**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

THAMIRES MELCHIADES DA SILVA MILANI

**Efeitos da administração de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 inativadas
pelo calor na prevenção da asma em modelo animal**

Ribeirão Preto

2018

Thamires Melchiades da Silva Milani

**Efeitos da administração de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905
inativadas pelo calor na prevenção da asma em modelo animal**

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

Área de Concentração: Clínica Médica

Orientador: Prof. Dr. Marcos de Carvalho Borges

Ribeirão Preto

2018

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.

Milani, Thamires Melchiades da Silva

Efeitos da administração de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 inativadas pelo calor na prevenção da asma em modelo animal. Ribeirão Preto, 2018.

69 p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Área de concentração: Clínica Médica

Orientador: Pr. Dr. Marcos de Carvalho Borges

1. Asma. 2.Paraprobióticos. 3. Inflamação das vias aéreas.

Thamires Melchiades da Silva Milani

Efeitos da administração de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 inativadas pelo calor na prevenção da asma em modelo animal

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

Aprovado em ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Aos meus queridos pais Luzia e Gabriel que sempre me apoiaram e me incentivaram a prosseguir, dedico todas as minhas vitórias a vocês.

Ao meu amado marido Rômulo, que sempre esteve comigo me apoiando, me motivando e nunca me deixando desistir.

A vocês todo meu amor e gratidão!

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus que me deu forças, saúde, sabedoria e fé nos momentos difíceis.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcos Borges pela confiança e credibilidade. Obrigada por acreditar em meu potencial e permitir fazer parte da sua equipe, pelas palavras de incentivo, pelo tempo dedicado, preocupação e amizade, a você meu muito obrigada.

Ao meu amado marido Rômulo, pelo incentivo e apoio em todos os momentos. Obrigada pela paciência, pelo amor e companheirismo, foi essencial.

Aos meus amados pais Luzia e Gabriel por não medir esforços para minha formação, todo agradecimento é pouco a vocês.

A todos meus familiares que me apoiaram e me incentivaram, em especial para meu sogro Mauro e minha sogra Dirce.

A minha querida amiga Ana Paula que tornou a caminhada muito mais divertida. Obrigada por toda ajuda, apoio, incentivo, pelas conversas, companheirismo, pela amizade, você sem dúvida foi um presente.

Ao colega Ednílson que por tantas vezes me ajudou prontamente, obrigada.

A equipe do Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, em especial aos amigos aprimorandos Giulia e Lucas que tanto me ajudaram com as análises microbiológicas, meu muito obrigada.

Aos laboratórios de apoio que colaboraram de alguma forma, obrigada.

Aos técnicos de laboratório Sandra, Ana Flávia (departamento de Clínica Médica), Marina, Roni, Iza, Ana Flávia (Departamento de Imunologia), Ceci, Livia, obrigada pela companhia e colaboração.

Aos colegas de laboratório que de alguma forma me ajudaram, obrigada.

Ao Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, onde realizei todos os experimentos.

Aos docentes e professores que conheci durante esse projeto.

Aos funcionários do departamento de pós-graduação em clínica médica.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de mestrado e apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Por fim, a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

“A persistência é o caminho do êxito. ”
(Charles Chaplin)

Milani, T. M.S. Efeitos da administração de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 inativadas pelo calor na prevenção da asma em modelo animal. 2018. 69 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

RESUMO

A asma é uma doença heterogênea caracterizada por inflamação crônica das vias aéreas. A prevalência de asma tem aumentado nas últimas décadas principalmente em países ocidentais, sobrecarregando os sistemas de saúde. A teoria da higiene sugere que a exposição a infecções na infância pode proteger contra o desenvolvimento de asma e outras doenças alérgicas. Estudos prévios demonstram que o tratamento com *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 protegeu camundongos contra infecções intestinais, preveniu translocação bacteriana e aumentou a produção de IL-10. Em um modelo animal de asma, a *S. cerevisiae* UFMG A-905 atenuou as principais características da asma reduzindo a hiper-responsividade brônquica (HRB), eosinofilia no lavado broncoalveolar (LBA), a inflamação peribrônquica, a produção de muco e os níveis de IL-4, IL-5 e IL-13. Paraprobióticos são microrganismos inativados que conferem benefícios a saúde do hospedeiro. Os objetivos deste trabalho foram avaliar os efeitos da administração do paraprobiótico *S. cerevisiae* UFMG 905 na prevenção da asma e os mecanismos envolvidos. Camundongos Balb/c machos de 6 a 8 semanas foram sensibilizados com injeções de ovalbumina (OVA), com uma semana de intervalo, e desafiados com OVA intranasal diariamente por três dias consecutivos. A levedura foi inativada por calor a 121°C por 20 minutos. Os camundongos receberam *S. cerevisiae* UFMG A-905 inativadas por gavagem diariamente, iniciando dez dias antes da primeira sensibilização, seguindo continuamente até o último desafio. Vinte e quatro horas após o último desafio, os animais foram anestesiados, ventilados com um ventilador para pequenos animais FlexVent® (Sicreq, Montreal, Canadá) e realizadas medidas *in vivo* da HRB na condição basal e após a administração de concentrações crescentes de um broncoconstritor (metacolina). Após, a inflamação foi avaliada no lavado broncoalveolar (LBA) pela contagem total e diferencial de células, dosagem das citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17A e INF- γ no LBA e homogenato pulmonar, por avaliação histológica do tecido pulmonar, produção de muco, e pela avaliação dos níveis de IgE. O grupo OVA, quando comparado ao grupo SAL, apresentou um aumento significativo na HRB ($p < 0,001$), número total de células ($p < 0,001$) e eosinófilos ($p < 0,001$) no LBA, nos níveis de IgE ($p < 0,001$), inflamação peribrônquica ($p < 0,001$) e produção de muco ($p < 0,001$). Quando comparado ao grupo OVA, a administração do paraprobiótico *S. cerevisiae* UFMG A-905 reduziu significativamente a quantidade de eosinófilos ($p < 0,001$) no LBA, os níveis de IL-5 ($p < 0,05$), IL-13 ($p < 0,05$), e IgE ($p < 0,001$) e a produção de muco ($p < 0,01$), além disso, a administração aumentou os níveis de IL-17A ($p < 0,001$), e não alterou a HRB. Conclui-se que a administração do paraprobiótico *S. cerevisiae* UFMG A-905 atenuou a inflamação das vias aéreas em modelo animal de asma.

Palavras-chave: Asma. Paraprobióticos. Inflamação das vias aéreas.

Milani, T. M.S. Effects of the administration of heat-inactivated *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 in the prevention of asthma in an animal model. 2018. 69 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018

ABSTRACT

Asthma is a heterogeneous disease characterized by chronic inflammation of the airways. The prevalence of asthma has increased in the last decades mainly in western countries, overloading health systems. Hygiene theory suggests that exposure to infections can protect against the development of asthma and other allergic diseases.. Studies have shown that treatment with *S. cerevisiae* UFMG A-905 protected mice against intestinal infections, prevented bacterial translocation and increased IL-10 production. In an animal model of asthma *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 attenuated the main characteristics of asthma reducing bronchial hyperresponsiveness (BHR), eosinophilis in bronchoalveolar lavage (BAL), peribronchial inflammation, mucus production, important inflammatory cytokines in asthma such IL-4, IL-5 and IL-13. Paraprobiotics are inactivated microorganisms that confer benefits to host health. The objectives of this study were to evaluate the effects of the administration of paraprobiotic *S. cerevisiae* UFMG 905 on the prevention of asthma and the mechanisms involved. Male Balb/c from 6 to 8 weeks were sensitized twice with ovalbumin (OVA), with one week apart between applications, and challenged intranasally with OVA daily for three consecutive days. The yeast was heat-inactivated at 121°C for 20 minutes. Mice received by gavage *S. cerevisiae* UFMG A-905 inactivated daily, starting ten days prior to the first sensitization, continuously until the last challenge. Twenty-four hours after the last challenge, the animals were anesthetized, ventilated with a ventilator for small animals FlexVent® (Sicreq, Montreal, Canada) and measurements were performed *in vivo* HRB at baseline and after administration of increasing concentration of a bronchoconstrictor (methacholine). The inflammation was assessed by counting total and differential cells present in BAL analysis of the cytokines IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17 e INF- γ in BAL and pulmonary homogenate by ELISA, by histological assessment of lung tissue, mucus production and levels of IgE. There was significant increase in BHR between the OVA/PBS and SAL/PBS ($p<0,001$), total number of cells ($p<0,001$) and eosinophils ($p<0,001$), peribronchial inflammation ($p<0,001$) and mucus production ($p<0,001$). When compared to the OVA/PBS group, administration of paraprobiotic *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 significantly reduced the amount of eosinophils ($p<0,001$) in BAL, IL-5 ($p<0,001$) and IL-13 ($p<0,01$) cytokines, levels of IgE ($p<0,01$) and mucus production ($p<0,01$), also increased levels of IL-17A ($p<0,001$), and did not change the BHR. In conclusion, oral administration of paraprobiotic *S. cerevisiae* UFMG A-905 attenuated the inflammation of the airways in an animal model of asthma.

Keywords: Asthma. Paraprobiotics. Airway inflammation.

Lista de Figuras

<i>Figura 1: Resumo da Fisiopatologia da asma</i>	20
Figura 2: Protocolo de sensibilização, desafios e tratamento	35
<i>Figura 3: Avaliação de inativação da levedura antes da administração e após administração aos animais</i>	43
<i>Figura 4: Avaliação da hiper-responsividade brônquica</i>	44
<i>Figura 5: Quantificação de células totais no LBA</i>	45
Figura 6: Quantificação de células diferenciais no LBA.	46
<i>Figura 7: Níveis de citocinas no homogenato pulmonar</i>	47
Figura 8: Níveis de citocinas no LBA	48
Figura 9: Nível de IgE no soro	49
Figura 10: Células inflamatórias no tecido pulmonar	50
Figura 11: Produção de muco	51

Lista de Tabelas

<i>Tabela 1:</i> Relatório de análise microbiológica.	42
--	----

Lista de Siglas

ANOVA	Análise de variância
ASD	Ágar Saboraud Dextrose
DATASUS	Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
Der p	<i>Dematophagoides pteronyssirus</i>
ERS	Elastância total
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FMRP-USP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
G	Resistência tecidual
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos/macrófagos
H	Elastância tecidual
HCFMRP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão
HE	Hematoxilina- Eosina
HRB	Hiper-responsividade brônquica
I.N	Intra-nasal
I.P	Intra-peritoneal
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
ICB-UFMG	Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais
IFN-γ	Interferon gama
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucinas
IL-10	Interleucina dez

IL-13	Interleucina treze
IL-17	Interleucina dezessete
IL-4	Interleucina quatro
IL-5	Interleucina cinco
LABA	B2- agonista de ação prolongada
LBA	Lavado Broncoalveolar
LGG	<i>Lactobacilos rhamnusus</i> GG
NK	Natural Killer
OVA	Albumina de galinha liofilizada
PAS	Ácido Periódico Schiff
PBS	Phosphate Beffered Saline
RPM	Rotação por minuto
RSS	Resistência total
SAC UFMG A-905	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFMG A-905
SAL	Salina
TGF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TGF- β	Fator transformador de crescimento beta
TMB	Tetrametilbenzidina
Treg	Linfócitos T reguladores
UFC	Unidade formadora de Colônia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
USP	Universidade de São Paulo
YPD	Yeast Extract Peptone Dextrose

Sumário

1. Introdução.....	17
1.1 DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA.....	17
1.2 FISIOPATOLOGIA DA ASMA.....	18
1.3 TRATAMENTO DA ASMA	22
1.4 TEORIA DA HIGIENE E SUAS APLICAÇÕES	23
1.5 PROBIÓTICOS	24
1.6 USO TERAPÊUTICO DA LEVEDURA DO GÊNERO <i>SACCHAROMYCES</i>	26
1.7 <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> UFMG A-905.....	27
1.8 PARAPROBIÓTICOS VS PROBIÓTICOS	28
2. HIPÓTESE.....	29
3. OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVO GERAL.....	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 AMOSTRAGEM	31
4.2 CONDICIONAMENTO DOS ANIMAIS	31
4.3 MICRORGANISMO UTILIZADO COMO PARAPROBIÓTICO	31
4.5 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA LINHAGEM <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	32
4.6 CULTIVOS DA LEVEDURA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> UFMG A-905.....	32
4.7 INATIVAÇÃO DA LEVEDURA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> UFMG A-905 E CONTROLE DO PROCESSO DE ESTERILIZAÇÃO	33
4.8 CONCENTRAÇÕES DA SOLUÇÃO PARAPROBIÓTICA E ADMINISTRAÇÃO DO PARAPROBIÓTICO	33
4.9 SENSIBILIZAÇÃO E DESAFIOS COM OVALBUMINA (OVA)	34
4.10 DIVISÃO DOS GRUPOS ANALISADOS.....	34
4.11 CONTROLE DE INATIVAÇÃO DA LEVEDURA APÓS ADMINISTRAÇÃO AOS ANIMAIS.....	35
4.12 AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> DA HIPER-RESPONSIVIDADE BRÔNQUICA	36
4.13 QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS NO LBA.....	37
4.14 COLETA DE SORO E DO PULMÃO	38
4.15 PROCESSAMENTO HOMOGENATO PULMONAR	38
4.16 DOSAGEM DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NO HOMOGENATO PULMONAR E LBA.....	39
4.17 DETECÇÃO DE ANTICORPOS OVA-ESPECÍFICO	39
4.18 PROCESSAMENTO DO PULMÃO	40
4.19 ANÁLISES MORFOMETRIAS DO PULMÃO	40
4.20 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5. RESULTADOS.....	42
5.1 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	42

5.1	INATIVAÇÃO DO PARAPROBIÓTICO <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> UFMG A-905	43
5.2	AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> DA HIPER-RESPONSIVIDADE BRÔNQUICA	44
5.3	QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS TOTAIS NO LBA	45
5.5	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS NO HOMOGENATO PULMONAR	47
5.6	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS NO LBA	48
5.7	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS	49
5.8	QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS NO TECIDO PULMONAR	50
5.9	QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MUCO NAS VIAS AÉREAS	51
6.	DISCUSSÃO	52
7.	CONCLUSÃO	61
8.	REFERÊNCIAS	62
9.	ANEXOS	69
	ANEXO 1: CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	69

1. Introdução

1.1 Definição e epidemiologia

A asma é definida como uma doença heterogênea caracterizada pela inflamação crônica das vias aéreas, hiper-responsividade, limitação variável do fluxo aéreo, e remodelamento brônquico. Manifesta-se com sintomas respiratórios como sibilos, aperto no peito, falta de ar e tosse que variam com o tempo e intensidade (1).

A prevalência de doenças alérgicas incluindo asma teve um aumento significativo nas últimas décadas, principalmente em sociedades ocidentais, sobrecarregando assim os sistemas de saúde (2). A asma é uma das doenças crônicas mais comuns, em ascensão por todo mundo, atingindo grupos de todas as idades (1). Estima-se que no mundo o número de pessoas afetadas pela asma possa chegar a 334 milhões, atingindo cerca de 14% de crianças e 8,6 % de jovens adultos com idades entre 18-45 anos (3).

A prevalência da asma tem aumentado em vários países sendo maior em países desenvolvidos como Reino Unido, Nova Zelândia e Austrália (15%). Porém, também está presente em países subdesenvolvidos como África e África do Sul (8%) e países em desenvolvimento como Peru, Costa Rica e Brasil (10%) (4).

No Brasil a prevalência também é alta, cerca de 10% da população possui a doença (5). Estima-se que há cerca de 20 milhões de asmáticos no país. A asma é responsável por grande parte de faltas escolares e no trabalho (6). Segundo dados do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) no ano de 2013 a asma foi responsável por 2.047 óbitos, o que representa aproximadamente 5 óbitos/dia, causando mais de 350.000 internações/ano, sendo a 4ª causa de hospitalização (7, 8).

Mais recentemente, os pacientes com asma foram classificados em diferentes fenótipos clínicos, compostos pela apresentação de diferentes características incluindo demográficas, clínicas e fisiopatológicas (1). Assim, foram definidos cinco fenótipos (1):

Asma alérgica: mais comum entre os pacientes, apresenta perfil eosinofílico, tem início na infância e é associada com histórico familiar de doenças alérgicas.

Asma não-alérgica: se desenvolve na fase adulta, não está associada com alergia e possui perfil neutrofílico/ eosinofílico ou com presença de poucas células inflamatórias.

Asma Tardia: desenvolve-se na fase adulta principalmente em mulheres sem histórico da doença ou familiar.

Asma com fixa limitação de ar: desenvolve-se em pacientes com asma de difícil controle, caracterizada por uma fixa limitação de ar associada ao remodelamento brônquico das paredes da via aérea.

1.2 Fisiopatologia da asma

Muitos são os fatores que estão relacionados com a asma, tais como atopia, alimentação, condições socioeconômicas, fatores ambientais, fatores étnicos e genéticos, exposição à alérgenos, poluentes, estilo de vida urbano ou rural, infecções, uso de antibióticos, fatores ocupacionais, resfriados, exercícios, uso de cigarro, entre outros (3, 4).

O desenvolvimento da asma ocorre devido a um desequilíbrio imunológico em resposta a fatores genéticos e ambientais, sendo que a presença de infiltrado eosinofílico na via aérea de pacientes asmáticos foi reportada pela primeira vez em 1908. No início dos anos 80, o desenvolvimento de técnicas e métodos de avaliação da função pulmonar em pacientes asmáticos permitiu descobertas como a presença de inflamação das vias aéreas mesmo em pacientes assintomáticos. Concomitante, foi descrita a função de células Th CD4, em especial linfócitos CD4⁺, na via aérea de pacientes asmáticos (9, 10). Desde então, a associação de infiltrado eosinofílico com citocinas de perfil Th2 e doenças alérgicas levaram a teoria de que células Th2 favorecem o desenvolvimento e a gravidade da asma (9).

A asma é resultado de uma complexa interação entre respostas inata e adaptativa do sistema imunológico, resultando em uma resposta exagerada do organismo (11). Uma das possíveis explicações desse desequilíbrio imunológico é um desbalanceamento de respostas Th1 e Th2, com um predomínio da resposta Th2 (12).

Na asma a parede das vias aéreas é infiltrada por células mononucleares onde a grande maioria são linfócitos T CD4⁺ e eosinófilos. Além disso, mastócitos,

macrófagos, plasmócitos e neutrófilos também estão aumentados na via aérea de pessoas asmáticas (9). Adicionalmente, o processo inflamatório também envolve outras células e mediadores, incluindo células constituintes do trato respiratório, como células epiteliais e do endotélio vascular (13).

A resposta imunológica da asma é demonstrada na figura 1. Resumidamente, os alérgenos são fagocitados por células dendríticas ao entrar em contato com o trato respiratório. Em seguida são apresentados a linfócitos indiferenciados Th0 que por ação da citocina IL-4 se diferencia em Th2. Além disso, citocinas inflamatórias como IL-4 e IL-13 estimulam os linfócitos B a produzir anticorpos IgE, que sensibilizam os mastócitos. Após, diante de uma nova exposição, os mastócitos liberam substâncias como histamina e leucotrienos que vão agir sobre as células da musculatura lisa provocando a broncoconstrição. Concomitante, IL-5 é uma das citocinas responsável por estimular, produzir e migrar os eosinófilos para o tecido pulmonar e vias aéreas, que quando desestruturados liberam substâncias que agem nas células epiteliais aumentando a produção de muco (14).

Figura 1: Resumo da Fisiopatologia da asma. Resumidamente, o alérgeno entra em contato com o epitélio respiratório e é fagocitado por célula dendrítica que o apresenta para um linfócito indiferenciado Th0 que sobre ação de IL-4 se diferencia em Th2. Por meio de citocinas como IL-4 e IL-13, os linfócitos Th2 estimulam linfócitos B a produzir anticorpos IgE que são responsáveis pela sensibilização dos mastócitos. Após uma nova exposição, os mastócitos liberam substâncias como histamina e leucotrienos que vão agir sobre células da musculatura lisa causando a hiper-respondividade. Além disso, por ação da IL-5 ocorre migração de eosinófilos para o tecido pulmonar e vias aéreas que quando desestruturados liberam substâncias que agem nas células epiteliais aumentando a produção de muco. Adaptado de Pelaia (14).

Assim, a presença de linfócitos ativados T CD4+, do subtipo 2 (Th2), secretores de interleucinas (IL) tais como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, e IL-13, fator estimulador de colônias de granulócitos/macrófagos (GM-CSF), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e fator transformador de crescimento beta (TGF- β), exercem papel central na patogênese da asma. São eles que induzem a ativação de linfócitos B, aumentam a produção de anticorpos IgE, e suprimem a atuação de células Th1 (11, 13).

A diferenciação dos linfócitos em Th2 depende de vários fatores e cooperação de diversas moléculas e citocinas expressas por células inflamatórias. A IL-4, citocina produzida por mastócitos e basófilos, é uma das citocinas capaz de induzir essa

diferenciação, que acarreta na produção de citocinas Th2 e estimula a maturação e recrutamento de outras células imunes envolvidas na cascata imunológica da alergia (9, 11).

A desgranulação de células inflamatórias como eosinófilos resulta na liberação de substâncias e proteínas tóxicas como os leucotrienos, peróxido de hidrogênio, hidroxilas e peróxido nítrico que contribuem para o dano epitelial da via aérea, superprodução de muco por células caliciformes e hiper-responsividade brônquica (11, 13).

Além da inflamação das vias aéreas, a hiper-responsividade brônquica (HRB) é uma característica importante em doenças pulmonares obstrutivas como a asma, sendo definida como um estreitamento brônquico excessivo à vários estímulos, contribuindo para a gravidade da doença (15, 16). A HRB ocorre devido a ação de estímulos diretos e indiretos na via aérea (17) por mecanismos ainda não totalmente elucidados (13). Sabe-se que alguns fatores podem contribuir com a HRB tais como pré-disposição genética, inflamação eosinofílica, aumento da massa da musculatura lisa das vias aéreas, perda de fatores que se opõem a contração muscular, alterações intrínsecas do músculo liso, perda de retração elástica do parênquima pulmonar, assim como redução do diâmetro da via aérea, aumento de contratilidade, grau de lesão epitelial, aumento de permeabilidade microvascular, ação de mediadores inflamatórios e até mesmo disfunção da regulação neural (9, 16, 17).

Além da inflamação e da HRB, alterações estruturais da via aérea, denominadas remodelamento, alteram sua função e contribuem para quadros mais graves (18). O remodelamento brônquico é caracterizado por diversas alterações, incluindo alterações epiteliais como metaplasia de células caliciformes e células escamosas, descamação de células epiteliais para dentro do lúmen, espessamento da membrana basal e lâmina própria, deposição de colágeno na matriz extracelular, alterações vasculares, hipertrofia e hiperplasia de glândulas submucosas e músculo liso e aumento da massa muscular lisa (19).

Por outro lado, existem células, citocinas e mediadores que agem como agentes imunossupressores ou anti-inflamatórios. Por exemplo, a IL-10 é uma citocina com ação anti-inflamatória produzida por várias células como monócitos, macrófagos, células T (CD4⁺, CD8⁺, linfócitos T reguladores), neutrófilos e células epiteliais. Ela

atua modulando e reduzindo respostas imunológicas exacerbadas em todo sistema imune por inibir a ativação de células T, produção de IgE e recrutamento de eosinófilos (11).

Os linfócitos T que possuem atividade imunomodulatória ou imunossupressora são chamados T reguladores (Treg), e são essenciais para homeostase e manutenção da imunidade (20), e regulação de processos inflamatórios (21) e doenças alérgicas (22). Diversas células T possuem atividades regulatórias como, por exemplo, os linfócitos T CD4⁺CD25⁺FOXP3, células Tr1 produtoras de IL-10, células Th3 produtoras de TGF- β (20). Os Treg podem prevenir e inibir o desenvolvimento de doenças alérgicas reduzindo a inflamação através de vários mecanismos, incluindo a produção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e TGF- β (20, 22).

1.3 Tratamento da asma

A asma é uma doença crônica sem cura com terapias voltadas para controle e manutenção. O tratamento inclui medidas educacionais sobre exposição a desencadeantes e terapia medicamentosa. Objetiva-se desta forma minimizar os sintomas que limitam atividade diárias, prevenir exacerbações, diminuir visitas a emergências e hospitalizações, além de manter a função pulmonar o mais próximo do normal possível, melhorando a qualidade de vida dos pacientes (1, 23).

Brevemente, o tratamento é dividido entre alívio e controle. Os β agonistas de curta ação são broncodilatadores indicados como primeira opção para alívio imediato de sintomas, como nas exacerbações. Os corticosteroides inalatórios geralmente são efetivos na maioria dos pacientes para controle da doença. Para pacientes de difícil controle, os β 2-agonistas de ação prolongada (LABA) associados com corticosteroides inalatórios são indicados.

Outras opções terapêuticas disponíveis para tratamento da asma incluem os antagonistas de leucotrienos, antagonistas muscarínicos de ação prolongada, uso de anticorpos monoclonais (ex. contra IgE; *Omalizumabe*), imunoterapia com alérgenos, vacinações, termoplastia brônquica, além de intervenções não medicamentosas como evitar cigarros, entre outros (1).

O sucesso para controle da asma requer diagnóstico correto e tratamento adequado (1, 3). Porém, apesar da eficácia, a resposta ao tratamento é variável entre

os pacientes (18) e o uso prolongado de corticosteroídes pode acarretar diversos efeitos colaterais sistêmicos indesejados (8). Desta forma, é importante o desenvolvimento de novas opções terapêuticas voltadas para a prevenção e tratamento da asma, como por exemplo, o uso de agentes bioterapêuticos como os probióticos (23).

1.4 Teoria da Higiene e suas aplicações

Alterações no estilo de vida e a industrialização têm contribuído para a diminuição de doenças infecciosas e estão associadas com o risco de desenvolvimento de doenças alérgicas e autoimunes. A teoria da higiene, primeiramente proposta em 1989 por David Strachan, pressupõe que a exposição a infecções e contatos não higiênicos na infância influencia o desenvolvimento do sistema imune e podem proteger contra o desenvolvimento de asma e outras doenças alérgicas (24).

Posteriormente, demais estudos demonstraram que outros fatores também favorecem a incidência de doenças alérgicas, tais como mudanças de hábitos alimentares, exposição a alérgenos, poluentes ambientais, uso de antibióticos, sanitização de água e alimentos, saneamento básico, forma de nascimento e até mesmo mudanças na biodiversidade. Tais fatores ajudam a reduzir a exposição microbiana, resultando na interferência de mecanismos naturais de tolerância imunológica, favorecendo o desenvolvimento de doenças alérgicas (4, 25-27).

Estudos que apoiam a teoria da higiene demonstraram que crianças que vivem em um ambiente rural em contato com animais de campo bem como constante exposição a microrganismos apresenta menor chance de desenvolver asma, quando comparadas aquelas sem contato com a vida rural (28, 29). Além disso, a exposição a animais domésticos como cães e gatos, assim como a endotoxinas presente na parede de bactérias gram-negativas, tem sido associada a uma diminuição do risco de doenças alérgicas (29, 30).

A teoria da higiene não avaliou a importância da microbiota sobre o funcionamento do sistema imunológico, considerada atualmente extremamente importante no surgimento de várias doenças (31), como as doenças alérgicas (32). Nesse sentido, nos últimos anos tem aumentado o número de pesquisas voltadas para

o estudo da importância de um balanço da microbiota intestinal, relacionando-lhe com a saúde do hospedeiro e a resposta do sistema imunológico (33).

Estudos sobre a microbiota e alergias demonstraram que bactérias comensais regulam o desenvolvimento de células inflamatórias bem como a produção de IgE (32, 34). Tais evidências indicam que provavelmente há uma importante relação entre as microbiotas intestinal e respiratória, uma vez que mudanças na composição dessas microbiotas estão associadas com doenças pulmonares crônicas. Entretanto os mecanismos envolvidos nessa relação ainda não foram totalmente elucidados (33).

Por outro lado sabe-se que os mecanismos de proteção contra doenças inflamatórias podem ocorrer através das vias inata e adaptativa, diante de componentes microbianos presentes nos trato epidérmico, intestinal e respiratório (25). Assim, baseados na teoria da higiene e na relação microbiota-sistema imune, estudos atuais apontam os probióticos como alternativas bioterapêuticas no tratamento de doenças imunes e alérgicas (35, 36).

1.5 Probióticos

O efeito benéfico de alterações na microbiota abre a perspectiva do uso de microrganismos na prevenção e tratamento de doenças alérgicas e autoimunes. Por outro lado, submeter adultos e crianças a tratamentos alternativos com risco de infecções para prevenir doenças alérgicas não são indicados (4). Desta forma, o uso de probióticos, considerados seguros, abre a possibilidade da aplicação prática da teoria da higiene em doenças alérgicas como asma.

A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura define probióticos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”(37). Para que um microrganismo seja considerado probiótico algumas características são essenciais: 1) permanecer estável na passagem pelo trato gastrointestinal e possuir capacidade de proliferação no intestino; 2) oferecer efeitos benéficos ao hospedeiro; 3) não ser patogênico ou tóxico; 4) promover proteção contra agentes patogênicos pelo aumento no número de bactérias benéficas; 5) não transferir genes de resistência a antibióticos (38).

Nos últimos anos, tem aumentado o número de pesquisas sobre a utilização de probióticos no tratamento ou prevenção de diversas doenças infecciosas e inflamatórias de diferentes órgãos, tais como inflamação/infecção intestinal, câncer, alergias, doenças cardiovasculares, desordens no trato urinário, entre outros (38).

Dentre os diversos possíveis mecanismos de ação, os probióticos podem promover alterações na mucosa intestinal devido ao balanceamento local da microbiota, atuar contra crescimento de microrganismos patogênicos, melhorar a resposta imune local e sistêmica, balancear citocinas pró e anti-inflamatórias (39, 40).

Diversos estudos experimentais e clínicos avaliaram os efeitos imunomodulatórios de probióticos no tratamento e prevenção doenças alérgicas, sendo os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* os mais comumente utilizados, porém não exclusivos (41-44) (45-47). Embora a busca para aplicação de probióticos esteja em ascensão, mais estudos ainda são necessários para comprovar a eficácia e segurança dessa terapia em doenças alérgicas (1).

Hyeyoung et al avaliaram os efeitos da administração oral de bactérias probióticas do gênero *Bifidobacterium* (*B. bifidum* BGN4) e *Lactobacillus* (*L. casei* 911) na prevenção de alergia em modelo animal, demonstrando que o tratamento foi eficaz na prevenção da hipersensibilidade a OVA, redução nos níveis de IgE e dos sintomas (48).

Na mesma linha, *Forsythe et al* avaliaram os efeitos do tratamento oral com *L. reuteri* vivas antes do desafio com OVA. Eles demonstraram que o *L. reuteri* inibiu a resposta alérgica em animais, demonstrado por redução na inflamação das vias aérea e HRB, associada a diminuição de citocinas inflamatórias como MCP-1, TNF, IL-5 e IL-13 (49).

Alguns estudos clínicos também demonstraram potencial terapêutico do uso de probióticos em doenças alérgicas. *Del Giudice et al* em um estudo prospectivo, avaliaram os efeitos do tratamento em crianças com rinite alérgica e asma com uma mistura de probióticos do gênero *Bifidobacterium* (*B. longum* BB536, *B. infantis* M-63 e *B. breve* M-16). O tratamento com os probióticos foi capaz de reduzir os sintomas da rinite alérgica e asma, assim como melhorou a qualidade de vida das crianças (47).

Liu et al demonstraram que o tratamento com imunoterapia específica para alérgenos associado com a administração do probiótico *Clostridium butyricum*

aumentou o efeito terapêutico em pacientes com asma por conversão de células B em células B regulatórias (50).

Embora a maioria dos resultados com o uso de probióticos sejam positivos, alguns estudos clínicos obtiveram dados conflitantes. *Giovannini et al* avaliaram os efeitos do uso prolongado de um produto lácteo com o probiótico *Lactobacillus casei* e demonstraram que não houve efeitos benéficos em crianças asmáticas (51). *Abrahamsson et al* demonstraram que a administração do probiótico *L. reuteri* no final da gestação de mães e durante o primeiro ano de vida das crianças não reduziu a prevalência de asma, rinoconjutivite alérgica e eczema associados a IgE em crianças com idade de 7 anos (52).

Assim, mais estudos são necessários para avaliar os efeitos dos probióticos e também quais são os mais efetivos. Além das bactérias mais habitualmente utilizadas como probióticos, leveduras não patogênicas com potencial probiótico, especialmente do gênero *Saccharomyces*, vem sendo estudadas (53). Linhagens da levedura *Saccharomyces* tem sido avaliada no manejo de diferentes doenças, tais como translocação bacteriana (54), dano hepático (55), doenças gastrointestinais (56).

1.6 Uso terapêutico da levedura do gênero *Saccharomyces*

A levedura *Saccharomyces boulardii* tem sido empregada na prevenção e tratamento de infecções gastrointestinais agudas e crônicas nos últimos 30 anos (57). Por ser uma alternativa segura e bem tolerada, seu uso tem sido empregado como terapia em diversas condições como infecção por *Clostridium difficile*, *diarreia aguda*, *diarreia persistente*, *diarreia do viajante*, *doença de Crohn*, infecções parasitárias entre outras (56, 57).

Os efeitos da *S. boulardii* no tratamento de problemas gastrointestinais podem estar relacionados a diversos mecanismos, entre eles: sua capacidade antimicrobiana, antioxidante, relação com a microbiota do hospedeiro, tropismo na mucosa intestinal, estimulação imune, efeitos sobre a imunidade adaptativa, redução de estímulos pró-inflamatórios e produção de efeitos anti-inflamatórios (56, 57).

Até momento, em nosso conhecimento, *S. boulardii* é a única levedura probiótica que tem livre comercialização na medicina humana, normalmente utilizada em cápsulas, liofilizada ou inativa (56, 58). Entretanto, devido a semelhanças

genéticas, muito provavelmente existem outras linhagens com efeitos bioterapêuticos semelhantes ou melhores que os apresentados pela *S. boulardii* (58).

1.7 *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905

As leveduras do gênero *Saccharomyces* são muito aplicadas na indústria alimentícia para fabricação de pães, vinhos, cervejas, queijos, e no setor sucroenergético na produção de combustíveis como etanol (59). Entre as diversas espécies do gênero, a *Saccharomyces boulardii* é a mais estudada e a única aplicada como probiótico na medicina humana.

Devido aos resultados positivos apresentados por testes *in vitro* (58), e ensaios *in vivo* (60), e a semelhança genética entre as linhagens do gênero *Saccharomyces*, nos últimos anos pesquisadores tem avaliado os efeitos probióticos de diferentes linhagens dessa levedura (61).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905, extraída da cachaça, foi previamente analisada entre 12 linhagens, sendo escolhida por apresentar melhores resultados probióticos como colonização intestinal e efeito protetor contra infecções intestinais (58).

Generoso et al avaliaram os efeitos probióticos da *S. cerevisiae* UFMG A-905 em modelo animal de obstrução intestinal, e demonstraram que tanto a forma ativa como a inativa possuem capacidade de proteger contra o aumento da permeabilidade intestinal, bem como induzir o aumento de IL-10 preservando a integridade da barreira intestinal e estimulando o sistema imune (54). Adicionalmente, *Martins et al* demonstraram que essa linhagem foi capaz de proteger contra infecções causadas por *Salmonella Typhimurium* e *Clostridium difficile* (58).

Recentemente, *Fonseca et al* demonstraram que a administração oral de *S. cerevisiae* UFMG A-905 vivas antes da sensibilização com ovalbumina (OVA) atenuou as características de asma em um modelo animal, demonstrado por redução na HRB, na quantidade de eosinófilos no LBA, nos níveis de IL-4, IL-5, IL-13, na inflamação peribronquial e produção de muco. Além disso, houve aumento de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e IFN- γ (63).

1.8 Paraprobióticos vs Probióticos

Por definição, probióticos são microrganismos vivos que conferem benefícios a saúde do hospedeiro (38). Assim, a maioria das pesquisas com probióticos avaliou os efeitos da administração de microrganismos vivos. Porém, embora o número de pesquisas sobre aplicação de probióticos como agentes bioterapêuticos esteja em ascensão, existe uma preocupação referente aos possíveis efeitos colaterais decorrentes dessa terapia, principalmente em pacientes imunocomprometidos e crianças (56, 64). Nesse sentido, se faz necessário avaliar o potencial bioterapêuticos desses microrganismos na forma não viável ou inativa e seus efeitos sobre as doenças.

Por necessidade de um termo que defina e classifique microrganismos inativos, *Taverniti e Guglielmetti* propuseram o termo “paraprobióticos” como sendo “células microbianas não viáveis que quando administradas em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro humano ou animal” (65).

O potencial terapêutico apresentado por microrganismos inativos ocorre por mecanismos não dependentes de viabilidade (66), tais como imunomodulação, inibição de patógenos, modulação da microbiota, recuperação de dano intestinal e redução da translocação bacteriana (67). Dessa forma, potencialmente, os paraprobióticos poderiam ser empregados como agentes bioterapêuticos com capacidade de modificar respostas imunes assim como os probióticos, porém com maior segurança (67).

2. Hipótese

A administração de *S. cerevisiae* UFMG A-905 vivas reduziu as principais características da asma em modelo animal bem como aumentou os níveis de substâncias imunomoduladoras como IL-10. Considerando que os mecanismos de ação possam não estar diretamente relacionados com a viabilidade, nos elaboramos a hipótese que a administração do paraprobiótico *S. cerevisiae* UFMG A-905 possa também apresentar efeitos benéficos na prevenção de asma.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo foi avaliar os efeitos da administração do paraprobiótico *S. cerevisiae* UFMG 905 na prevenção da asma em um modelo animal de asma induzida por alérgeno, e os mecanismos envolvidos.

3.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos foram avaliar:

- Alterações na responsividade brônquica decorrentes da administração do paraprobiótico *S. cerevisiae* UFMG A-905 antes da sensibilização com OVA;
- Alterações na inflamação das vias áreas decorrentes da administração do paraprobiótico *S. cerevisiae* a UFMG A-905 antes da sensibilização com OVA;
- Alterações na inflamação pulmonar decorrentes da administração do paraprobiótico *S. cerevisiae* UFMG A-905 antes da sensibilização com OVA;
- Alterações na produção de muco decorrentes da administração do paraprobiótico *S. cerevisiae* UFMG A-905 antes da sensibilização com OVA.

4. Materiais e Métodos

Este estudo trata-se de uma pesquisa experimental. Este projeto 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 nº022/2011), anexo 1.

4.1 Amostragem

Camundongos machos da linhagem Balb/c de 6-8 semanas foram utilizados. Os animais foram obtidos no Biotério Central da FMRP-USP.

4.2 Condicionamento dos animais

Os animais foram adquiridos do Biotério Central da FMRP-USP sete dias antes de iniciarmos o protocolo, para aclimatização com o novo ambiente, mantidos no Biotério da Clínica Médica da FMRP-USP. Foram mantidos de 4-5 animais em mini-isoladores auto-clavados com ventilação individual para camundongos em rack ventilada (Alesco, Brasil). Os animais tinham livre acesso a comida e água auto-clavadas e foram mantidos em sala com controle de temperatura e luminosidade 12/12h.

4.3 Microrganismo utilizado como paraprobiótico

Neste estudo foi utilizado como paraprobiótico a levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905. Esta levedura foi isolada da cana-de-açúcar (produção de cachaça), pertencente ao banco de cepas do Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG), gentilmente cedida pelo prof. Flaviano dos Santos Martins do Departamento de Microbiologia do ICB-UFMG. A levedura foi analisada, caracterizada fenotipicamente e selecionada dentre 12 linhagens de *S. cerevisiae* por apresentar melhor habilidade de colonização e conservação de níveis populacionais satisfatório no trato gastrointestinal, e efeito protetor (58).

Para armazenamento e conservação, as leveduras foram mantidas em tubos criogênicos de 2ml em meio contendo 1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2%

de dextrose bacteriológica (Yeast Extract Peptone Dextrose, YPD) e 25% de glicerol, armazenadas em freezer -80°C (Oxoid LTD, Brasingstoke, Inglaterra).

4.5 Análise microbiológica da linhagem *Saccharomyces cerevisiae*

Antes do cultivo da solução paraprobiótica, certificamos que administraríamos uma solução contendo somente leveduras do gênero *S. cerevisiae*, descartando assim possíveis contaminações por outros microrganismos. A análise foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas da FMRP-USP usando o equipamento O VITEK® 2 (Biomérieux, França).

Para isso, o microrganismo foi isolado previamente e, após, dissolvido em 3ml de solução salina em um tubo totalmente estéril. A turbidez dessa solução foi medida e avaliada por leitura em um turbidímetro entre os valores de 1,8 a 2,2 pela escala de Mc Farland. Pós análise, o volume de 280ul foi transferido para aparelho através de cartões de identificação, e o equipamento fez todos os passos necessários para incubação e leitura. Este equipamento realiza a análise de perfil biológico do microrganismo através da comparação de várias provas bioquímicas, liberando o resultado em probabilidade, demonstrado na tabela 1.

4.6 Cultivos da levedura *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905

Inicialmente, foi preparado um meio YPD sólido com adição de ágar-ágar (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia), que foi colocado em placas de petri estéreis, mantidas em estufa a 37°C por 24 horas para aferir a esterilidade. Após, foi realizada a semeadura da levedura em estoque por técnica de esgotamento, que foram incubadas a 37°C por 48 horas, afim de obter colônias isoladas.

Algumas colônias crescidas nas placas de YPD sólido foram transferidas para 60 ml de meio YPD líquido (10% do volume final de 600ml), que foi posto em shaker sob agitação constante de 160 rotação por minuto (rpm) durante 24 horas a 37°C (pré-inóculo).

Após 24 horas, os 60 ml de pré-inóculo foi transferido para 540 ml de meio YPD líquido, permanecendo sob constante agitação de 160 rpm por 24 horas a 37°C. Após 48h de crescimento foram feitas diluições seriadas do inóculo para determinar a

concentração inicial do meio. As leveduras foram contadas em câmara de Neubauer utilizando corante azul de tripan (Inlab, São Paulo, Brasil). Geralmente, a concentração inicial do meio foi 10^7 leveduras/ml.

4.7 Inativação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 e controle do processo de esterilização

A inativação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 foi realizada por calor, em autoclave a 121°C durante 20 minutos. A certificação de inatividade da levedura foi realizada por meio de indicador químico (fita), biológico e por plaqueamento. Após esterilização, 100ul do inóculo foram plaqueados em placas de YPD sólido estéreis e incubados em estufa a 37°C por 48 horas. As placas foram examinadas observando se houve crescimento de colônias. Adicionalmente foi utilizado o indicador biológico Attest™ 1262 (3M do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), que monitora o funcionamento da autoclave através de mudança de Ph e alteração de cor. A cada ciclo de esterilização foram colocadas 3 ampolas em diferentes posições da autoclave para monitorar o funcionamento.

4.8 Concentrações da solução paraprobiótica e administração do paraprobiótico

O meio de cultura YPD líquido contendo leveduras *S. cerevisiae* UFMG A-905 inativadas foi concentrado em 10^9 leveduras/ml, aliquotados em eppendorfs de 1ml e armazenados em temperatura de 2° a 8°C .

O paraprobiótico foi administrado aos animais via oral utilizando a técnica de gavagem. Foi administrada uma solução de 100ul contendo 1×10^9 UFC/ml de leveduras inativadas por 27 dias consecutivos, iniciando 10 dias antes da primeira sensibilização. O grupo controle recebeu apenas PBS pelo mesmo período (Figura 2).

4.9 Sensibilização e desafios com Ovalbumina (OVA)

Os animais foram sensibilizados duas vezes via intraperitoneal (I.P) com 200ul de uma solução contendo 10ug de Albumina de ovo de galinha liofilizada (OVA) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) e 1mg de alúmen ($\text{Al}(\text{OH})_3$) (Sigma-Aldrich, Co, St Louis, USA), com uma semana de intervalo entre as aplicações. Sete dias após a segunda sensibilização, os animais foram submetidos a três desafios em dias consecutivos com 50ul de uma solução contendo com 10ug de OVA via intranasal (I.N), sob leve anestesia (cloridrato de xilasina 10 mg/kg e cloridrato de cetamina 100 mg/kg) (Syntec do Brasil LTDA, São Paulo, Brasil). Os animais do grupo controle foram sensibilizados e desafiados com salina, nos mesmos dias (Figura 2). Os experimentos foram realizados 24 horas após o último desafio.

4.10 Divisão dos grupos analisados

Três grupos de 8-10 camundongos foram estudados. A figura 2 demonstra o protocolo de sensibilização, desafios e tratamento. O tratamento de todos os grupos iniciou-se dez dias antes da primeira sensibilização e continuou até o último desafio.

Grupo OVA/PBS: 10 dias antes da primeira sensibilização os camundongos receberam diariamente PBS estéril por gavagem, foram sensibilizados e desafiados com OVA.

Grupo SAL/PBS: 10 dias antes da primeira sensibilização os camundongos receberam diariamente PBS estéril por gavagem, foram sensibilizados e desafiados com solução salina isotônica estéril.

Grupo OVA/SAC UFMG A-905 inativadas: 10 dias antes da primeira sensibilização os camundongos receberam diariamente *S. cerevisiae* UFMG A-905 inativadas pelo calor por gavagem, foram sensibilizados e desafiados com OVA.

Figura 2: Protocolo de sensibilização, desafios e tratamento

4.11 Controle de inativação da levedura após administração aos animais

A análise de inatividade após a administração oral e passagem pelo trato gastrointestinal foi realizada com o cultivo das fezes dos animais. Para isso, as fezes foram coletadas, pesadas e dissolvidas em solução salina numa concentração de 10%. Posteriormente, foi feita uma diluição 1:10, e 100ul da diluição foram plaqueados no meio de cultura Ágar saboraud dextrose (ASD) com adição do antibiótico cloranfenicol (Novafarma, Anápolis, GO, Brasil) para inibir o crescimento dos demais microrganismos presentes na flora intestinal. As placas foram mantidas em estufa a 37°C por 48 horas.

4.12 Avaliação *in vivo* da hiper-responsividade brônquica

A avaliação da função pulmonar foi realizada com um ventilador para pequenos animais, FlexiVent® (Scireq, Montreal, QC, Canadá). Vinte e quatro horas após o último desafio, os animais foram anestesiados I.P. (cloridrato de xilasina 10 mg/kg e cloridrato de cetamina 100 mg/kg; Syntec do Brasil LTDA, São Paulo, Brazil), foi inserida uma cânula traqueal e eles foram conectados ao aparelho FlexiVent®, com uma frequência respiratória de 150 respirações/minuto e PEEP de 3 cmH₂O. Os camundongos foram submetidos a paralisia muscular com a administração de brometo de pancurônio I.P. (1.2 mg/kg; Cristália, Itapira, SP, Brasil) e, somente após completamente anestesiados e paralisados, as medidas respiratórias foram realizadas.

Este ventilador permite a realização de medidas *in vivo* de diversos parâmetros da mecânica respiratória pela técnica de oscilação forçada, com o modelo de compartimento simples e o modelo de fase constante. Estes dois modelos permitem a determinação da resistência e elastância do sistema respiratório e também a separação das alterações nos diferentes compartimentos pulmonares, como vias aéreas e parênquima (68, 69). Para isso, antes da coleta dos dados de mecânica respiratória, os pulmões são insuflados até uma pressão de 27 cmH₂O para homogeneização pulmonar. No modelo de compartimento simples, apenas uma onda sinusoidal em uma frequência única é aplicada, sendo então utilizada a seguinte equação:

$$P(t) = RV_{(t)} + EV_{(t)} + P_0$$

Equação 1

Onde $P_{(t)}$ é a pressão na entrada do modelo, $\dot{V}_{(t)}$ é o fluxo de gás, $V_{(t)}$ é o volume de gás no compartimento elástico, P_0 é a pressão aplicada de repouso (pressão positiva expiratória final), e t é o tempo.

No modelo de impedância complexo, o pistão, controlado por um computador, aplica 13 componentes senoides com frequências primas que vão de 1 a 20,5 Hz, durante um período de três segundos (quick prime-3 perturbation). Regressão linear múltipla é então utilizada para ajustar os dados no modelo de fase constante do pulmão, descrito por *Hantos et al*, usando a seguinte equação (70) :

$$Z_{in}(f) = R + i2\pi fI + \frac{Gt - iHt}{(2\pi f)\alpha}$$

Equação 2

Onde Z_{in} é a impedância do sistema respiratório, R é a resistência das vias aéreas (resistência newtoniana), i representa a unidade imaginária, I é a inércia essencialmente igual à do gás nas vias aéreas centrais, Gt reflete a dissipação de energia viscosa no tecido e está intimamente relacionada com a resistência das vias aéreas periféricas, Ht reflete a energia acumulada no tecido e está intimamente relacionada com a elastância tecidual, e f a frequência respiratória (68, 69).

$$\alpha = (2/\pi) \tan^{-1}(Ht/Gt)$$

Equação 3

Foram feitas medidas na condição basal e após a provocação com a administração de concentrações crescentes de aerossóis com metacolina (6,25; 12,5; 25, 50 e 100 mg/ml) por 10 segundos através de um nebulizador ultrassônico (Hudson RCI, Teleflex Medical, Temecula, CA, EUA). Os parâmetros respiratórios foram selecionados das curvas que apresentaram um coeficiente de determinação maior ou igual a 0,85 ($COD \geq 0,85$). Foram avaliados e comparados os seguintes parâmetros: resistência total (RRS), elastância total (ERS), resistência tecidual (G) e elastância tecidual (H).

4.13 Quantificação de células inflamatórias no LBA

Logo após a avaliação da responsividade brônquica, foi feita a coleta do lavado broncoalveolar (LBA) a fim de quantificar a inflamação pela análise de células e citocinas. Para isso, o LBA foi coletado duas vezes pela instilação e aspiração de 1 ml de solução salina isotônica estéril pela cânula traqueal. As duas amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante da primeira amostra foi coletado e armazenado a -80°C para dosagem de citocinas e o da segunda amostra descartado. Os precipitados (pellet) das duas amostras foram suspensos em 500ul de solução salina isotônica estéril gelada. Foi realizada a contagem de células totais em uma câmara de Neubauer com o corante azul de trypan.

Para quantificar células diferenciais, 100ul de cada amostra foram centrifugados a 400 rpm por 3 minutos em centrífuga cytospin (Cytospin IV, Thermo Scientific, Runcorn, Cheshire, EUA). As lâminas foram coradas por coloração hematológica Panótico Rápido LB (Labroclin, Pinhais, Pr, Brasil), e foram contadas 300 células inflamatórias de cada amostra, divididas entre eosinófilos, macrófagos, linfócitos e neutrófilos. O resultado foi expresso em porcentagem e células/ml.

4.14 Coleta de soro e do pulmão

Após a coleta do LBA, foi feita a coleta do sangue através da punção do coração, que foi centrifugado a 3300 rpm por 22 minutos a 4°C, e o soro foi armazenado em freezer -80°C para dosagem de anticorpos.

O pulmão foi lavado com 5ml solução salina estéril infundidos pelo ventrículo direito. Após lavagem, o pulmão foi retirado da caixa torácica e dividido em lóbulos direito e esquerdo, no qual o direito foi armazenado em RNAlater (Qiagen, Austin, TX, USA) para preparo do homogenato pulmonar e dosagem de citocinas. O lóbulo esquerdo foi insuflado com formol 10%, armazenado em cassetes histológicos e processado no laboratório de Patologia da FMRP-USP.

4.15 Processamento do Homogenato Pulmonar

O homogenato pulmonar foi produzido pela trituração do tecido pulmonar com adição de um inibidor de protease (Roche diagnostics Gmbh, Mannheim, Germany). Após macerar o tecido com a solução anti-protease, o material foi centrifugado 1900 rpm por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante da amostra foi coletado e armazenado em pequenas alíquotas em freezer -80°C para posterior análise de citocinas.

4.16 Dosagem de citocinas inflamatórias no homogenato pulmonar e LBA

As citocinas inflamatórias IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17A e IFN- γ foram dosadas no homogenato pulmonar e no LBA por ELISA seguindo as instruções dos fabricantes BD Biosciences (Biosciences, San Diego, CA, USA) e eBioscience (eBiosciences, San Diego, CA, USA).

4.17 Detecção de anticorpos OVA-Específico

A quantificação de anticorpos IgE específicos para OVA foi realizada por ELISA, como previamente descrito (71). Brevemente, inicialmente foi adicionada a placa 100ul por poço de uma solução contendo 10 μ g de OVA. Após 24h, a placa foi lavada manualmente com solução contendo PBS1X e 0,05% de Tween (Sigma-Aldrich Brasil LTDA, Duque de Caxias, RJ, Brasil). Após, 100ul de tampão de bloqueio contendo PBS1X, 10% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich Brasil LTDA, São Paulo, SP, Brasil) e 0.005% de Tween foram adicionados nos poços e incubados por 1 hora a 37°C para bloquear reações inespecíficas. Os poços foram lavados novamente e 100ul das amostras de soro foram adicionadas e incubadas a 37°C por 2 horas. Após 2 horas, os poços foram lavados e 100ul de anticorpo biotinilado diluídos 1:1000 foram adicionados e incubados por 1 hora a 37°C. Os poços foram lavados e 100ul da enzima estreptavidina diluída 1:250 foram adicionados e a placa foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente com ausência de luz. Após, 100 ul de TMB (BD, Bioscience, EUA) foram adicionados por poço, incubados por 30 minutos em temperatura ambiente. Interrompemos a reação com 50ul de solução de ácido sulfúrico 16%, e a absorbância das amostras foi capturada através de espectrofotômetro (Bio-Tek ELX 800™, Wincoski, VT, USA) com comprimento de onda de 450nm.

4.18 Processamento do pulmão

O processamento histológico foi realizado com auxílio do prof. Dr. Alexandre Todorovic Fabro do Departamento de Patologia e Medicina Legal da FMRP-USP. Os pulmões foram previamente colocados em cassetes histológicos e imersos em formol tamponado 10% (Lio Serum Produtos Laboratoriais e Hospitalares LDTA, Ribeirão Preto, SP, Brasil) por 24 horas. Após, os tecidos foram imersos em álcool 70% e armazenados até processamento. Os tecidos foram parafinados, submetidos a micro-cortes com espessura de 5µm e fixados em lâminas. As lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) para avaliação da inflamação pulmonar e Ácido Periódico Schiff (PAS) (Erviagas L.C Ltda, São Paulo, Brasil) para avaliação da produção de muco.

4.19 Análise morfométrica do pulmão

Foram selecionados de 4 a 5 vias aéreas por animal, com epitélio íntegro que apresentavam relação diâmetro maior/diâmetro menor $\geq 0,5$. As vias aéreas foram então fotografadas num aumento de 200 vezes pelo microscópio LeicaDM500 (Leica, Alemanha). Após, as imagens foram transferidas para um computador e a análise morfométrica foi realizada com auxílio de um retículo de retas e pontos (50 retas, 100 pontos) (72). Para quantificação da inflamação pulmonar, o retículo foi posicionado sobre as imagens das vias aéreas e a aérea entre a membrana basal e peribrônquica foi delimitada. Após, foram contadas todas as retas que passavam na aérea pré-determinada, e também somente as retas que passavam por células inflamatórias, na mesma área. O resultado foi expresso pela divisão das retas com células inflamatórias pelas retas totais (73).

Para avaliar a produção de muco, o retículo foi posicionado sobre as imagens com coloração PAS e a aérea da membrana basal foi delimitada. A avaliação foi realizada pela contagem de todas as retas que passavam pela membrana basal e também pelas retas que passavam por células caliciformes. O resultado foi expresso pela divisão das retas com células caliciformes pelas retas totais.

4.20 Análise estatística

Os dados foram analisados com o software *GraphPad Prism* versão 5.0 (GraphPad-Prism software Inc, San Diego, CA, USA). As variáveis categóricas foram expressas como porcentagem e as variáveis contínuas por média e erro padrão. A comparação dos grupos foi realizada por análise de variância *One Way* e *Two Way* ANOVA com aplicação de pós-teste de Bonferroni. Os resultados foram expressos em média, erro padrão ou porcentagem. Foram considerados significantes valores de $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1 Análise microbiológica

Tabela 1: Relatório de análise microbiológica. Demonstra o resultado da análise microbiológica. Houve uma confiança de identificação excelente, com 96% de probabilidade do microrganismo avaliado ser a levedura *S. cerevisiae*.

Informações de Identificação	Carta YST	Lote:243379320
Microrganismo Selecionado	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Probabilidade	96%	
Confiança	Excelente	
Concluído	16/03/2016	

Fonte: HC-MFRP

5.1 Inativação do paraprobiótico *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905

A inativação da levedura foi conferida em dois momentos, após o processo de esterilização e após a administração aos animais. Não houve crescimento de leveduras em ambas análises, confirmando sua inatividade do início ao fim do experimento.

Figura 3: Avaliação de inativação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 antes da administração e após administração aos animais

5.2 Avaliação *in vivo* da hiper-responsividade brônquica

A avaliação da responsividade brônquica é demonstrada na figura 4. O grupo sensibilizado e desafiado com OVA, quando comparado com o grupo SAL/PBS, apresentou aumento significativo na hiper-responsividade, demonstrado por aumento em RRS nas doses de 12,5, 25 e 50 mg/ml de metacolina; ERS nas doses de 25, 50 e 100 mg/ml, G nas doses de 25 e 50 mg/ml e H nas doses de 25, 50 e 100 mg/ml ($p < 0,05$). A administração de *S. cerevisiae* UFMG A-905 inativadas por calor não alterou significativamente a hiper-responsividade brônquica.

Figura 4: Avaliação da hiper-responsividade brônquica. A hiper-responsividade brônquica foi avaliada 24h horas após o último desafio com doses crescentes de metacolina. Dez dias antes da primeira sensibilização, os animais receberam diariamente *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 inativadas pelo calor ou PBS por gavagem e foram sensibilizados e desafiados com OVA ou solução salina. (n=8). Os valores foram expressos como média e erro padrão; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.3 Quantificação de células totais no LBA

A contagem de células totais do LBA é mostrada na figura 5. O grupo OVA/PBS apresentou aumento significativo no número totais de células quando comparado ao grupo SAL/PBS ($p<0,01$). Os animais tratados com o paraprobiótico *S. cerevisiae* UFMG A-905 apresentaram aumento significativo no número totais de células no LBA em comparação com o grupo OVA/PBS ($p<0,05$).

Figura 5: Quantificação de células totais no LBA. Dez dias antes da primeira sensibilização, os animais receberam diariamente *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 inativadas pelo calor ou PBS por gavagem e foram sensibilizados e desafiados com OVA ou solução salina. ($n=8$). Os valores foram expressos como média e erro padrão; * $p<0,05$, ** $p<0,01$.

5.4 Avaliação de células diferenciais no LBA

A figura 6 representa a avaliação de células diferenciais no LBA. Na avaliação do número absoluto de células, houve um aumento significativo no número de eosinófilos no grupo OVA/PBS em comparação ao grupo SAL/PBS ($p < 0,001$), e de neutrófilos no grupo tratado com o paraprobiótico *S. cerevisiae* UFMG A-905 em comparação ao grupo OVA/PBS ($p < 0,001$). Na avaliação percentual, o grupo OVA/PBS apresentou aumento significativo de eosinófilos e redução significativa na porcentagem de macrófagos e neutrófilos, em comparação ao grupo SAL/PBS ($p < 0,001$). A administração do paraprobiótico *S. cerevisiae* UFMG A-905 reduziu significativamente a porcentagem de eosinófilos ($p < 0,001$) e aumentou a porcentagem de neutrófilos ($p < 0,001$) em relação ao grupo OVA/PBS.

Figura 6: Quantificação de células diferenciais no LBA. Dez dias antes da primeira sensibilização, os animais receberam diariamente *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 inativadas pelo calor ou PBS por gavagem e foram sensibilizados e desafiados com OVA ou solução salina. ($n=8$). Os valores foram expressos como média e erro padrão; *** $p < 0,001$.

5.5 Avaliação da produção de citocinas no homogenato pulmonar

As citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17A e INF- γ foram dosadas no homogenato pulmonar e encontram-se na figura 7. Houve aumento significativo nos níveis de IL-5 e IL-13 do grupo OVA/PBS em comparação ao grupo SAL/PBS ($p<0,05$). A administração paraprobiótico *S. cerevisiae* UFMG A-905 foi capaz de reduzir significativamente os níveis de IL-13 ($p<0,05$), e aumentou significativamente os níveis de IL-17 ($p<0,001$), em comparação ao grupo OVA/PBS.

Figura 7: Níveis de citocinas no homogenato pulmonar. Dez dias antes da primeira sensibilização, os animais receberam diariamente *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 inativadas pelo calor ou PBS por gavagem e foram sensibilizados e desafiados com OVA ou solução salina. ($n=8$). Os valores foram expressos como média e erro padrão; * $p<0,05$, *** $p<0,001$.

5.6 Avaliação da produção de citocinas no LBA

Houve aumento significativo nos níveis de IL-5 e IL-13 do grupo OVA/PBS em comparação ao grupo SAL/PBS ($p < 0,05$) demonstrados na figura 8. A administração do paraprobiótico *S. cerevisiae* UFMG A-905 foi capaz de reduzir significativamente os níveis de IL-5, em comparação ao grupo OVA/PBS ($p < 0,01$).

Figura 8: Níveis de citocinas no LBA. Dez dias antes da primeira sensibilização, os animais receberam diariamente *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 inativadas pelo calor ou PBS por gavagem e foram sensibilizados e desafiados com OVA ou solução salina. (n=8). Os valores foram expressos como média e erro padrão; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

5.7 Avaliação da produção de anticorpos

Os níveis de IgE OVA-específico encontram-se na figura 9. Houve um aumento significativo no grupo OVA/PBS em relação ao grupo controle (SAL/PBS) ($p < 0,001$). A administração do paraprobiótico *S. cerevisiae* OVA/SAC UFMG A-905 reduziu significativamente os níveis de IgE OVA-específico, quando comparado com o grupo asmático não tratado (OVA/PBS) ($p < 0,01$).

Figura 9: Nível de IgE no soro. Dez dias antes da primeira sensibilização, os animais receberam diariamente *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 inativadas pelo calor ou PBS por gavagem e foram sensibilizados e desafiados com OVA ou solução salina. (n=8). Os valores foram expressos como média e erro padrão; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.8 Quantificação de células inflamatórias no tecido pulmonar

Os animais sensibilizados e desafiados com OVA apresentaram aumento significativo na inflamação pulmonar, demonstrado por aumento no número de células inflamatórias no parênquima pulmonar quando comparado com seu respectivo controle ($p < 0,001$). Os animais asmáticos tratados com o paraprobiótico *S. cerevisiae* UFMG A-905 não apresentaram redução significativa na quantidade de células inflamatórias demonstrados na figura 10.

Figura 10: Células inflamatórias no tecido pulmonar. Morfometria HE. Representação fotomicrográfica dos grupos (A) SAL/PBS, OVA/PBS (B), OVA/SAC UFMG A-905 inativadas (C). Dez dias antes da primeira sensibilização, os animais receberam diariamente *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 inativadas pelo calor ou PBS por gavagem e foram sensibilizados e desafiados com OVA ou solução salina. ($n=8$). Os valores foram expressos como média e erro padrão; *** $p < 0,001$.

5.9 Quantificação da produção de muco nas vias aéreas

Houve um aumento significativo na produção de muco dos animais alérgicos (OVA/PBS) em relação ao controle (SAL/PBS) ($p < 0,001$). A administração do paraprobiótico *S. cerevisiae* UFMG A-905 reduziu significativamente a produção de muco comparado aos animais asmáticos tratados com salina ($p < 0,01$), figura 11.

Figura 11: Produção de muco. Morfometria PAS. Representação fotomicrográfica dos grupos (A) SAL/PBS, OVA/PBS (B), OVA/SAC UFMG A-905 inativadas (C). Dez dias antes da primeira sensibilização, os animais receberam diariamente *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 inativadas pelo calor ou PBS por gavagem e foram sensibilizados e desafiados com OVA ou solução salina. ($n=8$). Os valores foram expressos como média e erro padrão; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

6. Discussão

Nesse trabalho, nós avaliamos o potencial terapêutico da administração da *S. cerevisiae* UFMG A-905 inativadas pelo calor em animais sensibilizados com OVA, e seus possíveis efeitos na prevenção de asma em um modelo animal. Nossos resultados demonstraram que a administração desse paraprobiótico apresentou potencial anti-inflamatório, demonstrado principalmente por redução da inflamação das vias aéreas, na produção de muco, e nos níveis de IgE. Adicionalmente, houve um aumento de neutrófilos e nos níveis de IL-17, porém o paraprobiótico não foi capaz de reduzir a HRB.

A asma é uma doença inflamatória crônica, com alta prevalência e morbidade, responsável por inúmeras hospitalizações e prejuízos sociais (1, 7, 8). Até o presente momento, não possui cura, sendo que seu tratamento é baseado, principalmente, na utilização de corticosteroides, que pode ocasionar efeitos colaterais (1, 2, 6). Desta forma, torna-se necessário a busca de medidas alternativas para sua prevenção ou tratamento, que sejam capazes de promover efeitos terapêuticos semelhantes com menos efeitos indesejáveis.

O desenvolvimento da doença ocorre devido a interações complexas entre fatores genéticos e ambientais (74). Uma das possíveis explicações pode ser um desbalanço imunológico nas respostas Th1/Th2, com predomínio de resposta Th2 (9). Nos últimos anos, tem aumentado as pesquisas que buscam estratégias para restaurar o equilíbrio nas respostas Th1/Th2 e/ou induzir Treg, amenizando a resposta imunológica (75).

Nesse sentido, utilizando como base a teoria da higiene, uma maior exposição a microrganismos e contatos não higiênicos pode, potencialmente, colaborar com o melhor desenvolvimento do sistema imunológico, reduzindo assim o risco de doenças alérgicas (24).

Nosso grupo demonstrou que a administração de *S. cerevisiae* UFMG A-905 vivas preveniu o desenvolvimento de asma em um modelo animal, demonstrado por redução da HRB, inflamação das vias aéreas e pulmonar e na produção de muco. Considerando que os mecanismos de ação da *S. cerevisiae* UFMG A-905 podem estar presentes mesmo com a levedura inativada (63), nesse estudo nós avaliamos

se a levedura inativada pelo calor também protegeria contra o desenvolvimento da asma.

Dessa forma, primeiramente nós inativamos a levedura por calor e avaliamos a eficácia dessa inativação por dois diferentes métodos em dois momentos distintos. Nos dois momentos, não houve crescimento da levedura, confirmado assim que a inativação pelo calor foi efetiva. Desta forma, garantimos que a solução administrada aos animais estava totalmente inativada e que os efeitos alcançados fossem independente de sua viabilidade (63). Após, avaliamos os seus efeitos na mecânica respiratória, inflamação das vias aéreas e pulmonar.

A HRB é uma das características centrais na asma e, embora os mecanismos envolvidos não foram totalmente elucidados, diversos fatores (ex. genético, ambiental, inflamação, estruturais) e a interação de diferentes mecanismos colaboram com o desenvolvimento da HRB na asma (16). Possíveis explicações incluem a presença de células inflamatórias como eosinófilos, aumento da massa muscular lisa, alterações musculares, redução do calibre das vias aéreas, espessamento da parede brônquica, aumento de permeabilidade, presença de mediadores químicos e maior contractilidade muscular (17, 76).

Em nosso estudo, os animais sensibilizados e desafiados com OVA apresentaram um aumento na HRB em relação ao grupo sensibilizado e desafiado com salina, confirmando que o modelo de asma utilizado foi adequado. Esse aumento da HRB foi acompanhado por aumento de células totais, eosinófilos, citocinas inflamatórias como IL-4, IL-5 e IL-13, e níveis de IgE ova-específico, o que reforça o quadro de resposta imunológica de perfil Th2. Entretanto, a administração do paraprobiótico *S. cerevisiae* UFMG A-905 não foi capaz de reduzir significativamente a HRB.

Estudos prévios também avaliaram os efeitos de outras linhagens probióticas na HRB em modelo animal de asma, principalmente as de origens bacterianas, como as linhagens *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, com resultados divergentes (42-44, 46).

Wu et al demonstraram que a administração oral de *L. rhamnosus* GG (LGG) reduziu a HRB, a inflamação das vias aéreas, a produção de citocinas Th2 como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 no LBA, o número de células totais e eosinófilos, e os níveis de IgE (42). De modo semelhante, a administração de *Lactobacillus salivarius* preveniu

a inflamação das vias aéreas atenuando a resposta alérgica por redução de eosinófilos, níveis de IgE, eotaxina e HRB (44).

Em um outro estudo, *Hsieh et al.* demonstraram que a administração de *L. gasseri* reduziu a inflamação das vias aéreas e a HRB em animais sensibilizados e desafiados com *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Der p*). Essa redução estava associada a diminuição no número de células totais e eosinófilos, nos níveis de IgG1, e 17, e aumento nos níveis de IgG2A e IL-10, assim como a expressão do gene *PPAR γ* por células dendríticas (43).

Por outro lado, em camundongos desafiados com OVA e tratados com *B. longum*, *MacSharry et al* demonstraram o probiótico foi capaz de modular a resposta inflamatória e reduzir células totais e eosinófilos, porém sem causar alterações na HRB (46).

Embora a maioria dos estudos mencionados acima foram eficazes para reduzir a inflamação e a HRB, a metodologia utilizada em alguns desses estudos foi a de avaliação indireta da mecânica respiratória, como a pletismografia de corpo inteiro, que não é capaz de gerar dados de resistência. Desta forma, os resultados podem não condizer fidedignamente com as alterações encontradas na asma (77, 78). Em nosso trabalho, os dados apresentados de mecânica respiratória foram realizados através de avaliação direta por técnica de oscilação forçada, considerada padrão ouro de análise (79). Esse pode ser uma das possíveis explicações pelo não efeito do paraprobiótico na mecânica pulmonar.

Por outro lado, como a forma ativa da *S. cerevisiae* UFMG A-905 foi capaz de reduzir a HRB (63), provavelmente a redução da HRB está ligada a ações da levedura viva e/ou à potência anti-inflamatória. Os efeitos imunomodulatórios promovidos por microrganismos comensais estão intimamente relacionados à linhagem e suas características, uma vez que as comparações entre diferentes linhagens assim como suas formas de administração (ativos/inativados) resultaram em efeitos diferentes (49, 80).

Resultados semelhantes aos deste trabalho foram demonstrados por Forsythe *et al* em um estudo que avaliou os efeitos de dois probióticos, *L. salivarius*, e *L. reuteri*, e paraprobióticos na resposta alérgica das vias aéreas. Os autores demonstraram que apenas o tratamento oral com o probiótico *Lactobacillus reuteri* foi capaz de reduzir

inibir a resposta alérgica e a HRB, enquanto o paraprobiótico não reduziu a HRB e a inflamação (49).

Adicionalmente, diferenças no perfil de citocinas envolvidas no processo inflamatório após os tratamentos podem influenciar os efeitos promovidos por probióticos e paraprobióticos. *Desta maneira, enquanto o uso do paraprobiótico L. reuteri foi ineficaz em reduzir a resposta alérgica das vias aéreas (49), o paraprobiótico Mycobacterium vaccae reduziu a inflamação pulmonar em camundongos sensibilizados com OVA. Interessantemente, a administração do paraprobiótico L. reuteri casou uma redução significativa de IL-5 sem modificação em IL-10 no LBA, enquanto a Mycobacterium vaccae causou o efeito praticamente oposto, ou seja, levou a um aumento nos níveis de IL-10 sem modificações em IL-5 no LBA (49, 80).*

Neste trabalho também se observa que o perfil de citocinas obtido com a administração da forma paraprobiótica de *S. cerevisiae* UFMG A-905 difere dos apresentados pela forma probiótica. A forma probiótica de *S. cerevisiae* UFMG A-905 reduziu a HRB, células totais, eosinófilos, as citocinas IL-4, IL-5, IL-13, a inflamação pulmonar, produção de muco, e aumentou os níveis de IFN- γ , IL-10 e IL-17 (63). Enquanto a forma paraprobiótica de *S. cerevisiae* UFMG A-905 reduziu os níveis de IL-5, IL-13, a quantidade de eosinófilos, IgE, a produção de muco, aumentando os níveis de IL-17 sem alterações na HRB. Sendo assim, a redução da HRB causada pelo probiótico *S. cerevisiae* UFMG A-905 (63) pode ser atribuída a efeitos não apresentados pela forma paraprobiótica, como a redução de IL-4 no LBA, e redução da inflamação pulmonar.

Em relação à contagem de células no LBA, os animais tratados com o paraprobiótico *S. cerevisiae* UFMG A-905 não apresentaram redução no número de células totais. Resultados semelhantes foram descritos por Forsythe *et al*, em que o paraprobiótico *L. reuteri* também não reduziu a quantidade de células totais presente no LBA de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA (49).

Por outro lado, os probióticos *L. reuteri* e *S. cerevisiae* UFMG A-905 resultaram em redução de células totais no LBA (49, 63). A diferença nesses resultados pode ser explicada pelo tipo de probiótico, se foram administrados vivos ou mortos, protocolo de sensibilização e desafios, dose e período de administração. Assim, outros

protocolos de administração do paraprobiótico *S. cerevisiae* UFMG A-905 devem ser realizados para avaliar seus efeitos no número de células das vias aéreas e HRB.

Embora a administração do paraprobiótico *S. cerevisiae* UFMG A-905 não tenha reduzido a HRB e a quantidade de células totais presentes no LBA, outros efeitos terapêuticos na inflamação das vias aéreas e pulmonar foram demonstrados, como uma redução na porcentagem de eosinófilos no LBA, nos níveis de IgE, na produção de muco, bem como nos níveis de duas importantes citocinas inflamatórias na asma, IL-5 e IL-13.

Considerada célula de papel central na asma, os eosinófilos são granulócitos produzidos na medula óssea presentes em baixas quantidades em condições normais (81). Na medula óssea são diferenciados, migram pela corrente sanguínea por meio de estímulos para o pulmão e outros órgãos. Pacientes asmáticos apresentam maiores números dessas células, e esse aumento está relacionado com a gravidade da HRB (82, 83).

Em nosso estudo, a administração do paraprobiótico *S. cerevisiae* UFMG A-905 reduziu significativamente a quantidade de eosinófilos presentes no LBA dos animais sensibilizados com OVA, o que demonstra que o paraprobiótico foi capaz de reduzir a inflamação das vias aéreas, uma importante característica da asma.

Além da eosinofilia, a asma é caracterizada por inflamação de perfil Th2, com o envolvimento de diversas citocinas, tais como IL-4, IL-5 e IL-13, tais citocinas podem ser essenciais para o desenvolvimento e perpetuação da asma (9). A IL-5 é classificada como condutor fundamental da eosinofiloiose, e infiltração de eosinófilos nas vias aéreas, entretanto a capacidade de resposta das vias aéreas pode ocorrer também por ação de outros mediadores e citocinas (84).

Adicionalmente, estudos *in vitro*, animal e clínicos demonstraram que a IL-13 também possui importante função como condutora de eosinófilos, e tem ligação direta com resposta de perfil Th2 (81), especialmente em exposições secundárias (84).

A administração preventiva da solução paraprobiótica reduziu significativamente os níveis de IL-5 e IL-13, o que pode estar diretamente relacionada com a redução da quantidade de eosinófilos no LBA. Como a solução continha somente leveduras inativadas, muito provavelmente, alguns componentes presentes

na parede de leveduras, como beta-glucanas podem ter sido responsáveis pela ação anti-inflamatória observada. Estudos prévios já demonstraram que beta-glucanas, lipopolissacarídeos e peptidoglicanos podem se apresentar como potentes ativadores imunes (85).

Por outro lado, o paraprobiótico induziu a um aumento na quantidade de neutrófilos no grupo tratado com a levedura inativada, e esse aumento foi acompanhado pelos níveis da citocina IL-17A. A produção de IL-17A está relacionada com modulação da resposta Th2, e sua produção resulta no aumento de infiltrados neutrofílicos após exposição a antígenos (86). Assim, o aumento nos níveis de IL-17A pode ter contribuído com o aumento de neutrófilos através de modulação da resposta Th2 ou desvio de resposta para perfil Th17.

Recentemente, a produção de IL-17 por células T auxiliaadoras tem sido considerada um importante controle em várias doenças inflamatórias crônicas (87). Além disso, células Th17 produtoras de IL-17 são descritas como condutoras de inflamação em doenças autoimunes e também tem um importante papel regulador na fisiopatologia de asma alérgica.

A IL-17 encontra-se aumentada no escarro, LBA e soro de pacientes com asma grave, e pode induzir células para o pulmão capazes de secretar citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas responsáveis pela infiltração de neutrófilos (88). Por outro lado, *Schnyder-Candrian et al* relataram que a IL-17 pode ter um papel de regulação negativa na asma alérgica. A administração de IL-17 em camundongos alérgicos reduziu a produção de quimiocinas como a TARC, o recrutamento de eosinófilos, linfócitos e eotaxinas, por agir na ativação de célula dendríticas e absorção de antígenos. Além disso, houve menor ativação de células T e consequentemente menor produção de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, reduzindo assim a resposta alérgica (89).

O aumento nos níveis de IL-17A e neutrófilos encontrado em nosso trabalho pode ter sido pela composição estrutural do microrganismo utilizado. Leveduras são fungos unicelulares, muito utilizadas para fermentação na fabricação de pães, cervejas e vinhos. A *S. cerevisiae* é a levedura mais comumente conhecida e utilizada entre as mais de 350 espécies conhecidas no reino *fungi* (90). A parede celular de

leveduras é composta por quatro classes de macromoléculas, dentre elas as beta-glucanas (91).

As beta-glucanas são polissacarídeos formados por polímeros de glicose, presentes na parede de organismos celulares, sendo que nas leveduras é o componente que ocupa maior porção (48-60%)(90). As moléculas de beta-glucanas normalmente não são presentes em células de mamíferos (92), desta maneira sua presença faz com que haja interação e resposta com células do sistema imune inato.

A resposta imune às beta-glucanas acontece por meio de seu reconhecimento através de receptores presentes em leucócitos como macrófagos, monócitos, neutrófilos e células NK. Devido a essa complexa e não totalmente elucidada interação, atualmente as beta-glucanas têm sido apontadas como modificadoras da resposta imune (90). *LeBlanc et al* determinaram em estudos animais e *in vitro* que o tratamento de pneumonia com beta-glucanas resultou no aumento de neutrófilos no local de inflamação (92).

Corroborando com nossos achados, a administração do probiótico *S. cerevisiae* UFMG A-905 na prevenção de asma, apresentou aumento no número de neutrófilos e IL-17A (63). Desta forma, a presença de beta-glucanas na parede celular do paraprobiótico *S. cerevisiae* UFMG A-905 pode ser responsável pelo aumento significativo de neutrófilos no LBA.

A produção de IgE por células B ocorre devido a interação entre células T e B e ação de algumas citocinas como IL-4 e IL-13 (93). A apresentação de alérgenos mediados por IgE é considerada importante na asma, uma vez que sua presença contribui para o recrutamento de eosinófilos (94). Além disso, a IgE é um importante mediador presente em doenças alérgicas (50), esses anticorpos estão presentes na primeira linha de defesa contra antígenos e patógenos (95).

Em nosso trabalho, houve redução nos níveis de IgE nos animais asmáticos tratados com o paraprobiótico, bem como nos níveis de IL-13. Isso sugere que um dos possíveis mecanismos de ação da levedura inativa possa ser na imunomodulação que inclui redução de células B produtoras de IgE dependentes de IL-13 (96).

Adicionalmente, a produção de muco por células caliciformes aumenta em pacientes asmáticos. A hiperprodução de muco é um dos fatores que contribui para

gravidade, morbidade e mortalidade na asma (97). *Kuperman et al* por meio de um estudo experimental demonstraram que a IL-13 age diretamente nas células epiteliais das vias aéreas resultando na produção de muco por essas células (98).

O tratamento preventivo com o paraprobiótico também foi capaz de reduzir a produção de muco no parênquima pulmonar. Desta maneira, a redução dos níveis de IL-13 pode ter colaborado com uma menor produção de muco por células epiteliais.

Na última década houve aumento considerável em pesquisas que avaliam cepas probióticas em diversas doenças, inclusive em doenças alérgicas. Em decorrência da definição e classificação do termo probiótico como “microrganismos vivos”, a maioria das pesquisas apenas avaliou o potencial terapêutico na forma ativa desses agentes (42, 45-48, 62, 99-103). Entretanto por apresentar maior segurança, facilidade de manutenção e incorporação em alimentos, os paraprobióticos têm chamado atenção e despertado curiosidade sobre efeitos nas doenças (67).

Estudos prévios já tinham demonstrado potencial terapêutico da levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905 no tratamento de doenças intestinais e alérgica (54, 62, 63). Neste estudo, reforçamos o seu potencial imunomodulador e demonstramos que a forma paraprobiótica também produziu efeitos terapêuticos na asma, principalmente na inflamação das vias aéreas e pulmonar demonstrados por redução de eosinófilos, de citocinas inflamatórias como IL-5 e IL-13, na produção de muco, bem como nos níveis de IgE. Assim, neste trabalho os efeitos benéficos promovidos pelo paraprobiótico *S. cerevisiae* UFMG A-905 foram observados principalmente na inflamação das vias aéreas e pulmonar, reforçando o potencial bioterapêutico dessa levedura mesmo na forma inativada.

Embora haja uma associação entre inflamação e HRB, *Crimi et al* em um estudo clínico demonstraram que o grau de resposta das vias aéreas após estímulo não está diretamente vinculado com o número de células inflamatórias na via aérea. Desta forma, pode existir uma dissociação entre inflamação das vias aéreas e HRB (104), o que justifica o nosso achado.

Embora os efeitos terapêuticos promovidos por probióticos sejam animadores, é necessário avaliar riscos/benefícios, especialmente em pessoas imunossuprimidas, uma vez que casos de fungemia e bacteremia já foram relatados (105). Como alguns dos mecanismos de ação podem não ser diretamente dependente da viabilidade

celular (66), outras formas desses microrganismos ou metabólitos produzidos por eles também devem ser avaliados em diferentes doenças (105). Adicionalmente, há muito a ser estudado na relação microrganismos-hospedeiro e seus benefícios, isso inclui a forma de administração, linhagem, dose, viabilidade, diferentes vias e mecanismos de ação, entre outros fatores.

Algumas limitações deste trabalho foi a não utilização de outros paraprobióticos como comparação. Além disso, só foi avaliado um protocolo de administração. Idealmente, outros protocolos de administração, com maiores doses e mais tempo de administração poderiam ter diferentes resultados. Também não avaliamos os seus efeitos no tratamento da asma.

7. Conclusão

A administração do paraprobiótico *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 atenuou a inflamação das vias aéreas e pulmonar, reduziu o número de eosinófilos no LBA, os níveis de IL-5 e IL-13 e a produção de muco, além de aumentar os níveis de IL-17A.

Assim, concluímos que o paraprobiótico *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 atenuou a inflamação das vias aéreas em modelo animal de asma.

8. Referências

1. Becker AB, Abrams EM. Asthma guidelines: the Global Initiative for Asthma in relation to national guidelines. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2017;17(2):99-103.
2. 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.
3. Network GA. Global Asthma Report. 2014.
4. 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.
5. TISIOLOGIA SBDPE. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o Manejo da Asma. *O Jornal Brasileiro de Pneumologia* 2012. p. S1-S46.
6. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia 2017 [Available from: <https://sbpt.org.br/espaco-saude-respiratoria-asma/>].
7. 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.
8. [IV Brazilian Guidelines for the management of asthma]. *J Bras Pneumol*. 2006;32 Suppl 7:S447-74.
9. Cohn L, Elias JA, Chupp GL. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:789-815.
10. Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, et al. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med*. 1992;326(5):298-304.
11. Pelaia G, Vatrella A, Busceti MT, Gallelli L, Calabrese C, Terracciano R, et al. Cellular mechanisms underlying eosinophilic and neutrophilic airway inflammation in asthma. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:879783.
12. 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.
13. Campos HS. Asma: suas origens, seus mecanismos inflamatórios e o papel do corticosteróide. *Revista Brasileira de Pneumologia*. 2007.
14. Pelaia G, Vatrella A, Maselli R. The potential of biologics for the treatment of asthma. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11(12):958-72.
15. Grootendorst DC, Rabe KF. Mechanisms of bronchial hyperreactivity in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2004;1(2):77-87.

16. Paul M. O'Byrne. Airway Hyperresponsiveness. In: MB F, and Mark D. Inman M, editors. CHEST2003. p. 411-6.
17. ADALBERTO SPERB RUBIN, CARLOS ALBERTO DE CASTRO PEREIRA, JOSÉ ALBERTO NEDER, JUSSARA FITERMAN, PIZZICHINI MMM. Hiperresponsividade brônquica. 2002.
18. HOLGATE ST. Pathogenesis of Asthma. In: A.B.el' g, editor. Allergy and Allergic Diseases. Blcackwell Publishing2008.
19. Bergeron C, Al-Ramli W, Hamid Q. Remodeling in asthma. Proc Am Thorac Soc. 2009;6(3):301-5.
20. 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.
21. Strickland DH, Holt PG. T regulatory cells in childhood asthma. Trends Immunol. 2011;32(9):420-7.
22. Ryanna K, Stratigou V, Safinia N, Hawrylowicz C. Regulatory T cells in bronchial asthma. Allergy. 2009;64(3):335-47.
23. Olin JT, Wechsler ME. Asthma: pathogenesis and novel drugs for treatment. BMJ. 2014;349:g5517.
24. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. BMJ. 1989;299(6710):1259-60.
25. Haahtela T, Holgate S, Pawankar R, Akdis CA, Benjaponpitak S, Caraballo L, et al. The biodiversity hypothesis and allergic disease: world allergy organization position statement. World Allergy Organ J. 2013;6(1):3.
26. RWRCaJP. Too clean, or not too clean: the Hygiene Hypothesis and home hygiene. Clinical and Experimental Allergy2006. p. 402-25.
27. Bloomfield SF. Too clean, or not too clean. In: R. Stanwell-Smithw RWRCaJP, editor. the Hygiene Hypothesis and home hygiene. Clinical and Experimental Allergy2006. p. 402-25.
28. Riedler J, Braun-Fahrländer C, Eder W, Schreuer M, Waser M, Maisch S, et al. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. Lancet. 2001;358(9288):1129-33.
29. Braun-Fahrländer 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.
30. Ownby DR, Johnson CC, Peterson EL. Exposure to dogs and cats in the first year of life and risk of allergic sensitization at 6 to 7 years of age. JAMA. 2002;288(8):963-72.
31. Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. Nature. 2008;453(7195):620-5.
32. Khosravi A, Mazmanian SK. Breathe easy: microbes protect from allergies. Nat Med. 2012;18(4):492-4.

33. Benjamin J. Marsland. The Gut-Lung Axis in Respiratory Disease In: Aur ´elien Trompette aESG, editor. TRANSATLANTIC AIRWAY CONFERENCE2015.
34. Hill DA, Artis D. The influence of commensal bacteria-derived signals on basophil-associated allergic inflammation. *Gut Microbes*. 2013;4(1):76-83.
35. Purchiaroni F, Tortora A, Gabrielli M, Bertucci F, Gigante G, Ianiro G, et al. The role of intestinal microbiota and the immune system. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2013;17(3):323-33.
36. Furrie E. Probiotics and allergy. *Proc Nutr Soc*. 2005;64(4):465-9.
37. Food an Agriculture Organization WHOFW. Report of joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including power milk with live lactic acid bacteria. 2001.
38. Food an Agriculture Organization of the United Nations WHOFW. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. 2002.
39. Servin AL. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *Fems Microbiology Reviews*. 2004;28(4):405-40.
40. Isolauri SSaE. Intestinal colonization, microbiota, and probiotic. *The Journal of Pediatrics*2006. p. 115-20.
41. Drago L, De Vecchi E, Gabrieli A, De Grandi R, Toscano M. Immunomodulatory Effects of *Lactobacillus salivarius* LS01 and *Bifidobacterium breve* BR03, Alone and in Combination, on Peripheral Blood Mononuclear Cells of Allergic Asthmatics. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2015;7(4):409-13.
42. Wu CT, Chen PJ, Lee YT, Ko JL, Lue KH. Effects of immunomodulatory supplementation with *Lactobacillus rhamnosus* on airway inflammation in a mouse asthma model. *J Microbiol Immunol Infect*. 2016;49(5):625-35.
43. Hsieh MH, Jan RL, Wu LS, Chen PC, Kao HF, Kuo WS, et al. *Lactobacillus gasseri* attenuates allergic airway inflammation through PPAR γ activation in dendritic cells. *J Mol Med (Berl)*. 2017.
44. Li CY, Lin HC, Hsueh KC, Wu SF, Fang SH. Oral administration of *Lactobacillus salivarius* inhibits the allergic airway response in mice. *Can J Microbiol*. 2010;56(5):373-9.
45. Yu J, Jang SO, Kim BJ, Song YH, Kwon JW, Kang MJ, et al. The Effects of *Lactobacillus rhamnosus* on the Prevention of Asthma in a Murine Model. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2010;2(3):199-205.
46. 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.
47. Del Giudice MM, Indolfi C, Capasso M, Maiello N, Decimo F, Ciprandi G. *Bifidobacterium* mixture (*B longum* BB536, *B infantis* M-63, *B breve* M-16V) treatment in children with seasonal allergic rhinitis and intermittent asthma. *Italian Journal of Pediatrics*. 2017;43.
48. Hyeyoung Kim KK, Dae-Young Kim, Geun Eog Ji. Oral probiotic bacterial

administration suppressed allergic responses in an ovalbumin-induced allergy mouse model. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2005.

49. Forsythe P, Inman MD, Bienenstock J. Oral treatment with live *Lactobacillus reuteri* inhibits the allergic airway response in mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2007;175(6):561-9.
50. Liu J, Chen FH, Qiu SQ, Yang LT, Zhang HP, Liu JQ, et al. Probiotics enhance the effect of allergy immunotherapy on regulating antigen specific B cell activity in asthma patients. *Am J Transl Res*. 2016;8(12):5256-70.
51. Giovannini M, Agostoni C, Riva E, Salvini F, Ruscitto A, Zuccotti GV, et al. A randomized prospective double blind controlled trial on effects of long-term consumption of fermented milk containing *Lactobacillus casei* in pre-school children with allergic asthma and/or rhinitis. *Pediatric Research*. 2007;62(2):215-20.
52. Abrahamsson TR, Jakobsson T, Bjorksten B, Oldaeus G, Jenmalm MC. No effect of probiotics on respiratory allergies: a seven-year follow-up of a randomized controlled trial in infancy. *Pediatric Allergy and Immunology*. 2013;24(6):556-61.
53. Sanders ME, Akkermans LM, Haller D, Hammerman C, Heimbach J, Hörmannspurger G, et al. Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes*. 2010;1(3):164-85.
54. 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.
55. Wu D, Teng D, Wang X, Dai C, Wang J. *Saccharomyces boulardii* prevention of the hepatic injury induced by *Salmonella Enteritidis* infection. *Can J Microbiol*. 2014;60(10):681-6.
56. Kelesidis T, Pothoulakis C. Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. *Therap Adv Gastroenterol*. 2012;5(2):111-25.
57. Lopes TdR, Pinto MAdO. Therapeutic application of *Saccharomyces boulardii* in diarrheas: a review. *HUrevista: Universidade Federal de Juiz de Fora*; 2010. Contract No.: 2.
58. Martins FS, Nardi RM, Arantes RM, 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.
59. SONEGO JLS. Produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* em betelada utilizando processo extrativo com dióxido de carbono. In: G. Y. RODRIGUEZ, CRUZ AJG, BADINO AC, editors. *Congresso Brasileiro de: Universidade Federal de São Carlos engenharia Química*; 2014.
60. 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 convectional mice. *Journal of Medical Microbiology*. 2007;56(3):352-9.

61. Fietto JL, Araújo RS, Valadão FN, Fietto LG, Brandão RL, Neves MJ, et al. Molecular and physiological comparisons between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*. *Can J Microbiol*. 2004;50(8):615-21.
62. Martins FS, Veloso LC, Arantes RM, Nicoli JR. Effects of yeast probiotic formulation on viability, revival and protection against infection with *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Typhimurium in mice. *Lett Appl Microbiol*. 2009;49(6):738-44.
63. Fonseca VMB, Milani TMS, Prado R, Bonato VLD, Ramos SG, Martins FS, et al. Oral administration of *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 prevents allergic asthma in mice. *Respirology*. 2017;22(5):905-12.
64. Roy U, Jessani LG, Rudramurthy SM, Gopalakrishnan R, Dutta S, Chakravarty C, et al. Seven cases of *Saccharomyces fungaemia* related to use of probiotics. *Mycoses*. 2017;60(6):375-80.
65. 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.
66. Lahtinen SJ. Probiotic viability - does it matter? *Microb Ecol Health Dis*. 2012;23.
67. 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. *Trends in Food Science & Technology*. 2016;58:96-114.
68. Bates JH, Irvin CG. Measuring lung function in mice: the phenotyping uncertainty principle. *J Appl Physiol* (1985). 2003;94(4):1297-306.
69. McGovern TK, Robichaud A, Fereydoonzad L, Schuessler TF, Martin JG. Evaluation of respiratory system mechanics in mice using the forced oscillation technique. *J Vis Exp*. 2013(75):e50172.
70. Hantos Z, Daróczy B, Suki B, Nagy S, Fredberg JJ. Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. *J Appl Physiol* (1985). 1992;72(1):168-78.
71. Fonseca VMBd. Administração de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 vivas inibe a responsividade brônquica e a inflamação pulmonar em um modelo animal de asma: Universidade de São Paulo- USP; 2015.
72. Weibel ER. The challenge of measuring lung structure. On the "Standards for the Quantitative Assessment of Lung Structure". *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi*. 2010;48(9):637-43.
73. Mühlfeld C, Ochs M. Quantitative microscopy of the lung: a problem-based approach. Part 2: stereological parameters and study designs in various diseases of the respiratory tract. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2013;305(3):L205-21.
74. WILLIAM W. BUSSE MD, AND ROBERT F. LEMANSKE J, M.D. Advances in Immunology : Asthma. *The New England Journal of Medicine*. 2001;344.
75. Mastrangeli G, Corinti S, Butteroni C, Afferni C, Bonura A, Boirivant M, et al. Effects of live and inactivated VSL#3 probiotic preparations in the modulation of in vitro and in vivo allergen-induced Th2 responses. *Int Arch Allergy Immunol*. 2009;150(2):133-43.

76. Cockcroft DW, Davis BE. Airway hyperresponsiveness as a determinant of the early asthmatic response to inhaled allergen. *Journal of Asthma*. 2006;43(3):175-8.
77. Inman MD. Trends and recommendations in studies of mouse airway function. *Clin Exp Allergy*. 2010;40(4):524-7.
78. Bates J, Irvin C, Brusasco V, Drazen J, Fredberg J, Loring S, et al. The use and misuse of Penh in animal models of lung disease. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2004;31(3):373-4.
79. Parameswaran H, Suki B. Assessing Structure-Function Relations in Mice Using the Forced Oscillation Technique and Quantitative Histology. *Methods Mol Biol*. 2017;1639:77-91.
80. Hunt JR, Martinelli R, Adams VC, Rook GA, Brunet LR. Intragastric administration of *Mycobacterium vaccae* inhibits severe pulmonary allergic inflammation in a mouse model. *Clin Exp Allergy*. 2005;35(5):685-90.
81. Doran E, Cai F, Holweg CTJ, Wong K, Brumm J, Arron JR. Interleukin-13 in Asthma and Other Eosinophilic Disorders. *Front Med (Lausanne)*. 2017;4:139.
82. McBrien CN, Menzies-Gow A. The Biology of Eosinophils and Their Role in Asthma. *Front Med (Lausanne)*. 2017;4:93.
83. Russo M, Jancar S, Pereira de Siqueira AL, Mengel J, Gomes E, Ficker SM, et al. Prevention of lung eosinophilic inflammation by oral tolerance. *Immunol Lett*. 1998;61(1):15-23.
84. Kips JC. Cytokines in asthma. *European Respiratory Journal*. 2001;18:24S-33S.
85. Adams CA. The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. *Nutr Res Rev*. 2010;23(1):37-46.
86. Bosnjak B, Stelzmueller B, Erb KJ, Epstein MM. Treatment of allergic asthma: modulation of Th2 cells and their responses. *Respir Res*. 2011;12:114.
87. Dongarrà ML, Rizzello V, Muccio L, Fries W, Cascio A, Bonaccorsi I, et al. Mucosal immunology and probiotics. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2013;13(1):19-26.
88. Wang YH, Wills-Karp M. The Potential Role of Interleukin-17 in Severe Asthma. *Current Allergy and Asthma Reports*. 2011;11(5):388-94.
89. Schnyder-Candrian S, Togbe D, Couillin I, Mercier I, Brombacher F, Quesniaux V, et al. Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. *Journal of Experimental Medicine*. 2006;203(12):2715-25.
90. Magnani M. β -glucana from *Saccharomyces cerevisiae*. In: Castro-Gómez RJH, editor. constitution, bioactivity and obtaining. Londrina, PR- Brasil: Semina: Ciências Agrárias; 2008. p. 631-50.
91. Dickinson JR, Schweizer M. The metabolism and Molecular Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* 2004. 476 p.

92. 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.
93. Yssel H, Abbal C, Pène J, Bousquet J. The role of IgE in asthma. *Clin Exp Allergy.* 1998;28 Suppl 5:104-9; discussion 17-8.
94. Platts-Mills TA. The role of immunoglobulin E in allergy and asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164(8 Pt 2):S1-5.
95. Gould HJ, Sutton BJ. IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(3):205-17.
96. van der Pouw Kraan T, Van der Zee JS, Boeijs LCM, De Groot ER, Stapel SO, Aarden LA. The role of IL-13 in IgE synthesis by allergic asthma patients. *Clinical and Experimental Immunology.* 1998;111(1):129-35.
97. Izuhara K, Ohta S, Shiraishi H, Suzuki S, Taniguchi K, Toda S, et al. The mechanism of mucus production in bronchial asthma. *Curr Med Chem.* 2009;16(22):2867-75.
98. Kuperman DA, Huang X, Koth LL, Chang GH, Dolganov GM, Zhu Z, et al. Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. *Nat Med.* 2002;8(8):885-9.
99. Kim JY, Choi YO, Ji GE. Effect of oral probiotics (*Bifidobacterium lactis* AD011 and *Lactobacillus acidophilus* AD031) administration on ovalbumin-induced food allergy mouse model. *J Microbiol Biotechnol.* 2008;18(8):1393-400.
100. Wang H, Gao K, Wen K, Allen IC, Li G, Zhang W, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG modulates innate signaling pathway and cytokine responses to rotavirus vaccine in intestinal mononuclear cells of gnotobiotic pigs transplanted with human gut microbiota. *BMC Microbiol.* 2016;16(1):109.
101. Yang HY, Liu SL, Ibrahim SA, Zhao L, Jiang JL, Sun WF, et al. Oral administration of live *Bifidobacterium* substrains isolated from healthy centenarians enhanced immune function in BALB/c mice. *Nutr Res.* 2009;29(4):281-9.
102. Galdeano CM, Perdígón G. The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity. *Clin Vaccine Immunol.* 2006;13(2):219-26.
103. Hougee S, Vriesema AJ, Wijering SC, Knippels LM, Folkerts G, Nijkamp FP, et al. Oral treatment with probiotics reduces allergic symptoms in ovalbumin-sensitized mice: a bacterial strain comparative study. *Int Arch Allergy Immunol.* 2010;151(2):107-17.
104. Crimi E, Spanevello A, Neri M, Ind PW, Rossi GA, Brusasco V. Dissociation between airway inflammation and airway hyperresponsiveness in allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157(1):4-9.
105. Doron S, Snyderman DR. Risk and safety of probiotics. *Clin Infect Dis.* 2015;60 Suppl 2:S129-34.

9. Anexos

Anexo 1: Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 022/2011, sobre o projeto intitulado “*Estudo da prevenção e tratamento da asma induzida por alérgeno em um modelo animal com a administração de *Saccharomyces cerevisiae* vivas e inativas pelo calor*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Marcos de Carvalho Borges** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de 28 de março de 2011.

(We certify that the protocol nº 022/2011, about “*Study of asthma prevention and treatment with the administration of viable and heat-killed *Saccharomyces cerevisiae* in a murine model of allergic asthma*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the College of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo – Ethical Commission of Ethics in Animal Research (CETEA) in 03/28/2011.