

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

VANESSA MACIEL BRAULIO DA FONSECA

**A administração de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 vivas inibe
a responsividade brônquica e a inflamação pulmonar em um
modelo animal de asma**

Ribeirão Preto

2015

VANESSA MACIEL BRAULIO DA FONSECA

**A administração de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 vivas inibe
a responsividade brônquica e a inflamação pulmonar em um
modelo animal de asma**

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

2015

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

Fonseca, Vanessa Maciel Braulio

A administração de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 vivas inibe a responsividade brônquica e a inflamação pulmonar m um modelo animal de asma. Ribeirão Preto, 2015.

55 p.: il.; 30cm.

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

Orientador: Marcos de Carvalho Borges

1. Asma, 2. Probiótico, 3. Remodelamento

Esta dissertação recebeu fomento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 2013/02209-4.

FOLHA DE APROVAÇÃO

VANESSA MACIEL BRAULIO DA FONSECA

A administração de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 vivas inibe a responsividade brônquica e a inflamação pulmonar em um modelo animal de asma

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

Área de Concentração: Clínica Médica

Aprovado em _____/_____/_____

Banca examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

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

Ao meu orientador, professor Marcos de Carvalho Borges, que acreditou no meu potencial e não mediu esforços para me ajudar e alimentou o meu amor pela ciência e pesquisa. Muito obrigada pela paciência durante todo este período, pela supervisão, pelo aprendizado, pela amizade e obrigada pela oportunidade de apreender que é com as dificuldades que aprendemos e nos tornarmos mais fortes ainda. Parabéns pelo exemplo dado aos seus alunos.

Ao meu marido pelo incentivo do início ao fim deste mestrado, pelo apoio incondicional, pela fé, amor, carinho, pelas palavras ditas no momento certo, e confiança depositada em mim para a realização deste trabalho.

Aos meus pais pelo exemplo de vida, pela força, amor, carinho e humildade, e que me ensinaram que sem luta e perseverança não há sucesso.

Aos meus filhos Igor e Larissa pela força, paciência e palavras de incentivo e amor.

Aos meus irmãos pelas palavras de incentivo e carinho.

Aos meus tios Gil e Ana pelo apoio.

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

Ao Rafael pela amizade, apoio e conselhos, muito obrigada.

As minhas amigas do laboratório Ana, Andy e Sandy, pelo companheirismo, pela disponibilidade em ajudar, força e amizade.

Aos meus colegas do laboratório Aline, Alessa, Leandra, Lucas, Rosana, Tiago, Tamires, Joana e pelas palavras de incentivo e aprendizado.

A minha colega Luana, pelas conversas sobre maquiagem, caminhadas e estudos obrigada pelo apoio e amizade.

Aos colegas dos laboratórios vizinhos da Professora Carla Nonino, Professor Elpidio e do Professor Coutinho obrigada pelo apoio e incentivo.

A Ceci uma amiga que adquiri no finalzinho deste processo todo que me ensinou que nunca estamos desamparados e que o amor divino nasce em pequenas coisas. Muito obrigada pela ajuda e palavras amigas tão importantes.

Aos colegas Tiago Moretti, Marcel e Guilherme por compartilharem comigo seu aprendizado, pelas sugestões e amizade.

Aos técnicos de laboratório Ana Flavia, Adalberto, Mônica, Flavia, Sandra, Paula e Elaine que não mediram esforços em me ajudar.

A técnica Elisabete Milani pelo apoio e incentivo do mestrado, muito obrigada.

Aos colegas que cursamos juntos as disciplinas no mestrado muito obrigado pelo aprendizado, companheirismo e alegrias.

Ao Emerson da pós-graduação obrigada pela paciência e apoio.

Aos auxiliares de limpeza pela amizade e companheirismo nestes anos e pelo chazinho.

Aos colegas do laboratório de Microbiologia do HC Campus pelo incentivo e onde começou a minha busca pelo aperfeiçoamento profissional em especial a Sohaíla, Lucélia, Rosa, Cris, Raquel, Tida e Bía.

A Fundação de Amparo e Pesquisa-FAPESP pelo apoio imprescindível.

Enfim a todos desta instituição que de alguma forma mesmo muitas vezes sem saber contribuíram com a minha evolução profissional e pessoal. Agradeço de coração. Que Jesus ilumine o caminho de cada um de vocês e mesmo longe sempre me lembrarei de todos vocês. Muito obrigada por tudo.

“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original.”
(Albert Einstein).

RESUMO

FONSECA, V. M. B. **A administração de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG905 vivas inibe a responsividade brônquica e a inflamação pulmonar em um modelo animal de asma.** 2015. 55 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

A prevalência de asma tem aumentado em crianças e nas comunidades que adotam um estilo de vida ocidental e se tornam mais urbanizadas. A teoria da higiene sugere que a exposição a infecções e contato não higiênicos na infância pode proteger contra o desenvolvimento de asma. Probióticos são micro-organismos vivos que conferem um benefício à saúde do hospedeiro. O tratamento com *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 protegeu camundongos contra infecções intestinais, preveniu a translocação bacteriana e aumentou a produção de IL-10. Até o momento, não há descrição do uso de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 na prevenção e/ou tratamento da asma. Os objetivos deste trabalho foram avaliar os efeitos da administração de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 na prevenção da asma e os mecanismos envolvidos. Camundongos Balbc machos de 6 a 8 semanas foram sensibilizados duas vezes com ovalbumina (OVA), com uma semana de intervalo, e desafiados com OVA diariamente por três dias consecutivos. Os camundongos receberam por gavagem *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 diariamente, dez dias antes da primeira sensibilização e durante todo o período de sensibilização e desafios, totalizando 27 administrações. O grupo controle recebeu apenas salina ou PBS. Assim quatro grupos, de 6 a 8 camundongos, foram estudados: Prev. SAL/PBS, Prev. OVA/PBS, Prev. SAL/Sac e Prev. OVA/Sac. Após a sensibilização e desafios, os animais foram anestesiados, ventilados com um pequeno ventilador para animais FlexiVent® (Scireq, Montreal, QC, Canadá) e submetidos a medidas *in vivo* da mecânica pulmonar na condição basal e após a administração de concentrações crescentes de aerossóis com metacolina. Após, o lavado broncoalveolar (LBA) foi coletado para contagem total e diferencial de células. As citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e IFN- γ foram dosadas no LBA e homogenato pulmonar. Foi realizada histoquímica para visualização e quantificação de inflamação e colágeno. Observamos que o grupo Prev. OVA/PBS apresentou aumento significativo na hiper-responsividade brônquica (RRS: $p < 0,0001$; RN: $p < 0,01$ e G: $p < 0,05$), o número total de células ($p < 0,0001$), número de eosinófilos ($p < 0,001$), e nos níveis de IL-4 ($p < 0,05$) e IL-13 ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo Prev. SAL/PBS. O grupo Prev. OVA/Sac, em comparação ao grupo Prev. OVA/PBS apresentou redução na hiper-responsividade brônquica (RRS: $p < 0,001$; RN: $p < 0,01$; G: $p < 0,05$), no número total de células ($p < 0,05$), número de eosinófilos ($p < 0,001$) e níveis de IL-4 ($p < 0,05$) no LBA. Em comparação com o grupo Prev. OVA/PBS, a administração de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 reduziu os níveis de IL-5 ($p < 0,05$) e IL-13 ($p < 0,05$) no homogenato do pulmão, e as células inflamatórias no pulmão ($p < 0,001$). Adicionalmente, houve aumento nos níveis de IL-10 ($p < 0,05$) no tecido pulmonar do grupo OVA/Sac em comparação ao grupo Prev. OVA/PBS. Conclui-se que a *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 atenuou as principais características da asma em um modelo animal e, conseqüentemente, pode ter um efeito benéfico na prevenção da asma.

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

ABSTRACT

FONSECA, V.M.B. **The administration of live *Saccharomyces cerevisiae* inhibits bronchial responsiveness and the airway inflammation in an animal model of asthma.** 2015. 55 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

The prevalence of asthma has increased in children and communities that adopt a Western lifestyle and become more urbanized. The hygiene hypothesis suggests that exposure to infections early in life can reduce the risk of asthma and other allergic diseases. Probiotics are live micro-organisms that confer a health benefit to the host. Treatment with *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 protected mice against intestinal infections, prevented bacterial translocation and increased IL-10 production. There is no study of *Saccharomyces cerevisiae* in the prevention or treatment of asthma. The objective of this study was to evaluate the effects of viable *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 administration in the prevention and treatment of asthma and the mechanisms involved. Male Balb/c mice were sensitized twice with ovalbumin (OVA) intraperitoneally, one week apart, and challenged with OVA intranasally for three days. Mice were treated by gavage with *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 10 days before OVA sensitization and during challenges. Control mice received saline or PBS on the same days. After challenge, mice were ventilated with a small animal ventilator (FlexiVent®) and in vivo measurements of bronchial hyperresponsiveness were performed with increasing concentrations of methacholine aerosol (6.25, 12.5, 25 and 50 mg/ml). Bronchoalveolar lavage (BAL) was collected to quantify total and differential cell counts. Levels IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 and IFN- γ in BAL and lung homogenate were measured by ELISA. Inflammatory cell number and collagen deposition were assayed in lung tissues. Oral treatment with *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 significantly decreased airway hyperresponsiveness, measured by total resistance ($p < 0,0001$), central airway resistance ($p < 0,001$) and tissue resistance ($p < 0,05$). *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 significantly attenuated total cell number ($p < 0,05$) and the influx of eosinophil ($p < 0,001$) to the airway lumen. Furthermore, inflammatory cell number in lung peripheral ($p < 0,001$) and levels of IL-4 ($p < 0,05$) in BAL and IL-5 ($p < 0,05$) and IL-13 ($p < 0,05$) in lung homogenate were significantly diminished by *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905. Of note, *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 restored IL-10 ($p < 0,05$) levels in lung tissue. In conclusion, oral administration of *Saccharomyces cerevisiae* 905 UFMG attenuated major asthma-like characteristics in a mouse model. These results showed that *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 might have potential for prevention of asthma.

Keywords: Asthma. Probiotic. Airway inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Resumo da fisiopatologia da asma	17
Figura 2 – Protocolo de sensibilização, desafios e tratamento	26
Figura 3 – Viabilidade da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFMG 905	31
Figura 4 - Avaliação da hiper-responsividade brônquica.....	32
Figura 5 – Número total de células no lavado broncoalveolar.....	33
Figura 6 – Número diferencial de células no lavado broncoalveolar	34
Figura 7 - Níveis de IL-4, IL-5 e IL-10 no lavado broncoalveolar	35
Figura 8 – Níveis de IgE, IgG1 e IgG2a no soro.....	36
Figura 9 – Níveis de IL-10 e IFN- γ no homogenato pulmonar	37
Figura 10 – Níveis de IL-5 e IL-13 no homogenato pulmonar.....	37
Figura 11 – Células inflamatórias do tecido pulmonar	38
Figura 12 – Deposição de colágeno nas vias aéreas	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Nome, clone e fabricante dos anticorpos utilizados nos ensaios de detecção de anticorpos séricos específicos para OVA	29
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIACOES

OVA – Ovalbumina

SAL – Salina

PBS – Phosphate Buffered Saline

I.P. – Intra-peritoneal

I.N. – Intra-nasal

ATS – American Thoracic Society

IL-10 – Interleucina dez

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

USP – Universidade de São Paulo

IL-4 – Interleucina quatro

IL-5 – Interleucina cinco

IL-13 – Interleucina treze

IFN- γ – Interferon gama

UFC – Unidade formadora de colônia

IgE – Imunoglobulina E

IgG1 – Imunoglobulina G um

IgG2A – Imunoglobulina G dois A

H&E – Hematoxilina - Eosina

PS – Picrosirius

GALT – Gut-associated lymphoid tissue

Tregs – células T regulatórias

ANOVA- Análise de variância

RINT-Técnica do interruptor de fluxo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Asma - Definição e Epidemiologia.....	15
1.2 Asma - Fisiopatologia	16
1.3 Teoria da higiene.....	18
1.4 Probióticos	20
1.5 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFMG 905.....	21
1.6 Hipótese	22
2 OBJETIVOS.....	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Animais.....	24
3.2 Probióticos	24
3.3 Cultivo e preparo da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFMG 905.....	24
3.4 Viabilidade da levedura.....	25
3.5 Protocolo de sensibilização, desafio e administração da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFMG 905.....	25
3.6 Avaliação in vivo da hiper-responsividade.....	26
3.7 Coleta e processamento do LBA, pulmão e soro	27
3.8 Contagem total e diferencial de células no LBA	28
3.9 Dosagem de citocinas no LBA	28
3.10 Preparo do homogenato e dosagem de citocinas inflamatórias no pulmão	28
3.11 Detecção de anticorpos específicos para OVA	29
3.12 Análise histológica do pulmão	30
3.13 Análise Estatística.....	30
4 RESULTADOS.....	31
4.1 Viabilidade da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFMG 905.....	31
4.2 Responsividade das vias aéreas	31
4.3 Número total de células no LBA.....	33
4.4 Células inflamatórias no LBA.....	34

4.5	Níveis das citocinas IL-4, IL-5 e IL-10 no LBA.....	35
4.6	Níveis das imunoglobulinas IgE, IgG1 e IgG2a específicas para OVA.....	36
4.7	Níveis das citocinas IL-10, IFN- γ , IL-5 e IL-13 no homogenato pulmonar.....	37
4.8	Quantificação das células inflamatórias no tecido pulmonar	38
4.9	Quantificação do colágeno nas vias aéreas	39
5	DISCUSSÃO	40
6	CONCLUSÕES	46
	REFERÊNCIAS.....	47
	ANEXOS	55

1 INTRODUÇÃO

1.1 Asma - Definição e Epidemiologia

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

Considerada uma das doenças crônicas mais comuns, a asma acomete crianças e adultos em todos os países, independente do nível de desenvolvimento. A prevalência mundial varia de 1 a 38%, sendo maior nos países desenvolvidos (2). Nos Estados Unidos, em 2009, estimava-se em 24,6 milhões (8,2% da população) o número de pacientes com asma. Na Austrália, Nova Zelândia e Reino Unido mais do que 15% da população têm asma (3). No Peru e Costa Rica, a prevalência é de 10% e na África do Sul, 8% da população (3). No Brasil, a prevalência oscila entre 18 e 27% (4, 5). Anualmente, ocorrem cerca de 350 mil internações por asma no Brasil, constituindo-se a quarta causa de hospitalização pelo Sistema Único de Saúde (SUS), o que corresponde a 2,3% do total e à terceira causa de internação entre crianças e adultos jovens (6).

Há evidências de que a prevalência de asma tem aumentado nos últimos 20 anos, especialmente em crianças e nas comunidades que adotam um estilo de vida ocidental e se tornam mais urbanizadas (7, 8). Possíveis explicações para o aumento da incidência de asma nesses países são mudanças na condição socioeconômica e higiênica, alteração na alimentação, uso de antibióticos, poluição ambiental, entre outras (3, 9, 10). De acordo com a “hipótese da higiene” o aumento na incidência de doenças alérgicas e autoimunes nos países desenvolvidos, e mais recentemente nos países em desenvolvimento, está relacionado com a diminuição na incidência de doenças infecciosas e no contato com micro-organismos, que está diretamente relacionado com as condições sanitárias desses países (3).

A asma, até o momento, não apresenta cura, sendo o tratamento convencional baseado no uso de broncodilatadores e anti-inflamatórios, como os corticosteroides inalatório. Apesar dos altos custos diretos, os custos indiretos são incalculáveis e maiores, representados pelo impacto da asma no indivíduo, família e sociedade, como absenteísmo

escolar e no trabalho, perda da produtividade, morte precoce e restrição física, emocional e social.

1.2 Asma - Fisiopatologia

O desenvolvimento da asma está relacionado a fatores que são pertinentes ao hospedeiro (genética, sexo e obesidade) e ao meio ambiente no qual está exposto (poeira doméstica, animais, tabagismo, poluição do ar, dieta e infecções predominantemente virais) (11).

A inflamação das vias aéreas é considerada o mecanismo fisiopatológico mais importante e está presente mesmo em asmáticos assintomáticos (1, 12). A inflamação, que resulta de uma interação complexa entre diversas células, é caracterizada por um aumento principalmente de eosinófilos, mastócitos, macrófagos e linfócitos T na mucosa das vias aéreas. Estas células liberam mediadores que contribuem para o desenvolvimento da obstrução ao fluxo aéreo, hiper-responsividade brônquica e gravidade clínica (11-13).

A hiper-responsividade brônquica é uma das manifestações clínicas da asma e resulta do estreitamento anormal das vias aéreas em resposta a um estímulo broncoconstritor, em comparação a uma pessoa não asmática. A hiper-responsividade pode variar ao longo do tempo, podendo aumentar durante as exacerbações e diminuir com o tratamento anti-inflamatório (11). Geralmente a hiper-responsividade brônquica é avaliada pelo teste de broncoprovocação que consiste na inalação de uma substância broncoconstritora em doses ou concentrações crescentes.

Além da resposta inflamatória e da hiper-responsividade brônquica, pode também ocorrer alterações estruturais na parede das vias aéreas dos pacientes com asma denominadas remodelamento. O remodelamento é caracterizado por um espessamento da lâmina basal subepitelial, aumento no número de miofibroblastos, hiperplasia e hipertrofia de músculo liso, aumento de glândulas mucosas, aumento da área vascular e alteração da deposição e composição das proteínas e proteoglicanas da matriz extracelular (14). Estas alterações estão relacionadas à gravidade da doença e podem resultar em um estreitamento irreversível das vias aéreas (12).

A complexidade da patogênese da asma ocorre devido a uma complexa interação entre fatores genéticos e ambientais. Uma das possíveis explicações é um desbalanço da

resposta imune Th1/Th2 com um desvio para a resposta do tipo Th2 (15). A presença de linfócitos T $CD4^+$, do subtipo Th2 ativado, e de citocinas e quimiocinas, tais como, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e IL-16 induzem um padrão de resposta denominado Th2, onde ocorre ativação de células B, produção de IgE, supressão de células Th1, crescimento e diferenciação de eosinófilos e aumento na atividade de mastócito (16). Esse desequilíbrio altera a homeostase do organismo levando a um quadro alérgico, como a asma. Um resumo da fisiopatologia da asma encontra-se na figura 1.

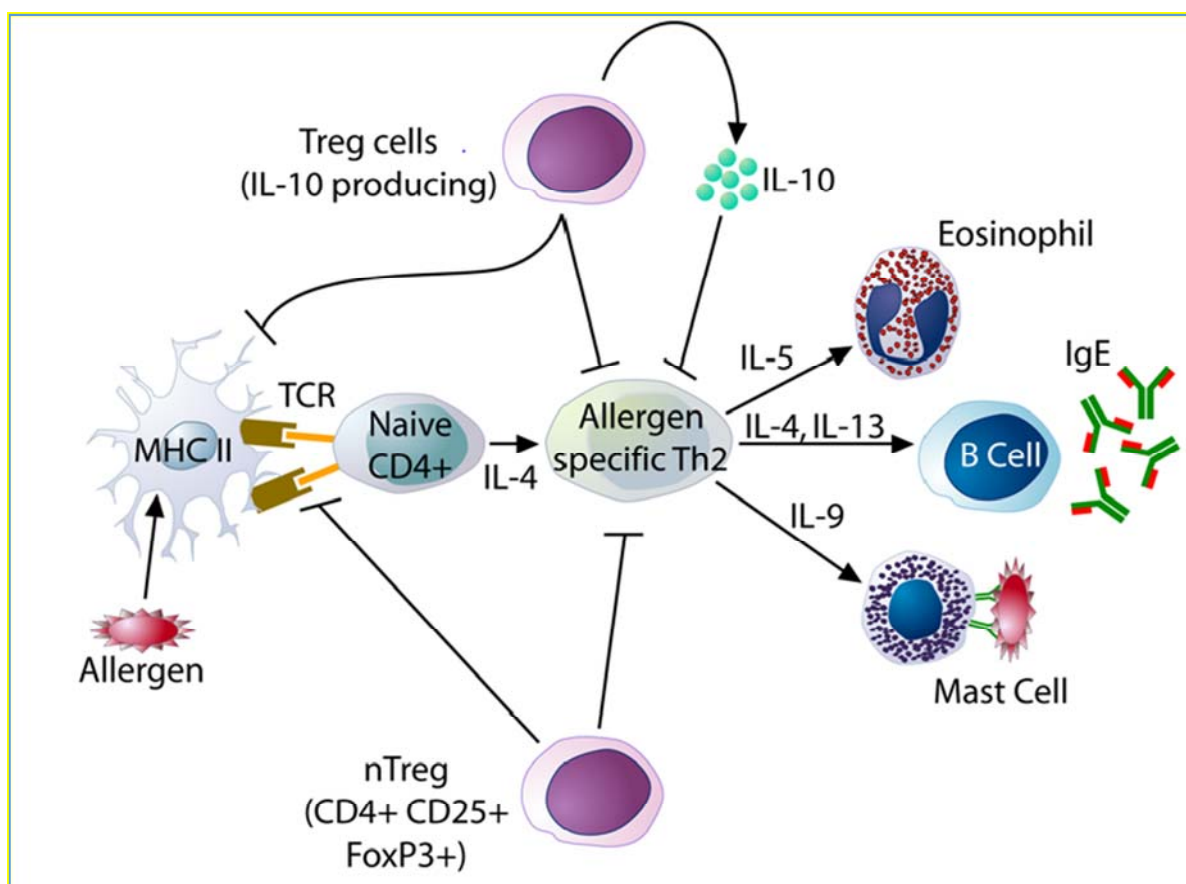


Figura 1 - Resumo da fisiopatologia da asma. Resumidamente, a inalação de alérgeno induz uma resposta de padrão Th2, com a liberação de citocinas, tais como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, que estimulam a produção de eosinófilos, IgE e degranulação de mastócitos. Os linfócitos T reguladores tem a propriedade de inibir a resposta Th2. Adaptado de Broide (17).

Nos últimos anos, alguns linfócitos T, conhecidos como linfócitos T reguladores, foram descritos como células capazes de exercer uma atividade imunossupressora ou imunomoduladora (18). Devido a sua importância na manutenção da homeostase imune nas vias aéreas (19, 20), tem-se aumentado o interesse no uso dos linfócitos T reguladores ou de

terapêuticas que estimulem o aumento de seu número e/ou função no tratamento de doenças alérgicas como a asma (21). Entre as células T, várias subpopulações apresentam propriedades regulatórias, como os linfócitos T CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺, células Tr1 produtoras de IL-10, células Th3 secretoras de TGF-β, células CD4⁻ CD8⁻ e CD8⁺ CD28⁻ (22). Elas atuam inibindo a resposta imune por diversos mecanismos, entre eles a secreção de citocinas inibitórias como IL-10 e TGF-β, competição por fatores de crescimento, citotoxicidade e mecanismos contato-dependente (18, 23, 24).

IL-10 é uma citocina com propriedades anti-inflamatórias e imunorregulatórias secretada por diversas células como células B, mastócitos, eosinófilos, macrófagos, células dendríticas e células T, principalmente os linfócitos T reguladores (CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺) (25, 26). Diversos estudos demonstraram que um dos mecanismos envolvidos na função imunossupressora ou imunomoduladora dos linfócitos T reguladores é dependente de IL-10 (18, 21, 27-30). Adicionalmente a diminuição de IL-10 encontrada em pacientes asmáticos pode favorecer a ação de citocinas inflamatórias, contribuindo para o desenvolvimento e gravidade da asma (31). Paralelamente ao desenvolvimento de novas drogas anti-inflamatórias para o tratamento de doenças alérgicas, tem-se buscado novas estratégias que estimulem a indução de células com atividade imunomoduladora e/ou a produção de citocinas anti-inflamatórias. Nesse sentido, estudos demonstraram que alguns probióticos podem modular a resposta inflamatória em modelos animais de alergia pela indução de linfócitos T reguladores e produção de IL-10 (28, 32-34).

1.3 Teoria da higiene

A teoria da higiene, proposta em 1989 por David Strachan, sugere que a exposição à infecções e contatos não-higiênicos na infância influenciam o desenvolvimento do sistema imune e podem proteger contra o desenvolvimento de asma e outras doenças alérgicas (8, 35, 36). Atualmente, a teoria se baseia em diversos estudos experimentais e epidemiológicos, particularmente estudos que evidenciaram aumento na incidência de algumas doenças, como diabetes e esclerose múltipla, na primeira geração de pessoas que migraram de áreas de baixa prevalência dessas doenças para áreas de alta prevalência (3, 37, 38).

Alguns estudos epidemiológicos evidenciaram que crianças de países em desenvolvimento, com irmãos mais velhos, que frequentam precocemente creches e que são expostas a animais apresentam menor incidência de doenças alérgicas, sugerindo uma relação inversa entre infecções na infância e doenças alérgicas (8, 21, 39-41). Adicionalmente, a exposição prolongada a altos níveis de endotoxinas durante o primeiro ano de vida também protegeu contra asma e atopia (42, 43). Apesar de inúmeras evidências, a teoria da higiene não foi confirmada em todos os estudos (43, 44).

Com o novo estilo de vida adotado pelas populações de países desenvolvidos e alguns países em desenvolvimento como o Brasil, as cidades proporcionaram mudanças nas condições de vida para a população, entre elas, atendimento a saúde básica, saneamento, vacinação, aumento no uso de antibióticos, mudanças na dieta e higiene. Essas melhorias provocaram redução no número de doenças infecciosas e, ao mesmo tempo, o aumento das doenças alérgicas (3). Diversos estudos confirmaram essa relação, entre eles, *De Filippo et al.* e *Trompette et al.* demonstraram que o espaço geográfico e a dieta podem influenciar o desenvolvimento de doenças alérgicas, diabetes e obesidade devido a mudanças de hábitos alimentares como a diminuição de ingestão de fibras, e a relação do indivíduo com o meio ambiente (9, 10).

Os mecanismos envolvidos na teoria da higiene são múltiplos, complexos e ainda não totalmente elucidados. Eles incluem o desvio da resposta imune para o tipo Th2, competição antigênica, estimulação de receptores do tipo Toll, fatores genéticos e imunorregulação, envolvendo diversos subtipos de linfócitos T reguladores e mudanças na microbiota (3, 7, 8). Assim, mudanças no estilo de vida podem ter causado alterações na microbiota, que, por sua vez, desempenha um papel importante na modulação da resposta imune (3, 44, 45).

A relação da microbiota com o sistema imune é complexa, e entre os principais mecanismos, são descritas modificações fenotípica das células dendríticas mudanças na resposta Th1 e Th2 e/ou produção de células Tregs. Estes mecanismos podem se originar localmente decorrentes de alterações da microbiota intestinal (ex. no GALT), se espalhar para as vias aéreas e proteger contra o desenvolvimento de doenças alérgicas (45). Nesse sentido, considerando que mudanças na microbiota por contaminação de crianças e adultos para prevenção de doenças alérgicas é algo não cogitado nos dias atuais e considerando que muitos probióticos agem por mecanismos semelhantes e são considerados seguros na

maioria das situações, abre-se a perspectiva de sua utilização na prevenção e tratamento de doenças autoimunes e alérgicas (3).

1.4 Probióticos

Probióticos são definidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) como “micro-organismos vivos que, quando administrados em adequadas quantidades, conferem um benefício à saúde do hospedeiro” (46). Diversas características são atribuídas aos probióticos, entre elas, eles são organismos microbianos; permanecem estáveis e viáveis após a cultura, manipulação e armazenamento; sobrevivem à digestão gástrica, biliar e pancreática; são capazes de induzir uma resposta quando presentes no intestino; e fornecem um benefício clínico ou funcional ao hospedeiro (47).

Sabe-se, embora não seja mencionado um número específico, que pelo menos 10^9 UFC/ml de micro-organismos devem ser ingeridos por dia para chegar ao intestino em níveis iguais ao da microbiota dominante (48). Os probióticos atuam no hospedeiro por diversos mecanismos, como modulação da homeostase intestinal e eliminação de patógenos, produção de ácidos graxos de cadeia curta, desenvolvimento de tolerância, estimulação de receptores do tipo Toll e modulação do sistema imune (47, 49, 50).

Bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, presentes na microbiota intestinal humana, têm sido os probióticos mais utilizados na prática clínica (46). Apesar do potencial benefício dos probióticos ainda faltam estudos sobre qual o melhor probiótico, posologia e eficácia na prevenção ou terapia das doenças alérgicas (8).

Paul Forsythe et al. avaliaram a resposta alérgica das vias aéreas em camundongos tratado com *Lactobacillus reuteri* vivos e mostraram redução da hiper-responsividade brônquica, do número de eosinófilos e dos níveis de citocinas TNF, IL-5 e IL-13 (51). Na mesma linha, *Houge et al.* realizaram um estudo comparativo utilizando cepas de bactérias diferentes com potencial probiótico em camundongos sensibilizados a ovalbumina (OVA). O *Bifidobacterium breve* mostrou ser o mais eficaz na redução alérgica em relação aos demais probióticos, demonstrado pela inibição da hiper-responsividade brônquica, redução de eosinófilos, IgE e IgG1 OVA específica, IL-4, IL-5 e IL-10 (52). Adicionalmente, outros micro-

organismos, como leveduras não patogênicas do gênero *Saccharomyces*, têm despertado interesse como opção terapêutica em diversas doenças.

Saccharomyces boulardii tem sido estudada no tratamento de doença inflamatória intestinal e tratamento e/ou prevenção de diversos tipos de diarreia, como diarreia associada a antibióticos, doença intestinal associada ao *Clostridium difficile* e diarreia do viajante (53-56). Embora leveduras de *Saccharomyces* sejam utilizadas por mais de 50 anos, existem casos descritos de fungemia, especialmente em pacientes imunocomprometidos (57). A *Saccharomyces boulardii* foi inicialmente isolada em frutas (“lychee”) da Indochina. As frutas contaminadas com *Saccharomyces boulardii* eram usadas na medicina popular local para o tratamento de diarreia. Diversos estudos confirmaram esses resultados e atualmente *Saccharomyces boulardii* é comercializado pela Merck e está disponível em diversos países da Europa, África e América do Sul (58). Devido a semelhanças genéticas com *Saccharomyces boulardii*, outras cepas de *Saccharomyces*, como *Saccharomyces cerevisiae*, despertaram interesse no tratamento de doenças alérgicas e intestinais (58).

1.5 *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905

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

Martins et al. avaliaram cepas de *Saccharomyces cerevisiae* de espécies distintas isoladas de ambientes diferentes, insetos, frutas tropicais, queijos e produção da cachaça. Entre as doze linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* testadas a cepa *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 foi a que apresentou melhores características para ser usada como um probiótico, devido a sua capacidade de sobreviver no trato gastrointestinal e o efeito protetor aos camundongos durante a infecção experimental por *Salmonella typhimurium* e *Clostridium difficile* (59).

A *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 quando administrada em camundongos atingiu níveis populacionais potencialmente funcionais no trato gastrointestinal, reduziu a translocação de *Salmonella Typhimurium* e foi capaz de proteger camundongos contra infecções por *Salmonella Typhimurium* e *Clostridium difficile*. Estas proteções ocorreram provavelmente por modulações locais e do sistema imune (59, 60). *Generoso et al.*

demonstraram que a administração de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 vivas ou mortas pelo calor aumentou a produção de IL-10 e preveniu a translocação bacteriana causada por obstrução intestinal, provavelmente pela imunomodulação e manutenção da integridade da barreira intestinal (61). Até o momento, não há descrição do estudo de *Saccharomyces cerevisiae* na prevenção e/ou tratamento da asma.

1.6 Hipótese

Considerando os efeitos imunomoduladores dos probióticos e a sua segurança associados ao aumento da produção de IL-10 pela administração de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905, nós hipotetizamos que a sua administração pode apresentar um efeito benéfico na prevenção da asma brônquica associado a um desvio da resposta imune para o um padrão Th1, e aumento na produção de IL-10.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral desse projeto foi avaliar os efeitos da administração de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 vivas na prevenção da asma induzida por um alérgeno em um modelo animal e os mecanismos envolvidos.

Os objetivos específicos foram avaliar:

- Alterações na responsividade brônquica decorrentes da administração de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 vivas antes a sensibilização com OVA.
- Contagem celular total e diferencial no lavado broncoalveolar (LBA) decorrentes da administração de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 vivas antes a sensibilização com OVA.
- Produção de citocinas Th1 e Th2 no LBA e homogenato pulmonar decorrentes da administração de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 vivas antes a sensibilização com OVA.
- Produção de anticorpos IgE, IgG1 e IgG2a específicos para OVA decorrentes da administração de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 vivas antes a sensibilização com OVA.
- Alterações no remodelamento brônquico decorrentes da administração de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 vivas antes a sensibilização com OVA.
- Alterações na inflamação pulmonar decorrentes da administração de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 vivas antes a sensibilização com OVA.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

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

3.1 Animais

Foram utilizados de 6 a 8 camundongos em cada grupo, sendo machos de seis a oito semanas da linhagem Balbc. Os animais eram provenientes do Biotério Central (FMRP-USP) e permaneceram no Biotério da Clínica Médica da FMRP-USP, no qual ficaram sob cuidados e manutenção do bioterista e da pesquisadora. Os camundongos ficaram em gaiolas isoladoras, que foram autoclavadas antes de receberem os camundongos e trocadas três vezes na semana. A ração, água e a maravalha foram previamente autoclavadas antes de serem colocadas nas gaiolas e os camundongos tiveram livre acesso à ração e água.

3.2 Probióticos

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

3.3 Cultivo e preparo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905

Inicialmente foi cultivada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905, em meio YPD (1% de extrato de levedura, 2% peptona e 2% de dextrose) por 48 horas a 37°C, sob agitação constante de 160 rpm. Posteriormente, foram feitas diluições seriadas e foi realizada a contagem das leveduras em câmara de Neubauer com adição do corante azul de tripan, após de 30 a 300 leveduras foram adicionadas em placas com meio YPD sólido, que foram mantidas a 37°C. Após 48 horas, as unidades formadoras de colônia (UFC) foram contadas e foi determinada a viabilidade da

levedura. Na maioria das vezes, o meio cultivado apresentou uma concentração de 10^8 leveduras/ml. Após, o meio foi concentrado a 10^9 UFC/ml e as leveduras foram armazenadas em alíquotas estocadas de 2°C a 8°C, para serem então administradas aos camundongos.

3.4 Viabilidade da levedura

Semanalmente, durante sete semanas consecutivas, a viabilidade da *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 foi determinada conforme previamente descrito.

3.5 Protocolo de sensibilização, desafio e administração da *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905

Camundongos Balb/c foram sensibilizados duas vezes com 10 µg de OVA e 1 mg $Al(OH)_3$ via intraperitoneal (I.P.), com uma semana de intervalo, e uma semana após foram desafiados com 10 µg de OVA por via intranasal (I.N.) por três dias consecutivos, sob leve anestesia (quetamina 100 mg/Kg e xilazina 10 mg/kg, I.P.). Os animais foram tratados diariamente por gavagem com 100 µl de uma solução contendo *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 na concentração de 10^9 UFC/ml por 27 dias consecutivos, 10 dias antes da primeira sensibilização e durante todo período de sensibilização e desafios.

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

- O grupo Prev. OVA/Sac: os camundongos receberam probiótico *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 diariamente por 10 dias antes da primeira sensibilização, e durante todo o período de sensibilização e desafios. Os camundongos foram sensibilizados e desafiados com OVA.
- O grupo Prev. OVA/PBS: os camundongos receberam PBS diariamente por 10 dias antes da primeira sensibilização, e durante todo o período de sensibilização e desafios. Os camundongos foram sensibilizados e desafiados com OVA.
- O grupo Prev. SAL/PBS: os camundongos receberam uma solução de PBS diariamente por 10 dias antes da primeira sensibilização, e durante todo o período de sensibilização e desafios. Os camundongos foram sensibilizados e desafiados com solução salina.

- O grupo Prev. SAL/Sac: os camundongos receberam *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 diariamente por 10 dias antes da primeira sensibilização, e durante todo o período de sensibilização e desafios. Os camundongos foram sensibilizados e desafiados com salina.

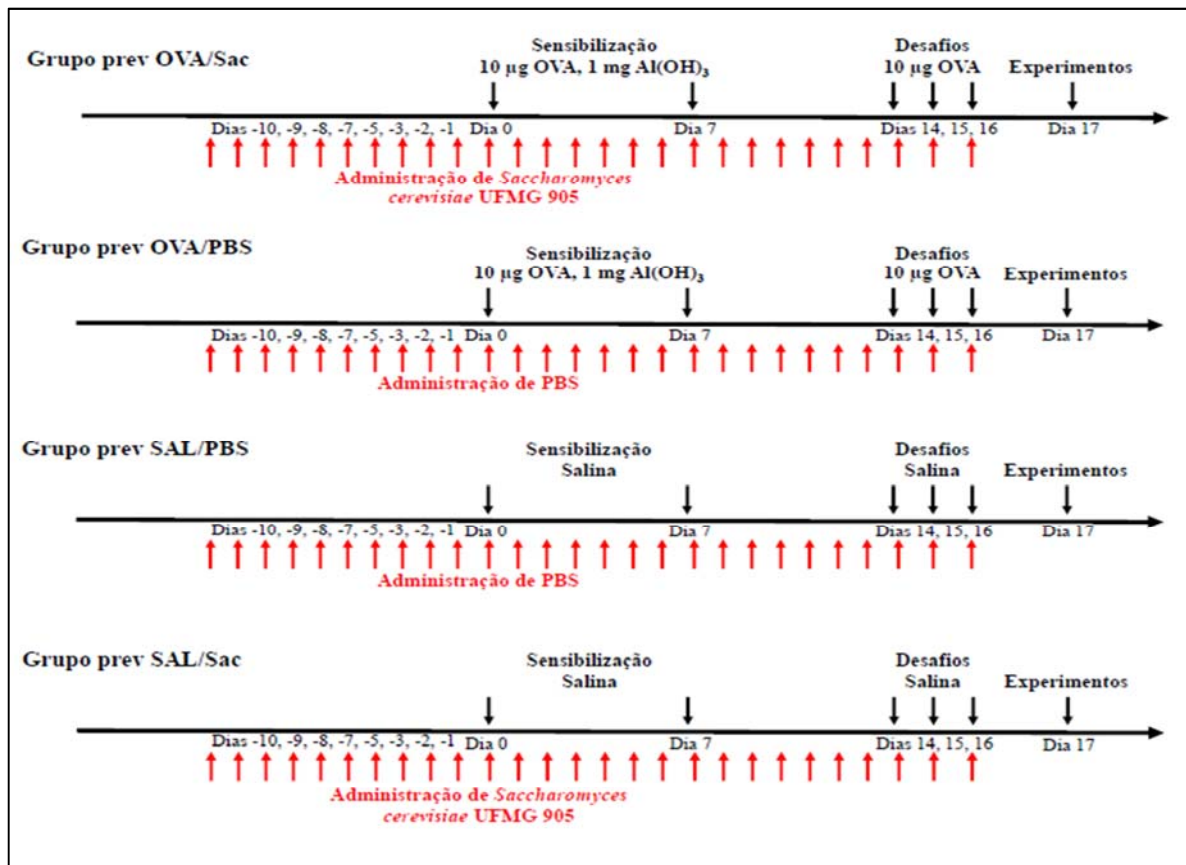


Figura 2 - Protocolo de sensibilização, desafios e tratamento.

3.6 Avaliação *in vivo* da hiper-responsividade

Vinte e quatro horas após o último desafio, os animais foram anestesiados I.P. com xilazina (10 mg/kg) e pentobarbital (30 mg/kg), uma cânula traqueal foi inserida e eles foram ventilados com um pequeno ventilador para animais, FlexiVent® (Scireq, Montreal, QC, Canadá), com uma frequência respiratória de 150 respirações/minuto e PEEP de 3 cmH₂O. Foi induzida paralisia muscular com brometo de pancurônio I.P. (1.2 mg/kg) e, somente após completamente anestesiados e paralisados, as medidas respiratórias foram realizadas.

Esse ventilador permite a realização de medidas *in vivo* de diversos parâmetros fisiológicos através da técnica de oscilação forçada, com o modelo de compartimento simples e o modelo de impedância complexo. Esses dois modelos permitem a separação das alterações nos diferentes compartimentos pulmonares, como vias aéreas e parênquima.

Para isso, antes da coleta dos dados de mecânica respiratória, os pulmões são insuflados até uma pressão de 27 cmH₂O para homogeneização pulmonar. Após, com a técnica de oscilação forçada, 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 3 s (*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 (62):

$$ZRS(f) = R_{aw} + j2\pi fI + (G_{ti} - jH_{ti}) / (2\pi f)^\alpha$$

Onde ZRS é a impedância do sistema respiratório, R_{aw} é a resistência das vias aéreas, j representa a unidade imaginária, I é a inertância das vias aéreas, G_{ti} reflete a dissipação de energia e está intimamente relacionado com a resistência das vias aéreas periféricas, H_{ti} reflete a energia acumulada no tecido do pulmão e está intimamente relacionado com a elastância tecidual, $\alpha = (2/\pi)\tan^{-1}(H/G)$, e f a frequência respiratória.

Foram feitas medidas na condição basal e após a provocação com a administração de concentrações crescentes de aerossóis com metacolina (6,25; 12,5; 25 e 50 mg/ml) por 10 segundos através de um nebulizador ultra-sônico (Hudson RCI, Teleflex Medical, Temecula, CA, USA).

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 das vias aéreas centrais (R_n), resistência tecidual (G) e elastância tecidual (H).

3.7 Coleta e processamento do LBA, pulmão e soro

Após a avaliação da responsividade brônquica, foi realizada a coleta de LBA a fim de quantificar a inflamação. Para isso, o LBA foi coletado duas vezes pela infusão e aspiração de 1 ml de solução salina pela cânula traqueal. As duas amostras do LBA foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante da primeira amostra foi coletado e armazenado a

-80°C para dosagem de citocinas. Após a coleta do LBA, foi feita a coleta de sangue através do ventrículo direito. O sangue foi centrifugado, e o plasma foi separado e armazenado a -70°C. Após a coleta do LBA, a caixa torácica foi aberta e foram infundidos 5 ml de solução salina no ventrículo direito para retirada do sangue dos pulmões.

O pulmão direito foi extraído e armazenado em RNAlater (Qiagen, Austin, Texas, USA) para extração de RNA e preparação do homogenato pulmonar para dosagem de citocinas. O pulmão esquerdo foi insuflado com formalina tamponada a 10% sob uma pressão de 25 cm H₂O por 25 minutos. Após, foi fixado em formalina tamponada a 10% por 24 horas, incluídos em blocos de parafina e cortados em micrótomo convencional com espessura de 5 µm. Os cortes foram utilizados para histologia.

3.8 Contagem total e diferencial de células no LBA

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

3.9 Dosagem de citocinas no LBA

Foram realizadas as dosagens de IL-4, IL-5 e IL-10 no sobrenadante da primeira amostra do LBA com ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), de acordo com as instruções do fabricante (BD Biosciences BD OptEIA™, San Diego, CA e eBioscience, San Diego, CA, EUA).

3.10 Preparo do homogenato e dosagem de citocinas inflamatórias no pulmão

O homogenato foi preparado a partir do pulmão armazenado em RNAlater (Qiagen, Austin, Texas, EUA) a -70°C. Para isso, 50 mg de pulmão foram pesados numa balança de

precisão e foram adicionados em 1 ml de uma solução contendo inibidor de proteases (Complete EDTA-free, ROCHE). O órgão foi processado utilizando um homogeneizador de tecido (OMNI(TH)-International-Kennesaw, GA, EUA). Após foi centrifugado a 3500 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -70°C.

Foram dosadas as citocinas inflamatórias de padrão Th1 e Th2 no sobrenadante do homogenato do pulmão por ELISA, de acordo com as instruções do fabricante (BD Biosciences BD OptEIA™, San Diego, CA e eBioscience, San Diego, CA, EUA). As citocinas quantificadas no homogenato foram IFN- γ , IL-10, IL-5 e IL-13.

3.11 Detecção de anticorpos específicos para OVA

Foi realizada a quantificação de IgE, IgG1A e IgG2a específicos para OVA. Brevemente, a cada poço de uma placa de 96 poços foi adsorvido 100 μ L de OVA (10 μ g/mL) e a placa foi incubada por 18 horas a 4°C. Então, com auxílio da lavadora de placas Aquax Max 2000 (MDS Technologies, EUA), os poços foram lavados com PBS contendo 0,05% de Tween 20. As reações inespecíficas foram bloqueadas com a incubação por 1 hora a 37°C com PBS contendo 10% de soro fetal bovino. Os poços foram lavados e 100 μ L das amostras de soro foram adicionadas. Após 2 horas a 37°C, os poços foram lavados e 100 μ L dos anticorpos biotinizados foram adicionados. Decorrido 1 hora a 37°C, os poços foram lavados e 100 μ L de estreptavidina HRP (diluída 1:10.000; BD Bioscience, EUA) foram adicionados e incubados por 30 minutos em temperatura ambiente no escuro. Os poços foram então lavados e a reação foi revelada decorrida 30 minutos da incubação com 100 μ L de TMB (BD Bioscience, EUA). A reação foi interrompida com adição de 50 μ L de ácido sulfúrico (16%). A leitura da absorbância foi lida com auxílio do espectrofotômetro Versa Max (Molecular Devices, EUA), no comprimento de onda de 450nm e 570nm. Na tabela 1 encontram-se os anticorpos utilizados.

Tabela 1 - Nome, clone e fabricante dos anticorpos utilizados nos ensaios de detecção de anticorpos séricos específicos para OVA.

Classe de Anticorpo	Clone	Fabricante
IgE	R35-118	BD Bioscience, EUA
IgG1	A85-1	BD Bioscience, EUA
IgG2a	R19-15	BD Bioscience, EUA

3.12 Análise histológica do pulmão

Foram realizados cortes histológicos no pulmão com espessura de 5 mm e realizadas colorações de Hematoxilina-Eosina (H&E) e Picrosirius-Hematoxilina (PS). Para análise morfológica foram selecionadas 4 a 5 vias aéreas de cada camundongo, que apresentavam epitélio íntegro e relação do maior diâmetro/menor diâmetro maior ou igual a 0,5. Antes de serem analisadas, as lâminas foram visualizadas no microscópio LeicaDM500 (Leica, Alemanha) e as imagens foram fotografadas com um aumento de 200 vezes, transferidas para um computador e analisadas pelo software ImageJ - 1.45 (*Research of Services Branch, National Institute of Health- NIH*) (63).

A quantificação do número total de células inflamatórias coradas em H&E foi realizada utilizando uma grade de 108 pontos (9x13). Foram contadas as células inflamatórias presentes na intersecção dos pontos. O resultado foi expresso pelo número de células inflamatórias presentes em cada ponto dividido pelo número total de pontos presentes na grade (108).

Para quantificação do colágeno foram utilizadas as vias aéreas coradas em PS. Inicialmente foi calculada a área da parede da via aérea definida pela área compreendida entre a membrana basal epitelial e a adventícia das vias aéreas. O resultado foi expresso pela razão entre as áreas positivas para colágeno e área total da parede da via aérea.

3.13 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa de software *GraphPad Prism* versão 5.0. As variáveis categóricas foram expressas como porcentagem e as variáveis contínuas como média e desvio padrão. Para comparação entre grupos foram utilizadas as análises de variância *One Way ANOVA* e *Two Way ANOVA*. Após, foi utilizado o pós-teste de Bonferroni. Foi considerado significativo um valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Viabilidade da *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905

Na primeira etapa deste projeto, antes de iniciarmos a administração por gavagem, avaliamos a viabilidade da *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905, que ficou armazenada a uma temperatura de 2° a 4°C. Durante sete semanas, a *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 manteve uma viabilidade entre 70% a 90% (Figura 3). Considerando que o período de administração do probiótico havia sido programado para aproximadamente 4 semanas, a *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 mostrou viabilidade satisfatória para utilização nesse estudo.

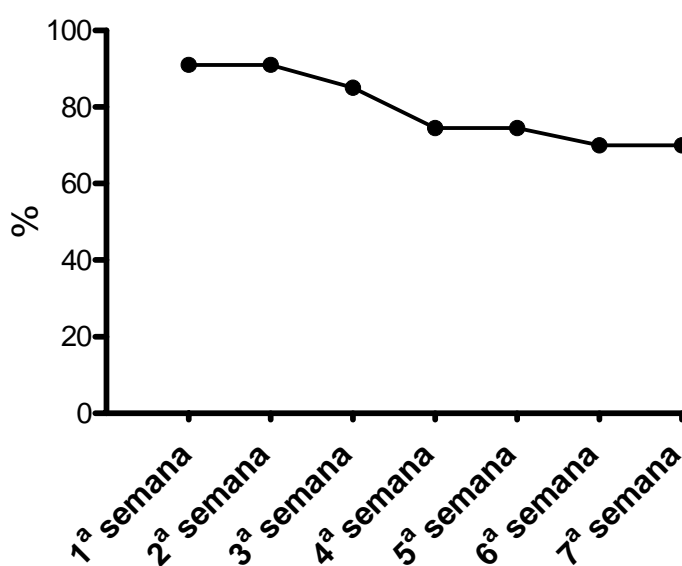


Figura 3 - Viabilidade da *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905. A *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 foi cultivada em meio YPD e mantida entre 2 a 4°C e, semanalmente, foi calculada a sua viabilidade.

4.2 Responsividade das vias aéreas

Os camundongos sensibilizados e desafiados com OVA apresentaram um aumento significativo na RRS ($p < 0,0001$), Rn ($p < 0,001$) e G ($p < 0,01$), quando comparados aos camundongos que receberam apenas solução salina. A administração de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 aos camundongos sensibilizados e desafiados

com ovalbumina, reduziu significativamente a RRS ($p < 0,001$), Rn ($p < 0,01$) e G ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo Prev. OVA/PBS. Portanto, a administração de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 reduziu significativamente a hiper-responsividade brônquica (Figura 4).

Avaliação da Hiper-responsividade Brônquica

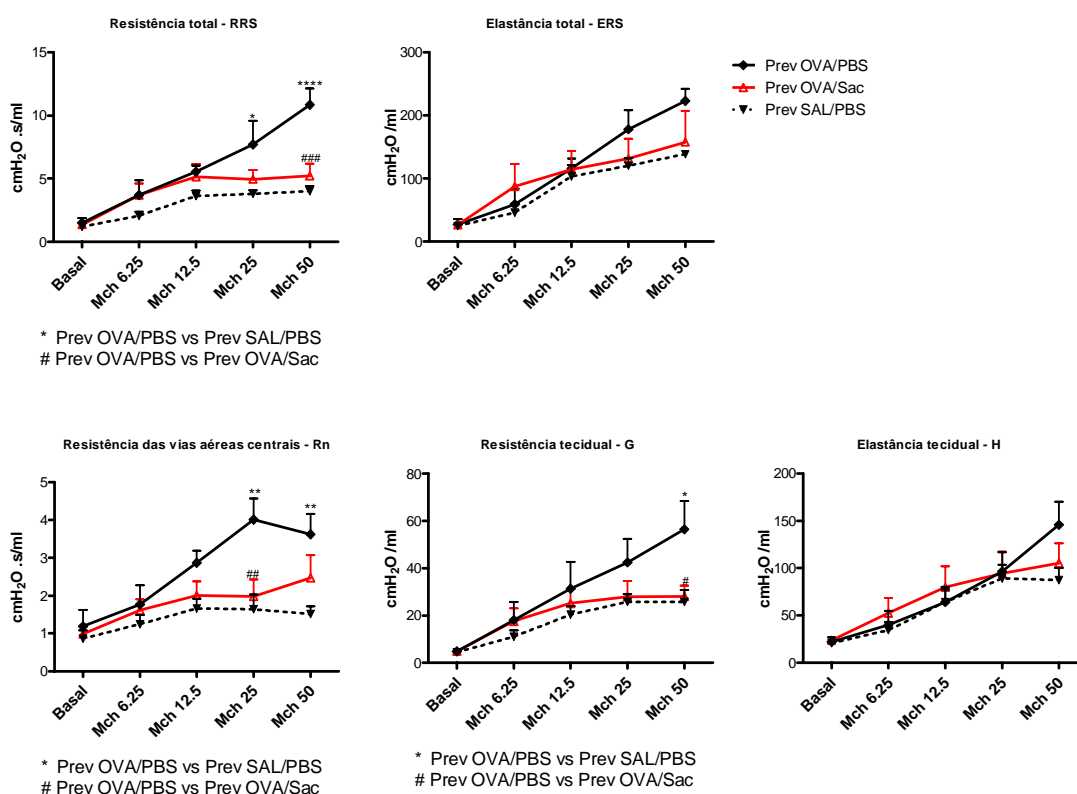


Figura 4 - Avaliação da hiper-responsividade brônquica. A hiper-responsividade brônquica foi avaliada 24h após os camundongos terem sido sensibilizados duas vezes com OVA, com uma semana de intervalo, e desafiados com OVA I.N. diariamente por três dias consecutivos. Os camundongos receberam por gavagem a *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 diariamente, dez dias antes da primeira sensibilização e durante todo o período de sensibilização e desafios. Os camundongos do grupo controle receberam apenas salina ou PBS. Foram avaliadas a resistência total (RRS), elastância total (ERS), resistência das vias aéreas centrais (Rn), resistência tecidual(G) e elastância tecidual(H). (n=5 a 7) * $p > 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

4.3 Número total de células no LBA

O grupo Prev. OVA/PBS, quando comparado ao grupo Prev. SAL/PBS apresentou aumento significativo no número total de células ($p < 0,0001$). O grupo Prev. OVA/Sac apresentou redução significativa no número total de células presentes no LBA, quando comparado ao grupo Prev. OVA/PBS (Figura 5).

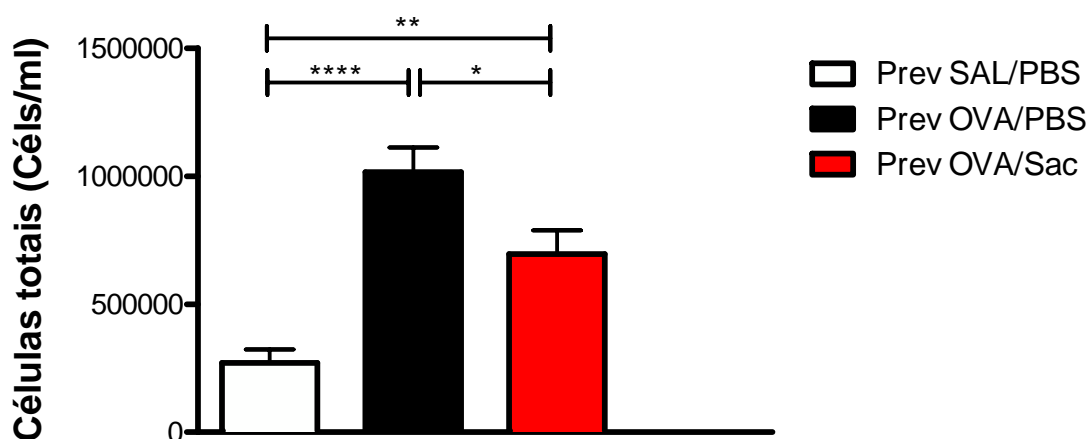


Figura 5 – Número total de células no lavadobroncoalveolar (LBA). Os camundongos foram sensibilizados duas vezes com OVA I.P., com uma semana de intervalo, e desafiados com OVA I.N. diariamente por três dias consecutivos. Os camundongos receberam por gavagem a *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 diariamente, dez dias antes da primeira sensibilização e durante todo o período de sensibilização e desafios. Os camundongos do grupo controle receberam apenas salina ou PBS. (n=7). * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

4.4 Células inflamatórias no LBA

Na quantificação de células diferenciais no LBA, houve um aumento significativo no número de eosinófilos e macrófagos do grupo Prev. OVA/PBS, quando comparado com o grupo Prev. SAL/PBS ($p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente). O grupo Prev. OVA/Sac quando comparado com o grupo Prev. OVA/PBS apresentou redução significativa no número de eosinófilos ($p < 0,001$). Adicionalmente o grupo Prev. OVA/Sac apresentou aumento significativo no número de neutrófilos em relação ao grupo Prev. OVA/PBS ($p < 0,01$). Não houve diferença significativa no número de linfócitos entre os grupos avaliados (Figura 6).

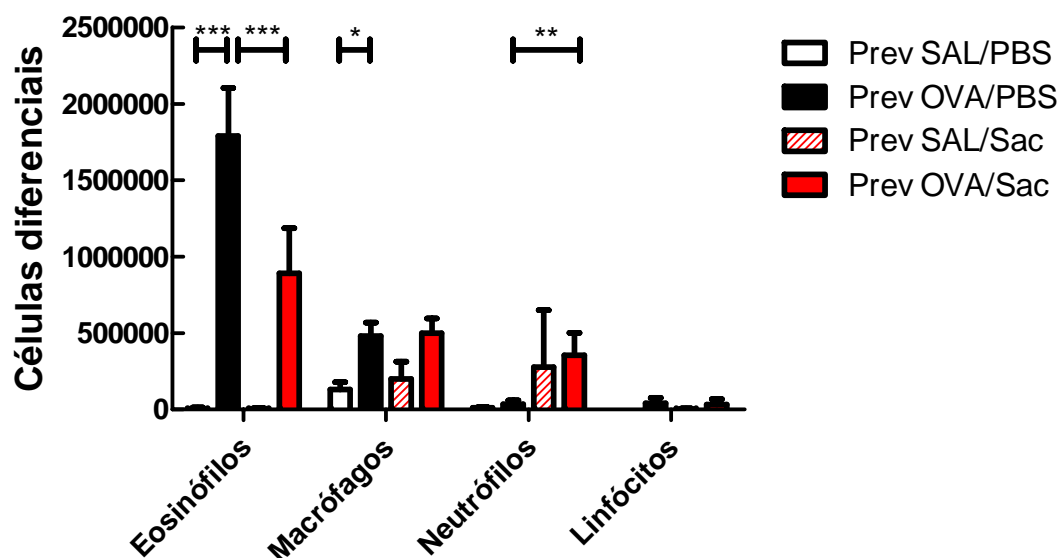


Figura 6 – Número diferencial de células no lavado broncoalveolar (LBA). Os camundongos foram sensibilizados duas vezes com OVA I.P., com uma semana de intervalo, e desafiados com OVA I.N. diariamente por três dias consecutivos. Os camundongos receberam por gavagem a *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 diariamente, dez dias antes da primeira sensibilização e durante todo o período de sensibilização e desafios. Os camundongos do grupo controle receberam apenas salina ou PBS. (n=4 a 7) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4.5 Níveis das citocinas IL-4, IL-5 e IL-10 no LBA

O grupo Prev. OVA/PBS, em comparação com o grupo Prev. SAL/PBS apresentou aumento significativo nos níveis de IL-4 ($p < 0,05$). A administração de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 reduziu significativamente os níveis de IL-4, quando comparado com o grupo Prev. OVA/PBS ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa nos níveis IL-5 e IL-10 no LBA entre os grupos estudados (Figura 7).

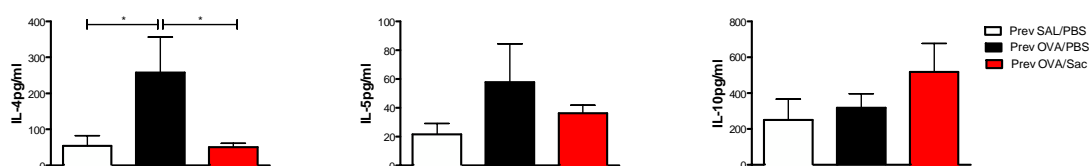


Figura 7 – Níveis de IL-4, IL-5 e IL-10 no lavado broncoalveolar (LBA). Os camundongos foram sensibilizados duas vezes com OVA I.P., com uma semana de intervalo, e desafiados com OVA I.N., diariamente por três dias consecutivos. Os camundongos receberam por gavagem a *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 diariamente, dez dias antes da primeira sensibilização e durante todo o período de sensibilização e desafios. Os camundongos do grupo controle receberam apenas salina ou PBS. (n=6 a 8). * $p < 0,05$.

4.6 Níveis das imunoglobulinas IgE, IgG1 e IgG2a específicas para OVA

Houve aumento significativo nos níveis de IgE, IgG1 e IgG2a específicas para OVA no grupo Prev. OVA/PBS, quando comparado com o grupo Prev. SAL/PBS ($p < 0,05$; $p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente). A administração de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 não alterou significativamente os níveis de IgE, IgG1 e IgG2a específicas para OVA, em relação ao grupo OVA/Sac (Figura 8).

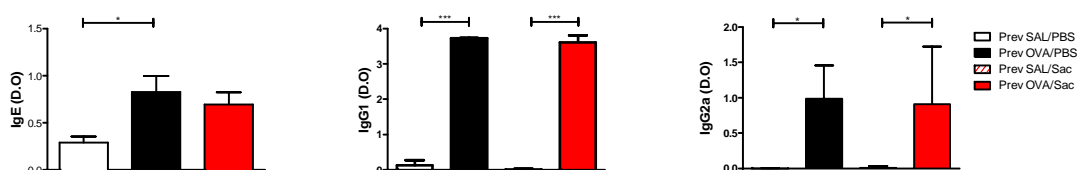


Figura 8 – Níveis de IgE, IgG1 e IgG2a OVA específica no soro. Os camundongos foram sensibilizados duas vezes com OVA I.P., com uma semana de intervalo, e desafiados com OVA I.N., diariamente por três dias consecutivos. Os camundongos receberam por gavagem a *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 diariamente, dez dias antes da primeira sensibilização e durante todo o período de sensibilização e desafios. Os camundongos do grupo controle receberam apenas salina ou PBS. (n=4 a 8). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

4.7 Níveis das citocinas IL-10, IFN- γ , IL-5 e IL-13 no homogenato pulmonar

Houve uma redução significativa nos níveis de IL-10 no grupo Prev. OVA/PBS, quando comparado ao grupo controle ($p < 0,01$). A administração de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 aumentou significativamente os níveis de IL-10 quando comparado ao grupo Prev. OVA/PBS ($p < 0,05$).

Em relação à dosagem de IFN- γ , o grupo Prev. OVA/PBS apresentou uma redução significativa nos níveis de IFN- γ quando comparado ao grupo Prev. SAL/PBS ($p < 0,05$). Essa diferença não atingiu significância estatística em relação ao grupo Prev. OVA/Sac (Figura 9).

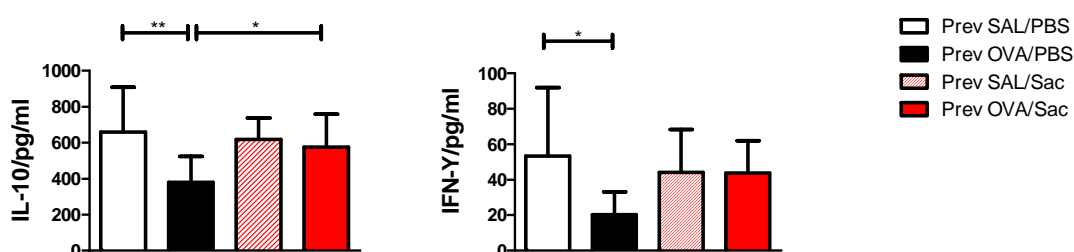


Figura 9 – Níveis de IL-10 e IFN- γ no homogenato pulmonar. Os camundongos foram sensibilizados duas vezes com OVA I.P., com uma semana de intervalo, e desafiados com OVA I.N., diariamente por três dias consecutivos. Os camundongos receberam por gavagem a *Saccharomyces cerevisiae* UFMG d 905 diariamente, dez dias antes da primeira sensibilização e durante todo o período de sensibilização e desafios. Os camundongos do grupo controle receberam apenas salina ou PBS. (n=6 a 8). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Houve um aumento significativo nos níveis de IL-13 no grupo Prev. OVA/PBS, quando comparado com o grupo Prev. SAL/PBS ($p < 0,05$). Adicionalmente, os níveis de IL-5 e IL-13 foram significativamente menores no grupo Prev. OVA/Sac, em comparação ao grupo Prev. OVA/PBS ($p < 0,05$) (Figura 10).

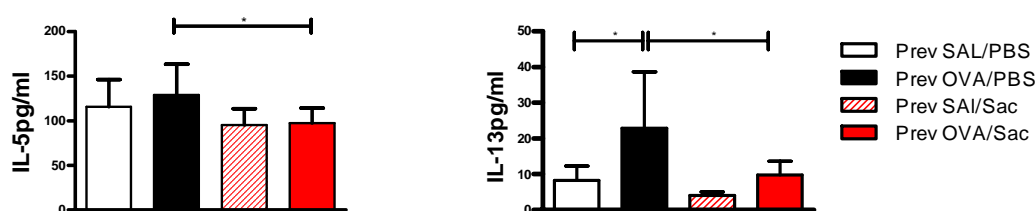


Figura 10 – Níveis de IL-5 e IL-13 no homogenato pulmonar. Os camundongos foram sensibilizados duas vezes com OVA I.P., com uma semana de intervalo, e desafiados com OVA I.N. diariamente por três dias consecutivos. Os camundongos receberam por gavagem a *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 diariamente, dez dias antes da primeira sensibilização e durante todo o período de sensibilização e desafios. Os camundongos do grupo controle receberam apenas salina ou PBS. (n=5 a 10). * $p < 0,05$.

4.8 Quantificação das células inflamatórias no tecido pulmonar

Os camundongos sensibilizados e desafiados com OVA apresentaram aumento significativo no número de células inflamatórias no tecido pulmonar, em comparação ao seu respectivo controle ($p < 0,001$). Adicionalmente, o número de células inflamatórias no tecido pulmonar reduziu significativamente no grupo Prev. OVA/Sac, em comparação com o grupo Prev. OVA/PBS ($p < 0,05$) (Figura 11).

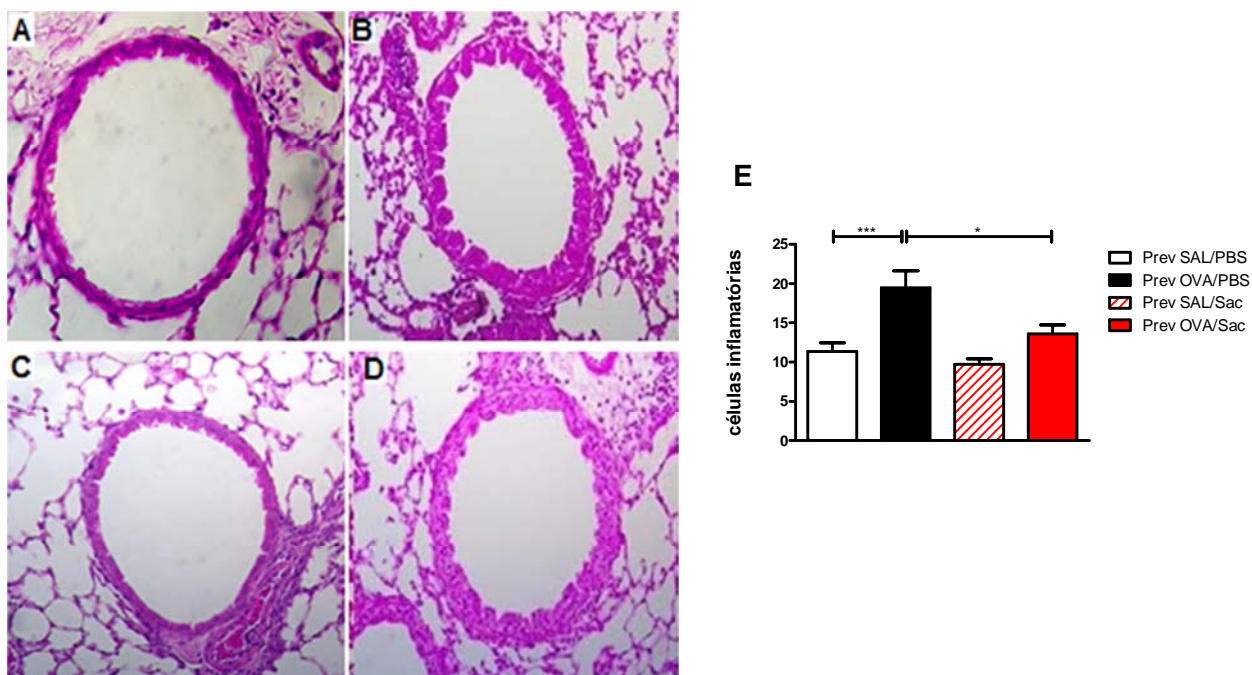


Figura 11 – Células inflamatórias do tecido pulmonar. A, B, C e D: Fotomicrografia representativa dos grupos Prev. SAL/PBS (A), Prev. OVA/PBS (B), Prev. SAL/Sac (C) e Prev. OVA/Sac (D). E: Quantificação das células inflamatórias. Os camundongos foram sensibilizados duas vezes com OVA I.P., com uma semana de intervalo, e desafiados com OVA I.N. diariamente por três dias consecutivos. Os camundongos receberam por gavagem a *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 diariamente, dez dias antes da primeira sensibilização e durante todo o período de sensibilização e desafios. Os camundongos do grupo controle receberam apenas salina ou PBS. (n=6 a 8) * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

4.9 Quantificação do colágeno nas vias aéreas

Não houve diferença significativa na deposição de colágeno nas vias aéreas entre os grupos estudados (Figura 12).

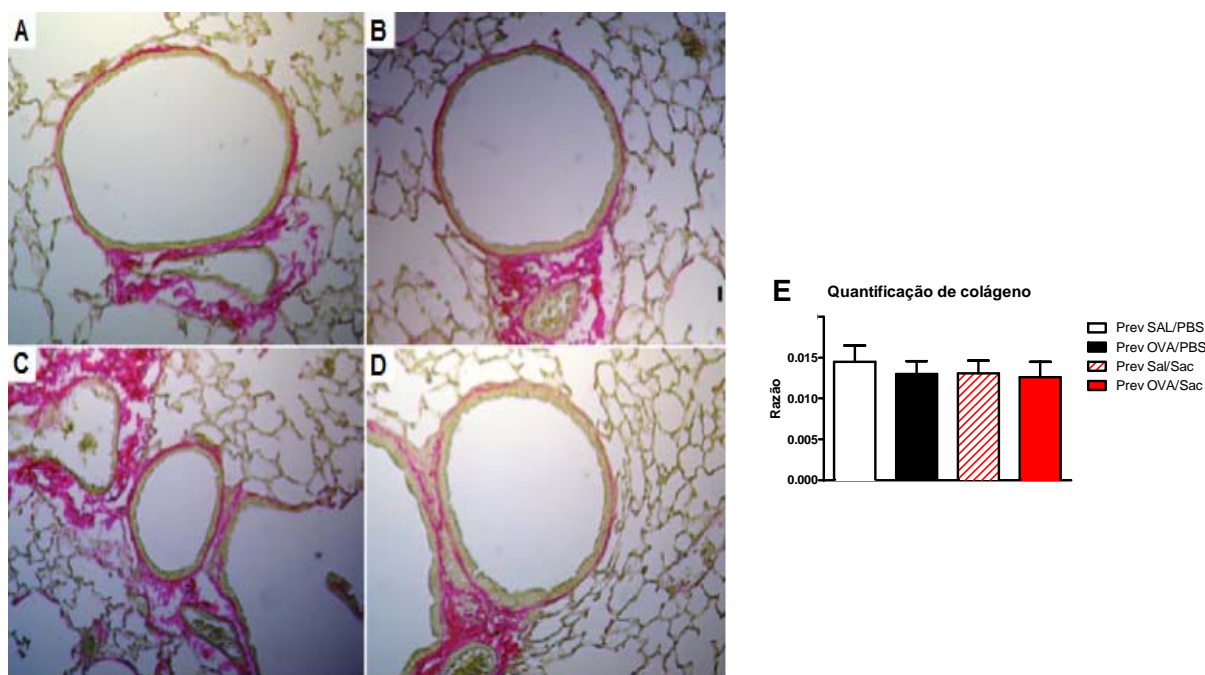


Figura 12 – Deposição de colágeno nas vias aéreas A, B,C e D: Fotomicrografia representativa dos grupos Prev. SAL/PBS (A), Prev. OVA/PBS (B), Prev. SAL/Sac (C) e Prev. OVA/Sac (D) E: Quantificação de colágeno. Os camundongos foram sensibilizados duas vezes com OVA I.P., com uma semana de intervalo, e desafiados com OVA I.N. diariamente por três dias consecutivos. Os camundongos receberam por gavagem a *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 diariamente, dez dias antes da primeira sensibilização e durante todo o período de sensibilização e desafios. Os camundongos do grupo controle receberam apenas salina ou PBS. (n=6 a 8)

5 DISCUSSÃO

Nesse estudo, nós avaliamos os efeitos da administração de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 na prevenção da asma em camundongos sensibilizados e desafiados com OVA. Nossos dados demonstram que a administração de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 foi capaz de prevenir o desenvolvimento das principais características da asma, tais como hiper-responsividade brônquica e inflamação das vias aéreas e pulmonar, demonstradas por redução no número total de células, de eosinófilos, dos níveis de IL-4, IL-5 e IL-13 e aumento da produção de IL-10.

A asma é uma doença inflamatória crônica, caracterizada por hiper-responsividade das vias aéreas, limitação variável ao fluxo aéreo, e remodelamento brônquico. Classicamente, a asma apresenta um padrão de resposta imune de perfil predominantemente Th2. Por outro lado, a teoria da higiene sugere que as exposições a micro-organismos e contatos não higiênicos na infância influenciam o desenvolvimento do sistema imune e podem atenuar respostas de padrão Th2 e, conseqüentemente, proteger contra o desenvolvimento de asma e outras doenças alérgicas (6, 32, 33). Nesse sentido, o uso de probióticos pode, potencialmente, apresentar um efeito benéfico na prevenção e/ou tratamento da asma.

Embora recentemente tenha aumentado o interesse no uso de probióticos em doenças alérgicas, ainda existem poucos estudos sobre os efeitos dos probióticos na asma. Adicionalmente, os efeitos dos probióticos não são observados em todas as espécies ou gêneros, e depende também do modelo utilizado, dose administrada, entre outros fatores. Em nosso conhecimento, até o momento nenhum estudo avaliou o uso da *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 na prevenção da asma.

Na primeira parte deste estudo, avaliamos a viabilidade da *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905, que se manteve estável por um período de, pelo menos, sete semanas. Esta avaliação foi importante para avaliar se ela estaria viável durante todo período de administração, ou seja, vinte e sete dias. Além disso, embora não tenha sido o escopo desse estudo, reforça que esse probiótico pode ser comercialmente viável. Após, avaliamos seu efeito na resposta asmática em um modelo animal sensibilizado e desafiado com OVA. Inicialmente, demonstramos que a administração de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 reduziu significativamente a hiper-responsividade brônquica.

A hiper-responsividade brônquica é uma característica central da asma. Os mecanismos envolvidos ainda não foram totalmente elucidados, algumas possíveis explicações incluem redução do calibre da via aérea, espessamento da parede brônquica, aumento da permeabilidade da mucosa, aumento do número de células inflamatórias, liberação de mediadores químicos, mudanças estruturais e aumento da contractilidade muscular (64, 65). Além disso, em um modelo animal de asma, o fechamento das vias aéreas pode contribuir significativamente com o desenvolvimento da hiper-responsividade (66-68).

A redução da hiper-responsividade brônquica decorrente da administração de probióticos já havia sido descrito por outros autores, com a utilização de outros probióticos, como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (47, 48). Entretanto, em alguns desses estudos a avaliação da hiper-responsividade foi realizada por pletismografia (*Whole body plethysmography*) e pela técnica de interruptor de fluxo (RINT). Ambas as técnicas são avaliações indiretas da mecânica respiratória e, conseqüentemente, estão sujeitas a intervenções externas, como estresse do camundongo, o que pode fazer com que essas medidas não representem fidedignamente as alterações fisiológicas avaliadas(69). Por outro lado, as medidas diretas da mecânica respiratória, como utilizadas em nosso estudo, que incluem principalmente resistência e elastância, refletem mais adequadamente alterações na função pulmonar.

A redução da hiper-responsividade brônquica pela administração de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 pode estar relacionada com a diminuição de células totais e de eosinófilos no LBA e/ou dos níveis de IL-4 e IL-13, observadas no estudo.

As células totais e os eosinófilos, quantificadas no LBA apresentaram redução significativa em resposta à administração de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905. Inúmeros mecanismos podem explicar esse achado, como a ação de células T reguladoras (33, 70), produção de ácidos graxos de cadeia curta e/ou IL-10, entretanto mais estudos são necessários para avaliar o mecanismo responsável pela diminuição dessas células. A redução de eosinófilos, assim como da hiper-responsividade brônquica, é um dado importante para a asma devido ao papel dessas células na sua patogênese. Os eosinófilos estão aumentados em pacientes asmáticos, principalmente no pulmão e trato respiratório superior, e contribuem, para a broncoconstrição, secreção de muco e dano no tecido das vias aéreas. Eles liberam diversas citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, muitas consideradas como pró-inflamatórias, que contribuem para a manutenção do processo inflamatório (71).

Uma citocina importante na fisiopatologia da asma é IL-5, que é responsável pelo desenvolvimento, sobrevivência e ativação de eosinófilos, e contribui também para a hiper-responsividade e remodelamento das vias aéreas (72-75). Assim, a redução nos níveis de IL-5 no pulmão pode ser uma das explicações para a diminuição de eosinófilos observada no LBA (76, 77). Adicionalmente, a redução de IL-5 decorrente da administração de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 pode ter contribuído também com a menor hiper-responsividade brônquica.

Adicionalmente, IL-4 e IL-13 são também citocinas consideradas de perfil Th2. A IL-4 é uma citocina produzida, predominantemente, por linfócitos T e mastócitos, e tem papel fundamental na indução de IgE, aumento da expressão de moléculas de adesão na superfície do endotélio como o VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule -1), indução de eosinófilos e de resposta Th2(78). IL-13, que é produzida por linfócitos T, macrófagos e eosinófilos, também está relacionada com a hiper-responsividade brônquica por diversos mecanismos, como o estímulo a produção de fibroblastos presentes no pulmão e produção de muco(1, 17). Desta forma, considerando a importância de IL-4 e IL-13 na fisiopatologia da hiper-responsividade, a diminuição de seus níveis com a administração de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905, observada em nosso estudo, pode ser um dos mecanismos envolvidos na redução da hiper-responsividade brônquica.

Em relação à sensibilização, a administração de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 não foi capaz de reduzir os níveis de IgE no soro dos camundongos sensibilizados e desafiados com OVA. Outros estudos avaliaram o efeito de diferentes probióticos e tiveram resultados divergentes, como, por exemplo, um estudo que comparou os probióticos *Bifidobacterium animalis* NumRes253, *Bifidobacterium breve* M16V, ou *Lactobacillus rhamnosus* NumRes6 em camundongos sensibilizados e desafiados com OVA e evidenciaram redução de IgE e IgG1 específicos para OVA (52). Uma possível explicação para a não alteração de IgE pela *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 pode ser que o mecanismo de ação desse probiótico não seja na sensibilização ao alérgeno ou o período de administração não tenha sido suficiente para a sua ação.

Outra evidência que confirma o desenvolvimento da resposta alérgica à OVA foi a produção de anticorpos IgG1 e IgG2a específicas, ambos aumentados significativamente no soro dos camundongos sensibilizados e desafiados com OVA. No entanto, a administração de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 não reduziu significativamente os níveis de IgG1 e

IgG2a específicas para OVA, o que reforça que a *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 não atuou na sensibilização dos camundongos.

Por outro lado, observamos aumento de IL-10 nos camundongos que receberam a *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905, em comparação aos sensibilizados e desafiados com OVA. Considerada uma citocina de padrão Th2, a IL-10 é uma citocina secretada por diversas células como linfócitos B, mastócitos, eosinófilos, macrófagos, células dendríticas e principalmente linfócitos T reguladores (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) (25, 26). Essa citocina apresenta papel fundamental na asma, estando reduzida em indivíduos asmáticos (31). Como IL-10 tem características imunossupressoras, como a inibição de citocinas inflamatórias, ela contribui para o equilíbrio da resposta imune. Assim, o aumento nos níveis de IL-10 pode ser um dos possíveis mecanismos de ação da *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905. Essa hipótese pode ser reforçada por outros estudos que demonstraram que a administração de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 vivas ou mortas pelo calor aumentou a produção de IL-10(61).

A *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 é um fungo, mais especificamente uma levedura. Os fungos apresentam uma característica na sua parede celular que é uma cadeia curta de polímeros de glicose mais conhecido como β -glucan que estimula a imunidade inata(79). Neutrófilos e macrófagos são as principais células do sistema imune inato e fazem parte da primeira linha de defesa do organismo.

Em nosso trabalho, houve um aumento de neutrófilos no grupo que recebeu a *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905. Uma das hipóteses pode ser devido à técnica de administração do probiótico (gavagem), fazendo com que o camundongo regurgitasse e aspirasse a *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 e, conseqüentemente, ocorresse um aumento de neutrófilos no LBA. Mais especificamente, isso poderia ser explicado pela presença de β - glucan na parede da levedura *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905, que é um fator quimiotáxico para neutrófilos (79).

Leblanc, Albina e Reichner (2006) demonstraram que o tratamento com β -glucan aumentou o potencial migratório de neutrófilos para uma inflamação em um modelo animal (79).

A redução significativa de células inflamatórias no parênquima pulmonar decorrente a administração de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 reforça mais uma vez a imunomodulação da resposta inflamatória proporcionada por esse probiótico.

Em relação à quantificação de colágeno nas vias aéreas não houve alteração significativa entre os grupos. Sabe-se que o remodelamento significativo ocorre numa fase mais avançada da asma, ou seja, na cronicidade da doença(1, 13). O desenho desse estudo pode ser classificado como asma aguda e, por esta razão, não houve evidências de alterações entre os grupos estudados.

Como comentado acima, outros probióticos já foram avaliados em modelos animais de asma. *Forsythe, Inman e Bienenstock* (2007) avaliaram os efeitos de dois probióticos *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus salivarius*, em um modelo animal de asma e demonstraram que somente a administração de cepas vivas de *Lactobacillus reuteri* por um período de nove dias inibiu a hiper-responsividade brônquica, reduziu eosinófilos, macrófagos, e diminuiu os níveis de IL-5, IL-13 e TNF no LBA de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA. É importante ressaltar que, nesse mesmo estudo, a administração do probiótico morto e de *Lactobacillus salivarius* não modulou a resposta alérgica (51).

Yu et al. avaliaram os efeitos de *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35 em um modelo animal de asma. Nesse estudo foram realizadas duas sensibilizações com OVA num intervalo de sete dias e após uma semana, três desafios diariamente com OVA. Um grupo de camundongos recebeu o probiótico sete dias antes da primeira sensibilização com OVA (prevenção) e o outro grupo dois dias antes do primeiro desafio com OVA (tratamento). Eles demonstraram que o tratamento preventivo foi mais eficaz na redução da hiper-responsividade brônquica, no número de células totais eosinófilos (80).

Jonh MacSharry et al. avaliaram os efeitos da administração de *Bifidobacterium longum* diariamente por catorze dias em camundongos sensibilizado e desafiados com OVA. A administração de *Bifidobacterium longum* reduziu o número de eosinófilos e IL-4 no LBA apenas quando os camundongos foram desafiados por um dia. Quando os camundongos foram desafiados por três dias, os resultados foram inferiores (81).

Estes estudos reforçam que diferentes cepas de probióticos (*Bifidobacterium sp* e *Lactobacillus sp*), ou cepas do mesmo gênero e espécies diferentes (*Bifidobacterium breve* e *Bifidobacterium longum*), são capazes de modular a resposta imune de formas diferentes, assim como o desenho do estudo. Muitos desses resultados foram semelhantes aos que observamos com a *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905, ou seja, ela atenuou as principais características da asma e foi capaz de induzir a produção de IL-10.

Apesar das propriedades imunorregulatórias dos probióticos, os mecanismos envolvidos na regulação imunológica ainda não são completamente conhecidos. Esses mecanismos quando melhor decifrados podem auxiliar na escolha de uma ou mais cepas de um probiótico ou na associação de probióticos que nos permita alcançar uma melhor eficácia na prevenção e /ou tratamento de doenças alérgicas, como a asma.

Ao que tudo indica, a importância da interação com os micro-organismos pode gerar uma correlação positiva para o desenvolvimento do seu sistema imunológico. As microbiotas presente na pele, vias aéreas e intestinais exercem um papel muito importante no processo saúde-doença do indivíduo através da colonização, produção de substâncias benéficas para o bom funcionamento do organismo e como regente de células que exercem o papel da modulação do sistema imune. Essa simbiose é de tal importância que alterações na diversidade da microbiota intestinal podem predispor a doenças alérgicas (82).

Estudos mostram que indivíduos que moram próximos de áreas verdes, ingerem alimentos ricos em fibras apresentam menor probabilidade de desenvolverem doenças alérgicas quando comparados com indivíduos que se estabeleceram em regiões urbanas e apresentam hábitos alimentares não saudáveis (82). Essas características estão relacionadas com a composição da microbiota intestinal. Indivíduos alérgicos apresentam alteração na diversidade da flora intestinal, como a diminuição dos *Lactobacilli* e *Bacteroides* (3). O gênero *Bifidobacterium* sp (*Bacteroides*) está relacionado com a produção de ácidos graxos de cadeia curta, que podem proteger contra inflamação alérgica no pulmão, e o aumento do gênero *Bifidobacterium* na microbiota está relacionada com a ingestão de fibras.

Há muito a ser estudado sobre os probióticos e seus mecanismos, mas alguns micro-organismos com potencial terapêutico estão sendo identificados e avaliados na prevenção e/ou tratamentos de diversas doenças.

Alguma das limitações encontradas neste trabalho foi a não utilização de outros probióticos como comparação aos resultados obtidos e a utilização de apenas uma espécie de camundongos. Além disso, são necessários mais estudos para melhor avaliar o mecanismo de ação da *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905.

6 CONCLUSÕES

Podemos concluir que a administração da *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905, diminuiu a hiper-responsividade brônquica, reduziu o número total de células e de eosinófilos no LBA, e os níveis de IL-4 no LBA e IL-5 e IL-13 no homogenato do pulmão, além de aumentar os níveis de IL-10.

Desta forma, a *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 atenuou as principais características da asma em um modelo animal e, conseqüentemente, pode ter um efeito benéfico na prevenção da asma.

REFERÊNCIAS

1. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *AmJRespirCrit Care Med.* 2000;161(5):1720-45.
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. 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.
4. Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *EurRespirJ.* 1998;12(2):315-35.
5. Sole D, Yamada E, Vana AT, Costa-Carvalho BT, Naspitz CK. Prevalence of asthma and related symptoms in school-age children in Sao Paulo, Brazil--International Study of Asthma and Allergies in Children (ISAAC). *JAsthma.* 1999;36(2):205-12.
6. [IV Brazilian Guidelines for the management of asthma]. *JBrasPneumol.* 2006;32 Suppl 7:S447-S74.
7. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy.* 2004;59(5):469-78.
8. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. National Heart,Lung,and Blood Institute; National Institutes of Health; World Health Organization, 2009.
9. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(33):14691-6.
10. Trompette A, Gollwitzer ES, Yadava K, Sichelstiel AK, Sprenger N, Ngom-Bru C, et al. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat Med.* 2014;20(2):159-66.
11. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Global Initiative for Asthma(GINA)2006. 2006.

12. Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barneon G, Ghavanian N, Enander I, et al. Eosinophilic inflammation in asthma. *NEnglJMed*. 1990;323(15):1033-9.
13. Vignola AM, Chanez P, Campbell AM, Souques F, Lebel B, Enander I, et al. Airway inflammation in mild intermittent and in persistent asthma. *AmJRespirCrit Care Med*. 1998;157(2):403-9.
14. Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *ClinExpAllergy*. 2008;38(6):872-97.
15. Georas SN, Guo J, De Fanis U, Casolaro V. T-helper cell type-2 regulation in allergic disease. *European Respiratory Journal*. 2005;26(6):1119-37.
16. Del Prete G. Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy. *Allergy*. 1992;47(5):450-5.
17. Broide DH. Immunologic and inflammatory mechanisms that drive asthma progression to remodeling. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121(3):560-70; quiz 71-2.
18. Ryanna K, Stratigou V, Safinia N, Hawrylowicz C. Regulatory T cells in bronchial asthma. *Allergy*. 2009;64(3):335-47.
19. Ostroukhova M, Seguin-Devaux C, Oriss TB, Dixon-McCarthy B, Yang L, Ameredes BT, et al. Tolerance induced by inhaled antigen involves CD4(+) T cells expressing membrane-bound TGF-beta and FOXP3. *J Clin Invest*. 2004;114(1):28-38.
20. Holt PG, Strickland DH, Wikstrom ME, Jahnsen FL. Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(2):142-52.
21. Lloyd CM, Hawrylowicz CM. Regulatory T cells in asthma. *Immunity*. 2009;31(3):438-49.
22. 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.
23. McGee HS, Agrawal DK. Naturally occurring and inducible T-regulatory cells modulating immune response in allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180(3):211-25.

-
24. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med.* 1998;188(2):287-96.
 25. Commins S, Steinke JW, Borish L. The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121(5):1108-11.
 26. Maynard CL, Harrington LE, Janowski KM, Oliver JR, Zindl CL, Rudensky AY, et al. Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3+ and Foxp3- precursor cells in the absence of interleukin 10. *Nat Immunol.* 2007;8(9):931-41.
 27. Joetham A, Takeda K, Takada K, Taube C, Miyahara N, Matsubara S, et al. Naturally occurring lung CD4(+)CD25(+) T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF-beta. *J Immunol.* 2007;178(3):1433-42.
 28. Smits HH, Engering A, van der Kleij D, de Jong EC, Schipper K, van Capel TMM, et al. Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2005;115(6):1260-7.
 29. Kearley J, Barker JE, Robinson DS, Lloyd CM. Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *J Exp Med.* 2005;202(11):1539-47.
 30. Sun J, Madan R, Karp CL, Braciale TJ. Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10. *Nat Med.* 2009;15(3):277-84.
 31. Borish L, Aarons A, Rumblyrt J, Cvietusa P, Negri J, Wenzel S. Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 1996;97(6):1288-96.
 32. Niers LEM, Timmerman HM, Rijkers GT, van Bleek GM, van Uden NOP, Knol EF, et al. Identification of strong interleukin-10 inducing lactic acid bacteria which down-regulate T helper type 2 cytokines. *Clinical and Experimental Allergy.* 2005;35(11):1481-9.
 33. Feleszko W, Jaworska J, Rha RD, Steinhausen S, Avagyan A, Jaudszus A, et al. Probiotic-induced suppression of allergic sensitization and airway inflammation is associated with an increase of T regulatory-dependent mechanisms in a murine model of asthma. *Clinical and Experimental Allergy.* 2007;37(4):498-505.

-
34. Karimi K, Inman MD, Bienenstock J, Forsythe P. Lactobacillus reuteri-induced Regulatory T cells Protect against an Allergic Airway Response in Mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2009;179(3):186-93.
 35. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*. 1989;299(6710):1259-60.
 36. von Mutius E. Allergies, infections and the hygiene hypothesis--the epidemiological evidence. *Immunobiology*. 2007;212(6):433-9.
 37. Leibowitz U, Kahana E, Alter M. The changing frequency of multiple sclerosis in Israel. *Arch Neurol*. 1973;29(2):107-10.
 38. Kondrashova A, Reunanen A, Romanov A, Karvonen A, Viskari H, Vesikari T, et al. A six-fold gradient in the incidence of type 1 diabetes at the eastern border of Finland. *Ann Med*. 2005;37(1):67-72.
 39. Ball TM, Castro-Rodriguez JA, Griffith KA, Holberg CJ, Martinez FD, Wright AL. Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. *New England Journal of Medicine*. 2000;343(8):538-43.
 40. de Meer G, Janssen NAH, Brunekreef B. Early childhood environment related to microbial exposure and the occurrence of atopic disease at school age. *Allergy*. 2005;60(5):619-25.
 41. Illi S, von Mutius E, Lau S, Bergmann R, Niggemann B, Sommerfeld C, et al. Early childhood infectious diseases and the development of asthma up to school age: a birth cohort study. *British Medical Journal*. 2001;322(7283):390-5.
 42. Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, et al. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med*. 2002;347(12):869-77.
 43. Bjorksten B. The Hygiene Hypothesis: Do We Still Believe in It? *Microbial-Host Interaction: Tolerance Versus Allergy*. 2009;64:11-22 271.
 44. Tavernier G, Fletcher G, Gee I, Watson A, Blacklock G, Francis H, et al. IPEADAM study: Indoor endotoxin exposure, family status, and some housing characteristics in English children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2006;117(3):656-62.

-
45. Ferreira CM, Vieira AT, Vinolo MA, Oliveira FA, Curi R, Martins FoS. The central role of the gut microbiota in chronic inflammatory diseases. *J Immunol Res*. 2014;2014:689492.
 46. Food and Agriculture Organization WHO. Report of Joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, Argentina: Food and Agriculture Organization, World Health Organization (FAO/WHO), 2001 Report no. 10-1-2001.
 47. Ozdemir O. Various effects of different probiotic strains in allergic disorders: an update from laboratory and clinical data. *Clinical and Experimental Immunology*. 2010;160(3):295-304.
 48. Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2002;82(1-4):279-89.
 49. Fink LN. Induction of regulatory T cells by probiotics: potential for treatment of allergy? *Clinical and Experimental Allergy*. 2010;40(1):5-8.
 50. Boirivant M, Strober W. The mechanism of action of probiotics. *Current Opinion in Gastroenterology*. 2007;23(6):679-92.
 51. 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.
 52. Oral treatment with probiotics reduces allergic symptoms in ovalbumin-sensitized mice: a bacterial strain comparative study, 151 (2010).
 53. Czerucka D, Rampal P. Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. *Microbes and Infection*. 2002;4(7):733-9.
 54. McFarland LV, Surawicz CM, Greenberg RN, Fekety R, Elmer GW, Moyer KA, et al. Randomized Placebo-Controlled Trial of *Saccharomyces-Boulardii* in Combination with Standard Antibiotics for *Clostridium-Difficile* Disease. *Jama-Journal of the American Medical Association*. 1994;271(24):1913-8.
 55. Surawicz CM, McFarland LV, Greenberg RN, Rubin M, Fekety R, Mulligan ME, et al. The search for a better treatment for recurrent *Clostridium difficile* disease: Use of high-dose vancomycin combined with *Saccharomyces boulardii*. *Clinical Infectious Diseases*. 2000;31(4):1012-7.

-
56. McFarland LV. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World Journal of Gastroenterology*. 2010;16(18):2202-22.
57. Munoz P, Bouza E, Cuenca-Estrella M, Eiros JM, Perez MJ, Sanchez-Somolinos M, et al. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia: An emerging infectious disease. *Clinical Infectious Diseases*. 2005;40(11):1625-34.
58. Edwards-Ingram L, Gitsham P, Burton N, Warhurst G, Clarke I, Hoyle D, et al. Genotypic and physiological characterization of *Saccharomyces boulardii*, the probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007;73(8):2458-67.
59. Martins FS, Nardi RMD, Arantes RME, Rosa CA, Neves MJ, Nicoli JR. Screening of yeasts as probiotic based on capacities to colonize the gastrointestinal tract and to protect against enteropathogen challenge in mice. *Journal of General and Applied Microbiology*. 2005;51(2):83-92.
60. Martins FS, Rodrigues AC, Tiago FC, Penna FJ, Rosa CA, Arantes RM, et al. *Saccharomyces cerevisiae* strain 905 reduces the translocation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and stimulates the immune system in gnotobiotic and conventional mice. *J Med Microbiol*. 2007;56(Pt 3):352-9.
61. 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.
62. 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.
63. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):671-5.
64. Cockcroft DW, Davis BE. Airway hyperresponsiveness as a determinant of the early asthmatic response to inhaled allergen. *J Asthma*. 2006;43(3):175-8.
65. O'Byrne PM, Inman MD. Airway hyperresponsiveness. *Chest*. 2003;123(3 Suppl):411S-6S.

-
66. Bates JH, Thompson-Figueroa J, Lundblad LK, Irvin CG. Unrestrained video-assisted plethysmography: a noninvasive method for assessment of lung mechanical function in small animals. *J Appl Physiol* (1985). 2008;104(1):253-61.
67. Lundblad LK, Thompson-Figueroa J, Allen GB, Rinaldi L, Norton RJ, Irvin CG, et al. Airway hyperresponsiveness in allergically inflamed mice: the role of airway closure. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(8):768-74.
68. Wagers S, Lundblad LK, Ekman M, Irvin CG, Bates JH. The allergic mouse model of asthma: normal smooth muscle in an abnormal lung? *J Appl Physiol* (1985). 2004;96(6):2019-27.
69. Inman MD. Trends and recommendations in studies of mouse airway function. *Clin Exp Allergy*. 2010;40(4):524-7.
70. Lyons A, O'Mahony D, O'Brien F, MacSharry J, Sheil B, Ceddia M, et al. Bacterial strain-specific induction of Foxp3+ T regulatory cells is protective in murine allergy models. *Clin Exp Allergy*. 2010;40(5):811-9.
71. Davoine F, Lacy P. Eosinophil cytokines, chemokines, and growth factors: emerging roles in immunity. *Front Immunol*. 2014;5:570.
72. Finkelman FD, Hogan SP, Hershey GK, Rothenberg ME, Wills-Karp M. Importance of cytokines in murine allergic airway disease and human asthma. *J Immunol*. 2010;184(4):1663-74.
73. Foster PS, Hogan SP, Ramsay AJ, Matthaei KI, Young IG. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J Exp Med*. 1996;183(1):195-201.
74. Humbles AA, Lloyd CM, McMillan SJ, Friend DS, Xanthou G, McKenna EE, et al. A critical role for eosinophils in allergic airways remodeling. *Science*. 2004;305(5691):1776-9.
75. Tanaka H, Komai M, Nagao K, Ishizaki M, Kajiwara D, Takatsu K, et al. Role of interleukin-5 and eosinophils in allergen-induced airway remodeling in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004;31(1):62-8.
76. Uhm TG, Kim BS, Chung IY. Eosinophil development, regulation of eosinophil-specific genes, and role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2012;4(2):68-79.

77. Serra MF, Anjos-Valotta EA, Olsen PC, Couto GC, Jurgilas PB, Cotias AC, et al. Nebulized lidocaine prevents airway inflammation, peribronchial fibrosis, and mucus production in a murine model of asthma. *Anesthesiology*. 2012;117(3):580-91.
78. Steinke JW, Borish L. Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. *Respir Res*. 2001;2(2):66-70.
79. 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.
80. 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.
81. 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.

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do comitê de ética



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.

Ribeirão Preto, 28 de março de 2011.

Prof. Dr. Márcio Dantas
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal