UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

VANESSA MACIEL BRAULIO DA FONSECA

Estudo dos mecanismos de ação da
Saccharomyces cerevisiae UFMG A-905 em
um modelo experimental de asma

Ribeirão Preto

2021

VANESSA MACIEL BRAULIO DA FONSECA

Estudo dos mecanismos de ação da
Saccharomyces cerevisiae UFMG A-905 em
um modelo experimental de asma

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

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

Área de Concentração: Clínica
Médica

Orientador: Prof. Dr. Marcos de
Carvalho Borges

Ribeirão Preto

2021

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.

Fonseca, Vanessa Maciel Braulio

Estudo dos mecanismos de ação da *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 em um modelo experimental de asma. Ribeirão Preto, 2021.

84 p.: il.; 30cm.

Tese de Doutorado. Apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Clínica Médica

Orientador: Marcos de Carvalho Borges

1. Asma. 2.Probiótico 3. Mecanismos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

FOLHA DE APROVAÇÃO

VANESSA MACIEL BRAULIO DA FONSECA

Estudo dos mecanismos de ação da *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 em um modelo experimental de asma

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor 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:	_____
Prof. Dr.	_____
Instituição:	_____
Julgamento:	_____
Assinatura:	_____

Dedico este trabalho a todos que morreram pela COVID-19 e que não perderam a fé na ciência a espera de uma vacina.

A todas as pessoas que sofrem com a asma e outras doenças respiratórias.

Ao meu orientador professor Marcos de Carvalho Borges pelo incentivo a formação acadêmica.

Ao meu marido Cleber, pelo apoio incondicional, carinho, amor, paciência, força em todos os momentos, obrigada pelas palavras ditas no momento em que eu fraquejei e pela convivência em todos esses anos.

Aos meus filhos Igor e Larissa pelo amor, carinho, força, fé no meu trabalho. Tenho muito orgulhos nas pessoas que se tornaram.

A minha mãe e ao meu pai (in memoriam) pelo exemplo de força, determinação, humildade e com amor podemos vencer tudo.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer muito a Deus por ter me dado fé, esperança e muita determinação para finalizar este trabalho.

Ao meu orientador, professor Marcos de Carvalho Borges, que acreditou no meu potencial e não mediu esforços para me ajudar e alimentou o meu amor pela ciência e pesquisa. Muito obrigada por todos esses anos de laboratório, pelo aprendizado profissional e humano este período está sendo muito enriquecedor para mim. Obrigada pelo exemplo dado aos seus alunos. Hoje sou uma pessoa melhor do que quando comecei.

Aos meus irmãos, cunhadas pelas palavras de incentivo e carinho.

A minha norinha Marcia pelo apoio, carinho, amizade e palavras de incentivo. Deus colocou mais uma filha em minha vida.

Aos professores Élcio, Vania, Karla Arruda, Flaviano, Jacques, Alceu, pela colaboração e ensinamentos.

Aos professores componentes da banca de qualificação: Alexandre Fabro, Daniela Sartori e Vania Bonato pela contribuição ao meu trabalho.

Aos professores do PAE pelo aprendizado.

A minha amiga Sandy pelo apoio, carinho, amizade, pelas comidinhas deliciosas, e pelas jornadas de experimentos sem medir esforços em me ajudar, muito obrigada.

As minhas colegas do laboratório Aline, Ana, Andy, Amanda, Camila, Jowanka, Rosana, Leandra e Maira pelo companheirismo, pela disponibilidade em ajudar, força e amizade.

A minha amiga de pós graduação Sandra Albornoz pelas discussões de trabalho e compartilhamento de aprendizado.

Aos alunos do laboratório de virologia Yunam e a sua esposa pelo apoio e ensinamentos.

A Camila Manca e a Natalia pelo apoio.

As técnicas de laboratórios: Ana Flavia, Sandra, Flavia, Livia, Ceci, Elaine, Cristiane, Wendy e Renato pela amizade, apoio e ensinamentos.

As moças das limpezas do anexo 70B, obrigada pelos sorrisos, carinho e chazinho compartilhados.

Ao Emerson da secretaria da pós-graduação de clínica médica pelo apoio, atenção e paciência todos esses anos.

Agradeço a todos que de uma forma direta ou indireta me apoiaram e incentivaram para a concretização deste trabalho.

“Renda-se, como eu me rendi. Mergulhe no
que você não conhece como eu mergulhei. Não
se preocupe em entender, viver ultrapassa
qualquer entendimento.”

(Clarice Lispector)

RESUMO

FONSECA, V. M. B. **Estudo dos mecanismos de ação da *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 em um modelo experimental de asma.** 2021. 84 p. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Introdução: A prevalência de asma tem aumentado nas comunidades que adotam um estilo de vida ocidental e se tornam mais urbanizadas. A teoria da higiene sugere que a exposição a infecções na infância pode proteger contra o desenvolvimento de asma e outras doenças alérgicas. A *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 reduziu a hiper-responsividade brônquica e a inflamação das vias aéreas e pulmonares e restaurou os níveis de IL-10 e interferon-gama em um modelo animal de asma. Porém, os mecanismos envolvidos não foram elucidados. **Objetivos:** Avaliar os mecanismos de ação envolvidos na prevenção da asma pela administração de *S. cerevisiae* UFMG A-905 vivas. **Material e métodos:** Camundongos Balb/c, C57BL/6 wild e nocaute para IL-17A foram utilizados no estudo. *S. cerevisiae* UFMG A-905 vivas foram administradas aos camundongos por gavagem 10 dias antes da primeira sensibilização e durante todo período de sensibilização e desafios. Os camundongos dos grupos controles receberam apenas PBS, nos mesmos dias. Foram avaliados a população fenotípica das células dendríticas (CD11c⁺MHCII⁺CD11b⁺CD103⁺) e a população de linfócitos T reguladores (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) no pulmão por citometria de fluxo; expressão gênica de receptores do tipo Toll (TLR-9), do tipo NLR (NLRP3), e do tipo lectina C (CLRs: Dectina-1 and Mincle) no parênquima pulmonar por PCR em tempo real; produção de ácidos graxos de cadeia curta, média e longa nas fezes por cromatografia gasosa; produção de citocinas no intestino por ELISA. **Resultados:** A administração de *S. cerevisiae* UFMG A-905 aumentou significativamente o número de células dendríticas de fenótipo CD11c⁺MHCII⁺CD11b⁺CD103⁻ e de linfócitos T reguladores, e a expressão de NLRP3 no tecido pulmonar; e a porcentagem do ácido graxo dihomogama-linolênico nas fezes de camundongos. Adicionalmente, os efeitos *S. cerevisiae* UFMG A-905 foram parcialmente dependentes de IL-17A. **Conclusão:** A administração do probiótico *S. cerevisiae* UFMG A-905 diminuiu as principais características da asma e desviou a resposta imune para um padrão Th17 via mecanismos parcialmente dependente de IL-17A. Nossos achados reforçam a importância do eixo-intestino-pulmão nas doenças alérgicas.

Palavras-chave: Asma. Probiótico. Mecanismos.

ABSTRACT

FONSECA, V.M.B. **Study of the mechanisms of action of *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 in an experimental model of asthma.** 2021. 84 p. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Background: The prevalence of asthma has increased in children and communities that adopt a Western lifestyle and become more urbanized. The hygiene hypothesis suggests that exposure to infections early in life can reduce the risk of asthma and other allergic diseases. The *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 reduced bronchial hyperresponsiveness, airways and lung inflammation, and restored the levels of IL-10 and IFN-gamma in a mouse model of asthma. However, the mechanisms involved were not fully elucidated. **Objective:** To evaluate the mechanisms involved in the prevention of asthma with the administration of *S. cerevisiae* UFMG A-905. **Materials and Methods:** Balb/c, C57BL/6 wild and IL-17A knockout mice were used in study. Mice were treated daily with live *S. cerevisiae* UFMG A-905 via gavage ten days before OVA sensitization and during sensitization and challenge protocol. Control mice received saline and PBS on the same days. Flow cytometer was performed in lung to measure dendritic cells (CD11c⁺MHCII⁺CD11b⁺CD103⁺) and regulatory T lymphocytes (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺). The evaluation of the following gene expression was done in lung with qPCR: Toll-like receptor (TLR-9), NLR receptor (NLRP3), and lectina C receptor (CLRs: Dectina-1 and Mincle). Short, medium, and long chain fatty acids were quantified in feces with gas chromatography. Cytokine levels were measured in gut with ELISA. **Results:** The administration of *S. cerevisiae* UFMG A-905 increase the number of dendritic cells (CD11c⁺MHCII⁺CD11b⁺CD103⁺), regulatory T lymphocytes, and NLRP3 gene expression in lung; and percentage of dihomogamma-linolenic in feces. Additionally, the effects of *S. cerevisiae* UFMG A-905 were partially dependent of IL-17A. **Conclusion:** The administration of *S. cerevisiae* UFMG A-905 decreased main features of asthma and shifted the immune response to a Th17 pattern, via mechanisms partially dependent on IL-17A. Our findings reinforce the importance of the intestine-lung axis in allergic diseases.

Keywords: Asthma. Probiotic. Mechanisms

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Resumo da fisiopatologia da asma.....	20
Figura 2 - Protocolo de sensibilização, desafios e tratamento.....	38
Figura 3 – Avaliação fenotípica da população de células dendríticas	50
Figura 4 - Avaliação de linfócitos T reguladores (CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺); estratégia de gate (A), representação dos grupos estudados (B), porcentagem de linfócitos T reguladores no tecido pulmonar (C) e no baço (D) de camundongos Balb/c	52
Figura 5 – Avaliação de linfócitos T reguladores (CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺); estratégia de gate (A), representação dos grupos estudados (B), porcentagem de linfócitos T reguladores (CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺) nos linfonodos mesentéricos (C) de camundongos Balb/c	53
Figura 6 - Expressão gênica dos receptores dos tipos TLR-9 (A), NLRP3 (B), DECTINA-1 (C), MINCLE (D) no tecido pulmonar	54
Figura 7 - Dosagem das citocinas IL-10, IL-13 e IL-17 no ceco e íleo de camundongos Balb/c	56
Figura 8 - Porcentagem de acetato (A), butirato (B) e propionato (C) nas fezes de camundongos Balb/c.....	56
Figura 9 - Porcentagem de dodecanoato (A); dihomogama-linolênico (B); oleato (C), araquidônico(D); estearato(E) e palmitato(F) nas fezes de camundongos Balb/c	57
Figura 10 - Número de células totais no lavado broncoalveolar de camundongos selvagens (WT) e nocautes (IL-17 ^{-/-}) para IL-17A	58
Figura 11 - Número de eosinófilos, macrófagos, linfócitos e neutrófilos no lavado broncoalveolar de camundongos selvagens (WT) e nocautes (IL-17 ^{-/-}) para IL-17A.....	59
Figura 12 - Níveis de IL-10 e IL-13 no tecido pulmonar de camundongos selvagens (WT) e nocautes (IL-17 ^{-/-}) para IL-17	60
Figura 13 - Níveis de IgE OVA específica no soro de camundongos selvagens (WT) e nocautes (IL-17 ^{-/-}) para IL-17A.....	61
Figura 14 - Número total de células no lavado broncoalveolar dos camundongos que receberam o posbiótico da <i>S. cerevisiae</i> UFMG A-905	62
Figura 15 - Número de eosinófilos, macrófagos, linfócitos e neutrófilos no lavado broncoalveolar de camundongos C57BL/6 que receberam o posbiótico da <i>S. cerevisiae</i> UFMG A-905	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Anticorpos utilizados nos ensaios de citometria de fluxo	41
Tabela 2 - Sequências de primers utilizados para detectar e amplificar genes expressos no tecido pulmonar de camundongos Balb/c.	46
Tabela 3 - Nomenclatura dos ácidos graxos analisados por cromatografia gasosa (GC-2014)	47

LISTA DE ABREVIações

AGCC – Ácido graxo de cadeia curta

AGCM –Ácido graxo de cadeia média

ANOVA – Análise de variância

APCs – antigen presenting cells

cDNA – DNA complementar

CTLA-4– Cytotoxic T lymphocyte-associated molecule 4

DAMPs – Padrões moleculares associados a danos

Dectin-1 – Dectina-1

FOXP3 – fork-like transcription fator 3

GALT – Gut-associated lymphoid tissue

HAMPs – Homeostasis-altering molecular processes

HCFMRP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

I.P. – Intra-peritoneal

I.N. – Intra-nasal

IL-10 – Interleucina dez

IL-4 – Interleucina quatro

IL-5– Interleucina cinco

IL-13 – Interleucina treze

IFN- γ – Interferon gama

IgA – Imunoglobulina A

IgE – Imunoglobulina E

LAG-3 –Lymphocyte activation gene- 3

NLR– NOD-like receptor

NLRC4 – NOD-LRR-and card domain containing protein 4

NLRP1– NOD-LRR-and pyrin containing protein 3

NLRP3 – NOD-LRR-and pyrin domain containing protein 3

Mincle – Macrophage-inducible-C-type lectin

MPO – Mieloperoxidase

Hprt – Hypoxanthine phosphoribosyltransferase

OVA – Ovalbumina

PAMPS – Padrões moleculares associados a patógenos

PBS – Phosphate Buffered Saline

PRRs –Receptores de reconhecimento padrão

PG1 – Prostaglandina-1

PG2 – Prostaglandina-2

RIG-1– Retinoic acid-inducible gene-I

SAL – Salina

TM – Temperatura de Melting

Tregs – células T reguladoras

TLR-Toll like receptor

TLR9 – Toll like receptor-9

USP – Universidade de São Paulo

UFC – Unidade formadora de colônia

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Considerações gerais.....	17
1.2	Fsiopatologia	18
1.3	Células T reguladores	20
1.4	Células dendríticas	22
1.5	Receptores de reconhecimento padrão (PRRs)	23
1.6	Teoria da higiene	25
1.7	Probióticos.....	27
1.8	Principais mecanismos de ação dos probióticos	28
1.9	Mecanismos dos probióticos associados aos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) ...	30
1.10	Mecanismos dos probióticos associados aos ácidos graxos de cadeia média a longa .	30
1.11	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFMG A-905.....	31
1.12	Posbiótico	32
2	JUSTIFICATIVA	34
3	OBJETIVOS.....	35
3.1	Objetivo geral	35
3.2	Objetivos específicos.....	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1	Animais.....	36
4.2	Probióticos.....	36
4.3	Cultivo e preparo da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFMG A-905.....	36
4.4	Posbióticos.....	37
4.5	Protocolo de sensibilização, desafio e administração da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFMG A-905	37
4.6	Coleta e processamento do lavado broncoalveolar (LBA), pulmão e soro	39
4.7	Contagem total e diferencial de células no LBA	39
4.8	Preparo do homogenato e dosagem de citocinas no pulmão	39
4.9	Deteção de anticorpos específicos para OVA	40
4.10	Anticorpos utilizados na citometria de Fluxo	40
4.11	Obtenção das células do tecido pulmonar, baço e linfonodos mesentéricos para citometria de fluxo	41
4.12	Avaliação da população das células dendríticas do tecido pulmonar por citometria de fluxo	42

4.13	Avaliação da população de linfócitos T reguladores no tecido pulmonar, baço e linfonodos mesentéricos por citometria de fluxo.....	43
4.14	Avaliação dos receptores do tipo Toll (TLRs), receptores tipo NOD (NLRs) e receptores tipo lectina C (CLRs) no tecido pulmonar	43
4.15	Avaliação de ácidos graxos de cadeia curta, média e longa.....	46
4.16	Preparo do homogenato e dosagem de citocinas no intestino.....	48
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
6	RESULTADOS	49
6.1	Avaliação fenotípica da população de células dendríticas no tecido pulmonar	49
6.2	Avaliação de linfócitos T reguladores no pulmão e no baço.....	51
6.3	Avaliação dos linfócitos T reguladores nos linfonodos mesentéricos	52
6.4	Avaliação da expressão gênica dos receptores dos tipos Toll -9 (TLR-9), NLRP (NLRP3) e receptores do tipo lectina C (CLRs: Dectina-1 e Mincle) no tecido pulmonar	54
6.5	Avaliação das citocinas IL-10, IL-13 e IL-17A no ceco e íleo	55
6.6	Avaliação da produção de ácidos graxos de cadeia curta.....	56
6.7	Avaliação da produção de ácidos graxos de cadeia média e longa	56
6.8	Número de células totais e diferenciais no lavado broncoalveolar de camundongos C57BL/6 selvagens e nocautes para IL-17A.....	57
6.9	Dosagem das citocinas IL-10 e IL-13 no homogenato pulmonar dos camundongos C57BL/6 selvagens e nocautes para IL-17A.....	60
6.10	Avaliação de IgE OVA específica nos camundongos C57BL/6 selvagens e nocautes para IL-17A	61
6.11	Número de células totais e diferenciais no lavado broncoalveolar de camundongos C57BL/6 que receberam o posbiótico de <i>S. cerevisiae</i> UFMG A-905.	62
7	DISCUSSÃO	64
7.1	A população das células dendríticas	65
7.2	A população dos linfócitos T reguladores (CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺)	67
7.3	A expressão dos receptores tipos Toll, receptores do tipo NLRP e receptores do tipo lectina C no tecido pulmonar	68
7.4	A produção de ácidos graxos de cadeia curta, média e longa.....	69
7.5	A inflamação intestinal	71
7.6	O papel de IL-17A nos mecanismos de ação da <i>S. cerevisiae</i> UFMG A-905	71
7.7	O efeito posbiótico da <i>S. cerevisiae</i> UFMG A-905;	71
8	LIMITAÇÕES DESTE TRABALHO	72
9	SÍNTESE DOS RESULTADOS.....	73
10	CONCLUSÃO	74

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

A asma pode ser definida como uma doença inflamatória crônica, heterogênea, caracterizada por hiper-responsividade das vias aéreas; limitação variável ao fluxo aéreo, reversível espontaneamente ou com o tratamento; e remodelamento brônquico. Manifesta-se clinicamente por episódios recorrentes de sibilância, dispneia, desconforto torácico e tosse, particularmente à noite e pela manhã ao despertar (1-3).

A asma pode ser classificada como leve, moderada ou grave e apresenta diferentes formas clínicas e fenótipos. Os mais comuns são: asma alérgica, asma não alérgica, asma de início tardio, asma com limitação fixa ao fluxo de ar, e asma com obesidade (1). Esses diferentes fenótipos da asma apresentam variações na resposta inflamatória, que pode ser mediada por populações específicas de células do sistema imune (3).

Considerada uma das doenças crônicas mais comuns, a asma acomete crianças e adultos em todos os países, independente do nível de desenvolvimento. Em 2019, houve uma estimativa pela Organização Mundial da Saúde de 262 milhões de pessoas acometidas no mundo e 461 mil mortes pela asma (4).

A prevalência da asma em diferentes países varia de 1 a 18%, sendo maior nos países desenvolvidos (3, 5). Nos Estados Unidos, em 2010, estimava-se o número de pacientes com asma em 18,7 milhões de adultos e 7 milhões de crianças (2). Na Austrália, Nova Zelândia e Reino Unido mais do que 15% da população têm asma (6, 7). No Peru e Costa Rica, a prevalência é de 10% e na África do Sul, 8% da população (6). Em 2016, a asma foi classificada no ranking mundial no trigésimo primeiro lugar de doenças que levam a causa de mortes prematuras nos países de baixa e média renda (8). No Brasil, a prevalência oscila entre 18 e 27% (9, 10). Anualmente, ocorrem cerca de 350 mil internações por asma no Brasil, constituindo-se a quarta causa de hospitalização pelo Sistema Único de Saúde (SUS), o que corresponde a 2,3% do total e à terceira causa de internação entre crianças e adultos jovens (11, 12).

Há evidências de que a prevalência de asma tem aumentado nos últimos 20 anos, especialmente em crianças e nas comunidades que adotam um estilo de vida ocidental e se tornam mais urbanizadas (7, 13, 14). Possíveis explicações para o aumento da incidência de asma nesses países são mudanças na condição socioeconômica e higiênica, alteração na

alimentação, uso de antibióticos, poluição ambiental, poeira, tabagismo, sedentarismo, infecções predominantemente virais, entre outros fatores que são pertinentes ao hospedeiro como a genética, sexo e obesidade (6, 15, 16).

De acordo com a “hipótese da higiene” o aumento na incidência de doenças alérgicas e autoimunes nos países desenvolvidos e mais recentemente nos países em desenvolvimento está relacionado com a diminuição na incidência de doenças infecciosas e no contato com micro-organismos, o que está diretamente relacionado com a melhoria nas condições sanitárias desses países e mudanças de hábito de vida da população (6, 17).

A asma, até o momento, não apresenta cura, sendo o tratamento convencional baseado no uso de broncodilatadores e anti-inflamatórios, como os corticosteroides inalatórios. Novas drogas direcionadas a alvo específicos, como IL-5 e IgE, são adições recentes ao arsenal terapêutico da asma e podem ser utilizadas em casos específicos, como os de difícil controle (7).

1.2 Fisiopatologia

A inflamação das vias aéreas é considerada o mecanismo fisiopatológico mais importante e está presente mesmo em asmáticos assintomáticos (18, 19). A inflamação, que resulta de uma interação complexa entre diversas células, é caracterizada por um aumento principalmente de eosinófilos, mastócitos, macrófagos e linfócitos T na mucosa das vias aéreas. Estas células liberam mediadores que contribuem para o desenvolvimento da obstrução ao fluxo aéreo, hiper-responsividade brônquica e gravidade clínica (7, 18, 20, 21).

A hiper-responsividade brônquica é uma das manifestações clínicas da asma e resulta do estreitamento anormal das vias aéreas em resposta a um estímulo broncoconstritor, em comparação a uma pessoa não asmática. A hiper-responsividade pode variar ao longo do tempo, podendo aumentar durante as exacerbações e diminuir com o tratamento anti-inflamatório (3). Geralmente a hiper-responsividade brônquica é avaliada pelo teste de broncoprovocação que consiste na inalação de uma substância broncoconstritora em doses ou concentrações crescentes.

Além da resposta inflamatória e da hiper-responsividade brônquica, pode também ocorrer alterações estruturais na parede das vias aéreas dos pacientes com asma denominadas remodelamento. 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 (7, 22). Estas alterações estão relacionadas à gravidade da doença e podem resultar em um estreitamento irreversível das vias aéreas (18).

A complexidade da patogênese da asma ocorre devido a uma complexa interação entre fatores genéticos e ambientais. Uma das possíveis explicações é um desbalanço da resposta imune Th1/Th2 com um desvio para a resposta do tipo Th2 (23). A presença de linfócitos TCD4⁺, do subtipo Th2 ativado, e de citocinas e quimiocinas, tais como, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e IL-16 induzem um padrão de resposta denominado Th2, onde ocorre ativação de células B, produção de IgE, supressão de células Th1, crescimento e diferenciação de eosinófilos e aumento na atividade de mastócito (7, 24). Adicionalmente a estas citocinas, temos também as células ILC-2 (células linfoides inatas), TSLP (linfopoetina estromal tímica) e IL-33 que também estão relacionadas com o padrão de resposta Th2 (25, 26). Um resumo da fisiopatologia da asma encontra-se na figura 1.

Fonte: Pavon Romero et al., 2021.

Figura 1 - Resumo da fisiopatologia da asma. Resumidamente, a inalação de alérgenos estimula as células epiteliais das vias aéreas a produzirem citocinas como IL-25, IL-33 e TSLP. As células dendríticas das vias aéreas apresentam o antígeno aos linfócitos T que podem estimular diferentes respostas, sendo a mais frequente a resposta de padrão Th2, com a produção de citocinas IL-4, IL-5, e IL-13; estimulação de eosinófilos; produção de IgE; e liberação de histamina pelos mastócitos. Os alérgenos podem levar também a um padrão de resposta Th17 com a estimulação de neutrófilos (27).

1.3 Células T reguladoras

Nos últimos anos, alguns linfócitos T, conhecidos como linfócitos T reguladores, foram descritos como células capazes de exercer uma atividade imunossupressora ou imunomoduladora (28, 29). Nesse sentido, os linfócitos T reguladores têm um papel fundamental no controle da função efetora de diferentes padrões de resposta. Além disso, uma deficiência ou uma intensa supressão na resposta de linfócitos T reguladores pode desencadear doenças alérgicas como a asma (29).

Devido à sua importância na manutenção da homeostase imune nas vias aéreas (30, 31), tem-se aumentado o interesse no uso de linfócitos T reguladores ou de terapêuticas que estimulem o aumento de seu número e/ou função no tratamento de doenças alérgicas como a asma (32). Entre as células T, várias subpopulações apresentam propriedades regulatórias, como os linfócitos TCD4⁺CD25⁺FOXP3⁺, células Tr1 produtoras de IL-10, células Th3 secretoras de TGF- β (do inglês, transform growth fator - β), células CD4⁺ CD8⁻ e CD8⁺ CD28⁻ (33). A proteína FOXP3 (do inglês, forkhead box protein P3) tem um papel chave na indução e desenvolvimento de linfócitos T reguladores.

Os linfócitos T reguladores atuam inibindo a resposta imune por diversos mecanismos, entre eles a secreção de citocinas inibitórias como IL-10 e TGB- β , competição por fatores de crescimento, competição pelo mesmo sítio de ligação, baixa modulação das células apresentadoras de antígenos através de moléculas inibitórias tais como o CTLA-4 e LAG3, citotoxicidade e mecanismos contato-dependente (28, 29, 34-36).

A IL-10 é uma citocina com propriedades anti-inflamatórias e imunorregulatórias secretada por diversas células como células B, mastócitos, eosinófilos, macrófagos, células dendríticas e células T, principalmente os linfócitos T reguladores (CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺) (37, 38). Diversos estudos demonstraram que um dos mecanismos envolvidos na função imunossupressora ou imunomoduladora dos linfócitos T reguladores é dependente de IL-10 (28, 32, 39-42). Adicionalmente, a diminuição de IL-10 encontrada em pacientes asmáticos pode favorecer a ação de citocinas inflamatórias, contribuindo para o desenvolvimento e gravidade da asma (43). Paralelamente ao desenvolvimento de novas drogas anti-inflamatórias para o tratamento de doenças alérgicas, tem-se buscado novas estratégias que estimulem a indução de células com atividade imunomoduladora e/ou a produção de citocinas anti-inflamatórias. Nesse sentido, estudos prévios demonstraram que alguns probióticos podem modular a resposta inflamatória em modelos animais de alergia pela indução de linfócitos T reguladores e produção de IL-10 (40, 44-46). Assim como a citocina IL-10, TGF-beta também apresenta um papel importante no estímulo de produção de células T reguladoras.

Entre as células T reguladores, as células CD4⁺ FOXP3⁺ apresentam duas populações importantes, as células T reguladoras originadas do timo (tTregs), que podem regular a resposta imune contra antígenos próprios do organismo, e a células T reguladoras convencionais (Tconv), de origem extra tímica, presentes em tecidos linfoides secundários,

que ao encontrarem antígenos se diferenciam sob a influência de TGF-beta. Essas células T regulatórias periféricas (Tconv) encontram-se no intestino e no pulmão durante inflamação crônica (29).

O TGF-beta pode também estimular as células T reguladoras pela indução de FOXP3 em células CD4⁺CD25⁻ com função imunossupressora e, quando associado com IL-6, pode levar a uma resposta do tipo padrão Th17, estimulando a produção das citocinas IL-17A, IL-17F e IL-22 (47).

1.4 Células dendríticas

As células dendríticas são reconhecidas como as principais células apresentadoras de antígenos e desempenham um papel essencial na indução da inflamação alérgica pulmonar ao reconhecer alérgenos inspirados no ar e que chegam até os pulmões (48).

Na asma as células dendríticas iniciam a resposta de padrão Th2 e a mantêm em resposta a alérgenos inalados. Essas células tem a função de capturar os antígenos e transportar para os linfonodos mediastinos para apresentar aos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ (49).

As células dendríticas são reconhecidas pelos seus marcadores de superfícies. Após o reconhecimento, os receptores presentes em sua membrana são estimulados de acordo com o tipo de antígeno e juntamente com citocinas e quimiocinas presentes no microambiente vão direcionar o padrão de resposta a ser estabelecido (50).

Existem dois principais conjuntos de células dendríticas nas vias aéreas. As células dendríticas plasmocitóides (pDCs) e as convencionas (cDCs). As convencionais são divididas em dois grupos, as células dendríticas cDC1 e as cDC2. Em camundongos, as células dendríticas cDC1 correspondem às células dendríticas CD8⁺ e apresentam na superfície a integrina CD103⁺, desse modo são caracterizadas como células CD103⁺. As células dendríticas cDC2 correspondem as CD8⁻, e estão inclusas neste grupo de CD8⁻ as células cDs CD11b⁺. Ambos fenótipos de células dendríticas, CD103⁺ e CD11b⁺, são reconhecidos pelo papel na regulação da resposta imune à alérgenos (50).

As células dendríticas CD103⁺ são eficientes na apresentação de alérgenos de barata, ácaros e poeira doméstica e estimulam a resposta de padrão Th2 (50-52). O fenótipo CD11b⁺ apresenta uma eficiência na captura de alérgeno, principalmente a ovalbumina (OVA) em

modelos alérgicos, e o transporta para apresentação nos linfonodos aos linfócitos T, estimulando um padrão de resposta Th2 (53).

Adicionalmente, as células dendríticas CD103⁺ na presença de CD4⁺ naive *in vitro* estimularam a produção das citocinas IFN-gama e IL-17A, induzindo um padrão de resposta Th1 e Th17. Neste mesmo estudo as células dendríticas CD11b⁺ estimularam a produção de citocinas IL-4, IL-6 e IL-10 estimulando um padrão de resposta Th2 e também de linfócitos T reguladores (51).

O papel das células dendríticas CD103⁺ e CD11b⁺ no tecido pulmonar ainda é pouco entendido. Após a captura do antígeno pelas células dendríticas e apresentação aos linfócitos TCD4⁺, as respostas adquirem padrões específicos. As células T naive podem se diferenciar em padrão de resposta Th1, Th2, ou Th17, de acordo com os estímulos de citocinas. Podem também, na presença de IL-10 e TGF-beta, estimular linfócitos T reguladores. Estas respostas são orquestradas de acordo com o antígeno, microbiota e a epigenética do indivíduo (54).

As células dendríticas são capazes de reconhecer um repertório de agentes não próprios ao organismo pela expressão de receptores de reconhecimento padrões (PRRs) que estão expressos na sua membrana auxiliando a resposta imune.

1.5 Receptores de reconhecimento padrão (PRRs)

Os PRRs são expressos nas células de defesas contra agentes infecciosos (bactéria, fungos e vírus) ou quando ocorre dano tecidual, podendo estar presentes nas células de defesa da imunidade inata e adaptativa como os macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células epiteliais. Os mais conhecidos e estudados são os receptores do tipo toll like (TLR) e receptores do tipo NOD (NLRs). Porém, outros PRRs têm sido descritos como os receptores de lectina tipo C, pela sua importância no reconhecimento de açúcares, proteínas, quitina e sua relação com alérgenos (55).

Foram identificados aproximadamente de 10 a 12 TLRs em camundongos e humanos, sendo que os mais caracterizados são os TLR-1 a TLR 9. Os TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-5 e TLR-6 estão presentes na membrana celular (transmembrana), já os TLR-3, TLR-7, TLR-8 e TLR-9 estão presente no compartimento endossomal das células (56). Os TLRs participam da primeira linha de defesa do hospedeiro ao detectar antígenos e micro-organismos

infecciosos; sendo que a sinalização via toll-like leva a ativação NF- κ B (fator nuclear κ B) que ativa células B e T em resposta à infecção (57).

O epitélio pulmonar utiliza de uma variedade de TLRs que interagem com patógenos, alérgenos, poluição, entre outros estímulos. Os TLRs reconhecem os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Dentre eles, o LPS, que é um componente de membrana de bactérias GRAM negativas e o ácido lipoteicóico componente de bactérias GRAM positivas. Além destas moléculas os TLRs reconhecem peptidoglicanas presentes em bactérias, zimosan presente na parede de fungo, RNA de fita dupla comuns em vírus, entre outros (58).

Adicionalmente, ligantes de TLR-9 pode induzir as células B a mudar a produção de imunoglobulina IgE para a IgA e também bloquear a produção de IL-4, uma citocina importante para o desenvolvimento de resposta padrão Th2 (59). Portanto, os TLRs além do reconhecerem antígenos desempenham papel importante na sinalização da resposta imunológica. Na asma os agonistas dos receptores TLRs podem suprimir ou agravar a resposta imune, dependendo do tipo de antígeno, do tempo de utilização, do adjuvante utilizado e da via de administração (56, 60).

Associado, temos NLRs que reconhecem substâncias nocivas ao nosso organismo, PAMPs, irritantes ambientais e sinais de perigo derivados do seu hospedeiro (DAMPs), como o aumento de ácido úrico ocasionados pela lise celular e o aumento de potássio (56, 61, 62). Os NLRs, diferentemente de outros PRRs, estão localizados no citosol. A detecção de PAMPs, DAMPs, HAMPs (processos moleculares que alteram a homeostasia), pelos NLRs levam a uma plataforma de grande sinalização multimolecular chamada inflamassomas (63).

Os inflamassomas, que respondem a sinais endógenos e patogênicos, são indutores críticos da defesa do hospedeiro. Os principais inflamassomas são: NLRP1, NLRC4, RIG-1, AIM-2 e NLRP3. A indução dos inflamassomas podem estimular as vias inflamatórias de respostas Th1 e Th17 de acordo com o microambiente (63, 64). O NLRP3 é um inflamassoma de sensor intracelular que detecta patógenos e sinais endógenos de dano e tem um papel importante na imunidade inata das vias aéreas. O NLRP3 detecta alérgenos e sinaliza para proteger o organismo contra este invasor. No entanto se este estímulo for intensificado, com a exposição contínua ao alérgeno, pode levar a uma asma mais grave com indução de resposta Th17 (64).

Além dos inflamassomas, temos outros receptores que exibem eficiência nos reconhecimentos de PAMPs associados às moléculas de açúcares no nosso organismo. Os receptores de lectina do tipo C (CLRS) são proteínas de ligação a carboidratos, lipídeos e proteínas. Eles são formados por mais de mil membros e foram organizados em dezessete grupos com diferentes funções. Os CLRs mais estudados são a Dectina-1, Dectina-2 e o Mincle (lectina do tipo C induzível por macrófago). Esses receptores são transmembranares e estão presentes em células do sistema imune, como as células dendríticas e macrófagos. O papel principal desses receptores são o reconhecimento de agentes fúngicos, mas também reconhecem outros agentes infecciosos e ácaros de poeira domésticas (55).

A Dectina-1, em alguns estudos, foi associada com o padrão de resposta Th2. Nesses estudos, o uso do extrato de HDM em um modelo animal mostrou que a Dectina-1 foi expressa e sinalizou uma resposta Th2 (55). A Dectina-1 é expressa em células dendríticas CD11b que reconheceram moléculas como a β - glucana (55). Assim como a Dectina-1, o Mincle ou Clec4e é um receptor de reconhecimento padrão expresso em macrófagos com um domínio de reconhecimento de carboidratos que reconhece diversos açúcares presentes em fungos e bactérias, e também proteínas (65). Esses receptores são poucos estudados em doenças alérgicas como a asma.

1.6 Teoria da higiene

A teoria da higiene, proposta em 1989 por David Strachan, sugere que a exposição a 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 (14, 66, 67). Atualmente, a teoria se baseia em diversos estudos experimentais e epidemiológicos, particularmente estudos que evidenciaram aumento na incidência de algumas doenças, como diabetes e esclerose múltipla, na primeira geração de pessoas que migraram de áreas de baixa prevalência dessas doenças para áreas de alta prevalência (6, 68, 69).

Alguns 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 (14, 32, 70-72).

Adicionalmente, a exposição prolongada a altos níveis de endotoxinas durante o primeiro ano de vida também protegeu contra asma e doenças atópicas (73, 74). Apesar de inúmeras evidências, a teoria da higiene não foi confirmada em todos os estudos (74, 75).

Com o novo estilo de vida adotado pelas populações de países desenvolvidos e alguns países em desenvolvimento como o Brasil, houve mudanças nas condições de vida, entre elas, aumento do atendimento à saúde básica, melhorias no saneamento, aumento da vacinação, uso indiscriminado de antibióticos, além de mudanças na dieta e higiene. Essas modificações provocaram redução no número de doenças infecciosas e, ao mesmo tempo, aumento das doenças alérgicas (6). Diversos estudos confirmaram essa relação, entre eles, *De Filippo et al.* e *Trompette et al.* demonstraram que o espaço geográfico e a dieta podem influenciar o desenvolvimento de doenças alérgicas, diabetes e obesidade devido a mudanças de hábitos alimentares como a diminuição de ingestão de fibras, além de alterações na relação do indivíduo com o meio ambiente (15, 16).

Os mecanismos envolvidos na teoria da higiene são múltiplos, complexos e ainda não totalmente elucidados. Eles incluem o desvio da resposta imune para um padrão Th2, competição antigênica, estimulação de TLRs, fatores genéticos e imunorregulação, envolvendo diversos subtipos de linfócitos T reguladores e mudanças na microbiota (6, 13, 14). Assim, mudanças no estilo de vida podem ter causado alterações na microbiota, que, por sua vez, desempenha um papel importante na modulação da resposta imune (6, 75, 76).

A relação da microbiota com o sistema imune é complexa, e entre os principais mecanismos, são descritas modificações fenotípicas das células dendríticas mudanças no equilíbrio das respostas Th1/Th2 e/ou produção de linfócitos T reguladores. Estes mecanismos podem se originar localmente decorrentes de alterações da microbiota intestinal, se espalhar para as vias aéreas e proteger contra o desenvolvimento de doenças alérgicas (76). Não é algo cogitado induzir mudanças na microbiota por contaminação de crianças e adultos para prevenção de doenças alérgicas. No entanto, considerando que muitos probióticos agem por mecanismos semelhantes e são considerados seguros na maioria das situações, abre-se a perspectiva de sua utilização na prevenção e tratamento de doenças autoimunes e alérgicas (6).

1.7 Probióticos

Probióticos são definidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) como “micro-organismos vivos que, quando administrados em adequadas quantidades, conferem um benefício à saúde do hospedeiro” (77, 78). Diversas características são atribuídas aos probióticos, entre elas, eles são organismos microbianos; permanecem estáveis e viáveis após a cultura, manipulação e armazenamento; sobrevivem à digestão gástrica, biliar e pancreática; são capazes de induzir uma resposta quando presentes no intestino; e fornecem um benefício clínico ou funcional ao hospedeiro (79).

Sabe-se, embora não seja mencionado um número específico, que pelo menos 10^9 UFC/ml de micro-organismos devem ser ingeridos por dia para chegar ao intestino em níveis adequados (80).

Bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, presentes na microbiota intestinal humana, têm sido os probióticos mais utilizados na prática clínica (77). Apesar do potencial benéfico dos probióticos, ainda faltam estudos sobre qual o melhor probiótico, posologia e eficácia na prevenção ou terapia das doenças alérgicas (14).

Paul Forsythe et al. avaliaram a resposta alérgica das vias aéreas em camundongos tratados com *L. reuteri* vivos e mostraram redução da hiper-responsividade brônquica, do número de eosinófilos e dos níveis de citocinas TNF, IL-5 e IL-13 (81). Na mesma linha, *Houge et al.* realizaram um estudo comparativo utilizando cepas de bactérias diferentes com potencial probiótico em camundongos sensibilizados à OVA. O *B. breve* mostrou ser o mais eficaz na redução alérgica em relação aos demais probióticos, demonstrado pela inibição da hiper-responsividade brônquica, redução de eosinófilos, IgE, IgG1 OVA específica, IL-4, IL-5 e IL-10 (82). Adicionalmente, outros micro-organismos, como leveduras não patogênicas do gênero *Saccharomyces*, têm despertado interesse como opção terapêutica em diversas doenças.

A *Saccharomyces boulardii* tem sido estudada no tratamento de doença inflamatória intestinal e tratamento e/ou prevenção de diversos tipos de diarreia, como diarreia associada a antibióticos, doença intestinal associada ao *Clostridium difficile* e diarreia do viajante (83-86). A *S. boulardii* foi inicialmente isolada em frutas (“lychee”) da Indochina. As

frutas contaminadas com a *S. boulardii* eram usadas na medicina popular local para o tratamento de diarreia. Diversos estudos confirmaram esses resultados e atualmente a *S. boulardii* está disponível em diversos países da Europa, África e América do Sul (87). Devido a semelhanças genéticas com a *S. boulardii*, outras cepas de *Saccharomyces*, como *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905, despertaram interesse no tratamento de doenças alérgicas e intestinais (87). Embora leveduras de *Saccharomyces* sejam utilizadas por mais de 50 anos, existem casos descritos de fungemia, especialmente em pacientes imunocomprometidos

1.8 Principais mecanismos de ação dos probióticos

O uso de probióticos ocorre desde os primórdios da civilização. Antes de Cristo, Abraão atribuiu sua longevidade ao consumo do leite azedo (Genesis 18:8). Os efeitos benéficos dos probióticos tornaram-se um aliado à terapêutica em diversas patologias, como as inflamações intestinais, dermatites e doenças alérgicas (88). Existem vários mecanismos de ação dos probióticos, sendo os principais a melhora da barreira intestinal, aumento da adesão a mucosa intestinal e concomitantemente a inibição da adesão a patógenos, competição com patógenos, produção de substâncias antimicrobianas, produção de ácidos graxos de cadeia curta, supressão de NLRP3, propriedades analgésicas e anti-inflamatórias, alteração da microbiota intestinal e modulação do sistema imune (89, 90).

A **barreira intestinal** é o principal mecanismo de defesa para manutenção da integridade epitelial e para proteger os organismos em seu ambiente. As defesas da parede intestinal são a produção de IgA, a camada de muco, a produção de substâncias antimicrobianas e o complexo de adesão epitelial. Quando a função de barreira é interrompida, o conteúdo presente no lúmen intestinal incluindo bactérias e alimentos pode alcançar a submucosa e induzir respostas inflamatórias (89). Estudos prévios demonstraram que alguns probióticos podem iniciar o reparo após o dano da barreira. A bactéria Nissle 1917 (EcN1917) pode prevenir a irrupção de barreira pela enteropatogênicas *E. coli* e também restaurar a integridade da barreira (89, 91).

O **aumento da adesão a mucosa intestinal** é considerado um pré-requisito para a colonização, e aumenta a oportunidade de interação com o hospedeiro e a modulação do sistema imune. As células epiteliais intestinais (IECs) produzem as mucinas, um complexo de

glicoproteínas que são os principais componentes do muco e têm como função prevenir a adesão de bactérias patogênicas na parede intestinal. Alguns probióticos são escolhidos pela capacidade de adesão ao epitélio intestinal e a presença de receptores capazes de competir pelo sítio de adesão (89, 90).

A **exclusão competitiva de patógenos** refere-se a um cenário em que uma espécie de bactéria compete por receptores alvos no trato gastrointestinal mais vigorosamente que outras bactérias. A via específica e o mecanismo regulatório dos probióticos na exclusão competitiva ainda não são totalmente conhecidos. Entretanto, uma bactéria pode excluir ou minimizar o crescimento de outras espécies de bactérias através da criação de um microambiente hostil, pela produção de substâncias antimicrobianas e pela competição por nutrientes. Alguns probióticos compartilham especificidades de ligação a carboidratos com alguns enteropatógenos e, conseqüentemente, induz a competição por receptores alvos do hospedeiro (89, 90).

Adicionalmente a estes mecanismos de ação, temos a produção de **substâncias antimicrobianas**. Alguns estudos demonstraram que a redução no número de bactérias patogênicas, como a *Salmonella ssp*, ocorre devido a alguns metabólitos produzidos por probióticos que desempenham papel na indução da sinalização de vias metabólicas celulares (89, 91). Esses metabólitos são os ácidos orgânicos, bacteriocinas, peróxido de hidrogênio, aminas, dentre outros. A produção de ácidos orgânicos como o ácido láctico pode inibir o crescimento de bactérias GRAM negativas. Os gêneros *Lactobacillus sp* e *Bifidobacterium sp* podem produzir as bacteriocinas, que previnem a proliferação de patógenos. Algumas destas bacteriocinas inibem o crescimento de *Helicobacter*, *C. difficile*, rotavírus, e *Shigella ssp* resistente a multidrogas (91).

A microbiota intestinal **modula o sistema imune** pela produção de substâncias com funções imunomoduladora e anti-inflamatórias. Esses efeitos reguladores também são vistos pela interação dos probióticos com as células epiteliais intestinais, as células dendríticas e interação com os PRRs. Assim, a interação do probiótico com estas células pode desencadear diferentes padrões de resposta (Th0, Th1, Th2, Th17 e T reguladora), a depender do estímulo e do microambiente intestinal. Apesar da ampla possibilidade de indução de diferentes respostas, os probióticos estão mais associados ao desvio de resposta para o padrão do tipo Th1 e estimulação de células T reguladoras, preservando assim a homeostase intestinal (92).

1.9 Mecanismos dos probióticos associados aos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

Nos últimos anos foram observados que alguns metabólitos produzidos pela microbiota intestinal desempenham um papel na modulação do sistema imune estimulando a diferenciação de células T reguladoras (93). Entre eles, temos os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) que são produzidos pela fermentação das bactérias anaeróbicas comensais da microbiota intestinal após a ingestão de fibras. Os principais ácidos AGCC são o acetato, butirato e o propionato, que apresentam na sua composição de 4 a 6 carbonos, sendo a proporção no nosso organismo 60:20:20, respectivamente. Eles são os combustíveis para as células epiteliais intestinais e uma fonte de energia para algumas bactérias. Os AGCC não ficam restritos ao trato gastrointestinal, sendo também detectados no sangue (16). Os AGCC por serem pequenos disseminam-se rapidamente pela corrente sanguínea e influenciam a proliferação de células hematopoiéticas (94).

A adição de propionato na dieta de camundongos desafiados com alérgenos (HDM) diminuiu a produção de citocinas inflamatórias, a inflamação pulmonar e fez com que as células dendríticas apresentasse um perfil fenotípico ineficaz em estimular células efetoras de padrão Th2 (16). O tratamento com acetato em fêmeas de camundongos grávidas estimulou a expressão de FOXP3 nos adultos e na prole, estimulando os linfócitos T reguladores (95).

1.10 Mecanismos dos probióticos associados aos ácidos graxos de cadeia média a longa

Além dos AGCC, existem também os lipídeos da dieta que são adquiridos de fontes vegetais, animais e marinhas e contribuem para a formação de estruturas celulares importantes no organismo como a membrana celular, a síntese de hormônios, e a composição de substâncias que exercem um efeito imunológico. Os ácidos graxos de cadeia média (AGCM) e longa (AGCL) compõem este grupo.

Os AGCM apresentam na sua composição de 6 a 12 carbonos. Por serem pequenos são absorvidos rapidamente no intestino, transportados para o fígado e após são direcionados para os tecidos periféricos. Os AGCL apresentam mais de 12 carbonos; após a hidrólise na cavidade oral e no estômago, os lipídeos de cadeias longas são emulsificados no duodeno com o auxílio de ácidos biliares (96, 97).

Probióticos podem auxiliar na restauração da microbiota e interagir com os ácidos biliares no lúmen intestinal modificando seu metabolismo. Alguns estudos evidenciaram que a modificação na absorção de colesterol através da enzima BSH (hidrolase sal bile) pode alterar a composição dos sais biliares (91).

1.11 *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905

Saccharomyces são leveduras utilizadas pela indústria alimentícia na produção de comida, pães, vinhos e cerveja. O gênero *Saccharomyces* inclui diversas espécies, sendo *S. boulardii* e *S. cerevisiae* as mais estudadas.

Martins et al. avaliaram cepas de *S. cerevisiae* de espécies distintas isoladas de ambientes diferentes, insetos, frutas tropicais, queijos e produção da cachaça. Entre as doze linhagens de *S. cerevisiae* testadas a cepa *S. cerevisiae* UFMG A-905 foi a que apresentou melhores características para ser usada como um probiótico (98).

A *S. cerevisiae* UFMG A-905 quando administrada em camundongos atingiu níveis populacionais potencialmente funcionais no trato gastrointestinal, reduziu a translocação de *Salmonella typhimurium* e foi capaz de proteger camundongos contra infecções por *S. typhimurium* e *C. difficile*. Estas proteções se deram provavelmente por modulações locais e do sistema imune (98, 99). *Generoso et al.* demonstraram que a administração de *S. cerevisiae* UFMG A-905 vivas ou mortas pelo calor aumentou a produção de IL-10 e preveniu a translocação bacteriana causada por obstrução intestinal, provavelmente pela imunomodulação e manutenção da integridade da barreira intestinal (100).

Em um modelo experimental de colite ulcerativa aguda com sulfato de dextrano sódico, os camundongos que receberam a *S. cerevisiae* UFMG A-905 apresentaram melhora nas manifestações clínicas (101). A *S. cerevisiae* UFMG A-905 enriquecida com selênio reverteu parcialmente o aumento da permeabilidade intestinal provocado por mucosite intestinal e a atividade da MPO (mieloperoxidase) (102). *Miranda et al.* avaliaram os efeitos da *S. cerevisiae* UFMG A-905 em um modelo de alergia alimentar e mostraram que ela atenuou os danos teciduais, o nível da atividade de MPO e reduziu níveis de IL-17 (103).

Nós avaliamos o uso de *S. cerevisiae* UFMG A-905 na prevenção da asma e demonstramos que ela diminuiu o número de eosinófilos nas vias aéreas; a produção de IL-4, IL-5 e IL-13; a hiper-responsividade brônquica; e a inflamação pulmonar. Além disso, a *S.*

cerevisiae UFMG A-905 aumentou os níveis de IL-10, IFN-gama e IL-17A no tecido pulmonar (104). O aumento de IL-17A no tecido pulmonar pode estar associado a um padrão de resposta Th17. Adicionalmente, em um outro estudo que avaliou diferentes doses da *S. cerevisiae* UFMG A-905 vivas, a que apresentou melhores resultados na atenuação da inflamação das vias aéreas foi com a concentração 10^9 UFC/mL (105).

Adicionalmente a forma inativa da *S. cerevisiae* UFMG A-905 foi avaliada pelo nosso grupo em um modelo experimental de asma e seus resultados mostraram que a *S. cerevisiae* UFMG A-905 reduziu os níveis das citocinas IL-5, IL-13, e de IgE OVA-específica, além de aumentar os níveis de IL-17 A, corroborando com os nossos resultados de desvio de padrão de resposta para um Th17 (104, 106). A administração da *S. cerevisiae* UFMG A-905 em modelo experimental de asma durante o período perinatal reduziu as principais características da asma na prole de camundongos, e administração no período de lactação foi o que induziu melhor modulação do sistema imune (107). Até o momento, não há descrição dos mecanismos da *S. cerevisiae* UFMG A-905 na prevenção ou no tratamento da asma.

1.12 Posbiótico

O termo posbiótico tem sido usado para referir a produtos bacterianos não viáveis ou subprodutos metabólicos de micro-organismos probióticos que possuem atividade biológica no hospedeiro (108). Os posbióticos podem ser AGCC, enzimas, vitaminas, ácidos teicóico, proteínas de superfície celular, ácidos orgânicos, plasmalogênio (109).

O uso de posbiótico pode ser interessante em populações que apresentam o sistema imunológico imaturo ou comprometimento, como recém nascidos, crianças, pessoas em tratamento de câncer ou portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV). Assim, o posbiótico pode mimetizar a função do probiótico e diminuir algum eventual risco de ingestão de micro-organismos vivos. Além disso, para a indústria, a questão da manutenção da viabilidade e a estabilidade durante o processo de produção tornam os posbióticos uma alternativa promissora (110).

Nos últimos anos aumentaram os estudos com metabólitos provenientes de micro-organismos comensais devido às descobertas do papel da microbiota intestinal na modulação do sistema imune e em estudos de inflamação intestinal e alergias.

A inibição de bactérias enteropatogênicas foram observadas em camundongos pelo uso de acetato produzido por *Bifidobacterium sp* (111). Em um outro estudo, células inativas de *Lactobacillus sp.* (paraprobiótico) reduziram IgE e aumentaram as citocinas IL-12 e IFN-gama, estimulando um padrão de resposta Th1 (112).

Existem poucos estudos com o uso de subprodutos de probióticos, entretanto seus achados são promissores.

2 JUSTIFICATIVA

A asma é uma doença alérgica crônica prevalente que acomete crianças e adultos no mundo inteiro e até o presente momento, não apresenta cura. Considerando os efeitos imunomoduladores e protetores da *S. cerevisiae* UFMG A-905 na asma, tais como a redução da inflamação vias aéreas e pulmonar, da hiper-responsividade brônquica e da produção de IgE, e considerando que esses benefícios podem ocorrer quando a levedura foi administrada viva ou inativa e também ocorreu na prole de camundongos, é importante avaliar os mecanismos de ação da *S. cerevisiae* UFMG A-905 na prevenção da asma. Assim, nos hipotetizamos que a administração de *S. cerevisiae* UFMG A-905 pode estimular dois padrões de resposta no pulmão, do tipo Treg e Th17, desequilibrando o padrão de resposta Th2 presente na asma.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi avaliar os mecanismos de ação da *S. cerevisiae* UFMG A-905 vivas na prevenção da asma induzida por um alérgeno em um modelo animal.

3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste estudo foram avaliar:

- A população das células dendríticas;
- A população dos linfócitos T reguladores (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺);
- A expressão dos receptores tipos Toll, receptores do tipo NLR e receptores do tipo lectina C no tecido pulmonar;
- A produção de ácidos graxos de cadeia curta, média e longa;
- A inflamação intestinal;
- O papel de IL-17A nos mecanismos de ação da *S. cerevisiae* UFMG A-905;
- O efeito posbiótico da *S. cerevisiae* UFMG A-905.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo FMRP-USP (processo nº 022/2011).

4.1 Animais

Foram utilizados de 6 a 8 camundongos em cada grupo, sendo machos de seis a oito semanas da linhagem Balb/c. Adicionalmente foram usados machos e fêmeas de C57BL/6 nocaute para IL-17A. Os animais eram provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) e do Centro de Criação de Camundongos Especiais (CCEE) da FMRP-USP. Os animais permaneceram no Biotério da Clínica Médica da FMRP-USP, no qual ficaram sob cuidados e manutenção da pesquisadora. Os camundongos ficaram em gaiolas isoladoras, que foram autoclavadas antes de receberem os camundongos e trocadas três vezes na semana. A ração, água e a maravalha foram previamente autoclavadas antes de serem colocadas nas gaiolas. Os camundongos tiveram livre acesso à ração e água.

4.2 Probióticos

O presente estudo fez uso da levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905 como probiótico, que foi nos cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Esta levedura foi isolada da cana-de açúcar da produção da cachaça pelo Professor Doutor Carlos Augusto Rosa do laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da UFMG (98).

4.3 Cultivo e preparo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905

Inicialmente foi cultivada a levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905, em meio YPD (1% de extrato de levedura, 2% peptona e 2% de dextrose) por 48 horas a 37°C, sob agitação constante de 160 rpm. Posteriormente, foram feitas diluições seriadas e foi realizada a

contagem das leveduras em câmara de Neubauer com adição do corante azul de tripan; de 30 a 300 leveduras foram adicionadas em placas com meio YPD sólido, que foram mantidas a 37°C. Após 48 horas, as unidades formadoras de colônia (UFC) foram contadas e foi determinada a viabilidade da levedura. Na maioria das vezes, o meio cultivado apresentou uma concentração de 10^8 leveduras/ml. Após, o meio foi concentrado a 10^9 UFC/mL e as leveduras foram armazenadas em alíquotas estocadas de 2°C a 8°C, para serem então administradas aos camundongos. No dia da administração as alíquotas foram centrifugadas e ressuspensas em PBS estéril e administradas aos camundongos.

4.4 Posbióticos

Após o cultivo e concentração, as *S. cerevisiae* UFMG A-905 vivas foram armazenadas em alíquotas e estocadas, como descrito acima. Antes de serem administradas aos camundongos as alíquotas foram centrifugadas a 5000 rpm durante 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e reservado em alíquotas para serem administradas aos camundongos.

4.5 Protocolo de sensibilização, desafio e administração da *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905

Camundongos Balb/c e C57BL/6 foram sensibilizados duas vezes com 10 µg de OVA e 1 mg Al(OH)₃ via intraperitoneal (I.P.), com uma semana de intervalo, e uma semana após foram desafiados com 10 µg de OVA por via intranasal (I.N.) por três dias consecutivos, sob leve anestesia (quetamina 100 mg/Kg e xilazina 10 mg/kg, I.P.). Os animais foram tratados diariamente por gavagem com 100 µl de uma solução contendo *S. cerevisiae* UFMG A-905 na concentração de 10^9 UFC/ml por 27 dias consecutivos, 10 dias antes da primeira sensibilização e durante todo período de sensibilização e desafios.

O protocolo de sensibilização, desafio e tratamento é mostrado na Figura 2. Os animais foram divididos em quatro grupos:

- O grupo prev OVA/Sac: os camundongos receberam probiótico *S. cerevisiae* UFMG A-905 diariamente por 10 dias antes da primeira sensibilização, e durante todo o

período de sensibilização e desafios. Os camundongos foram sensibilizados e desafiados com OVA.

- O grupo prev OVA/PBS: os camundongos receberam PBS diariamente por 10 dias antes da primeira sensibilização, e durante todo o período de sensibilização e desafios. Os camundongos foram sensibilizados e desafiados com OVA.
- O grupo prev SAL/PBS: os camundongos receberam uma solução de PBS diariamente por 10 dias antes da primeira sensibilização, e durante todo o período de sensibilização e desafios. Os camundongos foram sensibilizados e desafiados com solução salina.
- O grupo prev OVA/Sac-Sobrenadante: os camundongos receberam posbiótico diariamente por 10 dias antes da primeira sensibilização, e durante todo o período de sensibilização e desafios. Os camundongos foram sensibilizados e desafiados com OVA.

Figura 2 - Protocolo de sensibilização, desafios e tratamento

4.6 Coleta e processamento do lavado broncoalveolar (LBA), pulmão e soro

O lavado broncoalveolar (LBA) foi coletado a fim de quantificar a inflamação. Para isso, 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 -80°C para dosagem de citocinas. Após a coleta do LBA, foi feita a coleta de sangue através do ventrículo direito. O sangue foi centrifugado, e o soro foi separado e armazenado a -70°C. Após a coleta do LBA, a caixa torácica foi aberta e foram infundidos 5 ml de solução salina no ventrículo direito para retirada do sangue dos pulmões. O pulmão direito foi extraído e armazenado em RNAlater (Qiagen, Austin, Texas, USA) para extração de RNA e preparação do homogenato pulmonar para dosagem de citocinas.

4.7 Contagem total e diferencial de células no LBA

Os precipitados da primeira e segunda amostra de LBA foram ressuspensos e foi realizada a contagem total de células coradas com o azul de tripan em uma câmara de Neubauer. Após, 100 µl de cada amostra foram centrifugados a 400 rpm por 3 minutos em centrífuga tipo cytospin (Cytospin IV, Thermo Scientific, Runcorn, Cheshire, EUA). As lâminas foram coradas com o kit Panótico Rápido (Labroclin, Pinhais, PR, Brasil) para contagem diferencial das células inflamatórias. Foram contadas 300 células inflamatórias de cada amostra.

4.8 Preparo do homogenato e dosagem de citocinas no pulmão

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

Foram dosadas as citocinas inflamatórias de padrão Th2 e Th17 no sobrenadante do homogenato do pulmão por ELISA, de acordo com as instruções do fabricante (BD Biosciences BD OptEIA™, San Diego, CA e eBioscience, San Diego, CA, EUA). As citocinas quantificadas no homogenato foram IL-10, IL-13 e IL-17A.

4.9 Detecção de anticorpos específicos para OVA

Foi realizada a quantificação de IgE (BD, Bioscience, EUA) específica para OVA. Brevemente, a cada poço de uma placa de 96 poços foi adsorvido 100 µL de OVA (10 µg/mL) e a placa foi incubada por 18 horas a 4°C. Após, os poços foram lavados com PBS contendo 0,05% de Tween 20. As reações inespecíficas foram bloqueadas com a incubação por 1 hora a 37°C com PBS contendo 10% de soro fetal bovino. Os poços foram lavados e 100 µL das amostras de soro foram adicionadas. Após 2 horas a 37°C, os poços foram lavados e 100 µL dos anticorpos biotinilados foram adicionados. Decorrido 1 hora a 37°C, os poços foram lavados e 100 µL de estreptavidina HRP (diluída 1:10.000; BD Bioscience, EUA) foram adicionados e incubados por 30 minutos em temperatura ambiente no escuro. Os poços foram então lavados e a reação foi revelada decorridos 30 minutos da incubação com 100 µL de TMB (BD Bioscience, EUA). A reação foi interrompida com adição de 50 µL de ácido sulfúrico (16%). A leitura da absorbância foi lida com auxílio do espectrofotômetro Versa Max (Molecular Devices, EUA), no comprimento de onda de 450nm e 570nm.

4.10 Anticorpos utilizados na citometria de Fluxo

Os anticorpos foram adquiridos da BD Biosciense Pharmigen (Franklin Lakes, New Jersey, EUA), Biolegend (San Diego, CA, EUA) e eBioscience (San Diego, CA, EUA) e utilizados de acordo com as instruções do fabricante. Na tabela 1 encontram-se todos anticorpos utilizados.

Tabela 1 - Anticorpos utilizados nos ensaios de citometria de fluxo

Populações	Anticorpos	Clone	Fabricante
Linfócitos	CD4 (FITC)	H129.19	BD, Bioscience, EUA
	CD25(PE)	3C7	BD, Bioscience, EUA
	FOXP3(APC)	FJK-16	BD, Bioscience, EUA
Células dendríticas	CD11c APC	HL3	BD, Bioscience, EUA
	CD11b Pe Cy7	M1/70	BD, Bioscience, EUA
	CD103 Pe	2E 7	BioLegend, EUA
	MHC Fitc	M5/114.152	BioLegend, EUA

4.11 Obtenção das células do tecido pulmonar, baço e linfonodos mesentéricos para citometria de fluxo

Os pulmões foram coletados e colocados em um falcon de 50mL (Corning, NY, EUA) contendo 2mL de RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, MO, EUA). Após foram transferidos para uma placa de petri de 60mm de diâmetro (Corning, NY, EUA) e com o auxílio de uma tesoura e pinça estéreis as amostras foram cortadas em fragmentos pequenos. Brevemente, os fragmentos foram transferidos para um falcon de 50mL e foram adicionados de 1mL de uma solução digestão, contendo 0,5µg/mL de liberase (Liberase Blendzyme-Roche, IN, EUA), 25U/mL de deoxiribonuclease I de pâncreas bovino (Dnase, Sigma-Aldrich, MO, EUA) e RPMI e foram incubados a 37°C durante 30 minutos. Após as amostras foram homogeneizadas com uma seringa de 10mL de forma mecânica com um êmbolo de seringa. Em seguida a solução foi filtrada utilizando um filtro para seringa de 0,22 micrometro (Cell Strainer, BD Biosciences, CA, EUA) para um falcon e centrifugada por 10 minutos a 1500 rpm e 4°C. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram ressuspensas de forma mecânica; foram adicionados 2 mL de solução de lise ACK (0,15M de NH₄CL, 10 mM de KHCO₃, 0,1Mm de EDTA) diluídos em H₂O, por 2 minutos para hemólise das hemácias. A reação foi bloqueada adicionando 10 mL de PBS em cada falcon. Posteriormente, foram centrifugadas por 10 minutos a 1500 rpm e 4°C, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em

1mL de PBS. Foram feitas diluições destas amostras para a contagem de células em câmara de Neubauer com o azul de tripan. Após a contagem de células as amostras foram normalizadas para uma 1×10^6 células/mL.

O baço foi retirado e transferido para uma placa de petri de 35 mm contendo 2 mL de RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, EUA) e, com o auxílio de duas pinças cirúrgicas estéreis foi macerado e mantido a 37°C durante 30 minutos. Após, foi filtrado utilizando um filtro de 0,22 micrometro e centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 2 mL numa solução de tampão de lise ACK (0,15M de NH₄CL, 10 mM de KHCO₃, 0,1Mm de EDTA) diluídos em H₂O e centrifugadas a 1500 rpm 4°C por 10 minutos; esta etapa com solução de lise foi repetida 2 vezes. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 100 microlitros de PBS para lavagem, que foram centrifugados novamente 1500 rpm 4°C durante 10 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 mL de RPMI. Foram realizadas as contagens das células com azul de tripan na câmara de Neubauer. Após a contagem de células, as amostras foram normalizadas para 1×10^6 células/mL.

Os linfonodos mesentéricos foram retirados, lavados com PBS e imediatamente colocados em meio RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino, 10.000U/mL de penicilina (Gibco, New York, EUA) e 10.000g/mL de streptomicina (Gibco, New York,EUA) e mantidos na estufa a 37°C por 30 minutos. As amostras foram maceradas com o êmbolo da seringa e filtradas em um filtro de 0,22µm para células (Cell strainer, BD Biosciences). Após, foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram ressuspensas com 1 mL de RPMI. As células foram contadas na câmara de Neubauer com azul de tripan e normalizadas para 1×10^6 células/mL.

4.12 Avaliação da população das células dendríticas do tecido pulmonar por citometria de fluxo

As seguintes populações de células dendríticas foram avaliadas CD11c⁺MHCII⁺CD11b⁻CD103⁺ e CD11c⁺MHCII⁺CD11b⁺CD103⁻. Após adquirir 1×10^6 células/mL, as células foram incubadas com os anticorpos monoclonais (Tabela 1), durante 30 minutos a 4°C, no escuro. Após a incubação as células foram ressuspensas em 100µL de tampão PBS com 2% de soro fetal bovino e centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado

cuidadosamente e o pellet foi ressuspenso em 100 µL de PBS. Os tubos foram mantidos no escuro, a 4°C, até o momento da aquisição. Foram adquiridos 100.000 eventos por amostra, que foram analisados em citômetro de fluxo BD FACSCanto II e com o software FlowJoTM7.6.1.

4.13 Avaliação da população de linfócitos T reguladores no tecido pulmonar, baço e linfonodos mesentéricos por citometria de fluxo

Após adquirir 1×10^6 células/mL, foram incubadas com Fc Block™ (BD Biosciences, CA, USA), para cada tubo foi adicionado 1 µL de FcBlock e as amostras permaneceram durante 40 minutos entre 2 a 8°C. Em seguida, foram adicionados os anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos marcadores de superfície (anti-CD4 e anti-CD25) por 10 minutos, no escuro. Após foram centrifugadas a 1500 rpm durante 8 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foram acrescentados 100µL de uma solução 1:3 (concentrado: diluente) de permeabilizante/fixador durante 20 minutos no escuro. Após a centrifugação, foi descartado o sobrenadante e acrescentado 100µL de uma solução buffer permeabilizante e 0,1µL do marcador intracelular anti-FOXP3 (TF eBioscience, CA, USA) durante 20 minutos no escuro e centrifugado a 1500 rpm por 8 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em 100µL de PBS e mantido em temperatura entre 2 a 8°C até a aquisição. Foram adquiridos 100.000 eventos por amostra, que foram analisadas em citômetro de fluxo BD FACSCanto II e com o software FlowJoTM7.6.1.

4.14 Avaliação dos receptores do tipo Toll (TLRs), receptores tipo NOD (NLRs) e receptores tipo lectina C (CLRs) no tecido pulmonar

A avaliação dos receptores TLR-9, NLRP3, Dectina-1 e Mincle foi realizada por PCR em tempo real (qPCR). O pulmão foi extraído, cortado em pequenos pedaços com auxílio de uma tesoura e pinças estéreis e mantido em RNA Later (Qiagen, Texas, EUA) no freezer a -80°C até o processamento da amostra.

4.14.1 Extração de RNA

Seguindo o protocolo do Kit comercial RNeasy®Mini Kit (Qiagen, NY, EUA) para a extração de RNA, em 0,30g de pulmão foram adicionados em 400µL de uma solução tampão RLT do kit, as amostras foram então processadas com um homogeneizador de tecido (OMNI(TH)-International-Kennesaw, GA, EUA) e centrifugadas a velocidade máxima durante 3 minutos. O sobrenadante foi coletado cuidadosamente e transferido para um eppendorf estéril de 1,5 mL; foram acrescentados 400 µL etanol a 70%. A solução foi homogeneizada com a pipeta e transferida para as colunas de Rneasy Mini Spim do kit. Os tubos contendo as colunas foram fechados e as amostras foram centrifugadas durante 15 segundos a 8000 x g. Posteriormente os sobrenadantes foram descartados e 350 µL de tampão RW1 foram adicionados a coluna. Após, foram centrifugados por 15 segundos a 8000 x g e os sobrenadantes descartados. Em seguida foram adicionados 500 µL de tampão RPE e foram centrifugadas durante 15 segundos a 8000 x g e os sobrenadantes descartados. Este procedimento foi repetido mais uma vez e após a centrifugação por 2 minutos as amostras foram transferidas para tubos estéreis de 1,5 mL. Para finalizar foram adicionadas 30 µL de água livre de RNases. As colunas foram centrifugadas durante 1 minuto a 8000 x g.

No mesmo dia da extração de RNA, o sobrenadante contendo o RNA foi quantificado e sua qualidade em relação a pureza foi avaliada por um espectrofotômetro (TM NanoDrop™, 2000) utilizando um volume de 2µL de cada amostra. Após obtidas as concentrações de RNA em ng/µL, a razões 260/280 e 260/230 foram avaliadas.

4.14.2 Síntese de cDNA

O DNA complementar foi preparado a partir de 1 µL de RNA extraído das amostras do tecido pulmonar. A síntese de cDNA foi realizada por transcrição reversa utilizando Random Primers, dNTP Mix e MultiScribe™ Reverse Transcriptase (Applied Biosystems, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A cada amostra foram adicionados 10µL do mix (2,0 µL de 10x RT Buffer; 0,8 µL de 25x dNTP Mix 100mM; 2,0 µL 10x Random Primers; 1,0 µL Reverse Transcriptase) e 4,2 µL de água livre RNA/DNA). As amostras foram incubadas em um termociclador T100™ Thermal cycler da Bio-Rad(BioRad Laboratories,USA) a 25°C por 10 minutos, 37°C durante 120 minutos, 85°C por 5 minutos e 4°C para parar a reação. Após

finalizada a reação, as amostras de cDNA foram quantificados utilizando o Nanodrop (TM NanoDrop™, 2000). As amostras de cDNA foram diluídas em água livre de RNA/DNA até atingir a concentração de 100ng/ µL.

Nas reações para síntese do cDNA, foram utilizados os seguintes controles: NT (no template) – tubo com todos reagentes do Mix para preparo do cDNA exceto a amostra de RNA; NRT (no reverse transcriptase) – tubo com todos os reagentes da síntese de cDNA incluindo a amostra (RNA) sem a transcriptase reversa; tubo Branco – tubo com 5 µL de água livre RNA/DNA e o primer de interesse.

4.14.3 Análise da Expressão gênica

A expressão dos genes TLR-9, NLRP3, Dectina-1 e Mincle foi quantificada por qPCR utilizando Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) no StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. As sequências dos primers utilizados encontram-se na Tabela 2. As condições da reação da qPCR foram: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C e 40 ciclos de 95°C a 15 segundos, 58°C a 30 segundos e 72°C a 30 segundos. O volume final de cada amostra foi de 12,5 µL. Nas reações para a qPCR os resultados foram analisados com base no valor de CT (do inglês *Cycle threshold*). O CT é o ponto que indica o número de ciclos onde a amplificação é detectada e permite a análise quantitativa da expressão do alvo a ser avaliado. Para a análise foi utilizada a formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, na qual $\Delta\Delta Ct$ é igual $\Delta\Delta Ct$ amostra - $\Delta\Delta Ct$ controle e $\Delta Ct = Ct$ gene alvo – Ct gene Hprt (gene de referência endógeno).

Tabela 2 - Sequências de primers utilizados para detectar e amplificar genes expressos no tecido pulmonar de camundongos Balb/c.

Primers	Sequências		TM
TLR9	F 5' PARA 3'	GGACCTACAGCAGAATAGCTCA	79.5°C
	R 5' PARA 3'	AACTCGGGAACCAGACATG	
NLRP3	F 5' para 3'	GTGGATGGGTTTGCTGGGAT	65,4°C
	R 5' para 3'	CCCACTCTCACCTAGACGC	
Mincle (Clec 4e)	F 5' para 3'	AGTGAGGCATCAGGTTCAGTCAAG	77.0°C
	R 5' para 3'	GACCAGGTCAAGGTTGTCGTAGAG	
Dectin-1 (Clec7A)	F 5' para 3'	GACTTCAGCACTCAAGACATCC	84.5°C
	R 5' para 3'	TTGTGTCGCCAAAATGCTAGG	
Hprt	F 5' para 3'	AACAAAGTCTGGCCTGTATCC	75.4°C
	R 5' para 3'	CCCCAAAATGGTTAAGGTTGC	

4.15 Avaliação de ácidos graxos de cadeia curta, média e longa

Os AGCC foram detectados por cromatografia gasosa empregando um detector de ionização em chama (FID, Flame ionization detector) de injeção líquida automática equipada com uma coluna capilar de sílica segundo a metodologia descrito por Zhao et al., com algumas modificações (Zhao, Nyman et al. 2006, Lu, Fan et al. 2016). O gás de arraste utilizado foi o gás hélio, com fluxo de 1,6ml/min com o objetivo de transportar a amostra pela coluna. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250°C. As análises de AGCC foram feitas utilizando uma coluna de Agilent 6890N GC. A quantificação dos AGCC das amostras foi determinada por uma curva padrão de AGCC contendo ácido acético, ácido propiônico, ácido isobutírico, ácido valérico e ácido metilbutírico previamente analisadas (Sigma, Supelco™ WSFA- 4 Mix 5ml). A coluna padrão para detecção e quantificação de AGCM e AGCL foi composta por um mix de ácidos graxos da Supelco (Supelco 37 Component FAME Mix), seguindo as orientações de Zhao *et al.* (113).

As amostras de fezes dos camundongos foram coletadas e armazenadas no freezer a – 80°C. No dia do processamento foram pesadas 500 mg de fezes e adicionados 2,5 ml de água Milli-Q. As fezes foram homogeneizadas com um homogeneizador (OMNI(TH)-International-Kennesaw, GA, EUA) por aproximadamente 2 minutos e foi medido o pH das amostras com

um auxílio de uma fita de pH (Macherey-Nagel, pH 0 a 14). Foram então adicionados HCL 5M para ajustar o pH das amostras entre 2 e 3. Após, as amostras foram mantidas em temperatura ambiente durante 10 minutos e posteriormente foram centrifugadas a 5000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi filtrado com o auxílio de um filtro de 0,22 micrometros (Cell Strainer, BD Biosciences, CA, EUA) acoplado a uma seringa de 5 mL. Após o filtrado foi transferido para um tubo transparente com capacidade de 200 microlitros pronto para ser inserido no cromatógrafo de gases GC-2014 (SHIMADZU, USA). Um microlitro de amostra foi injetado para análise dos AGCC, AGCM e AGCL foram realizadas no laboratório Nutrição e Metabolismo da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, sob orientação do Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior. Na Tabela-3 encontram-se os AGCC, AGCM e AGCL avaliados.

Tabela 3 - Nomenclatura dos ácidos graxos analisados por cromatografia gasosa (GC-2014)

Ácidos graxos	Simbologia	Nome comum
Acetic acid	C2:0	A. acético
Butyric acid	C4:0	A. butírico
Propionic acid	C3:0	A. propiônico
Methyl hexanoate 4 wt. %	C6:0	A. caprótico
Methyl octanoate 4 wt. %	C8:0	A. caprilico
Methyl decanoate 4 wt. %	C10:0	A. decanóico
Methyl undecanoate 2 wt. %	C11:0	A. hendecanóico
Methyl dodecanoate 4 wt. %	C12:0	A. láurico
Methyl tridecanoate 2 wt. %	C13:0	-
Methyl myristate 4 wt. %	C14:0	A. mirístico
Methyl myristoleate 2 wt. %	C14:1	A. miristoléico
Methyl pentadecanoate 2 wt. %	C15:0	A. pentadecílico
Methyl cis-10-pentadecenoate 2 wt. %	C15:1	-
Methyl palmitate 6 wt. %	C16:0	A. palmítico
Methyl palmitoleate 2 wt. %	C16:1	A. palmitoléico
Methyl heptadecanoate 2 wt. %	C17:0	A. margárico
Methyl cis-10-heptadecenoate 2 wt. %	C17:1	-
Methyl stearate 4 wt. %	C18:0	A. esteárico
Methyl oleate 4 wt. %	C18:1n9c	A. oléico
Methyl linoleate 2 wt. %	C18:2n6c	A. linoleico
Methyl γ-linolenate 2 wt. %	C18:3n6	A. alfa linolênico
Methyl linolenate 2 wt. %	C18:3n3	A. linolênico
Methyl tetracosanoate 4 wt. %	C20:0	A. araquídico

Ácidos graxos	Simbologia	Nome comum
Methyl heneicosanoate 2 wt. %	C20:1n9	A. gadoléico
cis-11-Eicosenoic acid methyl ester 2 wt. %	C20:2	-
cis-11,14,17-Eicosatrienoic acid methyl ester 2 wt. %	C20:3n6	A. di-homo-alfa-linolênico
cis-11,14-Eicosadienoic acid methyl ester 2 wt. %	C21:0	-
cis-8,11,14-Eicosatrienoic acid methyl ester 2 wt. %	C20:3n3	A. di-homo-gama-linolênico
Methyl arachidonate 2 wt. %	C20:4n6	A. araquidônico
cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid methyl ester 2 wt. %	C20:5n3	A. 5,8,11,14,17-eicosapentaenóico (EPA)
Methyl behenate 4 wt. %	C22:0	A. behênico
Methyl erucate 2 wt. %	C22:1n9	A. esteárico
cis-13,16-Docosadienoic acid methyl ester 2 wt. %	C22:2	-
Methyl tricosanoate 2 wt. %	C23:0	-
Methyl arachidate 4 wt. %	C24:0	A. lignocérico
Methyl cis-15-tetracosenoate 2 wt. %	C24:1n9	A. nervônico
cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid methyl ester 2 wt. %	C22:6n-3	DHA

4.16 Preparo do homogenato e dosagem de citocinas no intestino

A dosagem de citocinas intestinais foi realizada no íleo e ceco. O íleo e ceco foram retirados, o conteúdo fecal do intestino foi retirado e com o auxílio de uma seringa de 10 mL e uma agulha (25mm x 0,70mm), foi injetado salina estéril gelada para limpar e inflar o tecido completamente. O tecido foi gentilmente colocado em um papel filtro para retirar o excesso de líquido e foi medido uma régua. Para cada 1 cm de tecido foram adicionados 500µL de uma solução contendo inibidor de proteases (Complete EDTA-free, ROCHE). As amostras foram processadas utilizando um homogeneizador de tecido (OMNI(TH)-International-Kennesaw, GA, EUA). Após, foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando o programa de software *GraphPad Prism* versão 5.0. As variáveis categóricas foram expressas como porcentagem e as variáveis contínuas como média e desvio padrão. 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 e o teste de Tukey. Foi considerado significativo um valor de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Avaliação fenotípica da população de células dendríticas no tecido pulmonar

Na primeira etapa deste projeto, antes de iniciarmos o estudo nos camundongos nocautes para IL-17A, avaliamos a população de células dendríticas presentes no tecido pulmonar dos camundongos Balb/c.

A Figura 3 representa a estratégia de gate (Figuras 3A e 3B) e o número e a população fenotípica de células dendríticas estudadas no tecido pulmonar (Figuras 3C e 3D). Não houve diferença significativa no número de células $CD11c^{+}MHCII^{+}CD11b^{-}Cd103^{+}$ no tecido pulmonar dos camundongos Balb/c entre os grupos estudados (Figura 3C). Houve um aumento significativo no número de células $CD11c^{+}MHCII^{+}CD11b^{+}Cd103^{-}$ no grupo OVA/PBS em comparação com o grupo SAL/PBS ($p<0,001$). Adicionalmente, a administração de *S. cerevisiae* UFMG A-905 aumentou significativamente o número de células $CD11c^{+}MHCII^{+}CD11b^{+}Cd103^{-}$, no tecido pulmonar em comparação com o grupo OVA/PBS ($p<0,001$, Figura 3D).

Figura 3 – Avaliação fenotípica da população de células dendríticas: estratégia de gate (A), representação dos grupos (B), número de células CD11c⁺MHCII⁺CD11b⁺Cd103⁺ (C) e CD11c⁺MHCII⁺CD11b⁺Cd103⁻ (D) no tecido pulmonar de camundongos Balb/c. Os camundongos foram sensibilizados duas vezes com OVA I.P. com uma semana de intervalo, e desafiados com OVA I.N. diariamente por três dias consecutivos. Os camundongos receberam por gavagem a *S. cerevisiae* UFMG A-905 diariamente, dez dias antes da primeira sensibilização e durante todo o período de sensibilização e desafios. Os camundongos do grupo controle receberam somente salina ou PBS. Os pulmões foram coletados e analisados por citometria de fluxo (n = 8). **p<0,001

6.2 Avaliação de linfócitos T reguladores no pulmão e no baço

Para avaliar a porcentagem de linfócitos T reguladores, primeiramente avaliamos a população de células $CD4^+$ e após a população de células $CD25^+FOXP3^+$. A Figura 4 representa as estratégias de gate (Figuras 4A e 4B) e a porcentagem de linfócitos T reguladores no tecido pulmonar e baço (Figuras 4C e 4D).

Houve um aumento significativo na população de linfócitos T reguladores no tecido pulmonar dos camundongos tratados com *S. cerevisiae* UFMG A-905 quando comparado ao grupo OVA/PBS ($p < 0,05$, Figura 4C). A porcentagem de linfócitos T reguladores no baço não apresentou diferença significativa entre os grupos estudados.

Figura 4 - Avaliação de linfócitos T reguladores (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺); estratégia de gate (A), representação dos grupos estudados (B), porcentagem de linfócitos T reguladores no tecido pulmonar (C) e no baço (D) de camundongos Balb/c. Os camundongos foram sensibilizados duas vezes com OVA I.P. com uma semana de intervalo, e desafiados com OVA I.N, diariamente por três dias consecutivos. Os camundongos receberam por gavagem a *S. cerevisiae* UFMG A-905 diariamente, dez dias antes da primeira sensibilização e durante todo o período de sensibilização e desafios. Os camundongos do grupo controle receberam somente salina ou PBS. Os pulmões e o baço foram coletados e analisados por citometria de fluxo (n = 8) *p<0,05

6.3 Avaliação dos linfócitos T reguladores nos linfonodos mesentéricos

As figuras 5A e 5B mostram a estratégia de gate para análise dos linfócitos T reguladores nos linfonodos mesentéricos e a representação dos grupos estudados. A figura 5C mostra a porcentagem de linfócitos T reguladores nos linfonodos mesentéricos de camundongos Balb/c. A porcentagem de Tregs nos linfonodos mesentéricos não foi significativamente diferente entre os grupos estudados (Figura 5).

Figura 5 – Avaliação de linfócitos T reguladores (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺); estratégia de gate (A), representação dos grupos estudados (B), porcentagem de linfócitos T reguladores (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) nos linfonodos mesentéricos (C) de camundongos Balb/c. Os camundongos foram sensibilizados duas vezes com OVA I.P. com uma semana de intervalo, e desafiados com OVA I.N, diariamente por três dias consecutivos. Os camundongos receberam por gavagem a *S. cerevisiae* UFMG A-905 diariamente, dez dias antes da primeira sensibilização e durante todo o período de sensibilização e desafios. Os camundongos do grupo controle receberam somente salina ou PBS. Os linfonodos mesentéricos foram coletados e analisados por citometria de fluxo (n = 6).

6.4 Avaliação da expressão gênica dos receptores dos tipos Toll -9 (TLR-9), NLRP (NLRP3) e receptores do tipo lectina C (CLRs: Dectina-1 e Mincle) no tecido pulmonar

Houve uma diminuição significativa na expressão gênica do receptor tipo TLR-9 no grupo OVA/PBS em comparação com o grupo SAL/PBS ($p < 0,05$, Figura 6). Não houve alteração significativa na expressão TLR-9 entre os grupos OVA/PBS e OVA/Sac. A expressão gênica do receptor NLRP3 reduziu significativamente no grupo OVA/PBS quando comparado ao grupo SAL/PBS ($p < 0,05$, Figura 6). A administração de *S. cerevisiae* UFMG A-905 aumentou significativamente a expressão do receptor NLRP3 no tecido pulmonar, em relação ao grupo OVA/PBS ($p < 0,05$, Figura 6). A expressão gênica dos receptores Dectina -1 e Mincle não apresentou diferença significativa entre os grupos estudados.

Figura 6 - Expressão gênica dos receptores dos tipos TLR-9 (A), NLRP3 (B), DECTINA-1 (C), MINCLE (D) no tecido pulmonar. Os camundongos foram sensibilizados duas vezes com OVA I.P. com

uma semana de intervalo, e desafiados com OVA I.N. diariamente por três dias consecutivos. Os camundongos receberam por gavagem a *S. cerevisiae* UFMG A-905 diariamente, dez dias antes da primeira sensibilização e durante todo o período de sensibilização e desafios. Os camundongos do grupo controle receberam somente salina ou PBS. A expressão gênica foi feita por PCR em tempo real (n= 6 a 8). *p<0,05

6.5 Avaliação das citocinas IL-10, IL-13 e IL-17A no ceco e íleo

Não houve diferença significativa nos níveis de IL-10, IL-13 e IL-17A no ceco e íleo dos camundongos entre os grupos estudados (Figura 7).

Figura 7 - Dosagem das citocinas IL-10, IL-13 e IL-17 no ceco e íleo de camundongos Balb/c. Os camundongos foram sensibilizados duas vezes com OVA I.P. com uma semana de intervalo, e desafiados com OVA I.N, diariamente por três dias consecutivos. Os camundongos receberam por gavagem a *S. cerevisiae* UFMG A-905 diariamente, dez dias antes da primeira sensibilização e durante todo o período de sensibilização e desafios. Os camundongos do grupo controle receberam somente salina ou PBS. A dosagem de citocinas foi realizada por ELISA (n=6).

6.6 Avaliação da produção de ácidos graxos de cadeia curta

Os níveis de AGCC nas fezes dos camundongos Balb/c não apresentaram diferença significativa entre os grupos estudados (Figura 8).

Figura 8 - Porcentagem de acetato (A), butirato (B) e propionato (C) nas fezes de camundongos Balb/c. Os camundongos foram sensibilizados duas vezes com OVA I.P. com uma semana de intervalo, e desafiados com OVA I.N. diariamente por três dias consecutivos. Os camundongos receberam por gavagem a *S. cerevisiae* UFMG A-905 diariamente, dez dias antes da primeira sensibilização e durante todo o período de sensibilização e desafios. Os camundongos do grupo controle receberam somente salina ou PBS. A dosagem dos ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa (n=9).

6.7 Avaliação da produção de ácidos graxos de cadeia média e longa

Na figura 9 encontram-se as dosagens de ácidos graxos de cadeia média e longa. O ácido graxo dodecanoato apresentou uma redução significativa no grupo OVA/PBS quando comparado ao grupo SAL/PBS, e no grupo OVA/Sac em comparação com o grupo OVA/PBS ($p < 0,05$). Houve uma redução significativa na porcentagem do ácido graxo dihomo-gama linolênico no grupo OVA/PBS em comparação com o grupo SAL/PBS ($p < 0,05$). A

administração de *S. cerevisiae* UFMG A-905 restaurou significativamente a porcentagem de ácido graxo dihomo-gama linolênico quando comparado ao grupo OVA/PBS ($p<0,05$). A porcentagem de ácido graxo oleato no grupo OVA/PBS aumentou significativamente quando comparado ao grupo controle SAL/PBS ($p<0,001$) e diminuiu significativamente quando comparado ao grupo OVA/Sac ($p<0,001$). Não houve diferenças significativas nos ácidos graxos araquidônico, estearato e palmitato entre os grupos estudados.

Figura 9 - Porcentagem de dodecanoato (A); dihomo-gama-linolênico (B); oleato (C), araquidônico(D); estearato(E) e palmitato(F) nas fezes de camundongos Balb/c. Os camundongos foram sensibilizados duas vezes com OVA I.P. com uma semana de intervalo, e desafiados com OVA I.N. diariamente por três dias consecutivos. Os camundongos receberam por gavagem a *S. cerevisiae* UFMG A-905 diariamente, dez dias antes da primeira sensibilização e durante todo o período de sensibilização e desafios. Os camundongos do grupo controle receberam somente salina ou PBS. A dosagem dos ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa (n=6). * $p<0,05$; ** $p<0,001$

6.8 Número de células totais e diferenciais no lavado broncoalveolar de camundongos C57BL/6 selvagens e nocautes para IL-17A

Os camundongos C57BL/6 selvagens apresentaram um aumento significativo no número de células totais no grupo OVA/PBS comparado ao grupo SAL/PBS ($p<0,001$, Figura 10). Não houve diferença significativa no número de células totais nos camundongos C57BL/6 nocautes para IL-17A entre os grupos estudados (Figura 10).

Nos camundongos C57BL/6 selvagens, houve um aumento significativo no número de eosinófilos no grupo OVA/PBS quando comparado ao grupo SAL/PBS ($p<0,0001$, Figura 11). A administração de *S. cerevisiae* UFMG A-905 diminuiu significativamente o número de eosinófilos quando comparado ao grupo OVA/PBS ($p<0,05$, Figura 11). Nos camundongos C57BL/6 nocautes para IL-17A, não houve diferença significativa no número de células diferenciais entre os grupos estudados (Figura 11).

Figura 10 - Número de células totais no lavado broncoalveolar de camundongos selvagens (WT) e nocautes (IL-17^{-/-}) para IL-17A. Os camundongos foram sensibilizados duas vezes com OVA I.P. com uma semana de intervalo, e desafiados com OVA I.N. diariamente por três dias consecutivos. Os camundongos receberam por gavagem a *S. cerevisiae* UFMG A-905 diariamente, dez dias antes da primeira sensibilização e durante todo o período de sensibilização e desafios. Os camundongos do grupo controle receberam somente salina ou PBS (n=6). *** $p<0,001$

Figura 11 - Número de eosinófilos, macrófagos, linfócitos e neutrófilos no lavado broncoalveolar de camundongos selvagens (WT) e nocautes (IL-17^{-/-}) para IL-17A. Os camundongos foram sensibilizados duas vezes com OVA I.P. com uma semana de intervalo, e desafiados com OVA I.N. diariamente por três dias consecutivos. Os camundongos receberam por gavagem a *S. cerevisiae* UFMG A-905 diariamente, dez dias antes da primeira sensibilização e durante todo o período de sensibilização e desafios. Os camundongos do grupo controle receberam somente salina ou PBS (n=8). *p<0,05; ****p<0,0001

6.9 Dosagem das citocinas IL-10 e IL-13 no homogenato pulmonar dos camundongos C57BL/6 selvagens e nocautes para IL-17A

Não houve diferença significativa nos níveis de IL-10 no homogenato pulmonar entre os grupos estudados, em camundongos selvagens e nocautes para IL-17A. Houve uma redução significativa nos níveis de IL-13 entre os grupos OVA/PBS e OVA/Sac em camundongos selvagens ($p < 0,05$). No entanto, esta diferença nos níveis de IL-13 entre os grupos OVA/PBS e OVA/Sac, não foi observada em camundongos nocautes para IL-17A.

Figura 12 - Níveis de IL-10 e IL-13 no tecido pulmonar de camundongos selvagens (WT) e nocautes (IL-17^{-/-}) para IL-17. Os camundongos foram sensibilizados duas vezes com OVA I.P. com uma semana de intervalo, e desafiados com OVA I.N. diariamente por três dias consecutivos. Os camundongos receberam por gavagem a *S. cerevisiae* UFMG A-905 diariamente, dez dias antes da primeira sensibilização e durante todo o período de sensibilização e desafios. Os camundongos do grupo controle receberam somente salina ou PBS (n=6). * $p < 0,05$

6.10 Avaliação de IgE OVA específica nos camundongos C57BL/6 selvagens e nocautes para IL-17A

Houve um aumento significativo nos níveis de IgE OVA específica no grupo OVA/PBS quando comparado ao grupo SAL/PBS nos camundongos selvagens (WT) e nos camundongos nocautes (IL-17^{-/-}) para IL-17A ($p < 0,001$, Figura 13). Entretanto, a administração de *S. cerevisiae* UFMG A-905 não alterou significativamente os níveis de IgE OVA específica entre os camundongos selvagens (WT) e nocautes (IL-17^{-/-}) para IL-17A.

Figura 13 - Níveis de IgE OVA específica no soro de camundongos selvagens (WT) e nocautes (IL-17^{-/-}) para IL-17A. Os camundongos foram sensibilizados duas vezes com OVA I.P., com uma semana de intervalo, e desafiados com OVA I.N., diariamente por três dias consecutivos. Os camundongos receberam por gavagem a *S. cerevisiae* UFMG A-905 diariamente, dez dias antes da primeira sensibilização e durante todo o período de sensibilização e desafios. Os camundongos do grupo controle receberam apenas salina ou PBS (n=4). *** $p < 0,001$

6.11 Número de células totais e diferenciais no lavado broncoalveolar de camundongos C57BL/6 que receberam o posbiótico de *S. cerevisiae* UFMG A-905.

Houve um aumento significativo no número de células totais ($p < 0,001$, Figura 14), eosinófilos ($p < 0,0001$, Figura 15) e linfócitos ($p < 0,01$, Figura 15) no grupo OVA/PBS quando comparado ao grupo controle (SAL/PBS). A administração do posbiótico de *S. cerevisiae* UFMG A-905 não alterou significativamente o número de células totais e diferenciais.

Figura 14 - Número total de células no lavado broncoalveolar dos camundongos que receberam o posbiótico da *S. cerevisiae* UFMG A-905. Os camundongos foram sensibilizados duas vezes com OVA I.P., com uma semana de intervalo, e desafiados com OVA I.N. diariamente por três dias consecutivos. Os camundongos receberam por gavagem o sobrenadante da cultura de *S. cerevisiae* UFMG A-905 diariamente, dez dias antes da primeira sensibilização e durante todo o período de sensibilização e desafios. Os camundongos do grupo controle receberam apenas salina ou PBS (n=5).

Figura 15 - Número de eosinófilos, macrófagos, linfócitos e neutrófilos no lavado broncoalveolar de camundongos C57BL/6 que receberam o posbiótico da *S. cerevisiae* UFMG A-905. Os camundongos foram sensibilizados duas vezes com OVA I.P. com uma semana de intervalo, e desafiados com OVA I.N. diariamente por três dias consecutivos. Os camundongos receberam o posbiótico diariamente, dez dias antes da primeira sensibilização e durante todo o período de sensibilização e desafios. Os camundongos do grupo controle receberam somente salina ou PBS (n=5). ** P<0,01; **** p<0,0001

7 DISCUSSÃO

No presente estudo nós avaliamos os possíveis mecanismos de ação da *S. cerevisiae* UFMG A-905 na prevenção da asma usando camundongos Balb/c, C57BL/6 selvagens e nocautes sensibilizados e desafiados com OVA. A administração da *S. cerevisiae* UFMG A-905 aumentou a porcentagem de células dendríticas e de linfócitos T reguladores e a expressão do receptor NLRP3 no tecido pulmonar, e aumentou a porcentagem do ácido graxo dihomo-gama-linolênico. Adicionalmente, seus efeitos foram parcialmente dependentes de IL-17A.

Previamente, no meu mestrado, nós demonstramos que a administração da *S. cerevisiae* UFMG A-905 atenuou as principais características da asma, tais como, diminuiu o número de células totais e eosinófilos no LBA e as células inflamatórias no parênquima pulmonar; reduziu a hiper-responsividade brônquica; diminuiu os níveis das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13; e aumentou os níveis de IL-10 e IL-17A. Porém, os mecanismos de ação da *S. cerevisiae* UFMG A-905 não foram desvendados.

Assim, considerando que os probióticos podem exercer seus efeitos por diferentes mecanismos de ação e que muitas vezes um probiótico pode agir em mais de um mecanismo de ação, esse estudo visa fazer uma triagem dos principais mecanismos de ação em que a *S. cerevisiae* UFMG A-905 possa atuar.

Estudos prévios demonstraram que os mecanismos de ação dos probióticos são múltiplos e podem estar relacionados à produção de IgA, substâncias antibactericidas e metabólitos; ligação a patógenos; redução de translocação bacteriana; produção de ácidos graxos e a modulação do sistema imune (91).

Muitos estudos que utilizaram probióticos relacionaram seus efeitos a mais de um mecanismo envolvido. Além do probiótico, *per se*, seus mecanismo de ação podem depender da linhagem e idade dos animais utilizados; da dose, do tempo e via de administração; do momento das análises; e da microbiota intestinal (91, 108).

Estudos em camundongos germ-free e camundongos SPF (do inglês, specific pathogen free) que avaliaram a resposta inflamatória nas vias aéreas à OVA, demonstraram a importância da microbiota intestinal no desenvolvimento da resposta imune. A resposta alérgica mostrou-se exagerada nos camundongos germ-free quando comparada aos camundongos SPF, e esta intensa resposta foi revertida pela transferência da microbiota intestinal dos camundongos SPF para o germ-free nos primeiros anos de vida (114).

Adicionalmente, estudos recentes mostraram a relação da microbiota das vias aéreas pulmonares com o desenvolvimento de doenças respiratórias (114, 115).

Assim, o contato na infância com diversos micro-organismos, tais como probióticos, pode auxiliar no desenvolvimento do sistema imune e na composição da microbiota intestinal, conferindo um efeito protetor contra o desenvolvimento de doenças alérgicas.

Os probióticos mais estudados são os *Lactobacillus* spp e *Bifidobacterium* spp, entretanto bactérias como *E. coli*, *Enterococcus* spp e fungos como *Saccharomyces* vêm sendo estudados. Em nosso conhecimento, até o momento nenhum estudo avaliou os mecanismos de ação da *S. cerevisiae* UFMG A-905 na prevenção da asma.

7.1 A população das células dendríticas

Na primeira parte deste estudo, avaliamos a população fenotípica de células dendríticas no tecido pulmonar. No pulmão há basicamente duas populações de células dendríticas CD11b⁺ e CD103⁺ (50, 116). A população de cDs CD103⁺CD11b⁺ é responsável pela apresentação de antígenos a linfócitos TCD8⁺ e pode induzir as respostas Th1 e Th17 (51). As células cDs CD103⁺CD11b⁺ foram associadas a células estimuladoras de quimiocinas e citocinas principalmente sob inflamação alérgica induzindo padrão de resposta Th2 e Treg (51). Um estudo recente classificou as cDs (CD103⁺CD11b⁺) como sendo CD24⁺ (CD11b⁺CD24⁺) e neste novo fenótipo foi associado com um padrão de resposta do tipo Th17 em resposta ao desafio com *Aspergillus fumigatus* (117).

Nós observamos que a administração da *S. cerevisiae* UFMG A-905 aumentou a população fenotípica de células dendríticas CD11c⁺MHCII⁺CD11b⁺Cd103⁺. O papel do fenótipo CD11c⁺MHCII⁺CD11b⁺Cd103⁺ ainda não está muito claro no pulmão. O aumento das células dendríticas de fenótipo CD11c⁺MHCII⁺CD11b⁺Cd103⁺ no grupo OVA/PBS sugere que o estímulo dado pela OVA e o microambiente pulmonar induziram as células dendríticas e seus receptores a estimular um padrão de resposta Th2 característico da asma. O aumento deste fenótipo de células dendríticas no grupo OVA/Sac, comparado ao grupo OVA/PBS, pode estar relacionado ao estímulo da *S. cerevisiae* UFMG A-905 no intestino. O aumento do fenótipo de célula dendríticas CD11c⁺MHCII⁺CD11b⁺Cd103⁺ pela administração de uma levedura pode ter estimulado um padrão de resposta Th17 no intestino, órgão no qual a *S. cerevisiae* UFMG A-905 foi reconhecida e apresentada aos linfócitos T.

As células dendríticas possuem receptores que são estimulados pelo microambiente em sua volta e pelo estímulo recebido. No pulmão ao capturar o antígeno as células dendríticas migram para os linfonodos mediastinais para apresentar o antígeno aos linfócitos T e inicia-se o desenvolvimento de uma resposta imunológica que pode ser do tipo Th1, Th2, Th17 e T reguladora. Muitas variáveis como a microbiota, dieta, as citocinas presentes no microambiente, e a genética ditam a relação do sistema imune com o hospedeiro e interferem no fenótipo e na ação das células dendríticas. A ausência do antígeno pode fazer com que estas células permaneçam imaturas, apenas mantendo a homeostase do tecido. Existem poucos estudos que avaliaram o papel das diferentes células fagocíticas pulmonares, contudo há muito a ser desvendado nos mecanismos das células dendríticas (48).

Estudos em camundongos C57BL/6 e Balb/c infectados com *M. tuberculosis* demonstraram que a genética dos camundongos C57BL/6 e Balb/c interferiram na frequência de células dendríticas CD11c⁺MHCII⁺CD11b⁻CD103⁺ e CD11c⁺MHCII⁺CD11b⁺CD103⁻ no pulmão. Os camundongos Balb/c apresentaram uma frequência maior de CD11c⁺MHCII⁺CD11b⁺CD103⁻ quando comparado aos camundongos C57BL/6. Adicionalmente a cultura celular de linfócitos TCD4⁺ com células dendríticas CD11c⁺MHCII⁺CD11b⁻CD103⁺ produziram citocinas que estimularam respostas do tipo Th1 e Th17; já a cultura de linfócitos TCD4⁺ com células dendríticas CD11c⁺MHCII⁺CD11b⁺CD103⁻ estimularam um padrão de resposta do tipo Th2 e T reguladora (116).

Notavelmente, é fundamental o papel das células dendríticas no desenvolvimento das respostas imunológicas. Deste modo, o reconhecimento da *S. cerevisiae* UFMG A-905 no intestino pode ter induzido a um padrão Th17, que tem papel importante na defesa do nosso organismo contra patógenos, como bactérias e fungos (118).

Devido ao tempo prolongado de administração do probiótico, pode ter ocorrido também uma resposta de tolerância pelo estímulo da *S. cerevisiae* UFMG A-905 nas células dendríticas intestinais. Mudanças no ambiente intestinal, relacionadas ao estímulo de Th17 e de células T reguladoras, podem ter levado a uma plasticidade do sistema imune (119). Outra possibilidade pode ser decorrente a um aumento nos níveis IgA, induzido pela *S. cerevisiae* UFMG A-905. *Martins et al.* demonstraram que administração da *S. cerevisiae* UFMG A-905 durante dez dias aumentou os níveis de IgA no intestino e no soro de camundongos gnotobióticos (120).

7.2 A população dos linfócitos T reguladores (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺)

Em um estudo prévio, a administração da *S. cerevisiae* UFMG A-905 aumentou os níveis da citocina IL-10 em um modelo experimental de asma (121). Nossos resultados demonstraram que a administração da *S. cerevisiae* UFMG A-905 aumentou o número de células Tregs (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) no pulmão. Considerando que as Tregs são um dos principais produtores de IL-10 e que a *S. cerevisiae* UFMG A-905 restaurou os níveis da citocina IL-10, nos hipotetizamos que o aumento de Tregs pode estar vinculado ao aumento nos níveis da citocina IL-10 no tecido pulmonar.

Um dos mecanismos de ação mais observados nos probióticos está relacionado com o recrutamento de linfócitos Tregs. *Macsharry et al.* demonstraram que a administração oral de *B. longum* inibiu a reação alérgica nas vias aéreas pelo estímulo de linfócitos Tregs (122). *Karimi et al.*, em um estudo utilizando *L. reuteri*, demonstraram um aumento de Tregs no baço e linfonodos mediastinais após nove dias de tratamento (123).

Nossos achados corroboram com esses estudos, entretanto não detectamos um aumento de linfócitos T reguladores no baço e nos linfonodos mesentéricos. Uma das possíveis explicações pode ser o momento em que fizemos a avaliação, ou seja, como a *S. cerevisiae* UFMG A-905 foi administrada por 37 dias, um eventual momento de Tregs no baço e linfonodos mesentéricos pode ter ocorrido no início da administração. Mais estudos são necessários para avaliar a cinética dos linfócitos T reguladores e resposta aos probióticos. Outra possibilidade é o fato de que a *S. cerevisiae* UFMG A-905 não causou um processo inflamatório intestinal e, para a manutenção da resposta de T reguladora, é preciso haver um estímulo contínuo de um alérgeno ou agente estranho ao organismo que estimule o sistema imunológico (29). Assim, o tempo de exposição do trato gastrointestinal a presença da *S. cerevisiae* UFMG A-905 e ausência de dano provocado pela *S. cerevisiae* UFMG A-905 podem ter promovido um ambiente homeostático.

7.3 A expressão dos receptores tipos Toll, receptores do tipo NLRP e receptores do tipo lectina C no tecido pulmonar

A interação no eixo pulmão-intestino envolve além do sistema imune de mucosa, a microbiota intestinal e a microbiota pulmonar. Entre as inúmeras participações na homeostasia do organismo, esses micro-organismos são reconhecidos pelos receptores-padrão. Os principais receptores avaliados neste estudo foram os receptores do tipo toll like, do tipo NLR e receptores do tipo lectina C.

A administração da *S. cerevisiae* UFMG A-905 aumentou a expressão do receptor NLRP3 no tecido pulmonar, porém não houve alteração significativa na expressão dos receptores TLR-9, Mincle e Dectina-1 no tecido pulmonar. O NLRP3 é um complexo de multiproteínas presente no citoplasma da célula ativado por PAMPs, DAMPs e outros componentes. A sua sinalização leva a clivagem de pró IL-1 β e pró IL-18 inativas em IL-1 β e IL-18 ativas e Caspase -1, estimulando resposta pro-inflamatórias.

Os fungos apresentam uma cadeia curta de polímeros de glicose em sua parede celular mais conhecida como β -glucan, que estimula a imunidade inata (124). Neutrófilos e macrófagos são as principais células do sistema imune inato e fazem parte da primeira linha de defesa do organismo. Sabe-se que a *Candida albicans* e *S. cerevisiae* estimulam a expressão do receptor padrão NLRP3 via SyK (96). Nossa hipótese é que o aumento da expressão de NLRP3 pode estar sendo estimulado pela presença da levedura potencializando as células da imunidade inata e aumentando a fagocitose (125).

Che Chung et al. demonstraram que a administração do probiótico *E. faecalis* inativada modulou a expressão de NLRP3 no câncer de colón retal associada a uma colite. Há evidências que NLRP3 estimula citocinas pro-inflamatórias na patologia da colite (126). O aumento de NLRP3 em nosso estudo pode estar relacionado à resposta do tipo padrão Th17. Como mencionado anteriormente, as citocinas IL-6 e TGF-beta promovem diferenciação de Th17, pela ativação de STAT3, e indução de IL-23R. Durante a diferenciação de células Th17, a citocina IL-6 pode estimular IL-1R1 que aumentam a proliferação dessas células através da ligação com IL-1 β (127). Assim o aumento da expressão de NLRP3 pela administração da *S. cerevisiae* UFMG A-905 pode contribuir com a expansão dessas células devido a produção de IL-1 β estimulada pelo receptor NLRP3 (128).

7.4 A produção de ácidos graxos de cadeia curta, média e longa

No nosso estudo avaliamos os níveis de acetato, butirato e propionato nas fezes de camundongos e não foram observadas alterações na porcentagem de AGCC entre os grupos estudados. Os ácidos graxos são afetados pela dieta, pelo tipo e número de micro-organismo presente no intestino e pelo tempo de transito no qual os substratos acessíveis para fermentação são esgotados (130). Scheneider et al. observaram em um estudo que a *S. boulardii* quando administrada a pacientes que fazem uso de nutrição enteral de longo prazo aumentou a concentração de butirato e a concentração de ácido graxos totais nas fezes (131).

Adicionalmente a quantificação de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes, avaliamos a produção de ácidos graxos de cadeia media e longa, dentre eles os ácidos graxos ômega 3 e ômega 6. Na literatura há uma relação de efeito protetivo desses ácidos graxos em prevenir doenças, principalmente as doenças relacionadas ao sistema circulatório (132). Além disso, esses ácidos graxos estão envolvidos em vias metabólicas que estimulam a produção de substâncias que podem modular a resposta imune como as prostaglandinas. Entre os ácidos graxos estudados nesse estudo, a administração da *S. cerevisiae* UFMG A-905 diminuiu significativamente os ácidos graxos dodecanoato e o oleato e aumentou significativamente o ácido dihomo-gama linolênico. Contudo não houve diferença entre os grupos estudados na porcentagem dos ácidos araquidônico, estearato e palmitato.

O ácido graxo dodecanoato (ou o ácido láurico) é utilizado por sua função antibactericida, pois altera o pH do meio reduzindo o crescimento e a colonização de bactérias (133, 134). O ácido graxo oleato estimula o processo de fagocitose do sistema imune. Assim, a administração de ácido oleico na dieta auxilia o sistema imune na eliminação de patógenos como fungos e bactérias pela interferência de células da imunidade inata (135).

O aumento significativo do ácido graxo dihomo-gama linolênico pode estar relacionado com a regulação do sistema imune. O ácido dihomo-gama linolênico e o ácido araquidônico são substratos da enzima COX (ciclooxigenase). A metabolização de ambos ácidos formam metabólitos bioativos conhecidos como prostaglandinas 1 (associadas a processo inflamatórios) e prostaglandinas 2 (associadas estímulos anti-inflamatórios). O ácido graxo dihomo-gama linolênico é um precursor de prostaglandinas 1 (136), já o ácido araquidônico

de prostaglandina 2. O ácido graxo dihomo-gama linolênico é dessaturado pela enzima delta 5 dessaturase em ácido araquidônico, no entanto a atividade da enzima delta 5 dessaturase é limitada, deste modo, diminui a produção do ácido araquidônico e acumula o ácido graxo dihomo-gama linolênico nas células. O aumento de ácido graxo dihomo-gama linolênico comparado com o ácido araquidônico é capaz de atenuar a biossíntese dos metabólitos do ácido araquidônico, tais como, PG2, leucotrienos, fator de ativação de plaquetas, exercendo um efeito anti-inflamatório (136, 137). No estudo realizado por *Eva et al.* a prostaglandina E₂ inibiu a quimiotaxia de eosinófilos na asma exercendo um efeito protetivo na alergia (138).

Em nosso estudo, de forma inédita, observamos que a *S. cerevisiae* UFMG A-905 aumentou a porcentagem do ácido dihomo-gama linolênico e, conseqüentemente, pode ter estimulado prostaglandinas 1. Assim, a produção de prostaglandinas 1 pode ser também um dos mecanismos de ação da *S. cerevisiae* UFMG A-905.

7.5 A inflamação intestinal

Os probióticos podem alterar o sistema imune de mucosa pela modulação de citocinas intestinais inflamatórias (101). Em nosso estudo, nós avaliamos IL-10, IL-13 e IL-17A e não detectamos alterações no ceco e íleo. Estes resultados podem estar relacionado a um equilíbrio da resposta Th17 e T reguladora presente no intestino e a ausência de uma infecção, visto que a *S. cerevisiae* UFMG A-905 não ocasiona dano ao intestino (101). Outra possibilidade foi o momento em que as análises foram feitas. *Tiago et al.* em um modelo experimental de colite ulcerativa aguda demonstraram que a *S. cerevisiae* UFMG A-905 reduziu o nível da citocina IFN- γ no cólon dos camundongos (101). Embora as citocinas avaliadas no nosso estudo sejam diferentes, o mesmo probiótico foi utilizado em ambos os estudos e os achados não corroboram com o nosso estudo, pois não houve alteração nos níveis de citocinas no intestino com a administração da *S. cerevisiae* UFMG A-905, este fato pode estar associado ao fato de não haver um processo inflamatório instalado.

7.6 O papel de IL-17A nos mecanismos de ação da *S. cerevisiae* UFMG A-905

Baseado nesses achados, utilizamos camundongos nocautes para IL-17A para avaliarmos a sua participação no mecanismo da *S. cerevisiae* UFMG A-905. A administração da *S. cerevisiae* UFMG A-905 em camundongos C57BL/6 selvagens reduziram significativamente o número de eosinófilos e os níveis de IL-13. Já em camundongos nocautes para IL-17A, a administração da *S. cerevisiae* UFMG A-905 não reduziu o número de eosinófilos e os níveis de IL-13. Assim, podemos sugerir que os efeitos da *S. cerevisiae* UFMG A-905 são parcialmente dependentes de IL-17A, ou seja, esses dados corroboram com a nossa hipótese do papel da resposta Th17 estimulada pela *S. cerevisiae* UFMG A-905 na diminuição das principais características da asma.

7.7 O efeito posbiótico da *S. cerevisiae* UFMG A-905;

Por fim, avaliamos o efeito do posbiótico gerado pela *S. cerevisiae* UFMG A-905 na prevenção da asma. Posbiótico são componentes bioativos gerados da fermentação de micro-organismos, tais como metabólitos, ácidos graxos de cadeia curta, fração celular

microbiana, proteínas funcionais, entre outros. A interação do produto microbiano e o hospedeiro pode desencadear uma ativação e/ou modulação do sistema imune, a depender como o componente é utilizado e a forma como foi processado (109). *Buts et al.* mostraram a capacidade da *S. boulardii* em liberar uma proteína capaz de inibir os efeitos de endotoxinas de *E. coli* (139).

A administração do posbiótico gerado pela *S. cerevisiae* UFMG A-905 não alterou o número de células totais e células diferenciais entre os grupos estudados. Pode ser que a dose administrada do sobrenadante (posbiótico) não tenha ocasionado um efeito e/ou o tempo o qual o sobrenadante ficou em contato com a *S. cerevisiae* UFMG A-905 não tenha sido efetivo para captarmos uma concentração maior de substância anti-inflamatória. Outra explicação é que se o posbiótico for uma proteína, a depender do seu peso molecular, ela pode ser centrifugada juntamente com a *S. cerevisiae* UFMG A-905. Por fim, a *S. cerevisiae* UFMG A-905 pode também não ser capaz de produzir um posbiótico com características anti-inflamatórias.

8 LIMITAÇÕES DESTE TRABALHO

O estudo realizado apresentou algumas limitações decorrente do atual momento no qual estamos vivendo, a pandemia ocasionada pelo Sars-Cov-2. Experimentos em andamento precisaram ser postergados, tais como, à avaliação de camundongos nocautes para IL-6; técnica de Western Blot para quantificação de STAT3 precisam ser finalizadas; imunohistoquímica para TGF-beta; avaliação dos ácidos graxos de cadeia curta no soro dos camundongos. Adicionalmente, houve limitações no momento da avaliação das dosagens de citocinas, poderíamos ter avaliado em momentos diferentes, tais como, antes da sensibilização, durante e após a administração da *S. cerevisiae* UFMG A-905.

9 SÍNTESE DOS RESULTADOS

Em um modelo animal de asma, a administração da *S. cerevisiae* UFMG A-905

- Aumentou a porcentagem das células dendríticas de fenótipo CD11c⁺MHCII⁺CD11b⁺CD103⁻ no tecido pulmonar;
- Aumentou a porcentagem de linfócitos T reguladores CD4⁺ CD25⁺FOXP3⁺ no tecido pulmonar;
- Aumentou a expressão do receptor NLRP3 no tecido pulmonar;
- Não alterou a produção de ácidos graxos de cadeia curta;
- Aumentou a porcentagem do ácido graxo dihomogama-linolênico nas fezes;
- Exerceu seus efeitos parcialmente dependente de IL-17A;
- Não produziu um posbiótico com ações anti-inflamatórias.

10 CONCLUSÃO

A administração do probiótico *S. cerevisiae* UFMG A-905 diminuiu as principais características da asma; desviou a resposta imune para um padrão Th17; aumentou a porcentagem de células dendríticas CD11c⁺MHCII⁺CD11b⁺CD103⁻ e de linfócitos T reguladores e a expressão de NLRP3 no tecido pulmonar; e aumentou a produção de ácidos graxos de cadeia longa. Adicionalmente, os mecanismos de ação da *S. cerevisiae* UFMG A-905 foram parcialmente dependentes de IL-17A. Nossos achados reforçam a importância do eixo-intestino-pulmão nas doenças alérgicas.

REFERÊNCIAS

1. Global Inactive Strategy of asthma Mannagement and Prevention (GINA) 2018. 2018. p. 160.
2. Olin JT, Wechsler ME. Asthma: pathogenesis and novel drugs for treatment. *BMJ*. 2014;349:g5517.
3. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. 2021. p. 215.
4. Collaborators GDal. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*. 2020;396(10258):1204-22.
5. 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.
6. 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.
7. Papi A, Brightling C, Pedersen SE, Reddel HK. Asthma. *Lancet*. 2018;391(10122):783-800.
8. "Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary." E.D. Bateman, S.S. Hurd, P.J. Barnes, J. Bousquet, J.M. Drazen, J.M. FitzGerald, P. Gibson, K. Ohta, P. O'Byrne, S.E. Pedersen, E. Pizzichini, S.D. Sullivan, S.E. Wenzel and H.J. Zar. *Eur Respir J*. 2018;51(2).
9. Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Eur Respir J*. 1998;12(2):315-35.
10. 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). *J Asthma*. 1999;36(2):205-12.
11. [IV Brazilian Guidelines for the management of asthma]. *J Bras Pneumol*. 2006;32 Suppl 7:S447-S74.
12. Cardoso TA, Roncada C, Silva ERD, Pinto LA, Jones MH, Stein RT, 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.
13. 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.
14. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. National Heart, Lung, and Blood Institute; National Institutes of Health; World Health Organization; 2009.
15. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(33):14691-6.
16. Trompette A, Gollwitzer ES, Yadava K, Sichelstiel AK, Sprenger N, Ngom-Bru C, et al. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat Med*. 2014;20(2):159-66.

17. Bach JF. The hygiene hypothesis in autoimmunity: the role of pathogens and commensals. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(2):105-20.
18. Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barneon G, Ghavanian N, Enander I, et al. Eosinophilic inflammation in asthma. *NEnglJMed.* 1990;323(15):1033-9.
19. 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.
20. 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.
21. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Global Initiative for Asthma(GINA)2006. 2006.
22. Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *ClinExpAllergy.* 2008;38(6):872-97.
23. Georas SN, Guo J, De Fanis U, Casolaro V. T-helper cell type-2 regulation in allergic disease. *Eur Respir J.* 2005;26(6):1119-37.
24. Del Prete G. Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy. *Allergy.* 1992;47(5):450-5.
25. Besnard AG, Togbe D, Guillou N, Erard F, Quesniaux V, Ryffel B. IL-33-activated dendritic cells are critical for allergic airway inflammation. *Eur J Immunol.* 2011;41(6):1675-86.
26. Lee JU, Chang HS, Lee HJ, Jung CA, Bae DJ, Song HJ, et al. Upregulation of interleukin-33 and thymic stromal lymphopoietin levels in the lungs of idiopathic pulmonary fibrosis. *BMC Pulm Med.* 2017;17(1):39.
27. Pavón-Romero GF, Serrano-Pérez NH, García-Sánchez L, Ramírez-Jiménez F, Terán LM. Neuroimmune Pathophysiology in Asthma. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:663535.
28. Ryanna K, Stratigou V, Safinia N, Hawrylowicz C. Regulatory T cells in bronchial asthma. *Allergy.* 2009;64(3):335-47.
29. Martín-Orozco E, Norte-Muñoz M, Martínez-García J. Regulatory T Cells in Allergy and Asthma. *Front Pediatr.* 2017;5:117.
30. Ostroukhova M, Seguin-Devaux C, Oriss TB, Dixon-McCarthy B, Yang L, Ameredes BT, et al. Tolerance induced by inhaled antigen involves CD4(+) T cells expressing membrane-bound TGF-beta and FOXP3. *J Clin Invest.* 2004;114(1):28-38.
31. Holt PG, Strickland DH, Wikstrom ME, Jahnsen FL. Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(2):142-52.
32. Lloyd CM, Hawrylowicz CM. Regulatory T cells in asthma. *Immunity.* 2009;31(3):438-49.
33. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(7):490-500.

34. McGee HS, Agrawal DK. Naturally occurring and inducible T-regulatory cells modulating immune response in allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180(3):211-25.
35. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*. 1998;188(2):287-96.
36. Athari SS. Targeting cell signaling in allergic asthma. *Signal Transduct Target Ther*. 2019;4:45.
37. Commins S, Steinke JW, Borish L. The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121(5):1108-11.
38. Maynard CL, Harrington LE, Janowski KM, Oliver JR, Zindl CL, Rudensky AY, et al. Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3+ and Foxp3- precursor cells in the absence of interleukin 10. *Nat Immunol*. 2007;8(9):931-41.
39. Joetham A, Takeda K, Takada K, Taube C, Miyahara N, Matsubara S, et al. Naturally occurring lung CD4(+)CD25(+) T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF-beta. *J Immunol*. 2007;178(3):1433-42.
40. Smits HH, Engering A, van der Kleij D, de Jong EC, Schipper K, van Capel TMM, et al. Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115(6):1260-7.
41. Kearley J, Barker JE, Robinson DS, Lloyd CM. Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *J Exp Med*. 2005;202(11):1539-47.
42. Sun J, Madan R, Karp CL, Braciale TJ. Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10. *Nat Med*. 2009;15(3):277-84.
43. Borish L, Aarons A, Rumbyrt J, Cvietusa P, Negri J, Wenzel S. Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1996;97(6):1288-96.
44. Niers LEM, Timmerman HM, Rijkers GT, van Bleek GM, van Uden NOP, Knol EF, et al. Identification of strong interleukin-10 inducing lactic acid bacteria which down-regulate T helper type 2 cytokines. *Clin Exp Allergy*. 2005;35(11):1481-9.
45. Feleszko W, Jaworska J, Rha RD, Steinhausen S, Avagyan A, Jaudszus A, et al. Probiotic-induced suppression of allergic sensitization and airway inflammation is associated with an increase of T regulatory-dependent mechanisms in a murine model of asthma. *Clin Exp Allergy*. 2007;37(4):498-505.
46. Karimi K, Inman MD, Bienenstock J, Forsythe P. *Lactobacillus reuteri*-induced Regulatory T cells Protect against an Allergic Airway Response in Mice. *Am J Resp Crit Care*. 2009;179(3):186-93.
47. Saito A, Horie M, Nagase T. TGF- β Signaling in Lung Health and Disease. *Int J Mol Sci*. 2018;19(8).
48. Hoffmann FM, Berger JL, Lingel I, Laumonnier Y, Lewkowich IP, Schmutte I, et al. Distribution and Interaction of Murine Pulmonary Phagocytes in the Naive and Allergic Lung. *Front Immunol*. 2018;9:1046.

49. Conejero L, Khouili SC, Martínez-Cano S, Izquierdo HM, Brandi P, Sancho D. Lung CD103+ dendritic cells restrain allergic airway inflammation through IL-12 production. *JCI Insight*. 2017;2(10).
50. Nakano H, Free ME, Whitehead GS, Maruoka S, Wilson RH, Nakano K, et al. Pulmonary CD103(+) dendritic cells prime Th2 responses to inhaled allergens. *Mucosal Immunol*. 2012;5(1):53-65.
51. Furuhashi K, Suda T, Hasegawa H, Suzuki Y, Hashimoto D, Enomoto N, et al. Mouse lung CD103+ and CD11bhigh dendritic cells preferentially induce distinct CD4+ T-cell responses. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012;46(2):165-72.
52. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:563-604.
53. Morianos I, Semitekolou M. Dendritic Cells: Critical Regulators of Allergic Asthma. *Int J Mol Sci*. 2020;21(21).
54. Pennock ND, White JT, Cross EW, Cheney EE, Tamburini BA, Kiedl RM. T cell responses: naive to memory and everything in between. *Adv Physiol Educ*. 2013;37(4):273-83.
55. Hadebe S, Brombacher F, Brown GD. C-Type Lectin Receptors in Asthma. *Front Immunol*. 2018;9:733.
56. Zakeri A, Russo M. Dual Role of Toll-like Receptors in Human and Experimental Asthma Models. *Front Immunol*. 2018;9:1027.
57. Zhang Q, Lenardo MJ, Baltimore D. 30 Years of NF- κ B: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology. *Cell*. 2017;168(1-2):37-57.
58. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol*. 2014;5:461.
59. Athari SS, Athari SM, Beyzay F, Movassaghi M, Mortaz E, Taghavi M. Critical role of Toll-like receptors in pathophysiology of allergic asthma. *Eur J Pharmacol*. 2017;808:21-7.
60. Hanagata N. Structure-dependent immunostimulatory effect of CpG oligodeoxynucleotides and their delivery system. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:2181-95.
61. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell*. 2010;140(6):821-32.
62. Wevers BA, Kaptein TM, Zijlstra-Willems EM, Theelen B, Boekhout T, Geijtenbeek TB, et al. Fungal engagement of the C-type lectin mincle suppresses dectin-1-induced antifungal immunity. *Cell Host Microbe*. 2014;15(4):494-505.
63. Pinkerton JW, Kim RY, Robertson AAB, Hirota JA, Wood LG, Knight DA, et al. Inflammasomes in the lung. *Mol Immunol*. 2017;86:44-55.
64. Theofani E, Semitekolou M, Morianos I, Samitas K, Xanthou G. Targeting NLRP3 Inflammasome Activation in Severe Asthma. *J Clin Med*. 2019;8(10).
65. Patin EC, Orr SJ, Schaible UE. Macrophage Inducible C-Type Lectin As a Multifunctional Player in Immunity. *Front Immunol*. 2017;8:861.

66. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*. 1989;299(6710):1259-60.
67. von Mutius E. Allergies, infections and the hygiene hypothesis--the epidemiological evidence. *Immunobiology*. 2007;212(6):433-9.
68. Leibowitz U, Kahana E, Alter M. The changing frequency of multiple sclerosis in Israel. *Arch Neurol*. 1973;29(2):107-10.
69. Kondrashova A, Reunanen A, Romanov A, Karvonen A, Viskari H, Vesikari T, et al. A six-fold gradient in the incidence of type 1 diabetes at the eastern border of Finland. *Ann Med*. 2005;37(1):67-72.
70. 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.
71. 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.
72. 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. *British Medical Journal*. 2001;322(7283):390-5.
73. Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, et al. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med*. 2002;347(12):869-77.
74. Bjorksten B. The Hygiene Hypothesis: Do We Still Believe in It? *Microbial-Host Interaction: Tolerance Versus Allergy*. 2009;64:11-22 271.
75. Tavernier G, Fletcher G, Gee I, Watson A, Blacklock G, Francis H, et al. IPEADAM study: Indoor endotoxin exposure, family status, and some housing characteristics in English children. *J Allergy Clin Immun*. 2006;117(3):656-62.
76. Ferreira CM, Vieira AT, Vinolo MA, Oliveira FA, Curi R, Martins FoS. The central role of the gut microbiota in chronic inflammatory diseases. *J Immunol Res*. 2014;2014:689492.
77. Food and Agriculture Organization 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.
78. Binda S, Hill C, Johansen E, Obis D, Pot B, Sanders ME, et al. Criteria to Qualify Microorganisms as "Probiotic" in Foods and Dietary Supplements. *Front Microbiol*. 2020;11:1662.
79. 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.
80. Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2002;82(1-4):279-89.
81. Forsythe P, Inman MD, Bienenstock J. Oral treatment with live *Lactobacillus reuteri* inhibits the allergic airway response in mice. *Am J Resp Crit Care*. 2007;175(6):561-9.

82. Oral treatment with probiotics reduces allergic symptoms in ovalbumin-sensitized mice: a bacterial strain comparative study, 151 (2010).
83. Czerucka D, Rampal P. Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. *Microbes Infect.* 2002;4(7):733-9.
84. McFarland LV, Surawicz CM, Greenberg RN, Fekety R, Elmer GW, Moyer KA, et al. Randomized Placebo-Controlled Trial of *Saccharomyces-Boulardii* in Combination with Standard Antibiotics for *Clostridium-Difficile* Disease. *Jama-J Am Med Assoc.* 1994;271(24):1913-8.
85. Surawicz CM, McFarland LV, Greenberg RN, Rubin M, Fekety R, Mulligan ME, et al. The search for a better treatment for recurrent *Clostridium difficile* disease: Use of high-dose vancomycin combined with *Saccharomyces boulardii*. *Clin Infect Dis.* 2000;31(4):1012-7.
86. McFarland LV. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World J Gastroentero.* 2010;16(18):2202-22.
87. Edwards-Ingram L, Gitsham P, Burton N, Warhurst G, Clarke I, Hoyle D, et al. Genotypic and physiological characterization of *Saccharomyces boulardii*, the probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microb.* 2007;73(8):2458-67.
88. Bustamante M, Oomah BD, Oliveira WP, Burgos-Díaz C, Rubilar M, Shene C. Probiotics and prebiotics potential for the care of skin, female urogenital tract, and respiratory tract. *Folia Microbiol (Praha).* 2020;65(2):245-64.
89. Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llrente C, Gil A. Probiotic mechanisms of action. *Ann Nutr Metab.* 2012;61(2):160-74.
90. Halloran K, Underwood MA. Probiotic mechanisms of action. *Early Hum Dev.* 2019;135:58-65.
91. Plaza-Díaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Gil-Campos M, Gil A. Mechanisms of Action of Probiotics. *Adv Nutr.* 2019;10(suppl_1):S49-S66.
92. Giorgetti G, Brandimarte G, Fabiocchi F, Ricci S, Flamini P, Sandri G, et al. Interactions between Innate Immunity, Microbiota, and Probiotics. *J Immunol Res.* 2015;2015:501361.
93. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature.* 2013;504(7480):446-50.
94. Shore SA, Cho Y. Obesity and Asthma: Microbiome-Metabolome Interactions. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2016;54(5):609-17.
95. McAleer JP, Kolls JK. Contributions of the intestinal microbiome in lung immunity. *Eur J Immunol.* 2018;48(1):39-49.
96. Yu Y, Raka F, Adeli K. The Role of the Gut Microbiota in Lipid and Lipoprotein Metabolism. *J Clin Med.* 2019;8(12).
97. Radzikowska U, Rinaldi AO, Çelebi Sözen Z, Karaguzel D, Wojcik M, Cypriak K, et al. The Influence of Dietary Fatty Acids on Immune Responses. *Nutrients.* 2019;11(12).

98. Martins FS, Nardi RMD, Arantes RME, Rosa CA, Neves MJ, Nicoli JR. Screening of yeasts as probiotic based on capacities to colonize the gastrointestinal tract and to protect against enteropathogen challenge in mice. *J Gen Appl Microbiol*. 2005;51(2):83-92.
99. Martins FS, Rodrigues AC, Tiago FC, Penna FJ, Rosa CA, Arantes RM, et al. *Saccharomyces cerevisiae* strain 905 reduces the translocation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and stimulates the immune system in gnotobiotic and conventional mice. *J Med Microbiol*. 2007;56(Pt 3):352-9.
100. 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.
101. 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*. 2015:1-10.
102. Porto BAA, Monteiro CF, Souza É, Leocádio PCL, Alvarez-Leite JI, Generoso SV, et al. Treatment with selenium-enriched *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 partially ameliorates mucositis induced by 5-fluorouracil in mice. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2019;84(1):117-26.
103. Miranda VC, Santos SS, Assis HC, Faria AMC, Quintanilha MF, Morão RP, et al. Effect of. *Benef Microbes*. 2020;11(3):255-68.
104. 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.
105. Milani, Tamires. A administração de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905, em diferentes concentrações inibe a resposta alérgica em um modelo animal de asma in ATS American Thoracic Society International Conference, 2015, Denver. Anais de evento of Am J Respir Crit Care Med, 2015.v.191.p. A5660. 2015.
106. Milani, Tamires. A Administração de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905, em diferentes concentrações inibe a resposta alérgica em um modelo animal de asma in ATS American Thoracic Society International Conference, 2015, Denver. Anais de evento of Am J Respir Crit Care Med, 2015.v.191.p. A5660. 2015.
107. Sandy, Camila. Efeito da administração da *S.cerevisiae* UFMGA-905 na prevenção da asma na prole de camundongos in 12th Conferência Internacional Científica de Probióticos, Prebióticos e Microbiota intestinal, 2019, Budapeste. Anais de Congresso na 12th International Scientific Conference on Probiotic, Prebiotics and Gut microbiota and Health. P.118. 2018.
108. de Almada CN, Almada CN, Martinez RCR, Sant'Ana AS. Paraprobiotics: Evidences on their ability to modify biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods. 2016.
109. Wegh CAM, Geerlings SY, Knol J, Roeselers G, Belzer C. Postbiotics and Their Potential Applications in Early Life Nutrition and Beyond. *Int J Mol Sci*. 2019;20(19).
110. Nataraj BH, Ali SA, Behare PV, Yadav H. Postbiotics-parabiotics: the new horizons in microbial biotherapy and functional foods. *Microb Cell Fact*. 2020;19(1):168.

111. Fukuda S, Toh H, Taylor TD, Ohno H, Hattori M. Acetate-producing bifidobacteria protect the host from enteropathogenic infection via carbohydrate transporters. *Gut Microbes*. 2012;3(5):449-54.
112. Taverniti V, Guglielmetti S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes Nutr*. 2011;6(3):261-74.
113. Zhao G, Nyman M, Jönsson JA. Rapid determination of short-chain fatty acids in colonic contents and faeces of humans and rats by acidified water-extraction and direct-injection gas chromatography. *Biomed Chromatogr*. 2006;20(8):674-82.
114. Huang YJ, Boushey HA. The microbiome in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(1):25-30.
115. Enaud R, Prevel R, Ciarlo E, Beauflis F, Wieërs G, Guery B, et al. The Gut-Lung Axis in Health and Respiratory Diseases: A Place for Inter-Organ and Inter-Kingdom Crosstalks. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:9.
116. Sérgio CA, Bertolini TB, Gembre AF, Prado RQ, Bonato VL. CD11c(+) CD103(+) cells of *Mycobacterium tuberculosis*-infected C57BL/6 but not of BALB/c mice induce a high frequency of interferon- γ - or interleukin-17-producing CD4(+) cells. *Immunology*. 2015;144(4):574-86.
117. Mildner A, Jung S. Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity*. 2014;40(5):642-56.
118. Li M, Wang B, Sun X, Tang Y, Wei X, Ge B, et al. Upregulation of Intestinal Barrier Function in Mice with DSS-Induced Colitis by a Defined Bacterial Consortium Is Associated with Expansion of IL-17A Producing Gamma Delta T Cells. *Front Immunol*. 2017;8:824.
119. Cheng H, Guan X, Chen D, Ma W. The Th17/Treg Cell Balance: A Gut Microbiota-Modulated Story. *Microorganisms*. 2019;7(12).
120. 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 gnotobiotic and conventional mice. *J Med Microbiol*. 2007;56(Pt 3):352-9.
121. VMB F, MC B, RQ P, TMS M, FS M. Oral administration of *Saccharomyces cerevisiae* inhibits the allergic airway response in mice. *Congresso Brasileiro de PRE, PRO, SIMBIÓTICOS*; Brazil, São Paulo - SP 2015.
122. MacSharry J, O'Mahony C, Shalaby KH, Sheil B, Karmouty-Quintana H, Shanahan F, et al. Immunomodulatory effects of feeding with *Bifidobacterium longum* on allergen-induced lung inflammation in the mouse. *Pulm Pharmacol Ther*. 2012;25(4):325-34.
123. Karimi K, Inman MD, Bienenstock J, Forsythe P. *Lactobacillus reuteri*-induced regulatory T cells protect against an allergic airway response in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;179(3):186-93.
124. LeBlanc BW, Albina JE, Reichner JS. The effect of PGG-beta-glucan on neutrophil chemotaxis in vivo. *J Leukoc Biol*. 2006;79(4):667-75.

125. Figueiredo RT, Carneiro LA, Bozza MT. Fungal surface and innate immune recognition of filamentous fungi. *Front Microbiol.* 2011;2:248.
126. Chung IC, OuYang CN, Yuan SN, Lin HC, Huang KY, Wu PS, et al. Pretreatment with a Heat-Killed Probiotic Modulates the NLRP3 Inflammasome and Attenuates Colitis-Associated Colorectal Cancer in Mice. *Nutrients.* 2019;11(3).
127. Lorè NI, Bragonzi A, Cigana C. The IL-17A/IL-17RA axis in pulmonary defence and immunopathology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016;30:19-27.
128. Patel D, Gaikwad S, Challagundla N, Nivsarkar M, Agrawal-Rajput R. Spleen tyrosine kinase inhibition ameliorates airway inflammation through modulation of NLRP3 inflammasome and Th17/Treg axis. *Int Immunopharmacol.* 2018;54:375-84.
129. Markowiak-Kopeć P, Śliżewska K. The Effect of Probiotics on the Production of Short-Chain Fatty Acids by Human Intestinal Microbiome. *Nutrients.* 2020;12(4).
130. Wong JM, de Souza R, Kendall CW, Emam A, Jenkins DJ. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol.* 2006;40(3):235-43.
131. Schneider SM, Girard-Pipau F, Filippi J, Hebutterne X, Moyse D, Hinojosa GC, et al. Effects of *Saccharomyces boulardii* on fecal short-chain fatty acids and microflora in patients on long-term total enteral nutrition. *World J Gastroenterol.* 2005;11(39):6165-9.
132. Toko H, Morita H, Katakura M, Hashimoto M, Ko T, Bujo S, et al. Omega-3 fatty acid prevents the development of heart failure by changing fatty acid composition in the heart. *Sci Rep.* 2020;10(1):15553.
133. Nakatsuji T, Kao MC, Fang JY, Zouboulis CC, Zhang L, Gallo RL, et al. Antimicrobial property of lauric acid against *Propionibacterium acnes*: its therapeutic potential for inflammatory acne vulgaris. *J Invest Dermatol.* 2009;129(10):2480-8.
134. Harrison LM, Balan KV, Babu US. Dietary fatty acids and immune response to food-borne bacterial infections. *Nutrients.* 2013;5(5):1801-22.
135. Sales-Campos H, Souza PR, Peghini BC, da Silva JS, Cardoso CR. An overview of the modulatory effects of oleic acid in health and disease. *Mini Rev Med Chem.* 2013;13(2):201-10.
136. Sergeant S, Rahbar E, Chilton FH. Gamma-linolenic acid, Dihomo-gamma linolenic, Eicosanoids and Inflammatory Processes. *Eur J Pharmacol.* 2016;785:77-86.
137. Arm JP, Boyce JA, Wang L, Chhay H, Zahid M, Patil V, et al. Impact of botanical oils on polyunsaturated fatty acid metabolism and leukotriene generation in mild asthmatics. *Lipids Health Dis.* 2013;12:141.
138. Sturm EM, Schratl P, Schuligoi R, Konya V, Sturm GJ, Lippe IT, et al. Prostaglandin E2 inhibits eosinophil trafficking through E-prostanoid 2 receptors. *J Immunol.* 2008;181(10):7273-83.
139. Buts JP, Dekeyser N, Stilmant C, Delem E, Smets F, Sokal E. *Saccharomyces boulardii* produces in rat small intestine a novel protein phosphatase that inhibits *Escherichia coli* endotoxin by dephosphorylation. *Pediatr Res.* 2006;60(1):24-9.