

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia

Ana Clara Matoso Montuori de Andrade

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS PROTETORES DE *Lactobacillus delbrueckii* UFV-
H2b20 EM MODELO EXPERIMENTAL DE ASPERGILOSE PULMONAR**

Belo Horizonte

2021

Ana Clara Matoso Montuori de Andrade

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS PROTETORES DE *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 EM MODELO EXPERIMENTAL DE ASPERGILOSE PULMONAR

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Leda Quercia Vieira

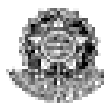
Orientadora: Dr^a. Liliane Martins dos Santos

Coorientador: Prof. Dr. Frederico Marianetti Soriani

Belo Horizonte

2021

- 043 Andrade, Ana Clara Matoso Montuori de.
Avaliação dos efeitos protetores de *Lactobacillus delbrueckii* UFVH2b20 em modelo experimental de aspergilose pulmonar [manuscrito] / Ana Clara Matoso Montuori de Andrade. - 2021.
113 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientadoras: Prof^a. Dr^a. Leda Quercia Vieira; Dr^a. Liliane Martins dos Santos.
Coorientador: Prof. Dr. Frederico Marianetti Soriani.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.
1. Bioquímica e imunologia. 2. *Lactobacillus delbrueckii*. 3. Probióticos. 4. Linfócitos T Reguladores. 5. *Aspergillus fumigatus*. 6. Neutrófilos. 7. Espécies de Oxigênio Reativas. I. Vieira, Leda Quercia. II. Santos, Liliane Martins dos. III. Soriani, Frederico Marianetti. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.
- CDU: 577.1



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE ANA CLARA MATOSO MONTUORI DE ANDRADE. Aos seis dias do mês de outubro de 2021 às 09:00 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 “Avaliação dos efeitos protetores de *Lactobacillus delbrueckii* UFVH2b20 em modelo experimental de aspergilose pulmonar”, requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof. Leda Quercia Vieira, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Elisabeth Neumann (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Ana Maria Caetano de Faria (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Vânia Luiza Deperon Bonato (Universidade de São Paulo), aprovada; Dra. Alessandra D. Almeida Filardy (Universidade Federal do Rio de Janeiro), aprovada; Dra. Liliame Martins dos Santos - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Leda Quercia Vieira - 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, 06 de outubro de 2021.

Dra. Elisabeth Neumann (UFMG)

Ana Maria Caetano de Faria

Dra. Ana Maria Caetano de Faria (UFMG)

Vânia L. D. Bonato

Dra. Vânia Luiza Deperon Bonato (Universidade de São Paulo)

Alessandra D. Almeida Filardy

Dra. Alessandra D' Almeida Filardy (Universidade Federal do Rio de Janeiro)

Liliame Martins dos Santos

Dra. Liliame Martins dos Santos - Orientadora (UFMG)

Leda Quercia Vieira

Dra. Leda Quercia Vieira - Orientadora (UFMG)

Agradecimentos

A Deus, por seu infinito amor, justiça e bondade, pela oportunidade e por nunca desamparar nenhum de seus filhos.

Aos meus pais, irmão, marido e toda a família pelo apoio incondicional e por nunca me deixarem desistir mesmo quando parecia tão difícil. Tudo que estou fazendo é por nós e para nós. Obrigado por entenderem.

À Professora Leda Vieira, Doutora Liliane Martins e Professor Frederico Soriani pela oportunidade, por acreditarem em mim, pelos conselhos, amizade e por todo aprendizado nesses anos.

Aos amigos do LAGI que são muito mais que colegas de trabalho e sim verdadeiros amigos que tornaram o desenvolvimento deste trabalho tão mais leve com sua colaboração e companheirismo. Vocês também são parte deste projeto.

À minha querida amiga Nathália Oliveira que está comigo desde antes do início da graduação e é também a idealizadora deste projeto que se tornou minha tese de doutorado. Eu agradeço por sua amizade, apoio, conselhos e colaboração pessoal e profissional. Nada disso seria possível sem você que me ensina tanto sempre. Tenho muito orgulho da profissional que você se tornou. Obrigada por tudo.

À Universidade Federal de Minas Gerais.

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

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

Aos membros que compõem essa banca, pela oportunidade de discussão deste trabalho, pelas sugestões e pela possibilidade de enriquecimento do mesmo. Agradeço a todas as pessoas que, de alguma forma, participaram da realização deste trabalho.

Resumo

O termo probiótico é definido como “microrganismos viáveis, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios para a saúde do hospedeiro”. A utilização dos probióticos vem se tornando cada vez mais estudada e recentes evidências sugerem que os probióticos podem proporcionar benefícios terapêuticos não só diretamente no intestino, mas também, em doenças localizadas em outros órgãos, entre eles o pulmão. O microrganismo *L. delbrueckii* UFV-H2b20 pode ser considerado um probiótico, pois preenche os requisitos básicos que uma estirpe microbiana necessita para ser classificada como tal. *L. delbrueckii* UFV-H2b20 é capaz de estimular o sistema imunológico do hospedeiro, mas suas influências na resposta frente a doenças respiratórias ainda estão sendo estudadas. *A. fumigatus* é um fungo ubíquo e saprofítico, responsável por causar cerca de 90% das infecções causadas pelos fungos do gênero *Aspergillus* que vão desde infecções superficiais de pele até infecções invasivas a órgãos internos como o pulmão. A infecção ocorre após a inalação dos conídios dispersos pelo ar, que se depositam nos espaços alveolares, o que culmina na ativação dos macrófagos e iniciação de uma resposta inflamatória. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos protetores da administração do probiótico *L. delbrueckii* UFV-H2b20 em um modelo de infecção pulmonar experimental causada por *A. fumigatus* em camundongos. Nossos resultados mostram uma modulação prévia do sistema imune causada por *L. delbrueckii* UFV H2b20, antes da infecção por *A. fumigatus*, indicada pelo aumento de macrófagos, células dendríticas com perfil regulador e células T reguladoras FoxP3⁺ nos linfonodos mesentéricos e aumento de IgA nas fezes dos animais tratados. Após a infecção, observamos uma diminuição na letalidade e diminuição da carga fúngica pulmonar nos animais tratados. Além disso, foi observada uma diminuição da permeabilidade vascular no sítio da infecção, assim como alterações no perfil de células recrutadas. Os resultados indicam também que esses animais apresentam melhora em funções neutrofílicas como *killing* e produção de ROS, além de um aumento na eferocitose dos macrófagos. Finalmente, os animais tratados também apresentaram maior quantidade de células Treg e maior concentração das citocinas TGF- β e IL-10, com consequente diminuição de IL1- β , IL-17 e CXCL-1, indicando maior regulação da inflamação. Observamos também indícios de proteção causada pelo metabólito lactato, principal metabólito produzido por *L. delbrueckii* UFV H2b20. Esta proteção está representada pela diminuição na letalidade dos camundongos infectados com *A. fumigatus* e tratados com lactato em comparação com os camundongos infectados não tratados, indicando, portanto, um possível mecanismo de ação do probiótico. Sendo assim, os resultados deste trabalho indicam uma otimização da resposta imune no controle do fungo *A. fumigatus*, promovida pela ingestão de *L. delbrueckii* UFV H2b20, e que envolve tanto a potencialização da resposta imune inata nas horas iniciais da infecção, quanto a regulação desta resposta, levando à menor susceptibilidade dos hospedeiros tratados frente à infecção.

Palavras chave: *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20, probiótico, célula T reguladora, *Aspergillus fumigatus*, neutrófilo, ROS.

Abstract

The term probiotic is defined as “viable microorganisms, which when administered in adequate amounts, confer benefits to the host”. The use of probiotics has become increasingly studied and recent evidence has suggested that probiotics can provide therapeutic benefits not only directly in the intestine, but also in diseases located in other organs, including the lung. The microorganism *L. delbrueckii* UFV-H2b20 can be considered a probiotic because it fulfills the basic requirements that a microbial strain needs to be classified as such. Some studies have already shown the ability of *L. delbrueckii* UFV-H2b20 to stimulate the host's immune system, but its influences on the response to respiratory diseases are still being studied. *A. fumigatus* is a ubiquitous and saprophytic fungus, responsible for causing about 90% of infections caused by *Aspergillus* genus, ranging from superficial skin infections to invasive internal organs infections. This type of infection occurs after inhalation of air-dispersed conidia, which are deposited in alveolar spaces, which culminates in the activation of macrophages and the initiation of an inflammatory response. Therefore, the objective of this study was to evaluate the protective effects of the administration of *L. delbrueckii* UFV-H2b20 in a model of experimental pulmonary infection caused by *A. fumigatus* in mice. Our results indicate a previous modulation of the immune system caused by *L. delbrueckii* UFV H2b20, before *A. fumigatus* infection, with increasing numbers of macrophages, tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells FoxP3⁺ numbers in mesenteric lymph nodes and increasing IgA levels in treated animal's feces. After infection, we observed increased survival and decreasing fungal burden in the treated group. Furthermore, a decreasing vascular permeability at the site of infection and changes on the recruited cell profile were observed. Results also indicate optimization of neutrophil function such as killing and ROS production, in addition to an increasing macrophage efferocytosis. Finally, treated animals also had higher Treg amounts and higher TGF- β and IL-10 concentrations, with a consequent decreased production of IL1- β , IL-17 and CXCL-1, indicating greater inflammatory regulation. We also observed evidence of protection caused by the lactate metabolite, the main metabolite produced by *L. delbrueckii* UFV H2b20. This protection is represented by increased survival lactate treated mice infected with *A. fumigatus* compared to not treated infected mice, thus indicating a possible probiotic mechanism of action. Thus, our results indicate the potencialization of immune responses that are important for controlling *A. fumigatus* infection, promoted by *L. delbrueckii* UFV H2b20 ingestion, which involves innate immune response optimization and regulation during early infection, leading to lower susceptibility of hosts to infection.

Key words: *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20, probiotic, regulatory T cell, *Aspergillus fumigatus*, neutrophil, ROS.

Lista de Figuras

Figura 1. Interação da microbiota intestinal com o sistema imune.....	19
Figura 2. Fatores que contribuem para disbiose intestinal.....	21
Figura 3. Papel da microbiota no eixo intestino-pulmão.....	24
Figura 4. Morfologia dos conidióforos e conídios de <i>A. fumigatus</i>	27
Figura 5. Resposta imune inata ao <i>A. fumigatus</i> na superfície alveolar.....	29
Figura 6. Avaliação da ingestão de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20.....	45
Figura 7. Análise de leucócitos nos linfonodos mesentéricos e IgA nas Fezes.....	47
Figura 8. Avaliação da taxa de sobrevivência e carga fúngica nos pulmões.....	49
Figura 9. Avaliação histopatológica da lesão pulmonar causada por <i>A. fumigatus</i> nos pulmões e avaliação da permeabilidade vascular.....	51
Figura 10. Avaliação de função respiratória.....	52
Figura 11. Análise do influxo celular no BAL e pulmão.....	54
Figura 12. Avaliação <i>ex vivo</i> da função dos neutrófilos e da eferocitose durante a infecção por <i>A. fumigatus</i>	56
Figura 13. Avaliação da produção de ROS e expressão de anexina <i>in vivo</i> pelas células mielóides do BAL após 12 horas de infecção por <i>A. fumigatus</i>	58
Figura 14. Avaliação da regulação da inflamação <i>in vivo</i> no BAL após 24 horas de infecção por <i>A. fumigatus</i>	59
Figura 15. Dosagem de mediadores inflamatórios no BAL.....	61
Figura 16. Avaliação da taxa de sobrevivência de animais tratados com Lactato.....	62

Lista de Abreviaturas e Siglas

AFU – infectados com *Aspergillus fumigatus*

AFU+LAC – infectados com *Aspergillus fumigatus* que ingeriram *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20

APC - (*antigen presenting cells*) célula apresentadora de antígenos

BAL – lavado broncoalveolar

BSA - (*Bovine Serum Albumine*) albumina de soro bovino

CFSE - éster de carboxifluoresceína succinimidílico

CLR – (*C like receptor*) receptor de lectina do tipo C

CD – (*cluster of differentiation*) grupamento de diferenciação

DCs – (*dendritic cels*) células dendríticas

DHE - diidroetídio

EPO – peroxidase eosinofílica

FDA - *Food and Drug Administration*

GALT - (*gut-associated lymphoid tissue*) tecido linfático associado ao intestino

G-CSF – (*granulocyte colony stimulating factor*) fator estimulador de colônia de granulócitos

GM-CSF – (*granulocyte and macrophage colony stimulating factor*) fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

HPA – eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

IBD - (*inflammatory bowel disease*) doença inflamatória intestinal

IFN - interferon

IgA – Imunoglobulina A

IgE – Imunoglobulina E

IL – interleucina

ILCs – (*innate lymphoid cells*) células linfoides inatas

LAC - *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20

LPS - lipopolissacarídeo

MIP – (*macrophage inflammatory protein*) proteína inflamatória de macrófagos

MLN – (*mesenteric lymphonode*) linfonodo mesentérico

MPO – mieloperoxidase

NAG – N-acetil-glicosaminidase

NETs – (*neutrophils extra cellular traps*) armadilhas extracelulares dos neutrófilos

NF-κB - (*nuclear factor*) fator nuclear κB

NI – não infectados

NI+LAC – não infectados que ingeriram *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20

NLRs – (*nod like receptors*) receptores do tipo NOD

OVA - albumina extraída do ovo de galinha

PAMPs - (*pathogen-associated molecular pattern*) padrões moleculares associados a patógenos

PBS - (*Phosphate-buffered saline*) Tampão fosfato-salino

PRRs – (*Pattern recognition receptors*) receptores de reconhecimento de padrão

ROS - (*reactive oxygen species*) espécies reativas de oxigênio

SIgA - (*secretory IgA*) anticorpos IgA secretores

SCFAs – (*short chain fat acids*) ácidos graxos de cadeia curta

TGF-β – (*transforming growth factor beta*) Fator de transformação do crescimento beta

TGI - Trato gastrointestinal

Th – (*T helper*) T auxiliary

TLR – (*Toll like receptor*) receptor do tipo Toll

TNF - (*tumoral necrosis factor*) fator de necrose tumoral

Tregs - T reguladoras

WAO – (*world allergy organization*) Organização Mundial de Alergia

SUMÁRIO

1. Introdução.....	13
1.1 Microbiota intestinal, probióticos, e a modulação da resposta imune.....	13
1.1.1 Microbiota intestinal, probióticos, e a modulação da resposta imune local.....	13
1.1.2 Microbiota intestinal, probióticos, e a modulação da resposta imune pulmonar.....	22
1.1.3 O <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV-H2b20.....	25
1.2 Respostas imune e inflamatória frente ao <i>Aspergillus fumigatus</i>	26
1.2.1 O microrganismo <i>Aspergillus fumigatus</i>	26
1.2.2 Patogênese e aspectos imunológicos da aspergilose.....	28
1.2.3 A influência da microbiota na resposta imunológica frente à aspergilose pulmonar.....	31
1.2.4 Probióticos e a aspergilose pulmonar.....	32
2. Objetivos.....	34
2.1 Objetivos Gerais.....	34
2.2 Objetivos Específicos.....	28
3. Materiais e Métodos.....	29
3.1 Animais experimentais.....	29
3.2 Cultivo, tratamento com <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV-H2b20 e tratamento com lactato.....	35
3.3 Marcação de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 com CFSE.....	36
3.4 Cultivo, preparo do inóculo e infecção via intranasal de <i>Aspergillus fumigatus</i>	36
3.5 Análise da sobrevivência de camundongos infectados por <i>A. fumigatus</i>	37
3.6 Avaliação da mecânica respiratória.....	37
3.7 Análises histopatológicas.....	37
3.8 Determinação de unidades formadoras de colônias (UFC) nos pulmões de animais infectados com <i>A. fumigatus</i>	37
3.9 Coleta do lavado Broncoalveolar (BAL).....	38
3.10 Contagem total e diferencial das células do BAL.....	38
3.11 Avaliação da atividade de mieloperoxidase (MPO).....	38
3.12 Avaliação da atividade de N-acetilglicosaminidase (NAG).....	39
3.13 Avaliação da atividade de peroxidase eosinofílica (EPO).....	40
3.14 Quantificação de proteínas.....	40
3.15 Quantificação de citocinas, quimiocinas e IgA por ELISA.....	40
3.16 Obtenção de macrófagos e neutrófilos da medula óssea.....	41
3.17 <i>Killing</i> dos conídios pelos neutrófilos <i>in vitro</i>	42
3.18 Ensaio de eferocitose.....	42
3.19 Imunofluorescência.....	42

3.20 Citometria de fluxo.....	43
3.21 Análises Estatísticas.....	43
4. Resultados.....	38
4.1 Avaliação da imunomodulação prévia causada por <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 no intestino, antes do desafio com <i>A. fumigatus</i>	38
4.1.1 <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 permanece no intestino dos camundongos até 24 horas após a ingestão.....	38
4.1.2 <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 modula o sistema imune dos camundongos após ingestão.....	39
4.2 A administração de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 modula a resposta imune e inflamatória frente à infecção por <i>A. fumigatus</i>	41
4.2.1 A administração de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 resultou em uma menor susceptibilidade à infecção, após desafio com <i>A. fumigatus</i>	41
4.2.2 A menor susceptibilidade dos camundongos que ingeriram <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 foi associada à menor carga fúngica no pulmão após infecção.....	41
4.2.3 Animais que ingeriram <i>L. delbrueckii</i> UFV-H2b20 e os que não ingeriram apresentaram graus semelhantes de lesão pulmonar nas análises histológicas e diferenças na permeabilidade vascular.....	43
4.2.4 A administração do probiótico <i>L. delbrueckii</i> UFV-H2b20 reduz o déficit funcional que a infecção por <i>A. fumigatus</i> provoca na mecânica respiratória.....	52
4.3 Avaliação da modulação da resposta imune por <i>L. delbrueckii</i> UFV-H2b20 após infecção por <i>Aspergillus fumigatus</i>	46
4.3.1 A administração do probiótico <i>L. delbrueckii</i> UFV-H2b20 altera o influxo celular nos pulmões após infecção com <i>A. fumigatus</i>	46
4.3.2 Avaliação de alterações nas funções dos neutrófilos promovidas por <i>L. delbrueckii</i> UFV-H2b20 após infecção por <i>Aspergillus fumigatus</i>	48
4.3.2.1 O tratamento com o probiótico <i>L. delbrueckii</i> UFV-H2b20 otimiza o killing, a produção de ROS dos neutrófilos e a eferocitose dos macrófagos ex vivo.....	55
4.3.2.2 O tratamento com o probiótico <i>L. delbrueckii</i> UFV-H2b20 aumenta o influxo de neutrófilos produtores de ROS e diminui a frequência de neutrófilos apoptóticos no local da infecção, 12 horas após o desafio com <i>A. fumigatus</i> in vivo.....	56
4.3.3 O tratamento com o probiótico <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV-H2b20 promove otimização da regulação da inflamação após infecção por <i>Aspergillus fumigatus</i>	52
4.3.3.1 O tratamento com o probiótico <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV-H2b20 promove um aumento de linfócitos T reguladores FoxP3 ⁺ frente à infecção por <i>A. fumigatus</i>	59
4.3.3.2 A administração do probiótico <i>L. delbrueckii</i> UFV-H2b20 altera a concentração de mediadores inflamatórios após infecção com <i>A. fumigatus</i>	60
4.4 A administração de lactato, principal metabólito produzido por <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20, diminui a letalidade de animais infectados por <i>A. fumigatus</i>	62
5. Discussão.....	63
6. Conclusão.....	69
7. Referências.....	71

8. Anexo.....	84
----------------------	-----------

1. Introdução

1.1 Microbiota intestinal, probióticos, e a modulação da resposta imune

1.1.1 Microbiota intestinal, probióticos, e a modulação da resposta imune local

Dos microrganismos que vivem em todo o corpo, aproximadamente 80% do total se encontram no trato gastrointestinal (TGI) e, coletivamente, são chamados de microbiota intestinal. Para sua própria sobrevivência, a microbiota intestinal também codifica muito mais genes que o genoma do hospedeiro, e geram mais de 1000 metabólitos (Medini *et al.*, 2008; Sonnenburg e Sonnenburg, 2014). Esta microbiota e seus metabólitos desempenham uma variedade de funções fisiológicas (Backhed *et al.*, 2004) e é importante na maturação do sistema imunológico (Gueimonde *et al.*, 2006).

A distribuição da microbiota intestinal varia ao longo do TGI. A carga microbiana total é de aproximadamente $10^3 - 10^7$ /mL no trato gastrointestinal superior (estômago e intestino delgado), enquanto no ceco e cólon, o número de micróbios totais aumenta para até 10^{12} /mL (Mowat e Agace, 2014). Além de bactérias, outros microrganismos, como vírus e fungos, também estão presentes no intestino (Clemente *et al.*, 2012). No entanto, a maior parte da microbiota intestinal é composta por bactérias. Mais de 99% das bactérias no intestino são anaeróbias, o que é consistente com o ambiente de baixo oxigênio no intestino (Vedantam e Hecht, 2003).

Os microrganismos da microbiota intestinal estão em constante movimento entre o TGI e os linfonodos mesentéricos (mesenteric lymphonode - MLN). Este processo de passagem da microbiota através da mucosa é chamado de translocação e a presença destes microrganismos na lâmina própria e linfonodos pode ser benéfica para o sistema imune do hospedeiro que passa a ser capaz de responder mais rapidamente a patógenos exógenos (Berg, 1996).

A importância da microbiota intestinal no desenvolvimento do sistema imunológico do hospedeiro foi primeiramente demonstrada em camundongos sem germes (Macpherson e Harris, 2004; Round e Mazmanian, 2009), que possuem tecido linfóide intestinal e mesentérico pouco desenvolvidos, diminuição na produção de imunoglobulina A (IgA), deficiência na regulação das populações de células T no tecido intestinal e menor resistência a infecções. Essas diferenças na função imunológica podem ser revertidas introduzindo a microbiota intestinal nesses animais (Smith *et al.*, 2007; Gensollen *et al.*, 2016). Uma função primordial do sistema imunológico da mucosa é a produção de anticorpos IgA secretores (secretory IgA - SIgA), que são dímeros de moléculas de IgA unidas por uma cadeia J e um componente secretor (Brandtzaeg *et al.*, 2013) (**Figura 1**).

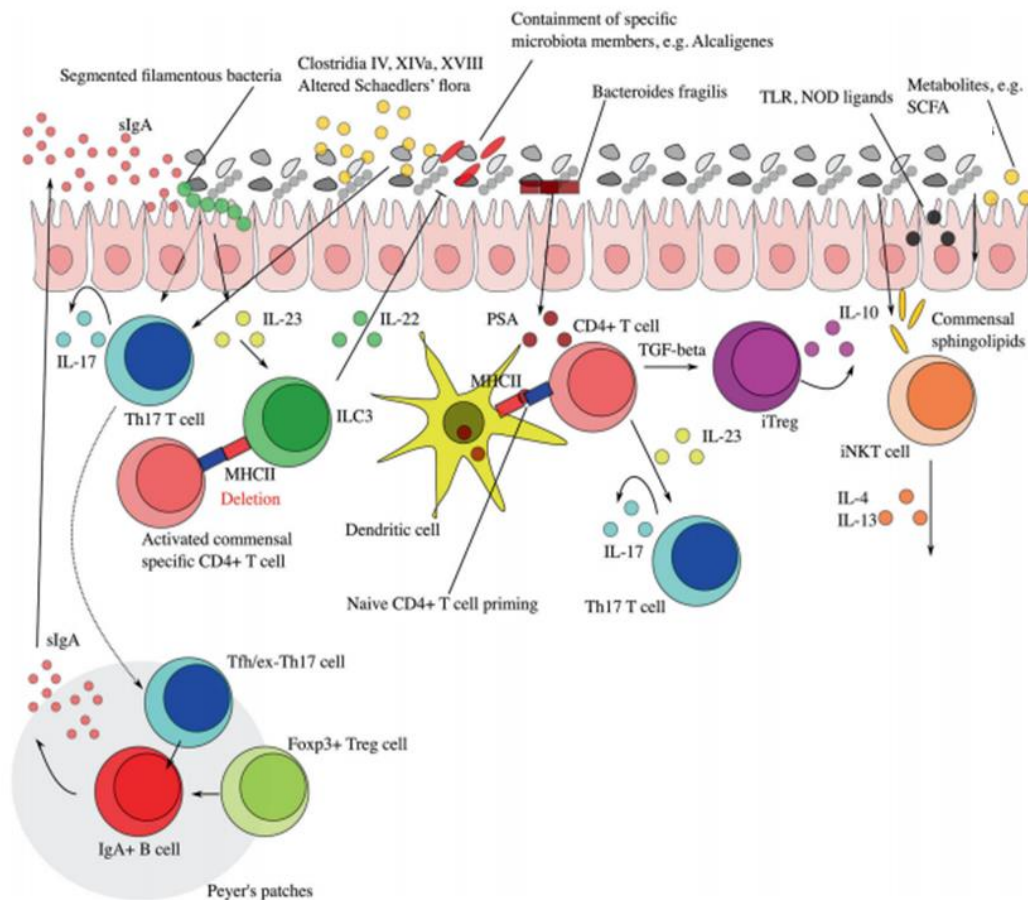


Figura 1. Interação da microbiota intestinal com o sistema imune. Ligantes de TLR e NOD e metabólitos derivados da microbiota modulam o sistema imune através da ação direta nos enterócitos e células imunes intestinais e também podem atingir outros tecidos pela circulação. Linfócitos T reguladores (Treg) Foxp3^+ e linfócitos T helper 17 promovem a troca de classe de células B e produção de IgA secretória. A colonização intestinal por bactérias filamentosas segmentadas (BFS) e outras bactérias comensais promovem a diferenciação de células CD4^+ Th17. A colonização com *Bacteroides fragilis* é capaz de promover a diferenciação de células T CD4^+ e o equilíbrio das populações Th1 e Th2, um efeito que depende de seu polissacarídeo A (PSA). PSA é captado pelas células dendríticas da lâmina própria via TLR-2 e apresentado para células T CD4^+ naive. Na presença simultânea de TGF- β , essas células podem se diferenciar em Treg. A IL-10 produzida por estas células promove a homeostase imune. Ao contrário, IL-23 vinda da mesma cascata, promove a expansão de células Th17 pró inflamatórias. Fonte: Adaptado de Zheng *et al.*, 2020.

A produção de SIgA é importante para a proteção contra patógenos e na regulação da composição da microbiota comensal (Pabst *et al.*, 2016; Moor *et al.*, 2017). A SIgA não afeta apenas a composição bacteriana da microbiota intestinal, mas também pode influenciar o nível de inflamação do intestino. Por exemplo, o SIgA específico parece impedir a propagação de

patógenos devido à ligação cruzada com células bacterianas em divisão, denominado encadeamento do crescimento bacteriano e, dessa maneira, facilitar a eliminação dos patógenos (Moor *et al.*, 2017).

De maneira geral, a microbiota intestinal de humanos e animais representa um ecossistema complexo e em equilíbrio. Os microrganismos presentes no trato gastrointestinal podem ter papéis distintos na manutenção deste equilíbrio. Algumas bactérias intestinais podem ser potencialmente patogênicas para o hospedeiro, estar envolvidas na putrefação intestinal e na produção de substâncias tóxicas, carcinogênicas e mutagênicas (Isolauri *et al.*, 2004). Outros componentes da microbiota, como lactobacilos e bifidobactérias, podem conferir benefícios ao hospedeiro através da diminuição de triglicérides, estimulação imune não invasiva e capacidade de inibição de microrganismos prejudiciais (Isolauri *et al.*, 2004). Em indivíduos saudáveis existe um balanço entre as populações bacterianas benéficas e as potencialmente patogênicas (Isolauri *et al.*, 2004). Por exemplo, *Helicobacter pylori* é reconhecida como fator de risco chave para o desenvolvimento de câncer e úlceras gástricas (Amieva e Peek, 2016). A infecção intestinal induzida por *Clostridium difficile* é uma síndrome comum em gastroenterologia (Banaei *et al.*, 2015). A doença inflamatória intestinal (inflammatory bowel disease - IBD) está intimamente associada à disbiose da microbiota intestinal. Estudos mostraram que a diversidade da microbiota é menor em pacientes com IBD do que em indivíduos saudáveis (Kaur *et al.*, 2011). As quantidades ou proporções de *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria* estão alteradas durante o desenvolvimento da IBD e as de *Enterobacteriaceae* são notavelmente aumentadas em pacientes com IBD. No entanto, o mecanismo detalhado é complexo. Os níveis de ácidos graxos de cadeia curta (short chain fat acids - SCFAs) intestinais, que servem como nutrientes benéficos para as células epiteliais intestinais, são diminuídos pela disbiose (Rodriguez-Carrio *et al.*, 2017). Além disso, a alteração da composição e função da microbiota pode interferir diretamente nas respostas imunes do hospedeiro, causando uma inflamação prejudicial à mucosa (Hu *et al.*, 2017) (**Figura 1**). Fatores como dieta, terapias antibióticas, radiação, estresse, depressão e infecções também podem levar a distúrbios no equilíbrio da microbiota, aumentando a predisposição a um risco maior de doenças (Isolauri *et al.*, 2004, Collins, 2014) (**Figura 2**).

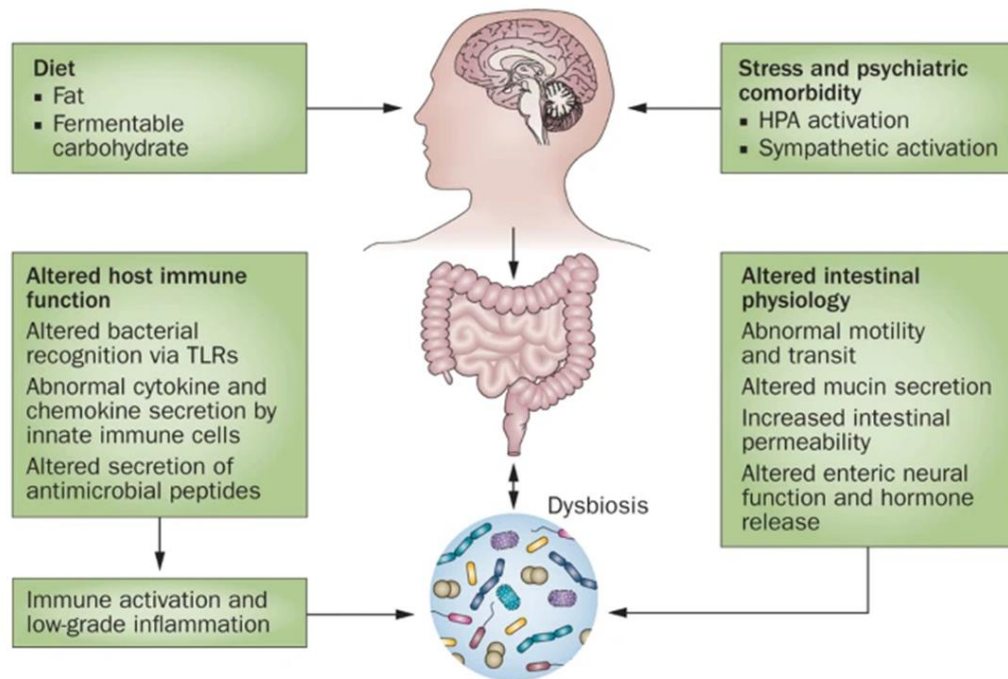


Figura 2. Fatores que contribuem para disbiose intestinal. Mudanças na dieta, estresse e depressão podem desestabilizar o microambiente das bactérias comensais e alterar a composição microbiana, gerando a disbiose. Abreviaturas: HPA, eixo hipotálamo-hipófise-adrenal; TLR, receptor Toll-like. Fonte: adaptado de Collins, 2014.

O termo probiótico é definido como “microorganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício para a saúde do hospedeiro” (Cremon *et al.*, 2018). Atualmente, alguns probióticos comumente usados são espécies Gram-positivas, como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, mas também algumas são Gram-negativas, principalmente *Escherichia coli* Nissle 1917 (Behnsen *et al.*, 2013). Os benefícios para a saúde promovidos por probióticos incluem prevenção da colonização ou restrição do crescimento de bactérias patogênicas, otimização das funções da barreira epitelial, modulação da expressão de genes que modulam a inflamação no intestino (Mizock, 2015; Cremon *et al.*, 2018) e produção de diferentes tipos de substâncias que estimulam a imunidade do hospedeiro através de diversos mecanismos (Collado *et al.*, 2007). Essas substâncias produzidas pelos probióticos e outras bactérias da microbiota intestinal incluem acetato, propionato e butirato, que são SCFAs, ou ainda, lactato, que é o hidróxi-ácido graxo de cadeia curta mais comum no lúmen intestinal e pode ser convertido em outros SCFAs por um subgrupo de espécies bacterianas fermentadoras de lactato (Iraporda *et al.*, 2015). O potencial dos probióticos de modular a microbiota intestinal, e assim corrigir a disbiose, é uma evidência que já leva à sua utilização em doenças intestinais como a síndrome do intestino irritável (Whelan e Quigley, 2013; Quigley, 2015; Hod e Ringel, 2016).

Probióticos administrados oralmente podem interagir com a mucosa gastrointestinal e com o tecido linfóide associado ao intestino, onde mais de 70% das células imunes estão localizadas (Lebeer *et al.*, 2010). Os probióticos interagem de diversas formas com macrófagos, células dendríticas (dendritic cells - DCs) da mucosa e células do epitélio intestinal. Os receptores de reconhecimento padrão (Pattern recognition receptors – PRRs) como os receptores do tipo Toll (Toll like receptors - TLRs) (Tang, 2009) e os receptores no tipo NOD (Nod like receptors - NLRs) (Bouskra *et al.*, 2008) desempenham um papel fundamental no reconhecimento e transmissão de sinais que levam a diferentes tipos de resposta.

Já é estabelecido que os probióticos podem também afetar a resposta T auxiliar (T helper – Th) tanto atingindo diretamente suas funções como indiretamente via células T reguladoras (Tregs) (Tang, 2009). Cepas bacterianas específicas podem influenciar a produção de citocinas indutoras da resposta Th1 ou pró-inflamatórias, como interleucina (IL)-12, IL-1 β e fator de necrose tumoral (tumor necrosis factor - TNF), enquanto outras podem estimular respostas Th2 desencadeando sinais de tolerância e induzindo a produção de citocinas anti-inflamatórias como fator de transformação do crescimento beta (transforming growth factor beta - TGF- β) e IL-10. As DCs e os macrófagos contidos nesse meio enriquecido com IL-10 e TGF- β podem aumentar a geração de células Tregs, que desempenham um papel fundamental na tolerância imune periférica (**Figura 1**). Além das estirpes que induzem as respostas Th1 ou Th2, existem ainda aquelas que podem desencadear uma mistura das duas respostas (Tang, 2009; Kang e Im, 2015). Células T CD4⁺IL-17⁺ (Th17), que representam uma potente classe de células efetoras imunomoduladoras, também são induzidas por bactérias na microbiota, principalmente bactérias filamentosas segmentadas (Ivanov *et al.*, 2009). Descobertas mais recentemente, as células linfóides inatas (innate lymphoid cells - ILCs), também tem suas funções moldadas pelas bactérias presentes na microbiota intestinal. Estas células são especializadas na secreção rápida de citocinas e quimiocinas para combater infecções e promover o reparo do tecido nas mucosas (Gury-BenAri *et al.*, 2016) (**Figura 1**).

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

1.1.2 Microbiota intestinal, probióticos, e a modulação da resposta imune pulmonar

Sabe-se que a microbiota intestinal afeta vários órgãos, inclusive o pulmão. A interface entre microbiota intestinal e pulmão, denominada “eixo intestino-pulmão”, é essencial para a resposta imune e a homeostase nas vias aéreas. Ainda há muito o que explorar no entendimento do eixo intestino-pulmão, no entanto, muitas estratégias associadas à microbiota intestinal já foram propostas para tratar e prevenir doenças pulmonares (Dong *et al.*, 2020).

Não apenas em condições saudáveis, mas também em condições patológicas, as microbiotas de diferentes partes do corpo são correlacionadas e co-desenvolvidas entre si. Análises seriadas da microbiota intestinal e respiratória durante a fibrose cística na infância constataram que um grupo de bactérias encontradas em amostras do intestino nesta fase também está presente em amostras do trato respiratório na fase adulta. Este grupo de bactérias inclui *Enterococcus*, *Coprococcus*, *Escherichia* e *Parabacteroides*. O mapeamento das populações ao longo do tempo mostrou que a colonização intestinal ocorreu antes de aparecer no trato respiratório. A diversidade microbiana das vias aéreas e intestinos aumentou significativamente ao longo do tempo, e a diversidade das vias aéreas aumentou de forma mais aguda ainda ao longo do tempo (Madan *et al.*, 2012).

Muitos fatores exógenos e endógenos, como dieta, tabagismo, antibióticos, bactérias probióticas e a forma com que se deu o parto do indivíduo podem exercer uma influência significativa na composição da microbiota intestinal. Essa alteração na microbiota intestinal pode levar a fortes influências nas respostas imunológicas do pulmão através do eixo intestino-pulmão (Dong *et al.*, 2020). Uma dessas influências é, por exemplo, na produção de IgA. A composição da microbiota afeta drasticamente não só a produção de IgA no intestino, mas também influencia fortemente a produção de IgA nos pulmões via células dendríticas CD103⁺ (Ruane *et al.*, 2013; Lindner *et al.*, 2015).

Os mecanismos pelos quais a interação intestino-pulmão ocorre ainda não são completamente conhecidos, mas estudos indicam que ela pode ser mediada de duas formas. Através dos produtos bacterianos contidos no sistema circulatório, que incluem seus metabólitos como SCFAs e lactato, ou partes da estrutura da própria bactéria, e também através de células do sistema imune contidas nos linfonodos mesentéricos e pulmão (Dong *et al.*, 2020) (**Figura 3**). Na primeira forma, fragmentos da parede celular, partes proteicas de bactérias mortas, bactérias vivas (Samuelson *et al.*, 2015) ou metabólitos e subprodutos produzidos por elas (Bingula *et al.*, 2017), gerados no trato intestinal podem viajar ao longo do linfonodo mesentérico para a circulação sistêmica e, posteriormente, entrar na circulação pulmonar, o que pode levar à estimulação de DCs, macrófagos, células T e o influxo de neutrófilos (Samuelson *et al.*, 2015). Outra maneira do intestino e pulmão de exercerem influência entre si é através da migração de células T e B. Inicialmente, as bactérias viáveis e seus produtos são transferidos para o linfonodo mesentérico por macrófagos e DCs após fagocitose e eliminação. Nos MLN, as bactérias translocadas e seus produtos podem estimular células B e células T inativas, ativando assim a diferenciação de células B em plasmócitos. Os plasmócitos produzem imunoglobulinas específicas ao antígeno e podem primar e auxiliar na diferenciação das células T. Depois disso, algumas células T migram para fora do tecido linfático associado ao intestino (gut-associated lymphoid tissue - GALT) e finalmente atingem o epitélio pulmonar ativando as células apresentadoras de antígeno e as células T locais. A ativação das células imunes mencionadas acima leva à melhora da resposta imune pulmonar e, conseqüentemente, aumenta a eliminação de patógenos nos pulmões (Samuelson *et al.*, 2015) (**Figura 3**).

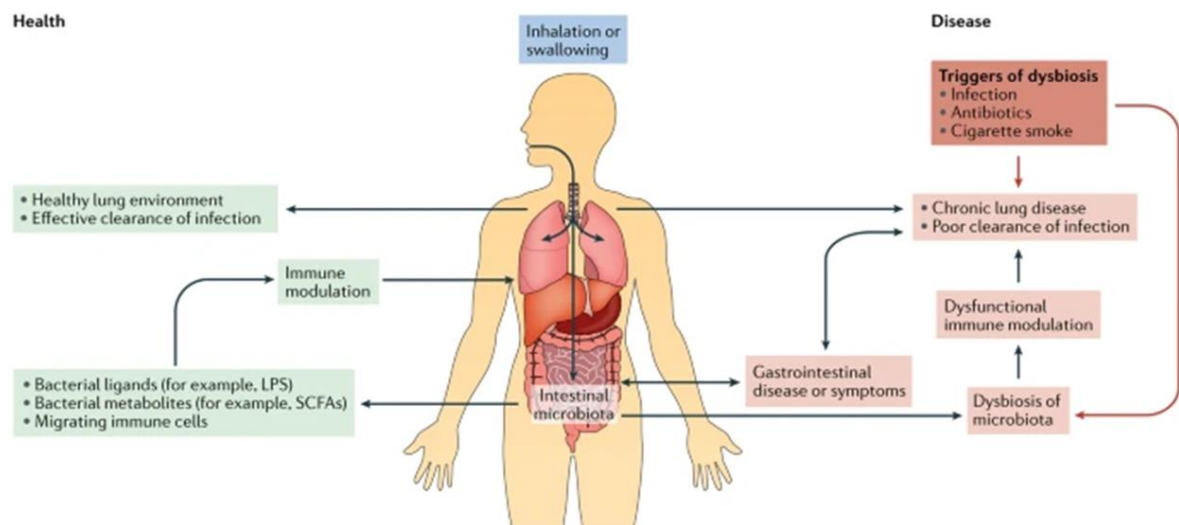


Figura 3. Papel da microbiota no eixo intestino-pulmão. Uma microbiota intestinal saudável mantém a homeostase das respostas imunológicas locais através da exposição de ligantes estruturais (por exemplo, lipopolissacarídeo (LPS) e peptidoglicano) e metabólitos secretados (por exemplo, ácidos graxos de cadeia curta). Os microrganismos e os metabólitos absorvidos influenciam os linfócitos circulantes e contribuem para a regulação das respostas imunes sistêmicas. Quando a microbiota intestinal é perturbada os sinais normais derivados da microbiota são alterados levando a uma resposta imune alterada. Fonte: Budden *et al.*,2017.

Neste trabalho vamos analisar a influência de uma bactéria probiótica na resposta imunológica frente a uma infecção pulmonar fúngica, a aspergilose pulmonar. Como já mencionado, bactérias probióticas são componentes importantes da microbiota intestinal, fornecem benefícios à saúde do hospedeiro e mantêm o equilíbrio ácido-base no TGI por um longo tempo. Até o momento, inúmeras pesquisas foram realizadas para desvendar como as bactérias probióticas podem exercer impacto sobre inflamações respiratórias alérgicas ou causadas por infecções. Como exemplo, algumas pesquisas já demonstraram que a ingestão de *Lactobacillus rhamnosus* GG pode desempenhar um papel anti-inflamatório na inibição da inflamação alérgica crônica pulmonar induzida por albumina extraída de ovo de galinha (OVA) (Wu *et al.*, 2016) e, da mesma forma, *Bifidobacterium lactis* também tem o mesmo efeito no alívio da inflamação das vias aéreas, reduzindo a proporção de linfócitos Th17 e aumentando a de células Treg (Liu *et al.*, 2018). Até agora, a maioria dos estudos relacionando probióticos e infecções pulmonares se concentrou em dois modelos de infecção - influenza e pneumonias bacterianas - nos quais os efeitos benéficos da administração de probióticos foram caracterizados por melhora na sobrevida, diminuição da perda de peso, diminuição da carga viral ou bacteriana no pulmão, e diminuição do dano no epitélio brônquico. Esses estudos relatam que o efeito protetor dos probióticos foi mediado por modulação imune específica, caracterizada por um recrutamento precoce no pulmão de células do

sistema imune inato potencialmente eliminadoras de patógenos, como macrófagos (Park *et al.*, 2013; Vieira *et al.*, 2016), neutrófilos (Racedo *et al.*, 2006) ou células natural killers (Kawahara *et al.*, 2015; Belkacem *et al.*, 2017) e níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias como TNF e IL-6. Esse aumento na inflamação aguda diminui rapidamente, provavelmente devido ao aumento subsequente de fatores anti-inflamatórios, como células Treg e IL-10 nos pulmões, reduzindo as lesões pulmonares, diferentemente dos camundongos não tratados com os probióticos (Khailova *et al.*, 2013). No entanto, não existem estudos publicados associando os benefícios da administração de bactérias probióticas durante infecções pulmonares fúngicas, mas essas evidências com outros modelos de infecções pulmonares sugerem que a manipulação da microbiota intestinal e seus produtos podem melhorar a imunidade respiratória durante infecções, que também é uma das opções a serem consideradas em um futuro tratamento/prevenção para infecções pulmonares.

1.1.3 O *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20

O microrganismo *L. delbrueckii* UFV-H2b20, que primeiramente foi identificado como *Lactobacillus acidophilus* e pertencente ao filo *Firmicutes*, pode ser considerado um probiótico, pois preenche os requisitos básicos que uma estirpe microbiana necessita para ser classificada como tal, a saber: habitar normalmente o trato intestinal do hospedeiro; ser capaz de resistir às condições de estresse no trato gastrointestinal; estabelecer-se e conferir benefícios ao seu hospedeiro (Neumann *et al.*, 1998). *L. delbrueckii* UFV-H2b20 é um habitante normal do trato intestinal já que foi isolado de fezes de uma criança recém-nascida na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais (Santos, 1984).

Alguns trabalhos do nosso grupo já mostraram a capacidade de *L. delbrueckii* UFV-H2b20 de estimular o sistema imunológico do hospedeiro: Neumann *et al.* demonstraram que esta estirpe bacteriana é capaz de sobreviver às condições do trato intestinal de camundongos e se manter em número elevado em todas as porções do mesmo (Neumann *et al.*, 1998). Neste mesmo trabalho, também foi demonstrada a capacidade de *L. delbrueckii* UFV-H2b20 de estimular as defesas imunes do hospedeiro, visto que camundongos monoassociados mostraram uma maior capacidade fagocítica dos macrófagos, maior eliminação de bactérias Gram-negativas inoculadas via intravenosa e duas vezes mais células de Kupffer, responsáveis pela eliminação das bactérias circulantes. Vieira *et al.* mostraram que *L. delbrueckii* UFV-H2b20 aumenta a eliminação de *Escherichia coli* e a produção de citocinas inflamatórias sistêmicas, além de proteger camundongos contra a infecção por *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* (Vieira *et al.*, 2008). Neumann *et al.* mostraram que *L. delbrueckii* UFV-H2b20 induz a produção de citocinas inflamatórias por camundongos *in vitro* e *in vivo* (Neumann *et al.*, 2009). Dos Santos *et al.* demonstraram que a monoassociação com *L. delbrueckii* UFV-H2b20 estimula o sistema imune e protege camundongos sem germes contra a infecção por *Listeria monocytogenes* (Dos Santos *et al.*, 2011). Em um outro trabalho também do nosso grupo (Montuori-de-Andrade, ACM - em submissão- em anexo) observamos que *L. delbrueckii* UFV-H2b20 promove efeitos protetores na

inflamação alérgica pulmonar induzida por OVA em camundongos, diminuindo o número de células inflamatórias e a IgE sérica total no BAL. Ao mesmo tempo o tratamento prévio com *L. delbrueckii* melhora a função pulmonar e a hiper-reatividade das vias aéreas, estimulando respostas regulatórias por meio de dois mecanismos de células Treg: produção de IL-10 e expressão de CD73 e CD39, modulando as vias de sinalização purinérgica. Essas duas respostas estavam combinadas com uma maior produção de interferon IFN- γ e controlaram a resposta Th2 aumentada nos camundongos alérgicos. Apesar de ainda não existirem estudos publicados avaliando os efeitos de *L. delbrueckii* UFV H2b20 frente a infecções fúngicas pulmonares, um estudo avaliou microrganismos probióticos, entre eles *L. delbrueckii* UFV H2b20, como agentes de controle biológico para reduzir a produção de aflatoxina e esporos por *Aspergillus parasiticus* IMI 242695 em amendoim. Os resultados mostraram que os probióticos reduziram, de forma significativa, tanto a esporulação quanto a produção de aflatoxina de *A. parasiticus* IMI 242695, mostrando assim que os microrganismos probióticos podem também ter uma ação de inibição direta sobre o fungo (Da Silva *et al.*, 2015). Portanto, sabe-se pouco em relação aos efeitos do tratamento com *L. delbrueckii* UFV-H2b20 em relação a imunidade pulmonar, sendo então uma grande perspectiva para o estudo dos efeitos moduladores desse probiótico.

1.2 Respostas imune e inflamatória frente ao *Aspergillus fumigatus*

1.2.1 O microrganismo *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus é um fungo pertencente ao gênero *Aspergillus* e sua identificação é baseada predominantemente na morfologia de seus conídios e conidióforos. As colônias de *A. fumigatus* possuem coloração verde-acinzentada, forma granular e rápido crescimento. Sua micro morfologia apresenta hifas hialinas e septadas com paredes paralelas. A partir da superfície das hifas, surgem os conidióforos, estruturas simples, em forma de cálice e sem ramificação, que terminam em uma vesícula onde ficam inseridas as fiálides uniseriadas, recobrimdo dois terços superiores de sua superfície (Dagenais e Keller, 2009) (**Figura 4**).



Figura 4. Morfologia dos conidióforos e conídios de *A. fumigatus*. Morfologia microscópica de vários conidióforos, onde se observam as fiálides uniseriadas com a produção de conídios (setas vermelhas) durante o crescimento em temperatura de 37°C. Fonte: adaptado de https://www.aspergillus.org.uk/zcombined_images/aspergillus-fumigatus-25/

A. fumigatus é saprofítico e desempenha um papel essencial na reciclagem ambiental de carbono e nitrogênio (Pitt, 1994). Seu nicho ecológico principal é o solo ou vegetação em decomposição onde é capaz de sobreviver e crescer em detritos orgânicos. No entanto, *Aspergillus* produz conídios que se dispersam facilmente no ar, podendo sobreviver em uma ampla gama de condições ambientais (Mullins *et al.*, 1976). *A. fumigatus* possui uma alta capacidade de esporulação, já que cada conidióforo produz milhares de conídios. Os conídios liberados na atmosfera são de diâmetro suficientemente pequeno, cerca de 2 a 5 μm de diâmetro e não há um mecanismo elaborado para liberação destes conídios, já que a disseminação se dá simplesmente por perturbações do ambiente e forte corrente de ar. Uma vez que os conídios estão no ar, o seu tamanho pequeno os torna flutuantes e tende a mantê-los no ar, tanto em ambientes internos quanto em espaços abertos (Dagenais e Keller, 2009; Perez-Nadales *et al.*, 2014). Além disso, *A. fumigatus* é um fungo termo tolerante, capaz de apresentar crescimento em uma faixa de temperatura de 12°C e 52°C e sobreviver a temperaturas de até 70 °C (Perez-Nadales *et al.*, 2014). Todos esses fatores contribuem para que *A. fumigatus* seja uma das espécies mais ubíquas de fungos filamentosos (Tekaiia e Latge, 2005).

Estudos ambientais indicam que todos os seres humanos inalam, pelo menos, centenas de conídios de *A. fumigatus* por dia (Dagenais e Keller, 2009; Perez-Nadales *et al.*, 2014). O gênero *Aspergillus* inclui cerca de 200 espécies, sendo algumas consideradas importantes patógenos em humanos. As doenças fúngicas apresentam um largo espectro de manifestações clínicas que variam desde infecções superficiais de pele até infecções invasivas, sendo as infecções superficiais mais comuns

e mais fáceis de curar. Já as invasivas são menos frequentes, porém oferecem risco à vida. Dentre as espécies patogênicas desse gênero, *A. fumigatus* é o agente etiológico de cerca de 90% das infecções diagnosticadas (Latge, 1999; Dagenais e Keller, 2009). Portanto, considerando a sua capacidade em sobreviver em uma vasta gama de condições ambientais e dispersão eficaz no ar, e por possuir características físicas que permitem que os conídios atinjam as vias respiratórias distais, e consequente adaptação rápida no meio ambiente hospedeiro, *A. fumigatus* pode ser considerado um importante patógeno pulmonar (Kwon-Chung e Sugui, 2013).

A capacidade do fungo de se adaptar a altas temperaturas, estresse oxidativo, limitações de nutrientes, condições de hipóxia, assim como a sua capacidade de sintetizar metabólitos secundários e secretar enzimas para a absorção de nutrientes, contribuem para a sobrevivência de *A. fumigatus* no interior do corpo humano, fazendo assim com que sua patogenicidade seja influenciada por várias características (Latge, 2001; Dagenais e Keller, 2009).

Os fungos do gênero *Aspergillus* causam uma ampla gama de doenças humanas, dependendo do estado imunológico do hospedeiro (Denning, 1998), sendo uma delas a aspergilose pulmonar, uma infecção de prognóstico reservado, que ocorre principalmente em indivíduos imunossuprimidos e hospitalizados e é dispersa em todas as regiões geográficas. As taxas de mortalidade variam de 50% a 95% em populações de alto risco e são dependentes de fatores como estado imunológico do hospedeiro, local da infecção e regime de tratamento aplicado (Balloy e Chignard, 2009; Margalit e Kavanagh, 2015). Além disso, desde o início da atual pandemia, também existe uma crescente preocupação de que os pacientes com a doença do coronavírus 2019 (coronavirus disease 2019 - COVID-19) possam estar em risco de desenvolver uma co-infecção com aspergilose pulmonar que agrava ainda mais o quadro dos pacientes (Gangneux *et al.*, 2020).

São conhecidas três formas da doença: a aspergilose saprofítica, caracterizada pela colonização das vias aéreas ou pela formação da bola fúngica (também chamada aspergiloma); a aspergilose broncopulmonar alérgica, na qual há a indução de uma resposta imune desencadeada pela secreção de toxinas e alérgenos pelo fungo em desenvolvimento; e a aspergilose pulmonar invasiva, que tem como características a proliferação e crescimento das hifas invasivas dentro do tecido pulmonar (Margalit e Kavanagh, 2015).

1.2.2 Patogênese e aspectos imunológicos da aspergilose

Após a inalação dos conídios presentes no ar, estes entram nas vias aéreas e se depositam nos alvéolos pulmonares ou bronquíolos, ocorrendo assim a infecção por *A. fumigatus* (**Figura 5**) (Ben-Ami *et al.*, 2010). Em indivíduos imunocompetentes, os conídios inalados são rapidamente eliminados pelas células do sistema imunológico pulmonar (Margalit e Kavanagh, 2015) sendo que, as barreiras físicas e a imunidade inata são de grande importância para a defesa do hospedeiro. As células epiteliais do trato respiratório superior contribuem para a eliminação de microrganismos e partículas exógenas, a partir da

secreção de muco e pelo transporte ativo mediado por cílios. Nos alvéolos, os pneumócitos são responsáveis pela secreção do surfactante pulmonar, com atividade antimicrobiana. No entanto, em pacientes imunocomprometidos os conídios podem escapar dessas defesas (Perez-Nadales *et al.*, 2014; Brune *et al.*, 2015). Assim, os conídios que foram depositados nos espaços alveolares, até o momento, estavam em estado de repouso mas, logo se entumescem e tornam-se metabolicamente ativos perdendo a camada *rodlet*, uma camada de hidrofobinas que recobrem a parede celular fúngica (Margalit e Kavanagh, 2015; Erwig e Gow, 2016). Nesse contexto, há a exposição de componentes pertencentes à parede celular do fungo, o que culmina no desencadeamento da resposta imune pró-inflamatória no hospedeiro (Perez-Nadales *et al.*, 2014). Quando não eliminados eficientemente pelo sistema imune inato do pulmão, esses conídios podem germinar em hifas que colonizarão o tecido pulmonar (Dagenais e Keller, 2009).

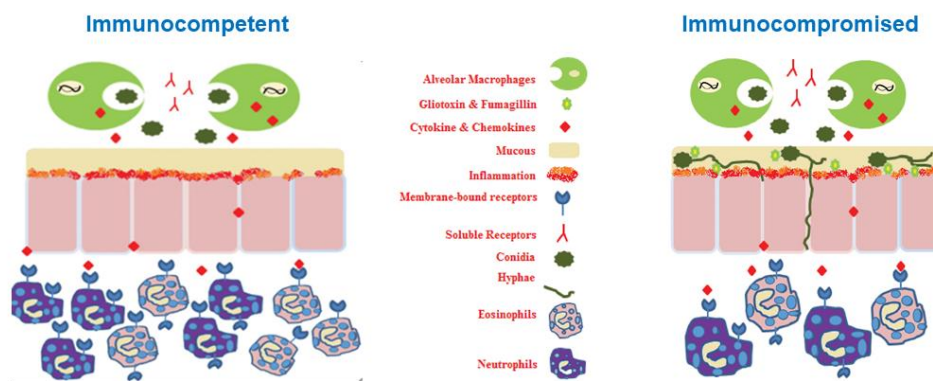


Figura 5. Resposta imune inata ao *A. fumigatus* na superfície alveolar. Em indivíduos imunocompetentes os conídios inalados são rapidamente eliminados pelas células do sistema imunológico pulmonar. Já o pulmão dos indivíduos imunocomprometidos fornece um ambiente propício ao crescimento dos conídios. Fonte: Adaptado de Margalit e Kavanagh, 2015.

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa contra os conídios entumescidos e metabolicamente ativos. A defesa contra a aspergilose conta com importantes células inatas como macrófagos, neutrófilos, monócitos e células dendríticas (Margalit e Kavanagh, 2015). O desencadeamento da resposta imune está relacionado com o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (pathogen-associated molecular patterns - PAMPs) do fungo, por intermédio de PRRs presentes nos macrófagos alveolares e células epiteliais do hospedeiro. Os TLRs 2 e 4 e o receptor de lectina do tipo C (C like receptor - CLR) dectina-1, são os mais bem caracterizados PRRs envolvidos no reconhecimento de *A. fumigatus* e na ativação das células do hospedeiro. Os conídios e as hifas são capazes de ativar macrófagos pelos receptores TLR2 e TLR4, enquanto dectina-1 é específica para os carboidratos β (1,3)-glucana do fungo, moléculas que estão normalmente mascaradas na parede celular dos conídios. Com a perda da camada *rodlet*, há a germinação dos conídios (tubos germinativos) e a β

(1,3)-glucana torna-se exposta sendo então reconhecida por dectina-1. Os sinais de dectina-1 ativam a via do fator nuclear κ B (nuclear factor - NF- κ B) e induzem a expressão de citocinas e quimiocinas, que são importantes para a defesa do hospedeiro contra este organismo e também para o recrutamento de neutrófilos, incluindo TNF, IL-8, IL -6, IL -1 α , IL-1 β , fator estimulador de colônia de granulócitos (granulocyte colony stimulating factor - G-CSF), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (granulocyte and macrophage colony stimulating fator - GM-CSF), proteína inflamatória de macrófagos (macrophage inflammatory protein - MIP) -1 α e a MIP-1 β , os ligantes de CXCR2, as quimiocinas CXCL1/KC e CXCL2/MIP-2 e a citocina IL-10, indicando que há também um controle da resposta inflamatória (Chai *et al.*, 2011; Margalit e Kavanagh, 2015; Valiante *et al.*, 2015; Erwig e Gow, 2016).

Os neutrófilos representam a primeira linha de defesa do organismo contra patógenos e são componentes essenciais das respostas inflamatórias agudas, participando ativamente da resolução da infecção microbiana (Cox, 1998). Na infecção por *A. fumigatus*, eles são rapidamente recrutados para os alvéolos, têm a capacidade de fagocitar tanto conídios quanto tubos germinativos e são considerados as principais células de defesa contra as hifas, devido à sua capacidade de produção de espécies reativas de oxigênio (reactive oxygen species - ROS), liberação de conteúdo granular e formação de armadilhas extracelulares dos neutrófilos (neutrophils extracellular traps - NETs). Desta forma, um dos pontos substanciais desta infecção fúngica é que indivíduos neutropênicos, devido a tratamentos ou doenças que causam imunossupressão, estão especialmente mais propensos a infecções provocadas por patógenos oportunistas, como *A. fumigatus* (Latge, 2001; Perez-Nadales *et al.*, 2014; Margalit e Kavanagh, 2015). Além dos neutrófilos, estudos já demonstraram que os macrófagos alveolares também possuem um papel decisivo nos estágios iniciais da infecção por *A. fumigatus*. Ambas células possuem atividade antimicrobiana e fatores relacionados à imunidade humoral, como complemento por exemplo, o que as tornam células decisivas no processo. Estudos mostraram que camundongos com macrófagos alveolares depletados foram ineficientes em controlar a infecção por *A. fumigatus* mesmo com um alto número de neutrófilos recrutados. Da mesma maneira, o contrário também ocorreu, já que camundongos que sofreram depleção de neutrófilos também não conseguiram controlar a infecção. Esses dados indicaram que existe uma atividade colaborativa entre macrófagos alveolares e neutrófilos para a eliminação dos conídios, desempenhando importantes funções nos mecanismos de resistência do hospedeiro. (Dagenais e Keller, 2009; Margalit e Kavanagh, 2015; Erwig e Gow, 2016).

A ativação do sistema imune inato através de PRRs presentes nas células apresentadoras de antígenos (antigen presenting cells - APCs) podem também regular o desenvolvimento de células T e, conseqüentemente, desencadear respostas imunes adaptativas. APCs expressam uma ampla gama de PRRs que fornecem a conexão entre a imunidade inata e adaptativa (Thakur *et al.*, 2015). Vários fatores contribuem para a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ por *A. fumigatus*, incluindo a frequência de exposição e o tipo de antígeno. Estudos demonstraram que camundongos desafiados repetidamente com conídios de *A. fumigatus* apresentaram um predomínio de IgE, eosinófilos e IL-4, que são característicos

de Th2, o que contribui para o desenvolvimento de aspergilose broncopulmonar alérgica. Uma resposta Th2 exagerada está associada a uma reação inflamatória prejudicial como a eosinofilia, aumento da produção do muco e troca de classe de imunoglobulina para IgE. Exposições repetidas em modelo murino de infecção por *A. fumigatus* também podem resultar em um aumento no recrutamento de células Th17. Estudos indicam que uma resposta Th17 pode estar diretamente envolvida em uma doença fúngica alérgica. Em um trabalho desenvolvido por Murdock *et al* foi demonstrado que camundongos knockout para IL-17, desafiados repetidamente com conídios de *A. fumigatus*, apresentaram uma atenuação da inflamação e redução significativa de eosinófilos (Murdock *et al*, 2012).

A incidência de doenças fúngicas tem aumentado significativamente nas últimas décadas e, concomitantemente, tem ocorrido também o aumento de indivíduos imunocomprometidos devido ao aumento do uso de medicamentos imunossupressores. Portanto, uma variedade cada vez maior de pacientes está mais susceptível ao desenvolvimento de infecções invasivas por fungos. Esse aumento da incidência tem reforçado o interesse em compreender os mecanismos pelos quais a doença é prevenida em indivíduos normais e métodos para a modulação imunológica que podem proteger os indivíduos susceptíveis (Hohl e Feldmesser, 2007).

1.2.3 A influência da microbiota na resposta imunológica frente à aspergilose pulmonar

A defesa do hospedeiro contra *Aspergillus* depende principalmente dos fagócitos neutrófilos, macrófagos e monócitos e de populações de células T específicas que incluem Th1, Th17 e Tregs que controlam a extensão e a natureza da resposta imune (Segal, 2009). Evidências indicam que o impacto das interações microbiota comensal-hospedeiro vão muito além do ambiente local e influenciam a função da imunidade inata e adaptativa periférica (Marstrand *et al.*, 2015; Samuelson *et al.*, 2015). Consequentemente, a microbiota intestinal tem uma função imunorreguladora que se expande a partir do intestino e pode desempenhar um papel significativo em doenças pulmonares, tais como as várias formas de aspergilose (Gonçalves *et al.*, 2017).

Mais especificamente, as bactérias filamentosas segmentadas são necessárias para indução de células Th17 para produzir IL-17 e IL-22 no intestino (Ivanov *et al.*, 2009), principalmente pela sua habilidade de aderir às células do epitélio intestinal (Atarashi *et al.*, 2015). Outro fato importante é que estudos confirmaram o papel de bactérias filamentosas segmentadas intestinais na geração de células Th17 nos pulmões durante a infecção experimental por *A. fumigatus* e esse efeito foi associado com uma sinalização sistêmica do receptor de IL-1 (Mcaleer *et al.*, 2016). É importante destacar que as células Th17 e a sinalização dos receptores de IL-17 também regulam reciprocamente o crescimento de bactérias filamentosas segmentadas, permitindo um controle preciso da disbiose, imunidade Th17 e susceptibilidade à inflamação autoimune (Kumar *et al.*, 2016). Além disso, em um estudo recente realizado com ratos, Kulas *et al.* mostraram que a infecção pulmonar por *A. fumigatus* afeta a

homeostase gastrointestinal aumentando sinais de danos intestinais como elevado infiltrado inflamatório e níveis das citocinas IFN- γ e IL-17, além da diminuição da citocina IL-10. O estudo mostrou também que houve alteração na diversidade da microbiota intestinal (Kulas *et al.*, 2019).

Juntos, estes dados fornecem evidências sobre o papel da microbiota intestinal na regulação da imunidade antifúngica nos pulmões.

1.2.4 Probióticos e a aspergilose pulmonar

Devido à sua importância clínica, muitas pesquisas têm sido realizadas para o desenvolvimento de drogas antifúngicas e estratégias contra aspergilose (Walsh *et al.*, 2008). As melhores formas de se gerenciar a doença incluem prevenção, diagnóstico precoce, início imediato da terapia antifúngica, redução na terapia imunossupressora se possível, e em alguns casos, cirurgia (Jenks e Hoenigl, 2018). Atualmente os compostos utilizados para tratamento incluem três classes principais de antifúngicos, os triazóis, equinocandinas e polienos. Os triazóis incluem itraconazol, voriconazol e posaconazol. O isavuconazol é o azol recém-introduzido contra o *Aspergillus* e aprovado contra a aspergilose (Miceli e Kauffman, 2015). Embora estas drogas antifúngicas sejam eficientes, elas podem desencadear graves efeitos secundários, como nefrotoxicidade e hepatotoxicidade, considerados fatores limitantes para o tratamento (Walsh *et al.*, 2008). Além disso, o surgimento de infecções resistentes a estas drogas representa mais um desafio. A resistência ao itraconazol foi relatada pela primeira vez em 1997 a partir de isolados clínicos da Califórnia, EUA. O aparecimento de resistência ao itraconazol é considerado um motivo de preocupação, uma vez que o surgimento de resistência cruzada aos demais antifúngicos poderia ser devastadora (Fedorova *et al.*, 2008; Walsh *et al.*, 2008).

Com isso, a utilização dos probióticos vem se tornando cada vez mais investigada nesse contexto e recentes evidências sugeriram que os probióticos podem proporcionar benefícios terapêuticos em doenças respiratórias (Alexandre *et al.*, 2014). Organismos do gênero *Lactobacillus* têm sido usados tradicionalmente como probióticos por décadas e são considerados como uma alternativa biológica no combate a bactérias e fungos patogênicos (Matsubara *et al.*, 2016).

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar os efeitos protetores da administração do probiótico *L. delbrueckii* UFV-H2b20 em modelo experimental de aspergilose pulmonar em camundongos.

2.2 Objetivos Específicos

- A. Avaliação do perfil celular, produção de citocinas em linfonodos mesentérico e níveis de IgA nas fezes de camundongos não infectados tratados com *L. delbrueckii* UFV H2b20;
- B. Avaliar o efeito da ingestão de *L. delbrueckii* UFV H2b20 na susceptibilidade dos camundongos frente à infecção por *A. fumigatus*;
- C. Investigar o efeito da ingestão de *L. delbrueckii* UFV H2b20 na depuração fúngica após infecção por *A. fumigatus*;
- D. Avaliar o efeito da ingestão de *L. delbrueckii* UFV H2b20 no dano tecidual e na função pulmonar após infecção por *A. fumigatus*;
- E. Determinar o perfil de células recrutadas para o sítio da infecção por *A. fumigatus* em camundongos tratados com *L. delbrueckii* UFV H2b20;
- F. Avaliar mecanismos de função de neutrófilos e macrófagos em camundongos tratados com *L. delbrueckii* UFV H2b20 frente à infecção por *A. fumigatus*, entre eles, *Killing*, produção de ROS e eferocitose.
- G. Avaliar a indução de células Treg e o perfil de mediadores inflamatórios liberados no sítio da infecção em camundongos tratados com *L. delbrueckii* UFV H2b20 frente à infecção por *A. fumigatus*.
- H. Investigar o efeito da ingestão de lactato na susceptibilidade dos camundongos após infecção por *A. fumigatus*.

3. Materiais e Métodos

3.1 Animais experimentais

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA/UFMG), sob o número do protocolo 246/2018. Foram utilizados camundongos livres de patógenos específicos (SPF, do inglês, *specific pathogen free*), isogênicos, machos, da linhagem BALB/c AnNCrI com 20-26 g de peso e oito a dez semanas de idade, obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os camundongos foram agrupados em três a cinco animais por gaiola em estante ventilada e mantidos em condições de luz controlada, no biotério do Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB - UFMG. Os animais foram mantidos com ingestão de água autoclavada para garantir a viabilidade do probiótico nas mamadeiras dos grupos tratados e como forma de controle nos grupos não tratados. A disponibilidade de ração, água e probiótico foi acompanhada diariamente.

3.2 Cultivo, tratamento com *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 e tratamento com lactato

O microrganismo *L. delbrueckii* UFV-H2b20 foi isolado na Universidade Federal de Viçosa (UFV) de fezes de uma criança recém-nascida e trazido para a UFMG em meio LDR (leite desnatado reconstituído) 12%. Este material foi expandido em 1 L de LDR 12% e cultivado por 18 horas a 37°C. Esta cultura foi alíquotada e estas alíquotas foram usadas como cultura estoque em nossos experimentos. Para a associação dos animais com *L. delbrueckii* UFV-H2b20, 100µL desta preparação eram inoculados em 10 mL de caldo MRS (deMan, Rogosa e Sharpe, Merck, São Paulo, SP, Brasil) e cultivados por 20 horas a 37°C obtendo-se uma cultura na concentração de 10⁹ UFC/ml. A cultura era centrifugada a 2500 x g a 4 °C, lavada uma vez em salina esterilizada e colocada inteiramente na mamadeira dos animais contendo 150 mL água estéril para ingestão. Os animais dos grupos controle recebiam somente água estéril. O tratamento iniciou-se 10 dias antes da infecção com *A. fumigatus* e foi mantido até o dia da eutanásia dos animais. No experimento em que os animais foram tratados com lactato, foi administrada uma solução com 220µL de ácido láctico 85% 50µM/mL (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, EUA) em 50mL de água estéril para os animais tratados. Os animais não tratados receberam 50mL de água estéril. As mamadeiras eram trocadas diariamente e o tratamento foi mantido durante todo o experimento.

3.3 Marcação de *L. delbrueckii* UFV H2b20 com CFSE

L. delbrueckii UFV H2b20 foi cultivado segundo o protocolo acima e o pellet foi ressuscitado em 2 mL de éster de carboxifluoresceína succinimidílico (carboxyfluorescein succinimidyl ester - CFSE) a 10 μ M (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, EUA) e incubado à temperatura ambiente por 1 hora, no escuro, enquanto era gentilmente agitado para garantir uma marcação uniforme. Em seguida, foi centrifugado a 3000 x g a 4° C por 15 minutos e o pellet ressuscitado em 10 mL de salina tamponada com fosfato 0,1 M, pH 7,3 (PBS) e oferecido aos animais por gavagem. 24 e 48 horas após a ingestão, as fezes dos camundongos foram coletadas e 30 mg de cada amostra foi pesada, diluída em 1 mL de PBS e centrifugada a 3000 x g a 4°C por 15 minutos. Os pellets foram ressuscitados em 200 μ L de PBS e a aquisição foi realizada em um citômetro de fluxo FACSCanto (BD). *L. delbrueckii* UFV H2b20 não marcado foi utilizado como controle negativo e *L. delbrueckii* UFV H2b20 marcado como controle positivo. Na análise dos dados foi utilizado o software FlowJo da versão 10.6.1 (FlowJo LLC, Oregon, USA).

3.4 Cultivo, preparo do inóculo e infecção via intranasal de *Aspergillus fumigatus*

Neste trabalho utilizou-se a linhagem CEA-17 de *A. fumigatus* proveniente de um isolado clínico. Os conídios de *A. fumigatus* foram plaqueados em cultura após 48 horas de crescimento a 37 °C em meio YAG (yeast, agar, glucose) completo, composto de 2% p/v de glicose, 2% p/v de ágar, 0,5% p/v de extrato de levedura e elementos de traço (Soriani *et al.*, 2008). Após o crescimento, foram coletados por lavagem com 30 mL de PBS estéril, e filtrados através de uma membrana de *nylon* estéril de 40 μ m para remover fragmentos de hifas. As amostras foram centrifugadas a 500 x g por 10 minutos a 23 °C (Centrífuga 320R, Hettich, Tuttlingen, Alemanha). Após centrifugação, os conídios foram ressuscitados em 1 mL de PBS estéril, diluídos e contados em câmara de Neubauer. A concentração foi ajustada para 1×10^8 células em 40 μ L de suspensão fúngica, antes da inoculação. Foram empregadas, para o inóculo experimental, culturas de *A. fumigatus* que apresentaram, pelo menos, 90% de viabilidade. Após os dez dias de tratamento, os animais controles, que consumiram somente água autoclavada, e os animais tratados, que ingeriram o probiótico, foram anestesiados por vaporização de até 3% de isoflurano (Biochimico, Itatiaia, RJ, Brasil). Aproximadamente 30 segundos após administração do isoflurano, os camundongos foram infectados, via intranasal, com *A. fumigatus*. Para isso, o animal foi contido manualmente e, em seguida, foram administrados 40 μ L da suspensão fúngica pela narina do animal (1×10^8 conídios/animal). Após a administração do fungo, os animais foram mantidos aquecidos e observados até o término do efeito da anestesia. Como controles negativos foram utilizados camundongos não infectados e não infectados tratados com *L. delbrueckii* UFV H2b20 que receberam 40 μ L de solução PBS estéril pela mesma via.

3.5 Análise da sobrevivência de camundongos infectados por *A. fumigatus*

Os camundongos foram inoculados com 1×10^8 conídios viáveis de *A. fumigatus* e a sobrevivência foi acompanhada por um período de 10 dias. A morte dos animais nos diferentes grupos foi registrada diariamente e a curva de sobrevida determinada.

3.6 Avaliação da mecânica respiratória

Para avaliação invasiva in vivo, os camundongos foram anestesiados e traqueostomizados e, em seguida, foram colocados em um pletismógrafo de corpo inteiro para manter a respiração espontânea conectada a um ventilador controlado por computador (Forced Pulmonary Maneuver System®, Buxco Research Systems ©, Wilmington, Carolina do Norte, EUA). Sob respiração mecânica a Capacidade Pulmonar Total (CPT), Complacência (Cchord), Capacidade Vital Forçada (CVF) e a resistência pulmonar basal foram determinadas pelo teste de resistência e conformidade RC. Para medir a complacência (Cchord), as manobras de pressão volume foram realizadas, inflando os pulmões a uma pressão padrão de +30 cm H₂O e, em seguida, expiração lenta até que uma pressão negativa de -30 cm H₂O seja alcançada. Para medir o Volume Expiratório Forçado em 50 milissegundos (FEV50), manobras de volume de fluxo rápido foram realizadas e a curva de fluxo-volume foi registrada durante esta manobra.

3.7 Análises histopatológicas

Após 24 horas de eutanásia, os pulmões foram imediatamente removidos. O pulmão esquerdo foi fixado em solução de formalina 10% (formol tamponado em solução salina) e acondicionado até o processamento das amostras. Em seguida, as amostras foram desidratadas em diferentes concentrações de etanol, diafanizadas em xilol e embebidas em blocos de parafina. Com auxílio de um micrótomo, foram obtidos cortes histológicos de 4 mm de seções do pulmão dispostos em lâminas de microscopia. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (HE) para avaliação do infiltrado inflamatório. As lâminas foram escaneadas em Microscópio Digital – Scanner de Lâminas 3D Histech (Budapeste, Hungria) e analisadas pelo software CaseViewer 3DHistech, versão 2.4

3.8 Determinação de unidades formadoras de colônias (UFC) nos pulmões de animais infectados com *A. fumigatus*

Para avaliar a capacidade do *clearance* fúngico dos pulmões dos animais, o pulmão direito foi removido 24 horas após a infecção. Os animais foram eutanasiados com uma solução de 150 mg/kg de quetamina (Syntec, Cotia, SP, Brasil) e 10 mg/kg de xilazina (Syntec, Cotia, SP, Brasil), por via intraperitoneal. O pulmão coletado foi macerado e homogeneizado em 1 mL de PBS estéril. Após diluição, alíquotas de 100 µL dessa suspensão foram semeadas, em duplicata, com auxílio de bastões de vidro, em placas de Petri (J-Prolab, São José dos Pinhais, Brasil), contendo meio de cultura para fungos a base de extrato de levedura, ágar e glicose (YAG) Em seguida, as placas foram incubadas em estufa incubadora BOD (TE-371 – Tecnal, Piracicaba/SP-Brasil), sob câmara úmida a 37 °C. As unidades

formadoras de colônias foram contadas após 20 horas de crescimento e o resultado foi expresso em número de UFC x10⁶ por pulmão direito.

3.9 Coleta do lavado Broncoalveolar (BAL)

Após a eutanásia, a traqueia de cada animal foi exposta e canulada com um cateter de polipropileno (1,7 mm). O lavado foi realizado pela injeção de três alíquotas de 0,7 mL de PBS estéril gelado, homogeneizadas por três vezes cada uma, obtendo-se aproximadamente 2 mL de volume final recuperado do lavado. O fluido recolhido do lavado foi centrifugado 300 x g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante resultante foi coletado e armazenado em freezer -20 °C para posteriores análises. O sedimento de células foi ressuscitado em 100 µL de solução de PBS para a contagem total e diferencial de leucócitos ou marcação para citometria.

3.10 Contagem total e diferencial das células do BAL

A contagem do número total de leucócitos presentes no BAL foi realizada na diluição de 1:10 empregando solução de Turk (Renylab, Barbacena, MG, Brasil) em câmara de Neubauer e visualização em microscópio óptico. A contagem diferencial das células foi realizada em lâminas preparadas em citocentrífuga (CT-2000, Cientec, Belo Horizonte, MG, Brasil), a 95 x g por 5 minutos, e submetidas à coloração com *kit* Panótico rápido (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil), seguida de visualização em microscópio óptico em objetiva de imersão (100 x). Para cada lâmina examinada, foram contados 200 leucócitos, diferenciados por critérios morfológicos em quatro tipos celulares: neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e linfócitos. A quantidade de cada tipo celular foi calculada a partir da porcentagem encontrada em relação ao número total de células. Os valores obtidos foram expressos em número de células por mL de BAL.

3.11 Avaliação da atividade de mieloperoxidase (MPO)

O acúmulo de neutrófilos no tecido pulmonar foi avaliado por meio do ensaio de atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Após 24 horas de infecção, a eutanásia dos animais foi realizada e cem miligramas de tecido pulmonar obtidos de animais controle e infectados foram homogeneizados, utilizando-se homogeneizador elétrico de tecidos (Power Gen 125 – Fisher 23 Scientific, Lenexa, Kansas, EUA), em 1,9 mL de tampão I (0,1M NaCl, 0,02M Na₃PO₄, 0,015M NaEDTA, pH 4,7) e centrifugados a 300 x g por 10 minutos a 4°C, descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi submetido à lise hipotônica com 1,5 mL de solução NaCl 0,2% durante 30 segundos seguida pela adição de igual volume da solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5% e submetido a centrifugação a 300 x g por 10 minutos a 4°C. O precipitado foi suspenso em tampão II (0,05M Na₃PO₄ - pH 5,4, contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio) e homogeneizado. As suspensões foram submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido e centrifugadas por 15 minutos a 300 x g a 4°C, coletando-se o sobrenadante para o ensaio. O ensaio de MPO foi conduzido adicionando-se

25 µL da amostra, na diluição 1:3, em duplicata, em microplaca de 96 poços (o tampão II – 25 µL/poço corresponde ao branco). A reação foi iniciada pela adição de 25 µL do substrato 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, Sigma-Aldrich) dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck, Darmstadt, Alemanha) com concentração final de 1,6 mM e incubação a 37 °C por 5 minutos. Após, adicionaram-se 100 µL de peróxido de hidrogênio diluído numa concentração final de 0,002% (v/v) em tampão II e as placas foram incubadas a 37 °C por 5 minutos. Acrescentaram-se 100 µL de ácido sulfúrico 1 M para término da reação. A atividade de MPO foi avaliada pela medida das alterações na densidade óptica em espectrofotômetro de microplacas (µQuant™, Biotek, Winooski, VT, EUA) a 450 nm. Os resultados foram expressos em unidades relativas de acordo com uma curva padrão de neutrófilos purificados (> 95% pureza) da cavidade peritoneal de camundongos estimulados com caseína 5%.

3.12 Avaliação da atividade de N-acetilglicosaminidase (NAG)

O acúmulo de macrófagos no tecido pulmonar foi avaliado pelo ensaio de atividade da enzima NAG, conforme Barcelos *et al* (Barcelos *et al.*, 2005). Cem miligramas de tecido pulmonar obtidos de animais controle e infectados foram homogeneizados em 1,9 mL de tampão I (ver acima) e centrifugados a 300 x g por 10 minutos a 4°C, descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi submetido à lise hipotônica com 1,5 mL de solução NaCl 0,2% durante 30 segundos seguida pela adição de igual volume da solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5%. Após centrifugação a 300g por 10 minutos a 4°C, o precipitado foi suspenso e homogeneizado em solução salina 0,9% com 0,1% v/v de Triton X-100, seguido de centrifugação a 300 x g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi coletado para o ensaio. A reação foi realizada pela adição de 100 µL da amostra em microplacas de 96 poços, seguido da adição de 100 µL de *p*-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminidina (Sigma-Aldrich, Inc.) diluído em tampão citrato/fosfato (C₆H₈O₇ 0,1 M; Na₂HPO₄ 0,1M, pH 4,5) e incubação a 37 °C por 10 minutos. O término da reação ocorreu pela adição de 100 µL de tampão glicina 0,2 M (pH 10,6). Foi realizada leitura em espectrofotômetro de microplacas em comprimento de onda de 405 nm (Biochrom, Cambridge, UK). O número de macrófagos foi calculado a partir de uma curva-padrão de atividade de NAG expressa a partir de macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos estimulados com tioglicolato 3%. Os resultados foram expressos em número relativo de macrófagos em 100 mg de tecido.

3.13 Avaliação da atividade de peroxidase eosinofílica (EPO)

A avaliação da atividade de EPO por análise colorimétrica é utilizada como uma medida indireta da quantidade de eosinófilos no tecido (Strath *et al.*, 1985). Cem miligramas de tecido pulmonar obtidos de animais controle e infectados foram homogeneizados em PBS 5% e centrifugados a 300 x g por 10 minutos a 4 °C, descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi submetido à lise hipotônica com 1,5 mL de solução NaCl 0,2% durante 30 segundos seguida pela adição de igual volume da solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5%. Após centrifugação a 300 x g por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante

foi descartado e o precipitado foi suspenso e homogeneizado em solução PBS com 0,5% brometo de hexadeciltrimetilamônio (Sigma-Aldrich, Inc., St.). As amostras foram homogeneizadas e submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido e centrifugadas a 300g por 15 minutos a 4°C, coletando-se o sobrenadante para o ensaio. A reação foi realizada pela adição de 75 µL do sobrenadante em microplacas de 96 poços, seguido da adição de 75 µL do substrato (1,5 mM de di-hidro-clorito de *o*-fenilenodiamina d - OPD em tampão Tris-HCl 0,075 mM, pH 8,0, acrescido de H₂O₂ 6,6 mM). Após 30 minutos de incubação no escuro, a reação foi interrompida pela adição de 50 µL de H₂SO₄ e realizada leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 492 nm.

3.14 Quantificação de proteínas

A quantificação das proteínas totais no BAL foi feita por *kit* específico (Bio-Rad *Protein Assay*, Lagoa Santa, Brasil), com base no método de Bradford (Bradford, 1976) e foi utilizado para avaliar o extravasamento de proteínas plasmáticas para os alvéolos. A reação foi realizada pela adição de 40 µL do reagente para 160 µL do sobrenadante do BAL em microplacas de 96 poços. A D.O. foi avaliada em espectrofotômetro de microplaca com filtro de 595 nm e a concentração de proteínas das amostras foi avaliada a partir da curva padrão contra a absorbância, com concentrações que foram de 5 a 30 pg/mL. Os resultados são apresentados em mg/mL.

3.15 Quantificação de citocinas, quimiocinas e IgA por ELISA

As concentrações de citocinas e quimiocinas foram quantificadas no sobrenadante do BAL de animais tratados ou não com *L. delbrueckii* UFV H2b20, 24 horas após a infecção por *A. fumigatus* e as concentrações de IgA total foram quantificadas nas fezes de animais tratados com *L. delbrueckii* UFV H2b20 não infectados, ambos pelo método imunoenzimático de ELISA sanduíche, utilizando-se kits de anticorpos murinos específicos, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, EUA) para as citocinas e quimiocinas e Southern Biotech, Birmingham, AL, US para IgA. As amostras de sobrenadante do BAL foram processadas como especificado acima e as de fezes foram coletadas e 30 mg por amostra foram diluídas em 200 mL de PBS e centrifugadas a 50 x g por 2 min. Os sobrenadantes das amostras foram coletados para a realização do ensaio. Anticorpos de captura foram adicionados a 50 µL/poço em microplacas de 96 poços (C96 MicroWell™ Plates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), na concentração indicada pelos fabricantes. Após a sensibilização das placas durante 18 horas a 4°C, as placas foram lavadas três vezes com solução PBS acrescida de 0,05% de Tween 20 (tampão de lavagem). Após as sucessivas lavagens, foram adicionados 200 µL/poço do tampão fosfato com 1% de albumina de soro bovino (Bovine Serum Albumine – BSA) seguido de incubação à temperatura ambiente por uma hora. Após o bloqueio, os poços foram novamente lavados com tampão de lavagem e adicionados 50 µL das amostras experimentais. Foi preparada a curva-padrão com as citocinas recombinantes de acordo com as instruções do fabricante. As placas foram incubadas a 4°C por 18 horas. Após incubação, as placas foram lavadas com tampão

de lavagem e foram adicionados 50 µL/poço dos anticorpos de detecção biotinizados, na concentração indicada pelo fabricante. As placas foram incubadas por duas horas à temperatura ambiente. Após a incubação, foi realizado novo ciclo de lavagem com tampão de lavagem, seguido da adição de 100 µL/poço de solução de estreptavidina conjugada com peroxidase (HRP-Streptavidin, Pharmigen, San Diego, California, EUA - 1:4000) e incubação por 20 minutos à temperatura ambiente. As placas foram submetidas novamente ao ciclo de lavagem e realizada a revelação da reação pela adição de 50 µL/poço de solução de 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis,) e incubação por 20 minutos à temperatura ambiente no escuro. A reação foi bloqueada adicionando-se 25 µL/poço de H₂SO₄ 1M. A densidade ótica foi avaliada em espectrofotômetro de microplaca com filtro de 492 nm e a concentração calculada a partir da curva padrão.

3.16 Obtenção de macrófagos e neutrófilos da medula óssea

Camundongos BALB/c AnNCrI de 8 a 10 semanas tratados e não tratados com *L. delbrueckii* UFV H2b20 foram eutanasiados e tiveram seus ossos fêmur e tíbia retirados para coleta da medula óssea. Para isso, as epífises foram cortadas e foram injetados, pelas extremidades, 3 mL de solução tampão fosfato salina (PBS) complementado com 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (GIBCO). A suspensão celular obtida foi submetida à centrifugação à 400 x g durante 8 minutos a 4°C. Para a aquisição dos macrófagos, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em meio DMEM F12 (GIBCO). Após isto, foram incubadas em placa de Petri (JProLab) por nove dias em meio DMEM F12 (GIBCO) complementado com 10% de soro fetal bovino inativado, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina e 20% de sobrenadante de cultura de fibroblastos L929, que produzem o fator M-CSF responsável pela diferenciação das células precursoras em macrófagos. As células foram mantidas em 10 mL de meio DMEM F12 (GIBCO) por quatro dias, após esse período foram adicionados mais 5 mL do meio DMEM F12 (GIBCO). Finalmente, após sete dias em cultura, os macrófagos foram removidos da placa com PBS gelado, a concentração celular foi ajustada para necessidade de cada ensaio a ser feito com os macrófagos obtidos. Durante todo o processo de diferenciação e para todos os ensaios as células foram incubadas em estufa de atmosfera úmida a 37°C e 5% de CO₂ (Eppendorf, Hamburg, Alemanha).

Para a aquisição dos neutrófilos, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em meio RPMI (GIBCO) ou Percoll® 52% (GIBCO). A separação de neutrófilos foi feita por centrifugação a 400 x g por 30 minutos a 4°C, em gradiente de densidade usando Histopaque® 1119-1 e 1077-1 (GIBCO) ou gradiente de Percoll® 52%, 64% e 72% (GIBCO) em PBS. As hemácias foram lisadas pela adição de água seguida pela adição de PBS 10x, na proporção de 9:1. Os neutrófilos foram contados em câmara de Neubauer. A pureza dos neutrófilos em todos os experimentos foi acima de 80%.

3.17 Killing dos conídios pelos neutrófilos *in vitro*

O ensaio de *killing* foi realizado por incubação dos neutrófilos obtidos da medula de animais tratados e não tratados com *L. delbrueckii* UFV H2b20, com conídios de *A. fumigatus* por 6 horas a 37°C com 5% de CO₂ na proporção de 1:5. Para determinar o *killing* de *A. fumigatus*, as células foram lisadas com água destilada, as amostras diluídas foram plaqueadas em meio para fungo e as unidades formadoras de colônia (UFC) foram determinadas após incubação overnight a 37°C. A porcentagem do *killing* foi calculada como a porcentagem de viabilidade após incubação sem os neutrófilos.

3.18 Ensaio de eferocitose

Após a obtenção dos macrófagos e neutrófilos de medula óssea dos animais tratados e não tratados com *L. delbrueckii* UFV H2b20, o ensaio de eferocitose foi realizado. Os neutrófilos apoptóticos para o ensaio foram obtidos após os neutrófilos derivados da medula serem expostos a irradiação ultravioleta por 3 horas. Após isto, foi feita a incubação dos macrófagos e neutrófilos por 3h a 37 °C com 5% de CO₂, na proporção de 3:1. Após, foram realizadas as preparações de lâminas de cytospin e coloração com o kit de Panótico rápido. O índice fagocítico foi avaliado pela contagem de neutrófilos apoptóticos dentro de macrófagos.

3.19 Imunofluorescência

Neutrófilos de camundongos tratados e não tratados com *L. delbrueckii* UFV H2b20, na quantidade de 5×10^5 por poço, foram incubados por 30 minutos com a sonda diidroetídio (DHE) (Invitrogen) (1 μ M) na estufa de atmosfera úmida a 37°C e 5% de CO₂, lavadas três vezes com PBS e novamente incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por mais 30 minutos. O ensaio de imunofluorescência foi realizado a partir da incubação destes neutrófilos com conídios de *A. fumigatus*, na proporção de 5:1 por 1 hora a 37 °C com 5% de CO₂. Após a incubação, a produção de ROS pelos neutrófilos foi avaliada por imunofluorescência. Brevemente, os neutrófilos de animais tratados e não tratados com *L. delbrueckii* UFV H2b20 e estimulados com zimosan foram colocados em preparações de lâminas de cytospin e fixados com formaldeído 4%. As amostras foram permeabilizadas com triton X-100 1%. Posteriormente, houve a marcação das células com DAPI (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EUA). As preparações foram visualizadas em microscópio Confocal Nikon Ti A1R equipado com detector espectral e estágio motorizado XYZ. As imagens foram adquiridas utilizando objetiva de 20x e com definição de 1024x1024.

3.20 Citometria de fluxo

Células do BAL dos animais tratados ou não com *L. delbrueckii* UFV H2b20 foram coletados após 24 horas de infecção para análise por citometria de fluxo. As amostras foram centrifugadas a 300 x g por 10 minutos a 4 °C. Para os experimentos onde foram avaliadas a produção de ROS, as células dos camundongos tratados e não tratados com *L. delbrueckii* UFV H2b20 foram incubados por 30 minutos com a sonda diidroetídio (DHE) (Invitrogen) (1 μ M) na estufa de atmosfera úmida a 37°C e 5%

de CO₂, lavadas três vezes com PBS e novamente incubadas em a 37°C e 5% de CO₂ por mais 30 minutos antes de serem submetidas a marcação com os anticorpos. Para análise das células dos linfonodos mesentéricos dos animais não infectados, tratados ou não com *L. delbrueckii* UFV H2b20, após 10 dias de tratamento os linfonodos mesentéricos foram coletados, macerados, centrifugados a 300 x g por 10 min a 4 °C e o sobrenadante descartado. As células do BAL ou linfonodos mesentéricos foram então marcadas por 20 minutos com diferentes combinações de anticorpos: anti-CD45 (clone 30-F11); anti-CD11b (clone M1/70); anti-CD11c (clone HL3); anti-F4/80 (clone BM8); anti-Ly6C (clone HK1.4); anti-CD103 (clone 2E7) anti-Ly6G (clone 1A8-Ly6g) anti-TCR β (clone H57-597), anti-CD4 (clone GK1.5) e anti-CD16/32 (clone 2.4G2). Em seguida, adicionou-se 1 mL de PBS a 4°C e as amostras foram centrifugadas a 400 x g por 10 minutos a 4°C para remoção de excesso de anticorpos, este procedimento foi repetido por três vezes. Em seguida, as células foram fixadas e permeabilizadas com o kit de marcação de fatores de transcrição eBioscience™, (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, EUA) e marcadas por 45 minutos a 4°C com os anticorpos)anti-ROR γ t (clone Q31-378) e anti-FOXP3 (clone MF23). Todos os anticorpos usados foram adquiridos da BD (BD Biosciences Pharmingen). Para a exclusão de células mortas foi utilizado o kit de marcação LIVE/DEAD Aqua (Thermofisher). Ao final das marcações, as células foram lavadas duas vezes e ressuspensas em PBS 10% soro fetal bovino. A aquisição foi realizada em um citômetro de fluxo LSRFortessa™ (BD). As análises foram realizadas no software FlowJo.

3.21 Análises Estatísticas

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM) para cada grupo. Nos ensaios de cinética de produção de citocinas foi realizado o teste Two-Way ANOVA, seguido de Sidak para determinar diferenças entre os tempos e os grupos avaliados. Para determinar diferenças entre os grupos, foi utilizado o teste *t* de Student usando distribuição bi-caudal com amostras não pareadas, após a aplicação do teste de normalidade e verificação da simetria dos dados. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism versão 8.00 Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1 Avaliação da imunomodulação prévia causada por *L. delbrueckii* UFV H2b20 no intestino, antes do desafio com *A. fumigatus*

4.1.1 *L. delbrueckii* UFV H2b20 permanece no intestino dos camundongos até 24 horas após a ingestão

Inicialmente, verificamos se os camundongos estavam ingerindo a preparação probiótica administrada nas mamadeiras, medindo a quantidade de líquido ingerido pelos grupos. Como pode ser observado na **figura 6**, o grupo que ingeriu somente água e o grupo que ingeriu *L. delbrueckii* UFV H2b20 ressuspensão na água consumiram a mesma quantidade de líquido (**Fig. 6A**). Em seguida, determinamos se *L. delbrueckii* UFV H2b20 poderia ser encontrado nas fezes dos camundongos que receberam o probiótico marcado com CFSE por gavagem para confirmar sua presença no intestino. Observamos que bactérias ainda podem ser encontradas 24 horas, após sua administração, nas fezes dos animais tratados, como evidenciado pela curva na cor vermelha no histograma, mas não após 48 horas (**Figura 6B**).

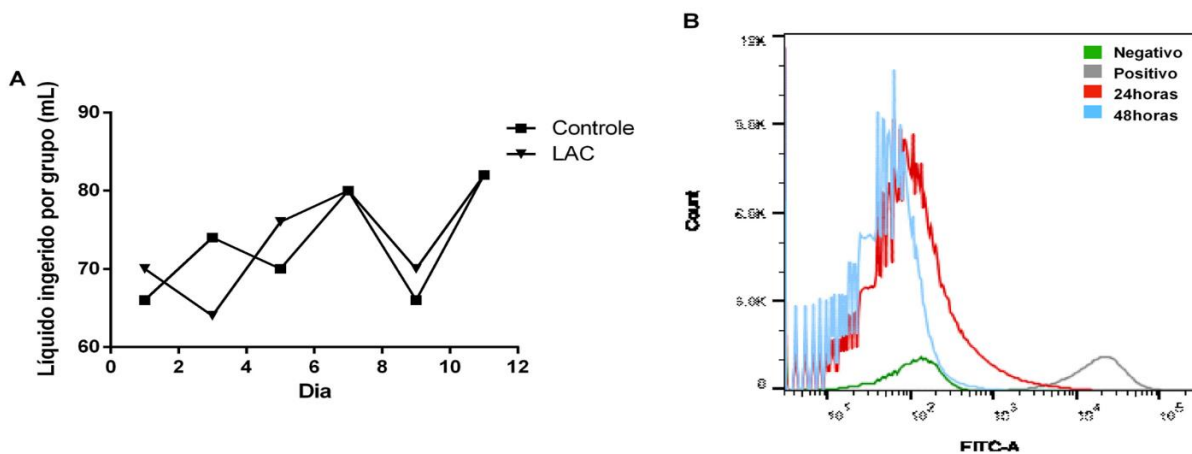


Figura 6. Avaliação da ingestão de *L. delbrueckii* UFV H2b20. **A)** Quantidade de líquido ingerido diariamente. Os camundongos receberam *L. delbrueckii* UFV H2b20 vivo que foi previamente marcado com CFSE por gavagem. **B)** Em diferentes momentos após o tratamento, as fezes foram coletadas e a fluorescência avaliada por citometria de fluxo. Verde: *L. delbrueckii* UFV H2b20 não marcado; Cinza: *L. delbrueckii* UFV H2b20 marcado com CFSE; Vermelho: *L. delbrueckii* UFV H2b20 marcado com CFSE nas fezes 24 horas após a ingestão; Azul: *L. delbrueckii* UFV H2b20 marcado com CFSE nas

fezes 48 horas após a ingestão. Os resultados de A são a média de dois experimentos independentes e os resultados de B são representativos de dois experimentos independentes. (n = 5 camundongos por experimento).

4.1.2 *L. delbrueckii* UFV H2b20 modula o sistema imune dos camundongos após ingestão

Após confirmada a presença de *L. delbrueckii* UFV H2b20 no intestino dos camundongos, avaliou-se, por citometria de fluxo de acordo com a estratégia mostrada na figura 7A, a quantidade e variedade de leucócitos nos linfonodos mesentéricos dos animais. Este experimento foi realizado com o intuito de avaliar se o tratamento com o probiótico foi capaz de modular a resposta imune antes dos animais serem desafiados com o patógeno. Observa-se na **figura 7** que, apesar dos animais tratados com *L. delbrueckii* UFV H2b20 apresentarem as mesmas quantidades de leucócitos totais nos linfonodos mesentéricos, em comparação aos não tratados (**Figura 7B**), foram observadas diferenças em alguns tipos celulares. Os animais tratados apresentaram maiores números de macrófagos (**Figura 7C**), células dendríticas totais (**Figura 7D**), células dendríticas CD103⁺, que tem conhecido perfil tolerogênico na mucosa intestinal (**Figura 7E**), linfócitos T CD4⁺ efetores (**Figura 7F**) e linfócitos T reguladores (**Figura 7H**). Não foram observadas diferenças nos números de linfócitos Th17 entre os grupos (**Figura 7G**). Além disso, foram quantificadas as citocinas no sobrenadante da cultura das células dos linfonodos mesentéricos estimulados com *L. delbrueckii* UFV H2b20 morto por calor e também foi avaliada imunoglobulina A (IgA) nas fezes destes animais através de ELISA. As citocinas avaliadas foram TGF- β , IL-10, IFN- γ e IL-17, no entanto, todas estavam abaixo dos limites de detecção (dados não mostrados). Já com relação a IgA, foi observado um aumento nos níveis totais desta imunoglobulina (**Figura 7I**).

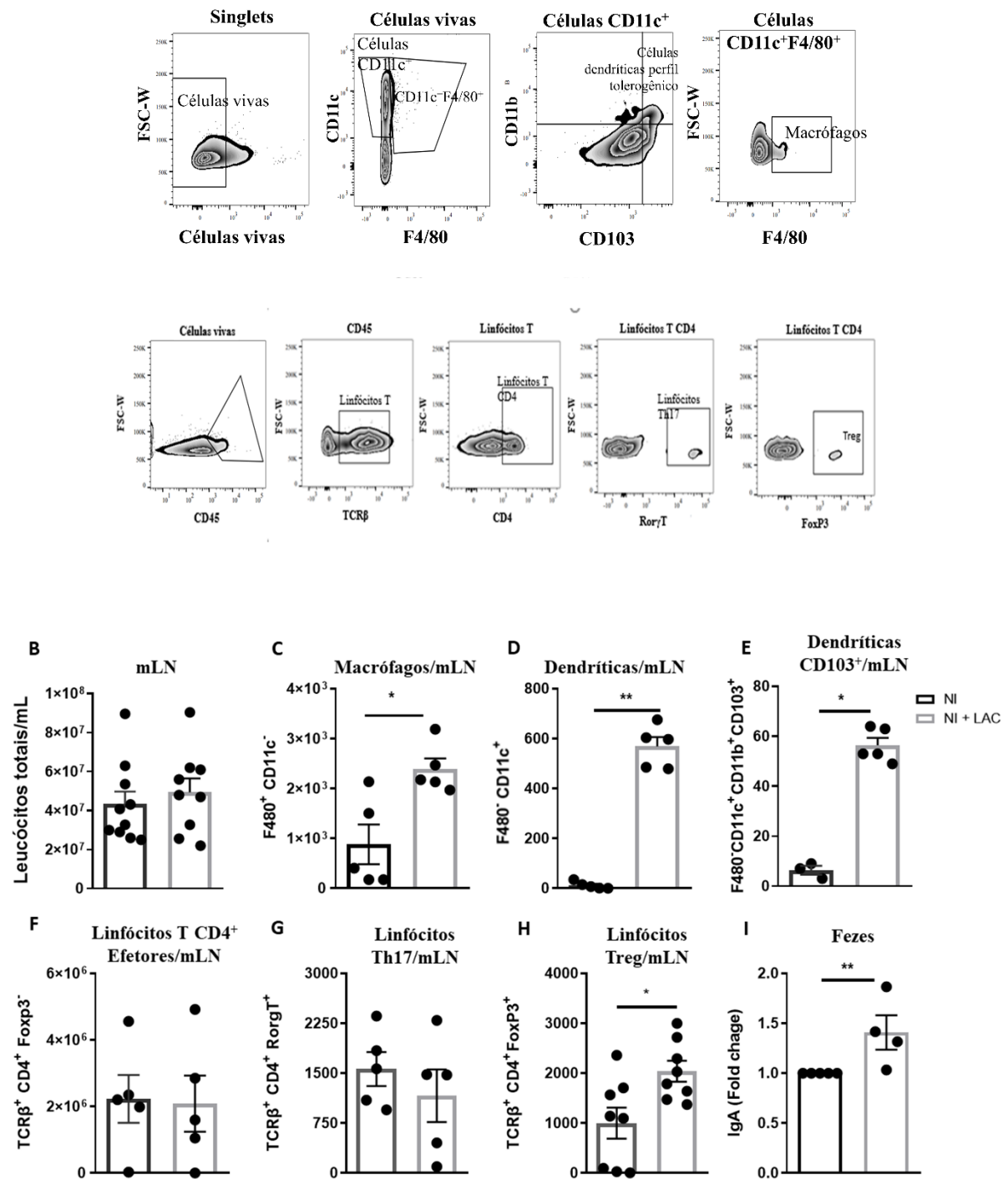


Figura 7. Análise de leucócitos nos linfonodos mesentéricos e IgA nas Fezes: Camundongos não infectados foram submetidos a 10 dias de tratamento com *L. delbrueckii* UFV H2b20 (NI+LAC) para posterior avaliao de leucócitos nos linfonodos mesentéricos (mLN). Os animais controles ingeriram apenas gua (NI). Os linfonodos foram coletados, macerados e centrifugados a 400 x g por 10 minutos a 4C. O sedimento de células foi ressuspensado em 1 mL de RPMI (GIBCO) 10% SFB para contagem (1×10^6 por poço) e marcados para análise por citometria de fluxo. **A**) Estratégia de *gating*; **B**) Contagem de leucócitos totais no microscópio óptico; **C**) Macrófagos (F480⁺CD11c⁺); **D**) Células dendríticas

(F480⁺CD11c⁺); **E**) Células dendríticas CD103⁺ (F480⁺CD11c⁺ CD103⁺); **F**) Linfócitos T CD4⁺ efetores (TCRβ⁺ CD4⁺ Foxp3⁻); **G**) Linfócitos Th17 (TCRβ⁺ CD4⁺ RorgT⁺); **H**) Células T reguladoras (TCRβ⁺CD4⁺Foxp3⁺). As fezes foram coletadas e 30 mg por amostra foram pesadas. As amostras foram diluídas em 200 µL de PBS e centrifugadas a 50 x g 2 min. Os sobrenadantes das amostras foram coletados e a IgA mensurada por ELISA. **I**) Alteração dos níveis de IgA ocasionadas por *L. delbrueckii* UFV H2b20 nas fezes (produto obtido pelos níveis de IgA dos camundongos tratados pelos não tratados). Média de 1 experimento (n = mínimo de 5 animais por grupo); Dados são a média ±SEM *p=0,05; **p=0,01.

4.2 A administração de *L. delbrueckii* UFV H2b20 modula a resposta imune e inflamatória frente à infecção por *A. fumigatus*

4.2.1 A administração de *L. delbrueckii* UFV H2b20 resultou em uma menor susceptibilidade à infecção, após desafio com *A. fumigatus*

Para avaliar o efeito da administração de *L. delbrueckii* UFV H2b20 na resposta imune do hospedeiro durante a infecção pelo fungo, verificou-se a taxa de sobrevivência dos animais infectados tratados com o probiótico (AFU+LAC) ou não tratados (AFU) e dos controles tratados (NI+LAC) ou não tratados (NI) após infecção intranasal com 1x10⁸ conídios de *A. fumigatus*. Os resultados mostraram que os animais tratados com *L. delbrueckii* UFV H2b20 apresentaram uma taxa de mortalidade significativamente menor (50% até o décimo dia após a infecção) quando comparados com os animais infectados que não ingeriram o probiótico (100% no sexto dia após a infecção) (**Figura 8A**).

Foi avaliada também a perda de peso dos animais como sinal de morbidade associada à infecção pelo fungo. A avaliação feita entre animais infectados tratados (AFU+LAC) e animais infectados não tratados (AFU) mostrou que ambos grupos perdem massa corporal até o quinto dia. No entanto, após o quinto dia houve a necessidade de se eutanasiar a maioria dos animais do grupo AFU, por questões éticas devido ao excesso de perda de peso, enquanto os animais do grupo AFU+LAC mostram tendência a recuperar peso progressivamente (dados não mostrados).

4.2.2 A menor susceptibilidade dos camundongos que ingeriram *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi associada à menor carga fúngica no pulmão após infecção

Para avaliar se a diminuição da susceptibilidade dos camundongos que ingeriram o probiótico estava associada à diminuição da carga fúngica nos pulmões após infecção e, conseqüentemente, um melhor controle da infecção fúngica pelo hospedeiro, foi feita a quantificação da carga fúngica pulmonar dos animais tratados e não tratados com *L. delbrueckii* UFV H2b20 (**Figura 8 B**). A quantificação da carga fúngica pulmonar demonstrou que, 12, 24 e 48 horas após a infecção, ambos grupos apresentaram conídios viáveis no espaço alveolar. No entanto, a quantidade de conídios viáveis do grupo que ingeriu

L. delbrueckii UFV H2b20 é aproximadamente 50% menor em comparação ao grupo não tratado em todos os tempos avaliados. Este resultado demonstra um maior *clearance* do patógeno no grupo tratado, o que pode justificar a menor letalidade.

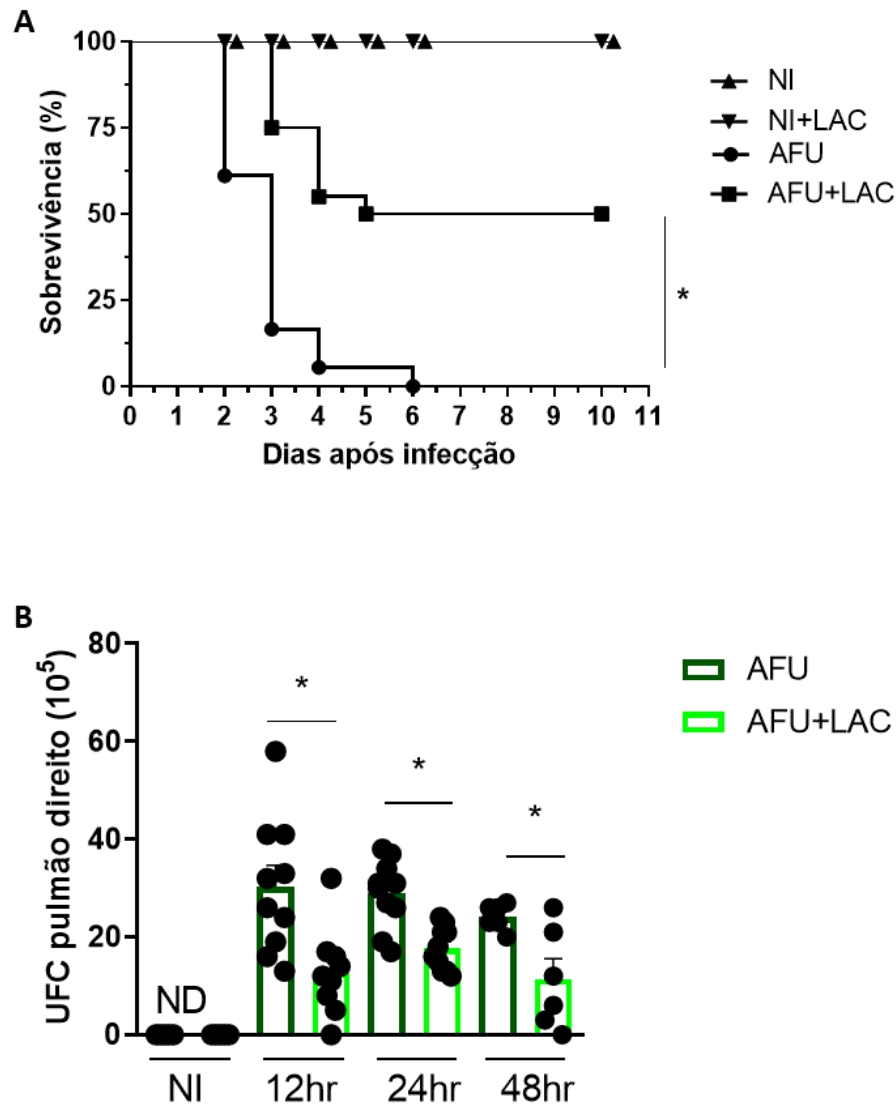


Figura 8. Avaliação da taxa de sobrevivência e carga fúngica nos pulmões. Animais controles tratados (NI+LAC) ou não tratados (NI) e animais infectados com 1×10^8 conídios, tratados (AFU+LAC) ou não tratados (AFU) com *L. delbrueckii* UFV H2b20 foram monitorados durante um período de: **(A)** 10 dias para avaliação de sobrevivência. Os resultados estão apresentados como a porcentagem de letalidade após infecção. Média de 1 experimento (n = mínimo de 15 animais por grupo); Dados são a média \pm SEM *p=0,05; **(B)** 12, 24 e 48 horas após infecção para avaliação da carga fúngica. Os animais foram eutanasiados e os pulmões direitos foram coletados e processados para a análise. Os resultados estão expressos como o número de unidades formadoras de colônia (UFC) por pulmão. Média de 2 experimentos (média \pm SEM, n = 5 a 6 animais por grupo). NI = não infectados; ND = não detectado. *p=0,05.

4.2.3 Animais que ingeriram *L. delbrueckii* UFV-H2b20 e os que não ingeriram apresentaram graus semelhantes de lesão pulmonar nas análises histológicas e diferenças na permeabilidade vascular

Foi realizada, em seguida, a análise histopatológica dos pulmões para avaliar o potencial de lesão induzido pela infecção pulmonar por *A. fumigatus*. Essa análise demonstrou que o tecido pulmonar dos animais não infectados tratados ou não com *L. delbrueckii* UFV-H2b20 permaneceram íntegros e com suas características morfológicas preservadas. Por outro lado, a infecção por *A. fumigatus* provocou alterações no parênquima pulmonar tanto dos animais tratados quanto dos animais não tratados com *L. delbrueckii* UFV-H2b20 após 1 dia de infecção, apresentando graus semelhantes de infiltrado inflamatório, com predomínio de neutrófilos, especialmente nas regiões perivasculares e peribronquiolares. (**Figura 9A**), o que é confirmado pelo score histopatológico (**Figura 9B**).

A permeabilidade vascular foi obtida pela análise do extravasamento de proteínas para os alvéolos. Essa análise foi realizada com o objetivo de verificar se as alterações de influxo celular para os pulmões entre os grupos estavam relacionadas a alterações na permeabilidade vascular. Os resultados mostram que a quantidade de proteína total no BAL dos animais tratados com *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi menor 1 dia após a infecção, em comparação com os animais não tratados (**Figura 9C**) indicando, assim que o tratamento contribui para um menor extravasamento de conteúdo vascular para as vias aéreas dos animais tratados com *L. delbrueckii* UFV H2b20 e infectados com *A. fumigatus*.

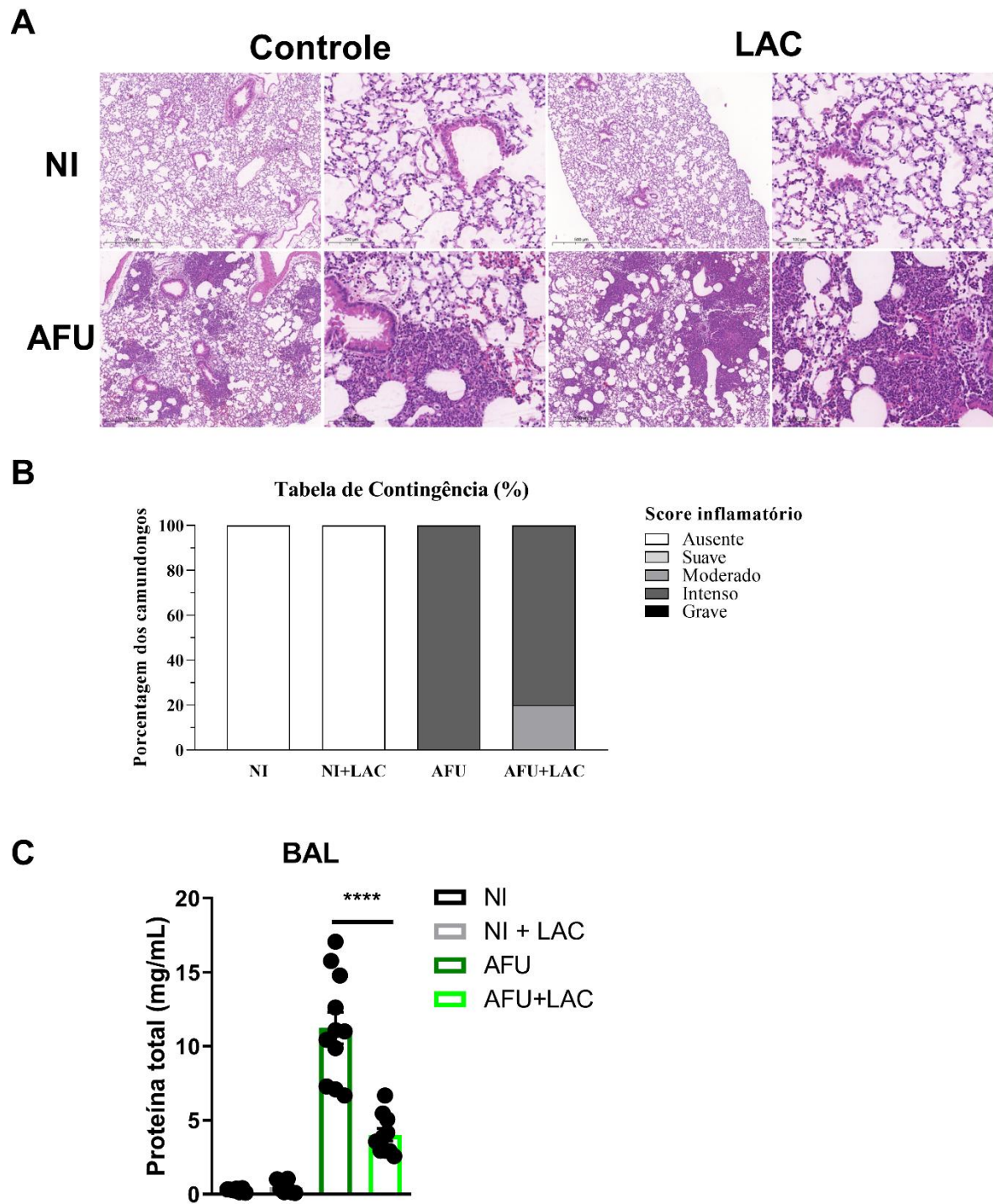


Figura 9. Avaliação histopatológica da lesão pulmonar causada por *A. fumigatus* nos pulmões e avaliação da permeabilidade vascular. Animais tratados e não tratados com *L. delbrueckii* UFV H2b20 foram inoculados com 1×10^8 conídios de *A. fumigatus* e, após 1 dia de infecção, os pulmões esquerdos foram coletados, fixados em formol 10%, embebidos em parafina e coradas com hematoxilina-eosina. O BAL foi coletado e centrifugado. A quantificação das proteínas totais do sobrenadante do BAL foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Animais não infectados (NI) receberam 40 μ L de PBS estéril pela mesma via de inoculação. **A)** Histopatologia do pulmão; **B)** Score histopatológico; **C)** Extravasamento de proteínas no BAL. Os resultados de A são representativos de dois experimentos e os de B e C são a média de dois experimentos (média \pm SEM n = 3 a 6 animais

por grupo); **** $p=0,0001$; as barras representam 500 ou 100 μm . A partir da avaliação das lâminas de hematoxilina-eosina, foram atribuídos valores que pontuaram de 0 a 5 à gravidade e à distribuição da lesão causada pela inflamação, sendo que 0 representa ausência de lesão e 5 lesão grave.

4.2.4 A administração do probiótico *L. delbrueckii* UFV-H2b20 reduz o déficit funcional que a infecção por *A. fumigatus* provoca na mecânica respiratória

Para analisar os impactos fisiológicos que a infecção e a intensidade da resposta inflamatória provocam nos pulmões e analisar suas consequências funcionais na mecânica respiratória, foi realizada a avaliação da função pulmonar dos animais. Esta avaliação foi realizada com base em parâmetros essenciais para determinar a funcionalidade respiratória, sendo eles capacidade pulmonar total, complacência, volume expirado forçado em 50 milissegundos e Resistência Pulmonar Basal. Os resultados mostram que o tratamento com o *L. delbrueckii* UFV-H2b20 tem capacidade de restaurar de forma significativa o déficit funcional provocado pela infecção. Foi observado que o grupo infectado tratado foi capaz de recuperar capacidade pulmonar total (**Figura 10 A**), complacência (**Figura 10 B**) e volume expirado forçado em 50 milissegundos (**Figura 10 C**) quando comparado com o grupo infectado não tratado. Os dois grupos apresentaram níveis semelhantes, sem diferença estatísticas, nos níveis de Resistência Pulmonar Basal (**Figura 10 D**).

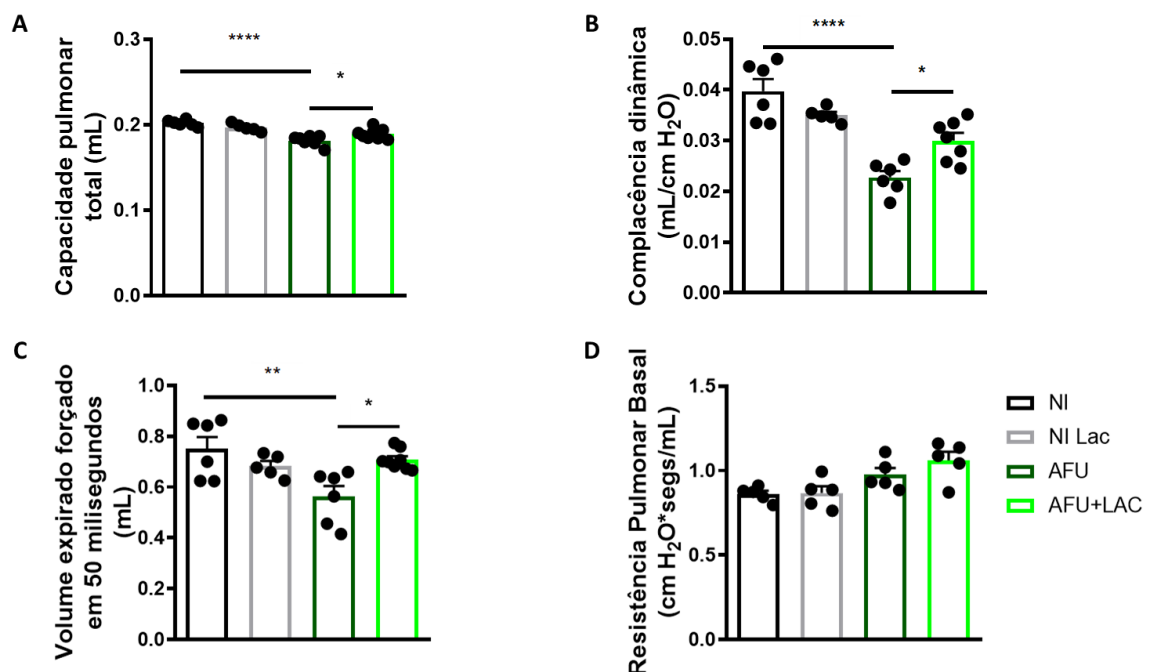


Figura 10. Avaliação de função respiratória. Animais tratados e não tratados com *L. delbrueckii* UFV H2b20 foram inoculados com 1×10^8 conídios de *A. fumigatus* e a mecânica pulmonar foi realizada após 1 dia de infecção. Os animais foram anestesiados e submetidos ao protocolo do espirômetro para avaliar os parâmetros basais. A) Capacidade pulmonar total; B) Complacência dinâmica; C) Volume expirado forçado em 50 milissegundos; D) Resistência pulmonar basal. Os resultados são a média de dois experimentos (n = 3 a 5); * $p=0,05$; ** $p=0,01$; **** $p=0,0001$.

4.3 Avaliação da modulação da resposta imune por *L. delbrueckii* UFV-H2b20 após infecção por *Aspergillus fumigatus*

4.3.1 A administração do probiótico *L. delbrueckii* UFV-H2b20 altera o influxo celular nos pulmões após infecção com *A. fumigatus*

Tendo, os resultados anteriores, indicado uma diminuição da letalidade e carga fúngica nos animais tratados com *L. delbrueckii* UFV H2b20, verificou-se em seguida a relação dessa diminuição com o perfil de leucócitos no sítio de infecção. Os resultados mostram que os animais infectados com *A. fumigatus* e tratados com *L. delbrueckii* UFV H2b20 tiveram diminuição do influxo de leucócitos totais no BAL, 1 dia após a infecção em comparação com os animais infectados com *A. fumigatus* não tratados com *L. delbrueckii* UFV H2b20 (**Figura 11A**).

Em seguida, avaliou-se por contagem diferencial se existia diferença na proporção de células no BAL dos animais tratados e não tratados 1 dia após infecção. Dos leucócitos recrutados, o tipo celular mais presente foram os neutrófilos. Os resultados mostraram, de maneira congruente aos de células totais, que os animais tratados com *L. delbrueckii* UFV H2b20 apresentam diminuição significativa de neutrófilos no BAL, comparados com os animais não tratados com *L. delbrueckii* UFV H2b20 (**Figura 11B**). No entanto, não foram observadas diferenças entre os grupos nas contagens de macrófagos (**Figura 11C**), eosinófilos (**Figura 11D**) e linfócitos (**Figura 11E**).

Avaliado o perfil de leucócitos nos alvéolos, o passo seguinte foi avaliar o perfil do infiltrado celular no parênquima pulmonar dos animais tratados ou não com *L. delbrueckii* UFV H2b20 durante a infecção por *A. fumigatus*. O acúmulo de leucócitos nos pulmões foi quantificado utilizando ensaios que avaliam a atividade de enzimas presentes em certas populações celulares, como a mieloperoxidase (MPO), enzima com elevada expressão em neutrófilos e, usada como marcador da presença dessas células nos tecidos; a N-acetil-glicosaminidase (NAG), presente em macrófagos é, da mesma maneira, usada como marcador desse tipo celular; e a peroxidase eosinofílica (EPO), cuja atividade permite avaliar de maneira indireta o acúmulo de eosinófilos nos tecidos de interesse.

Primeiramente, foi analisado o acúmulo de neutrófilos, os resultados mostraram novamente um número significativamente menor destas células no parênquima pulmonar dos animais tratados com o probiótico após 1 dia de infecção (**Figura 11F**). Na análise do acúmulo de macrófagos (**Figura 11G**) e eosinófilos (**Figura 11H**) no parênquima pulmonar dos animais tratados ou não com *L. delbrueckii* UFV H2b20, os resultados não mostraram diferença entre os grupos.

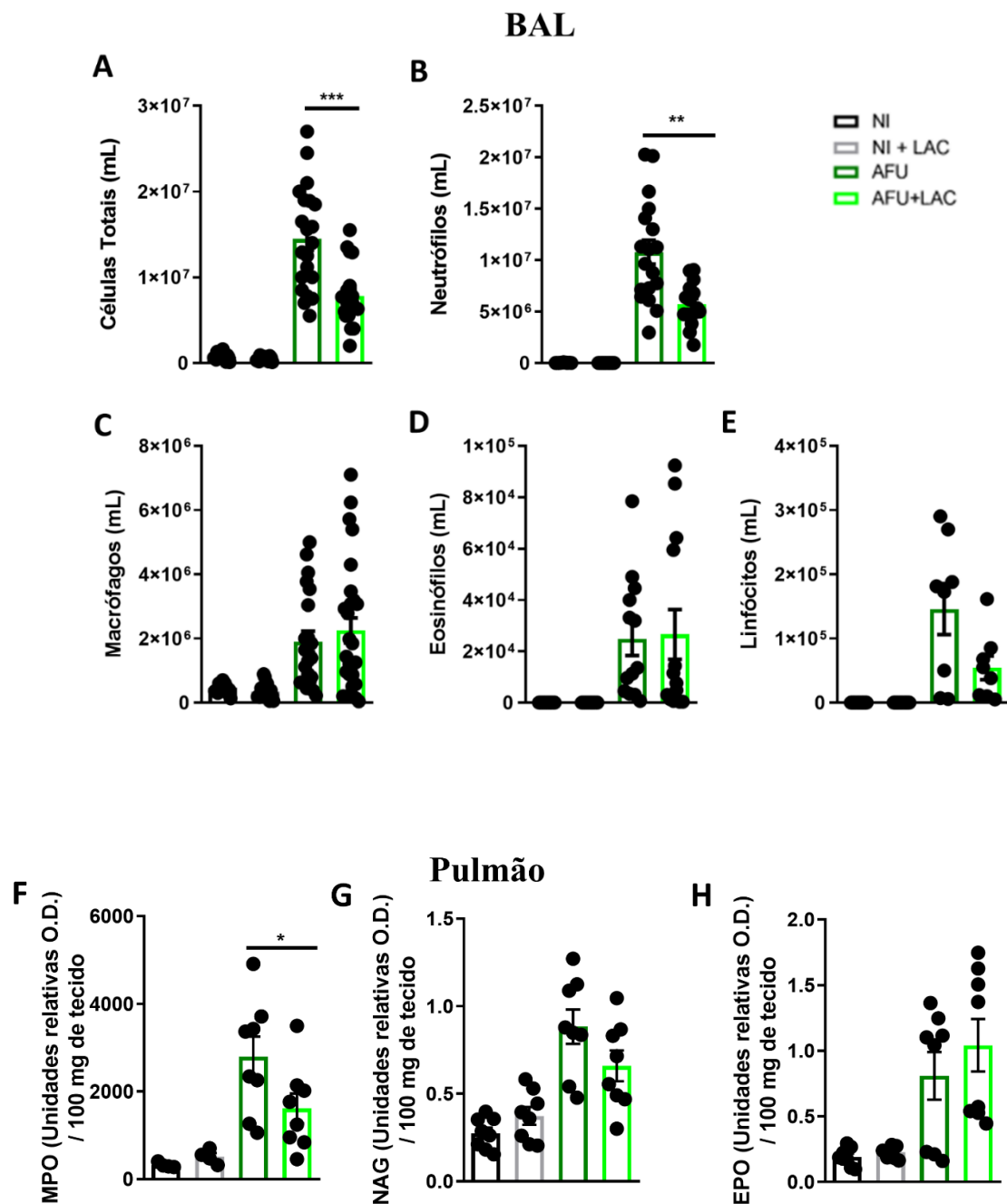


Figura 11. Análise do influxo celular no BAL e pulmão. Animais tratados e não tratados com *L. delbrueckii* UFV H2b20 (LAC) foram inoculados com 1×10^8 conídios de *A. fumigatus* (AFU). Animais não infectados (NI) receberam 40 μ L de PBS estéril pela mesma via de inoculação. Após 1 dia de infecção, o BAL foi coletado para quantificação dos A) leucócitos totais, B) neutrófilos polimorfonucleares, C) macrófagos, D) eosinófilos e E) linfócitos. O pulmão foi coletado para avaliação da atividade de A) MPO, B) NAG e C) EPO. Os resultados estão expressos como média \pm SEM (n = no mínimo 5 animais por grupo). Os resultados são a média de 4 experimentos independentes (n = 3 a 6); *p=0,05; **p=0,01; ***p=0,001.

4.3.2 Avaliação de alterações nas funções dos neutrófilos promovidas por *L. delbrueckii* UFV-H2b20 após infecção por *Aspergillus fumigatus*

4.3.2.1 O tratamento com o probiótico *L. delbrueckii* UFV-H2b20 otimiza o *killing*, a produção de ROS dos neutrófilos e a eferocitose dos macrófagos *ex vivo*

Após a observação de uma melhora nos aspectos da inflamação e, ao mesmo tempo, uma diminuição da carga fúngica nos animais tratados com o probiótico *L. delbrueckii* UFV-H2b20 em comparação aos não tratados, iniciou-se uma investigação a cerca de uma possível melhora das funções neutrofílicas nos animais deste grupo.

Inicialmente, foram feitos estudos com neutrófilos retiradas de animais tratados ou não com *L. delbrueckii* UFV-H2b20 e infectadas. Na **figura 12A**, observa-se que os neutrófilos dos animais que receberam o probiótico apresentam uma tendência de serem mais eficientes em matar os conídios de *A. fumigatus* do que os neutrófilos dos animais que ingeriram somente água, apesar de não apresentarem diferença estatística, provavelmente devido ao N experimental.

Posteriormente, com a intenção de verificar se havia diferença entre os grupos na produção de ROS pelos neutrófilos, realizou-se um ensaio de imuno-histoquímica marcando-os com a sonda DHE. No entanto, não foram observadas diferenças aparentes na fluorescência da sonda DHE entre os grupos AFU e AFU+LAC (**Figura 12B**).

Por fim, analisou-se se o tratamento com o probiótico otimizaria a fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos (eferocitose), o que também contribui para uma menor sinalização da inflamação no local da infecção. Observamos na **figura 12C** que a eferocitose das células no grupo tratado foi significativamente maior que no grupo não tratado quando as células não recebem nenhum estímulo. Após receberem estímulo com IFN- γ e LPS, essa diferença não se apresenta. Além disso, também não há diferença entre o grupo tratado que não recebeu os estímulos e os grupos que receberam os estímulos, sugerindo que o próprio tratamento com o probiótico estaria estimulando as células por si só. Em conjunto, esses resultados indicam uma melhora nas funções dos neutrófilos e da eferocitose no grupo tratado com o probiótico em comparação com o grupo não tratado.

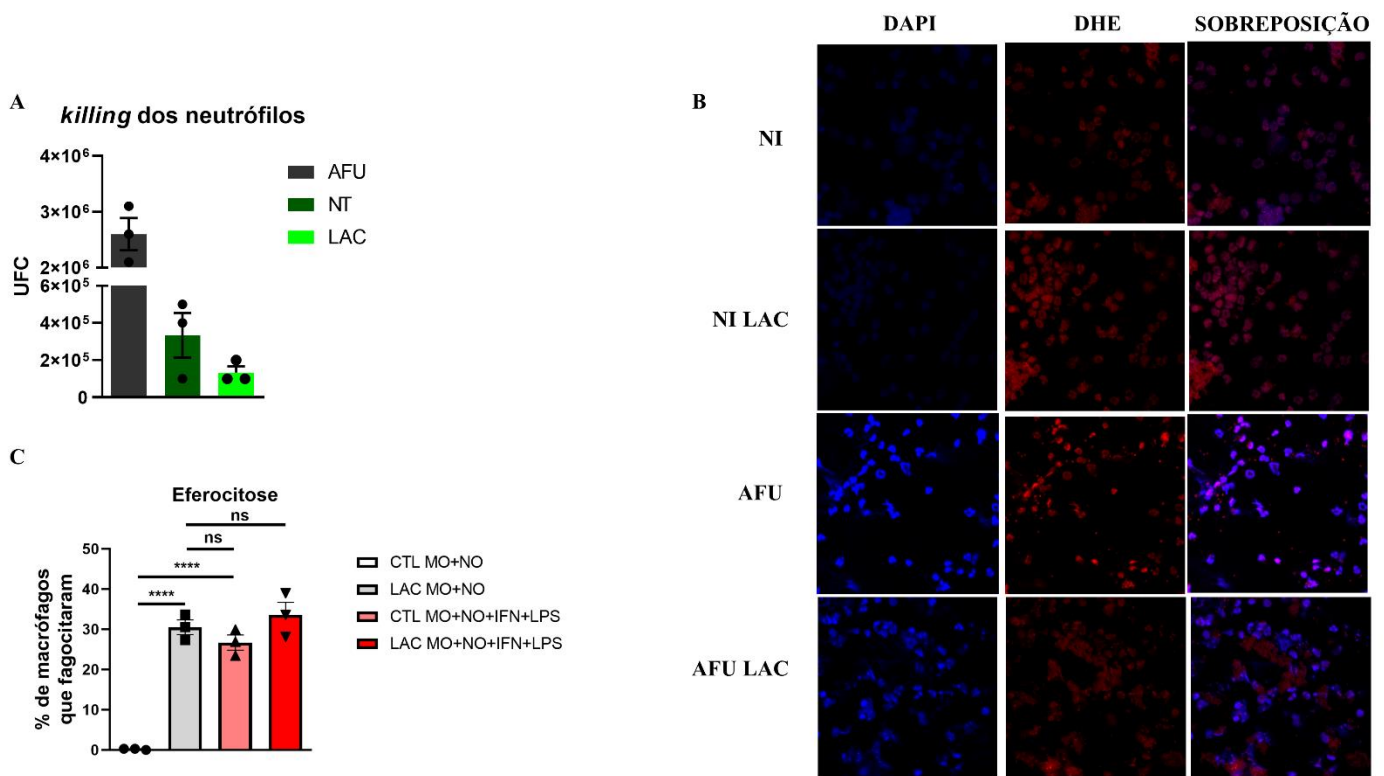


Figura 12. Avaliação *ex vivo* da função dos neutrófilos e da eferocitose durante a infecção por *A. fumigatus*. Camundongos não infectados foram tratados por dez dias com *L. delbrueckii* UFV-H2b20 (LAC) pela mamadeira. Os animais foram eutanasiados e os neutrófilos e macrófagos foram isolados da medula óssea. As células foram plaqueadas na concentração de 5×10^5 células/poço e infectadas *in vitro* na proporção de 1:1 e (A) deixadas em estufa 37°C por 4 horas para avaliação do *killing* fúngico pelos neutrófilos; (B) células marcadas com sonda DHE para avaliação da produção de ROS em microscópio eletrônico de fluorescência; (C) Os macrófagos (MO) para o experimento de eferocitose foram incubados em uma proporção de 1:1 de neutrófilos apoptóticos (NO), estimulados ou não com IFN- γ e LPS e fixados e corados com panótico para contagem em microscópio. DAPI em azul: marcação do núcleo neutrofilico; DHE em vermelho: marcação do ROS. Os resultados de A e C são a média de 1 experimento realizado em triplicata (****p=0,0001); os resultados de B são representativos de 3 experimentos independentes realizados em duplicata.

4.3.2.2 O tratamento com o probiótico *L. delbrueckii* UFV-H2b20 aumenta o influxo de neutrófilos produtores de ROS e diminui a frequência de neutrófilos apoptóticos no local da infecção, 12 horas após o desafio com *A. fumigatus* *in vivo*

Na sequência, foi feita uma avaliação por citometria de fluxo dos neutrófilos produtores de ROS no BAL de animais tratados ou não com *L. delbrueckii* UFV-H2b20 após infecção com *A. fumigatus* de acordo com a estratégia de *gating* na figura 13A. Esta avaliação foi realizada após 12 horas de infecção para melhor detecção do ROS. Inicialmente, corroborando os resultados obtidos nas contagens diferenciais (Figura 11A), observou-se também, através da análise de citometria de fluxo, maior número de células mieloides no BAL dos camundongos infectados tratados em comparação com os infectados

não tratados (**Figura 13 B**). Curiosamente, ao contrário do observado no tempo de 24 horas de infecção (**Figura 11B**), observou-se no tempo de 12 horas de infecção, um maior número e frequência de neutrófilos no BAL dos animais infectados tratados, em comparação com os infectados não tratados com o probiótico (**Figura 13C**), indicando que o tratamento leva a uma potencialização da resposta neutrofílica nas primeiras horas de infecção. Após isto, desta vez por citometria de fluxo, avaliou-se a quantidade de neutrófilos produtores de ROS, através da sonda DHE, e observou-se que a quantidade e proporção desses neutrófilos que estavam produzindo ROS era maior no BAL deste grupo (**Figura 13D**). Não foram observadas diferenças na média geométrica de intensidade de fluorescência da DHE entre os grupos (dados não mostrados). Esses dados indicam que, apesar de não haver diferença na produção de ROS pelos neutrófilos, a maior quantidade e proporção de neutrófilos produtores de ROS no local da infecção confirma a potencialização da resposta neutrofílica antifúngica.

Em seguida verificou-se a quantidade e frequência de neutrófilos apoptóticos no BAL através da expressão de anexina V, para confirmar uma possível melhora da capacidade de *clearance* de células apoptóticas pelos animais tratados com *L. delbrueckii* UFV-H2b20 12 horas após a infecção por *A. fumigatus* já que, nos experimentos *ex vivo*, conseguimos observar melhora na capacidade de eferocitose dos macrófagos dos animais tratados (**Figura 12C**). Apesar de não observarmos diferenças nos números de neutrófilos expressando anexina entre os grupos, observamos uma diminuição significativa na frequência destas células no grupo tratado em comparação ao grupo não tratado (**Figura 13E**).

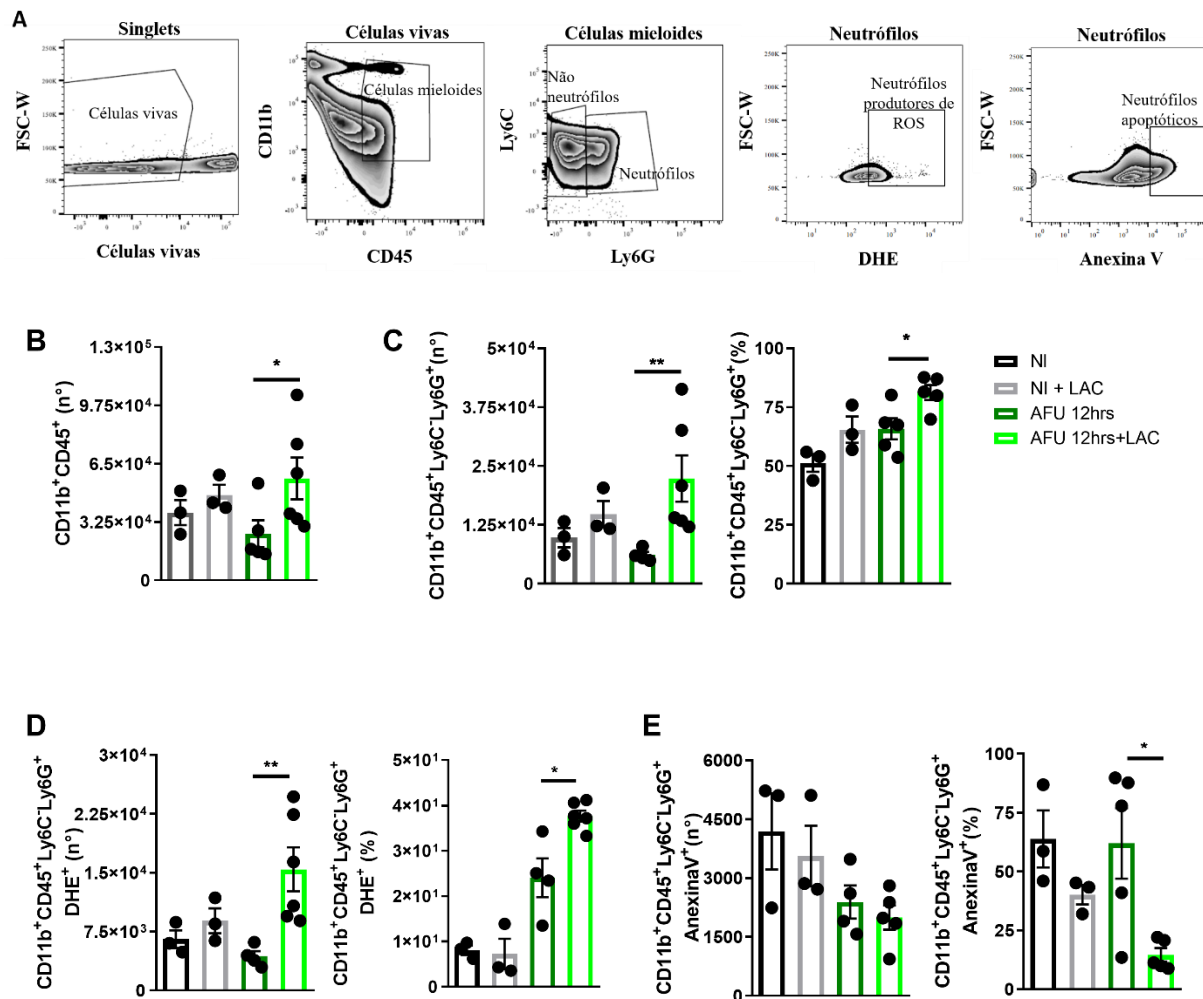


Figura 13. Avaliação da produção de ROS e expressão de anexina in vivo pelas células mielóides do BAL após 12 horas de infecção por *A. fumigatus*. Animais tratados e não tratados com *L. delbrueckii* UFV H2b20 (LAC) foram inoculados com 1×10^8 conídios de *A. fumigatus* (AFU). Animais não infectados (NI) receberam 40 μ L PBS pela mesma via de inoculação. Após 12 horas de infecção, o BAL foi coletado, centrifugado e as células foram marcadas com os marcadores específicos para cada tipo celular, com sonda de ROS (DHE) e com anexina para realização da citometria de fluxo. A) Estratégia de *gating*; B) Células mielóides totais (CD11b⁺CD45⁺); C) Neutrófilos em número e porcentagem (CD11b⁺CD45⁺Ly6C⁺Ly6G⁺); D) Neutrófilos produtores de ROS em número e porcentagem (CD11b⁺CD45⁺Ly6C⁺Ly6G⁺ROS⁺); E) Neutrófilos apoptóticos em número e porcentagem (CD11b⁺CD45⁺Ly6C⁺Ly6G⁺AnexinaV⁺). Os resultados são a média \pm SEM de 1 experimento (n = 5 a 6 animais por grupo; nos grupos controle, cada N é um pool de no mínimo 3 animais). *p=0,05; **p=0,01.

4.3.3 O tratamento com o probiótico *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 promove otimização da regulação da inflamação após infecção por *Aspergillus fumigatus*

4.3.3.1 O tratamento com o probiótico *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 promove um aumento de linfócitos T reguladores FoxP3⁺ frente à infecção por *A. fumigatus*

Os próximos experimentos foram realizados com a intenção de verificar os mecanismos pelos quais *L. delbrueckii* UFV-H2b20 estaria regulando a resposta imune durante a infecção. Probióticos estimulam a produção de células T CD4⁺ Foxp3⁺ reguladoras (Treg), portanto, quantificamos por citometria de fluxo, de acordo com a estratégia de *gating* na **figura 14A**, as células Treg presentes no BAL dos animais tratados e comparamos com os não tratados. Analisamos, primeiramente, as quantidades de células T totais (**Figura 14B**) e de células T CD4⁺ (**Figura 14C**), no qual não foram observadas diferenças entre os grupos infectados tratados ou não tratados. No entanto, ao analisarmos as quantidades de células Treg, foi observado aumento significativo destas células no BAL dos animais infectados tratados com o probiótico, em comparação com os do grupo infectados não tratados (**Figura 14D**), indicando que *L. delbrueckii* UFV-H2b20 de fato estaria promovendo a regulação da inflamação através do aumento do número de Tregs.

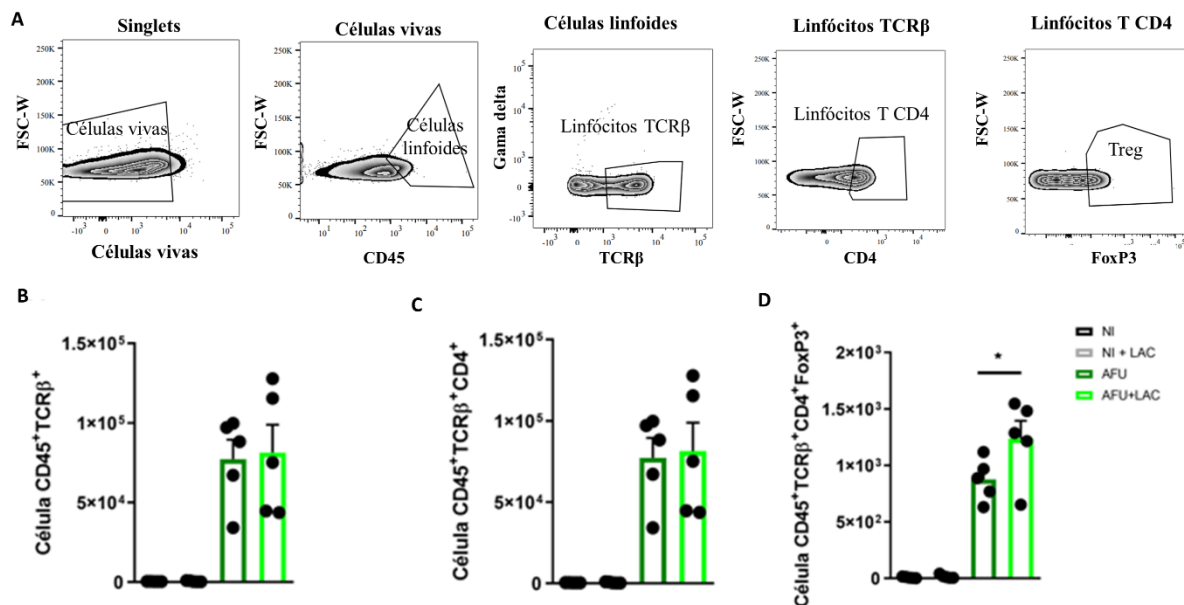


Figura 14. Avaliação da regulação da inflamação *in vivo* no BAL após 24 horas de infecção por *A. fumigatus*. Animais tratados e não tratados com *L. delbrueckii* UFV H2b20 (LAC) foram inoculados com 1 × 10⁸ conídios de *A. fumigatus* (AFU). Animais não infectados (NI) receberam 40 μL PBS pela mesma via de inoculação. Após 24 horas de infecção, o BAL foi coletado, centrifugado e as células

foram marcadas para a realização da citometria de fluxo. A) Estratégia de *gate*; B) Células T totais (Célula CD45⁺TCRβ⁺); C) Células T CD4⁺ (Célula CD45⁺TCRβ⁺CD4⁺); D) Células T reguladoras (Célula CD45⁺TCRβ⁺CD4⁺FoxP3⁺). Os resultados estão expressos como média ± SEM de 1 experimento (n = 5). *p= 0,05.

4.3.3.2 A administração do probiótico *L. delbrueckii* UFV-H2b20 altera a concentração de mediadores inflamatórios após infecção com *A. fumigatus*

Estudos prévios mostraram que *L. delbrueckii* UFV-H2b20 é capaz de modular a produção de citocinas no hospedeiro (Vieira *et al.*, 2008; Neumann *et al.*, 2009; Dos Santos *et al.*, 2011; Montuori-de-Andrade, A.C.M. *et al.*, artigo em anexo - em submissão). Além disso, os resultados anteriores demonstraram que a ingestão de *L. delbrueckii* UFV-H2b20 diminuiu o influxo de neutrófilos e aumentou o influxo de células Treg para as vias aéreas dos animais, resultando em um maior controle da inflamação nos pulmões e menor letalidade. Portanto, o próximo passo foi verificar o perfil de produção de mediadores inflamatórios nas vias aéreas. As concentrações da quimiocina CXCL-1, e das citocinas IL-17, IL1-β, TNF, IFN-γ, TGF-β e IL-10 foram mensuradas no BAL dos animais através de ELISA. Observa-se na **figura 15**, com relação à quimiocina quimiotática para neutrófilos CXCL-1 (**Figura 15A**) e às citocinas inflamatórias IL-17 (**Figura 15B**) e IL1-β (**Figura 15C**), que os animais tratados com *L. delbrueckii* UFV-H2b20 apresentam diminuição nos níveis destas moléculas 24 horas após a infecção. Não foram observadas diferenças nos níveis de TNF entre os grupos infectados (**Figura 15D**) e não foram detectados níveis de IFN-γ acima do limite de detecção em nenhum dos grupos (**dados não mostrados**). Com relação às citocinas reguladoras TGF-β (**Figura 15E**) e IL-10 (**Figura 15F**), observou-se um aumento significativo nos níveis das duas citocinas 24 horas após a infecção dos animais tratados em comparação com os não tratados com *L. delbrueckii* UFV-H2b20, corroborando assim a hipótese de que o probiótico estaria estimulando uma maior regulação da inflamação nos animais tratados.

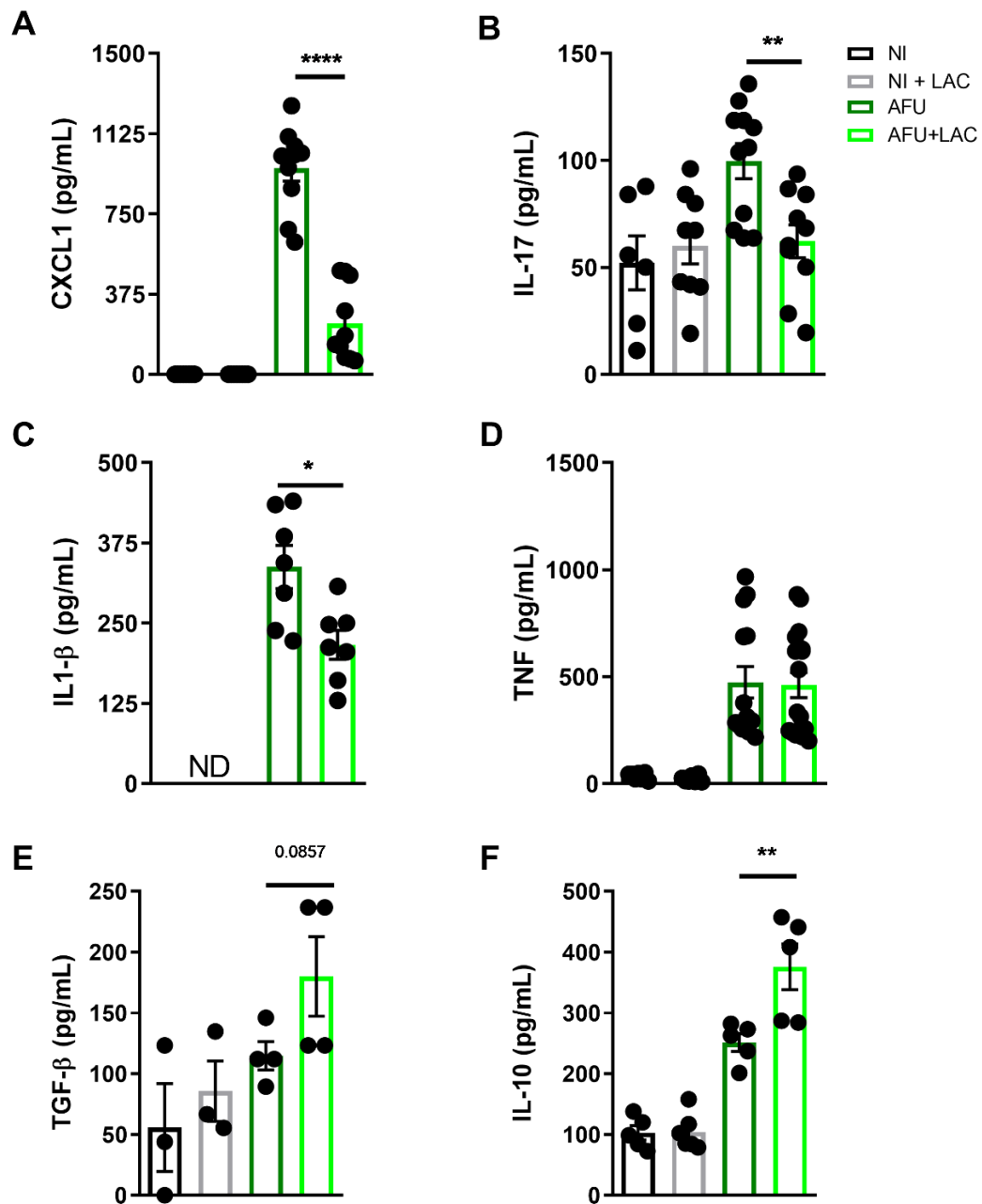


Figura 15. Dosagem de mediadores inflamatórios no BAL. Camundongos dos grupos tratados e não tratados com *L. delbrueckii* UFV-H2b20 (LAC) foram inoculados com 1×10^8 conídios de *A. fumigatus*. Animais não infectados (NI) receberam 40 μ L de PBS pela mesma via de inoculação. Após 24 horas de infecção, os animais foram eutanasiados para coleta do BAL, que foi centrifugado para avaliação da concentração de mediadores inflamatórios no sobrenadante por ELISA. **A)** CXCL1, **B)** IL-17, **C)** IL-1 β , **D)** TNF, **E)** TGF- β , **F)** IL-10. Os resultados estão expressos como média \pm SEM (n = 4 a 8 animais por grupo). Os gráficos são a média \pm SEM de dois experimentos independentes (n= 4 a 8). p =0,05; **p=0,01; ****p=0,0001.

4.4 A administração de lactato, principal metabólito produzido por *L. delbrueckii* UFV H2b20, diminui a letalidade de animais infectados por *A. fumigatus*

Finalmente, realizamos o próximo experimento com o objetivo de avaliar se o lactato, principal metabólito produzido pelas bactérias ácido-láticas como *L. delbrueckii* UFV H2b20, teria o mesmo efeito protetor que o probiótico vivo nos animais infectados com *A. fumigatus*. O lactato já tem papel protetor conhecido testado em outras doenças inflamatórias (Errea *et al*, 2016) e, se confirmado seu papel protetor também neste modelo, podemos sugerir uma possível via de estimulação do sistema imune pelo probiótico para estudos futuros mais aprofundados. Para avaliar se o lactato exerce efeito protetor durante a infecção pelo fungo, verificou-se a taxa de sobrevivência dos animais infectados tratados ou não tratados com lactato e dos controles tratados ou não tratados com lactato após infecção intranasal com 1×10^8 conídios de *A. fumigatus*, durante um período de 10 dias. Assim como os resultados obtidos a partir do tratamento com o probiótico vivo, os resultados mostraram que os animais tratados com lactato também apresentaram uma taxa de mortalidade 50% menor quando comparados com os animais infectados que não ingeriram o probiótico (**Figura 16**), corroborando assim nossa hipótese.

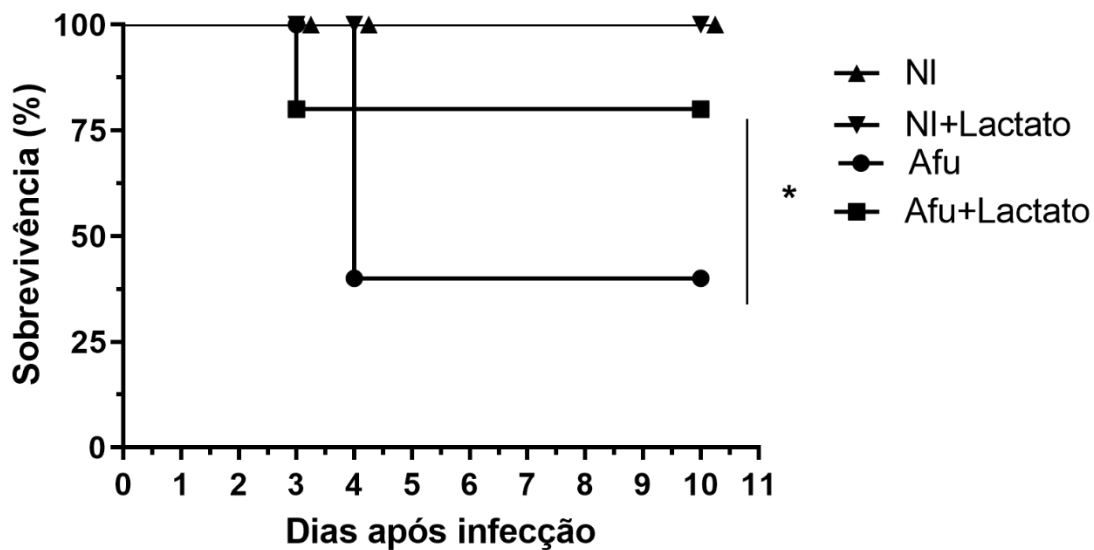


Figura 16. Avaliação da taxa de sobrevivência de animais tratados com Lactato. Animais Controle tratados (NI+Lactato) e não tratados (NI) e animais infectados com 1×10^8 conídios, tratados (Afu+Lactato) e não tratados (Afu) com *L. delbrueckii* UFV H2b20 foram monitorados durante um período de 10 dias para avaliação de sobrevivência. Os resultados estão apresentados como a porcentagem de letalidade após infecção. (n = 5 animais por grupo); *Diferença significativa (p < 0,05)

5. Discussão

Desde o início do século XX vários efeitos benéficos têm sido atribuídos ao consumo de produtos contendo bactérias probióticas (Santosa, S. *et al.*, 2006) e algumas espécies de lactobacilos têm sido amplamente utilizadas como probióticos. O microrganismo *L. delbrueckii* UFV-H2b20 pode ser considerado um probiótico pois preenche requisitos básicos para tal, como habitar normalmente o trato intestinal do hospedeiro; ser capaz de resistir às condições de estresse no trato gastrointestinal e se estabelecer e conferir benefícios ao hospedeiro (dos Santos, L.M. *et al.*, 2011; Neumann, E. *et al.*, 1998; Neumann, E. *et al.*, 2009; Vieira, L.Q. *et al.*, 2008). Através dos nossos resultados pudemos comprovar essas características de *L. delbrueckii* UFV-H2b20 já que a bactéria permaneceu viável no intestino dos animais e foi capaz de melhorar a resposta imune e proteger contra a infecção por *Aspergillus*. Nosso trabalho traz alguns novos entendimentos acerca da capacidade de imunomodulação por probióticos durante infecções pulmonares

Durante nossos experimentos, observamos que o probiótico permanece viável no intestino dos camundongos por até 24 horas após a ingestão (**Figura 6B**), o que nos levou a estabelecer a troca constante do tratamento para garantir que os animais estivessem sempre com *L. delbrueckii* UFV-H2b20 viável no intestino durante todo o período dos experimentos. Em trabalhos anteriores do nosso grupo, foi mostrado que é possível encontrar bactérias nas fezes de animais isentos de germes monocolonizados com *L. delbrueckii* UFV-H2b20 (Neumann, E. *et al.* 1998; Dos Santos, L. M. *et al.*, 2011). Aqui, diferentemente, utilizamos do CFSE para detectar esta bactéria nas fezes. Dessa maneira também foi possível avaliar a presença do probiótico em camundongos com microbiota normal, o que é importante para mostrar que *L. delbrueckii* UFV-H2b20 é capaz de permanecer no trato gastrointestinal dos animais, por um período mínimo necessário para sua ação como probiótico, mesmo na presença de uma microbiota intestinal já bem estabelecida.

A utilização de probióticos vem se tornando cada vez mais popular e seu uso em pacientes hospitalizados pode chegar a 55% em pacientes internados (Draper K *et al.*, 2017). Sabe-se que nem todos os probióticos são igualmente eficientes (Cruchet S *et al.*, 2015), mas estudos têm sido realizados para se chegar a um consenso sobre qual probiótico deve ser usado para cada doença específica (McFarland LV *et al.*, 2018). As indicações de uso podem ser variadas, abrangendo a prevenção de doenças como diarreia associada ao uso de antibióticos, vaginite, diarreia do viajante, sepse, dermatite atópica e alergias, prevenção de efeitos colaterais de terapias como no tratamento contra infecção por *Helicobacter pylori* e quimioterapia ou pode ser indicado também para tratar doenças em fase aguda, principalmente doenças intestinais como infecções por *Clostridium difficile*, diarreia aguda adulta ou pediátrica, constipação e doenças crônicas como doenças inflamatórias intestinais, síndrome do intestino irritável ou obesidade (McFarland LV, 2015). Alguns estudos já foram conduzidos para abordar a indicação do uso de probióticos também em pacientes com doenças pulmonares. Por exemplo, Jafari *et*

al. observaram que probióticos são úteis para melhorar a qualidade de vida e diminuir a exacerbação dos sintomas de pacientes com fibrose cística (Jafari *et al.*, 2013). Em um estudo randomizado e duplo cego realizado por Lau *et al.* em crianças da pré-escola da Malásia com 2 a 6 anos de idade, *Bifidobacterium longum* BB536, um probiótico multifuncional, demonstrou aliviar doenças do trato respiratório superior modulando a microbiota intestinal (Lau *et al.*, 2018). A Organização Mundial de Alergia (WAO) já sugere o uso de probióticos em mulheres grávidas que correm risco de terem um filho com alergias respiratórias, em mulheres que estão amamentando crianças que correm o risco de desenvolver alergias respiratórias e em crianças que estão sendo amamentadas (Fiocchi *et al.*, 2015). No entanto, os estudos em humanos ainda são insuficientes e as recomendações são baseadas em evidências de baixa qualidade. Já em modelos murinos, assim como nos nossos resultados, existem muitos estudos indicando que a administração de certos probióticos podem modular a resposta imune no trato respiratório. Em um estudo conduzido por Khailova *et al.* a administração de *Lactobacillus rhamnosus* GG por via oral modulou a resposta inflamatória e a homeostase em camundongos com pneumonia causada por *Pseudomonas aeruginosa* (Khailova *et al.*, 2017). Hougee *et al.* mostraram que o probiótico *Bifidobacterium breve* M-16V reduz os sintomas alérgicos em camundongos sensibilizados com OVA reduzindo o número de eosinófilos, IgE OVA-específica e IgG1 ova-específica no BAL dos camundongos (Hougee *et al.*, 2010).

Portanto, diversos efeitos imunomoduladores dos probióticos frente aos modelos de infecções e doenças inflamatórias já foram descritos. Quanto ao *L. delbrueckii* UFV-H2b20, nosso grupo já mostrou sua eficiência de modular o sistema imune e proteger os hospedeiros frente à infecções por *Escherichia coli* e *Salmonella enterica serovar Typhimurium*. (Vieira *et al.*, 2008), *Listeria monocytogenes* (Dos Santos *et al.*, 2011) e frente a inflamação alérgica pulmonar induzida por OVA (Montuori-de-Andrade, A.C.M., artigo em anexo - em submissão). No entanto, em nenhum destes trabalhos tinha sido avaliado o efeito imunomodulador promovido pelo probiótico antes dos camundongos serem desafiados, o que foi feito no presente trabalho (**figura 7**). Aqui, observamos nos linfonodos mesentéricos dos camundongos que a ingestão do probiótico promoveu algumas diferenças nos perfis celulares dos animais tratados como maiores números de macrófagos (**Figura 7C**), células dendríticas totais (**Figura 7D**), células dendríticas CD11b⁺ CD103⁺, de perfil tolerogênico (Bain CC., 2017) (**Figura 7E**), e linfócitos T reguladores (**Figura 7H**). As células dendríticas CD11b⁺CD103⁺ tem papel bem descrito na literatura pela sua contribuição para geração de células T reguladoras (Bain CC., 2017), o que corrobora nossos resultados já que observamos aumento dos dois tipos celulares nos animais tratados com *L. delbrueckii* UFV-H2b20. Não foram observadas diferenças nos números de linfócitos TCD4⁺ efetores e Th17 entre os grupos (**Figura 7F e G**). Estes resultados nos levam a sugerir que o pré-tratamento com o probiótico, antes do desafio com *A. fumigatus*, promove um perfil regulador no sistema imune dos animais, o que é interessante para evitar o descontrole da inflamação promovido pela infecção com o fungo, já que a letalidade neste tipo de infecção é causada principalmente devido a uma intensa resposta

inflamatória em camundongos imunocompetentes (Malacco NL., 2019). Além das alterações nos perfis celulares, também observamos, nas fezes destes animais, um aumento nos níveis totais de IgA (**Figura 7 I**), que é a principal imunoglobulina encontrada nas secreções de mucosas e possui um papel crucial na proteção desse tipo de tecido (Woof JM *et al*, 2006). Esses dados reforçam o papel modulador causado pelo probiótico já que o que estamos observando é um aumento do número de células dendríticas intestinais que migram para o linfonodo mesentérico e induzem a diferenciação de mais células T reguladoras, assim como já descrito na literatura para outras bactérias comensais que assim auxiliam na homeostase intestinal (Esterházy D *et al*, 2016). Nossa suspeita é que a bactéria viva, ou seus produtos bacterianos como por exemplo o lactato, sejam reconhecidos pelas células no intestino promovendo uma sinalização que estaria recrutando estas células dendríticas e promovendo sua posterior migração para os linfonodos mesentéricos para indução das Treg. Além disso, se relacionarmos nossos dados de aumento de IgA nos camundongos tratados com os estudos de Macpherson AJ *et al*, quando mostrou que as células dendríticas intestinais que transportam bactérias comensais vivas induzem a troca de classe de células B para IgA quando chegam aos linfonodos mesentéricos (Macpherson AJ *et al*, 2004), temos uma outra possível sugestão de mecanismo de ação do probiótico para induzir esta regulação e proteção. Mais estudos precisam ser feitos para a confirmação destes mecanismo.

Após desafiar os camundongos com *A. fumigatus*, observamos diminuição na susceptibilidade à infecção dos animais tratados com *L. delbrueckii* UFV-H2b20 em comparação aos não tratados, indicada pela diminuição de 50% na letalidade (**figura 8A**) e também pela menor perda de peso apresentada por estes animais (dados não mostrados). Além disso, vimos que esta diminuição na susceptibilidade dos animais tratados à infecção estava associada a uma diminuição na carga fúngica nos pulmões em todos os tempos de infecção avaliados (**Figura 8B**). Estes resultados corroboram outros estudos que também indicam a proteção causada por probióticos frente às infecções respiratórias. Por exemplo, Kawahara *et al* e Zolnikova *et al* mostraram em seus estudos que a administração oral ou intranasal de várias cepas de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. suprimem sintomas de várias infecções virais, incluindo Influenza (Kawahara *et al*. 2015; Zolnikova *et al*. 2018). Mortaz *et al*. mostraram que probióticos são responsáveis por reduzir as chances de pneumonia associada a ventilação mecânica (Mortaz *et al*. 2013).

No entanto, curiosamente, nas nossas análises histopatológicas dos pulmões, onde avaliamos o potencial de lesão induzido pela infecção pulmonar por *A. fumigatus* nos camundongos, não foram observadas diferenças entre os grupos infectados tratados e não tratados. Ambos apresentaram graus semelhantes de infiltrado inflamatório, com predomínio de neutrófilos, especialmente nas regiões perivasculares e peribronquiolares (**Figura 9A e B**). Em contrapartida, quando avaliamos a permeabilidade vascular através da análise do extravasamento de proteínas para os alvéolos, identificamos que a quantidade de proteína total no BAL dos animais infectados tratados com *L.*

delbrueckii UFV H2b20 foi menor 24 horas após a infecção, em comparação com os animais infectados não tratados (**Figura 9C**). Este resultado pode indicar que o tratamento contribui para uma menor permeabilização vascular nos animais infectados tratados, o que nos levaria a esperar também um menor grau de lesão nos pulmões destes animais, ao contrário do que foi observado nas histologias. No entanto, apesar das imagens histológicas não refletirem melhora na lesão, observamos nos experimentos de mecânica pulmonar que o grupo infectado tratado foi capaz de restaurar de forma significativa o déficit funcional nos pulmões provocados pela infecção (**Figura 10**). A lesão tecidual desencadeada pela inflamação em resposta a infecção causa perda de volume, elasticidade e diminuição do fluxo de ar para os pulmões (Malacco NL *et al*, 2019). Em nossos resultados vimos que a administração do probiótico *L. delbrueckii* UFV H2b20 promoveu a recuperação de importantes funções pulmonares como capacidade pulmonar total (**Figura 10A**), complacência (**Figura 10B**) e volume expirado forçado (**Figura 10C**), com exceção apenas da resistência pulmonar basal (**Figura 10D**) onde os dois grupos apresentaram níveis semelhantes.

Outro fator essencial a ser avaliado no desfecho de uma pneumonia é o padrão de resposta celular no sítio da infecção (Mehrad e Standiford, 1999). Sabe-se que o modelo de infecção por *A. fumigatus* recruta neutrófilos, macrófagos, eosinófilos e linfócitos nas fases iniciais da infecção, sendo os neutrófilos as células mais prevalentes (Malacco NL *et al*, 2019). Portanto, avaliamos o perfil de leucócitos no BAL e tecido pulmonar e observamos, corroborando a literatura, que ambos grupos infectados têm um aumento do influxo de leucócitos totais no BAL 24 horas após a infecção em comparação com os grupos não infectados (**Figura 11A**) e na análise de células diferenciais no BAL, observamos que a maioria destas células de fato eram neutrófilos (**Figura 11B**). No entanto, tanto no BAL (**Figura 11B**), como no tecido pulmonar (**Figura 11F**), o grupo infectado tratado apresentou quantidades significativamente menores de neutrófilos com relação ao grupo infectado não tratado. Este dado nos levou a tentar investigar melhor a função dos neutrófilos na infecção por *A. fumigatus* após o tratamento com *L. delbrueckii* UFV H2b20.

Os neutrófilos recrutados para o sítio da inflamação tem um papel essencial contra o crescimento dos conídios e hifas por vários mecanismos (Kolaczowska e Kubes,2013) e sabe-se que a falha na produção de ROS por estas células leva a uma alta susceptibilidade à infecção por *A. fumigatus* (Hogan e Wheeler, 2016). Por isso, quisemos investigar como os animais infectados tratados apresentavam menor carga fúngica nos pulmões em comparação com os animais infectados não tratados (**Figura 8B**), apesar de terem menos neutrófilos no sítio da infecção. Foi iniciada então, uma investigação acerca da influência da administração de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em importantes mecanismos dos neutrófilos durante o *clearance* do patógeno como a capacidade de *killing* e a produção de ROS (Kolaczowska e Kubes,2013). De fato, observamos que a capacidade de *killing* dos neutrófilos provenientes dos animais tratados com o probiótico tende a ser maior do que a dos animais não tratados (**Figura 12A**). Quando analisamos a produção de ROS dos neutrófilos, indicada pela expressão da sonda DHE, não vimos

diferenças aparentes entre os grupos (**Figura 12B**). No entanto, demonstramos na citometria de fluxo que os camundongos infectados tratados com o probiótico apresentam maior número e frequência de neutrófilos produtores de ROS no sítio da infecção 12 horas após a infecção (**Figura 13D**).

Muitos trabalhos na literatura já demonstraram que probióticos são capazes de estimular o sistema imune inato (Seema Patel, 2015) e trabalhos do nosso grupo já demonstraram que *L. delbrueckii* UFV H2b20 também tem essa capacidade (Vieira *et al.*, 2008; Dos Santos *et al.*, 2011). No entanto, até então, pouco se sabe sobre como os probióticos influenciam efetivamente as vias de sinalização envolvidas na funcionalidade dos neutrófilos. O que se sabe é por inferência pela modulação de moléculas que são reguladas por vias já estabelecidas (Llewellyn A e Foey, 2017). Por exemplo, estudos mostraram que *B. animalis* MB5 e *L. rhamnosus* GG inibem a toxicidade de *E. coli* K88 diminuindo a indução dos mediadores inflamatórios TNF α , IL-1 β , IL-8 resultando na inibição da migração de neutrófilos para o local da infecção (Roselli M *et al*, 2006). *L. rhamnosus* GG também é capaz de inibir a formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos e a consequente produção de ROS, prevenindo o dano em tecidos durante doenças crônicas (Vong L *et al*, 2014). Já *L. rhamnosus* NutRes1 aumenta a expressão de CCL2, TNF α , IL-1 β , IL-6 e TLR2 e reduz a quantidade de neutrófilos e sua atividade (MPO) em um modelo murino de colite crônica (Zheng B *et al*, 2016). Em nossos resultados, observamos que após 12 horas de infecção havia mais neutrófilos em número e frequência no BAL dos animais infectados tratados do que no BAL dos animais infectados não tratados (**Figura 13C**), indicando que *L. delbrueckii* UFV H2b20 promove uma melhora da resposta neutrofílica inicial ao fungo e controle mais rápido desta resposta já que, 24 horas após a infecção, estes animais tratados apresentaram menor quantidade de neutrófilos no BAL (**Figura 11A**), confirmando a influência do tratamento na indução e regulação da resposta neutrofílica.

A rápida remoção dos neutrófilos apoptóticos no sítio da infecção é essencial para uma boa resolução das inflamações agudas (Vago JP *et al*, 2012). Portanto, observamos também a capacidade de eferocitose dos macrófagos presentes no BAL (**Figura 12C**) e mostramos que a dos macrófagos não estimulados com IFN- γ +LPS dos animais que receberam o probiótico foi maior do que a dos macrófagos não estimulados com IFN- γ +LPS dos animais que não receberam o probiótico. Além disso, a eferocitose dos macrófagos não estimulados com IFN- γ +LPS dos animais que receberam o probiótico foi igual a eferocitose dos macrófagos que foram estimulados com IFN+LPS, indicando que o tratamento com o probiótico, poderia atuar como o estímulo para os macrófagos. Corroborando estes dados, mostramos também por citometria de fluxo que o BAL dos animais infectados e tratados com *L. delbrueckii* UFV H2b20 tem uma menor frequência de neutrófilos apoptóticos, indicada pela expressão de anexina V (**Figura 13E**). Estes dados confirmam que além da influência na resposta neutrofílica, o tratamento também auxilia na rápida remoção destes neutrófilos no sítio da infecção e consequente resolução da inflamação.

Posteriormente, investigamos os mecanismos pelo qual *L. delbrueckii* UFV H2b20 estaria regulando a inflamação. Já existem evidências de que probióticos possuem a capacidade de regular o sistema imune frente às infecções. Por exemplo, Harata G. *et al*, mostraram em seus estudos que a administração de *L. rhamnosus* GG protege camundongos contra a infecção pelo vírus H1N1 através de regulação da resposta imunes nas vias aéreas (Harata G *et al*, 2010). Em nossos resultados, observamos que o BAL dos camundongos infectados tratados com o probiótico apresentaram maior número de células T reguladoras Foxp3⁺ em comparação com o dos camundongos infectados não tratados, indicado pela análise de citometria de fluxo. De acordo com Vignali DA *et al*, as células Treg têm, do ponto de vista funcional, quatro mecanismos de regulação do sistema imune: através de citólise, através da modulação de células dendríticas, através de citocinas reguladoras como IL-10 e TGF- β e através da expressão de CD39 e CD73, receptores que desfosforilam ATP para produzir adenosina que promove a imunossupressão mediada pelo receptor purinérgico A2A (Vignali DA *et al*, 2008). No presente trabalho, mostramos que o BAL dos camundongos infectados tratados com o probiótico também apresentou maiores quantidades das citocinas reguladoras IL-10 e TGF- β que estavam associadas a menor quantidade das citocinas pró inflamatórias IL-17 e IL-1 β , e também da quimiocinas quimiotática para neutrófilos CXCL-1 (**Figura 15**), o que nos leva a sugerir que o aumento destas citocinas reguladoras, com consequente diminuição de CXCL1 e das citocinas inflamatórias, possa ser um dos possíveis mecanismos de regulação da inflamação induzidos pelo probiótico. Em estudo anterior do nosso grupo, onde avaliamos os efeitos protetores de *L. delbrueckii* UFV H2b20 frente a inflamação alérgica pulmonar induzida por OVA, observamos também que o probiótico regulava a inflamação nos pulmões através da indução de IL-10 e ainda, observamos um aumento do número de células Treg expressando os receptores CD39 e CD73 (Montuori-de-Andrade, A.C.M., artigo em anexo - em submissão). Quando comparamos estes dados, concluímos que *L. delbrueckii* UFV H2b20 pode promover o controle da inflamação induzindo os diversos tipos de mecanismo de regulação das células Treg.

Finalmente, iniciamos uma investigação para saber se os efeitos protetores do *L. delbrueckii* UFV H2b20 poderiam ser causados pelo principal metabólito produzido pelas bactérias ácido lácticas, o lactato. Este metabólito tem sido indicado recentemente como um metabólito ativo de sinalização em vários campos da biologia e da medicina (Garrote GL *et al*, 2015) inclusive mediando vias de sinalização celulares que incluem migração celular e a produção de mediadores pró e anti-inflamatórios por células do sistema imune inato e adaptativo. O lactato intracelular pode ligar-se diretamente às proteínas, influenciar o estado redox por meio da reação da lactato desidrogenase e induzir espécies reativas de oxigênio (Haas R *et al*, 2016). Um estudo realizado por Iraporda C. *et al* mostrou que a administração local de lactato administrada por via intrarectal em um modelo murino de colite promoveu aspectos protetores prevenindo danos histopatológicos da doença, translocação bacteriana no cólon e aumento dos níveis de IL-6 no soro (Iraporda C *et al*, 2015). No entanto, os efeitos protetores do lactato administrado fora do local da inflamação/infecção ainda não foram relatados. Em nosso estudo

observamos que os animais com aspergilose pulmonar tratados com lactato via oral apresentaram uma taxa de letalidade 50% menor quando comparados com os animais que não ingeriram o lactato (**Figura 16**). Esta via pode ser uma sugestão de mecanismo de imunomodulação do probiótico. A maior produção de lactato promovida pelo probiótico estaria causando uma pré-modulação do sistema imune e, quando desafiados com *A. fumigatus*, os camundongos respondem mais eficientemente à infecção e regulam a resposta imunológica também com mais eficiência. No entanto, mais experimentos devem ser realizados para certificar os efeitos do lactato frente à infecção pulmonar por *A. fumigatus*. Outros mecanismos podem estar envolvidos e devem ser investigados como a alteração do perfil geral da microbiota promovido pela administração de *L. delbrueckii* UFV-H2b20, causando um efeito protetor pela maior produção de SCFA por esta microbiota alterada, o que seria plausível já que diversos trabalhos já mostraram a capacidade dos SCFAs em reduzir o risco de algumas doenças incluindo a síndrome do intestino irritável, a doença inflamatória do intestino, doenças cardiovasculares e câncer (Hijova e Chmelarova, 2007).

6. Conclusão

Organismos do gênero *Lactobacillus* têm sido usados tradicionalmente como probióticos e são considerados há muito tempo como uma alternativa biológica no controle da inflamação e no combate a bactérias, fungos e outros patógenos. Nesse contexto, a bactéria *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 é um probiótico capaz de estimular e modular o sistema imunológico do hospedeiro, sendo que alguns trabalhos já demonstraram seu efeito protetor durante infecções. Além disso, a aspergilose pulmonar é uma doença emergente cuja incidência vem crescendo cada vez mais nas últimas décadas, devido ao aumento de terapias imunossupressoras. Considerando o alto índice de mortalidade da aspergilose pulmonar e o alto grau de toxicidade das terapias antifúngicas utilizadas para esse patógeno, faz-se necessária a busca de alvos terapêuticos e terapias imunomoduladoras a fim de melhorar a resposta imune inflamatória frente à aspergilose pulmonar em pacientes. Os resultados gerados neste trabalho demonstram que a administração do probiótico *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 promoveu modulação do sistema imune em camundongos não infectados, indicada pelo aumento de macrófagos, células dendríticas de perfil regulador e células Treg nos linfonodos mesentéricos, além de maiores níveis de IgA nas fezes dos animais tratados. Após a infecção por *A. fumigatus*, os resultados mostraram que os animais que ingeriram *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 tiveram menor taxa de letalidade, menor carga fúngica nos pulmões, menor permeabilidade vascular nos pulmões, melhora nos parâmetros de função respiratória e diminuição do infiltrado neutrofílico nos pulmões 24 horas após a infecção em comparação com os animais que não ingeriram o probiótico. Essa melhora nos parâmetros da doença é provavelmente promovida pela otimização de funções dos neutrófilos como capacidade de *killing* e

aumento de neutrófilos produtores de ROS, assim como uma melhora na capacidade de remoção dos neutrófilos apoptóticos no sítio da infecção. Além disso, os resultados também mostram que o probiótico promove uma melhora na regulação da inflamação indicada pelo aumento de células Treg e aumento da produção de IL-10, TGF- β e diminuição de IL-17 e IL1- β nos pulmões, 24 horas após a infecção. Finalmente, sugerimos que o metabólito lactato pode ser indicado como um possível mediador entre a bactéria e o sistema imune para a promoção destes efeitos imunomoduladores.

Desta forma, tomados em conjunto, estes resultados nos permitem concluir que o probiótico *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 promove um efeito protetor frente a infecção experimental por *A. fumigatus*.

7. Referências

ALEXANDRE Y, LE BLAY G, BOISRAMÉ-GASTRIN S, LE GALL F, HÉRY-ARNAUD G, GOURIOU S, VALLET S, LE BERRE R. Probiotics: a new way to fight bacterial pulmonary infections? *Med Mal Infect*, v. 44, n. 1, p. 9-17, 2014.

AMIEVA, M.; PEEK, R. M., JR. Pathobiology of *Helicobacter pylori*-Induced Gastric Cancer. *Gastroenterology*, v. 150, n. 1, p. 64-78, 2016.

ATARASHI, K. Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells. *Cell*, v. 163, n. 2, p. 367-80, 2015.

BACKHED, F. ARAGON, F., CARINO, S., PERDIGON, G., and de MORENO DE LEBLANC, A. Inhibition of growth and metastasis of breast cancer in mice by milk fermented with *Lactobacillus casei* CRL 431. *J. Immunother.* 38, 185–196, 2015.

BAIN CC, MONTGOMERY J, SCOTT CL, KEL JM, GIRARD-MADOUX MJH, MARTENS L, ZANGERLE-MURRAY TFP, OBER-BLÖBAUM J, LINDENBERGH-KORTLEVE D, SAMSOM JN, HENRI. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 101, n. 44, p. 15718-23, 2004.

BAIN CC, MONTGOMERY J, SCOTT CL, KEL JM, GIRARD-MADOUX MJH, MARTENS L, ZANGERLE-MURRAY TFP, OBER-BLÖBAUM J, LINDENBERGH-KORTLEVE D, SAMSOM JN, HENRI S, LAWRENCE T, SAEYS Y, MALISSEN B, DALOD M, CLAUSEN BE, MOWAT AM. TGFβR signalling controls CD103⁺CD11b⁺ dendritic cell development in the intestine. *Nat Commun.* 2017 Sep 20;8(1):620. doi: 10.1038/s41467-017-00658-6. PMID: 28931816; PMCID: PMC5607002.

BALLOY, V.; CHIGNARD, M. The innate immune response to *Aspergillus fumigatus*. *Microbes Infect*, v. 11, n. 12, p. 919-27, 2009.

BANAEI, N.; ANIKST, V.; SCHROEDER, L. F. Burden of *Clostridium difficile* infection in the United States. *N Engl J Med*, v. 372, n. 24, p. 2368-9, 2015.

BARCELOS LS, TALVANI A, TEIXEIRA AS, VIEIRA LQ, CASSALI GD, ANDRADE SP, TEIXEIRA MM. Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. *J Leukoc Biol.* 2005 Aug;78(2):352-8. doi: 10.1189/jlb.1104682. Epub 2005 May 13. PMID: 15894588.

BEHNSEN J, DERIU E, SASSONE-CORSI M, RAFFATELLU M. Probiotics: properties, examples, and specific applications. *Cold Spring Harb Perspect Med*, v. 3, n. 3, p. a010074, 2013.

BELKACEM,N.; SERAFINI, N.; WHEELER, R.; DERRIEN, M.; BOUCINHA, L.; COUESNON, A.; CERF-BENSUSSAN, N.; BONECA, IG.; DI SANTO, JP.; TAHA, MK.; BOURDET-SICARD, R. *Lactobacillus paracasei* feeding improves immune control of influenza infection in mice. *PLoS One*, v. 12, n. 9, p. e0184976, 2017.

BEN-AMI, R.; LEWIS, R. E.; KONTOYIANNIS, D. P. Enemy of the (immunosuppressed) state: an update on the pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* infection. *Br J Haematol*, v. 150, n. 4, p. 406-17, 2010.

BERG, R. D. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol*, v. 4, n. 11, p. 430-5, 1996.

BINGULA, R.; FILAIRE, M.; RADOSEVIC-ROBIN, N.; BEY, M.; BERTHON, JY.; BERNALIER-DONADILLE, A.; VASSON, MP.; FILAIRE, E. Desired Turbulence? Gut-Lung Axis, Immunity, and Lung Cancer. *J Oncol*, v. 2017, p. 5035371, 2017.

BOUSKRA D, BRÉZILLON C, BÉRARD M, WERTS C, VARONA R, BONECA IG, EBERL G. Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nature* 456, 507–510, 2008

BRADFORD, M.A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v. 72, p. 248-54, 1976.

BRANDTZAEG, P. Secretory IgA: Designed for Anti-Microbial Defense. *Front Immunol*, v. 4, p. 222, 2013.

BRUNE K, FRANK J, SCHWINGSHACKL A, FINIGAN J, SIDHAYE VK. Pulmonary epithelial barrier function: some new players and mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, v. 308, n. 8, p. L731-45, 2015.

BUDDEN, K., GELLATLY, S., WOOD, D. Emerging pathogenic links between microbiota and the gut–lung axis. *Nat Rev Microbiol* 15, 55–63, 2017.

CHAI LY, VONK AG, KULLBERG BJ, VERWEIJ PE, VERSCHUEREN I, VAN DER MEER JW, JOOSTEN LA, LATGÉ JP, NETEA MG. *Aspergillus fumigatus* cell wall components differentially modulate host TLR2 and TLR4 responses. *Microbes Infect*, v. 13, n. 2, p. 151-9, 2011.

CHOTIRMALL SH, GELLATLY SL, BUDDEN KF, MAC AOGAIN M, SHUKLA SD, WOOD DL, HUGENHOLTZ P, PETHE K, HANSBRO PM. Microbiomes in respiratory health and disease: An Asia-Pacific perspective. *Respirology*, v. 22, n. 2, p. 240-250, 2017.

CLEMENTE JC, URSELL LK, PARFREY LW, KNIGHT R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*, v. 148, n. 6, p. 1258-70, 2012.

- COLLADO, M. C.; MERILUOTO, J.; SALMINEN, S. Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *Lett Appl Microbiol*, v. 45, n. 4, p. 454-60, 2007.
- COLLINS SM. A role for the gut microbiota in IBS. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014 Aug;11(8):497-505. doi: 10.1038/nrgastro.2014.40. Epub 2014 Apr 22. PMID: 24751910.
- COX, G. The role of neutrophils in inflammation. *Can Respir J*, v. 5 Suppl A, p. 37A-40A, 1998.
- CREMON C, BARBARO MR, VENTURA M, BARBARA G. *Curr Opin Pharmacol*, v. 43, p. 87-92, 2018.
- CRUCHET S, FURNES R, MARUY A, HEBEL E, PALACIOS J, MEDINA F. The Use of probiotics in pediatric gastroenterology: a review of the literature and recommendations by Latin-American experts. *Paediatr Drugs* (2015) 17(3):199–216. doi:10.1007/s40272-015-0124-6
- DA SILVA JF, PELUZIO JM, PRADO G, MADEIRA JE, SILVA MO, DE MORAIS PB, ROSA CA, PIMENTA RS, NICOLI JR. Use of Probiotics to Control Aflatoxin Production in Peanut Grains. *ScientificWorldJournal*, v. 2015, p. 959138, 2015.
- DAGENAIS, T. R.; KELLER, N. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*, v. 22, n. 3, p. 447-65, 2009.
- DENNING, D. W. Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis*, v. 26, n. 4, p. 781-803; quiz 804-5, 1998.
- DONG L, XIE J, WANG Y, ZUO D. Gut Microbiota and Immune Responses. *Adv Exp Med Biol*, v. 1238, p. 165-193, 2020.
- DOS SANTOS LM, SANTOS MM, DE SOUZA SILVA HP, ARANTES RM, NICOLI JR, VIEIRA LQ. Monoassociation with probiotic *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 stimulates the immune system and protects germfree mice against *Listeria monocytogenes* infection. *Med Microbiol Immunol*, v. 200, n. 1, p. 29-38, 2011.
- DRAPER K, LEY C, PARSONNET J. A survey of probiotic use practices among patients at a tertiary medical centre. *Benef Microbes*, 2017, 8(3):345–51. doi:10.3920/BM2016.0148
- ERREA A, CAYET D, MARCHETTI P, TANG C, KLUZA J, OFFERMANN S, SIRARD JC, RUMBO M. Lactate Inhibits the Pro-Inflammatory Response and Metabolic Reprogramming in Murine Macrophages in a GPR81-Independent Manner. *PLoS One*. 2016 Nov 15;11(11):e0163694.
- ERWIG, L. P.; GOW, N. A. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nat Rev Microbiol*, v. 14, n. 3, p. 163-76, 2016.
- ESTERHÁZY D, LOSCHKO J, LONDON M, JOVE V, OLIVEIRA TY, MUCIDA D. Classical dendritic cells are required for dietary antigen-mediated induction of peripheral T(reg) cells and

tolerance. *Nat Immunol.* 2016 May;17(5):545-55. doi: 10.1038/ni.3408. Epub 2016 Mar 28. PMID: 27019226; PMCID: PMC4837106.

FEDOROVA ND, KHALDI N, JOARDAR VS, MAITI R, AMEDEO P, ANDERSON MJ, CRABTREE J, SILVA JC, BADGER JH, ALBARRAQ A, ANGIUOLI S, BUSSEY H, BOWYER P, COTTY PJ, DYER PS, EGAN A, GALENS K, FRASER-LIGGETT CM, HAAS BJ, INMAN JM, KENT R, LEMIEUX S, MALAVAZI I, ORVIS J, ROEMER T, RONNING CM, SUNDARAM JP, SUTTON G, TURNER G, VENTER JC, WHITE OR, WHITTY BR, YOUNGMAN P, WOLFE KH, GOLDMAN GH, WORTMAN JR, JIANG B, DENNING DW, NIERMAN WC. Genomic islands in the pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Genet*, v. 4, n. 4, p. e1000046, 2008.

FIOCCHI, A; PAWANKAR, R; CUELLO-GARCIA, C; AHN, K; AL-HAMMADI, S; AGARWAL, A; BEYER, K; BURKS, W; CANONICA, GW; EBISAWA, M; GANDHI, S; KAMENWA, R; LEE, BW; LI, H; PRESCOTT, S; RIVA, JJ; ROSENWASSER, L; SAMPSON, H; SPIGLER, M; TERRACCIANO, L; VEREDA-ORTIZ, A; WASERMAN, S; YEPES-NUNEZ, JJ; BROZEK, JL AND SCHUNEMANN, HJ. World Allergy Organization-McMaster University Guidelines for Allergic Disease Prevention (GLAD-P): Probiotics. *World Allergy Organ J.* 8, 4-2015.

FORSYTHE, P. Probiotics and lung diseases. *Chest*, v. 139, n. 4, p. 901-908, 2011.

GANGNEUX JP, BOUGNOUX ME, DANNAOUI E, CORNET M, ZAHAR JR. Invasive fungal diseases during COVID-19: we should be prepared. *J Mycol Med* 2020; published online April 6. DOI:10.1016/j.mycmed.2020.100971.

GARROTE GL, ABRAHAM AG, RUMBO M. Is lactate an undervalued functional component of fermented food products? *Front Microbiol* (2015) 6:629. doi:10.3389/fmicb.2015.00629

GARROTE GL, ABRAHAM AG, RUMBONOVAL SUBUNIT IN SECRETORY IGA. *Nature*, v. 228, n. 5278, p. 1276-8, 1970.

GENSOLLEN T, IYER SS, KASPER DL, BLUMBERG RS. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science*, v. 352, n. 6285, p. 539-44, 2016.

GONÇALVES SM, LAGROU K, DUARTE-OLIVEIRA C, MAERTENS JA, CUNHA C, CARVALHO A. The microbiome-metabolome crosstalk in the pathogenesis of respiratory fungal diseases. *Virulence*, v. 8, n. 6, p. 673-684, 2017.

GUEIMONDE M, SAKATA S, KALLIOMÄKI M, ISOLAURI E, BENNO Y, SALMINEN S. Effect of maternal consumption of lactobacillus GG on transfer and establishment of fecal bifidobacterial microbiota in neonates. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, v. 42, n. 2, p. 166-70, 2006.

GURY-BENARI M, THAISS CA, SERAFINI N, WINTER DR, GILADI A, LARA-ASTIASO D, LEVY M, SALAME TM, WEINER A, DAVID E, SHAPIRO H, DORI-BACHASH M, PEVSNER-FISCHER M, LORENZO-VIVAS E, KEREN-SHAUL H, PAUL F, HARMELIN A, EBERL G, ITZKOVITZ S, TANAY A, DI SANTO JP, ELINAV E, AMIT I. The spectrum and regulatory landscape of intestinal innate lymphoid cells are shaped by the microbiome. *Cell* 166, 1231–1246, 2016

HALPERN, M. S.; KOSHLAND, M. S, LAWRENCE T, SAEYS Y, MALISSEN B, DALOD M, CLAUSEN BE, MOWAT AM. TGFβR signalling controls CD103⁺CD11b⁺ dendritic cell development in the intestine. *Nat Commun.* 2017 Sep 20;8(1):620. doi: 10.1038/s41467-017-00658-6. PMID: 28931816; PMCID: PMC5607002.

HOD, K.; RINGEL, Y. Probiotics in functional bowel disorders. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 30, n. 1, p. 89-97, 2016.

HAAS R, CUCCHI D, SMITH J, PUCINO V, MACDOUGALL CE, MAURO C. Intermediates of metabolism: from bystanders to signalling molecules. *Trends Biochem Sci* (2016) 41:460–71. doi:10.1016/j.tibs.2016.02.003

HARATA G, HE F, HIRUTA N, KAWASE M, KUBOTA A, HIRAMATSU M, YAUSI H. Intranasal administration of *Lactobacillus rhamnosus* GG protects mice from H1N1 influenza virus infection by regulating respiratory immune responses. *Lett Appl Microbiol.* 2010 Jun 1;50(6):597-602. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02844.x. Epub 2010 Mar 29. PMID: 20438620.

HIJOVA E, CHMELAROVA A. Short chain fatty acids and colonic health. *Bratisl Lek Listy.* 2007;108(8):354-8. PMID: 18203540.

HOGAN, D.; WHEELER, R. T. The complex roles of NADPH oxidases in fungal infection. *Cellular Microbiology*, v. functional bowel disorders. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 30, n. 1, p. 89-97, 2016.

HOHL, T. M.; FELDMESSER, M. *Aspergillus fumigatus*: principles of pathogenesis and host defense. *Eukaryot Cell*, v. 6, n. 11, p. 1953-63, 2007.

HOUGEE S, VRIESEMA AJ, WIJERING SC, KNIPPELS LM, FOLKERTS G, NIJKAMP FP, *et al.* Oral treatment with probiotics reduces allergic symptoms in ovalbumin-sensitized mice: a bacterial strain comparative study. *International archives of allergy and immunology* 2010, 151(2): 107-117.

HU J, LUO H, WANG J, TANG W, LU J, WU S, XIONG Z, YANG G, CHEN Z, LAN T, ZHOU H, NIE J, JIANG Y, CHEN P. Enteric dysbiosis-linked gut barrier disruption triggers early renal injury induced by chronic high salt feeding in mice. *Exp Mol Med*, v. 49, n. 8, p. e370, 2017.

IRAPORDA C, ERREA A, ROMANIN DE, CAYET D, PEREYRA E, PIGNATARO O, SIRARD JC, GARROTE GL, ABRAHAM AG, RUMBO M. Short chain fatty acids produced by microbial fermentation downregulate proinflammatory responses in intestinal epithelial cells and myeloid cells. *Immunobiology*. 2015 Oct;220(10):1161-9. doi: 10.1371/journal.pone.0163694.1016/j.imbio.2015.06.004. Epub 2015 Jun 10. PMID: 2610113827846210; PMCID: PMC511284926101138.

IRAPORDA C, ROMANIN DE, BENGEOA AA, ERREA AJ, CAYET D, FOLIGNÉ B, SIRARD JC, GARROTE GL, ABRAHAM AG, RUMBO M. Local Treatment with Lactate Prevents Intestinal Inflammation in the TNBS-Induced Colitis Model. *Front Immunol*. 2016 Dec 27;7:651. doi: 10.3389/fimmu.2016.00651. PMID: 28082985; PMCID: PMC5187354.

ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. C. Microbial-gut interactions in health and disease. *Probiotics*. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, v. 18, n. 2, p. 299-313, 2004.

IVANOV II, ATARASHI K, MANEL N, BRODIE EL, SHIMA T, KARAOZ U, WEI D, GOLDFARB KC, SANTEE CA, LYNCH SV, TANOUE T, IMAOKA A, ITOH K, TAKEDA K, UMESAKI Y, HONDA K, LITTMAN DR. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell*, v. 139, n. 3, p. 485-98, 2009.

JAFARI, S. A., MEHDIZADEH-HAKKAK, A., KIANIFAR, H. R., HEBRANI, P., AHANCHIAN, H., AND ABBASNEJAD, E. Effects of probiotics on quality of life in children with cystic fibrosis; a randomized controlled trial. *Iran. J. Pediatr.* 23, 669–674, 2013

JENKS, J. D.; HOENIGL, M. Treatment of Aspergillosis. *J Fungi (Basel)*, v. 4, n. 3, 2018.

KANG, H. J.; IM, S. H. Probiotics as an Immune Modulator. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, v. 61 Suppl, p. S103-5, 2015.

KAUR N, CHEN CC, LUTHER J, KAO JY. Intestinal dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut Microbes*, v. 2, n. 4, p. 211-6, 2011.

KAWAHARA T, TAKAHASHI T, OISHI K, TANAKA H, MASUDA M, TAKAHASHI S, TAKANO M, KAWAKAMI T, FUKUSHIMA K, KANAZAWA H, SUZUKI T Consecutive oral administration of *Bifidobacterium longum* MM-2 improves the defense system against influenza virus infection by enhancing natural killer cell activity in a murine model. *Microbiol Immunol* 59:1–12. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12210>, v. 59, n. 1, p. 1-12, 2015.

KHAILOVA, L., BAIRD, C. H., RUSH, A. A., BARNES, C., AND WISCHMEYER, P. E. *Lactobacillus rhamnosus* GG treatment improves intestinal permeability and modulates inflammatory response and homeostasis of spleen and colon outcome in experimental model of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Clin. Nutr.* 36, 1549–1557. doi: 10.1016/j.clnu.2016.09.025: potential role of regulatory T cells. *Shock*, v. 40, n. 6, p. 496-503, 2013.

KOLACZKOWSKA E, KUBES P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 13(3), 159–175 (2013).

KUMAR P, MONIN L, CASTILLO P, ELSEGEINY W, HORNE W, EDDENS T, VIKRAM A, GOOD M, SCHOENBORN AA, BIBBY K, MONTELARO RC, METZGER DW, GULATI AS, KOLLS JK. Intestinal Interleukin-17 Receptor Signaling Mediates Reciprocal Control of the Gut Microbiota and Autoimmune Inflammation. *Immunity*, v. 44, n. 3, p. 659-671, 2016.

KWON-CHUNG, K. J.; SUGUI, J. A. *Aspergillus fumigatus*-what makes the species a ubiquitous human fungal pathogen? *PLoS Pathog*, v. 9, n. 12, p. e1003743, 2013.

KULAS J, MIRKOV I, TUCOVIC D, ZOLOTAREVSKI L, GLAMOCLIIJA J, VELJOVIC K, TOLINACKI M, GOLIC N, KATARANOVSKI M. Pulmonary *Aspergillus fumigatus* infection in rats affects gastrointestinal homeostasis. *Immunobiology*, v. 224, n. 1, p. 116-123, 2019.

KULAS, J. C. J., JONKERS, D., SMIDT, H., ROMBOUTS, F., PENNING, PULMONARY H. J., WOUTERS, E. The effect of a multispecies probiotic on the composition of the fecal microbiota and bowel habits in chronic obstructive pulmonary disease patients treated with antibiotics. *Br. J. Nutr.* 2010, 103, 1452–1460. doi: 10.1017/S0007114509993497

LATGE, J. P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*, v. 12, n. 2, p. 310-50, 1999
_____. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol*, v. 9, n. 8, p. 382-9, 2001.

LAU, A. S., YANAGISAWA, N., HOR, Y. Y., LEW, L. C., ONG, J. S., CHUAH, L. O. *Bifidobacterium longum* BB536 alleviated upper respiratory illnesses and modulated gut microbiota profiles in Malaysian pre-school children. *Benef. Microbes* 9, 61–70, 2018. doi: 10.3920/BM2017.0063

LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat Rev Microbiol*, v. 8, n. 3, p. 171-84, 2010.

LINDNER C, THOMSEN I, WAHL B, UGUR M, SETHI MK, FRIEDRICHSEN M, SMOCZEK A, OTT S, BAUMANN U, SUERBAUM S, SCHREIBER S, BLEICH A, GABORIAU-ROUTHIAU V, CERF-BENSUSSAN N, HAZANOV H, MEHR R, BOYSEN P, ROSENSTIEL P, PABST O. Diversification of memory B cells drives the continuous adaptation of secretory antibodies to gut microbiota. *Nat Immunol*, v. 16, n. 8, p. 880-8, 2015.

LIU, Q.; JING, W.; WANG, W. *Bifidobacterium lactis* Ameliorates the Risk of Food Allergy in Chinese Children by Affecting Relative Percentage of Treg and Th17 Cells. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, v. 2018, p. 4561038, 2018.

LLEWELLYN A, FOEY A. Probiotic Modulation of Innate Cell Pathogen Sensing and Signaling Events. *Nutrients*. 2017 Oct 23;9(10):1156. doi: 10.3390/nu9101156. PMID: 29065562; PMCID: PMC5691772.

MACPHERSON AJ, UHR T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science*, 2004, 303:1662–5. doi: 10.1126/science.1091334

MALACCO NL, SOUZA JA, MENDES AC, RACHID MA, KRAEMER LR, MATTOS MS, LIMA GN, SOUSA LP, SOUZA DG, PINHO V, TEIXEIRA MM, RUSSO RC, SORIANI FM. Acute lung injury and repair induced by single exposure of *Aspergillus fumigatus* in immunocompetent mice. *Future Microbiol*. 2019 Nov; 14:1511-1525. doi: 10.2217/fmb-2019-0214. Epub 2020 Jan 8. PMID: 31913059.

MCFARLAND LV. From yaks to yogurt: the history, development and current use of probiotics. *Clin Infect Dis*, 2015, 60(S2):S85–90. doi:10.1093/cid/civ054

MCFARLAND LV, EVANS CT, GOLDSTEIN EJC. Strain-Specificity and Disease-Specificity of Probiotic Efficacy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Med (Lausanne)*. 2018 May 7;5: 124. doi: 10.3389/fmed.2018.00124. PMID: 29868585; PMCID: PMC5949321.

MEHRAD, B.; STANDIFORD. *Aspergillus fumigatus* infection in rats affects gastrointestinal homeostasis. *Immunobiology*, v. 224, n. 1, p. 116-123, 2019..

MEHRAD, B.; STANDIFORD, T. J. Use of Animal Models in the Study of Inflammatory Mediators of Pneumonia. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*, v. 40, n. 4, p. 167–174, 1999.

MORTAZ E, ADCOCK LM, FOLKERTS G, BARNES PJ, VOS AP, GARSSSEN J. Probiotics in the management of lung diseases. *Mediat Inflamm*, 2013, 2013:1–10. <https://doi.org/10.1155/2013/751068>

- MACPHERSON, A. J.; HARRIS, N. A.; Britti, M.S.; Mengheri, E. Probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* MB5 and *Lactobacillus rhamnosus* GG protect intestinal Caco-2 cells from the inflammation-associated response induced by enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *Br. J. Nutr.* 2006, 95, 1177–1184.
- MADAN JC, KOESTLER DC, STANTON BA, DAVIDSON L, MOULTON LA, HOUSMAN ML, MOORE JH, GUILL MF, MORRISON HG, SOGIN ML, HAMPTON TH, KARAGAS MR, PALUMBO PE, FOSTER JA, HIBBERD PL, O'TOOLE GA. Serial analysis of the gut and respiratory microbiome in cystic fibrosis in infancy: interaction between intestinal and respiratory tracts and impact of nutritional exposures. *mBio*, v. 3, n. 4, 2012.
- MARGALIT, A.; KAVANAGH, K. The innate immune response to *Aspergillus fumigatus* at the alveolar surface. *FEMS Microbiol Rev*, v. 39, n. 5, p. 670-87, 2015.
- MARSLAND, B. TROMPETTE, A.; GOLLWITZER, E. S. The Gut-Lung Axis in Respiratory Disease. *Ann Am Thorac Soc*, v. 12 Suppl 2, p. S150-6, 2015.
- MATSUBARA VH, BANDARA HM, MAYER MP, SAMARANAYAKE LP. Probiotics as Antifungals in Mucosal Candidiasis. *Clin Infect Dis*, v. 62, n. 9, p. 1143-53, 2016.
- MCALEER JP, NGUYEN NL, CHEN K, KUMAR P, RICKS DM, BINNIE M, ARMENTROUT RA, POCIASK DA, HEIN A, YU A, VIKRAM A, BIBBY K, UMESAKI Y, RIVERA A, SHEPPARD D, OUYANG W, HOOPER LV, KOLLS JK. Pulmonary Th17 Antifungal Immunity Is Regulated by the Gut Microbiome. *J Immunol*, v. 197, n. 1, p. 97-107, 2016.
- MEDINI D, SERRUTO D, PARKHILL J, RELMAN DA, DONATI C, MOXON R, FALKOW S, RAPPUOLI R. Microbiology in the post-genomic era. *Nat Rev Microbiol*, v. 6, n. 6, p. 419-30, 2008.
- MESTECKY, J.; ZIKAN, J.; BUTLER, W. Immunoglobulin M and secretory J.; Assa, A.; Glogauer, M.; Sherman, P.M. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* inhibits the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Immunol.* 2014, 192, 1870–1877.
- MICELI, M. H.; KAUFFMAN, C. A. Isavuconazole: A New Broad-Spectrum Triazole Antifungal Agent. *Clin Infect Dis*, v. 61, n. 10, p. 1558-65, 2015.
- MIZOCK, B. A. Probiotics. *Dis Mon*, v. 61, n. 7, p. 259-90, 2015.
- MOOR K, DIARD M, SELLIN ME, FELMY B, WOTZKA SY, TOSKA A, BAKKEREN E, ARNOLDINI M, BANSEPT F, CO AD, VÖLLER T, MINOLA A, FERNANDEZ-RODRIGUEZ B, AGATIC G, BARBIERI S, PICCOLI L, CASIRAGHI C, CORTI D, LANZAVECCHIA A, REGOES RR, LOVERDO C, STOCKER R, BRUMLEY DR, HARDT WD, SLACK E. High-avidity IgA protects the intestine by enchainning growing bacteria. *Nature*, v. 544, n. 7651, p. 498-502, 2017.

- MOWAT, A. AGACE, W. W. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol*, v. 14, n. 10, p. 667-85, 2014.
- MULLINS, J.; HARVEY, R.; SEATON, A. Sources and incidence of airborne *Aspergillus fumigatus* (Fres). *Clin Allergy*, v. 6, n. 3, p. 209-17, 1976.
- MURDOCK BJ, FALKOWSKI NR, SHREINER AB, SADIGHI AKHA AA, MCDONALD RA, WHITE ES, TOEWS GB, HUFFNAGLE GB. Interleukin-17 drives pulmonary eosinophilia following repeated exposure to *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect Immun*. 2012 Apr;80(4):1424-36. doi: 10.1128/IAI.05529-11. Epub 2012 Jan 17. PMID: 22252873; PMCID: PMC3318426.
- NEUMANN E, OLIVEIRA MA, CABRAL CM, MOURA LN, NICOLI JR, VIEIRA EC, CARA DC, PODOPRIGORA GI, VIEIRA LQ. Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice. *Braz J Med Biol Res*, v. 31, n. 12, p. 1565-73, 1998.
- NEUMANN E, RAMOS MG, SANTOS LM, RODRIGUES AC, VIEIRA EC, AFONSO LC, NICOLI JR, VIEIRA LQ. *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 induces type 1 cytokine production by mouse cells in vitro and in vivo. *Braz J Med Biol Res*, v. 42, n. 4, p. 358-67, 2009.
- PABST, O.; CEROVIC, V.; HORNEF, M. Secretory IgA in the Coordination of Establishment and Maintenance of the Microbiota. *Trends Immunol*, v. 37, n. 5, p. 287-296, 2016.
- PARK MK, NGO V, KWON YM, LEE YT, YOO S, CHO YH, HONG SM, HWANG HS, KO EJ, JUNG YJ, MOON DW, JEONG EJ, KIM MC, LEE YN, JANG JH, OH JS, KIM CH, KANG SM. *Lactobacillus plantarum* DK119 as a probiotic confers protection against influenza virus by modulating innate immunity. *PLoS One*, v. 8, n. 10, p. e75368, 2013.
- PEREZ-NADALES E, NOGUEIRA MF, BALDIN C, CASTANHEIRA S, EL GHALID M, GRUND E, LENGELER K, MARCHEGANI E, MEHROTRA PV, MORETTI M, NAIK V, OSES-RUIZ M, OSKARSSON T, SCHÄFER K, WASSERSTROM L, BRAKHAGE AA, GOW NA, KAHMANN R, LEBRUN MH, PEREZ-MARTIN J, DI PIETRO A, TALBOT NJ, TOQUIN V, WALTHER A, WENDLAND J. Fungal model systems and the elucidation of pathogenicity determinants. *Fungal Genet Biol*, v. 70, p. 42-67, 2014.
- PITT, J. I. The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. *J Med Vet Mycol*, v. 32 Suppl 1, p. 17-32, 1994.
- QUIGLEY, E. M. Probiotics in Irritable Bowel Syndrome: The Science and the Evidence. *J Clin Gastroenterol*, v. 49 Suppl 1, p. S60-4, 2015.

RACEDO S, VILLENA J, MEDINA M, AGÜERO G, RODRÍGUEZ V, ALVAREZ S. Lactobacillus casei administration reduces lung injuries in a Streptococcus pneumoniae infection in mice. *Microbes Infect*, v. 8, n. 9-10, p. 2359-66, 2006.

RODRÍGUEZ-CARRIO J, LÓPEZ P, SÁNCHEZ B, GONZÁLEZ S, GUEIMONDE M, MARGOLLES A, DE LOS REYES-GAVILÁN CG, SUÁREZ A. Intestinal Dysbiosis Is Associated with Altered Short-Chain Fatty Acids and Serum-Free Fatty Acids in Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol*, v. 8, p. 23, 2017.

ROSELLI, M.; FINAMORE, A.; BRITTI, M.S.; MENGHERI, E. Probiotic bacteria Bifidobacterium animalis MB5 and Lactobacillus rhamnosus GG protect intestinal Caco-2 cells from the inflammation-associated response induced by enterotoxigenic Escherichia coli K88. *Br. J. Nutr.* 2006, 95, 1177–1184.

ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol*, v. 9, n. 5, p. 313-23, 2009.

RUANE D, BRANE L, REIS BS, CHEONG C, POLES J, DO Y, ZHU H, VELINZON K, CHOI JH, STUDDT N, MAYER L, LAVELLE EC, STEINMAN RM, MUCIDA D, MEHANDRU S. Lung dendritic cells induce migration of protective T cells to the gastrointestinal tract. *J Exp Med*, v. 210, n. 9, p. 1871-88, 2013.

SAMUELSON, D. R.; WELSH, D.SHELLITO, J. E. Regulation of lung immunity and host defense by the intestinal microbiota. *Front Microbiol*, v. 6, p. 1085, 2015.

SANTOSA S, FARNWORTH E, JONES PJ. Probiotics and their potential health claims. *Nutrition reviews* 2006, 64(6): 265-274.

SANTOS, N. S. Isolamento e caracterização de Lactobacillus acidophilus de fezes de crianças alimentadas ao seio e de bezerros, visando sua utilização como adjunto dietético. 1984. Dissertation (MSc Dissertation). Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil.

SEEMA PATEL, RISHIKESH SHUKLA, ARUN GOYAL, Probiotics in valorization of innate immunity across various animal models, *Journal of Functional Foods*, Volume 14, 2015, Pages 549-561, ISSN 1756-4646.

SEGAL, B. H. Aspergillosis. *N Engl J Med*, v. 360, n. 18, p. 1870-84, 2009.

SMITH, K.; MCCOY, K. D.; MACPHERSON, A. J. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Semin Immunol*, v. 19, n. 2, p. 59-69, 2007.

SONNENBURG, E. D.; SONNENBURG, J. L. Starving our microbial self: the deleterious consequences of a diet deficient in microbiota-accessible carbohydrates. *Cell Metab*, v. 20, n. 5, p. 779-786, 2014.

SORIANI FM, MALAVAZI I, DA SILVA FERREIRA ME, SAVOLDI M, VON ZESKA KRESS MR, DE SOUZA GOLDMAN MH, LOSS O, BIGNELL E, GOLDMAN GH. Functional characterization of the *Aspergillus fumigatus* CRZ1 homologue, CrzA. *Mol Microbiol*. 2008 Mar;67(6):1274-91. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06122.x. Epub 2008 Feb 20. PMID: 18298443.

STRATH M, WARREN DJ, SANDERSON CJ. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. *J Immunol Methods*. 1985 Nov 7;83(2):209-15. doi: 10.1016/0022-1759(85)90242-x. PMID: 3840509.

TANG, M. L. Probiotics and prebiotics: immunological and clinical effects in allergic disease. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program*, v. 64, p. 219-35; discussion 235-8, 251-7, 2009.

TEKAIA, F.; LATGE, J. P. *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? *Curr Opin Microbiol*, v. 8, n. 4, p. 385-92, 2005.

THAKUR, R. *et al.* Cytokines induce effector T-helper cells during invasive aspergillosis; what we have learned about T-helper cells? *Front Microbiol*, v. 6, p. 429, 2015.

VAGO JP, NOGUEIRA CRC, TAVARES LP. Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis. *J. Leukoc. Biol.* 92(2), 249–258, 2012.

VALIANTE V, MACHELEIDT J, FÖGE M, BRAKHAGE AA. The *Aspergillus fumigatus* cell wall integrity signaling pathway: drug target, compensatory pathways, and virulence. *Front Microbiol*, v. 6, p. 325, 2015.

VEDANTAM, G.; HECHT, D. W. Antibiotics and anaerobes of gut origin. *Curr Opin Microbiol*, v. 6, n. 5, p. 457-61, 2003.

VIGNALI DA, COLLISON LW, WORKMAN CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*. 2008 Jul;8(7):523-32. doi: 10.1038/nri2343. PMID: 18566595; PMCID: PMC2665249.

VIEIRA AT, ROCHA VM, TAVARES L, GARCIA CC, TEIXEIRA MM, OLIVEIRA SC, CASSALI GD, GAMBA C, MARTINS FS, NICOLI JR. Control of *Klebsiella pneumoniae* pulmonary infection and immunomodulation by oral treatment with the commensal probiotic *Bifidobacterium longum* 5(1A). *Microbes Infect*, v. 18, n. 3, p. 180-9, 2016.

VIEIRA LQ, DOS SANTOS LM, NEUMANN E, DA SILVA AP, MOURA LN, NICOLI JR. Probiotics protect mice against experimental infections. *J Clin Gastroenterol*, v. 42 Suppl 3 Pt 2, p. S168-9, 2008.

VONG, L.; LORENTZ, R. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol*, v. 4, n. 6, p. 478-85, 2004.

VONG, L.; LORENTZ, R.J.; ASSA, A.; GLOGAUER, M.; SHERMAN, P.M. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* inhibits the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Immunol.* 2014, 192, 1870–1877.

WALSH TJ, ANAISSIE EJ, DENNING DW, HERBRECHT R, KONTOYIANNIS DP, MARR KA, MORRISON VA, SEGAL BH, STEINBACH WJ, STEVENS DA, VAN BURIK JA, WINGARD JR, PATTERSON TF. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, v. 46, n. 3, p. 327-60, 2008.

WHELAN, K.; QUIGLEY, E. M. Probiotics in the management of irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol*, v. 29, n. 2, p. 184-9, 2013.

WOLF JM, KERR MA. The function of immunoglobulin A in immunity. *J Pathol.* 2006 Jan;208(2):270-82. doi: 10.1002/path.1877. PMID: 16362985.

WU CT, CHEN PJ, LEE YT, KO JL, LUE KH. Effects of immunomodulatory supplementation with *Lactobacillus rhamnosus* on airway inflammation in a mouse asthma model. *J Microbiol Immunol Infect*, v. 49, n. 5, p. 625-635, 2016.

ZHENG, B.; VAN BERGENHENEGOUWEN, J.; VAN DE KANT, H.J.G.; FOLKERTS, G.; GARSSSEN, J.; VOS, A.P.; MORGAN, M.E.; KRANEVELD, A.D. Specific probiotic dietary supplementation leads to different effects during remission and relapse in murine chronic colitis. *Benef. Microbes* 2016, 7, 205–213.

ZHENG, B.; VAN BERGENHENEGOUWEN, J.; VAN DE KANT, H.J.G.; FOLKERTS, G.; GARSSSEN, J.; VOS, A.P.; MORGAN, M.E.; KRANEVELD, A.D. Specific probiotic dietary supplementation leads to different effects during remission and relapse in murine chronic colitis. *Benef. immunoglobulin A: presence of a common polypeptide chain different from light chains.* *Science*, v. 171, n. 3976, p. 1163-5, 1971.

ZHENG, D., LIWINSKI, T. & ELINAV, E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Res* 30, 492–506, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0332-7>

ZOLNIKOVA O, KOMKOVA I, POTSKHERASHVILI N, TRUKHMANOV A, IVASHKIN V. Application of probiotics for acute respiratory tract infections. *Ital J Med*, 2018, 12:32. <https://doi.org/10.4081/itjm.2018.931>

8. Anexo

The probiotic *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 protects mice against experimental allergic asthma by increasing CD39⁺CD73⁺ Treg cells

Ana Clara Matoso Montuori de Andrade¹, Ana Elisa Nolasco e Silva¹, Nathália Luísa Sousa de Oliveira Malacco², Leonardo Gomes Vaz¹, Luís Carlos Crocco Afonso⁴, Remo Castro Russo³ Leda Quercia Vieira¹, Liliane Martins dos Santos¹

¹Departamento de Bioquímica e Imunologia, ²Departamento de Genética Ecologia e Evolução, ³Laboratório de Imunologia e Mecânica Pulmonar, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte MG, Brazil, ⁴ Departamento de Ciências Biológicas and NUPEB, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brazil

Corresponding author: Liliane Martins dos Santos

ORCID ID 0000-0002-4466-8868

Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

Email: lilianemartins.bh16@gmail.com

Abstract

Asthma is a disorder characterized by airflow obstruction, inflammation, declining airway function, bronchial hyperresponsiveness and tissue remodeling. Probiotic is defined as “live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host”. The use of probiotics is becoming increasingly studied and recent evidence has suggested that it may provide therapeutic benefits in asthma and other diseases. *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 fulfills requirements to be classified as probiotic. Previous studies have already shown the ability of *L. delbrueckii* UFV-H2b20 to stimulate the immune system. Our objective was to evaluate protective effects of *L. delbrueckii* UFV-H2b20 in experimental allergic asthma. We used ovalbumin-induced allergic airway inflammation

mouse model to mimic allergic asthma. Oral treatment with *L. delbrueckii* UFV-H2b20 improves respiratory parameters, inhibits the inflammatory response in the lungs by decreasing numbers of inflammatory monocytes, eosinophils and alveolar macrophages, as well as IL-4 and IgE levels. Results also revealed that this protection may be associated with higher numbers of CD39⁺ CD73⁺ T regulatory lymphocytes and increased production of IL-10 in lungs, which would promote regulation of the inflammatory response. Treatment also increased the Th1/Th2 ratio, as determined by increased IFN- γ and decreased IL-4 production. Understanding the mechanisms of modulation of the immune system by probiotics could allow the development of probiotic preparations that are safe and have a direct action. Therefore, oral administration of *L. delbrueckii* UFV-H2b20 could be helpful to treat chronic inflammatory airway diseases, such as asthma.

Key words: Probiotic, *Lactobacillus delbrueckii*, allergic asthma, Treg cell, CD39, CD73

1. Introduction

The term probiotic is defined as “live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host” [1]. Several studies have shown the ability of probiotics to prevent diseases and promote health improvement [2]. To qualify an organism as probiotic, a strain must satisfy requirements such as be regarded as safe, be resistant to gastric acid and bile, survive the gastrointestinal transit, and confer some health benefit to the host such as regulation of intestinal microbial homeostasis, interference with the ability of pathogens to colonize and infect the mucosa, and modulation of local or systemic immune responses [3]. Probiotics orally administered may interact with the gastrointestinal mucosa and associated gut lymphoid tissue, where more than 70% of immune cells are located [4]. Probiotics interact in different ways with macrophages, mucosal dendritic cells (DCs) and intestinal epithelial cells. Pattern recognition receptors such as Toll-like receptors play a key role in the recognition and transmission of signals that exert different types of immune responses [5]. Specific bacterial strains may induce the production of anti-inflammatory cytokines such as interleukin (IL)-10 [6]. However, probiotic microorganisms do not interact only with the gut mucosa. There is now increasing evidence that oral probiotics are also capable of regulating immune responses outside of the gut [7], such as the respiratory mucosa [8,30-32].

Lactobacillus delbrueckii UFV-H2b20, which was at first identified as *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2B20, was isolated at the Universidade de Viçosa, MG, Brazil, from feces of a newborn child. PCR analysis classified this strain as *Lactobacillus delbrueckii* var. *bulgaricus* [9]. *L. delbrueckii* UFV-H2b20 is a probiotic candidate because it fulfills the requirements that a bacterial strain needs to be classified as such. *L. delbrueckii* UFV-H2b20 is a inhabitant of human intestinal tract and is able to resist the gastrointestinal tract adverse conditions and stay viable [10]. Previous studies from our group have shown that *L. delbrueckii* UFV-H2b20 stimulates the immune system by improving the phagocytic capacity of mouse macrophages [10] or inducing type 1 cytokine production by mouse cells *in vitro* and *in vivo* [11]. We have also shown that *L. delbrueckii* UFV-H2b20 protects germfree mice against infection by the intracellular food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* [12].

Allergic asthma prevalence has increased and, according to the “hygiene hypothesis”, lesser exposure to microorganisms in early childhood in increasingly clean environments in industrialized countries is the key-factor to explain the continuous increase of prevalence [13]. It is also hypothesized, however, that high in energy and low in fiber diets may contribute to increase prevalence of the disease [13]. Asthma is a heterogeneous and complex disorder that has several clinical phenotypes in adults and children. It is characterized by variable airflow obstruction, inflammation, decreased airway functions, bronchial hyperresponsiveness and tissue remodeling [15-17]. Its onset and evolution has multiple causes, and factors that trigger the disease may vary from genetic causes [18] to environmental factors such as viral infections of the respiratory tract in childhood [19], allergens [20] and occupational exposure [21]. Allergies are usually related to pronounced or deregulated Th2 responses. The production of the cytokines IL-4, IL-5, IL-9 and IL-13 characterize Th2 cells and contribute to development and maintenance of allergic inflammation. However, other cell types besides Th2 cells are involved in allergic responses. Regulatory T (Treg) cells, which have immunomodulatory and immunosuppressive functions, are fundamental to maintain the immunological tolerance and play essential role in controlling inflammatory responses and autoimmune diseases. It has been well established that alterations in Treg cell numbers and function are associated with progression of allergic diseases [23].

In the present study, we used an OVA-induced allergic asthma murine model [24] to evaluate the effect of *L. delbrueckii* UFV-H2b20 on the development allergic response. We found that treatment with *L. delbrueckii* UFV-H2b20 protected mice against airway inflammation. This effect was associated with enhanced regulatory responses such as increased IL-10 levels and higher CD39⁺CD73⁺ Treg cell numbers. In addition, treatment led to increasing levels of interferon-gamma (IFN)- γ and IL-4 decrease.

2. Methods

- Animals:

In this study we used six-week-old female BALB/c mice obtained from the Centro de Bioterismo of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). All animal experiments were in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in the Animal Experimentation (CEUA/UFMG) (protocol number 139/2015). Mice were maintained in an experimental animal house with barriers and received autoclaved water and chow *ad libitum*.

- Maintenance and treatment with *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20

Lactobacillus delbrueckii UFV-H2b20 was isolated at Universidade Federal de Viçosa (UFV), MG, Brazil, from feces of a newborn child and brought to Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) in reconstituted nonfat milk (RNM) 12%. This culture was aliquoted and used as culture stock in our experiments. *L. delbrueckii* cultures were expanded by inoculating 100 µL of the frozen aliquotes into 10 mL of MRS medium (DeMan, Rogosa eSharpe, Merck, São Paulo) for 18 to 20 hours at 37° C. After 18 to 20 hours at 37° C the culture was centrifuged at 3000 x g at 4° C for 15 minutes, washed twice in sterile saline and resuspended in 1 mL saline, thus obtaining a final 10⁹ UFC/ml concentration. This preparation was added to water bottles containing 150 mL of drinking water. Fresh preparation was given every 48 hours to ensure that mice were ingesting live cells. Control group mice received only water. Treatment remained until the sacrifice day.

- CFSE labeling of *L. delbrueckii* UFV H2b20

L. delbrueckii UFV H2b20 was cultivated following the above protocol and the pellet resuspended in 2 mL of 10 µM carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) in phosphate buffered saline (PBS) and incubated at room temperature for 1 hour, in the dark, while gently shaking to ensure even staining. Preparations were centrifuged at 3000 x g at 4° C for 15 minutes, and the pellet resuspended in 10mL PBS. This procedure was repeated twice. After the final wash, the pellet was resuspended with 1mL PBS and administered to animals by adding to the drinking water. 24 and 48 hours after ingestion feces samples from mice were collected and 30 mg of each sample was weighed, diluted in 1 mL of PBS and centrifuged at 3000 x g for 15 minutes. The pellets were

resuspended in 200 μ L of PBS and acquisition was performed in a FACSCanto flow cytometry (BD) with unlabeled bacteria as negative controls and labeled bacteria as positive control. Data analyses were performed using version 10.6.1 of FlowJo software (FlowJo LLC, Ashland, OR, USA).

- Experimental asthma induction

Ten days after initiation of *L. delbrueckii* UFV H2b20 treatment, BALB/c mice were sensitized subcutaneously inoculated with 200 μ L of a 1 μ g OVA solution (Sigma-Aldrich) and 1 mg Pepsamar aluminum hydroxide (Sanofi-Synthelabo de Colombia S.A., Santiago de Cali, Valle de Cauca, Colombia) in sterile saline. Control group received aluminum hydroxide in the same concentration. After 14 days, mice received a subcutaneous boost of 1 mg aluminum hydroxide in 200 μ L saline. Control group received saline only. The OVA challenge by aerosolization started seven days after the booster. Mice breathed 1% OVA in sterile saline for 20 minutes/day, for 6 consecutive days. Mice were sacrificed 24 hours after the last challenge. *L. delbrueckii* UFV H2b20 treatment was kept throughout the allergy induction period until sacrifice day.

- Lung histological analysis

For histological analysis, lungs were collected, fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, sliced into 5 μ m thick sections and stained with hematoxylin-eosin (H & E). Slides were analyzed by microscope and photographed, and quantification of inflammation area and number of foci were performed on Image J 1.51s software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Three sections of each slide were used to measure the area of the inflammation and count the number of foci. Results were represented as mean of the 3 sections for each animal.

- Assessment of pulmonary mechanics

Pulmonary dysfunction was measured as we previously described [25-27]. For invasive *in vivo* assessment, mice were anesthetized and tracheostomized, then were placed in a whole-body plethysmograph to maintain spontaneous breathing connected to a computer-controlled ventilator (Forced Pulmonary Maneuver System®, Buxco Research Systems©, Wilmington, NC (USA)). Under mechanical respiration the Tidal Volume (TV), Volume per Minute (MV), Dynamic Compliance (Cdyn)

and Lung Resistance (LR) were determined by Resistance and Compliance RC test. To measure the Chord compliance (C_{chord}), pressure-volume maneuvers were performed. This procedure consists of inflating lungs to a standard pressure of +30 cm H₂O and then slowly desinflating until a negative pressure of -30 cm H₂O is reached. To measure the Forced Expiratory Volume at 50 milliseconds (FEV₅₀), a Fast-Flow Volume maneuver were performed and Flow-Volume curves were recorded during this maneuver. To evaluate Airway Hyperreactivity (AHR), the same mice used in the previous maneuvers (basal condition) received 1 mg/Kg methacholine (Acetyl-β-methylcholine chloride, A-2251, Sigma-Aldrich St., Louis, MO, USA) *i.v.* and after 10 seconds, new set of maneuvers were conducted to assess LR changes.

- **Bronchoalveolar lavage (BAL) and lung analysis**

For BAL assessment, mice were anaesthetized, their trachea were exposed, and a small cut was made where a needle coupled to a cannula was introduced to the hilum. BAL was collected injecting about 700μL of 0.9% saline through the cannula and instantly sucking it back. This procedure was repeated twice. BAL was centrifuged at 1000 x g for 10 minutes and the supernatant was stored at -20° C for cytokine measure. Cells were resuspended in saline, stained with Trypan blue, and counting of viable cells was performed in Neubauer chambers. After BAL harvesting, lungs were perfused with 5 mL of PBS to remove circulating blood and the right lobes were removed and frozen for subsequent analysis of eosinophil peroxidase (EPO).

- **Evaluation of eosinophilic peroxidase activity (EPO)**

Lungs were collected and 100 mg of tissue obtained from control and infected animals were homogenized in PBS 5% and centrifuged at 1120g for 10 minutes at 4 °C, discarding the supernatant. The precipitate was subjected to hypotonic lysis with 1.5 mL of 0.2% NaCl solution for 30 seconds followed by the addition of an equal volume of the solution containing 1.6% NaCl and 5% glucose. After centrifugation at 1120g for 10 minutes at 4 °C, the supernatant was discarded and the precipitate was suspended and homogenized in a PBS solution with 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA). The samples were homogenized and submitted to three cycles of freezing and thawing in liquid nitrogen and centrifuged at 1120g for 15 minutes at 4 ° C,

collecting the supernatant for the assay. The reaction was carried out by adding 75 μ L of the supernatant in 96-well microplates, followed by the addition of 75 μ L of the substrate (1.5 mM o-phenylenediamine d - OPD dihydro-chlorite in 0.075 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, plus 6.6 mM H₂O₂). After 30 minutes of incubation in the dark, the reaction was stopped by adding 50 μ L of H₂SO₄ and reading was performed on a spectrophotometer at a wavelength of 492 nm

- Lung cells flow cytometry

BAL and right lungs were collected after last OVA challenge for cellular profile analysis by flow cytometry. Lung samples were perfused with 5 mL of PBS through the right ventricle of the heart for removal of blood from the pulmonary vascular bed and immediately collected. The right lungs were cut into smaller pieces and incubated for 40 min in 1 mL of RPMI medium (Gibco BRL Life Technologies, Grand Island, NY, USA) containing 125 μ g/mL TL liberase (ROCHE, Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) and 0.005 g/mL deoxyribonuclease I (Sigma-Aldrich). After this time, 1 mL of RPMI containing 10% bovine fetal serum (BFS) was added to block the digestion. Lung samples were then macerated, and lung homogenates and the collected BAL were centrifuged at 300 x g for 10 minutes at 4 °C. Samples containing 1.0 x 10⁶ cells in 200 μ L were labeled for 20 minutes with different combinations of the following antibodies for surface staining: anti-CD11b (clone M1/70); anti-CD11c (clone HL3); anti-siglecF (clone E50-2440); anti-F4/80 (clone BM8); anti-Ly6G (clone 1A8); anti-Ly6G (clone 1A8); anti-MHC II (clone AF6-120.1); anti-TCR β (clone H57-597), anti-CD4 (clone GK1.5), anti CD44 (clone IM7), anti-CD39 (clone eBioA1); anti-CD73 (clone TY/23) and anti-CD16/CD32 (clone 24G.2) for blocking Fc receptors. For Foxp3 staining, cells were fixed and permeabilized using the eBioscience™ Intracellular Fixation and Permeabilization Buffer Set (Thermofisher, Waltham, MA, USA) according to the instructions of the manufacturer. All antibodies used were purchased from BD (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA, USA). Exclusion of dead cells was performed using the LIVE/DEAD Aqua stain kit (Thermofisher, Waltham, MA, USA). After staining, cells were washed twice and resuspended in PBS containing 10% BFS. Acquisition was performed in a FACSCanto flow cytometry (BD). Data analyses were performed using version 10.6.1

of FlowJo software. Gating strategy for flow cytometry analysis of myeloid cells was based on a previous study [49] and is shown in Supplementary Figure 1.

- **Cytokine and IgE detection**

Right lungs were collected and 100 mg of each organ was homogenized in 1ml of PBS containing protease inhibitors cocktail solution (Roche) and 0.05 % Tween 20. Samples were centrifuged for 10 minutes at 3000 x *g* and the supernatants were immediately used for cytokine detection. DuoSet ELISA Kits were used for detection of murine IL-10 and IFN- γ according to procedures supplied by the manufacturer (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, EUA). IL-4 was detected using 11B11 mAb and biotinylated BVD6 mAb. For specific-OVA IgE serum levels detection, a sandwich ELISA test following manufacturer protocols was performed (SouthernBiotech Birmingham, AL, USA). The detection limits for cytokine assays were: 2 pg/ml for IL-10 and IFN- γ and 1 pg/ml for IL-4.

- **Statistical analysis**

Statistical analyses were performed using Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Comparisons between two groups were made using Student's *t* test and among three groups, using One-Way Anova test. The differences were considered statistically significant for $P < 0.05$. Error bars in graphs represent standard deviations of the means.

3. Results

- ***L. delbrueckii* UFV H2b20 remains in the mouse gut for 24 hours after ingestion.**

We initially verified if mice were indeed ingesting the probiotic preparation administered in bottles by measuring the amount of liquid ingested by each group. As can be observed in Figure 1, the group that was offered water and the group that ingested *L. delbrueckii* UFV H2b20 suspended in water consumed the same amount of liquid (Fig. 1A). We next determined if *L. delbrueckii* UFV H2b20 could be found in feces of mice that ingested CFSE-labeled *L. delbrueckii* UFV H2b20. We observed that the bacteria

could still be found in treated animals up until 24 hours after the ingestion but not after 48 hours (Fig 1B).

- **Treatment with *L. delbrueckii* UFV-H2b20 decreases cellular infiltrate in lungs after OVA challenge.**

The protective effects of *L. delbrueckii* UFV H2b20 against experimental asthma were first evaluated by comparison of lung tissues. Control group (control) ingested only water throughout the experiment and was not submitted to OVA challenge; Asthma group ingested only water throughout the experiment and were submitted to induction of pulmonary inflammation with OVA; Asthma + LAC group ingested water supplemented with *L. delbrueckii* UFV H2b20 (10^9 UFC/mL in 150 mL of drinking water/day) and was submitted to the induction of pulmonary inflammation with OVA. We observed a noticeable decrease in peribronchial inflammation (arrows) in lungs of the Asthma + LAC group compared to the Asthma group (Figure 2A). This result was confirmed by reduced inflammation area (Figure 2B) and decreased number of inflammatory foci (Figure 2 B) of the Asthma + LAC group.

- **Treatment with *L. delbrueckii* UFV-H2b20 improves basal lung functions in response to OVA challenge and protects mice from Airway Hyperreactivity.**

To investigate whether histopathological changes correlated with alterations in lung function, spirometric analyses were performed. Asthma mice had compromised mechanical lung function when compared to Asthma LAC mice, as seen by increased lung basal resistance as well as increased airway hyperreactivity induced by methacholine (Figure 3A), and a small decreased respiratory minute volume (Figure 3B) in comparison to Asthma LAC animals. We did not see any difference between treated and non-treated groups in total volume (Figure 3C), forced expiratory volumes in 50 ms (Figure 3D), Chord Compliance (Figure 3 E) or dynamic compliance (Figure 3F) parameters.

- **Treatment with *L. delbrueckii* UFV-H2b20 decreases myeloid cell numbers in BAL in response to OVA challenge**

Since our results revealed a decrease in the inflammatory infiltrate and some lung dysfunction in the Asthma + LAC group when compared to Asthma group, we proceeded to determine the cell populations that migrated to the lungs. The total number of cells in BAL was determined and differential counts were performed. There was a significant decrease in the numbers of cells from the Asthma+LAC group

compared to Asthma group (Figure 4A) when evaluated by microscopy counting. Differential counting of BAL by flow cytometry showed decreased numbers of eosinophils (Figure 4B), alveolar macrophages (Figure 4C) and inflammatory monocytes (Figure 4D) in BAL of Asthma + LAC group compared to Asthma. No significant differences were observed in numbers of dendritic cells (Figure 4E) and neutrophils (Figure 4F). The gating strategy for multicolor flow cytometry analysis can be found in supplementary figure 1 (S1). Decreased eosinophilic infiltrate in lung tissue could also be confirmed by eosinophil peroxidase activity assay. We found lower activity in lungs of Asthma + LAC group compared to the lungs of Asthma group (Fig 4G).

- Treatment with *L. delbrueckii* UFV-H2b20 changes activated T CD4⁺ lymphocytes and Treg cell numbers in lungs in response to OVA challenge

To further characterized a possible mechanism of action, we evaluate the T cell profile in the lungs, as activated lymphocytes are important to maintenance of allergic profile and Treg cell is important for regulation of inflammation in this organ. We characterized the TCR- β^+ cell population in lungs of the three experimental groups and used the expression of CD44 as a marker for cell activation. Surprisingly, we found a significant increase in total TCR- β^+ cells (Figure 5A) in the Asthma +LAC group. Initially, an increase of TCR- β^+ cells would lead us to think that a higher number of lymphocytes are maintaining the allergic profile in the lungs of the treated animals, which would contradict our results. However, when we looked at CD44⁺ CD4⁺ effector T cells we observed a decreased in the number of activated cells in treated animals (Figure 5B), corroborating our results. In order to find out if the increase in total TCR- β^+ cells was related to the regulation of inflammation, we looked for CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells and found a significant increase in number of these cells in Asthma+LAC group in comparison with Asthma group (Figure 5C), thus suggesting that an immunoregulatory profile can be elicited by treatment with *L. delbrueckii* UFV-H2b20. In addition to the increasing number of regulatory T cells, we also observed an increasing number of these cells expressing the ectonucleotidases CD39 and CD73 (Figure 5D) in treated animals. Ectonucleotidases play an important role in regulating the duration, magnitude and chemical nature of purinergic signals transmitted to cells of the immune system [44].

- Treatment with *L. delbrueckii* UFV-H2b20 changes cytokine and IgE levels in response to OVA challenge

L. delbrueckii UFV-H2b20 modulates the production of cytokines in the host [11]. Therefore, to verify if probiotic treatment promotes regulatory mechanisms that would contribute to a shift in the Th2/Th1 balance, we measured the production of IFN- γ and IL-4 by ELISA (figure 6). We found an increase in IFN- γ production (Figure 6B) and a decrease in IL-4 production (Figure 6C), indicating a shift to a type 1 response. We also measured IL-10 and found an increase in production in the Asthma +LAC group (Figure 6A), suggesting that the probiotic treatment can also promote regulatory responses. In addition to cytokines, the allergic asthma model also has an increase in IgE production as a striking feature, which was attenuated in treated animals both in BAL (Figure 6D) and serum (Figure 6E).

4. Discussion

Since the beginning of the 20th century, several beneficial effects have been attributed to the consumption of products containing probiotic bacteria [28]. Various strains of lactobacilli have been widely used as probiotics. Several studies have shown the beneficial effects of probiotics in treatment and prevention of allergic diseases such as asthma [30]. The World Allergy Organization (WAO) suggests the use of probiotics in pregnant women who are at risk of having an allergic child; in women who are breastfeeding children at risk of developing allergy; in children who are being breastfed. However, human studies are still insufficient, and recommendations are based on poor quality evidence. Despite this, clinical studies continue to take place to guide the use of probiotics in clinical practice [29].

In murine models, there is much evidence that the administration of certain probiotics may modulate allergic responses in the respiratory tract. For example, a previous study showed that the probiotic *Bifidobacterium breve* M-16V reduces allergic symptoms in mice sensitized with OVA decreasing the eosinophil numbers in BAL and OVA-specific IgE and OVA-specific IgG1 levels [31]. In the present study, we demonstrated that treatment with *L. delbrueckii* UFV-H2b20 improved several important parameters of the disease such as the inflammatory response in lungs, histopathological damage, BAL and serum total IgE in treated mice. Parameters like lung resistance and respiratory volume per minute, which are extremely harmed in asthma [15], were also very well recovered in treated animals, indicating a great improvement in lung function. Another study demonstrated that oral administration of *Bifidobacterium infantis* CGMCC313-2, during or after allergen sensitization,

suppressed allergic inflammation in lung and intestinal tissues, while the proportion of infiltrating inflammatory cells was significantly decreased in the BAL of allergic asthma mice [32]. They also demonstrated that the expression of IL-4 and IL-13 in both serum and BAL was suppressed following the administration of *B. infantis* CGMCC313-2. In our study, we observed significant decreased number of eosinophils, alveolar macrophages, inflammatory monocytes and lower IL-4 levels in BAL of treated animals.

In regards to dendritic cells, studies have already shown that probiotics induce their maturation [33]. DCs are one of the first cells to recognize probiotics in the intestine and can ingest and retain bacteria for a few days [34]. This ingestion induces a tolerogenic DC phenotype which, after interaction with T and B cells, can promote and maintain an anti-inflammatory immune response through mechanisms including induction of Treg cell subtypes [35]. However, we did not find differences on the number of DCs between treated and untreated animals. Concerning the number of neutrophils our data also did not show significant differences between groups. The model of pulmonary allergic inflammation used in our study is a predominantly Th2 and eosinophilic model [36], where neutrophils do not occur in large quantities. Therefore, low numbers of these cells were expected in BAL of allergy group and our findings suggest that the probiotic does not alter the amount of these cells in BAL.

Asthma is an inflammatory disease mediated by T lymphocytes and there are suggestions that the mucosal immune system is involved, with the migration of activated T lymphocytes from one mucosal site to another. There is evidence that the beneficial effects of probiotics are associated with changes on the T cell responses balance leading to Th2 response activity reduction. Juan *et al* [37] showed in their work that oral administration of *Clostridium butyricum* reversed the imbalance of Th1/Th2 responses and increased the anti-inflammatory cytokine IL-10. Previous studies from our group have already shown that *L. delbrueckii* UFV-H2b20 is able to stimulate production of Th1 cytokines in mice both locally and systemically [11-12]. In our study we further demonstrated that *L. delbrueckii* UFV-H2b20 can contribute to establish a Th1/Th2 balance by decreasing IL-4 production in BAL of probiotic-treated animals during asthma. Mice treated with *L. delbrueckii* UFV-H2b20 also produced higher amounts of IL-10. It is known that there are specific bacterial strains that can induce the

production of pro-inflammatory cytokines, while others may stimulate the production of anti-inflammatory cytokines triggering signs of tolerance [6]. The ability of *L. delbrueckii* UFV H2b20 to produce IL-10 has also been demonstrated in the literature. A previous study from our group demonstrated that animals treated with *L. delbrueckii* UFV H2b20 and infected with *Listeria monocytogenes* had higher production of local IL-10 in the intestine that contributed to the resolution of the intestinal infection [12]. Therefore, it is interesting to note that the present work makes an additional contribution in this sense since, as stated, treated animals presented higher levels of IL-10 in a different site of inflammation other than the intestine, in this case, the lung.

In lung tissue we observed higher number of total T lymphocytes, decreased numbers of activated T CD4⁺ cells and increased numbers of Treg lymphocytes. Several studies have already shown the ability of probiotics to induce Treg cells, which are able to attenuate both Th1 and Th2 responses, an essential element for the anti-inflammatory action of probiotic organisms [7]. There is evidence that the anti-inflammatory effect of probiotics may be associated with significant increase in Treg cells proportion [38] and studies have already shown the importance of these cells to suppress allergen-induced eosinophilia in asthma rodent models [35]. With respect to monocyte and macrophage suppression, the impact of Treg cells on these populations *in vivo* is poorly defined [39]. However, studies have proposed that Treg cells can directly suppress the activation of monocytes and macrophages and also their effector functions including production of cytokines and expression of co-stimulatory surface molecules [40-41]. In another recent study, Liu *et al* [42] showed that treatment with Treg cells reduced COX-2 expression in macrophages and induced transition of macrophage phenotype from M1 to M2 in an abdominal aortic aneurysm murine model.

In addition, we also observed higher Treg cell numbers expressing CD39 and CD73 related to reduced airway inflammation and hyperreactivity induced by *L. delbrueckii* UFV-H2b20. The ectonucleotidases ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 or E-NTPDase1 (CD39) and ecto-50-nucleotidase or Ecto50NTase (CD73) have an important role in regulating the duration, magnitude and chemical nature of purinergic signals transmitted to the cells of the immune system. CD39 converts adenosine diphosphate (ADP) and adenosine triphosphate (ATP) into adenosine monophosphate

(AMP). CD73, in turn, dephosphorylates AMP, releasing adenosine. This allows for a change from a pro-inflammatory environment induced by ATP to an anti-inflammatory environment induced by adenosine [44]. Purinergic mediators such as ATP and adenosine are released into the extracellular space by damaged or stressed cells [43] and acts as sensory signals to shape immune responses [44]. Many studies have demonstrated the importance of these molecules and severe tissue damage and chronic pulmonary complications in CD73 and CD39 deficient animals in response to allergens have been described [45]. In addition, CD39 and CD73 are highly expressed on the Treg cell surface, playing a key role in controlling inflammatory responses, and have been increasingly used as markers of Treg activity [46-47]. The catabolic activity of CD39 and CD73 is synchronized with the activation state of these cells. In fact, studies have shown that murine Treg cells exhibit increased CD39 activity only after activation of their T cell receptors and it has been observed that this enzyme is inactive in unstimulated cells [48]. This increase in ATP metabolizing activity appears to be critical for the immunosuppressive activity of regulatory T cells [47], which highlights the importance of studies associating purinergic pathway factors and regulatory mechanisms mediated by Treg cells. These evidences help explain the reduced inflammatory infiltrate and disease parameters in *L. delbrueckii* UFV-H2b20 treated animals since the increase in cells expressing these ectonucleotidases allows a change from a pro-inflammatory environment induced by ATP to an anti-inflammatory environment induced by adenosine that upregulates IL-10 [44].

In summary, our results show that oral treatment with *L. delbrueckii* UFV-H2b20 inhibits the inflammatory response in lungs of BALB/c mice after OVA stimulation, decreasing inflammatory cell numbers and total BAL and serum IgE while also improving lung function and airway hyperreactivity. We suggest that *L. delbrueckii* UFV-H2b20 administration stimulates regulatory responses in treated animals through two mechanisms of Treg cells: IL-10 production and expression of CD73 and CD39, modulating purinergic signaling pathways. These two responses combined with the higher production of IFN- γ control the heightened Th2 response in allergic mice. Further studies are currently underway to understand which components of *L. delbrueckii* UFV H2b20 are responsible for the activation of these immunoregulatory responses.

Declarations

Availability of data and material: (data transparency)

Code availability (software application or custom code)

Funding: This study was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Conflict of interests: The authors declare that they have no conflict of interests.

Ethics approval: Comissão de Ética no Uso de Animais – Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFMG) Protocol number 139/2015

Acknowledgments:

Acknowledgements: ACMMA is a FAPEMIG fellow. LMS is a CNPq fellow. LQV and LCCA are CNPq fellows. LGV is a CAPES fellow. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil (CAPES) Finance Code 001, and CNPq grants number 304588/2013-0 and 309789/2017-5. CAPES is currently cutting funds to graduate programs, even those of recognized excellency. CNPq has not launched any calls for basic research proposals for the last two years and is also cutting fund for scholarships. Brazil is currently dismantling research groups and facilities due to lack of funding. The state agency, FAPEMIG, which previously funded the authors, owes the authors grant money that has been approved and not payed. This paper was written under great distress due to the coronavirus pandemic and threats against Democracy and Science in Brazil.

Author contributions

All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by Ana Clara Matoso Montuori de Andrade, Liliane Martins dos Santos, Ana Elisa Nolasco e Silva, Nathália Luísa Sousa de Oliveira Malacco, Leonardo Gomes Vaz and Remo

Castro Russo. The first draft of the manuscript was written by Ana Clara Matoso Montuori de Andrade and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Legends to figures

Fig. 1 *L. delbrueckii* UFV H2b20 intake assessment. Mice were divided into two groups. One ingested only water and the other ingested water + *L. delbrueckii* UFV H2b20. **A)** Amount of liquid ingested per group in mL, measured daily. Mice received oral treatment of live *L. delbrueckii* UFV H2b20 previously labeled with CFSE. At different time points after treatment, feces were collected, and fluorescence was evaluated by flow cytometry **B)** *L. delbrueckii* UFV H2b20 labeled with CFSE in feces. Green: unlabeled *L. delbrueckii* UFV H2b20; Grey: labeled *L. delbrueckii* UFV H2b20; Red: labeled *L. delbrueckii* UFV H2b20 in feces 24 hours after ingestion; Blue: labeled *L. delbrueckii* UFV H2b20 in feces 48 hours after ingestion. Results are representative of two experiments performed (n= 5 mice per experiment).

Fig. 2 Lung cellular infiltrate analyses in response to OVA challenge. Asthma and Asthma+LAC groups were challenged with 10mg/mL of OVA by aerosolization; control group received saline. BAL and lungs were collected 24 hours after last OVA challenge. Left lungs were fixed with 10% formaldehyde, embedded in paraffin, and stained with hematoxylin-eosin. **A)** Lung histology (200x total magnification, bars = 50 μ m). Arrows indicate areas of peribronchial inflammation **I**=Control; **II**=Asthma; **III**=Asthma+LAC. **B)** Inflammation area analyzed in ImageJ software indicated as mean percentage of inflammatory foci size evaluated in three different sections of the histological slide for each animal at 200x magnification. **C)** Number of inflammatory foci in lungs represented as mean count of the number of foci in three different sections of the histological slide for each animal at 200x magnification. Results are representative of two experiments performed (n= 3 to 5). *Significant difference between Asthma and Asthma + LAC ($p < 0.05$).

Fig. 3. Lung function analyses in response to OVA challenge. Asthma and Asthma+LAC groups were challenged with 10mg/mL of OVA by aerosolization; control group received saline and lung

function was assessed 24 hours after the last OVA challenge. (A) Lung Resistance; (B) Respiratory Volume per Minute; (C) Tidal volume; (D) Forced Expiratory Volume at 50 msec; (E) Chord Compliance; (F) Dynamic Compliance. Results are representative of two experiments performed (n=5 mice per experiment). ($p < 0.05$)

Fig 4. Myeloid cell profile in BAL after OVA challenge. Asthma and Asthma+LAC groups were challenged with 10mg/mL of OVA by aerosolization; control group received saline. BAL and lungs were collected after the last OVA challenge. Right lungs were store at -80 °C for EPO assays. BAL total cell counts were performed by light microscopy. BAL flow cytometric analysis was also performed. **A)** Total number of cells in BAL; **B-G)** Characterization of cells in BAL by flow cytometry **B)** Eosinophils (CD11b⁺CD11c⁺SiglecF⁺); **C)** Alveolar macrophages (CD11b⁺CD11c⁺F4/80⁺SiglecF⁺); **D)** Inflammatory monocytes (CD11b⁺Ly6C^{high}); **E)** Dendritic cells (CD11b⁺CD11c⁺MHCII^{high}); **F)** Neutrophils (CD11b⁺Ly6C^{int}Ly6G^{high}); **G)** EPO activity in lung. Results are representative of two experiments performed (n= 3 to 5 mice per experiment). # Significant difference between Control and Asthma; * Significant difference between Asthma and Asthma+LAC ($p < 0.05$).

Fig 5. Activated lymphocyte and Treg cell numbers in lung after OVA challenge. Asthma and Asthma+LAC groups were challenged with 10mg/mL of OVA by aerosolization; control group received saline. Lungs were perfused and collected after the last OVA challenge. Afterwards lungs were digested, macerated, centrifuged, cells were plated and labelled for different T cell markers. **A)** total numbers of TCR- β ⁺; **B)** CD44⁺ CD4⁺ Foxp3⁻ T lymphocytes; **C)** Treg cells (TCR- β ⁺ CD4⁺ Foxp3⁺); **D)** CD39⁺ CD73⁺ Treg cells. Results are representative of two experiments performed (n= 3 to 5 mice per group). # Significant difference between Control and Asthma; * Significant difference between Asthma and Asthma+LAC ($p < 0.05$).

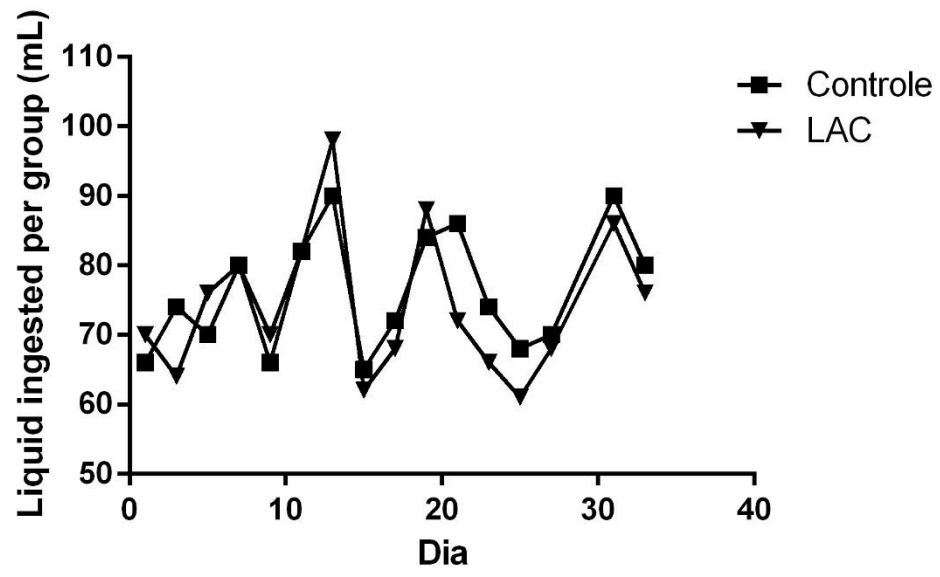
Figure 6. Cytokines and IgE detection: Asthma and Asthma+LAC groups were challenged with 10mg/mL of OVA by aerosolization; control group received saline. BAL was collected after the last OVA challenge and stored at -80C for ELISA analysis. **A)** IL-10; **B)** IFN- γ ; **C)** IL-4; **D)** IgE in BAL; **E)** IgE in serum. Results are representative of three experiments performed (n= 3 to 5 mice per

experiment). # Significant difference between Control and Asthma; * Significant difference between Asthma and Asthma+LAC ($p < 0.05$).

Fig S1. Myeloid cell characterization strategy. Cells were first gated to eliminate doublets (FSC-H x FSC-A) followed by exclusion of dead cells by LIVE/DEAD stain. Live cells were then divided into CD11b positive and CD11b negative populations. CD11b negative cells gated double positive for Syg1eF and F4/80 were considered alveolar macrophages. CD11b positive cells gated positive for Syg1eF were considered eosinophils. CD11b positive Syg1eF negative cells were gated as follows: interstitial macrophages ($CD11b^+Ly6G^-Ly6C^-F4/80^+$), inflammatory monocytes ($CD11b^+Ly6C^{high}$), conventional dendritic cells ($CD11b^+Ly6G^-Ly6C^-CD11c^+MHCII^{high}$) and neutrophils ($CD11b^+Ly6C^{int}Ly6G^{high}$). FSC-H: Forward scatter height. FSC-A: Forward scatter area.

Figure 1

A



B

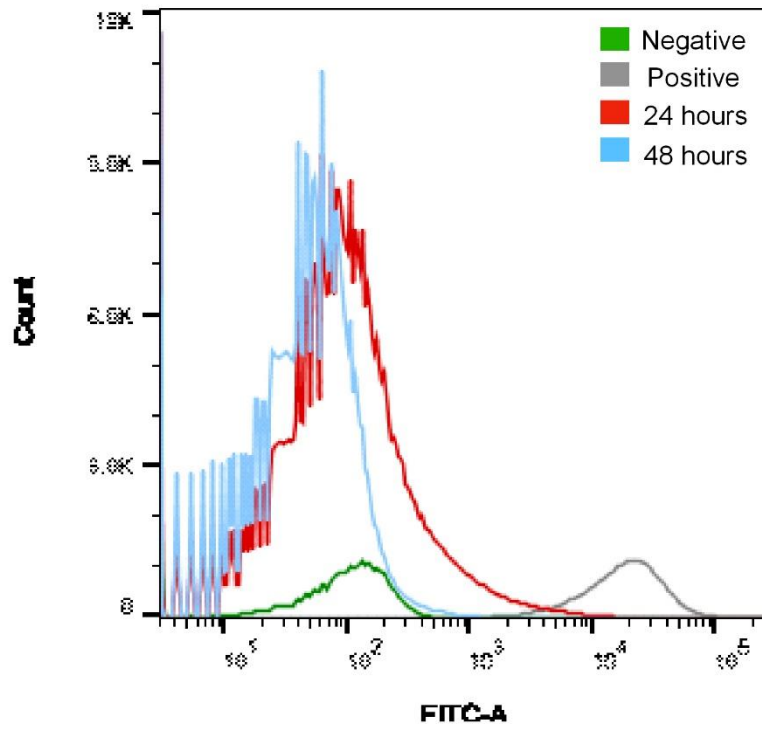


Figure 2

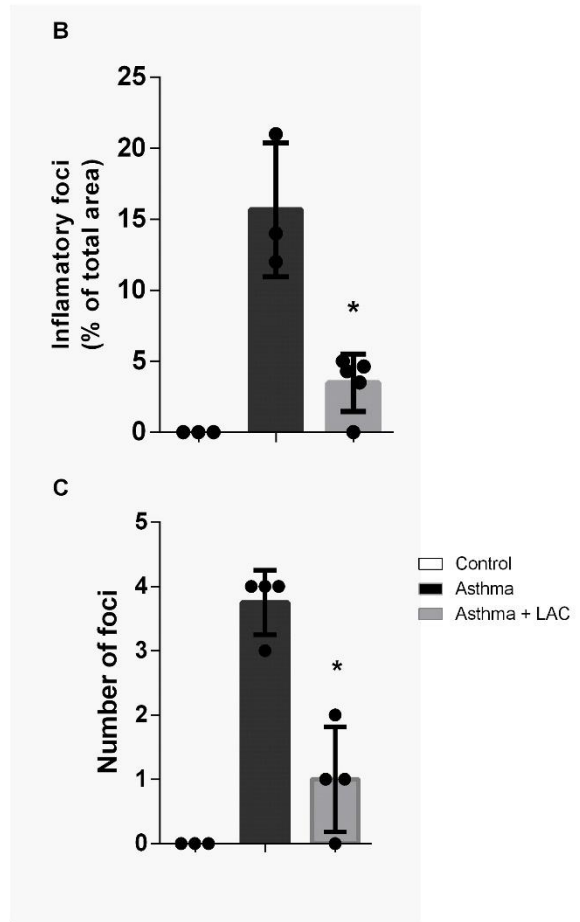
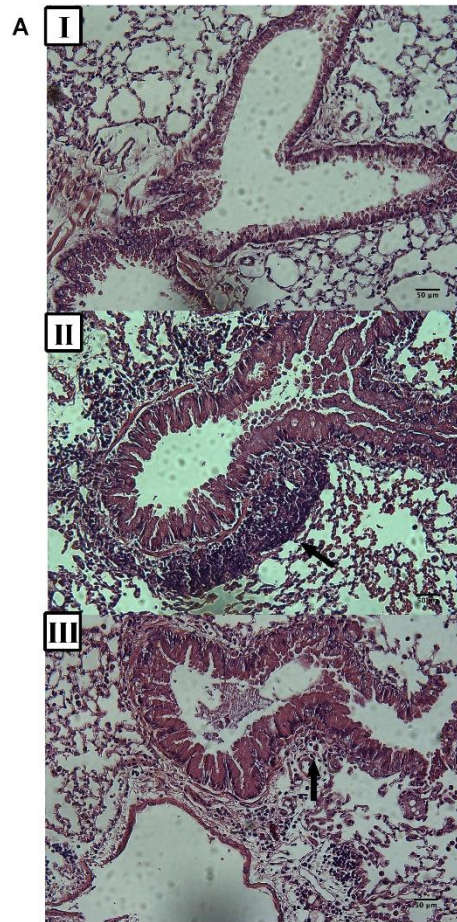


Figure 3

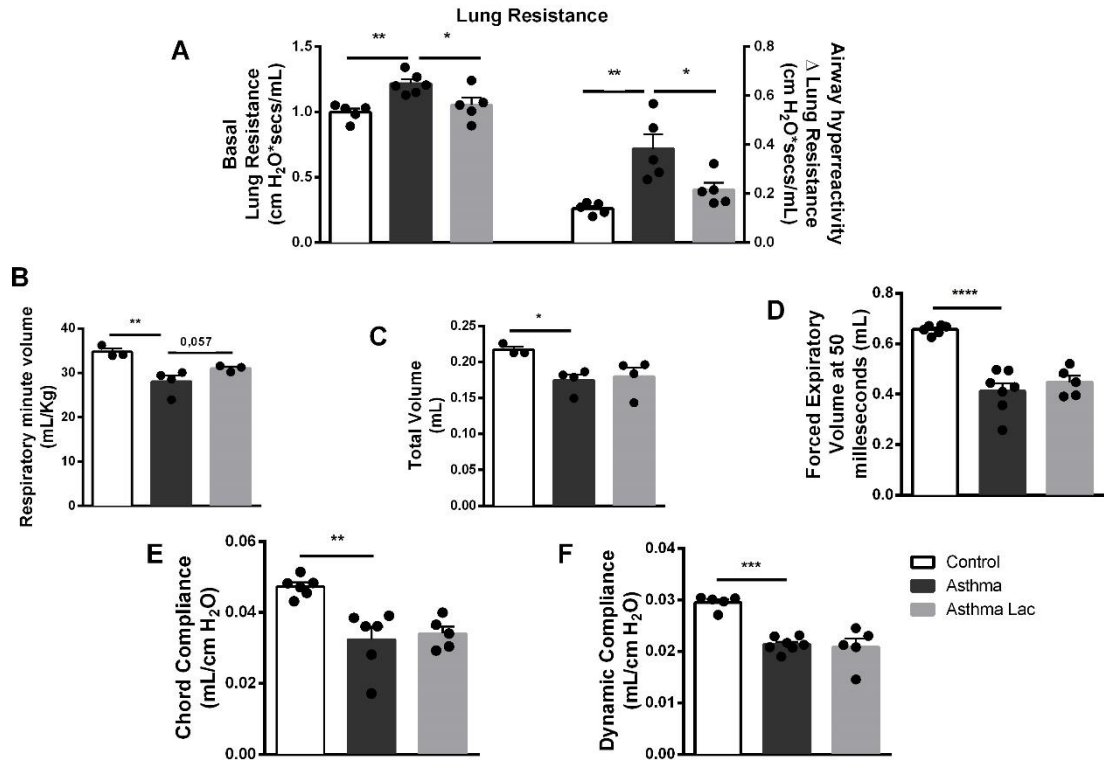


Figure 4

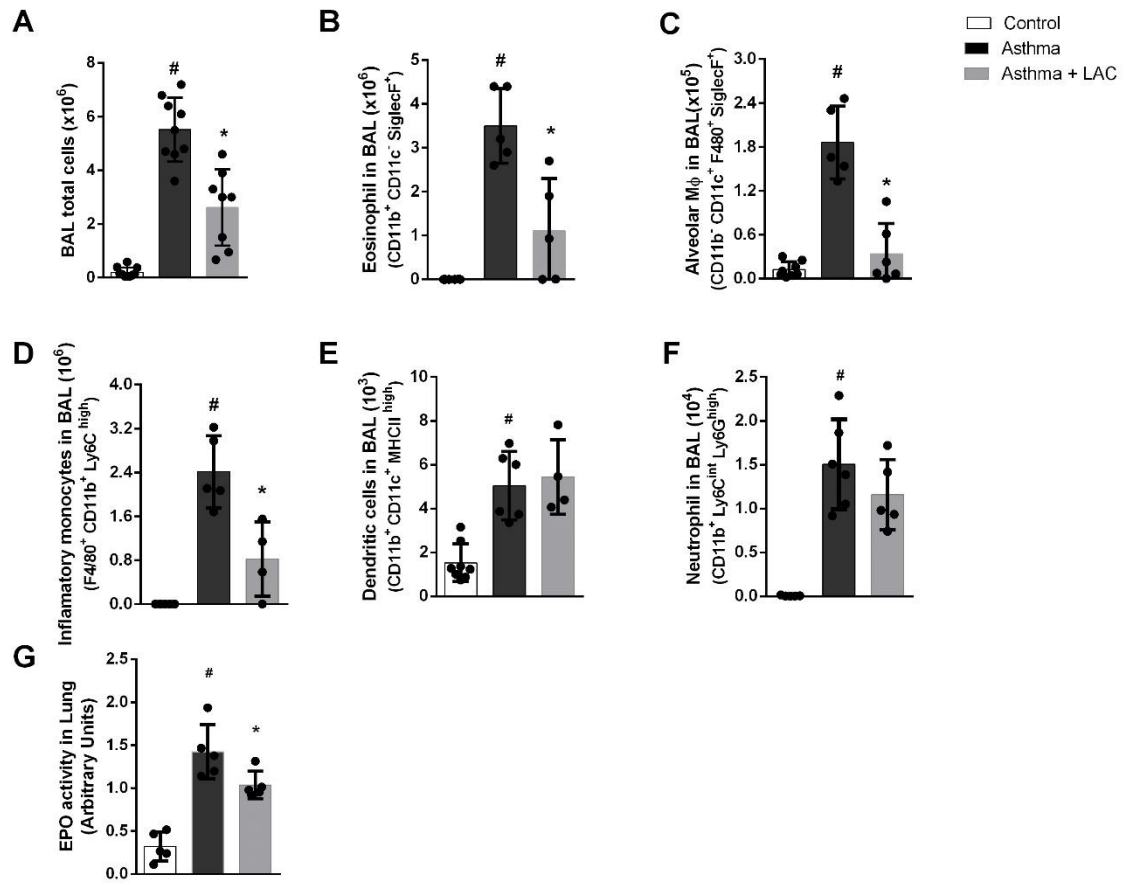


Figure 5

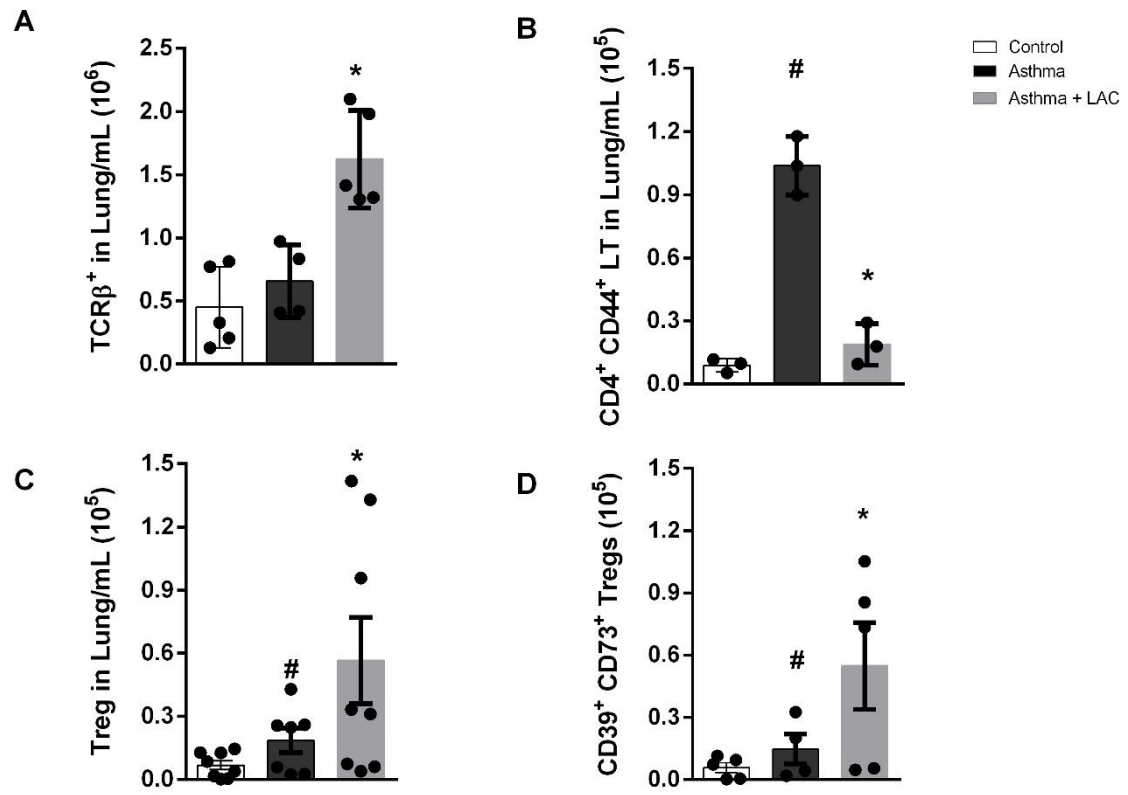
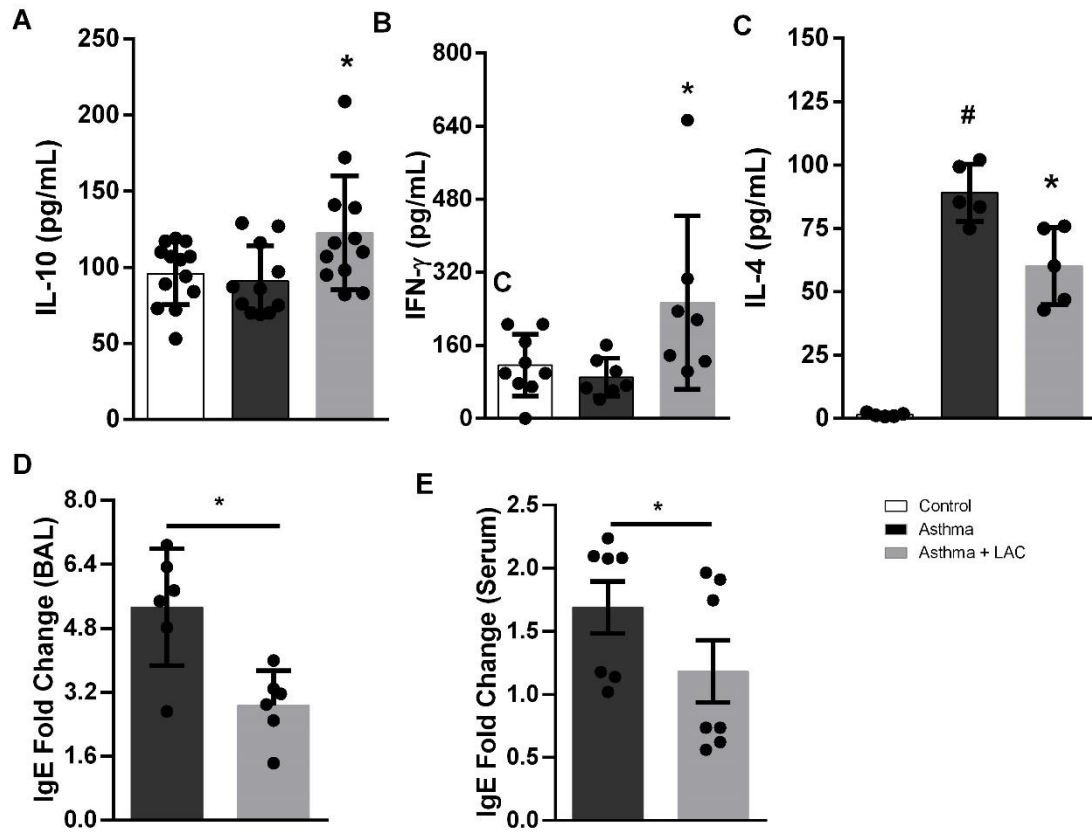


Figure 6



References:

1. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, *et al.* Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 2014, **11**(8): 506-514.
2. Plaza-Diaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Gil-Campos M, Gil A. Mechanisms of Action of Probiotics. *Advances in nutrition* 2019, **10**(suppl_1): S49-S66.
3. Borchers AT, Selmi C, Meyers FJ, Keen CL, Gershwin ME. Probiotics and immunity. *Journal of gastroenterology* 2009, **44**(1): 26-46.
4. Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SC. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nature reviews Microbiology* 2010, **8**(3): 171-184.
5. Tang ML. Probiotics and prebiotics: immunological and clinical effects in allergic disease. *Nestle Nutrition workshop series Paediatric programme* 2009, **64**: 219-235; discussion 235-218, 251-217.
6. Kang HJ, Im SH. Probiotics as an Immune Modulator. *Journal of nutritional science and vitaminology* 2015, **61 Suppl**: S103-105.
7. Forsythe P. Probiotics and lung diseases. *Chest* 2011, **139**(4): 901-908.
8. Song JA, Kim HJ, Hong SK, Lee DH, Lee SW, Song CS, *et al.* Oral intake of *Lactobacillus rhamnosus* M21 enhances the survival rate of mice lethally infected with influenza virus. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi* 2016, **49**(1): 16-23.
9. Santos NS. Isolamento e caracterização de *Lactobacillus acidophilus* de fezes de crianças alimentadas ao seio e de bezerros, visando sua utilização como adjunto dietético. MSc Dissertation thesis, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil, 1984.
10. Neumann E, Oliveira MA, Cabral CM, Moura LN, Nicoli JR, Vieira EC, *et al.* Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas* 1998, **31**(12): 1565-1573.
11. Neumann E, Ramos MG, Santos LM, Rodrigues AC, Vieira EC, Afonso LC, *et al.* *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 induces type 1 cytokine production by mouse cells in vitro and in vivo. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas* 2009, **42**(4): 358-367.
12. dos Santos LM, Santos MM, de Souza Silva HP, Arantes RM, Nicoli JR, Vieira LQ. Monoassociation with probiotic *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 stimulates the immune

- system and protects germfree mice against *Listeria monocytogenes* infection. *Medical microbiology and immunology* 2011, **200**(1): 29-38.
13. von Mutius E, Illi S, Hirsch T, Leupold W, Keil U, Weiland SK. Frequency of infections and risk of asthma, atopy and airway hyperresponsiveness in children. *The European respiratory journal* 1999, **14**(1): 4-11.
 14. McKenzie C, Tan J, Macia L, Mackay CR. The nutrition-gut microbiome-physiology axis and allergic diseases. *Immunological reviews* 2017, **278**(1): 277-295.
 15. Busse WW, Lemanske RF, Jr. Asthma. *The New England journal of medicine* 2001, **344**(5): 350-362.
 16. Lemanske RF, Jr., Busse WW. Asthma: clinical expression and molecular mechanisms. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2010, **125**(2 Suppl 2): S95-102.
 17. Murdoch JR, Lloyd CM. Chronic inflammation and asthma. *Mutation research* 2010, **690**(1-2): 24-39.
 18. Cookson W. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. *Nature* 1999, **402**(6760 Suppl): B5-11.
 19. Kusel MM, de Klerk NH, Kebabdzic T, Vohma V, Holt PG, Johnston SL, *et al.* Early-life respiratory viral infections, atopic sensitization, and risk of subsequent development of persistent asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2007, **119**(5): 1105-1110.
 20. Halonen M, Stern DA, Lohman C, Wright AL, Brown MA, Martinez FD. Two subphenotypes of childhood asthma that differ in maternal and paternal influences on asthma risk. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1999, **160**(2): 564-570.
 21. Bush RK, Peden DB. Advances in environmental and occupational disorders in 2008. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2009, **123**(3): 575-578.
 22. McLoughlin RM, Mills KH. Influence of gastrointestinal commensal bacteria on the immune responses that mediate allergy and asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2011, **127**(5): 1097-1107; quiz 1108-1099.
 23. Karlsson MR, Rugtveit J, Brandtzaeg P. Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *The Journal of experimental medicine* 2004, **199**(12): 1679-1688.
 24. Noviello Mde L, Batista NV, Dourado LP, Pereira RV, Oliveira AG, Menezes GB, *et al.* Prolonged ingestion of ovalbumin diet by Ova sensitized mice suppresses mBSA-induced arthritis. *Cellular immunology* 2013, **284**(1-2): 20-28.

25. Campa CC, Silva RL, Margaria JP, Pirali T, Mattos MS, Kraemer LR, *et al.* Inhalation of the prodrug PI3K inhibitor CL27c improves lung function in asthma and fibrosis. *Nat Commun* 2018, **9**(1): 5232.
26. Russo RC, Savino B, Mirolo M, Buracchi C, Germano G, Anselmo A, *et al.* The atypical chemokine receptor ACKR2 drives pulmonary fibrosis by tuning influx of CCR2(+) and CCR5(+) IFN γ -producing γ deltaT cells in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2018, **314**(6): L1010-L1025.
27. Insuela DB, Daleprane JB, Coelho LP, Silva AR, e Silva PM, Martins MA, *et al.* Glucagon induces airway smooth muscle relaxation by nitric oxide and prostaglandin E(2). *J Endocrinol* 2015, **225**(3): 205-217.
28. Santosa S, Farnworth E, Jones PJ. Probiotics and their potential health claims. *Nutrition reviews* 2006, **64**(6): 265-274.
29. Fiocchi A, Pawankar R, Cuello-Garcia C, Ahn K, Al-Hammadi S, Agarwal A, *et al.* World Allergy Organization-McMaster University Guidelines for Allergic Disease Prevention (GLAD-P): Probiotics. *The World Allergy Organization journal* 2015, **8**(1): 4.
30. Huang L, Guo J, Li W, Jiang M, Wang F, Kang J, *et al.* Probiotics, prebiotics, and synbiotics for the treatment of asthma: Protocol for a systematic review. *Medicine* 2019, **98**(47): e17840.
31. Hougee S, Vriesema AJ, Wijering SC, Knippels LM, Folkerts G, Nijkamp FP, *et al.* Oral treatment with probiotics reduces allergic symptoms in ovalbumin-sensitized mice: a bacterial strain comparative study. *International archives of allergy and immunology* 2010, **151**(2): 107-117.
32. Liu MY, Yang ZY, Dai WK, Huang JQ, Li YH, Zhang J, *et al.* Protective effect of *Bifidobacterium infantis* CGMCC313-2 on ovalbumin-induced airway asthma and beta-lactoglobulin-induced intestinal food allergy mouse models. *World journal of gastroenterology* 2017, **23**(12): 2149-2158.
33. Weiss G, Christensen HR, Zeuthen LH, Vogensen FK, Jakobsen M, Frokiaer H. Lactobacilli and bifidobacteria induce differential interferon-beta profiles in dendritic cells. *Cytokine* 2011, **56**(2): 520-530.
34. Macpherson AJ, Harris NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature reviews Immunology* 2004, **4**(6): 478-485.
35. Forsythe P. Probiotics and lung immune responses. *Annals of the American Thoracic Society* 2014, **11 Suppl 1**: S33-37.
36. Nials AT, Uddin S. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. *Disease models & mechanisms* 2008, **1**(4-5): 213-220.

37. Juan Z, Zhao-Ling S, Ming-Hua Z, Chun W, Hai-Xia W, Meng-Yun L, *et al.* Oral administration of *Clostridium butyricum* CGMCC0313-1 reduces ovalbumin-induced allergic airway inflammation in mice. *Respirology* 2017, **22**(5): 898-904.
38. Karimi K, Inman MD, Bienenstock J, Forsythe P. *Lactobacillus reuteri*-induced regulatory T cells protect against an allergic airway response in mice. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2009, **179**(3): 186-193.
39. Galani IE, Wendel M, Stojanovic A, Jesiak M, Muller MM, Schellack C, *et al.* Regulatory T cells control macrophage accumulation and activation in lymphoma. *International journal of cancer* 2010, **127**(5): 1131-1140.
40. Mahajan D, Wang Y, Qin X, Wang Y, Zheng G, Wang YM, *et al.* CD4+CD25+ regulatory T cells protect against injury in an innate murine model of chronic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2006, **17**(10): 2731-2741.
41. Taams LS, van Amelsfort JM, Tiemessen MM, Jacobs KM, de Jong EC, Akbar AN, *et al.* Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Human immunology* 2005, **66**(3): 222-230.
42. Liu B, Kong J, An G, Zhang K, Qin W, Meng X. Regulatory T cells protected against abdominal aortic aneurysm by suppression of the COX-2 expression. *Journal of cellular and molecular medicine* 2019, **23**(10): 6766-6774.
43. Sperlagh B, Vizi ES. The role of extracellular adenosine in chemical neurotransmission in the hippocampus and Basal Ganglia: pharmacological and clinical aspects. *Current topics in medicinal chemistry* 2011, **11**(8): 1034-1046.
44. Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Hasko G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends in molecular medicine* 2013, **19**(6): 355-367.
45. Thompson LF, Picher M, Blackburn MR. Animal models of airway diseases. *Sub-cellular biochemistry* 2011, **55**: 195-234.
46. Mandapathil M, Lang S, Gorelik E, Whiteside TL. Isolation of functional human regulatory T cells (Treg) from the peripheral blood based on the CD39 expression. *Journal of immunological methods* 2009, **346**(1-2): 55-63.
47. Ernst PB, Garrison JC, Thompson LF. Much ado about adenosine: adenosine synthesis and function in regulatory T cell biology. *Journal of immunology* 2010, **185**(4): 1993-1998.
48. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, *et al.* Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 2007, **110**(4): 1225-1232.

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