UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

CAMILA MIRA SANDY

Efeitos da administração perinatal da levedura *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 na prevenção da asma na prole de camundongos

Ribeirão Preto

2019

CAMILA MIRA SANDY

Efeitos da administração perinatal da levedura *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 na prevenção da asma na prole de camundongos

Versão original

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Clínica Médica

Orientador: Prof. Dr. Marcos de Carvalho Borges

Ribeirão Preto

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Sandy, Camila Mira

Efeitos da administração perinatal da *levedura Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 na prevenção da asma na prole de camundongos. Ribeirão Preto, 2019.

58 f.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Clínica Médica

Orientador: Marcos de Carvalho Borges

Versão original

Essa dissertação recebeu fomento
da Fundação de Amparo à Pesquisa do
Estado de São Paulo (FAPESP) processo
2017/10035-7.

FOLHA DE APROVAÇÃO

CAMILA MIRA SANDY

Efeitos da administração perinatal da levedura *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 na prevenção da asma na prole de camundongos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Clínica Médica

Aprovado em _____/_____/_____

Banca examinadora

Prof. Dr._____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura:_____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Geraldo e Izabel, pelo apoio e amor incondicionais.

AGRADECIMENTOS

À minha família; Geraldo, Izabel, Leo e Gi, que me apoiaram e incentivaram do começo ao fim. Obrigada por estarem comigo, principalmente quando a saudade apertava. Pelo amor, torcida e por sempre acreditarem em mim. Ao meu pai, por me fazer carregar sua paixão por pesquisa e ensino. À minha mãe, que me acolheu e ouviu quando eu mais precisei. Ao Leo e a Gi: obrigada pelos ''Boa, Mila!'' que ouvi tantas vezes, e pelas visitas em Ribeirão que me faziam tão feliz.

Ao meu orientador, Marcos; muito obrigada pela paciência, pela dedicação, apoio, por sempre encaixar uma reunião em seus dias atarefados, pelas conversas e conselhos. Por sempre trazer uma palavra de confiança e otimismo, quando algo não saía como o esperado. Obrigada por despertar em mim a curiosidade, o senso crítico, e ser essencial no meu amadurecimento científico ao longo de mais de 5 anos de orientação. Obrigada por ser um exemplo a ser seguido em minha carreira profissional. Obrigada pelas conversas descontraídas em meio à discussão de resultados, que sempre acabavam com alguma dica de cerveja a ser experimentada.

Às minhas amigas e colaboradoras desse projeto; Vanessa e Camila.
Van, obrigada por me guiar em cada etapa, por ser uma amiga e professora. Por vibrar comigo em cada pequena vitória, pela sua dedicação e amizade. Devo a você tudo que sei. Obrigada pelas risadas, pelos pedaços de bolo, pela sua paciência, por me ensinar a não desistir.
Cá, obrigada por todas as palavras de incentivo, pela amizade, pelas (longas) conversas enquanto o Flexivent calibrava, pela paciência e por sempre responder minhas dúvidas em horários inoportunos. Obrigada por me ensinar tanto, por encarar dias seguidos de experimentos como se fossem seus.

Ao meu namorado, Daniel, que nunca me deixou desanimar, que ouviu, opinou, estimulou. Pelo companheirismo desde o início, inclusive nos finais de semana de laboratório. Obrigada pela paciência ao ouvir sobre probióticos, camundongos e asma quase todos os dias.
À Sandra Pamio, muito obrigada pelo carinho e incentivo, pelas conversas, conselhos e cafés.

À minha família, que mesmo de longe, incentivou e torceu. Em especial à minha tia Marilda, tio Luiz, tia Maria, e minha querida vó Dita.
Ao meu primo Luiz, que achava muito chique ter uma prima pesquisadora: obrigada pela amizade, pelas conversas de todos os dias e por estar comigo desde sempre.

Aos meus amigos de Ribeirão; Mastelaro, Frajola, Xerox, Cupim, Cica, Cida, Naira, Davi, Andi, Jo, Bruna, Fogs, Ana, Ju Bezerra, Margô e Aline Gozzi – obrigada por fazerem meus dias mais leves - seja com uma cerveja gelada, uma jantinha ou uma partida de futebol com o InterPós Futebol Clube.

Aos colegas do laboratório de Fisiopatologia Pulmonar Experimental.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Médica; Emerson, Sandra, Cici, Flávia, Marina e Roni, pelo suporte e assistência durante o mestrado.

À Universidade de São Paulo, por me acolher e ser minha casa durante os últimos 7 anos. Obrigada a todos os professores e funcionários da Universidade, que de alguma maneira contribuíram para minha evolução pessoal e profissional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo por financiar o projeto.

''Scientia vinces''

RESUMO

SANDY, C.M**. Efeitos da administração perinatal da levedura *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 na prevenção da asma na prole de camundongos**. 2019. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

A prevalência de asma aumentou em crianças e em comunidades que adotam um estilo de vida ocidental e se tornam mais urbanizadas. Nossos resultados anteriores demonstraram que a administração de uma levedura, *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905, atenuou as características da asma em um modelo animal. A teoria da programação perinatal sugere que a exposição prematura a alguns estímulos exerce um efeito protetor durante toda a vida adulta. **Objetivo:** Avaliar os efeitos da administração perinatal de *S. cerevisiae* UFMG A-905 na prevenção da asma na prole de camundongos. **Material e métodos:** *S. cerevisiae* UFMG A-905 foi cultivada em meio líquido YPD e administrada em três grupos de camundongos: antes da concepção, durante a gestação e a lactação (grupo CGL); durante a gestação e lactação (grupo GL); e somente durante a lactação (grupo LAC). A prole desses animais foi sensibilizada e desafiada com ovalbumina (OVA). O grupo controle recebeu solução salina nos mesmos períodos. Após, foram realizadas medidas *in vivo* da hiper-responsividade brônquica (HPB), contagem de células totais e diferenciais no lavado broncoalveolar (LBA) e ELISA para IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e IL-17A no homogenato de pulmão ou LBA e para IgE específica para OVA. **Resultados**: O grupo OVA, comparado ao grupo SAL, apresentou aumento significativo na HPB ($p<0,0001$), número total de células ($p<0,0001$), eosinófilos ($p<0,001$), macrófagos ($p<0,01$), neutrófilos ($p<0,05$) e níveis de IL-5 ($p<0,001$) no LBA, IgE ($p<0,05$), e IL-13 ($p<0,0001$) no homogenato de pulmão. Os animais do grupo CGL, quando comparados ao grupo OVA, apresentaram redução significativa na HPB ($p<0,01$), nos níveis de IL-5 ($p<0,0001$) no LBA e IL-13 ($p<0,0001$) e IL-4 ($p<0,0001$) no homogenato pulmonar. Os níveis séricos de IgE foram significativamente maiores ($p<0,05$) no grupo CGL quando comparado ao grupo OVA. O grupo GL, quando comparado ao grupo OVA, apresentou redução significativa na HPB ($p<0,001$), nos níveis de IL-5 ($p<0,001$) no LBA e IL-4 ($p<0,01$) e IL-13 ($p<0,01$) no homogenato pulmonar. Os níveis séricos de IgE foram significativamente maiores ($p<0,01$) no grupo GL quando comparado ao grupo OVA. O grupo LAC, quando comparado ao grupo OVA, apresentou redução significativa na HPB ($p<0,001$), no número de células totais ($p<0,01$), eosinófilos ($p<0,05$), macrófagos ($p<0,05$), níveis de IL -5 ($p<0,001$) no LBA e IL-4 ($p<0,05$) e IL-13 ($p<0,0001$) no homogenato de pulmão. **Conclusão**: A administração de *S. cerevisiae* UFMG A-905 no período perinatal reduziu as principais características da asma e pode ser uma alternativa na prevenção da asma. O período de lactação parece ser chave na modulação da resposta imune da prole.

Palavras-chave: Probióticos. Asma. Perinatal.

ABSTRACT

SANDY, C.M **Effects of perinatal administration of *Saccharomyces Cerevisiae* UFMG A-905 on the prevention of asthma in the offspring of mice**. 2019. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

The prevalence of asthma has increased in children and communities that adopt a Western lifestyle and become more urbanized. Our previous results demonstrated that the administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905, attenuated asthma characteristics in an animal model. The theory of perinatal programming suggests that premature exposure to some stimuli exerts a protective effect throughout adult life. **Objective:** To evaluate the effects of perinatal administration of *S. cerevisiae* UFMG A-905 in the prevention of asthma in the offspring of mice. **Material and methods**: *S. cerevisiae* UFMG A-905 was cultured in liquid YPD medium and administered to three groups of mice: before conception, during gestation and lactation (CGL group); during gestation and lactation (CG group); and only during lactation (LAC group). The offspring of these animals were then sensitized and challenged with ovalbumin (OVA). The control group received saline in the same periods. After, *in vivo* measurements of bronchial hyperresponsiveness (AHR) were performed. Total and differential cell count in bronchoalveolar lavage (BAL) and ELISA for IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 and IL-17A in the lung homogenate or BAL and for OVA-specific IgE. **Results:** OVA group, compared to SAL group, presented a significant increase in AHR ($p<0.0001$), total number of cells ($p<0.0001$), eosinophils ($p<0.001$), macrophages ($p<0.01$), neutrophils ($p<0.05$) and levels of IL-5 ($p<0.001$) in BAL, IgE ($p<0.05$), and IL-13 ($p<0.0001$) in the lung homogenate. The animals of the CGL group, when compared to the OVA group, presented a significant reduction of AHR ($p<0.01$), levels of IL-5 ($p<0.0001$) in BAL and IL-13 ($p<0.0001$) and IL-4 ($p<0.0001$) in the lung homogenate. Serum IgE levels were significantly higher ($p<0.05$) in CGL group when compared to the OVA group. The GL group, when compared to the OVA group, presented a significant reduction in AHR ($p<0.001$), levels of IL-5 levels ($p<0.001$) in BAL and IL-4 ($p<0.01$) and IL-13 ($p<0.01$) in the lung homogenate. Serum IgE levels were significantly higher ($p<0.01$) in the GL group when compared to the OVA group. LAC group, when compared to the OVA group, presented a significant reduction in AHR ($p <0.001$), in the number of total cells ($p <0.01$), eosinophils ($p <0.05$), macrophages ($p <0.05$), levels of IL-5 ($p <0.001$) in BAL and IL-4 ($p <0.05$) and IL-13 ($p <0.0001$) in the lung homogenate. **Conclusion**: The administration of *S. cerevisiae* UFMG A-905 in the perinatal period decreased asthma-like characteristics and may be an alternative in the prevention of asthma. The lactation appears to be the more efficient period in modulating the offspring immune response.

Keywords: Probiotics. Asthma. Perinatal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Protocolo de administração da levedura, sensibilização e desafios e grupos de camundongos estudados.....31
Figura 2. Avaliação da hiper-responsividade brônquica.. 37
Figura 3. Contagem de células totais no lavado broncoalveolar (LBA). 38
Figura 4. Contagem de células diferenciais no lavado broncoalveolar (LBA) 39
Figura 5. Dosagem de anticorpo IgE específico para ovalbumina no soro. 40
Figura 6. Dosagem de IL-5 no LBA e IL-4, IL-10, IL-13 e IL-17A no homogenato pulmonar 41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resumo dos resultados encontrados em cada grupo que recebeu o probiótico, comparados ao grupo OVA.....44

LISTA DE SIGLAS

ANOVA	*Analysis of variance*
AP-1	*AP-1 transcription factor*
DATASUS	Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
DOHad	*Developmental origins of health and disease*
ELISA	*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
Ers	Elastância Total
Fc	*Fragment Crystallizable*
FcRn	*Neonatal Fc receptor*
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Foxp3	*Forkhead box P3*
G	Resistência Tecidual
G-CGL	Grupo Concepção + Gestação + Lactação
G-GL	Grupo Gestação + Lactação
G-LAC	Grupo Lactação
GM-CSF	*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
G-OVA	Grupo OVA
G-SAL	Grupo Salina
H	Elastância Tecidual
HPB	Hiper-responsividade brônquica
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IL-4	Interleucina quatro
IL-5	Interleucina cinco
IL-6	Interleucina seis
IL-9	Interleucina nove
IL-10	Interleucina dez
IL-13	Interleucina treze
IL-17A	Interleucina dezessete A
IL-25	Interleucina vinte e cinco
INF-gama	Interféron -gama
LBA	Lavado Broncoalveolar
MAPK	*Mitogen Activated Protein Kinases*
mRNA	*Messenger Ribonucleic acid*
NF-Kb	*Nuclear factor kappa B*
OVA	Ovalbumina
rpm	Rotações por minuto
Rrs	Resistência Total
SPF	*Specific Pathogen Free*
Th1	*Type 1 helper*
Th2	*Type 2 helper*
TNF-alfa	*Tumor necrosis factor alpha*

TSLP	*Thymic stromal lymphopoietin*
UFC	Unidades Formadoras de colônia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
YPD	*Yeast-Peptone-Dextrose*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 18
   1.1 Asma: Definição, Epidemiologia e Quadro Clínico 18
   1.2. Asma: Causas e Fisiopatologia 18
   1.4. Asma: Tratamentos e Potenciais Terapêuticos 20
   1.4. Teoria da Higiene 21
   1.5. Probióticos 22
   1.6. *Saccharomyces cerevisiae* A-UFMG 905 23
   1.7. Teoria de Programação Pré-Natal 24
   1.8. Aplicação de probióticos no período perinatal 25
2. HIPÓTESE 26
3. OBJETIVOS 27
   3.1. Geral 27
   3.2. Específicos 27
4. MATERIAL E MÉTODOS 28
   4.2. Camundongos 28
   4.3. Probiótico 28
   4.4. Protocolo de sensibilização, desafios e administração do probiótico 29
   4.5. Medida dos parâmetros *in vivo* da função pulmonar 32
   4.6. Lavado broncoalveolar 33
   4.7. Coleta e processamento do soro 33
   4.8. Coleta do pulmão 34
   4.9. Processamento do Pulmão 34
   4.10. Dosagem de citocinas inflamatórias no homogenato do pulmão 34
   4.11. Dosagem sérica de anticorpos IgE antiovalbumina 34
   4.12. Análise estatística 35
5. RESULTADOS 36
   5.1. Avaliação *in vivo* da hiper-responsividade brônquica 36
   5.2. Quantificação da inflamação das vias aéreas 37
   5.3. Dosagem de IgE OVA-específica 39
   5.4. Níveis de IL-5 no LBA e IL-4, IL-10, IL-13 e IL-17A no homogenato pulmonar 40
6. DISCUSSÃO 42
7. CONCLUSÃO 51
8. REFERÊNCIAS 52

1. INTRODUÇÃO

1.1 ASMA: DEFINIÇÃO, EPIDEMIOLOGIA E QUADRO CLÍNICO

A asma pode ser definida como uma doença inflamatória crônica, heterogênea, caracterizada por hiper-responsividade brônquica (HPB), limitação variável ao fluxo aéreo e remodelamento brônquico (1, 2).

Considerada uma das doenças crônicas mais comuns, acomete crianças e adultos em todos os países, independentemente do nível de desenvolvimento. A prevalência mundial varia de 1 a 38%, sendo maior nos países desenvolvidos (3, 4). Aproximadamente 300 milhões de pessoas no mundo são acometidas e estima-se que 250 mil mortes por ano são decorrentes da asma (5).

No Brasil, a prevalência oscila entre 13 e 27% (6-9), sendo que cerca de 6,4 milhões de pessoas acima de 18 anos sofrem com a doença. De acordo com dados do DATASUS, do ano de 2013, a asma foi responsável por 130.000 internações no ano e 2.047 pessoas morreram de complicações decorrentes da doença no Brasil. As internações por asma acarretaram, ao Sistema Único de Saúde (SUS), gasto de cerca de 70 milhões de reais no ano de 2013 (10).

Há evidências de que a prevalência de asma tem aumentado nos últimos 20 anos, especialmente em crianças e comunidades que adotam um estilo de vida ocidental e se tornam mais urbanizadas (5, 11-14). Nos Estados Unidos por exemplo, a prevalência de asma aumentou de 3.1% em 1980 para 7.3% em 2001 e 8.3% em 2016 (15).

As principais manifestações clínicas da asma incluem episódios recorrentes de chiado, aperto no peito, tosse e falta de ar, sendo geralmente piores à noite ou ao acordar (16). Os sintomas são desencadeados por diversos estímulos, tais como frio, exercício físico, vírus, fumaça e poluição, e podem variar de paciente para paciente e ao longo do tempo (17, 18).

1.2. ASMA: CAUSAS E FISIOPATOLOGIA

O desenvolvimento da asma sofre influência de fatores genéticos e ambientais. Dentre os fatores genéticos, a predisposição à atopia, inflamação das vias áreas e HPB

são importantes fatores de risco, além do sexo e obesidade. Entre os fatores ambientais, alguns exercem papel protetor no desenvolvimento da asma, como: alimentação e ganho de peso saudáveis durante a gestação, parto vaginal e a termo, amamentação e exposição precoce a ambientes rurais. Outros fatores como exposição a tabaco, poluição do ar, infecções de vias aéreas superiores, uso precoce de antibióticos – inclusive durante a gestação, refluxo gastroesofágico, obesidade, ambiente psicossocial negativo, alterações da microbiota, entre outros, podem estar relacionados com o desenvolvimento ou expressão da asma (14, 19, 20).

O mecanismo fisiopatológico mais importante da asma é a inflamação das vias aéreas, que está presente mesmo em asmáticos assintomáticos (21-23). A inflamação é caracterizada por um aumento de eosinófilos, mastócitos, macrófagos e linfócitos T na mucosa das vias aéreas e está relacionada com o desenvolvimento de obstrução ao fluxo aéreo, HPB e gravidade clínica (21, 22). A asma eosinofílica é o tipo mais comum da doença, e os eosinófilos são encontrados no lavadobroncoalveolar, nos tecidos, e no escarro induzido de pacientes com asma (2).

Alérgenos como fezes de ácaros, pólen, proteínas de baratas e fungos, ao entrarem em contato com as células dendríticas são apresentados às células T CD4+. Como consequência, ocorre a liberação de IL-25 e TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*), que estimulam a diferenciação das células T em células T com perfil Th2 (*T helper cell type 2*). Após a diferenciação, ocorre a produção de diversas quimiocinas e citocinas, tais como IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e GM-CSF (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*). (18).

Nesse primeiro contato com o alérgeno, IL-4 e IL-13 são responsáveis pelo estímulo na produção IgE pelas células B, que sensibilizam os mastócitos. Numa segunda exposição ao mesmo alérgeno, os mastócitos sensibilizados degranulam-se e liberam substâncias tóxicas, como histamina e leucotrienos, que em conjunto com outras citocinas, levam ou agravam o quadro inflamatório nas vias aéreas, com recrutação de eosinófilos, produção de muco e produção e liberação de IgE, culminando em HPB e estreitamento das vias aéreas (2).

Além da inflamação das vias aéreas, a HPB é outra característica central da asma. A HPB é definida como um estreitamento anormal das vias aéreas em resposta a um agonista constritor, em comparação a uma pessoa não asmática. Ela consiste em um

aumento da resposta das vias aéreas a estímulos físicos e químicos, podendo ser didaticamente dividida em hipersensibilidade, quando é necessário uma menor dose de agonistas constritores para iniciar uma reposta broncoconstritora, e hiper-reatividade, quando ocorre uma inclinação mais acentuada da curva dose-resposta ou uma maior resposta a uma determinada dose do agonista (24). Assim, durante a HPB ocorre um estreitamento excessivo das vias aéreas, levando ao aumento da resistência ao fluxo de ar e, consequentemente, diminuição na passagem do ar (25).

Os mecanismos envolvidos na HPB ainda não foram totalmente elucidados, algumas possíveis explicações incluem: aumento do número de células inflamatórias, principalmente eosinófilos nas vias aéreas; liberação de mediadores inflamatórios, tais como IL-4, IL-5 e IL-13; dano epitelial; redução do calibre das vias aéreas; espessamento da parede brônquica; aumento da permeabilidade da mucosa; alterações estruturais; inflamação neurogênica; e aumento da contractilidade e da massa muscular (25-27) . Em modelos animais de asma, o fechamento das vias aéreas também pode contribuir significativamente com o desenvolvimento da hiper-responsividade (28-30).

Outra alteração encontrada em pacientes asmáticos é denominada remodelamento das vias aéreas. O remodelamento é caracterizado por um espessamento da lâmina basal subepitelial, aumento no número de miofibroblastos, hiperplasia e hipertrofia de músculo liso, aumento de glândulas mucosas, aumento da área vascular e alteração da deposição e composição das proteínas e proteoglicanas da matriz extracelular (31, 32). Essas alterações estruturais contribuem para o desenvolvimento e progressão da doença. Ainda não está bem estabelecido a relação entre inflamação e remodelamento, porém sabe-se que o remodelamento ocorre em alguns casos, mesmo na ausência de inflamação (19).

1.4. Asma: Tratamentos e Potenciais Terapêuticos

Resumidamente, os medicamentos mais utilizados no tratamento da asma são os corticosteroides inalatórios, como terapia de controle, e os broncodilatadores. Os corticosteroides inalatórios reduzem a inflamação, melhoram os sintomas e previnem exacerbações, sendo o principal tratamento de controle para os indivíduos asmáticos. Os broncodilatadores de ação curta, também chamados de β2 agonistas de ação curta,

são usados para o alívio imediato de sintomas agudos e constituem a primeira opção broncodilatadora nas exacerbações. Os β2 agonistas de ação prolongada são utilizados em combinação com corticosteroides inalatórios (14).

Apesar do tratamento habitual para a asma apresentar uma boa eficácia, ele não controla os sintomas e exacerbações em todos os pacientes e pode causar efeitos colaterais (5, 33). Os principais efeitos colaterais são: *déficit* de crescimento em crianças, densidade mineral óssea diminuída, catarata e manifestações cutâneas (34).

Além disso, outras opções terapêuticas, como os antagonistas de leucotrienos, antagonistas muscarínicos de ação prolongada, termoplastia brônquica e os imunobiológicos (como anti-IgE, anti-IL-4, anti-IL-5, anti-IL-13 e anti-IL-17) não se mostraram totalmente efetivas em estudos clínicos (5, 33).

Desse modo, devido aos efeitos colaterais e limitado alcance em alguns pacientes que os tratamentos atuais contra a asma apresentam, a busca por potenciais terapêuticos se faz necessária.

Sabe-se que a microbiota intestinal é modificada quando ocorre algum tipo de alteração no pulmão, como por exemplo na asma, doença pulmonar obstrutiva crônica ou infecções respiratórias. Isto demonstra a existência de uma conexão entre a mucosa intestinal e os pulmões (35). O mecanismo pelo qual essa conexão acontece ainda não foi totalmente elucidado, mas sabe-se que alterações favoráveis na microbiota intestinal, como aumento na população de bactérias benéficas e aumento de subprodutos do metabolismo bacteriano – como ácidos graxos de cadeia curta, influenciam de maneira positiva o trato respiratório (36). Além disso, a depleção do gênero *Bifidobacteria* e aumento do *Clostridia* no intestino está associado com asma nos primeiros anos de vida (37). Assim, a modulação da microbiota intestinal é um dos possíveis alvos para o manejo da asma.

1.4. Teoria da Higiene

A teoria da higiene, proposta em 1989 por David Strachan, sugere que a exposição à infecções e contatos não-higiênicos na infância influenciam o desenvolvimento do sistema imune e podem proteger contra o desenvolvimento de asma e outras doenças alérgicas (13, 14, 38, 39). Estudos epidemiológicos evidenciaram que crianças de países em desenvolvimento, com irmãos mais velhos, que frequentam

precocemente creches e que são expostas a animais apresentam menor incidência de doenças alérgicas, sugerindo uma relação inversa entre infecções na infância e doenças alérgicas (13, 14, 40-43).

Ademais, sabe-se que alterações no estilo de vida e a industrialização levaram os indivíduos a terem menos contato com zonas rurais e animais, o que influencia de maneira negativa o desenvolvimento de doenças alérgicas como asma e dermatite atópica (44).

Culturas tradicionalmente rurais como os *Amish* possuem menor prevalência de asma, e a inalação de partículas de poeira obtidas nas residências desses indivíduos foi capaz de diminuir a HPB e o influxo de eosinófilos em modelo animal de asma (45).

Além disso, a proteção ao desenvolvimento da asma é maior quando o contato com ambientes como fazendas ou creches ocorre no útero ou durante a infância e está relacionada à diversidade microbiológica (19, 46, 47). Adicionalmente, sugere-se que a não exposição a micro-organismos durante a infância modifica de maneira significativa a microbiota comensal, criando um ambiente favorável ao desenvolvimento de doenças alérgicas (48). Por outro lado, a contaminação de crianças e adultos para prevenção de doenças alérgicas é algo não cogitado nos dias atuais (49).

Desta forma, o uso dos probióticos, considerados seguros na maioria das situações, cria a possibilidade da aplicação prática da teoria da higiene no tratamento de doenças autoimunes e alérgicas.

1.5. PROBIÓTICOS

Probióticos são “micro-organismos vivos que, quando administrados em adequadas quantidades, conferem um benefício à saúde do hospedeiro” (50).

Os efeitos benéficos dos probióticos não foram encontrados ou não foram similares em todos os estudos em animais e não foram completamente reprodutíveis em estudos clínicos. A diferença nos resultados pode ser decorrente de diferenças no desenho dos estudos; dose, método, tempo e período de administração; desfecho clínico utilizado; assim como fatores do hospedeiro. Um melhor entendimento dos efeitos dos diferentes probióticos e um conhecimento mais profundo dos mecanismos envolvidos nas doenças alérgicas são necessários para validação do uso das espécies com potencial antialérgico (51-53). Desta forma, há insuficientes, mas promissoras,

evidências do uso de probióticos na prevenção e tratamento de doenças alérgicas e asma (54).

Bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* têm sido os probióticos mais utilizados na prática clínica, e oferecem evidências positivas em modelos de asma animal, sendo capazes de reduzir a HPB, inflamação das vias aéreas e muco (55-58).

Outros micro-organismos, como leveduras não-patogênicas do gênero *Saccharomyces*, têm despertado interesse como opção terapêutica em diversas doenças (59-62).

1.6. *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* A-UFMG 905

A levedura *S. cerevisiae* UFMG A- 905, isolada durante o processo de produção da cachaça brasileira, quando administrada a camundongos atingiu níveis populacionais potencialmente funcionais no trato gastrointestinal, reduziu a translocação bacteriana e foi capaz de proteger contra infecções por *Salmonella Typhimurium* e *Clostridium difficile (62).*

Além disso, a levedura mostrou maior resistência ao estresse mecânico em situações compatíveis com as encontradas no trato gastrointestinal, e foi capaz de diminuir os níveis de inflamação no fígado e no cólon. Quanto ao seu potencial de modulação do sistema imune, a levedura foi capaz de aumentar os níveis de IL-10 e IgA secretória em camundongos saudáveis e diminuir os níveis de IL-6, TNF-α e IFN-gama, através da modulação de vias de sinalização, tais como as vias do NF-κB, AP-1, e MAPK (60, 62-65).

Nossos resultados prévios demonstraram que a administração de *S. cerevisiae* UFMG A-905 antes da sensibilização com ovalbumina (OVA) atenuou as características de asma em um modelo animal, demonstrado pela redução da HPB, redução do número total de células e de eosinófilos no LBA e pela diminuição de citocinas inflamatórias no LBA, e restauração dos níveis de IL-10 e IFN-gama no pulmão de camundongos asmáticos (59). Além disso, a administração diária e em dias alternados da levedura reduziu significativamente a HPB (66). Adicionalmente, a levedura quando inativada, e administrada como um paraprobiótico a camundongos, foi capaz de atenuar a inflamação das vias aéreas, através da redução do número de eosinófilos e os níveis de IL-5 e IL-13 no LBA, redução de muco e aumento os níveis de IL-17A no pulmão (67).

1.7. Teoria de Programação Pré-Natal

A teoria de programação pré-natal ou origens desenvolvimentistas da saúde e doença (DOHaD) propõe que eventos adversos ocorridos em fases precoces do desenvolvimento exercem influências sobre o padrão de saúde e doença ao longo da vida (68, 69). Nesse sentido, intervenções precoces, antes mesmo do nascimento, na microbiota intestinal podem exercer efeito protetor para doenças na vida adulta. Eventos que modulam a microbiota intestinal de maneira precoce, até o primeiro ano de vida, têm o potencial de programar fenótipos imunológicos persistentes ao longo da vida (70). Além disso, recém nascidos cujas microbiotas possuem menos espécies taxonômicas apresentam maiores chances de apresentarem algum tipo de atopia ao longo da vida (71).

Nesse sentido, considerando a teoria de programação pré-natal, existe uma janela de oportunidades para prevenção de doenças com intervenções no período que compreende as últimas semanas de gestação até os primeiros anos de vida. Precocemente, durante a gestação, a transferência de imunoglobulinas da mãe para o filho ocorre através da placenta. A imunoglobulina G é a única capaz de atravessar a placenta e essa travessia é mediada por receptores FcRn (*neonatal Fc receptor*) localizados no sinciciotrofoblasto (célula responsável pela interface materno-fetal). Sabe-se que a passagem de IgG é um importante mecanismo de proteção para o recém-nascido, e contribui para a maturação do sistema imunológico. Este mecanismo resulta em níveis séricos neonatal de IgG equivalentes aos níveis maternos e com o mesmo padrão de reconhecimento de antígeno (72, 73).

Durante a lactação ocorre a transferência de IgG e IgA pelo leite materno. Vale ressaltar que há diferenças entre a absorção de IgG do leite materno em roedores e humanos; no primeiro ocorre transporte através do epitélio intestinal diretamente para a circulação do neonato, através de um receptor de IgG parecido com o encontrado na placenta. Já em humanos, os anticorpos oriundos do leite materno não conseguem atravessar a mucosa intestinal (74). IgA é o subtipo de anticorpo mais abundante no leite materno. Pressupõe-se que a IgA proteja o feto pela exclusão de patógenos oportunistas, por mecanismos de melhora da barreira intestinal, ou promoção do

crescimento de bactérias benéficas que dificultem a colonização de espécies patógenas (75).

1.8. APLICAÇÃO DE PROBIÓTICOS NO PERÍODO PERINATAL

Alguns trabalhos avaliaram os efeitos da administração de algumas cepas probióticas durante a gestação e lactação na proteção contra asma em prole de camundongos, e obtiveram resultados diferentes, porém promissores. Schabussova e colaboradores utilizaram o probiótico *Lactobacillus paracasei* NCC 2461 em um modelo de asma induzido por pólen, e encontraram redução de eosinófilos no pulmão, diminuição dos níveis de IL-5, e redução na inflamação pulmonar e secreção de muco. Além disso, encontraram menores níveis de anticorpos específicos para o antígeno e maior expressão de mRNA para Foxp3 no pulmão da prole, porém não houve alteração nos níveis de IgE ou IgG e não foi avaliada a HPB (70).

Um outro trabalho utilizou *Lactobacillus rhamnosus* GG em modelo de asma experimental induzida por OVA. O probiótico, quando administrado aos camundongos, foi capaz de reduzir os níveis de TNF-alfa, IFN-gama, IL-5 e IL-10, assim como a inflamação das vias aéreas e peribrônquica. Porém, esse probiótico também não alterou a HPB (76).

Conrad e colaboradores avaliaram a administração intranasal de *Acinetobacter lwoffii* F78 no período perinatal em um modelo de asma murino. A bactéria protegeu contra o desenvolvimento de asma, demonstrado pela diminuição do influxo de eosinófilos, linfócitos e HPB (77).

Além disso, estudos clínicos recentes demonstraram que a administração de probiótico perinatal é segura e pode reduzir a prevalência de alergia a longo prazo (78, 79).

Como os efeitos dos probióticos são também dependentes da espécie e da cepa, ainda se faz necessário avaliar outros micro-organismos e o melhor momento de sua administração no manejo de doenças alérgicas. Até o momento, nenhum estudo avaliou os efeitos da administração perinatal de leveduras na prevenção de asma em prole de animais.

2. HIPÓTESE

Considerando que a *S. cerevisiae* UFMG A-905 foi capaz de prevenir o desenvolvimento de asma, nós elaboramos a hipótese que se administrada em fêmeas gestantes ou lactentes, ela pode também prevenir o desenvolvimento da asma na prole desses animais.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Avaliar os efeitos da administração perinatal da levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905 na prevenção da asma induzida por OVA na prole de camundongos.

3.2. ESPECÍFICOS

Administrar a *S. cerevisiae* UFMG A-905 a camundongos em diferentes momentos do período perinatal (1: antes da concepção, durante a gestação e a lactação; 2: durante a gestação e lactação; 3: somente durante a lactação), e, na prole desses camundongos, avaliar os seguintes parâmetros:

- Alterações na hiper-responsividade brônquica;
- Alterações celulares (contagem celular total e diferencial) no lavado broncoalveolar;
- Produção de citocinas de perfil Th1 e Th2 (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e IL-17A) no tecido pulmonar;
- Produção de IgE específico para OVA da prole de camundongos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.2. CAMUNDONGOS

Camundongos Balb/c machos e fêmeas livres de patógenos específicos (SPF), de 6-8 semanas foram obtidos no Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Após a climatização dos animais às condições do biotério, em cada gaiola, um macho foi colocado junto a duas fêmeas. Após uma semana, os animais foram separados e cada fêmea prenha foi colocada em uma nova gaiola. Os machos foram submetidos à eutanásia por câmara de CO_2. A prole macho e fêmea foi então utilizada no estudo e os animais foram mantidos em isoladores autoclavados com ração e água estéreis sob livre demanda. O projeto foi submetido e aprovado ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP de número 087/2017.

4.3. PROBIÓTICO

A levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905 foi utilizada no estudo. A cepa pertence ao banco de leveduras do Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa do Instituto de Ciências Biológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG) e foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Flaviano Martins do ICB-UFMG.

Placas de *petri* estéreis com meio YPD foram preparadas: extrato de levedura (concentração de 1%) , peptona (concentração de 2%) e glicose (concentração de 2%). Não havendo contaminação nas placas, 50 µl da levedura em estoque a -80ºC foram adicionados e mantidos a 37ºC por 48h. Após o crescimento, algumas colônias foram transferidas para 50 ml de meio YPD líquido e mantidas a 37ºC por 24h, sob agitação constante de 150 rpm (pré-inóculo). O pré-inóculo foi então transferido para 450 ml de meio YPD e mantido a 37ºC por 24h, sob agitação constante de 150 rpm (inóculo). A contagem das leveduras presentes no inóculo foi realizada em câmara de Neubauer com azul de tripan e o inóculo foi armazenado a 4ºC no mesmo meio YPD utilizado para seu crescimento.

Para determinar o número de unidades formadoras de colônias (UFC) presentes no inóculo, de 30 a 300 leveduras foram plaqueadas em meio YPD, em duplicata, e

mantidas a 37ºC por 48h. Após a determinação do número de UFC, o inóculo foi concentrado para se obter uma solução de 10^9 UFC/ml. Para isso, o inóculo foi centrifugado a 5.000 rpm por 5 minutos, ressuspendido no próprio meio YPD e armazenado em alíquotas a 4ºC por até 30 dias.

4.4. PROTOCOLO DE SENSIBILIZAÇÃO, DESAFIOS E ADMINISTRAÇÃO DO PROBIÓTICO

O protocolo de administração do probiótico, sensibilização e desafios encontra-se na Figura 1. Nas duas semanas anteriores à primeira intervenção, os animais passaram por processo de ambientação às condições do biotério e ao manipulador. Esta ação visou prevenir quaisquer situações novas de estresse para os animais durante a gestação e lactação.

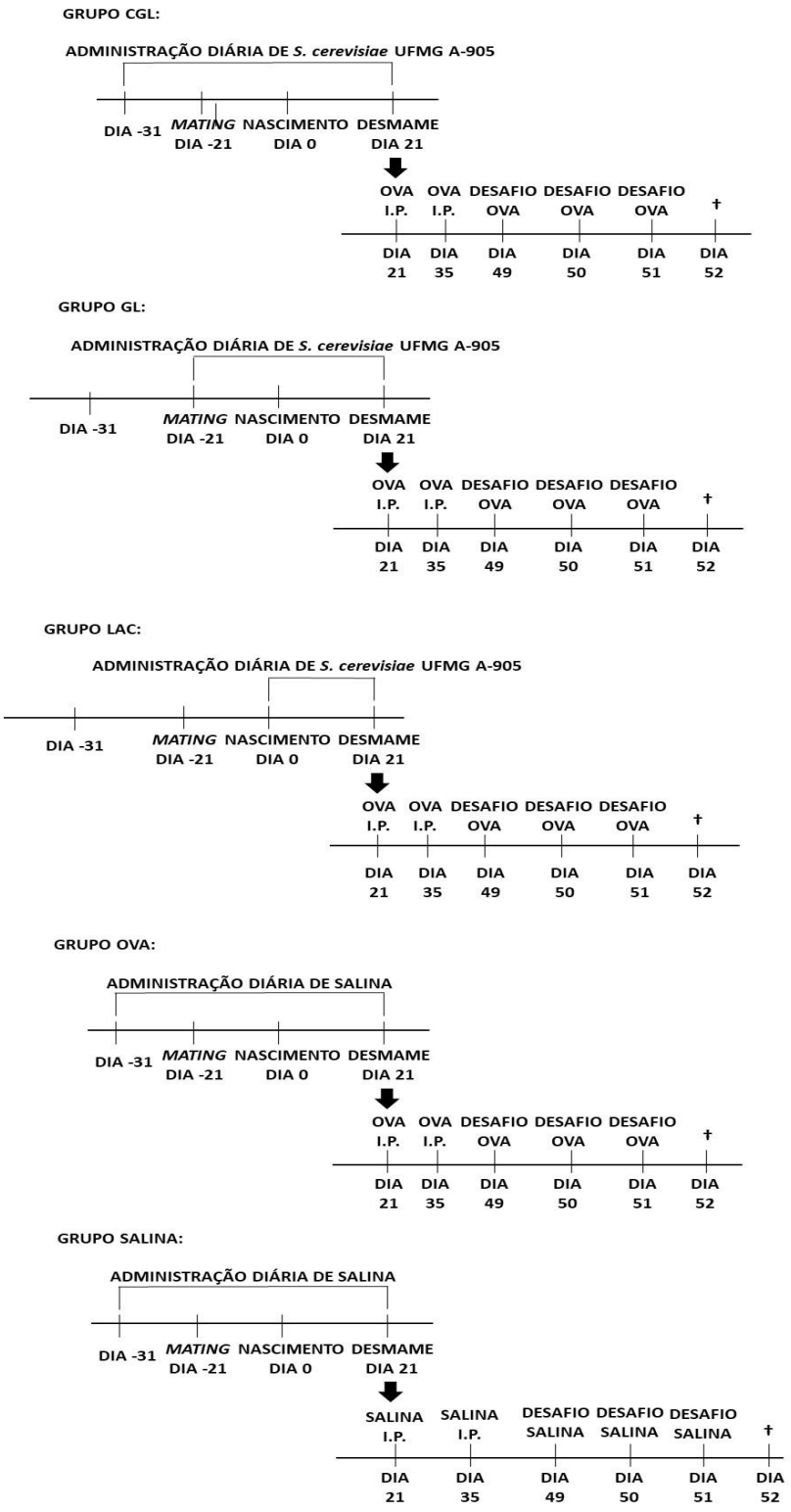
Três grupos de fêmeas receberam o probiótico: um grupo o recebeu 10 dias antes da concepção, durante a gestação e lactação – totalizando 52 dias consecutivos de gavagem (Grupo CGL); um grupo o recebeu durante a gestação e lactação – totalizando 42 dias consecutivos de gavagem (Grupo GL) e outro grupo, recebeu o probiótico somente durante a lactação, durante 21 dias (Grupo LAC). O inóculo foi administrado utilizando uma agulha de gavagem, sendo que em cada dia os camundongos receberam 100 µl de uma solução contendo 10^9 UFC/ml de *S. cerevisiae* UFMG A-905.

Aproximadamente sete dias após a junção dos machos às fêmeas, todas as fêmeas ficaram prenhas. No dia do desmame, 21 dias após o nascimento, a prole recebeu a primeira sensibilização intraperitoneal com OVA grau V (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) e alúmen (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) e, 14 dias após, foi feita a segunda sensibilização intraperitoneal. Duas semanas após a segunda sensibilização, a prole foi desafiada com 10 µg de OVA diluídos em 50 µL de solução salina isotônica estéril intranasal por três dias consecutivos, sob leve anestesia. Os experimentos ocorreram 24h após o último desafio. O grupo controle recebeu apenas salina nos mesmos dias. Assim, cinco grupos de 8 a 10 camundongos por grupo foram estudados, conforme descritos abaixo e na Figura 1.

- G-CGL: os camundongos fêmeas receberam 100 µl da levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905 por gavagem 10 dias antes da concepção, durante a gestação e lactação. A prole foi desafiada e sensibilizada com OVA;

- G-GL: os camundongos fêmeas receberam 100 µl da levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905 por gavagem durante a gestação e lactação. A prole foi desafiada e sensibilizada com OVA;
- G-LAC: os camundongos fêmeas receberam 100 µl da levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905 por gavagem durante A lactação. A prole foi desafiada e sensibilizada com OVA;
- G-OVA: os camundongos fêmeas receberam 100 µl de salina por gavagem antes da concepção, durante a gestação e lactação. A prole foi desafiada e sensibilizada com OVA;
- G-SAL: os camundongos fêmeas receberam 100 µl de salina por gavagem antes da concepção, durante a gestação e lactação. A prole foi desafiada e sensibilizada com salina.

FIGURA 1: PROTOCOLO DE ADMINISTRAÇÃO DA LEVEDURA, SENSIBILIZAÇÃO E DESAFIOS E GRUPOS DE CAMUNDONGOS ESTUDADOS



Fonte: próprio autor

4.5. MEDIDA DOS PARÂMETROS *IN VIVO* DA FUNÇÃO PULMONAR

Vinte e quatro horas após o último desafio, os animais foram anestesiados ip com xilazina (10 mg/kg) e quetamina (100 mg/Kg), uma cânula traqueal foi inserida e eles foram ventilados com um pequeno ventilador para animais FlexiVent® (Scireq, Montreal, QC, Canadá) com uma frequência respiratória de 150 respirações/minuto e PEEP de 3 cmH2O. Os animais foram paralisados com brometo de pancurônio ip (1.2 mg/kg) e, somente após completamente anestesiados e paralisados, as medidas respiratórias foram realizadas.

Este ventilador permite a realização de medidas *in vivo* de diversos parâmetros da mecânica respiratória pela técnica de oscilação forçada, com o modelo de compartimento simples e o modelo de fase constante. Estes dois modelos permitem a determinação da resistência e elastância do sistema respiratório e também a separação das alterações nos diferentes compartimentos pulmonares, como vias aéreas e parênquima (80, 81). Para isso, antes da coleta dos dados de mecânica respiratória, os pulmões são insuflados até uma pressão de 27 cmH2O para homogeneização pulmonar. No modelo de compartimento simples, apenas uma onda sinusoidal em uma frequência única é aplicada, sendo então utilizada a seguinte equação:

$$P(t) = R\dot{V}(t) + EV(t) + P0$$

Equação 1

Onde P(t)é a pressão na entrada do modelo, $\dot{V}(t)$é o fluxo de gás, V(t)é o volume de gás no compartimento elástico, P0é a pressão aplicada de repouso (pressão positiva expiratória final), e t é o tempo.

No modelo de impedância complexo, o pistão, controlado por um computador, aplica 13 componentes senoides com frequências primas que vão de 1 a 20,5 Hz, durante um período de três segundos (quick prime-3 perturbation). Regressão linear múltipla é então utilizada para ajustar os dados no modelo de fase constante do pulmão, descrito por Hantos et al, usando a seguinte equação:

$$Zin(f) = R + i2pfI + (Gt-iHt)/(2pf)\alpha$$

Equação 2

Onde Zin é a impedância do sistema respiratório, R é a resistência das vias aéreas (resistência newtoniana), i representa a unidade imaginária, I é a inertância essencialmente igual à do gás nas vias aéreas centrais, Gt reflete a dissipação de energia viscosa no tecido e está intimamente relacionada com a resistência das vias aéreas periféricas, Ht reflete a energia acumulada no tecido e está intimamente relacionada com a elastância tecidual, α = (2/p)tan-1(Ht/Gt), e f a frequência respiratória.

Foram feitas medidas na condição basal e após a provocação com a administração de concentrações crescentes de aerossóis com metacolina (6,25; 12,5; 25 e 50mg/ml) por 10 segundos através de um nebulizador ultrassônico (Hudson RCI, Teleflex Medical, Temecula, CA, EUA). Os parâmetros respiratórios foram selecionados das curvas que apresentaram um coeficiente de determinação maior ou igual a 0,9 (COD ≥ 0,9). Foram avaliados e comparados os seguintes parâmetros: resistência total (RRS), elastância total (ERS), resistência tecidual (G) e elastância tecidual (H)(82).

4.6. LAVADO BRONCOALVEOLAR

Foi coletado lavado broncoalveolar (LBA) a fim de quantificar a inflamação. Após a ventilação, o LBA foi coletado duas vezes pela infusão e aspiração de 1 ml de solução salina pela cânula traqueal.

As duas amostras do LBA foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante da primeira amostra foi coletado e armazenado a -80ºC para dosagem de citocinas. Os precipitados da primeira e segunda amostras foram ressuspendidos em 500 µl de salina estéril e foi realizada a contagem de células totais, coradas com o azul de trypan. A fim de quantificar as células diferenciais no LBA, 100 µl da amostra foi centrifugada a 400 rpm por 3 minutos em centrífuga tipo cytospin (Cytospin IV, Thermo Scientific, Runcorn, Cheshire, EUA), e as lâminas foram coradas por coloração de Panótipo Rápido (Labroclin, Pinhais, PR, Brasil). Foram contadas 300 células inflamatórias de cada amostra.

4.7. COLETA E PROCESSAMENTO DO SORO

Após a coleta do LBA, foi coletado sangue do ventrículo direito, que foi centrifugado a 3300 rpm por 22 minutos a 4ºC, e o soro separado e armazenado a -80°C.

4.8. Coleta do pulmão

Após a coleta do sangue, a caixa torácica foi aberta e foram infundidos 5 ml de solução salina no coração para retirada do sangue dos pulmões. O pulmão direito foi extraído e armazenado em RNAlater (Qiagen, Austin, TX, EUA) para preparação do homogenato pulmonar e dosagem de citocinas. O lóbulo esquerdo foi insuflado com formol 10% e armazenado para processamento posterior.

4.9. Processamento do Pulmão

O homogenato foi preparado a partir do pulmão armazenado em RNAlater (Qiagen, Austin, TX, EUA). Para isso, 50 mg de pulmão foram pesados numa balança de precisão e foram adicionados em 1 ml de uma solução estéril contendo inibidor de proteases (Complete EDTA-free, Roche, Mannheim, Germany). O órgão foi processado utilizando um homogeneizador de tecido (Omni International, Kennesaw, GA, EUA). Após, foi centrifugado a 3500 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C.

4.10. Dosagem de citocinas inflamatórias no homogenato do pulmão

As citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e IL-17A foram dosadas no homogenato do pulmão por ELISA (*Enzime Linked Immunosorbent Assay*), de acordo com as instruções dos fabricantes – BD Biosciences (Biosciences, San Diego, CA, USA) e eBioscience (eBiosciences, San Diego, CA, USA).

4.11. Dosagem sérica de anticorpos IgE antiovalbumina

Foi feita a quantificação de IgE específicas para ovalbumina (IgE anti-OVA) por protocolo de ELISA modificado (Biosciences, San Diego, CA, USA). Resumidamente, foi utilizada uma placa de 96 poços de poliestireno (*Corning Incorporated – Corning, NY*), em que foi adicionado a cada poço, 50 µl de OVA diluida em solução tampão (10 µl/ml),

e incubado *overnight*, a 4ºC. Após, foram seguidas as instruções do fabricante para detecção dos anticorpos específicos para OVA (83).

4.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através do programa *GraphPad Prism* versão 7.04 (*Graphpad Software, San Diego, CA, EUA*). Para comparação entre grupos foram utilizadas as análises de variância *One Way ANOVA* e *Two Way ANOVA*. Após, foi utilizado o pós-teste de Bonferroni. Foi considerado significativo um valor de $p<0,05$. As variáveis contínuas foram expressas como média e desvio padrão.

5. RESULTADOS

5.1. AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA HIPER-RESPONSIVIDADE BRÔNQUICA

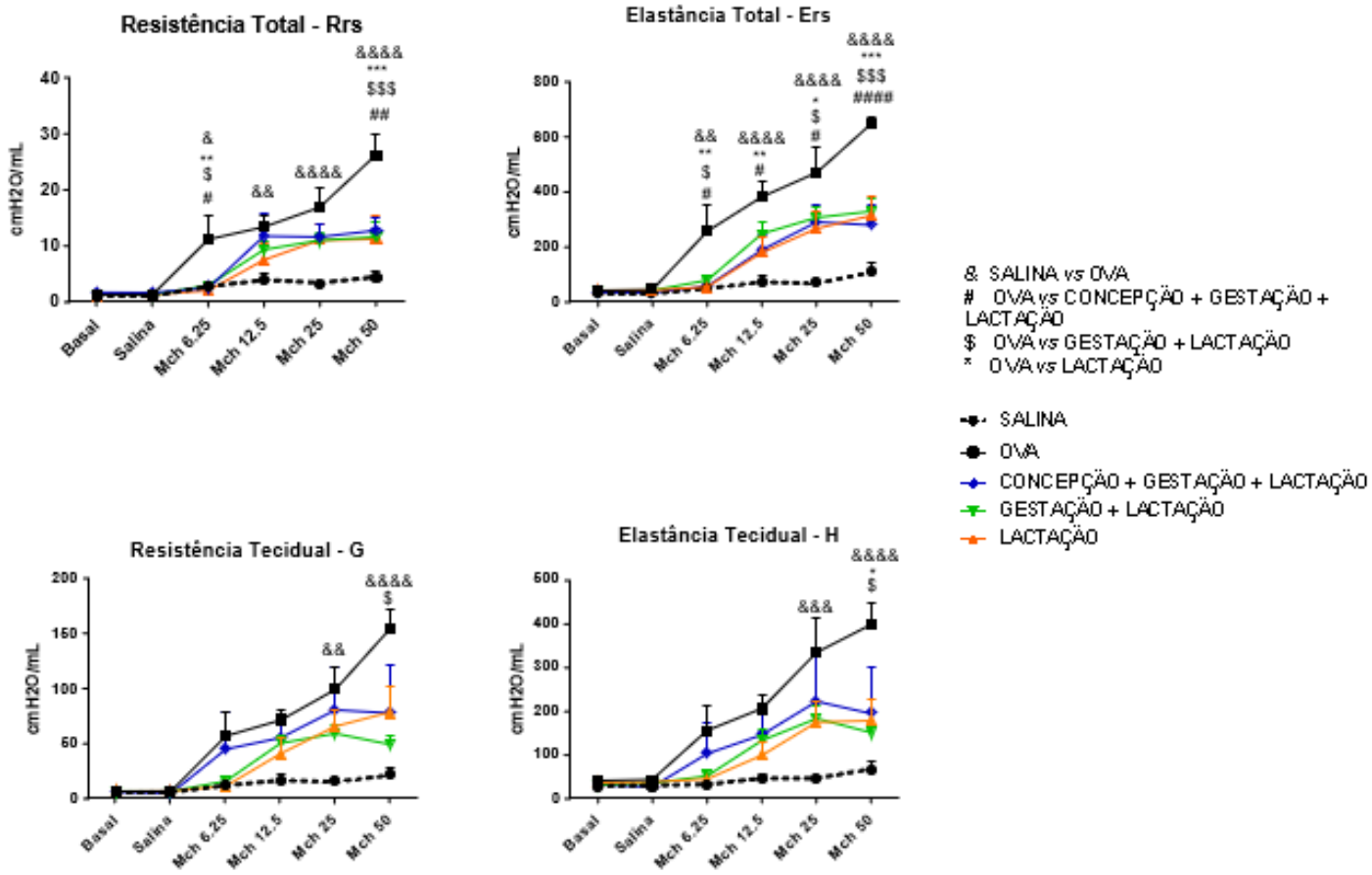
Houve um aumento significativo na HPB do grupo OVA quando comparado ao grupo SAL, demonstrado por aumento da G ($p<0,01$) na dose de 25 mg/ml de metacolina e aumento da RRS ($p<0,0001$), ERS ($p<0,0001$), G ($p<0,0001$) H ($p<0,0001$) na dose de 50 mg/ml de metacolina (Figura 2).

A administração do probiótico antes da concepção, durante a gestação e lactação (Grupo CGL) reduziu significativamente a HPB na prole, quando comparado ao grupo OVA, demonstrado pela diminuição da RRS nas doses de 6.25 mg/ml ($p<0,05$) e 50mg/ml ($p<0,01$) de metacolina e diminuição da ERS nas doses de 6.25 mg/ml, 12.5 mg/ml, 25 mg/ml ($p<0,05$) e 50 mg/ml ($p<0,0001$) de metacolina (Figura 2).

A prole das fêmeas que receberam o probiótico durante a gestação e lactação (Grupo GL) apresentou redução significativa na HPB, quando comparado ao grupo OVA, demonstrado pela diminuição da RRS nas doses de 6.25 mg/ml ($p<0,05$) e 50mg/ml ($p<0,001$) de metacolina; diminuição da ERS nas doses de 6.25 mg/ml ($p<0,05$) e 25 mg/ml ($p<0,05$) e 50 mg/ml ($p<0,001$) de metacolina; diminuição ($p<0,05$) da G na dose de 50 mg/ml de metacolina e diminuição ($p<0,05$) da H na dose de 50 mg/ml de metacolina (Figura 2).

A administração do probiótico durante a lactação (Grupo LAC) reduziu também significativamente a HPB na prole, quando comparado ao grupo OVA, demonstrado pela diminuição da RRS nas doses de 6.25 mg/ml ($p<0,01$) e 50mg/ml ($p<0,001$) de metacolina; diminuição da ERS nas doses de 6.25 mg/ml e 12.5 mg/ml ($p<0,01$), 25 mg/ml ($p<0,05$) e 50 mg/ml ($p<0,001$) de metacolina e diminuição ($p<0,05$) da H na dose de 50 mg/ml de metacolina (Figura 2).

Figura 2. Avaliação da hiper-responsividade brônquica. Um grupo de camundongos recebeu *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 antes da concepção, durante a gestação e lactação; outro grupo recebeu durante a gestação e lactação; e outro, somente durante a lactação. A prole desses animais foi sensibilizada duas vezes com OVA intraperitoneal, com 14 dias de intervalo, e desafiada com OVA intranasal, uma vez ao dia, por três dias consecutivos. Vinte e quatro horas após o último desafio, foram avaliados os parâmetros resistência total (RRS), elastância total (ERS), resistência tecidual (G) e elastância (H). Os resultados são expressos como média e erro padrão (n= 8 a 10 camundongos). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; **** p<0,0001.

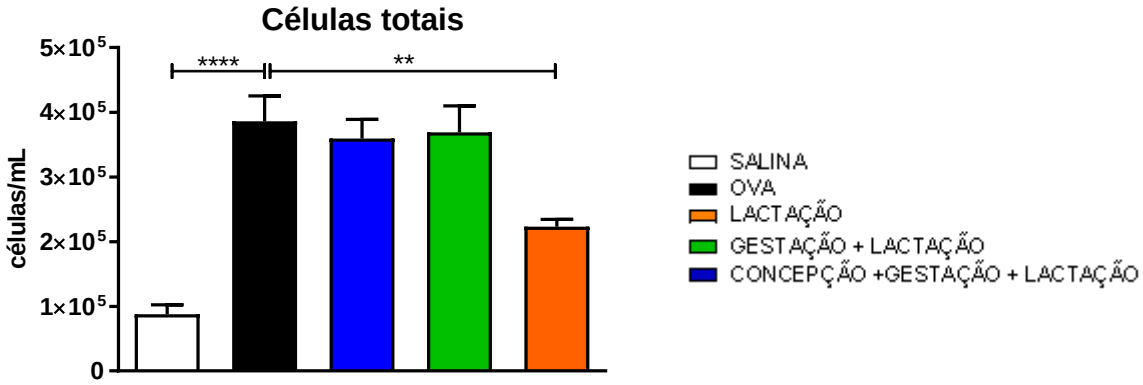


5.2. QUANTIFICAÇÃO DA INFLAMAÇÃO DAS VIAS AÉREAS

Houve um aumento significativo no número total de células no LBA do grupo OVA quando comparado ao grupo SAL (p< 0,001). Não houve diferença estatística no número de células totais no LBA dos grupos CGL e GL em comparação ao grupo OVA. A administração do probiótico durante a lactação (Grupo LAC) reduziu significativamente

(p<0,01) o número total de células no LBA na prole em comparação ao grupo OVA (Figura 3).

Figura 3. Contagem de células totais no lavado broncoalveolar (LBA). Um grupo de camundongos recebeu *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 antes da concepção, durante a gestação e lactação; outro grupo recebeu durante a gestação e lactação; e outro, somente durante a lactação. A prole desses animais foi sensibilizada duas vezes com OVA intraperitoneal, com 14 dias de intervalo, e desafiada com OVA intranasal, uma vez ao dia, por três dias consecutivos. Vinte e quatro horas após o último desafio, foi coletado o LBA para contagem das células totais. Os resultados são expressos como média e erro padrão; (n= 8 a 10 camundongos). *p<0,05; ***p<0,001

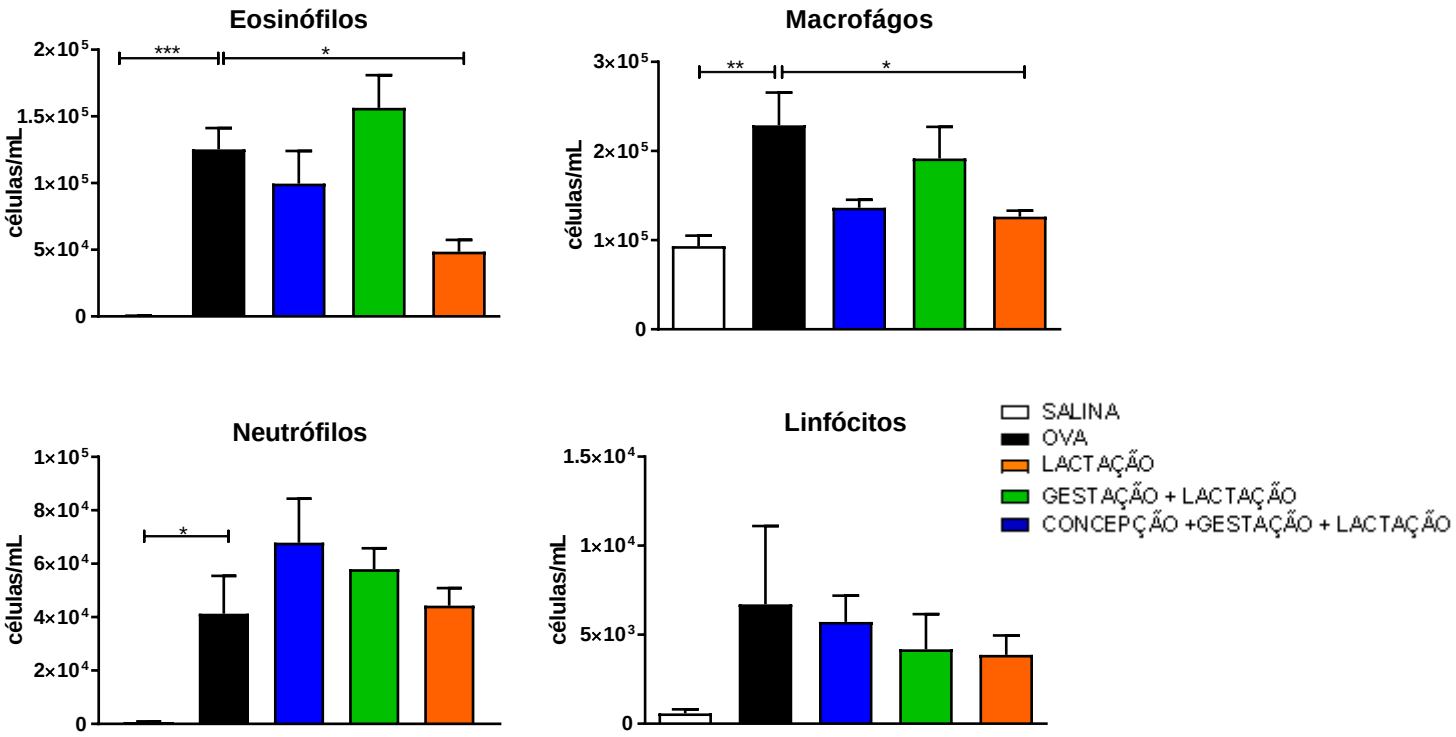


Houve um aumento significativo no número de eosinófilos (p<0,001) e macrófagos (p<0,01) no LBA do grupo OVA quando comparado ao grupo SAL. Não houve diferença estatística entre o número de linfócitos e neutrófilos no grupo OVA quando comparado ao grupo SAL (Figura 4).

A administração do probiótico nos grupos CGL e GL não reduziu de maneira significativa o número de eosinófilos, macrófagos, linfócitos e neutrófilos na prole quando comparado ao grupo OVA (Figura 4).

A administração de *S. cerevisiae* UFMG A-905 durante a lactação (Grupo LAC) reduziu significativamente (p<0,05) o número de eosinófilos e macrófagos no LBA na prole quando comparado ao grupo OVA. Não houve diferença estatística entre o número de linfócitos e neutrófilos no grupo LAC quando comparado ao grupo OVA (Figura 4).

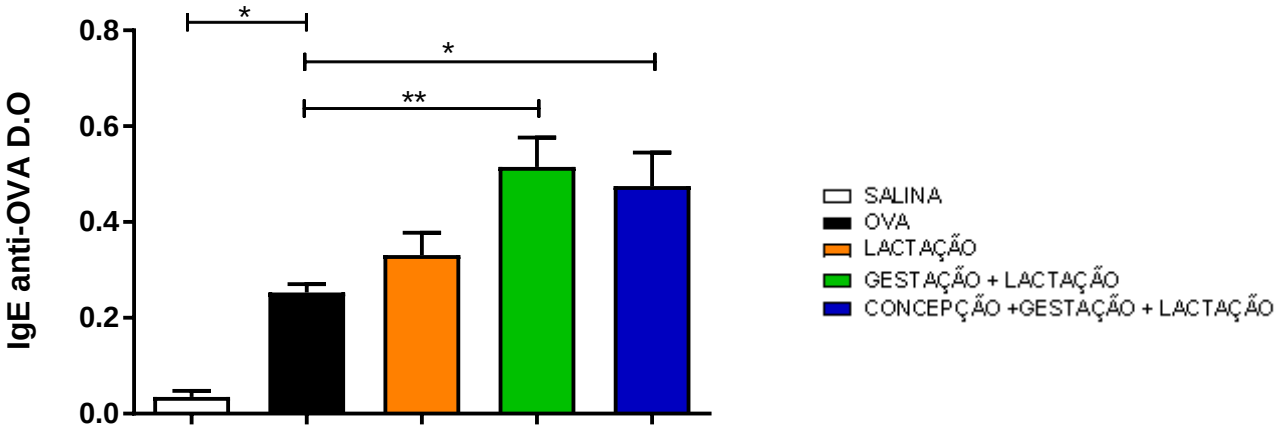
Figura 4. Contagem de células diferenciais no lavado broncoalveolar (LBA). Um grupo de camundongos recebeu Saccharomyces cerevisiae UFMG A-905 antes da concepção, durante a gestação e lactação; outro grupo recebeu durante a gestação e lactação; e outro, somente durante a lactação. A prole desses animais foi sensibilizada duas vezes com OVA intraperitoneal, com 14 dias de intervalo, e desafiada com OVA intranasal, uma vez ao dia, por três dias consecutivos. Vinte e quatro horas após o último desafio, foi coletado o LBA para contagem das células diferenciais e 300 células por animais foram contadas. Os resultados são expressos como média e erro padrão (n= 8 a 10 camundongos). *p<0,05; ***p<0,001



5.3. Dosagem de IgE OVA-específica

Houve um aumento significativo (p<0,05) de IgE OVA-específica no soro do grupo OVA quando comparado ao grupo SAL. A administração do probiótico aumentou significativamente os níveis de IgE OVA-específica no grupo CGL (p<0,01) e no grupo GL (p<0,05), em comparação ao grupo OVA. Não houve diferença nos os níveis de IgE OVA-específica entre os grupos LAC e OVA (Figura 5).

Figura 5. Dosagem de anticorpo IgE específico para ovalbumina no soro. Um grupo de camundongos recebeu Saccharomyces cerevisiae UFMG A-905 antes da concepção, durante a gestação e lactação; outro grupo recebeu durante a gestação e lactação; e outro, somente durante a lactação. A prole desses animais foi sensibilizada duas vezes com OVA intraperitoneal, com 14 dias de intervalo, e desafiada com OVA intranasal, uma vez ao dia, por três dias consecutivos. Vinte e quatro horas após o último desafio, foi coletado o soro para dosagem de IgE. Os resultados são expressos como média e erro padrão; (n= 5 a 7 camundongos). *p<0,05; ***p<0,001



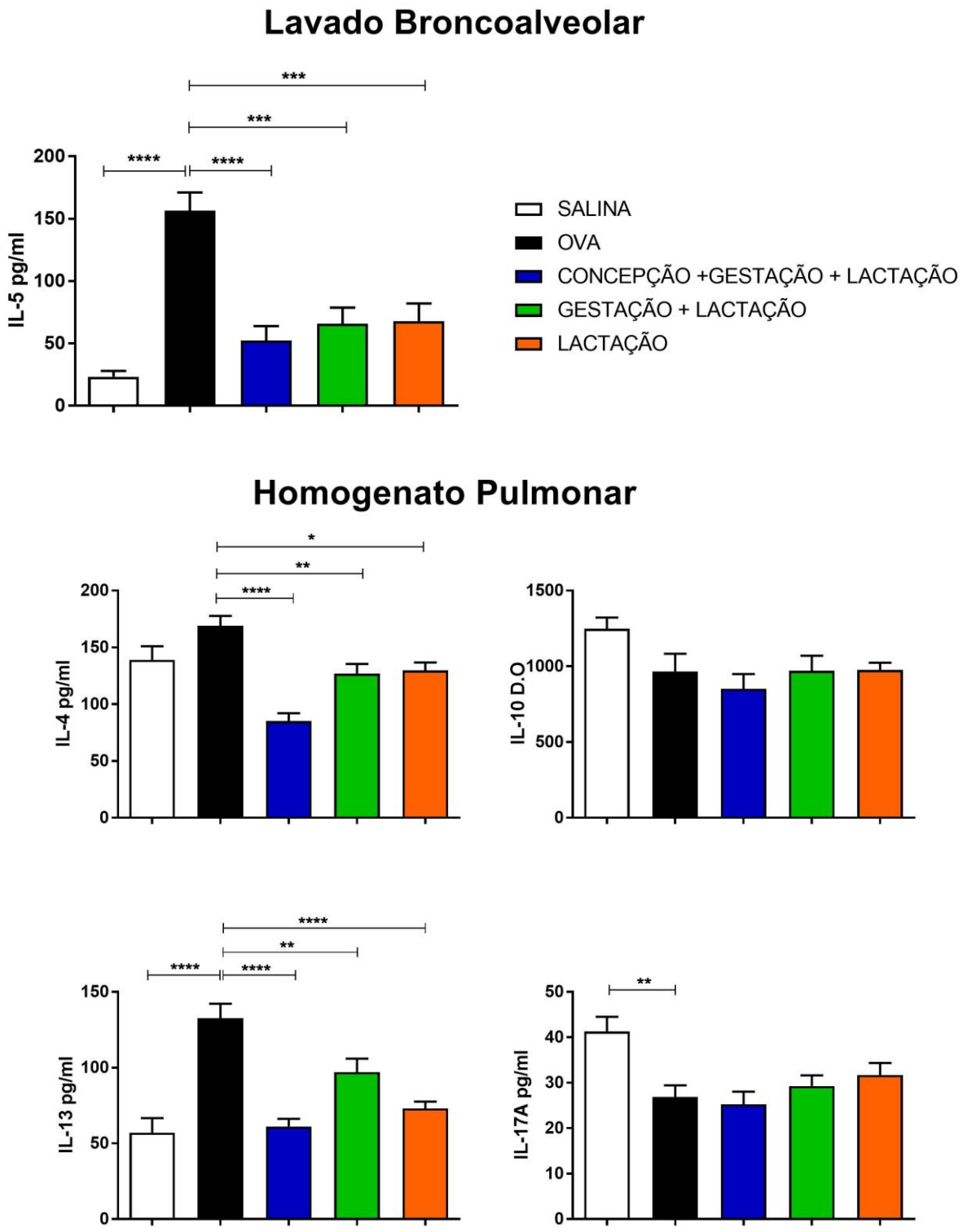
5.4. NÍVEIS DE IL-5 NO LBA E IL-4, IL-10, IL-13 E IL-17A NO HOMOGENATO PULMONAR

Os valores das citocinas dosadas encontram-se na Figura 6. Os níveis de IL-5 no LBA do grupo OVA foram significativamente maiores (p<0,0001) quando comparados ao grupo SAL. Além disso, em comparação com o grupo OVA, os níveis de IL-5 foram significativamente menores nos grupos CGL (p<0,0001), GL (p<0,001) e LAC (p<0,001).

Não houve aumento significativo nos níveis de IL-4 no homogenato pulmonar do grupo OVA quando comparado ao grupo SAL. Houve uma redução significativa nos níveis de IL-4 no homogenato pulmonar dos grupos CGL (p<0,0001), GL (p<0,001) e LAC (p<0,05), em relação ao grupo OVA.

Houve uma redução significativa entre os níveis de IL-17A no homogenato pulmonar no grupo OVA quando comparado ao grupo SAL. Não houve diferença nos níveis de IL-17A nos grupos CGL, GL, e LAC, quando comparados ao grupo OVA. Não houve diferença estatística nos níveis de IL-10 entre os grupos estudados.

Figura 6. Dosagem de IL-5 no LBA e IL-4, IL-10, IL-13 e IL-17A no homogenato pulmonar. Um grupo de camundongos recebeu *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 antes da concepção, durante a gestação e lactação; outro grupo recebeu durante a gestação e lactação; e outro, somente durante a lactação. A prole desses animais foi sensibilizada duas vezes com OVA intraperitoneal, com 14 dias de intervalo, e desafiada com OVA intranasal, uma vez ao dia, por três dias consecutivos. Vinte e quatro horas após o último desafio, foi coletado o lavado broncoalveolar (LBA) ou pulmão para dosagem de citocinas. Os resultados são expressos como média e erro padrão (n= 8 a 10 camundongos) *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; **** p<0,0001



6. DISCUSSÃO

Nesse trabalho, nós avaliamos os efeitos da administração da levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905 na prevenção da asma na prole de camundongos. Para tal, a levedura foi administrada a três grupos de camundongos com diferentes protocolos: antes da concepção, durante a gestação e a lactação (Grupo CGL); durante a gestação e a lactação (Grupo GL) e durante a lactação (Grupo LAC).

A levedura, quando administrada em camundongos fêmeas antes da concepção, durante a gestação e lactação (Grupo CGL) e durante a gestação e a lactação (Grupo GL) foi capaz de reduzir a HPB e os níveis de IL-4, IL-5 e IL-13 no pulmão. Já quando foi administrada somente durante a lactação, além de reduzir a HPB e os níveis de IL-4, IL-5 e IL-13 no pulmão, diminuiu também o infiltrado de células inflamatórias no LBA, demonstrado pela redução no número de células totais, eosinófilos e macrófagos. Esses resultados estão resumidos da Tabela 1.

Tabela 1: Resumo dos resultados encontrados em cada grupo que recebeu o probiótico, comparados ao grupo OVA. CGL: grupo que recebeu o probiótico antes da concepção, durante a gestação e lactação; GL: grupo que recebeu o probiótico durante a gestação e lactação e LAC: grupo que recebeu o probiótico durante a lactação.

Parâmetro	Grupo		
	CGL	GL	LAC
Hiper-responsividade	↓	↓	↓
Células totais	–	–	↓
Eosinófilos	–	–	↓
Macrófagos	–	–	↓
Neutrófilos	–	–	–
Linfócitos	–	–	–
IgE	↑	↑	–
IL-4	↓	↓	↓
IL-5	↓	↓	↓
IL-10	–	–	–
IL-13	↓	↓	↓
IL-17A	–	–	–

A asma é uma doença inflamatória crônica, cuja prevalência tem aumentado nos últimos anos. Segundo dados do Centro de Controle de Doenças (CDC) Norte-Americano, no ano de 2015 ocorreram 1.7 milhão de internações emergenciais por asma, e um custo de US$1.500 por paciente (15). O aumento da prevalência da asma ocorre ao passo que as comunidades se tornam cada vez mais urbanizadas e desenvolvidas (84).

Devido ao aumento na prevalência da asma, novos abordagens terapêuticas são necessárias. Nesse sentido, os probióticos, por apresentarem efeitos benéficos na maturação e proliferação de células do sistema imune, são uma estratégia promissora para reduzir a incidência de doenças alérgicas. Estudos com probióticos em humanos para a prevenção de doenças alérgicas ainda apresentam resultados divergentes, porém promissores. Em estudos clínicos, doenças como dermatite atópica, eczema e rinite

alérgica foram prevenidas, ou tiveram seus sintomas diminuídos, após a administração de diferentes cepas de probióticos – como o *L. rhamnosus GG, B. lactis e B. animalis* (85).

Em relação à aplicação de probióticos para a prevenção da asma em estudos clínicos, a sua utilização não apresentou resultados significativos até momento. Porém, diversos estudos experimentais têm demonstrado um bom potencial para a prevenção da asma (55, 57, 59, 86, 87).

Nesse sentido, levando em consideração os resultados positivos encontrados em estudos com probióticos como a *S. cerevisiae* UFMG A-905 (59, 66, 67), utilizada nesse estudo, a prevenção da asma poderia ser avaliada em diversas momentos, como em crianças, durante os primeiros anos de vida, e durante a gestação e a lactação. O período pré-natal e os primeiros anos de vida destacam-se como oportunidades de intervenção no manejo e prevenção de doenças alérgicas, tendo em vista a alta plasticidade da microbiota intestinal além da perduração dos efeitos da aplicação de probióticos até a vida adulta (88).

Em nosso estudo, nós avaliamos a administração da levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905 na prevenção da asma na prole de camundongos. A fim de investigar os efeitos do probiótico em diferentes momentos do período perinatal, camundongos fêmeas receberam o probiótico em três momentos diferentes: antes da concepção, durante a gestação e lactação (Grupo CGL), durante a gestação e a lactação (Grupo GL) e somente durante a lactação (Grupo LAC). Os grupos OVA e Salina receberam apenas salina durante esses mesmos períodos.

Em relação ao modelo de asma utilizado, os animais do grupo OVA apresentaram aumento significativo na HPB, no número de células totais, eosinófilos, macrófagos, neutrófilos, nos níveis de IL-5 no LBA e de IL-4, IL-13 e IL-17A no pulmão, e IgE no soro, quando comparados ao grupo Salina, o que demonstra que o modelo de asma experimental estava adequado.

A HPB, característica central da asma, pode ser definida como uma junção de hiper-reatividade, definida como um aumento na ‘’intensidade da broncoconstrição em resposta ao estímulo, medida pela inclinação da curva dose-resposta’’ e da hipersensibilidade, definida como ‘’diminuição na quantidade do estímulo necessário

para provocar o nível de broncoconstrição desejado, medida pelo desvio da curva dose-resposta para a direita'' (89).

Em humanos, é utilizado o teste de broncoprovocação a fim de se determinar a presença da HPB. Em modelos animais, a HPB é avaliada por métodos diferentes. Nesse estudo, utilizamos o broncoconstritor metacolina, e o *Flexivent®*, um ventilador para pequenos animais que utiliza a técnica de oscilação forçada e permite a realização de medidas diretas *in vivo* da mecânica respiratória.

Poucos estudos avaliaram a HPB na prole de camundongos que receberam probióticos durante o período perinatal. Em nosso trabalho, a administração do probiótico em todos os protocolos (grupo CGL, Grupo GL e Grupo LAC) reduziu a HPB, demonstrada em diversos parâmetros e doses de metacolina. A redução da HPB pode ser explicada pela redução das citocinas pró-inflamatórias IL-4, IL-5 e IL-13, encontrada no pulmão dos camundongos dos grupos CGL, GL e LAC, e de células totais no grupo LAC.

Blumer e colaboradores utilizaram *L. rhamnosus* GG, via gavagem, antes da concepção, durante a gestação e lactação, a fim de prevenir asma na prole de camundongos. Nesse estudo, a HPB foi avaliada pelo método de pletismografia e não houve diferenças significativas entre o grupo que recebeu o probiótico e o grupo que não recebeu (90). A pletismografia, método utilizado por Blumer, não é considerado ideal, por realizar as medidas de maneira indireta e não fornecer dados fidedignos relativos à resistência das vias aéreas (82).

Em outro estudo, *A. lwoffii* F78 foi administrada intranasal no período perinatal, 11, 9, 6, 4, 2 dias antes do acasalamento e em dias alternados durante a gestação, em um modelo experimental de asma induzida por OVA e a HPB foi avaliada por pleistimografia. Assim como em nosso estudo, a HPB foi significativamente menor no grupo que recebeu o probiótico, quando comparado ao grupo que não recebeu o probiótico. Os autores do estudo sugerem que a *A. lwoffii* F78 exerça a transferência de proteção da mãe para o feto através do aumento da expressão de receptores *toll-like* no pulmão materno em conjunto com a indução de uma resposta inflamatória local com perfil Th1 predominante (77). Vale ressaltar que o modo de administração do estudo citado e do presente estudo diferem. No entanto, o reconhecimento de bactérias e de fungos

acontece via receptor *toll-like*, o que pode desencadear efeitos similares, como por exemplo a ativação de células B, e desencadeamento da resposta imune adaptativa (91, 92).

Em relação à quantificação de células no LBA, ao contrário da redução encontrada na HPB dos grupos CGL e GL, o número de células totais, eosinófilos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos no LBA dos animais desses grupos não sofreu redução significativa com a administração da levedura. Porém, quando a *S. cerevisiae* UFMG A-905 foi administrada somente durante a lactação (Grupo LAC) foi capaz de reduzir o número total de células, eosinófilos, macrófagos no LBA da prole, quando comparado ao grupo que não recebeu o probiótico. Uma das possíveis explicações pode ser que a administração prolongada de probiótico possa ter induzido a tolerância. Em nosso conhecimento, nenhum estudo avaliou especificaste se exposição a crônica a probióticos pode causar tolerância ou taquifilaxia a longo prazo (93).

Semelhante aos nossos achados, no estudo citado acima, em que a *A. lwoffii* F78 foi administrada intranasal, os autores avaliaram os efeitos após a exposição aguda e crônica ao probiótico e também identificaram uma resposta mais eficiente no grupo que recebeu o probiótico por menos tempo. Nesse estudo, as vias aéreas maternas demonstraram adaptação parcial à exposição crônica ao probiótico, visto que neutrófilos e linfócitos não foram detectados no LBA após 5 semanas de tratamento (77).

Diferentemente de nossos achados, no estudo citado anteriormente, em que *L. rhamnosus* GG foi administrado antes da concepção, durante a gestação e lactação e somente antes da concepção e durante a gestação, houve redução no infiltrado de células totais, de eosinófilos e macrófagos no LBA da prole desses animais (90). Diversos estudos já demonstraram que o efeito dos probiótico depende de diversos fatores, como a espécie e dose utilizadas (53, 54, 94-96).

Schabussova e colaboradores administraram *L. paracasei* NCC 2461 a camundongos fêmeas durante a última semana de gestação e até o dia do desmame, e encontraram redução no número de eosinófilos no LBA na prole do grupo que recebeu o probiótico, quando comparado a prole dos camundongos que receberam salina (70).

Nossos resultados prévios com a *S. cerevisiae* UFMG A-905 demonstraram que a levedura viva e na forma de paraprobiótico, inativada pelo calor, quando administrada a camundongos machos foi capaz de reduzir o número total de células e de eosinófilos no LBA em um modelo de asma experimental induzido por OVA (59, 67). Assim, uma possível explicação é que a ação dessa levedura na redução de células inflamatórias no LBA seja dependente de sua administração direta, viva ou inativa.

Os eosinófilos são importantes células efetoras do sistema imune, e são essenciais na resposta contra parasitas. No entanto, podem ser prejudiciais ao epitélio do pulmão no processo alérgico inflamatório, como acontece na asma, por exemplo (97). Um aumento dos eosinófilos séricos e no escarro induzido de pacientes asmáticos está diretamente associado com piora nos sintomas e disfunção das vias aéreas (98). Devido à importância dos eosinófilos na fisiopatologia da asma, alguns tratamentos com alvo nessas células vêm sendo propostos a fim de se manejar os sintomas – como antagonistas de receptores de membrana presentes nos eosinófilos e bloqueadores de adesão (98).

O papel dos macrófagos encontrados nas vias aéreas de pacientes asmáticos é controverso. Alguns autores indicam que a presença de macrófagos no pulmão, dependendo do compartimento em que está localizado, pode ter ação anti ou pró-inflamatória, visto que a depleção de macrófagos alveolares em modelo animal de asma levou a atenuação da reposta alérgica Th2 e aumento de Th1. Em contrapartida, outros estudos mostram que a depleção dos macrófagos alveolares pode causar um aumento da resposta imune Th2 (99).

Outro parâmetro avaliado nesse estudo foram os níveis séricos de IgE específicas para OVA. A IgE possui papel central nas doenças alérgicas inflamatórias crônicas, visto que em indivíduos com predisposição à atopia, a exposição a alérgenos resulta em aumento do anticorpo específico para o alérgeno, que se liga a células efetoras como mastócitos e basófilos. Em um segundo contato com o alérgeno, as células sensibilizadas degranulam-se e liberam substâncias tóxicas ao epitélio pulmonar (100, 101).

Em nosso estudo, houve um aumento significativo da IgE OVA-específica no grupo OVA, quando comparado ao grupo Salina, o que demonstra que o modelo experimental de asma proposto funcionou. Porém, houve um aumento significativo da IgE OVA-

específica nos grupos que receberam a levedura antes da concepção, durante a gestação e lactação (Grupo CGL) e durante a gestação e a lactação (Grupo GL), quando comparado ao grupo OVA. O resultado encontrado é inesperado, visto que nesses grupos a administração do probiótico foi capaz de reduzir a HPB, e os níveis de IL-4, IL-5 e IL-13 no pulmão. No grupo que recebeu o probiótico somente durante a lactação (Grupo LAC), não houve alteração nos níveis de IgE OVA-especificas, quando comparado ao grupo OVA.

Alguns trabalhos já avaliaram os níveis de IgE específicas para OVA na prole após a administração de probióticos a camundongos fêmeas no período perinatal, com resultados semelhantes ao que encontramos. Os probióticos *L. rhamnosus* GG, *L. paracasei* NCC 2461 e *A. lwoffii* F78 quando administrados no período perinatal não reduziram os níveis séricos de IgE OVA-específicos na prole (90) (70) (77). Esses achados corroboram a hipótese que a prevenção da asma na prole não ocorre por alteração na sensibilização a alérgenos.

A administração da *S. cerevisiae* UFMG A-905 a camundongos machos, antes da sensibilização e concomitante aos desafios, em um modelo murino de asma induzido por OVA, também não reduziu de maneira significativa os níveis séricos de IgE OVA específicos (59).

O aumento encontrado nos níveis de IgE dos grupos CGL e GL foi um achado inesperado em nossos experimentos. Visto que os mecanismos envolvidos no efeito protetor e anti-inflamatório da *S. cerevisiae* UFMG A-905 não foram completamente elucidados, uma possibilidade é que o mecanismo de ação possa ser independente de células B ou não ser potente o suficiente para anular os efeitos da sensibilização ao alérgeno, como descrito por Conrad e colaboradores (102). Desse modo, mais estudos voltados para a investigação de leveduras na sensibilização alérgica devem ser realizados.

Sabe-se que na asma há uma predominância ou desvio de resposta imune para um perfil Th2, caracterizado pela secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-4, IL-5 e IL-13 (14). A administração da *S. cerevisiae* UFMG A-905 reduziu os níveis de IL-5 no LBA, e de IL-4 e IL-13 no homogenato do pulmão dos animais dos grupos CGL, GL e LAC. A redução das citocinas encontrada neste estudo, na prole dos animais que receberam o

probiótico, corrobora com estudos anteriores do nosso grupo, em que a levedura quando administrada via gavagem a camundongos machos antes da sensibilização e concomitante aos desafios, foi capaz de reduzir de IL-4 no LBA, e IL-5 e IL-13 no homogenato pulmonar. Além disso, quando administrada inativada, na forma de paraprobiótico, a levedura foi capaz de reduzir IL-5 no LBA e IL-13 no homogenato do pulmão de camundongos (59, 67).

O uso do probiótico no Grupo LAC apresentou melhores resultados nos parâmetros avaliados, visto que a administração do probiótico somente durante a lactação foi capaz de além de reduzir a HPB, IL-5 no LBA e IL-4 e IL-13 no pulmão, reduzir também o número total e de eosinófilos e macrófagos no LBA. Vale ressaltar que os grupos CGL e GL também receberam o probiótico durante a lactação, mas a administração da levedura iniciou-se 10 dias antes da concepção e no dia da concepção, respectivamente.

A lactação parece ser período chave no efeito anti-inflamatório de probióticos, transmitido da mãe para a prole. No estudo já citado acima, de Blumer e colaboradores, camundongos fêmeas receberam *L. rhamnosus* GG em dois períodos diferentes. O primeiro grupo recebeu o probiótico dez dias antes da concepção, durante a gestação (suplementação perinatal) e o segundo, dez dias antes da concepção e somente durante a gestação (suplementação pré-natal). A prole do grupo que não recebeu o probiótico durante a lactação apresentou redução da inflamação das vias aéreas, no entanto, a redução do número de células totais e de eosinófilos foi mais acentuada no grupo que também recebeu o probiótico durante a lactação (90).

No entanto, no estudo em que *A. lwoffii* F78 foi utilizada, o probiótico não foi administrado durante a lactação e o probiótico administrado somente antes da concepção e em dias alternados durante a gestação foi capaz de prevenir a asma na prole (77).

Vale ressaltar que os estudos citados acima foram feitos com diferentes cepas de probióticos, e sabe-se que os probióticos possuem mecanismos de ação diferentes, podendo agir por vias de sinalização distintas, sendo cepa-dependente. Desse modo, dependendo do mecanismo de ação de uma determinada cepa, os seus efeitos podem ser dependentes por exemplo da passagem de anticorpos pela placenta, ou pela indução da produção de citocinas anti-inflamatórias como INF-gama, ou dependente receptores *toll-like* maternos. Além disso, a exposição da prole ao probiótico causou modificações

na acetilação de alguns genes relacionados à resposta imune, fazendo com que os animais que foram expostos durante a gestação, desenvolvessem menos alergia ao entrar em contato com o alérgeno nas primeiras semanas de vida (77).

Durante a gestação, devido à imaturidade do sistema imune do feto, a mãe confere proteção, através da transferência de imunoglobulinas pela placenta e, outros fatores antimicrobianos encontrados no líquido amniótico (103). As últimas semanas de gestação e as primeiras semanas de vida parecem oferecer uma janela de oportunidades para intervenções na modulação do sistema imune, e a exposição à ambientes rurais, por exemplo, durante a gestação parece ter efeito protetor mais potente, quando comparado à exposição pós-natal (20, 104, 105).

A janela de intervenções justifica-se pela alta plasticidade característica do recém-nascido nesse período, dada a demanda de adaptação ao novo ambiente e ao contato com microorganismos e antígenos estranhos a seu sistema imune (106).

Algumas limitações desse trabalho foram: a ausência de um grupo de animais em que o probiótico fosse administrado somente durante a gestação; a ausência da colonização das fezes da prole; e dosagem de anticorpos séricos da prole como IgG1 e IgG2.

7. CONCLUSÃO

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905, quando administrada no período perinatal, foi capaz de atenuar as principais características da asma na prole de camundongos. Além disso, os efeitos da levedura foram mais robustos quando ela foi administrada somente durante a lactação. Desse modo, a *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 apresenta grande potencial terapêutico para a prevenção da asma.

8. REFERÊNCIAS

1. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o Manejo da Asma - 2012. Jornal Brasileiro de Pneumologia. 2012;38:S1 - S46.
2. Lambrecht BN, Hammad H. The immunology of asthma. Nature Immunology. 2014;16(1):45.
3. Anandan C, Nurmatov U, van Schayck OC, Sheikh A. Is the prevalence of asthma declining? Systematic review of epidemiological studies. Allergy. 2010;65(2):152-67.
4. Lai CK, Beasley R, Crane J, Foliaki S, Shah J, Weiland S, et al. Global variation in the prevalence and severity of asthma symptoms: phase three of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). Thorax. 2009;64(6):476-83.
5. Olin JT, Wechsler ME. Asthma: pathogenesis and novel drugs for treatment. BMJ. 2014;349:g5517.
6. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. Lancet. 1998;351(9111):1225-32.
7. Sole D, Yamada E, Vana AT, Costa-Carvalho BT, Naspitz CK. Prevalence of asthma and related symptoms in school-age children in Sao Paulo, Brazil--International Study of Asthma and Allergies in Children (ISAAC). JAsthma. 1999;36(2):205-12.
8. Kuschnir FC, Gurgel RQ, Solé D, Costa E, Felix MM, de Oliveira CL, et al. ERICA: prevalence of asthma in Brazilian adolescents. Rev Saude Publica. 2016;50 Suppl 1:13s.
9. Solé D, Wandalsen GF, Camelo-Nunes IC, Naspitz CK, Group I-B. Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and atopic eczema among Brazilian children and adolescents identified by the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) - Phase 3. J Pediatr (Rio J). 2006;82(5):341-6.
10. Cardoso TdA, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul PA, Brazil, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul PA, Brazil, Roncada C, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul PA, Brazil, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul PA, Brazil, et al. The impact of asthma in Brazil: a longitudinal analysis of data from a Brazilian national database system. J bras pneumol. 2017;43(3):163-8.
11. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. Allergy. 2004;59(5):469-78.
12. Lundbäck B, Backman H, Lötvall J, Rönmark E. Is asthma prevalence still increasing? Expert Rev Respir Med. 2016;10(1):39-51.
13. Global Initiative for Asthma (GINA). Global Strategy for Asthma Management and Prevention, 2017. http://www.ginasthma.org; 2017.
14. Global Initiative for Asthma (GINA). Global Strategy for Asthma Management and Prevention, http://www.ginasthma.org2018 [
15. Most Recent Asthma Data | CDC. 2019.
16. The burden of lung disease - ERS: s of routinely collected data do not extend beyond deaths and hospital admissions for all respiratory conditions, but for some diseases it is possible to place the routine data into context against the frequency of the condition in the general population. Figure 7 summarises the burden of asthma, COPD, lung cancer and tuberculosis in EU28 countries, taking data from a range of sources for recent years.; 2019 [Available from: https://www.erswhitebook.org/chapters/the-burden-of-lung-disease/.
17. Rennard SI, Farmer SG. Exacerbations and progression of disease in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Proc Am Thorac Soc. 2004;1(2):88-92.
18. Holgate ST, Wenzel S, Postma DS, Weiss ST, Renz H, Sly PD. Asthma. Nature Reviews Disease Primers. 2015;1:15025.
19. Martinez FD, Vercelli D. Asthma. Lancet. 2013;382(9901):1360-72.

20. Castro-Rodriguez JA, Forno E, Rodriguez-Martinez CE, Celedón JC. Risk and protective factors for childhood asthma: what is the evidence? J Allergy Clin Immunol Pract. 2016;4(6):1111-22.
21. Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barneon G, Ghavanian N, Enander I, et al. Eosinophilic inflammation in asthma. NEnglJMed. 1990;323(15):1033-9.
22. Vignola AM, Chanez P, Campbell AM, Souques F, Lebel B, Enander I, et al. Airway inflammation in mild intermittent and in persistent asthma. AmJRespirCrit Care Med. 1998;157(2):403-9.
23. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. AmJRespirCrit Care Med. 2000;161(5):1720-45.
24. O'Byrne PM, Inman MD. Airway hyperresponsiveness. Chest. 2003;123(3 Suppl):411s-6s.
25. Borak J, Lefkowitz RY. Bronchial hyperresponsiveness. Occup Med (Lond). 2016;66(2):95-105.
26. Nair P, Martin JG, Cockcroft DC, Dolovich M, Lemiere C, Boulet LP, et al. Airway Hyperresponsiveness in Asthma: Measurement and Clinical Relevance. J Allergy Clin Immunol Pract. 2017;5(3):649-59.e2.
27. Cockcroft DW, Davis BE. Airway hyperresponsiveness as a determinant of the early asthmatic response to inhaled allergen. J Asthma. 2006;43(3):175-8.
28. Bates JH, Thompson-Figueroa J, Lundblad LK, Irvin CG. Unrestrained video-assisted plethysmography: a noninvasive method for assessment of lung mechanical function in small animals. J Appl Physiol (1985). 2008;104(1):253-61.
29. Lundblad LK, Thompson-Figueroa J, Allen GB, Rinaldi L, Norton RJ, Irvin CG, et al. Airway hyperresponsiveness in allergically inflamed mice: the role of airway closure. Am J Respir Crit Care Med. 2007;175(8):768-74.
30. Wagers S, Lundblad LK, Ekman M, Irvin CG, Bates JH. The allergic mouse model of asthma: normal smooth muscle in an abnormal lung? J Appl Physiol (1985). 2004;96(6):2019-27.
31. Holgate ST. Pathogenesis of asthma. Clin Exp Allergy. 2008;38(6):872-97.
32. Marchica CL, Pinelli V, Borges M, Zummer J, Narayanan V, Iozzo RV, et al. A role for decorin in a murine model of allergen-induced asthma. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 3002011. p. L863-73.
33. Gauthier M, Ray A, Wenzel SE. Evolving Concepts of Asthma. Am J Respir Crit Care Med. 2015;192(6):660-8.
34. Dahl R. Systemic side effects of inhaled corticosteroids in patients with asthma. Respir Med. 2006;100(8):1307-17.
35. Marsland BJ, Trompette A, Gollwitzer ES. The Gut-Lung Axis in Respiratory Disease. Ann Am Thorac Soc. 2015;12 Suppl 2:S150-6.
36. Benjamin J. Marsland AeT, and Eva S. Gollwitzer. The Gut–Lung Axis in Respiratory Disease: TRANSATLANTIC AIRWAYCONFERENCE; 2015 [Available from: https://www.atsjournals.org/doi/pdf/10.1513/AnnalsATS.201503-133AW.
37. Anand S, Mande SS. Diet, Microbiota and Gut-Lung Connection. Front Microbiol. 2018;9.
38. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. BMJ. 1989;299(6710):1259-60.
39. von Mutius E. Allergies, infections and the hygiene hypothesis--the epidemiological evidence. Immunobiology. 2007;212(6):433-9.
40. Lloyd CM, Hawrylowicz CM. Regulatory T cells in asthma. Immunity. 2009;31(3):438-49.
41. Ball TM, Castro-Rodriguez JA, Griffith KA, Holberg CJ, Martinez FD, Wright AL. Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. New Engl J Med. 2000;343(8):538-43.
42. de Meer G, Janssen NAH, Brunekreef B. Early childhood environment related to microbial exposure and the occurrence of atopic disease at school age. Allergy. 2005;60(5):619-25.

43. Illi S, von Mutius E, Lau S, Bergmann R, Niggemann B, Sommerfeld C, et al. Early childhood infectious diseases and the development of asthma up to school age: a birth cohort study. Brit Med J. 2001;322(7283):390-5.
44. Tantoco JC, Elliott Bontrager J, Zhao Q, DeLine J, Seroogy CM. The Amish have decreased asthma and allergic diseases compared with old order Mennonites. Ann Allergy Asthma Immunol. 2018;121(2):252-3.e1.
45. Stein MM, Hrusch CL, Gozdz J, Igartua C, Pivniouk V, Murray SE, et al. Innate Immunity and Asthma Risk in Amish and Hutterite Farm Children. N Engl J Med. 2016;375(5):411-21.
46. Ege MJ, Mayer M, Normand AC, Genuneit J, Cookson WO, Braun-Fahrländer C, et al. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. N Engl J Med. 2011;364(8):701-9.
47. Wlasiuk G, Vercelli D. The farm effect, or: when, what and how a farming environment protects from asthma and allergic disease. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2012;12(5):461-6.
48. Gerrard JW, Geddes CA, Reggin PL, Gerrard CD, Horne S. Serum IgE levels in white and metis communities in Saskatchewan. Ann Allergy. 1976;37(2):91-100.
49. Okada H, Kuhn C, Feillet H, Bach JF. The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. Clin Exp Immunol. 2010;160(1):1-9.
50. Food and Agriculture Organization WHO, (FAO/WHO). Report of Joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, Argentina: Food and Agriculture Organization, World Health Organization (FAO/WHO); 2001. Report No.: Report no. 10-1-2001.
51. Boyle RJ, Bath-Hextall FJ, Leonardi-Bee J, Murrell DF, Tang ML. Probiotics for the treatment of eczema: a systematic review. Clin Exp Allergy. 2009;39(8):1117-27.
52. Ouwehand AC. A review of dose-responses of probiotics in human studies. Benef Microbes. 2016:1-10.
53. Bertazzoni E, Donelli G, Midtvedt T, Nicoli J, Sanz Y. Probiotics and clinical effects: is the number what counts? J Chemother. 2013;25(4):193-212.
54. Ozdemir O. Various effects of different probiotic strains in allergic disorders: an update from laboratory and clinical data. Clinical and Experimental Immunology. 2010;160(3):295-304.
55. Jang SO, Kim HJ, Kim YJ, Kang MJ, Kwon JW, Seo JH, et al. Asthma Prevention by Lactobacillus Rhamnosus in a Mouse Model is Associated With CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T Cells. Allergy Asthma Immunol Res. 2012;4(3):150-6.
56. Yu J, Jang SO, Kim BJ, Song YH, Kwon JW, Kang MJ, et al. The Effects of Lactobacillus rhamnosus on the Prevention of Asthma in a Murine Model. Allergy Asthma Immunol Res. 2010;2(3):199-205.
57. Hougee S, Vriesema AJM, Wijering SC, Knippels LMJ, 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. 2018;151(2):107-17.
58. Sagar S, Morgan ME, Chen S, Vos AP, Garssen J, van Bergenhenegouwen J, et al. Bifidobacterium breve and Lactobacillus rhamnosus treatment is as effective as budesonide at reducing inflammation in a murine model for chronic asthma. Respir Res. 2014;15:46.
59. Fonseca VM, Milani TM, Prado R, Bonato VL, Ramos SG, Martins FS, et al. Oral administration of Saccharomyces cerevisiae UFMG A-905 prevents allergic asthma in mice. Respirology. 2017.
60. Generoso SV, Viana M, Santos R, Martins FS, Machado JA, Arantes RM, et al. Saccharomyces cerevisiae strain UFMG 905 protects against bacterial translocation, preserves gut barrier integrity and stimulates the immune system in a murine intestinal obstruction model. Arch Microbiol. 2010;192(6):477-84.
61. Kollaritsch H, Holst H, Grobara P, Wiedermann G. [Prevention of traveler's diarrhea with Saccharomyces boulardii. Results of a placebo controlled double-blind study]. Fortschr Med. 1993;111(9):152-6.

62. Martins FS, Rodrigues ACP, Tiago FCP, Penna FJ, Rosa CA, Arantes RME, et al. Saccharomyces cerevisiae strain 905 reduces the translocation of Salmonella enterica serotype Typhimurium and stimulates the immune system in gnotoblotic and convectional mice. Journal of Medical Microbiology. 2007;56(3):352-9.
63. Bastos RW, Pedroso SH, Vieira AT, Moreira LM, Franca CS, Cartelle CT, et al. Saccharomyces cerevisiae UFMG A-905 treatment reduces intestinal damage in a murine model of irinotecan-induced mucositis. Benef Microbes. 2016;7(4):549-57.
64. Tiago FC, Porto BA, Ribeiro NS, Moreira LM, Arantes RM, Vieira AT, et al. Effect of Saccharomyces cerevisiae strain UFMG A-905 in experimental model of inflammatory bowel disease. Benef Microbes. 2015;6(6):807-15.
65. Martins FS, Elian SD, Vieira AT, Tiago FC, Martins AK, Silva FC, et al. Oral treatment with Saccharomyces cerevisiae strain UFMG 905 modulates immune responses and interferes with signal pathways involved in the activation of inflammation in a murine model of typhoid fever. Int J Med Microbiol. 2011;301(4):359-64.
66. Milani TM, Silva RQ, Carvalho APF, Fonseca VMB, Silva TG, Vianna EO, et al. Dose-Response Effect Of Probiotic Yeast Saccharomyces Cerevisiae Ufmg 905 For The Prevention Of Asthma In An Animal Model. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2015;191.
67. Milani TNS. Efeitos da administração de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 inativadas pelo calor na prevenção da asma em modelo animal. 2018.
68. Silveira PP, Portella AK, Goldani MZ, Barbieri MA. Developmental origins of health and disease (DOHaD). J Pediatr (Rio J). 2007;83(6):494-504.
69. Wadhwa PD, Buss C, Entringer S, Swanson JM. Developmental origins of health and disease: brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms. Semin Reprod Med. 2009;27(5):358-68.
70. Schabussova I, Hufnagl K, Tang ML, Hoflehner E, Wagner A, Loupal G, et al. Perinatal maternal administration of Lactobacillus paracasei NCC 2461 prevents allergic inflammation in a mouse model of birch pollen allergy. PLoS One. 2012;7(7):e40271.
71. Kalliomaki M, Kirjavainen P, Eerola E, Kero P, Salminen S, Isolauri E. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. J Allergy Clin Immunol. 2001;107(1):129-34.
72. Fan W, Tang Y, Qu Y, Cao F, Huo G. Infant formula supplemented with low protein and high carbohydrate alters the intestinal microbiota in neonatal SD rats. BMC Microbiol. 2014;14:279.
73. Palmeira P, Quinello C, Silveira-Lessa AL, Zago CA, Carneiro-Sampaio M. IgG Placental Transfer in Healthy and Pathological Pregnancies. Journal of Immunology Research. 2011;2012.
74. Van de Perre P. Transfer of antibody via mother's milk. Vaccine. 2003;21(24):3374-6.
75. Levi Mortera S, Del Chierico F, Vernocchi P, Rosado MM, Cavola A, Chierici M, et al. Monitoring Perinatal Gut Microbiota in Mouse Models by Mass Spectrometry Approaches: Parental Genetic Background and Breastfeeding Effects. Front Microbiol. 2016;7:1523.
76. Blümer N, Sel S, Virna S, Patrascan CC, Zimmermann S, Herz U, et al. Perinatal maternal application of Lactobacillus rhamnosus GG suppresses allergic airway inflammation in mouse offspring. Clin Exp Allergy. 2007;37(3):348-57.
77. Conrad ML, Ferstl R, Teich R, Brand S, Blumer N, Yildirim AO, et al. Maternal TLR signaling is required for prenatal asthma protection by the nonpathogenic microbe Acinetobacter lwoffii F78. J Exp Med. 2009;206(13):2869-77.
78. Lundelin K, Poussa T, Salminen S, Isolauri E. Long-term safety and efficacy of perinatal probiotic intervention: Evidence from a follow-up study of four randomized, double-blind, placebo-controlled trials. Pediatr Allergy Immunol. 2017;28(2):170-5.
79. Peldan P, Kukkonen AK, Savilahti E, Kuitunen M. Perinatal probiotics decreased eczema up to 10 years of age but at 5-10 years allergic rhino-conjunctivitis was increased. Clin Exp Allergy. 2017.

80. Bates JH, Irvin CG. Measuring lung function in mice: the phenotyping uncertainty principle. J Appl Physiol (1985). 2003;94(4):1297-306.
81. McGovern TK, Robichaud A, Fereydoonzad L, Schuessler TF, Martin JG. Evaluation of respiratory system mechanics in mice using the forced oscillation technique. J Vis Exp. 2013(75):e50172.
82. Hantos Z, Daroczy B, Suki B, Nagy S, Fredberg JJ. Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. J Appl Physiol (1985). 1992;72(1):168-78.
83. Fonseca VMB, Milani TMS, Prado R, Bonato VLD, Ramos SG, Martins FS, et al. Oral administration of Saccharomyces cerevisiae UFMG A-905 prevents allergic asthma in mice. Respirology. 2017;22(5):905-12.
84. Anandan C, Nurmatov U, van Schayck OCP, Sheikh A. Is the prevalence of asthma declining? Systematic review of epidemiological studies. Allergy. 2010;65(2):152-67.
85. Dargahi N, Johnson J, Donkor O, Vasiljevic T, Apostolopoulos V. Immunomodulatory effects of probiotics: Can they be used to treat allergies and autoimmune diseases? Maturitas. 2019;119:25-38.
86. Debarry J, Garn H, Hanuszkiewicz A, Dickgreber N, Blumer N, von Mutius E, et al. Acinetobacter lwoffii and Lactococcus lactis strains isolated from farm cowsheds possess strong allergy-protective properties. J Allergy Clin Immunol. 2007;119(6):1514-21.
87. 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. 2017.
88. Lundelin K, Poussa T, Salminen S, Isolauri E. Long-term safety and efficacy of perinatal probiotic intervention: Evidence from a follow-up study of four randomized, double-blind, placebo-controlled trials. Pediatric Allergy and Immunology. 2017;28(2):170-5.
89. RUBIN AS, PEREIRA CADC, NEDER JA, FITERMAN J, PIZZICHINI MMM. Hiperresponsividade brônquica. J Pneumol 28(Supl 3)2002.
90. Blumer N, Sel S, Virna S, Patrascan CC, Zimmermann S, Herz U, et al. Perinatal maternal application of Lactobacillus rhamnosus GG suppresses allergic airway inflammation in mouse offspring. Clinical and Experimental Allergy. 2007;37(3):348-57.
91. Christmas P. Toll-Like Receptors: Sensors that Detect Infection. Nature Education 3(9):85. 2010.
92. Dembic Z. The Function of Toll-Like Receptors. 2013.
93. Webb N. Tachyphylaxis. In: Kreutzer JS, DeLuca J, Caplan B, editors. Encyclopedia of Clinical Neuropsychology. New York, NY: Springer New York; 2011. p. 2463-.
94. Martins FS, Silva AA, Vieira AT, Barbosa FH, Arantes RM, Teixeira MM, et al. Comparative study of Bifidobacterium animalis, Escherichia coli, Lactobacillus casei and Saccharomyces boulardii probiotic properties. Arch Microbiol. 2009;191(8):623-30.
95. Habil N, Al-Murrani W, Beal J, Foey AD. Probiotic bacterial strains differentially modulate macrophage cytokine production in a strain-dependent and cell subset-specific manner. Benef Microbes. 2011;2(4):283-93.
96. Girard P, Pansart Y, Lorette I, Gillardin JM. Dose-response relationship and mechanism of action of Saccharomyces boulardii in castor oil-induced diarrhea in rats. Dig Dis Sci. 2003;48(4):770-4.
97. Buckland K. Eosinophils. 2019.
98. Brussino L, Heffler E, Bucca C, Nicola S, Rolla G. Eosinophils Target Therapy for Severe Asthma: Critical Points. Biomed Res Int. 2018;2018.
99. Jiang Z, Zhu L. Update on the role of alternatively activated macrophages in asthma. J Asthma Allergy. 92016. p. 101-7.
100. Amarasekera M. Immunoglobulin E in health and disease. Asia Pac Allergy. 2011;1(1):12-5.
101. Gould HJ, Sutton BJ. IgE in allergy and asthma today. Nature Reviews Immunology. 2008;8(3):205.

102. Brewer JM, Conacher M, Hunter CA, Mohrs M, Brombacher F, Alexander J. Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4- or IL-13-mediated signaling. J Immunol. 1999;163(12):6448-54.
103. Grases-Pintó B, Abril-Gil M, Castell M, Pérez-Cano FJ, Franch À. Enhancement of immune maturation in suckling rats by leptin and adiponectin supplementation. Scientific Reports. 2019;9(1):1786.
104. Ou CY, Kuo HC, Wang L, Hsu TY, Chuang H, Liu CA, et al. Prenatal and postnatal probiotics reduces maternal but not childhood allergic diseases: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Clin Exp Allergy. 2012;42(9):1386-96.
105. Zinkernagel RM, Mackay IR, Rosen FS. Maternal Antibodies, Childhood Infections, and Autoimmune Diseases. http://dxdoiorg/101056/NEJMra012493. 2009.
106. Tang ML, Lahtinen SJ, Boyle RJ. Probiotics and prebiotics: clinical effects in allergic disease. Curr Opin Pediatr. 2010;22(5):626-34.