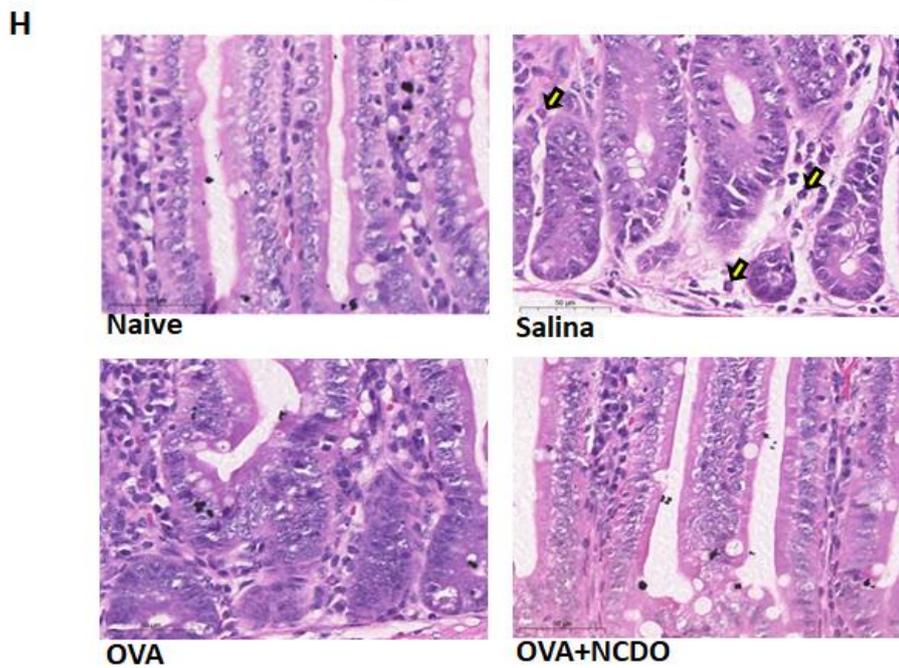
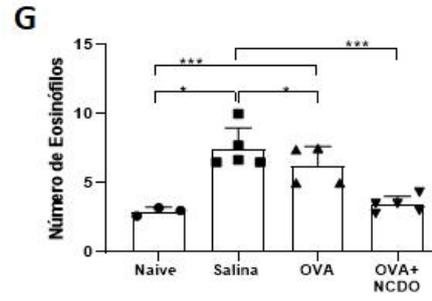
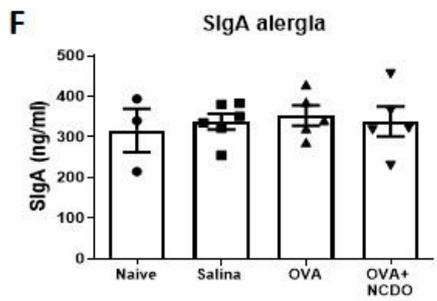
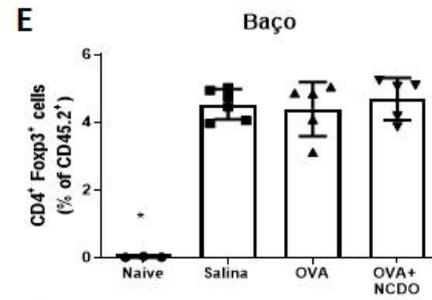
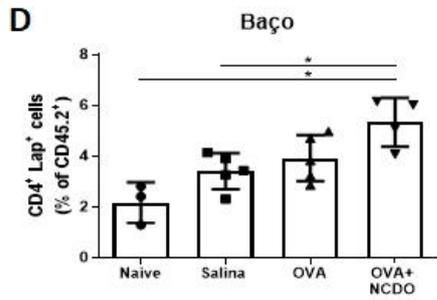
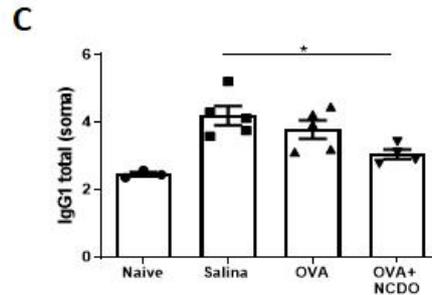
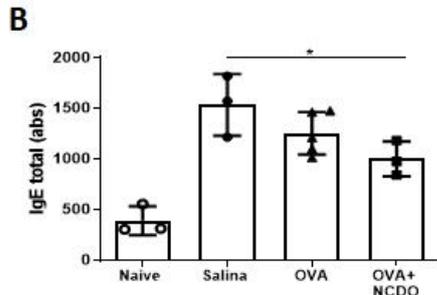
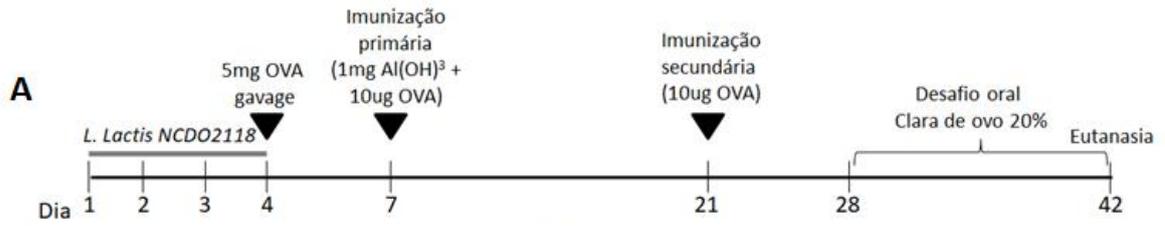


Figura 21. Análise do efeito adjuvante da *L. lactis* NCDO2118 na indução de tolerância oral em modelo de alergia alimentar a OVA. Camundongos C57BL/6 foram imunizados i.p. com 10ug de OVA + 1mg de Al(OH)₃, 14 dias depois receberam imunização secundária: 10ug de OVA + 200ul de salina. Após 7 dias foram submetidos a desafio oral com solução de clara de ovo 10% e eutanaziados após 2 semanas de desafio oral. O grupo naive consistiu de animais não manipulados. O grupo salina recebeu gavagem de solução salina. O grupo OVA recebeu uma gavagem de OVA. O grupo OVA+NCDO2118 recebeu administração da bactéria *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO2118 durante 4 dias Mais 1 gavagem de OVA. Todos os grupos foram imunizados e desafiados exceto o grupo naive. **(A)** Protocolo experimental de alergia alimentar a OVA. **(B)** Níveis de IgE total e **(C)** IgG1 total no soro dos animais medidas por ELISA. **(D)** Frequência de células Treg CD4⁺LAP⁺ e **(E)** CD4⁺Foxp3⁺ medidas no baço dos animais por Citometria de Fluxo. **(F)** Concentração de SIgA no soro medida por ELISA. **(G)** Número de eosinófilos mensurados na histologia de intestino delgado. **(H)** Imagens representativas das lâminas histológicas em HE do intestino delgado em aumento de 40x. Setas demonstram eosinófilos presentes. As barras representam a média + erro padrão da média (e.p.m). (n= 5) da absorvância obtida ou da somatória das absorvâncias. A significância da diferença entre os grupos foi calculada pelo teste ANOVA. *P<0,1

É descrito na literatura que alguns probióticos têm a capacidade de aumentar a Imunoglobulina A secretória (SIgA) (Santos Rocha et al., 2014). A SIgA é responsável por se ligar a antígenos e microorganismos patogênicos e aprisioná-los ao muco para prevenir seu contato direto com as células epiteliais intestinais gerando uma resposta pró-inflamatória (Oliver Pabst, 2012). O tratamento com a bactéria não alterou concentrações de SIgA. **(Figura 21F)**.

Um dos parâmetros inflamatórios descritos no modelo de alergia alimentar é a presença de infiltrado eosinofílico no tecido (Saldanha et al., 2004).

Para avaliar o efeito da *L. lactis* NCDO2118 nesse parâmetro, foi realizada a contagem dessas células na mucosa intestinal dos animais no aumento de 40X. Após o desafio antigênico, os animais do grupo Salina desafiados com a OVA tinham um infiltrado de eosinófilos maior dos outros grupos, demonstrando a presença de alergia alimentar a OVA. Animais tratados com *L. lactis* associada à OVA previamente ao protocolo de alergia alimentar tiveram redução significativa dos eosinófilos na mucosa intestinal **(Figura 21G)**. Lâminas histológicas demonstram esse resultado **(Figura 21H)**

Concluimos então que a *L.lactis* NCDO2118 é uma potente adjuvante da TO, podendo ser usada também na prevenção de alergia alimentar a OVA.

5. DISCUSSÃO

Inicialmente testamos o impacto modulador da bactéria *L.lactis* NCDO2118 em modelo experimental de colite induzida por DSS. Nesse modelo, observamos que a *L. lactis* teve um efeito anti-inflamatório significativo melhorando os sinais clínicos gerais da doença como a perda de peso, a diarreia e o sangramento nas fezes, e melhorando a permeabilidade intestinal. O alvo do nosso estudo, no entanto, era estudar a capacidade dessa bactéria em otimizar a indução de TO. Observamos que além do seu efeito anti-inflamatório, a bactéria teve um efeito tolerogênico, pois sua administração em conjunto com o antígeno (OVA) potencializou a supressão humoral específica para OVA além de atuar aumentando a frequência de CDs com fenótipo tolerogênico e células Treg na mucosa intestinal. Quando a bactéria foi administrada sozinha sem a presença do antígeno por via oral, não houve efeito na supressão humoral, o que indica que apenas o seu papel anti-inflamatório não foi capaz de gerar TO a OVA. Portanto, é importante que entendamos que existem diferenças entre o efeito anti-inflamatório e o efeito tolerogênico para compreendermos como a *L. lactis* atua.

A inflamação é uma resposta imune frente a uma lesão ou a uma infecção. Se exacerbada, ela contribui para desenvolvimento de diversas doenças e é caracterizada por estimular diversas células e moléculas como células efectoras, produção de citocinas inflamatórias, produção de diversos mediadores e agentes inflamatórios. O efeito anti-inflamatório é caracterizado por modulação da resposta imune inflamatória atenuando mecanismos que causariam doença. Ele é desencadeado pela produção de células reguladoras, citocinas e agentes anti-inflamatórios que reduzem sinais clínicos de doenças. O efeito anti-inflamatório possui curta duração e é inespecífico, ou seja, não envolve a administração de antígeno oral (Medzhitov, 2008).

Já o efeito tolerogênico é a supressão sistêmica e duradoura da imunidade humoral e celular específica para o antígeno. O efeito tolerogênico envolve principalmente a ação de células apresentadoras de antígenos e a produção de células T reguladoras induzidas através da administração prévia de um antígeno proteico (A.M.C. Faria & Weiner, 1999; Weiner et al., 2011). O efeito tolerogênico

pode ser potencializado quando um adjuvante é administrado juntamente com o antígeno por via oral.

Isso explica o porquê no modelo de TO a OVA, a *L. lactis* foi uma adjuvante da TO, pois quando administradas juntas (*L. lactis*+OVA), ocorreu uma potencialização da supressão da resposta celular e humoral antígeno específica. Já no modelo de colite, claramente o papel anti-inflamatório da *L. lactis* ocorreu enquanto a doença estava acontecendo, sem necessitar de um antígeno específico.

O efeito adjuvante da *L. lactis* NCDO2118 tem sido estudado, pelo nosso grupo e por colaboradores, em alguns modelos como encefalomielite autoimune experimental (Rezende et al., 2013), artrite (Gusmao-Silva et al., 2020), colite (Gomes-Santos et al., 2017), infecção por *Leishmania braziliensis* (Guerra et al., 2021) administrado juntamente com a proteína HSP65 e em modelo de GVHD (Mercadante et al., 2014), administrado juntamente com um aloantígeno.

A TO tem um grande potencial de utilização terapêutica nas doenças inflamatórias intestinais, hipersensibilidades alimentares e doenças autoimunes em humanos já que: (1) é uma forma potente de induzir Treg; (2) não apresenta toxicidade ou os efeitos colaterais comuns à maioria dos imunossuppressores utilizados na prática clínica; (3) é um protocolo de fácil administração; e (4) mais de um antígeno funciona para a mesma doença se ele for originado do mesmo tecido alvo (Ana M.C. Faria & Weiner, 2006; Pinheiro-Rosa et al., 2021). Apesar de tantos benefícios, ainda existem algumas dificuldades para implantação da TO na prática clínica (Mestecky et al., 1996), já que a dose do antígeno deve ser alta para se atingir a tolerização e nós não conseguimos tolerizar bem indivíduos já sensibilizados e que já desenvolveram a doença. A TO é uma alternativa importante para prevenção dessas doenças, mas ela ainda apresenta problemas reais para a sua utilização como tratamento. Portanto, é importante encontrarmos protocolos otimizados para potencializarmos a indução de TO. A utilização de agentes adjuvantes como a *L. lactis* surge como uma opção promissora nesse cenário.

No presente trabalho utilizamos o antígeno OVA para confirmarmos o efeito adjuvante da *L. lactis* NCDO2118 na indução de TO e estudarmos os componentes da bactéria responsáveis por esse efeito assim como os mecanismos pelos quais ela atua.

Uma das hipóteses explicativas para o efeito adjuvante da *L. lactis* é o local onde ela se aloja durante o tempo em que permanece no lumen intestinal (48-72

horas). Foi demonstrado que a principal região onde a TO é induzida no intestino é o duodeno, onde ocorre a drenagem de antígenos pelos vasos linfáticos que os conduzem aos linfonodos duodenais e induz preferencialmente a diferenciação de células Treg (Esterházy et al., 2019). Também já foi descrito que as bactérias lácticas da microbiota intestinal se alojam nessa região do intestino (De Filippis et al., 2020). Além disto, experimentos com *L. lactis* marcada com GFP mostram que ela se localiza preferencialmente nessa porção do intestino delgado (duodeno) por até 48 horas após sua ingestão (Mancha-Agresti et al., 2017). Sendo assim, a localização preferencial da *L. lactis* no duodeno, onde ocorre também a absorção de proteínas como a OVA, poderia ser um dos fatores que contribuiria na geração de uma resposta tolerogênica originada ali. Esses dados sugerem que o efeito da *L. lactis* pode envolver a geração de CDs tolerogênicas e células Treg na região proximal do intestino (duodeno e jejuno).

Os resultados obtidos em camundongos naive que receberam exclusivamente a *L. lactis* NCDO2118 demonstraram também que o tempo e o momento que a bactéria atua são importantes para seu efeito adjuvante. No estudo utilizando a *L. lactis* marcada com GFP, foi observado que 72 horas depois não foi mais possível encontrar bactéria no intestino. Isso significa que a *L. lactis* deixa o intestino após atuar no local durante 2 dias (Mancha-Agresti et al., 2017). Sabendo disso, administramos a *L. lactis* durante 4 dias por via oral aos camundongos, que foram eutanasiados 24 dias depois, ou seja, num momento onde as bactérias não se encontravam mais presentes. Tentamos assim mimetizar um protocolo que pudesse ser comparado aos protocolos de indução de TO, nos quais os camundongos são eutanasiados no 28º dia.

De fato, observamos que a administração da *L. lactis* NCDO2118 se associa ao aumento na frequência de CDs com fenótipo tolerogênico, $CD11b^-CD103^+$, nos linfonodos que drenam a região do jejuno. Esterházy e colaboradores demonstraram que as células dendríticas clássicas migratórias $CD103^+CD11b^-$ e $CD11b^+$ são essenciais para o desenvolvimento da TO. Dentre essas células, as CDs $CD11b^-$ induzem eficientemente a diferenciação de células Treg $CD4^+Foxp3^+$ nos MLN após a administração oral de antígeno e a depleção das DCs $CD11b^-$ dependentes de IRF8 impedem a diferenciação dessas Treg (Esterházy et al., 2019). Por outro lado, os macrófagos $CX3CR1^+$ presentes na LP intestinal são células importantes na manutenção da homeostase da mucosa intestinal criando um ambiente tolerogênico

para a ação das CDs pela produção de IL-10 (Bernshtein et al., 2019; Rivollier et al., 2012). A depleção específica das células CX3CR1⁺ da mucosa intestinal inibe a indução de TO (Kim et al., 2018). Além disto, já foi demonstrado que macrófagos CX3CR1⁺ presentes na LP do intestino são capazes de lançar dendritos para o lumen do intestino, captar ativamente antígenos e transferí-los para CDs tolerogências (CD11c⁺CD11b⁻CD103⁺) que migram para os MLNs onde produzem TGF- β e ácido retinoico e participam da diferenciação de linfócitos T com perfil regulador (Coombes et al., 2007; Jang et al., 2006; Mazzini et al., 2014). O aumento na frequência de CDs CD11b-CD103⁺ tolerogências nos MLN que drenam o jejuno assim como de macrófagos CX3CR1⁺ na LP do intestino após a administração de *L.lactis* NCDO2118 em camundongos naive sugerem que a ação da bactéria nessas células pode ser um dos mecanismos envolvidos no seu efeito adjuvante da TO .

Após administração exclusiva de *L. lactis*, houve também o aumento de ILC2. Essas células linfoides inatas do tipo 2 são muito abundantes na mucosa intestinal, elas secretam IL-4 e IL-13 e têm um papel crítico na alergia e nas respostas imunes a helmintos intestinais. Elas também secretam amphiregulina, uma molécula envolvida em reparo tecidual e na modulação do ambiente intestinal para um perfil resolutivo e regulador (Arpaia et al., 2015).

Esses dados demonstram que os efeitos que a *L. lactis* gera no intestino são duradouros e mesmo sem a sua presença, 24 dias depois, ainda verificamos alterações nas populações intestinais importantes para TO. Assim, a *L.lactis* NCDO2118 parece atuar em células da imunidade inata presentes no intestino favorecendo a indução de respostas anti-inflamatórias e tolerogências. Além disso, é importante ressaltar que, nos experimentos onde testamos a TO, a *L. lactis* não está presente no intestino no momento das imunizações, o que indica que a supressão humoral ocorre não pela presença de *L. lactis*, mas por seus efeitos duradouros gerados no lumen do intestino. É possível que esses efeitos envolvam a modulação da microbiota e os metabólitos produzidos tanto pela *L. lactis* quanto por essa microbiota no intestino, como discutiremos adiante.

Apesar de existirem estudos demonstrando que camundongos *germ free* conseguem desenvolver normalmente a TO (Walton et al., 2006), acreditamos que uma microbiota balanceada facilita o desenvolvimento TO. Nossos dados demonstram que a administração da *L.lactis* NCDO2118 promove um equilíbrio na razão F/B da microbiota e a modulação em algumas espécies bacterianas

demonstrando que a *L. lactis* tem um efeito benéfico na homeostase da microbiota intestinal. Esse efeito se reflete na produção de metabólitos microbianos pelas bactérias autóctones, reduzindo a concentração de acetato e aumentando a produção de lactato e propionato.

A administração da bactéria sozinha gera alterações diferentes na microbiota do que aquelas observadas quando ela é administrada em associação com o protocolo de indução de TO. Observamos que o filo Firmicutes e os gêneros *Enterococcus* e *Lactobacillus* estão aumentados em camundongos naive que ingeriram exclusivamente a bactéria, mas estão reduzidos quando tratados com *L. lactis* e submetidos ao protocolo de TO. Enquanto isso, o filo Bacteroidetes está aumentado apenas em camundongos tratados com *L. lactis* e submetidos ao protocolo de TO a OVA. Isso indica diferenças entre o efeito anti-inflamatório e o efeito adjuvante/tolerogênico da *L. lactis*. O tratamento oral com a OVA e as imunizações apresentam, eles mesmos, a capacidade de alterar a microbiota. No presente estudo, podemos observar que a alteração do perfil da microbiota intestinal e seus metabólitos, como o lactato, auxiliam a indução de TO.

Encontramos uma concentração de acetato reduzida tanto no meio de crescimento da *L. lactis* quanto nas fezes de camundongos tratados com *L. lactis* e submetidos à TO. Nossa hipótese é que bactérias produtoras de acetato podem estar reduzidas ou que bactérias que consomem acetato podem estar aumentadas no ambiente intestinal por influência direta ou indireta da *L. lactis*. Sabemos que bactérias intestinais são capazes de utilizar o acetato do meio para produzir butirato e outras utilizam o lactato do meio para produzir acetato ou propionato (Ríos-Covián et al., 2016). Sabe-se também que a maioria do acetato intestinal é produzido por bactérias acetogênicas (Louis et al., 2014; Miller & Wolin, 1996). Essas bactérias são anaeróbias estritas. Ao avaliar o crescimento de microorganismos por meios seletivos em anaerobiose, não observamos alteração entre os grupos, o que indica que a redução de acetato nas fezes pode ter ocorrido não pela redução nesse perfil bacteriano, mas sim pelo aumento de bactérias que consomem acetato. Estudos *in vitro* tem evidenciado a utilização de acetato por *Faecalibacterium prausnitzii* e *Roseburia sp.* (Duncan et al., 2002, 2004). Essas bactérias podem estar aumentadas em camundongos do grupo tratado com OVA e *L.lactis* NCDO2118 concomitantemente. Sabemos também que bactérias do gênero *Bifidobacteria* produzem acetato e lactato (Fukuda et al., 2011) e esse pode ser um gênero

modulado no lumen intestinal de camundongos que receberam *L. lactis* submetidos à TO

Além disso, é descrito que mecanismos de “*cross-feeding*” podem acontecer no lumen intestinal, ou seja, quando uma bactéria utiliza em seu metabolismo produtos finais originados do metabolismo de outra bactéria, existindo então uma relação mutualística (Belenguer et al., 2006; Flint et al., 2007). Estudos demonstram que bactérias do gênero *Veillonella* e *Propionibacterium* são capazes de transformar lactato em propionato *in vitro*. (Ríos-Covián et al., 2016). Esses podem ser alguns perfis bacterianos que estão alterados, já que observamos aumento no propionato das fezes de camundongos do grupo tratado com OVA e *L.lactis* NCDO2118 (OVA+NCDO). Foi demonstrado que, em condições fisiológicas, a concentração de lactato no lumen intestinal é baixa por causa da *Eubacterium hallii*, que é capaz de converter lactato em outros SCFAs (Flint et al., 2014). Portanto, esta seria uma bactéria que pode estar reduzida nas fezes de camundongos tratados com *L. Lactis* no modelo de TO, já que observamos aumento no lactato das fezes de camundongos desse grupo.

A abundância de bactérias do filo Bacteroidetes tem sido ligada ao aumento na concentração de propionato (Salonen et al., 2014), corroborando os dados encontrados aqui: o aumento na concentração de propionato e o aumento na abundância do filo Bacteroidetes nas fezes de camundongos do grupo OVA+NCDO. Bacteroidetes têm a capacidade de converter succinato em propionato (Salonen et al., 2014), o que sugere que a via do succinato também pode estar envolvida no papel adjuvante do *L. lactis*. Um estudo demonstrou que o succinato, um metabólito presente no lúmen intestinal, atua aumentando as células tuft que, de forma indireta, estimulam a proliferação de ILC2 através da citocina IL25 (Schneider et al., 2018). Observamos no presente estudo que a frequência de ILC2 está aumentada na LP de camundongos tratados com *L. lactis*. Como já mencionamos, as ILC2 são células inatas importantes para o reparo e remodelamento tecidual através da produção de anfiregulina e de IL-13 que estimula as células tronco intestinais a se diferenciarem em células epiteliais de diferentes perfis (Schneider et al., 2018). Além disso, experimentos com organoides demonstraram que, na presença de lactato, as células tronco intestinais Lgr5⁺ estão aumentadas, demonstrando o efeito desse ácido orgânico também na recomposição do epitélio (Y. S. Lee et al., 2018). Portanto, o lactato, por sua ação tanto nas células imunes inatas como as ILC2, nas células

tronco epiteliais do intestino e em outras células epiteliais intestinais pode contribuir também para a modulação do ambiente intestinal para um perfil tolerogênico contribuindo para a indução eficiente de TO. Acreditamos que serão necessários mais estudos para entendermos melhor esse papel.

Além de ser encontrado o aumento na concentração de lactato no meio de cultivo da bactéria, o que já se esperava por ela ser uma LAB, foi encontrado também redução na concentração de acetato. Apesar de sabermos que o acetato não está na via de produção do lactato (Ríos-Covián et al., 2016), sugerimos que a *L.lactis* utiliza o acetato do meio como produto para seu metabolismo, mas não para conversão em lactato.

O lactato é o principal metabólito produzido pela *L. lactis*. Observamos um aumento na concentração desse metabólito nas fezes de camundongos submetidos ao protocolo de TO tratados com *L. lactis*. Após administrarmos lactato na concentração de 50mM por via oral associado à OVA aos camundongos, potencializamos a indução de TO, indicando que esse ácido orgânico tem, em si, um bom efeito adjuvante.

Observamos um aumento na expressão dos receptores de lactato GPR81 e GPR31 no intestino de camundongos do grupo tratado com OVA e *L.lactis* NCDO, enquanto camundongos naive tratados com *L. lactis* não apresentaram diferenças estatisticamente significativas na expressão desses dois receptores. Esses dados indicam que esses receptores estão envolvidos no papel adjuvante/tolerogênico da *L. lactis*, mas que a administração de OVA e a imunização posterior com OVA em Al(OH)₃ são importantes na indução do aumento desses receptores.

GPR31 é o receptor acoplado à proteína G mais expresso em macrófagos residentes CX3CR1⁺ da LP intestinal (Morita et al., 2019). Um estudo identificou que, na presença de lactato, esses macrófagos aumentam a expressão de GPR31 e a protusão transepitelial dos seus dendritos no intestino, captando mais antígenos do lúmen (Morita et al., 2019). No presente estudo, observamos que a frequência dessas células imunes está aumentada paralelamente ao aumento de expressão de GPR31 no intestino de camundongos do grupo OVA+NCDO. Nossa hipótese, tendo em vista esses resultados, é que as concentrações aumentadas de lactato produzido pela *L.lactis* NCDO2118 e pela própria microbiota modificada podem estar modulando a expressão de GPR31 tornando os macrófagos mais aptos a lançar seus dendritos no lúmen e captar a OVA. É também possível que o aumento na

expressão do receptor GPR81 ocorra não somente nos macrófagos residentes, mas também nas CDs CD103⁺ modificando positivamente seu perfil tolerogênico. Outros estudos são necessários para confirmar essa hipótese.

GPR81 é altamente expresso nas células do tecido adiposo e menos expresso no intestino e em algumas células imunes inatas como macrófagos e CDs (Errea et al., 2016; Hoque et al., 2014; Ranganathan et al., 2018). Apesar disso, sua expressão no intestino é suficiente para conferir um papel crítico de proteção contra a inflamação intestinal. Camundongos geneticamente deficientes em GPR81 apresentam maior susceptibilidade ao desenvolvimento de colite induzida por DSS (Ranganathan et al., 2018). Foi com base nessa informação que decidimos avaliar o papel desse receptor na indução de TO, administrando o antagonista e o agonista de GPR81 por via oral previamente à gavagem com OVA. Em consonância com os dados da literatura sobre o papel anti-inflamatório de GPR81, observamos que a TO é inibida após bloqueio de GPR81 com seu antagonista, mesmo na presença de *L. lactis*, e a TO é induzida com o estímulo de GPR81 através do agonista juntamente com a administração oral de OVA mesmo na ausência de *L. lactis*. Esses dados demonstram a importância do lactato e seu receptor nos efeitos tolerogênicos da *L. lactis* NCDO2118. Destacamos que o papel de GPR31 pode ser complementar ao do GPR81 na TO, tendo em vista que cada receptor estimula mecanismos celulares diferentes.

Finalmente, decidimos avaliar o efeito adjuvante da *L. lactis* em um modelo de alergia alimentar à OVA para confirmar o seu papel em uma doença inflamatória. Observamos que a administração de uma dose subótima de OVA, incapaz de induzir TO, foi eficaz, quando administrada em conjunto com *L. lactis* NCDO2118, na supressão de IgE e IgG1 anti OVA, na indução do aumento da frequência de células Treg LAP⁺ e na melhora nos parâmetros histológicos da inflamação intestinal (número de eosinófilos), indicando menor resposta alérgica nos camundongos que ingeriram OVA+NCDO. Futuros experimentos com modelos de doenças autoimunes sistêmicas como artrite poderiam auxiliar na confirmação do papel adjuvante da *L. lactis*.

6. CONCLUSÃO

Concluimos, com o presente estudo, que a *L. lactis* NCDO2118 atua como adjuvante da TO à OVA e que o seu efeito adjuvante está associada ao aumento da frequência de CD tolerogênicas, macrófagos residentes e células Treg importantes para a TO em regiões proximais do intestino e em linfonodos mesentéricos que drenam essas regiões. Além disto, a administração de *L. lactis* NCDO2118 modula a microbiota intestinal podendo ser este um mecanismo importante no seu papel adjuvante. O lactato, metabólito produzido pela *L. lactis*, tem efeito adjuvante similar à bactéria na tolerância oral e a expressão do receptor de lactato GPR81 é essencial para esse efeito adjuvante na indução de TO.

Todos esses mecanismos contribuem para o estabelecimento da TO e caracterizam a *L. lactis* como adjuvante da TO.

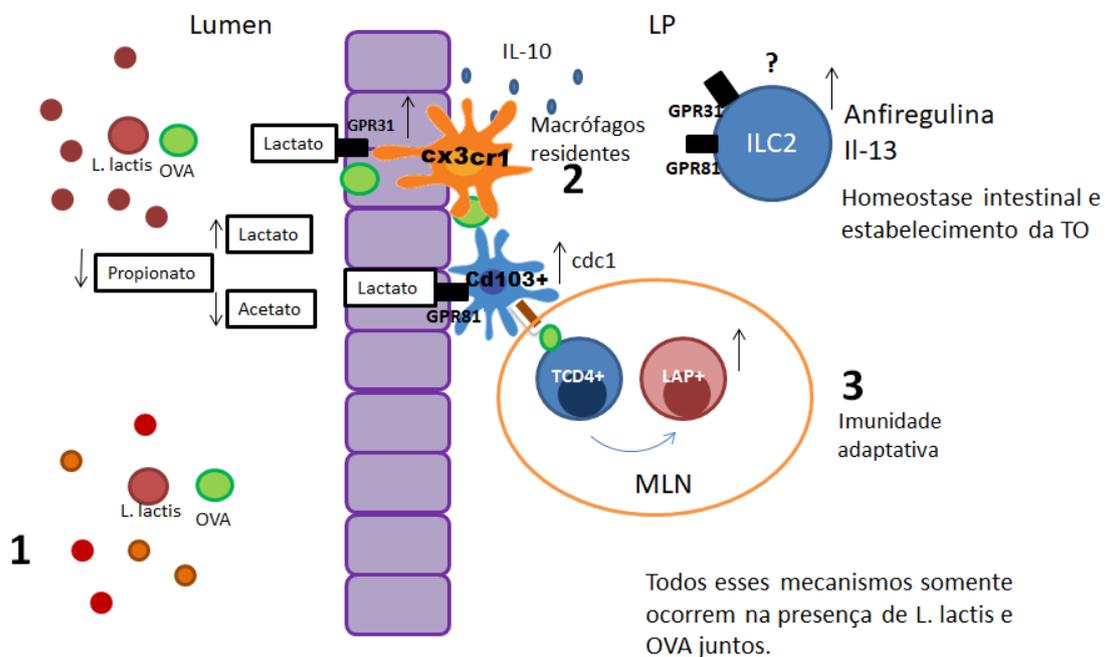


Figura 22. Resumo gráfico da hipótese de trabalho e dos resultados. *L. lactis* NCDO2118 ingerida juntamente com a OVA altera o perfil microbiano intestinal e modula a produção de propionato, acetato, butirato e lactato. O ácido orgânico mais produzido é o lactato, que se liga a receptores GPR31 nos macrófagos residentes $CX3CR1^+$ os tornando mais aptos a captar a OVA do lumen através de seus dendritos. Esses macrófagos processam e entregam a OVA às CDs tolerogênicas $Cd103^+CD11b^-$ presentes na LP. Essas CDs que também apresentam receptores de

lactato (GPR81), migram para os MLN e apresentam a OVA processada aos linfócitos Tnaive que se diferenciam em TregLAP⁺. As ILC2 também estão aumentadas na LP e podem ter uma função de homeostase intestinal, porém seu papel ainda não está bem esclarecido.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, C. A. (2010). The probiotic paradox: Live and dead cells are biological response modifiers. *Nutrition Research Reviews*, 23(1), 37–46.
<https://doi.org/10.1017/S0954422410000090>
- Andrade, M. C., Menezes, J. S., Cassali, G. D., Martins-Filho, O. A., Cara, D. C., & Faria, A. M. C. (2006). Alcohol-induced gastritis prevents oral tolerance induction in mice. *Clinical and Experimental Immunology*, 146(2), 312–322.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03207.x>
- Arpaia, N., Campbell, C., Fan, X., Dikiy, S., van der Veeke, J., DeRoos, P., Liu, H., Cross, J. R., Pfeffer, K., Coffey, P. J., & Rudensky, A. Y. (2013). Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*, 504(7480), 451–455. <https://doi.org/10.1038/nature12726>
- Arpaia, N., Green, J. A., Molledo, B., Arvey, A., Hemmers, S., Yuan, S., Treuting, P. M., & Rudensky, A. Y. (2015). A Distinct Function of Regulatory T Cells in Tissue Protection. *Cell*, 162(5), 1078–1089. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.021>
- Asseman, C., Mauze, S., Leach, M. W., Coffman, R. L., & Powrie, F. (1999). An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, 190(7), 995–1003.
<https://doi.org/10.1084/jem.190.7.995>
- Azad, M. A. K., Sarker, M., Li, T., & Yin, J. (2018). Probiotic Species in the Modulation of Gut Microbiota: An Overview. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9478630>
- Belenguer, A., Duncan, S. H., Calder, A. G., Holtrop, G., Louis, P., Lopley, G. E., & Flint, H. J. (2006). Two routes of metabolic cross-feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and butyrate-producing anaerobes from the human gut. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3593–3599.
<https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3593-3599.2006>
- Berlec, A., Zadavec, P., Jevnikar, Z., & Štrukelj, B. (2011). Identification of candidate

- carrier proteins for surface display on *Lactococcus lactis* by theoretical and experimental analyses of the surface proteome. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(4), 1292–1300. <https://doi.org/10.1128/AEM.02102-10>
- Bernshtein, B., Curato, C., Ioannou, M., Thaïss, C. A., Gross-Vered, M., Kolesnikov, M., Wang, Q., David, E., Chappell-Maor, L., Harmelin, A., Elinav, E., Thakker, P., Papayannopoulos, V., & Jung, S. (2019). IL-23-producing IL-10R α -deficient gut macrophages elicit an IL-22-driven proinflammatory epithelial cell response. *Science Immunology*, 4(36). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aau6571>
- Billingham, R. E., Brent, L., & Medawar, P. B. (1953). Actively Acquired Tolerance of Foreign Cells. *Nature Publishing Group*, 172(4379).
- Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarme, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D., & Sorokin, A. (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Research*, 11(5), 731–753. <https://doi.org/10.1101/gr.GR-1697R>
- Brandtzaeg, P. (2009). Mucosal Immunity : Induction , Dissemination , and Effector Functions. *Scandinavian Journal of Immunology*, 70, 505–515. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2009.02319.x>
- Brandtzaeg, Per. (1998). Development and basic mechanisms of human gut immunity. *Nutrition Reviews*, 56(1 II). <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01645.x>
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2017). Probióticos: construção da lista de linhagens probióticas. *Anvisa*, 1–14. http://portal.anvisa.gov.br/documents/3845226/0/Análise+das+Linhagens+de+Pr+obióticos__23042018.pdf/6e37da13-2151-4330-85b0-0f449dbb0e95
- Burnet, S. M. (1959). Clonal Selection Theory of Acquired Immunity. In *The Vanderbilt and Cambridge University Presses* (Vol. 200).
- Cao, X., Cai, S. F., Fehniger, T. A., Song, J., Collins, L. I., Piwnicka-Worms, D. R., & Ley, T. J. (2007). Granzyme B and Perforin Are Important for Regulatory T Cell-Mediated Suppression of Tumor Clearance. *Immunity*, 27(4), 635–646.

<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.08.014>

- Cavanagh, D., Fitzgerald, G. F., & McAuliffe, O. (2015). From field to fermentation: The origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment. *Food Microbiology*, *47*, 45–61. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.001>
- Charlet, R., Bortolus, C., Barbet, M., Sendid, B., & Jawhara, S. (2018). A decrease in anaerobic bacteria promotes *Candida glabrata* overgrowth while β -glucan treatment restores the gut microbiota and attenuates colitis 06 Biological Sciences 0605 Microbiology. *Gut Pathogens*, *10*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13099-018-0277-2>
- Cohen, I. R., & Young, D. B. (1991). Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. *Immunology Today*, *12*(4), 105–110. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(91\)90093-9](https://doi.org/10.1016/0167-5699(91)90093-9)
- Coombes, J. L., & Powrie, F. (2008). Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nature Reviews Immunology*, *8*(6), 435–446. <https://doi.org/10.1038/nri2335>
- Coombes, J. L., Siddiqui, K. R. R., Arancibia-Cárcamo, C. V., Hall, J., Sun, C. M., Belkaid, Y., & Powrie, F. (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF- β -and retinoic acid-dependent mechanism. *Journal of Experimental Medicine*, *204*(8), 1757–1764. <https://doi.org/10.1084/jem.20070590>
- Cooper, H. S., Murthy, S. N., Shah, R. S., & Sedergran, D. J. (1993). Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, *69*(2), 238–249. <http://europepmc.org/abstract/MED/8350599>
- Crabbé, P. A., Bazin, H., Eyssen, H., & Heremans, J. F. (1968). The Normal Microbial Flora as a Major Stimulus for Proliferation of Plasma Cells Synthesizing IgA in the Gut. *International Archives of Allergy and Immunology*, *34*(4), 362–375. <https://doi.org/10.1159/000230130>
- Curotto de Lafaille, M. A., Kutchukhidze, N., Shen, S., Ding, Y., Yee, H., & Lafaille, J. J. (2008). Adaptive Foxp3+ Regulatory T Cell-Dependent and -Independent

- Control of Allergic Inflammation. *Immunity*, 29(1), 114–126.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.05.010>
- Da cunha, A. P., Wu, H. Y., Rezende, R. M., Vandeventer, T., & Weiner, H. L. (2015). In Vivo anti-LAP mAb enhances IL-17/IFN- γ responses and abrogates anti-CD3-induced oral tolerance. *International Immunology*, 27(2), 73–82.
<https://doi.org/10.1093/intimm/dxu083>
- da Silva Menezes, J., de Sousa Mucida, D., Cara, D. C., Alvarez-Leite, J. I., Russo, M., Vaz, N. M., & Caetano de Faria, A. M. (2003). Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system. *International Immunology*, 15(3), 447–455. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxg043>
- De Filippis, F., Pasolli, E., & Ercolini, D. (2020). The food-gut axis: Lactic acid bacteria and their link to food, the gut microbiome and human health. *FEMS Microbiology Reviews*, 44(4), 454–489. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa015>
- De Moreno De Leblanc, A., Del Carmen, S., Chatel, J. M., Miyoshi, A., Azevedo, V., Langella, P., Bermúdez-Humarán, L. G., & Leblanc, J. G. (2015). Current Review of Genetically Modified Lactic Acid Bacteria for the Prevention and Treatment of Colitis Using Murine Models. *Gastroenterology Research and Practice*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/146972>
- Denning, T. L., Wang, Y. C., Patel, S. R., Williams, I. R., & Pulendran, B. (2007). Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nature Immunology*, 8(10), 1086–1094. <https://doi.org/10.1038/ni1511>
- Diniz, S. O. F., Barbosa, A. J. A., Araújo, I. D., Nelson, D. L., Machado, L. A. da S., Filho, M. B., & Cardoso, V. N. (2005). Assessment of bacterial translocation in obstructive jaundice using Tc-99m Escherichia coli. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(SPECIAL ISS. 2), 45–49. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132005000700006>
- Donohue, D. C., & Gueimonde, M. (2011). Some considerations for the safety of novel probiotic bacteria. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, Fourth Edition*, 423–438. <https://doi.org/10.1201/b11503-25>

- Duncan, S. H., Barcenilla, A., Stewart, C. S., Pryde, S. E., & Flint, H. J. (2002). Acetate utilization and butyryl coenzyme A (CoA): Acetate-CoA transferase in butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(10), 5186–5190. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.5186-5190.2002>
- Duncan, S. H., Louis, P., & Flint, H. J. (2004). Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(10), 5810–5817. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.5810-5817.2004>
- Edwards, J. P., Thornton, A. M., & Shevach, E. M. (2014). Release of Active TGF- β 1 from the Latent TGF- β 1/GARP Complex on T Regulatory Cells Is Mediated by Integrin β 8. *The Journal of Immunology*, *193*(6), 2843–2849. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401102>
- Errea, A., Cayet, D., Marchetti, P., Tang, C., Kluza, J., Offermanns, S., Sirard, J.-C., & Rumbo, M. (2016). Lactate Inhibits the Pro-Inflammatory Response and Metabolic Reprogramming in Murine Macrophages in a GPR81-Independent Manner. *Plos One*, *11*(11), e0163694. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163694>
- Esterházy, D., Canesso, M. C., Mesin, L., Muller, P. A., Castro, T. B. de, Lockhart, A., ElJalby, M., Faria, A. M., & Mucida, D. (2019). Compartmentalized gut lymph node drainage dictates adaptive immune responses. *Nature*, *569*(7754), 126–130. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1125-3>
- FAO/WHO. (2002). *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. 1–11.
- Faria, A.M.C., Mucida, D., McCafferty, D.-M., Tsuji, N. M., & Verhasselt, V. (2012). Tolerance and Inflammation at the Gut Mucosa. *Clinical and Developmental Immunology*, *2012*, 1–3. <https://doi.org/10.1155/2012/738475>
- Faria, A.M.C., & Weiner, H. L. (1999). Oral tolerance: Mechanisms and therapeutic applications. *Advances in Immunology*, *73*, 153–264. <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L29300430>

- Faria, Ana M.C., & Weiner, H. L. (2006). Oral tolerance: Therapeutic implications for autoimmune diseases. *Clinical and Developmental Immunology*, 13(2–4), 143–157. <https://doi.org/10.1080/17402520600876804>
- Faria, Ana M C, & Weiner, H. L. (2005). *Oral tolerance Immunological activities in the gut mucosa*. 206, 232–259.
- Faria, Ana Maria Caetano, Gomes-santos, A. C., Gonçalves, J. L., Moreira, T. G., Medeiros, S. R., Dourado, L. P. A., & Cara, D. C. (2013). *Food components and the immune system : from tonic agents to allergens*. 4(May), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00102>
- Flint, H. J., Duncan, S. H., Scott, K. P., & Louis, P. (2007). Interactions and competition within the microbial community of the human colon: Links between diet and health: Minireview. *Environmental Microbiology*, 9(5), 1101–1111. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01281.x>
- Flint, H. J., Duncan, S. H., Scott, K. P., & Louis, P. (2014). Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism. *Proceedings of the Nutrition Society*, 760(December 2013), 13–22. <https://doi.org/10.1017/S0029665114001463>
- Förster, R., Davalos-Miszlitz, A. C., & Rot, A. (2008). CCR7 and its ligands: Balancing immunity and tolerance. *Nature Reviews Immunology*, 8(5), 362–371. <https://doi.org/10.1038/nri2297>
- Frossard, C. P., Steidler, L., & Eigenmann, P. A. (2007). Oral administration of an IL-10-secreting *Lactococcus lactis* strain prevents food-induced IgE sensitization. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119(4), 952–959. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.12.615>
- Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Tobe, T., Clarke, J. M., Topping, D. L., Suzuki, T., Taylor, T. D., Itoh, K., Kikuchi, J., Morita, H., Hattori, M., & Ohno, H. (2011). Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*, 469(7331), 543–549. <https://doi.org/10.1038/nature09646>

- Gasbarrini, G., Bonvicini, F., & Gramenzi, A. (2016). Probiotics History. *Journal of Clinical Gastroenterology*, *50*(December), S116–S119.
<https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000697>
- Generoso, S. D. V., Rodrigues, N. M., Trindade, L. M., Paiva, N. C., Cardoso, V. N., Carneiro, C. M., Ferreira, A. V. D. M., Faria, A. M. C., & Maioli, T. U. (2015). Dietary supplementation with omega-3 fatty acid attenuates 5-fluorouracil induced mucositis in mice. *Lipids in Health and Disease*, *14*(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1186/s12944-015-0052-z>
- Gomes-Santos, A. C., de Oliveira, R. P., Moreira, T. G., Castro-Junior, A. B., Horta, B. C., Lemos, L., de Almeida, L. A., Rezende, R. M., Cara, D. C., Oliveira, S. C., Azevedo, V. A. C., Miyoshi, A., & Faria, A. M. C. (2017). Hsp65-producing *Lactococcus lactis* prevents inflammatory intestinal disease in mice by IL-10- and TLR2-dependent pathways. *Frontiers in Immunology*, *8*(JAN), 1–12.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00030>
- Gomes-Santos, A. C., Moreira, T. G., Castro-Junior, A. B., Horta, B. C., Lemos, L., Cruz, D. N., Guimarães, M. A. F., Cara, D. C., McCafferty, D. M., & Faria, A. M. C. (2012). New insights into the immunological changes in IL-10-deficient mice during the course of spontaneous inflammation in the gut mucosa. *Clinical and Developmental Immunology*, *2012*. <https://doi.org/10.1155/2012/560817>
- Guerra, P. V., Andrade, C. M., Nunes, I. V., Gama, B. C., Tibúrcio, R., Santos, W. L. C., Azevedo, V. A., Tavares, N. M., Rebouças, J. de S., Maiolii, T. U., Faria, A. M. C., & Brodskyn, C. I. (2021). Oral Tolerance Induced by Heat Shock Protein 65-Producing *Lactococcus lactis* Mitigates Inflammation in *Leishmania braziliensis* Infection. *Frontiers in Immunology*, *12*(June), 1–15.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.647987>
- Guimarães, M. A. F., Pinheiro-Rosa, N., Oliveira, R. P., Aguiar, S. L. F., Miranda, M. C. G., Santos, L. L., Souza, A. L., Reis, D. S., Medeiros, S. R., Gonçalves, W. A., Amaral, S. S., Miyoshi, A., Azevedo, V. A. Z., Rezende, R. M., & Faria, A. M. C. (2021). Hsp65-producing *Lactococcus lactis* inhibits experimental autoimmune encephalomyelitis by preventing cell migration into spinal cord. *Submetido à Revista Immunology*.

- Gusmao-Silva, G., Aguiar, S. L. F., Miranda, M. C. G., Guimarães, M. A., Alves, J. L., Vieira, A. T., Cara, D. C., Miyoshi, A., Azevedo, V. A., Oliveira, R. P., & Faria, A. M. C. (2020). Hsp65-Producing *Lactococcus lactis* Prevents Antigen-Induced Arthritis in Mice. *Frontiers in Immunology*, *11*(September), 1–15.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.562905>
- Handel, A. E., Irani, S. R., & Holländer, G. A. (2018). The role of thymic tolerance in CNS autoimmune disease. *Nature Reviews Neurology*, *14*(12), 723–734.
<https://doi.org/10.1038/s41582-018-0095-7>
- Helander, H. F., & Fändriks, L. (2014). Surface area of the digestive tract-revisited. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, *49*(6), 681–689.
<https://doi.org/10.3109/00365521.2014.898326>
- Herzenberg, L. A., Tung, J., Moore, W. A., Herzenberg, L. A., & Parks, D. R. (2006). Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed - Supplementary Information. *Nature Immunology*, *7*(7), 681–685.
- Hoque, R., Farooq, A., Ghani, A., Gorelick, F., & Mehal, W. Z. (2014). Lactate Reduces Liver and Pancreatic Injury in Toll-Like Receptor– and Inflammasome-Mediated Inflammation via GPR81-Mediated Suppression of Innate Immunity. *Gastroenterology*, *146*(7), 1763–1774.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.03.014>
- Houston, S. A., Cerovic, V., Thomson, C., Brewer, J., Mowat, A. M., & Milling, S. (2016). The lymph nodes draining the small intestine and colon are anatomically separate and immunologically distinct. *Mucosal Immunology*, *9*(2), 468–478.
<https://doi.org/10.1038/mi.2015.77>
- Inobe, J. I., Slavin, A. J., Komagata, Y., Chen, Y., Liu, L., & Weiner, H. L. (1998). IL-4 is a differentiation factor for transforming growth factor- β secreting Th3 cells and oral administration of IL-4 enhances oral tolerance in experimental allergic encephalomyelitis. *European Journal of Immunology*, *28*(9), 2780–2790.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199809\)28:09<2780::AID-IMMU2780>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199809)28:09<2780::AID-IMMU2780>3.0.CO;2-J)
- Iraporda, C., Errea, A., Romanin, D. E., Cayet, D., Pereyra, E., Pignataro, O., Sirard,

- J. C., Garrote, G. L., Abraham, A. G., & Rumbo, M. (2015). Lactate and short chain fatty acids produced by microbial fermentation downregulate proinflammatory responses in intestinal epithelial cells and myeloid cells. *Immunobiology*, *220*(10), 1161–1169. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2015.06.004>
- Ishida, T., Yokota, A., Umezawa, Y., Toda, T., & Yamada, K. (2005). Identification and characterization of lactococcal and Acetobacter strains isolated from traditional Caucasian fermented milk. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, *51*(3), 187–193. <https://doi.org/10.3177/jnsv.51.187>
- Jang, A. S., Park, S. W., Ahn, M. H., Park, J. S., Kim, D. J., Lee, J. H., & Park, C. S. (2006). Impact of circulating TGF- β and IL-10 on T cell cytokines in patients with asthma and tuberculosis. *Journal of Korean Medical Science*, *21*(1), 30–34. <https://doi.org/10.3346/jkms.2006.21.1.30>
- Joeris, T., Müller-Luda, K., Agace, W. W., & Mowat, A. M. I. (2017). Diversity and functions of intestinal mononuclear phagocytes. *Mucosal Immunology*, *10*(4), 845–864. <https://doi.org/10.1038/mi.2017.22>
- Kang, O. H., Kim, D. K., Choi, Y. A., Park, H. J., Jin, T., Kang, C. S., Choi, S. C., Nah, Y. H., Lee, H. K., & Lee, Y. M. (2006). Suppressive effect of non-anaphylactogenic anti-IgE antibody on the development of dextran sulfate sodium-induced colitis. *International Journal of Molecular Medicine*, *18*(5), 893–899. <https://doi.org/10.3892/ijmm.18.5.893>
- Kelsall, B. (2008). Recent progress in understanding the phenotype and function of intestinal dendritic cells and macrophages. *Mucosal Immunology*, *1*(6), 460–469. <https://doi.org/10.1038/mi.2008.61>
- Kim, M., Galan, C., Hill, A. A., Wu, W.-J., Fehlner-Peach, H., Song, H. W., Schady, D., Bettini, M. L., Simpson, K. W., Longman, R. S., Littman, D. R., & Diehl, G. E. (2018). Critical Role for the Microbiota in CX3CR1+ Intestinal Mononuclear Phagocyte Regulation of Intestinal T Cell Responses. *Immunity*, *49*(1), 151-163.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.05.009>
- Klose, C. S. N., & Artis, D. (2016). Innate lymphoid cells as regulators of immunity,

- inflammation and tissue homeostasis. *Nature Immunology*, *17*(7), 765–774.
<https://doi.org/10.1038/ni.3489>
- Koliada, A., Syzenko, G., Moseiko, V., Budovska, L., Puchkov, K., Perederiy, V., Gavalko, Y., Dorofeyev, A., Romanenko, M., Tkach, S., Sineok, L., Lushchak, O., & Vaiserman, A. (2017). Association between body mass index and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population. *BMC Microbiology*, *17*(1), 4–9. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1027-1>
- Lee, Y. S., Kim, T. Y., Kim, Y., Lee, S. H., Kim, S., Kang, S. W., Yang, J. Y., Baek, I. J., Sung, Y. H., Park, Y. Y., Hwang, S. W., Eunju, O., Kim, K. S., Liu, S., Kamada, N., Gao, N., & Kweon, M. N. (2018). Microbiota-Derived Lactate Accelerates Intestinal Stem-Cell-Mediated Epithelial Development. *Cell Host and Microbe*, *24*(6), 833-846.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.11.002>
- Lee, Z. M. P., Bussema, C., & Schmidt, T. M. (2009). rrn DB: Documenting the number of rRNA and tRNA genes in bacteria and archaea. *Nucleic Acids Research*, *37*(SUPPL. 1), 489–493. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn689>
- Li, M. O., Wan, Y. Y., & Flavell, R. A. (2007). T Cell-Produced Transforming Growth Factor- β 1 Controls T Cell Tolerance and Regulates Th1- and Th17-Cell Differentiation. *Immunity*, *26*(5), 579–591.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.03.014>
- Louis, P., Hold, G. L., & Flint, H. J. (2014). The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nature Reviews Microbiology*, *12*(10), 661–672.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro3344>
- Luerce, T. D., Gomes-Santos, A. C., Rocha, C. S., Moreira, T. G., Cruz, D. N., Lemos, L., Sousa, A. L., Pereira, V. B., De Azevedo, M., Moraes, K., Cara, D. C., Leblanc, J. G., Azevedo, V., Faria, A. M. C., & Miyoshi, A. (2014). Anti-inflammatory effects of *Lactococcus lactis* NCDO 2118 during the remission period of chemically induced colitis. *Gut Pathogens*, *6*(1), 1–11.
<https://doi.org/10.1186/1757-4749-6-33>
- Macfarlane, G. T., & Macfarlane, S. (2012). Bacteria, Colonic Fermentation, and Gastrointestinal Health. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, *95*(1), 50–60.

https://doi.org/10.5740/jaoacint.SGE_Macfarlane

Macia, L., Tan, J., Vieira, A. T., Leach, K., Stanley, D., Luong, S., Maruya, M., Ian McKenzie, C., Hijikata, A., Wong, C., Binge, L., Thorburn, A. N., Chevalier, N., Ang, C., Marino, E., Robert, R., Offermanns, S., Teixeira, M. M., Moore, R. J., ... Mackay, C. R. (2015). Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome. *Nature Communications*, *6*, 1–15.

<https://doi.org/10.1038/ncomms7734>

Maioli, T. U., De Melo Silva, B., Dias, M. N., Paiva, N. C., Cardoso, V. N., Fernandes, S. O., Carneiro, C. M., Dos Santos Martins, F., & De Vasconcelos Generoso, S. (2014). Pretreatment with *Saccharomyces boulardii* does not prevent the experimental mucositis in Swiss mice. *Journal of Negative Results in BioMedicine*, *13*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1477-5751-13-6>

Mancha-Agresti, P., Drumond, M. M., Carmo, F. L. R. do, Santos, M. M., Santos, J. S. C. dos, Venanzi, F., Chatel, J. M., Leclercq, S. Y., & Azevedo, V. (2017). A New Broad Range Plasmid for DNA Delivery in Eukaryotic Cells Using Lactic Acid Bacteria: In Vitro and In Vivo Assays. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*, *4*(March), 83–91.

<https://doi.org/10.1016/j.omtm.2016.12.005>

Maslowski, K. M., Vieira, A. T., Ng, A., Kranich, J., Sierro, F., Di Yu, Schilter, H. C., Rolph, M. S., Mackay, F., Artis, D., Xavier, R. J., Teixeira, M. M., & Mackay, C. R. (2009). Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*, *461*(7268), 1282–1286.

<https://doi.org/10.1038/nature08530>

Maynard, C. L., Elson, C. O., Hatton, R. D., & Weaver, C. T. (2012). Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*, *489*(7415), 231–241. <https://doi.org/10.1038/nature11551>

Mazzini, E., Massimiliano, L., Penna, G., & Rescigno, M. (2014). Oral Tolerance Can Be Established via Gap Junction Transfer of Fed Antigens from CX3CR1+ Macrophages to CD103+ Dendritic Cells. *Immunity*, *40*(2), 248–261.

<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.12.012>

- McCafferty, D. M., Sihota, E., Muscara, M., Wallace, J. L., Sharkey, K. A., & Kubes, P. (2000). Spontaneously developing chronic colitis in IL-10/iNOS double-deficient mice. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 279(1 42-1), 90–99. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2000.279.1.g90>
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428–435. <https://doi.org/10.1038/nature07201>
- Melgar, S., Bjursell, M., Gerdin, A. K., Svensson, L., Michaëlsson, E., & Bohlooly-Y, M. (2007). Mice with experimental colitis show an altered metabolism with decreased metabolic rate. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 292(1), 165–172. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00152.2006>
- Mercadante, A. C. T., Perobelli, S. M., Alves, A. P. G., Gonçalves-Silva, T., Mello, W., Gomes-Santos, A. C., Miyoshi, A., Faria, A. M. C., & Bonomo, A. (2014). Oral Combined Therapy with Probiotics and Alloantigen Induces B Cell–Dependent Long-Lasting Specific Tolerance. *The Journal of Immunology*, 192(4), 1928–1937. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301034>
- Mestecky, J., Hussy, S., Moldoveanu, Z., Waldo, F. B., Van Den Wall Bake, A. W. L., & Elson, C. O. (1996). Induction of tolerance in humans: Effectiveness of oral and nasal immunization routes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 778, 194–201. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1996.tb21128.x>
- Miller, T. L., & Wolin, M. J. (1996). Pathways of acetate, propionate, and butyrate formation by the human fecal microbial flora. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(5), 1589–1592. <https://doi.org/10.1128/aem.62.5.1589-1592.1996>
- Mills, S., O'sullivan, O., Hill, C., Fitzgerald, G., & Ross, R. P. (2010). The changing face of dairy starter culture research: From genomics to economics. *International Journal of Dairy Technology*, 63(2), 149–170. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00563.x>
- Miranda, M. C. G., Oliveira, R. P., Torres, L., Aguiar, S. L. F., Pinheiro-Rosa, N.,

- Lemos, L., Guimarães, M. A., Reis, D., Silveira, T., Ferreira, Ê., Moreira, T. G., Cara, D. C., Maioli, T. U., Kelsall, B. L., Carlos, D., & Faria, A. M. C. (2019). Frontline Science: Abnormalities in the gut mucosa of non-obese diabetic mice precede the onset of type 1 diabetes. *Journal of Leukocyte Biology*, *106*(3), 513–529. <https://doi.org/10.1002/JLB.3HI0119-024RR>
- Morita, N., Umemoto, E., Fujita, S., Hayashi, A., Kikuta, J., Kimura, I., Haneda, T., Imai, T., Inoue, A., Mimuro, H., Maeda, Y., Kayama, H., Okumura, R., Aoki, J., Okada, N., Kida, T., Ishii, M., Nabeshima, R., & Takeda, K. (2019). GPR31-dependent dendrite protrusion of intestinal CX3CR1+ cells by bacterial metabolites. *Nature*, *566*(7742), 110–114. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0884-1>
- Mortha, A., Chudnovskiy, A., Hashimoto, D., Bogunovic, M., Spencer, S. P., Belkaid, Y., & Merad, M. (2014). Microbiota-Dependent Crosstalk Between Macrophages and ILC3 Promotes Intestinal Homeostasis. *Science*, *343*(6178), 1249288–1249288. <https://doi.org/10.1126/science.1249288>
- Mowat, A. M. I. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature Reviews Immunology*, *3*(4), 331–341. <https://doi.org/10.1038/nri1057>
- Mowat, A. M. I. (2018). To respond or not to respond - A personal perspective of intestinal tolerance. *Nature Reviews Immunology*, *18*(6), 405–415. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0002-x>
- Mucida, D., & Cheroutre, H. (2007). TGFbeta and retinoic acid intersect in immune-regulation. *Cell Adhesion & Migration*, *1*(3), 142–144. <https://doi.org/10.4161/cam.1.3.5062>
- Mucida, D., Kutchukhidze, N., Erazo, A., Russo, M., Lafaille, J. J., & Curotto De Lafaille, M. A. (2005). Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *Journal of Clinical Investigation*, *115*(7), 1923–1933. <https://doi.org/10.1172/JCI24487>
- Mucida, D., Park, Y., & Cheroutre, H. (2009). From the diet to the nucleus: Vitamin A and TGF-β join efforts at the mucosal interface of the intestine. *Seminars in*

Immunology, 21(1), 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2008.08.001>

Ochi, H., Abraham, M., Ishikawa, H., Frenkel, D., Yang, K., Basso, A. S., Wu, H., Chen, M. L., Gandhi, R., Miller, A., Maron, R., & Weiner, H. L. (2006). Oral CD3-specific antibody suppresses autoimmune encephalomyelitis by inducing CD4+CD25-LAP+ T cells. *Nature Medicine*, 12(6), 627–635. <https://doi.org/10.1038/nm1408>

Oida, T., & Weiner, H. L. (2010). TGF- β induces surface LAP expression on murine CD4 T cells independent of Foxp3 induction. *PLoS ONE*, 5(11), 5–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015523>

Okayasu, I. S. A. (1990). *Reliable Experimental Acute and Chronic. April*, 694–702.

Oliveira, L. C., Saraiva, T. D. L., Soares, S. C., Ramos, R. T. J., Sá, P. H. C. G., Carneiro, A. R., Miranda, F., Freire, M., Wendel, R., Júnior, A. F. O., Santos, A. R., Pinto, A. C., Souza, B. M., Castro, C. P., Diniz, C. A. A., Rocha, C. S., Mariano, D. C. B., Aguiar, E. L. de, Folador, E. L., ... Azevedo, V. (2014). Genome Sequence of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 2118, a GABA-Producing Strain. *Genome Announcements*, 2(5), 9–10. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00980-14.Copyright>

Oliveira, R. P., Santiago, A. F., Ficker, S. M., Gomes-Santos, A. C., & Faria, A. M. C. (2015). Antigen administration by continuous feeding enhances oral tolerance and leads to long-lasting effects. *Journal of Immunological Methods*, 421, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2015.02.005>

Östman, S., Rask, C., Wold, A. E., Hultkrantz, S., & Telemo, E. (2006). Impaired regulatory T cell function in germ-free mice. *European Journal of Immunology*, 36(9), 2336–2346. <https://doi.org/10.1002/eji.200535244>

Pabst, O., & Mowat, A. M. (2012). Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunology*, 5(3), 232–239. <https://doi.org/10.1038/mi.2012.4>

Pabst, Oliver. (2012). New concepts in the generation and functions of IgA. *Nature Reviews Immunology*, 12(12), 821–832. <https://doi.org/10.1038/nri3322>

- Papadimitriou, K., Pot, B., & Tsakalidou, E. (2015). How microbes adapt to a diversity of food niches. *Current Opinion in Food Science*, 2, 29–35.
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.01.001>
- Peng, L., Li, Z.-R., Green, R. S., Holzman, I. R., & Lin, J. (2009). Butyrate Enhances the Intestinal Barrier by Facilitating Tight Junction Assembly via Activation of AMP-Activated Protein Kinase in Caco-2 Cell Monolayers. *The Journal of Nutrition*, 139(9), 1619–1625. <https://doi.org/10.3945/jn.109.104638>
- Pessione, E. (2012). Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2(June), 86.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00086>
- Pinheiro-Rosa, N., Torres, L., de Almeida Oliveira, M., de Oliveira, M. F. A., de Freitas Guimaraes, M. A., Coelho, M. M., de Lima Alves, J., Maioli, T. U., & Faria, A. M. C. (2021). Oral tolerance as antigen-specific immunotherapy. *Immunotherapy Advances*, 1–20. <https://doi.org/10.1093/immadv/ltab017>
- Powrie, F., Leach, M. W., Mauze, S., Caddie, L. B., & Coffman, R. L. (1993). Phenotypically distinct subsets of cd4+t cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in c. B-17 scid mice. *International Immunology*, 5(11), 1461–1471. <https://doi.org/10.1093/intimm/5.11.1461>
- Price, J. D., Hotta-Iwamura, C., Zhao, Y., Beauchamp, N. M., & Tarbell, K. V. (2015). DCIR2+ cDC2 DCs and Zbtb32 restore CD4+ T-cell tolerance and inhibit diabetes. *Diabetes*, 64(10), 3521–3531. <https://doi.org/10.2337/db14-1880>
- Rachmilewitz, D., Katakura, K., Karmeli, F., Hayashi, T., Reinus, C., Rudensky, B., Akira, S., Takeda, K., Lee, J., Takabayashi, K., & Raz, E. (2004). Toll-Like Receptor 9 Signaling Mediates the Anti-inflammatory Effects of Probiotics in Murine Experimental Colitis. *Gastroenterology*, 126(2), 520–528.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2003.11.019>
- Ranganathan, P., Shanmugam, A., Swafford, D., Suryawanshi, A., Bhattacharjee, P., Hussein, M. S., Koni, P. A., Prasad, P. D., Kurago, Z. B., Thangaraju, M., Ganapathy, V., & Manicassamy, S. (2018). GPR81, a Cell-Surface Receptor for Lactate, Regulates Intestinal Homeostasis and Protects Mice from Experimental

Colitis. *The Journal of Immunology*, ji1700604.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700604>

- Rea, M. C., Dobson, A., O'Sullivan, O., Crispie, F., Fouhy, F., Cotter, P. D., Shanahan, F., Kiely, B., Hill, C., & Paul Ross, R. (2011). Effect of broad- and narrow-spectrum antimicrobials on *Clostridium difficile* and microbial diversity in a model of the distal colon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(SUPPL. 1), 4639–4644.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1001224107>
- Rezende, R. M., Oliveira, R. P., Medeiros, S. R., Gomes-Santos, A. C., Alves, A. C., Loli, F. G., Guimarães, M. A. F., Amaral, S. S., da Cunha, A. P., Weiner, H. L., Azevedo, V., Miyoshi, A., & Faria, A. M. C. (2013). Hsp65-producing *Lactococcus lactis* prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice by inducing CD4+LAP+ regulatory T cells. *Journal of Autoimmunity*, 40(February), 45–57. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2012.07.012>
- Rezende, R. M., & Weiner, H. L. (2017). History and mechanisms of oral tolerance. *Seminars in Immunology*, 30(July), 3–11.
<https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.07.004>
- Ríos-Covián, D., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Gueimonde, M., De los Reyes-Gavilán, C. G., & Salazar, N. (2016). Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. *Frontiers in Microbiology*, 7(FEB), 1–9.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00185>
- Rivollier, A., He, J., Kole, A., Valatas, V., & Kelsall, B. L. (2012). Inflammation switches the differentiation program of Ly6chi monocytes from antiinflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in the colon. *Journal of Experimental Medicine*, 209(1), 139–155. <https://doi.org/10.1084/jem.20101387>
- Rizzo, L. V., Morawetz, R. A., Miller-Rivero, N. E., Choi, R., Wiggert, B., Chan, C. C., Morse, H. C., Nussenblatt, R. B., & Caspi, R. R. (1999). IL-4 and IL-10 are both required for the induction of oral tolerance. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162(5), 2613–26122.
- Round, J. L., O'Connell, R. M., & Mazmanian, S. K. (2010). Coordination of

- tolerogenic immune responses by the commensal microbiota. *Journal of Autoimmunity*, 34(3). <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2009.11.007>
- Sakaguchi, S. (2004). Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annual Review of Immunology*, 22, 531–562. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141122>
- Saldanha, J. C. S., Gargiulo, D. L., Silva, S. S., Carmo-Pinto, F. H., Andrade, M. C., Alvarez-Leite, J. I., Teixeira, M. M., & Cara, D. C. (2004). A model of chronic IgE-mediated food allergy in ovalbumin-sensitized mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37(6), 809–816. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2004000600005>
- Salonen, A., Lahti, L., Salojärvi, J., Holtrop, G., Korpela, K., Duncan, S. H., Date, P., Farquharson, F., Johnstone, A. M., Lobley, G. E., Louis, P., Flint, H. J., & De Vos, W. M. (2014). Impact of diet and individual variation on intestinal microbiota composition and fermentation products in obese men. *ISME Journal*, 8(11), 2218–2230. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.63>
- Sanders, M. (2009). How do we know when something called “probiotic” is really a probiotic? A guideline for consumers and health care professionals. *Functional Food Reviews*, 1(1), 3–12. <https://doi.org/10.2310/6180.2009.00002>
- Santos Rocha, C., Gomes-Santos, A. C., Garcias Moreira, T., De Azevedo, M., Diniz Luerce, T., Mariadassou, M., Longaray Delamare, A. P., Langella, P., Maguin, E., Azevedo, V., De Faria, A. M. C., Miyoshi, A., & Van De Guchte, M. (2014). Local and systemic immune mechanisms underlying the anti-colitis effects of the dairy bacterium *Lactobacillus delbrueckii*. *PLoS ONE*, 9(1), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085923>
- Saurer, L., & Mueller, C. (2009). T cell-mediated immunoregulation in the gastrointestinal tract. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 64(4), 505–519. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2009.01965.x>
- Schneider, C., O’Leary, C. E., von Moltke, J., Liang, H. E., Ang, Q. Y., Turnbaugh, P. J., Radhakrishnan, S., Pellizzon, M., Ma, A., & Locksley, R. M. (2018). A

- Metabolite-Triggered Tuft Cell-ILC2 Circuit Drives Small Intestinal Remodeling. *Cell*, 174(2), 271-284.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.014>
- Scott, C. L., Aumeunier, A. M., & Mowat, A. M. I. (2011). Intestinal CD103 + dendritic cells: Master regulators of tolerance? *Trends in Immunology*, 32(9), 412–419. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.06.003>
- Shevach, E. M. (2009). Mechanisms of Foxp3+ T Regulatory Cell-Mediated Suppression. *Immunity*, 30(5), 636–645. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.04.010>
- Shevach, E. M., & Thornton, A. M. (2014). tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. *Immunological Reviews*, 259(1), 88–102. <https://doi.org/10.1111/imr.12160>
- Slavin, A. J., Maron, R., & Weiner, H. L. (2001). Mucosal administration of IL-10 enhances oral tolerance in autoimmune encephalomyelitis and diabetes. *International Immunology*, 13(6), 825–833. <https://doi.org/10.1093/intimm/13.6.825>
- Smith, P. D., Smythies, L. E., Shen, R., Greenwell-Wild, T., Gliozzi, M., & Wahl, S. M. (2011). Intestinal macrophages and response to microbial encroachment. *Mucosal Immunology*, 4(1), 31–42. <https://doi.org/10.1038/mi.2010.66>
- Smole, U., Schabussova, I., Pickl, W. F., & Wiedermann, U. (2017). Murine models for mucosal tolerance in allergy. *Seminars in Immunology*, 30, 12–27. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.07.007>
- Song, C., Lee, J. S., Gilfillan, S., Robinette, M. L., Newberry, R. D., Stappenbeck, T. S., Mack, M., Cella, M., & Colonna, M. (2015). Unique and redundant functions of NKp46+ ILC3s in models of intestinal inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, 212(11), 1869–1882. <https://doi.org/10.1084/jem.20151403>
- Spahn, T. W., Weiner, H. L., Rennert, P. D., Lügering, N., Domschke, W., & Kucharzik, T. (2002). Mesenteric lymph nodes are critical for the induction of high-dose oral tolerance in the absence of Peyer ' s patches. 1109–1113.

- Steidler, L., Hans, W., Schotte, L., Neiryneck, S., Obermeier, F., Falk, W., Fiers, W., & Remaut, E. (2000). Treatment of Murine Colitis by *Lactococcus lactis* Secreting Interleukin-10. *Science*, *289*(5483), 1352–1355.
<https://doi.org/10.1126/science.289.5483.1352>
- Stiles, M. E., & Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, *36*(1), 1–29.
[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(96\)01233-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(96)01233-0)
- Stoddard, S. F., Smith, B. J., Hein, R., Roller, B. R. K., & Schmidt, T. M. (2015). rrnDB: Improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development. *Nucleic Acids Research*, *43*(D1), D593–D598. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1201>
- Stojanov, S., Berlec, A., & Štrukelj, B. (2020). The influence of probiotics on the firmicutes/bacteroidetes ratio in the treatment of obesity and inflammatory bowel disease. *Microorganisms*, *8*(11), 1–16.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8111715>
- Takada, Y., Hisamatsu, T., Kamada, N., Kitazume, M. T., Honda, H., Oshima, Y., Saito, R., Takayama, T., Kobayashi, T., Chinen, H., Mikami, Y., Kanai, T., Okamoto, S., & Hibi, T. (2010). Monocyte Chemoattractant Protein-1 Contributes to Gut Homeostasis and Intestinal Inflammation by Composition of IL-10–Producing Regulatory Macrophage Subset. *The Journal of Immunology*, *184*(5), 2671–2676. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804012>
- Tsuchiya, K., Siddiqui, S., Risse, P. A., Hirota, N., & Martin, J. G. (2012). The presence of LPS in OVA inhalations affects airway inflammation and AHR but not remodeling in a rodent model of asthma. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, *303*(1), 6–7.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00208.2011>
- Van Der Waaij, L. A., Limburg, P. C., Mesander, G., & Van Der Waaij, D. (1996). In vivo IgA coating of anaerobic bacteria in human faeces. *Gut*, *38*(3), 348–354.
<https://doi.org/10.1136/gut.38.3.348>
- Vaz, N. M., Maia, L. C. S., Hanson, D. G., & Lynch, J. M. (1977). Inhibition of

- homocytotropic antibody responses in adult inbred mice by previous feeding of the specific antigen. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 60(2), 110–115. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(77\)90035-5](https://doi.org/10.1016/0091-6749(77)90035-5)
- Vieira, A. T., Macla, L., Galvão, I., Martins, F. S., Canesso, M. C. C., Amaral, F. A., Garcia, C. C., Maslowski, K. M., De Leon, E., Shim, D., Nicoli, J. R., Harper, J. L., Teixeira, M. M., & MacKay, C. R. (2015). A role for gut microbiota and the metabolite-sensing receptor GPR43 in a murine model of gout. *Arthritis and Rheumatology*, 67(6), 1646–1656. <https://doi.org/10.1002/art.39107>
- Vivier, E., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J. P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R. M., McKenzie, A. N. J., Mebius, R. E., Powrie, F., & Spits, H. (2018). Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell*, 174(5), 1054–1066. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.017>
- Walton, K. L. W., Galanko, J. A., Balfour Sartor, R., & Fisher, N. C. (2006). T cell-mediated oral tolerance is intact in germ-free mice. *Clinical and Experimental Immunology*, 143(3), 503–512. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03019.x>
- Watanabe, T., Nishio, H., Tanigawa, T., Yamagami, H., Okazaki, H., Watanabe, K., Tominaga, K., Fujiwara, Y., Oshitani, N., Asahara, T., Nomoto, K., Higuchi, K., Takeuchi, K., & Arakawa, T. (2009). Probiotic *Lactobacillus casei* strain Shirota prevents indomethacin-induced small intestinal injury: Involvement of lactic acid. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 297(3), 506–513. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.90553.2008>
- Wegmann, U., O'Connell-Motherway, M., Zomer, A., Buist, G., Shearman, C., Canchaya, C., Ventura, M., Goesmann, A., Gasson, M. J., Kuipers, O. P., Van Sinderen, D., & Kok, J. (2007). Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *Journal of Bacteriology*, 189(8), 3256–3270. <https://doi.org/10.1128/JB.01768-06>
- Weiner, H. L., da Cunha, A. P., Quintana, F., & Wu, H. (2011). Oral tolerance. *Immunological Reviews*, 241(1), 241–259. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01017.x>
- Weiss, J. M., Bilate, A. M., Gobert, M., Ding, Y., de Lafaille, M. A. C., Parkhurst, C.

- N., Xiong, H., Dolpady, J., Frey, A. B., Ruocco, M. G., Yang, Y., Floess, S., Huehn, J., Oh, S., Li, M. O., Niec, R. E., Rudensky, A. Y., Dustin, M. L., Littman, D. R., & Lafaille, J. J. (2012). Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosagenerated induced Foxp3+ T reg cells. *Journal of Experimental Medicine*, 209(10), 1723–1742. <https://doi.org/10.1084/jem.20120914>
- Williamson, E., Bilsborough, J. M., & Viney, J. L. (2002). Regulation of Mucosal Dendritic Cell Function by Receptor Activator of NF- κ B (RANK)/RANK Ligand Interactions: Impact on Tolerance Induction. *The Journal of Immunology*, 169(7), 3606–3612. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.7.3606>
- Worbs, T., Bode, U., Yan, S., Hoff, M. W., Hintzen, G., Bernhardt, G., Förster, R., & Pabst, O. (2006). *Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells*. 203(3), 519–527. <https://doi.org/10.1084/jem.20052016>
- Zeng, B., Shi, S., Ashworth, G., Dong, C., Liu, J., & Xing, F. (2019). ILC3 function as a double-edged sword in inflammatory bowel diseases. *Cell Death and Disease*, 10(4). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1540-2>