UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

SPENCER SILVA SANTOS

EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE *Bifidobacterium longum* 5^{1A} EM UM MODELO MURINO DE ALERGIA ALIMENTAR

Belo Horizonte/MG
2019

SPENCER SILVA SANTOS

EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO ORAL *Bifidobacterium longum* 5^{1A} EM UM MODELO MURINO DE ALERGIA ALIMENTAR

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins

Co-orientador: Prof.ª Dr.ª Denise Carmona Cara Machado

Belo Horizonte/MG

2019

043 Santos, Spencer Silva.
Efeitos da administração oral de Bifidobacterium longum 5^{1A} em um modelo murino de alergia alimentar [manuscrito] / Spencer Silva Santos. – 2019.
153 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins. Co-orientador: Prof.ª Dr.ª Denise Carmona Cara Machado.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Hipersensibilidade Alimentar. 3. Alérgenos. 4. Inflamação. 5. Probióticos. 6. Bifidobacterium longum. I. Martins, Flaviano dos Santos. II. Machado, Denise Carmona Cara. III. Universidade Federal e Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579

Ficha Catalográfica elaborada pela bibliotecária Fabiane C M Reis CRB 6 2680

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE TESE DE Spencer Silva Santos
Nº REGISTRO: 2015704706

Às 8:30 horas do dia 22 de fevereiro de 2019, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Silvia Beleza de Moura, Maria de Lourdes Ferrari, Éricka Lorena de Sales e Souza, Denise Alves Perez e os Profs. Flaviano dos Santos Martins – Orientador e Denise Carmona Cara Machado - Coorientadora, para julgar o trabalho final, do aluno **Spencer Silva Santos**, intitulado de Efeitos da Administração Oral de *Bifidobacterium longum* 5^{1A} em um Modelo Murino de Alergia Alimentar, requisito final para a obtenção do Grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O candidato foi considerado **APROVADO.** O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 22 de fevereiro de 2019.

Profª. Drª. Silvia Beleza de Moura _____
Profª. Drª. Maria de Lourdes Ferrari _____
Profª. Drª. Éricka Lorena de Sales e Souza _____
Profª. Drª. Denise Alves Perez _____
Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins (Orientador) _____
Profª. Drª. Denise Carmona Cara Machado (Coorientadora) _____

_____
Prof. Flávio Guimarães da Fonseca
Coordenador

LABORATÓRIOS ENVOLVIDOS E COLABORADORES

Laboratório de Agentes Bioterapêuticos, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal De Minas Gerais (UFMG)

- Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins

Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos, Departamento de Microbiologia, ICB, UFMG

- Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins
- Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli

Departamento de Morfologia, ICB, UFMG

- Prof.ª Dr.ª Denise Carmona Cara Machado

Laboratório de Radioisótopos, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, UFMG

- Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso

AGRADECIMENTOS

À minha família: meus pais Marcia e João, meus irmãos queridos Thiago, Karise e Tassio, meus tios e tias, primos e primas, e a minha avó Lourdes, por todo o amor, atenção e incentivo, pelos ensinamentos e exemplo de integridade e, principalmente, pela compreensão nos meus momentos de ausência.

Aos meus amigos, principalmente Clayton Rodrigues, por toda ajuda, incentivo, compreensão, não me deixando desistir quando fui fraco e sempre me mostrando o quanto eu era capaz de prosseguir, obrigado por tudo.

Aos meus amigos que a pós-graduação me proporcionou e que levarei para a vida: Franklin, Bárbara, Fabs, Quésia, Ariane, Rafa, Sabrynna, Khatarina, Mônica, Gabriele (Gabi), Rodrigo, Vivian, Victor, Gabi e Karen.

Ao meu orientador, Professor Dr. Flaviano Martins, pelo exemplo de profissionalismo, pela orientação e confiança. Além de seu exemplo como pesquisador e ser humano.

À minha co-orientadora, Dr.ª Denise Carmona, pela contribuição para a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Jacques Robert Nicoli, pelo espelho de profissional, mestre, pesquisador e ser humano brilhante que sempre foi nesses meus 8 anos de UFMG.

Às Professoras Dr.ª Elisabeth Neumann e Dr.ª Sílvia Moura pela agradável convivência diária e disponibilidade em ajudar quando precisei.

Aos amigos do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos.

Aos Professores do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG pelos valiosos ensinamentos.

Às instituições de amparo à pesquisa: CNPq, CAPES e FAPEMIG, pelo suporte financeiro utilizado nesta pesquisa.

A todos aqueles, que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

E principalmente a DEUS, por me fazer ressurgir quando fui pó e por nunca ter desistido de mim.

“Eu não falhei. Apenas descobri 10 mil maneiras que não funcionam”

Thomas Edison

RESUMO

A alergia alimentar é definida como uma reação adversa a um antígeno alimentar mediada por mecanismos fundamentalmente imunológicos. Os alimentos mais citados como causadores de alergias alimentares são: leite, ovos, amendoim, castanhas, camarão, peixe e soja. Vários investimentos em pesquisas no sentido de reduzir os danos causados por esses alimentos vêm sendo desenvolvidos. Atualmente há um interesse crescente no uso de probióticos como alternativa aos tratamentos convencionais da alergia alimentar. Nesse estudo, buscou-se avaliar o efeito da administração oral de *Bifidobacterium longum* 5^{1A} na alergia alimentar experimental à ovalbumina (OVA). Para isso, grupos de camundongos Balb/c receberam duas imunizações com OVA (dias 0 e 14). A partir do dia 18, os camundongos receberam diariamente, por via oral, salina ou doses crescentes de *B. longum* 5^{1A} até o fim da experimentação. No 21º os camundongos receberam uma ração contendo OVA até o dia 28, quando foram eutanaziados. Quando recebeu ração com OVA, o grupo controle sensibilizado mostrou perda de peso corporal, lesões teciduais intestinais, aumentos dos níveis séricos de IgE anti-OVA e de citocinas pró-inflamatórias, de sIgA intestinal, da permeabilidade intestinal e de infiltrado de eosinófilos e neutrófilos na mucosa intestinal. O tratamento com *B*. *longum* 5^{1A} na dose de $1x10^8$ UFC reduziu ou eliminou todos esses sinais clínicos e imunológicos e estimulou a produção de IL-10. A avaliação da microbiota fecal por técnica dependente de cultivo mostrou, no grupo tratado com *B*. *longum* 5^{1A}, uma redução das enterobactérias e um aumento das bactérias do ácido lático (em particular *Enterococcus*) e do gênero *Staphylococcus*. O acetato, produto metabólico de *Bifidobacterium,* não parece estar envolvido nesses efeitos. Esses resultados demonstram que a administração oral de *B. longum* 5^{1A} poderia ser uma alternativa eficaz no tratamento da alergia alimentar.

Palavras-chave: alergia alimentar, antígeno alimentar, alérgenos, inflamação, probiótico, *Bifidobacterium longum* 5^{1A}.

ABSTRACT

Food allergy is defined as an adverse reaction to a food antigen fundamentally mediated by immunological mechanisms. The foods most cited as causing food allergies are: milk, eggs, peanuts, nuts, shrimp, fish and soy. Several investments in research to reduce the damage caused by these foods have been developed. There is a growing interest in the use of probiotics as an alternative to conventional food allergy treatments. In this study, the effect of oral administration of *Bifidobacterium longum* 5^{1A} in the experimental food allergy to ovalbumin (OVA) was evaluated. For this, groups of Balb/c mice received two immunizations with OVA (days 0 and 14). By day 18, mice received daily saline or increasing doses of *B. longum* 5^{1A} until the end of the trial. By day 21, mice received a feed containing OVA until day 28 when they were euthanized. When received feed with OVA, the sensitized control group showed body weight loss, bowel tissue injury, increased serum levels of anti-OVA IgE and pro-inflammatory cytokines, intestinal sIgA, intestinal permeability and infiltration of eosinophils and neutrophils in the intestinal mucosa. The treatment with *B. longum* 5^{1A} at a dose of $1x10^8$ CFU/ml reduced or eliminated these clinical and immunological signs and stimulated IL-10 production. The evaluation of fecal microbiota by culturing dependent technique shown in the group treated with *B. longum* 5^{1A}, a reduction in enterobacteria and an increase of lactic acid bacteria (in particular *Enterococcus* genus) and *Staphylococcus* genus. The acetate, metabolic product of *Bifidobacterium*, does not seens to be involved in these effects. These results demonstrate that oral administration of *B. longum* 5^{1A} could be an effective alternative in the treatment of food allergy,

Key words: food allergy, food antigen, allergens, inflammation, probiotic, *Bifidobacterium longum* 5^{1A}.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomia da mucosa intestinal 20
Figura 2. Distribuição de filotipos bacterianos predominantes no trato intestinal humano 23
Figura 3. Desregulação imunológica associada à disbiose da microbiota 26
Figura 4. Mecanismo da alergia mediada por IgE 33
Figura 5. Mecanismos de ação dos probióticos 35
Figura 6. Esquema representativo do período de sensibilização, tratamento e desafio alergênico no modelo murino de alergia alimentar 45
Figuras 7. Avaliação do fenômeno de aversão dependente de IgE 55
Figuras 8. Avaliação da perda de peso induzida pela alergia alimentar 56
Figura 9. Avaliação da permeabilidade intestinal 58
Figura 10. Avaliação do anticorpo IgE anti-OVA 59
Figura 11. Avaliação dos anticorpos sIgA 60
Figura 12. Avaliação da perda de peso induzida pela alergia alimentar 62
Figuras 13. Avaliação do fenômeno de aversão dependente de IgE 63
Figura 14. Avaliação do anticorpo IgE anti-OVA 64
Figura 15. Avaliação dos anticorpos sIgA 65
Figura 16. Avaliação da permeabilidade intestinal 66
Figura 17. Análise histopatológica do intestino delgado 67
Figura 18. Fotomicrografias da histologia corada com PAS 68
Figura 19. Avaliação das concentrações de EPO (A) e da atividade de CCL11/ Eotaxina-1 (B) 70
Figura 20. Avaliação das concentrações de MPO (A) e da atividade de KC (CXCL1) (B) no jejuno 71
Figura 21. Avaliação da produção de citocinas 73
Figura 22. Avaliação da microbiota intestinal 75
Figura 23. Contagem total e diferencial de leucócitos 76
Figura 24. Avaliação dos parâmetros clínicos e imunológicos da *B. longum* 5^{1A} via produção de acetato 80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Receita padrão para roedores baseada na AING93.....42
Tabela 2. Delineamento experimental com identificação dos grupos e os respectivos tratamentos utilizados.....44
Tabela 3. Escore histopatológico 49
Tabela 4. Análise qualitativa e quantitativa da composição da microbiota intestinal presente nas fezes dos camundongos.....53

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AGCC – Ácidos graxos de cadeia curta
APC – Células apresentadoras de antígenos
BAL – Bactérias do ácido láctico
BHI – *Brain Heart Infusion*
CD – Células dendríticas
CEBIO – Centro de Bioterismo
CEI – Células epiteliais intestinais
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
cpm – Contagem por minuto
COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
Da – Dalton
DAI – Índice de atividade da doença
DC – Doença de Crohn
DII – Doença inflamatória intestinal
DO – Densidade óptica
DSS – Sulfato de dextrano de sódio
EcN – *Escherichia coli* Nissle 1917
EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
EPO – Peroxidase eosinofílica
EUA – Estados Unidos da América
FAO – *Food and Agriculture Organization*
FITC-dextran – *Fluorescein isothiocyanate–dextran*
g – Grama
GM-CSF – Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
H&E – Hematoxilina e eosina
HMOs – *Human Milk Oligosaccharides*
HTAB – Brometo de hexadeciltrimetilamônio
i.g. – Intragástrica
IBD – *Inflammatory Bowel Disease*
ICB – Instituto de Ciências Biológicas
IEC – *Intestinal epithelial cells*

Ig – Imunoglobulina

IgA – Imunoglobulina A

IgE – Imunoglobulina E

IgG – Imunoglobulina G

IL – Interleucina

IFN – Interferon

kDa – Quilodalton

LP – Lâmina própria

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

MIP – *Macrophage Inflammatory Protein*

MPO – Mieloperoxidase

MRS – Ágar Man, Rogosa e Sharpe

NAG – N-acetilglicosaminidase

NB-2 – Nível de biossegurança 2

nd – Não determinado

NF-κB – Fator nuclear kappa B

NIAID – *National Institute of Allergy and Infectious Diseases*

NO – Óxido nítrico

OPD – Dicloridrato de o-fenilenodiamina

OVA – Ovalbumina

PAF – *Platelet-Activating Factor*

PAS – Ácido periódico de Schiff

PBS – *Phosphate-buffered saline*

pH – Potencial hidrogeniônico

PMN – Polimorfonucleares

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonil

PP – Placas de Peyer

PTG – Peptidoglicano

RCU – Retocolite ulcerativa

s.c. – Subcutânea

sIgA – Imunoglobulina A secretora

TA – Temperatura ambiente

Tc – Tecnécio

TFF3 – *Trefoil factor 3*

TGF – *Transforming Growth Factor*

TGI – Trato gastrointestinal

Th – Linfócito T helper

TMB – Tetrametilbenzidina

TNF – *Tumor Necrosis Factor*

Treg – Células T reguladoras

UFC – Unidade formadora de colônia

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

USP – Universidade de São Paulo

WAO – *World Allergy Organization*

WHO – *World Health Organization*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 17
1.1 Epitélio intestinal 17
1.2 Microbiota intestinal 21
1.3 Efeitos da dieta x Alergia alimentar 26
1.3.1 Mecanismos envolvidos na alergia alimentar 29
1.4 Probióticos 33
1.4.1 O gênero *Bifidobacterium* 36
1.4.1.1 O probiótico *B. longum* 5^{1A} 37

2. JUSTIFICATIVA 40

3. OBJETIVOS 41
3.1Objetivo geral 41
3.2 Objetivos específicos 41

4. MATERIAIS E MÉTODOS 42
4.1 Animais 42
4.2 Micro-organismo 42
4.3 Tratamento 43
4.4 Desenho experimental 43
4.5 Sensibilização, tratamento e desafio alergênico 44
4.5.1 Sensibilização 44
4.5.2 Desafio alergênico 45
4.6 Avaliação dos parâmetros clínicos 45
4.6.1 Avaliação do consumo de ração 45
4.6.2 Avaliação do peso corpóreo 45
4.7 Dosagem de Imunoglobulinas IgE anti-OVA no soro 46
4.8 Dosagem de sIgA 46
4.9 Determinação da permeabilidade intestinal 47
4.10 Avaliação morfológica do jejuno proximal 47
4.10.1 Coloração de HE 48
4.10.2 Técnica de PAS 48

4.10.3 Análise das lâminas e fotodocumentação.....49
4.10.4 Escore do grau de lesão.....49
4.10.5 Avaliação da produção de muco.....50
4.11 Medida da atividade da mieloperoxidase (MPO).....50
4.12 Medida da atividade da enzima peroxidase eosinofílica (EPO).....51
4.13 Dosagem de citocinas.....51
4.14 Avaliação da mielossupressão.....52
4.15 Avaliação da composição da microbiota intestinal na alergia alimentar após o tratamento probiótico por método dependente de cultivo.....52
4.16 Análise estatística.....53

5. RESULTADOS.....54
DOSE RESPOSTA.....54
5.1 Avaliação dos parâmetros clínicos: Consumo de ração e desenvolvimento ponderal.....55
5.2 *Bifidobacterium longum* 5^{1A} diminui a permeabilidade intestinal no modelo de alergia alimentar induzida por OVA.....57
5.3 Quantificação sérica de IgE anti-ovalbumina.....58
5.4 Avaliação dos níveis séricos de anticorpos sIgA.....59
MELHOR DOSE RESPOSTA.....61
5.5 Avaliação do desenvolvimento ponderal e do consumo de ração na melhor dose-resposta.....62
5.6 Quantificação sérica de IgE anti-OVA.....63
5.7 Avaliação dos níveis de sIgA.....64
5.8 *Bifidobacterium longum* 5^{1A} diminui a permeabilidade intestinal no modelo de alergia alimentar induzida por OVA.....65
5.9 *Bifidobacterium. longum* 5^{1A} preservou alterações funcionais e morfológicas induzidas pela ingestão de dieta OVA por camundongos sensibilizados com OVA. 66
5.10 Análise da produção de muco.....68
5.11 *Bifidobacterium longum* 5^{1A} diminui o influxo de eosinófilo e da quimiocina eotaxina-1 (CCL11) para o sitio primário da inflamação no modelo de alergia alimentar induzida por OVA.....69

5.12 *Bifidobacterium longum* 5^{1A} diminui o influxo de neutrófilos e da quimiocina KC/CXCL-1 para o sitio primário da inflamação no modelo de alergia alimentar induzida por OVA.....70
5.13 Avaliação das citocinas IL-4, IL-5, IL-6, TNF-α, IL-10 e IL-13 na alergia alimentar 72
5.14 Avaliação da microbiota intestinal pelo método dependente de cultivo 74
5.15 Efeito do tratamento *Bifidobacterium longum* 5^{1A} sobre a leucopenia induzida por ovalbumina 76
AVALIAÇÃO VIA PRODUÇÃO DE ACETATO 78
5.16 Avaliação do consumo de ração, desenvolvimento ponderal, permeabilidade intestinal, níveis de IgE e sIgA na alergia alimenta a OVA, avaliando se o efeito probiótico da *Bifidobacterium longum* 5^{1A} é via produção de acetato. 79

6. DISCUSSÃO 81

7. CONCLUSÃO.....90

8. REFERÊNCIAS.....91

9. ANEXO 113
9.1. Anexo A 113
9.2. Anexo B 114
9.3. Anexo C 115

10. APENDICE 118
10.1 Apêndice A 119
10.2 Apêndice B 146

1.1 Epitélio intestinal

O trato gastrointestinal (TGI) possui diversas funções importantes nos seres vivos, como, por exemplo, digerir os alimentos e moléculas que sejam absorvíveis, promover a absorção de água e eletrólitos, excreção de resíduos e micro-organismos, fornecendo, de maneira adequada, água e nutrientes para que o organismo possa manter suas funções metabólicas. O TGI é também uma barreira física e imunológica contra os micro-organismos, antígenos potenciais ou qualquer material estranho consumido com os alimentos ou formado durante sua passagem pelo TGI (KIM; HO, 2010; PETERSON; ARTIS, 2014; ELLIOTT et al., 2015; SALVO et al., 2015).

A mucosa intestinal tem a capacidade de separar as substâncias do lúmen intestinal do restante do corpo humano (ANDRADE et al., 2015a). O epitélio intestinal é constituido por uma camada única de células, as células epiteliais intestinais (IEC). A organização especializada do epitélio intestinal mantém uma barreira seletiva em que as IEC são interconectadas por uma rede de proteínas. Essa rede de proteínas regula a permeabilidade entre as IEC e são formadas principalmente pelas junções firmes, desmossomos e junções gap, (Figura 1) (DAS et al., 2012).

Responsáveis pela absorção, os enterócitos desempenham, também, funções metabólicas e digestivas (KIM; HO, 2010; GALLO; HOOPER, 2012). Já as células M (*Microfold*) possuem importante função no transporte transepitelial de micro-organismos e antígenos para as células dendríticas subjacentes e outras células apresentadoras de antígenos, como os macrófagos. As células M estão presentes na região denominada epitélio folicular, onde se encontram as estruturas linfoides do intestino (MOWAT, 2003; MABBOTT et al., 2013; PETERSON; ARTIS, 2014).

As células caliciformes são células originalmente colunares (prismáticas) que assumem a morfologia permanente de um cálice, pela contínua produção e acúmulo temporário de vesículas com secreção na região supranuclear de seu citoplasma. Esta região da célula, junto ao ápice, que é também seu polo de secreção, tem preenchimento variável, fazendo com que a célula se mostre volumosa ou quase colunar de acordo com o momento funcional observado. De igual forma, seu núcleo pode apresentar-se comprimido junto à base, assumindo a forma triangular na célula preenchida de vesículas, ou eliptico, nas células menos

repletas (KIM; HO, 2010; PETERSON; ARTIS, 2014; ELLIOTT et al., 2015; SALVO et al., 2015).

Presente também no epitélio intestinal, as células de *Paneth* são células secretoras importantes para o processo digestivo e função de barreira do epitélio, secretando diversas mucinas e o fator trefoil 3 (TFF3), e produzindo peptídeos antimicrobianos que estabelecem uma barreira física e bioquímica com o intuito de reduzir o contato de micro-organismos com as células imunes e a superfície do epitélio (KIM; HO, 2010; GALLO; HOOPER, 2012).

A primeira linha de defesa da barreira intestinal é dada pela secreção de mucinas pelas células caliciformes (KIM; HO, 2010; GALLO; HOOPER, 2012). A camada de muco também é responsável por reter outras substâncias, como os peptídeos antimicrobianos e a imunoglobulina A secretora (sIgA), resultando em elevada atividade antimicrobiana e impedindo que bactérias atinjam a superfície do epitélio, de modo a interagir com o sistema imune da mucosa (KIM; HO, 2010; MALOY; POWRIE, 2011; PETERSON; ARTIS, 2014).

A sIgA desempenha um papel muito importante na manutenção da homeostase intestinal pela exclusão imune caracterizada pela prevenção da penetração de bactérias ligadas a essa imunoglobulina que é rapidamente eliminada juntamente com seus ligantes pelas fezes, e pelo transporte ativo de antígenos, via receptores presentes nas células M, para as placas de Peyer (PP) do intestino onde células dendríticas especializadas podem realizar a apresentação de antígenos a linfócitos T da mucosa ativando-os de forma não inflamatória (KADAOUI; CORTHESY, 2007; GOTO; KIYONO, 2012; SLACK et al., 2012).

sIgA também participa da defesa na proteção do epitélio intestinal contra toxinas entéricas e micro-organismos patogênicos. Esse processo de defesa conhecido como exclusão imune, se dá pela depuração de antígenos e micro-organismos patogênicos do lúmen intestinal, bloqueando o seu acesso aos receptores epiteliais, aprisionando-os ao muco e facilitando sua remoção por atividades peristálticas e mucociliares (SLACK et al., 2012).

A sIgA é a classe mais abundante de anticorpos encontrados no lúmen intestinal de humanos e na maioria dos outros mamíferos. Múltiplas citocinas, incluindo interleucina (IL)-4, IL-5, IL-6 e IL-10 são importantes na estimulação intestinal para a produção de sIgA. Imediatamente após o nascimento, os mamíferos são expostos a micro-organismos associados aos ambientes externo e materno. A

transição de um ambiente estéril para um ambiente altamente colonizado é acompanhada pela exposição concomitante do TGI do recém-nascido aos anticorpos IgA maternos adquiridos por meio da amamentação. Os anticorpos de sIgA naturais e específicos no leite materno são capazes de se ligar às bactérias comensais e podem estar envolvidos no estabelecimento progressivo e controlado da microbiota do recém-nascido (SEKIROV et al., 2010). A relação entre a microbiota comensal e sIgA é altamente complexa, considerando que uma proporção considerável (24-74%) da microbiota é revestida com sIgA (SEKIROV et al., 2010).

Diversos estudos experimentais clínicos demonstraram que o sistema imune secretório é importante no controle dos sintomas alérgicos. A presença de sIgA específica para alérgenos nem sempre é aumentada em animais tolerados com sucesso, e pode até estar presente em grandes quantidades em animais sensibilizados sem conferir proteção (YEL, 2010).

Além disso, a importância da sIgA contra doenças alérgicas ainda não está clara no que diz respeito a estudos clínicos recentes. Pacientes com deficiência de IgA apresentam um risco aumentado de hipersensibilidade alimentar até os quatro anos de idade, enquanto que em outras idades, a deficiência de IgA não mostra qualquer correlação com alergia alimentar. A soma desses dados sugere que a produção de sIgA é mais crítica para a homeostase em relação às bactérias comensais do que os antígenos alimentares. Estudos adicionais são necessários para esclarecer a importância da sIgA na manutenção da tolerância oral e, consequentemente, na integridade da barreira intestinal (YEL, 2010; SELLERS; MORTON, 2014).

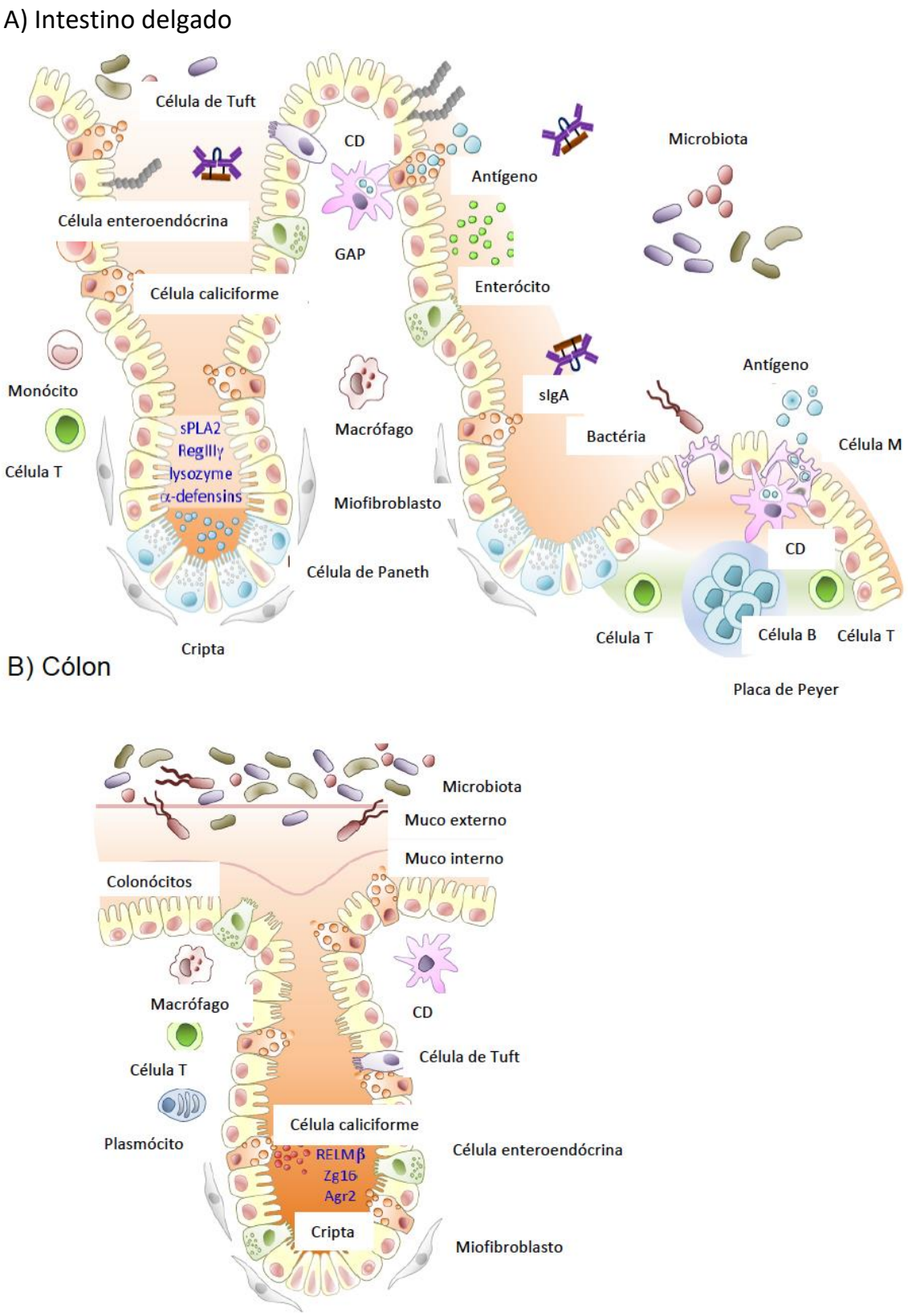


Figura 1. Anatomia da mucosa intestinal. (A) Intestino delgado (B) cólon. CD: Células dendríticas; GAP: Passagens associadas a células caliciformes (do inglês, *globet cell associated antigen passages*), (DAS et al., 2012).

1.2 Microbiota intestinal

O TGI do ser humano é o sitio anatômico mais densamente povoado por micro-organismos comensais e simbióticos, na maioria bactérias, mas também fungos, Archaea e vírus (QUIR et al., 2010; ARUMUGAM et al., 2011). Ao nascimento, o TGI apresenta-se estéril, mas logo após as superfícies e mucosas são colonizadas por micro-organismos. A duração desse processo varia de um ano e meio a dois anos, até que uma microbiota semelhante à de um adulto se instale (NICOLI, 2000; BORBA, 2003).

O estabelecimento da microbiota intestinal sofre influência de diversos fatores como o tipo de parto, visto que, durante o parto normal, a microbiota intestinal materna é passada ao recém-nascido; já no parto cesáreo isso não ocorre, reduzindo assim a instalação de bactérias anaeróbicas. O leite materno e o colostro também são responsáveis pelo processo de colonização da microbiota intestinal, uma vez que os mamilos, ductos lactíferos, pele circundante e mãos, possuem carga microbiana secundária que irão passar ao recém-nascido, enquanto o leite contém fatores de crescimento para certos grupos de bactérias (fatores bifidus) (BARBOSA et al., 2010).

O teor de oxigênio no intestino favorece primeiramente o crescimento de bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas, como enterobactérias, enterococos e estafilococos. Com o consumo do oxigênio por estes grupos, o ambiente torna-se altamente reduzido e, portanto, adequado ao crescimento de bactérias anaeróbias obrigatórias, facilitando a instalação de *Bacteroides, Bifidobacterium* e *Clostridium* (BARBOSA et al., 2010).

Em 1972, o microbiologista Thomas Luckey estimou que as bactérias e outros micro-organismos poderiam ser encontrados em nosso corpo em uma razão de 10 para 1. Acreditava-se que no adulto, o número de bactérias da microbiota intestinal era 10 vezes maior que o número de células que formam os nossos órgãos e tecidos, isto é, 10^{14} bactérias para 10^{13} células humanas (LEY et al., 2006; ARTIS, 2008). Por muitos anos, estes valores foram considerados corretos e utilizados em pesquisas acadêmicas, na publicação de artigos e até mesmo em salas de aula em universidades de todo o mundo. Porém, após uma extensa análise de artigos anteriormente publicados, os pesquisadores Ron Sender, Ron Milo e Shai Fuchs (2016) chegaram a uma estimativa muito menor de células da microbiota humana. Segundo eles, um homem adulto que possuir aproximadamente 30 trilhões de

células humanas, possuirá também cerca de 39 trilhões de células da microbiota, o que resulta em uma razão de 1,3 para 1. Os valores aceitos anteriormente foram afirmados a partir de estimativas muito vagas, sem grandes valores científicos a serem utilizados como base. Um dos principais erros de estimativa do trabalho de Thomas Luckey em 1972 foi à proporção de bactérias intestinais.

O intestino é repleto de bactérias, sendo a grande maioria destas, importantes para o funcionamento deste órgão e a correta digestão dos alimentos. Essa densidade de bactérias intestinais anteriormente era estimada a partir do conteúdo de bactérias do cólon. Atualmente, sabe-se que o cólon possui uma quantidade muito maior de micro-organismos, se comparado ao resto do nosso trato digestivo, o que significa que, em pesquisas anteriores, a quantidade de bactérias presentes no nosso corpo havia sido superestimada (SARTOR, 2007).

A predominância da microbiota varia em função da localização anatômica, sendo que a microbiota anaeróbia facultativa coloniza mais o íleo distal, enquanto no cólon predomina a microbiota anaeróbia obrigatória, com espécies dos gêneros *Bacteroides* e *Bifidobacterium* (BORBA, 2003).

Calcula-se que a microbiota intestinal compreenda em torno de 2000 espécies pertencentes a aproximadamente 50 gêneros, mas desses somente em torno de 20 a 30 são representados de maneira significativa (PETERSON et al., 2008) (Figura 2). Os processos envolvidos na aquisição e subsequente estabelecimento de comunidades microbianas intestinais são complexos, envolvendo a sucessão de populações microbianas dentro de regiões específicas do intestino, além de interações micro-organismo-hospedeiro favorecendo em inúmeras funções (MANICHANH et al., 2006; SARTOR, 2007).

A microbiota no estômago e no intestino delgado é relativamente baixa, devido ao pH ácido, grande quantidade de sais biliares e secreção de sIgA. Esse baixo nível é importante, pois uma quantidade muito elevada de micro-organismo nesses locais poderia interferir na absorção adequada de alguns nutrientes (MUSSO, GAMBINO e CASSADER, 2010; WALTER e LEY, 2011).

O colón é a parte do TGI que abriga o maior número de micro-organismos, e esses níveis se dá pela grande quantidade de nutrientes ali disponíveis, ausência de secreções intestinais, ao peristaltismo lento característico do local e menor presença de PP (MUSSO, GAMBINO e CASSADER, 2018; WALTER e LEY, 2011). A microbiota intestinal humana tem sua composição dominada pelos anaeróbios

obrigatórios, numa proporção três vezes superior aos aeróbios e anaeróbios facultativos (LAGE e BRITO, 2012). Dois filos componentes da microbiota colônica são dominantes: Bacteroidetes e Firmicutes, representando 92,6% do total. Outros filos, tais como Actinobacteria, Proteobacteria e Verrucomicrobia, estão presentes em números variáveis (TAGLIABUE e ELLI, 2013). Arqueias metanogênicas, principalmente *Methanobrevibacter smithii* também compõem a microbiota intestinal humana (KORECKA e ARELAMPALAM, 2012).

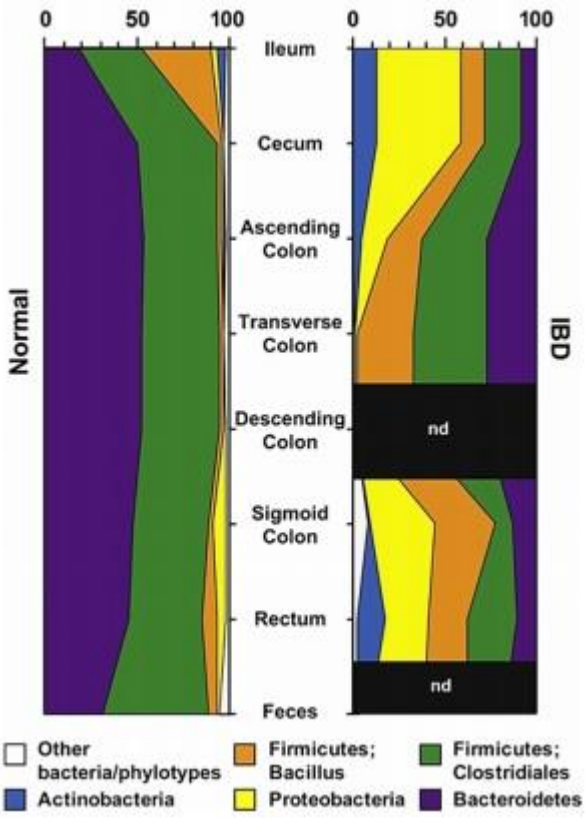


Figura 2- Distribuição de filotipos bacterianos predominantes no trato intestinal humano. Abundância relativa é ilustrada como uma função da posição ao longo do intestino saudável e intestino inflamado. **nd** (Não determinado), **IBD** (*Inflammatory Bowel Disease*); Fonte: PETERSON et al. (2008).

Há muitos anos, vários estudos estabelecem a importância da microbiota entérica no desenvolvimento e função do intestino, tais como: função imunomoduladora, contribuindo para a maturação local e sistêmica de resposta imunológica e geração de uma imunotolerância; metabolismo de drogas; favorecimento do desenvolvimento de microvilosidades; importantes funções metabólicas, além de atuar como uma barreira para o desenvolvimento de patógenos, por meio da competição por nutrientes, fixação ao epitélio intestinal e produção de substâncias antimicrobianas (VILLELA et al., 2004; TURNBAUGH et

al., 2006; CANI e DELZENNE, 2007; DIBAISE et al., 2008; TILG, MOSCHEN e KASER, 2009; SEKIROV et al., 2010; TAGLIABUE e ELLI, 2013). A disbiose da microbiota intestinal humana pode levar ao acometimento de vários distúrbios como, por exemplo, o diabetes tipo 1 e 2, doença inflamatória intestinal, síndrome do intestino irritável, câncer colorretal, alergias alimentares, dentre outros (XU et al., 2012).

Uma das funções da microbiota intestinal está na barreira antagonista entre o ambiente externo e interno sendo responsável pelo controle imunológico das bactérias comensais e as potencialmente patogênicas. A fim de manter a homeostase e evitar que o sistema imune reaja contra os antígenos exógenos inofensivos presentes no intestino, é preciso que haja um equilíbrio entre a tolerância aos comensais e uma imunidade a patógenos, permitindo uma homeostase intestinal entre o hospedeiro e os micro-organismos que habitam nele. A homeostase intestinal surge a partir de um balanço dinâmico entre a imunidade protetora do hospedeiro e mecanismos regulatórios (IZCUE et al., 2009).

Uma microbiota intestinal saudável é definida como aquela que conserva e promove o bem-estar e a ausência de doenças, especialmente do TGI. Além disso, ela também compete por nutrientes intraluminais, prevenindo o estabelecimento das bactérias patogênicas. Quando benéfica, ajuda a digerir os alimentos e a fermentar carboidratos que permaneçam mal absorvidos ou resistentes à digestão como as fibras da dieta, produzindo ácidos graxos de cadeia curta (AGCC - butirato, propionato, acetato), lactato e proteínas, que são parcialmente absorvidos e utilizados pelo hospedeiro (KLEIN, 2003).

O equilíbrio entre as populações de micro-organismos é controlado pela competição por sítio de adesão e por nutrientes; deste modo, alguns micro-organismos potencialmente patogênicos, como as *Escherichia coli*, são mantidos em menores números e o estabelecimento de novas bactérias é dificultado pelo processo chamado de resistência à colonização (BARBOSA et al., 2010).

O epitélio intestinal desempenha um papel de barreira mecânica, estabelecendo a interface entre o conteúdo luminal e as células imunológicas. Qualquer perturbação a esta barreira, desencadeada por antígenos dietéticos, micro-organismos patogênicos, agentes químicos ou radiações, conduz a um aumento da permeabilidade intestinal e a alterações estruturais no epitélio, as quais

podem ocasionar aumento do fluxo de antígenos e provocar diversos tipos de distúrbios (CARREIRO, VASCONCELOS, AYOUB, 2009).

As disfunções intestinais afetam o equilíbrio da microbiota (disbiose), fazendo com que as bactérias oportunistas se multipliquem e antígenos dietéticos não sejam devidamente processados, levando, assim, a uma situação de risco. Alguns desses micro-organismos nocivos podem colonizar o intestino, produzindo toxinas e/ou invadindo o compartimento interno (PÓVOA, 2002).

Estudos da composição bacteriana luminal de pacientes com doenças inflamatórias intestinais revelam um crescente aumento de bactérias nocivas das quais fazem parte determinadas linhagens de *E. coli*, e uma redução no número e na biodiversidade de membros dos filos Firmicutes e Bacteroidetes. Este fenômeno induz a quebra do equilíbrio entre as espécies comensais e as espécies patogênicas, contribuindo para a criação de um ambiente pró-inflamatório, e para o desenvolvimento de inflamação intestinal crônica em indivíduos suscetíveis (SARTOR, 2008; LAPAQUETTE et al., 2012).

Disbiose é um estado em que a microbiota produz efeitos nocivos via: mudanças qualitativas e quantitativas na própria microbiota intestinal; mudanças na sua atividade metabólica; e mudanças em seus locais de distribuição (HAWRELAK & MYERS, 2004). Esse desequilíbrio na microbiota normal pode ser gerado com a utilização de antibióticos, medicamentos com sulfa, drogas imunossupressoras, anti-inflamatórios, pílulas anticoncepcionais, laxantes e antiácidos (CARREIRO, VASCONCELOS, AYOUB, 2009). Quando ocorre essa disbiose e, consequentemente, um aumento de micro-organismos patobiontes, há uma destruição da mucosa, resultando em uma hiperpermeabilidade, seguida de hiperativação do sistema imune, o que ocasiona inúmeras patologias de relações imunológicas e inflamatórias (CARVALHO e PERUCHA, 2006; ROUND, 2009; ZECHNER, 2017) (Figura 3).

O ser humano consome aproximadamente uma tonelada de alimentos a cada ano, expondo o sistema imune intestinal a um constante contato com uma grande quantidade de antígenos diferentes (SEIBOLD, 2005). Várias reações imunes ocorrem em seguida à absorção do antígeno pelo epitélio intestinal dependendo da natureza do antígeno, da via de entrada no organismo e da história imunológica do indivíduo.

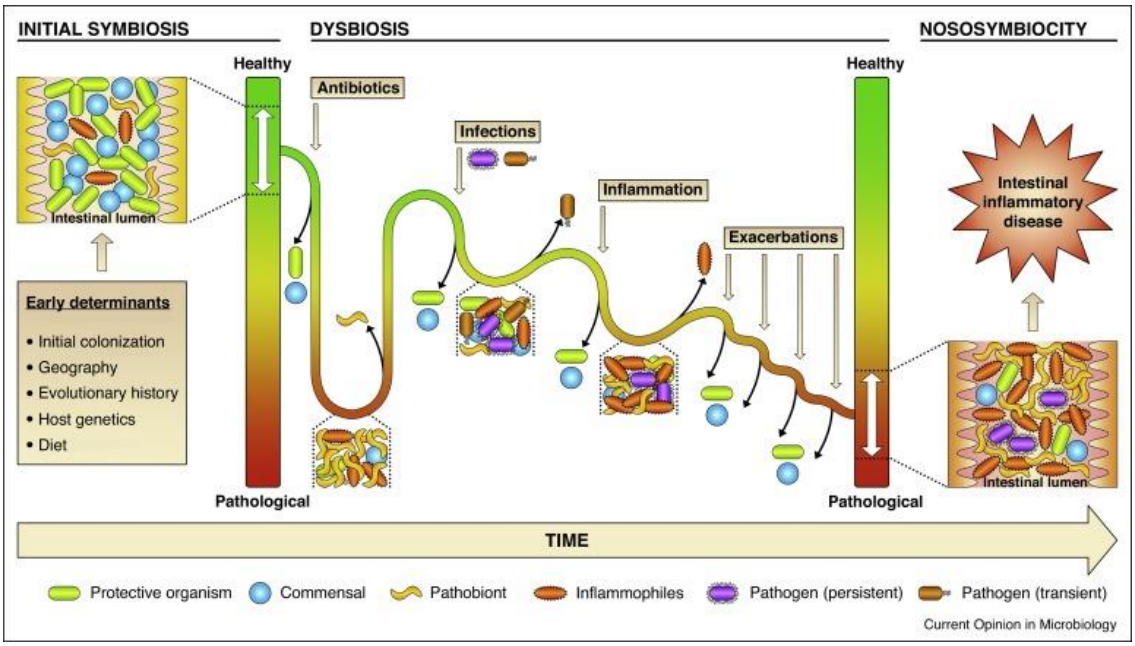


Figura 3- Desregulação imunológica associada à disbiose da microbiota. Uma microbiota saudável contém uma composição equilibrada de várias classes de bactérias. Simbiontes são organismos com funções de promoção da saúde conhecidos. Comensais são residentes permanentes deste complexo ecossistema e não fornecem nenhum benefício ou prejuízo para ao hospedeiro. Patobiontes também são residentes permanentes da microbiota e têm o potencial de induzir a patologia. A disbiose cria uma alteração na composição da microbiota, resultando numa redução no número de simbiontes e comensais e/ou um aumento no número de patobiontes. Isto pode resultar na indução de diversas doenças em indivíduos geneticamente suscetíveis. Fonte: ELLEN L ZECHNER (2017).

A superfície da mucosa intestinal é altamente absortiva, porém os antígenos da dieta encontram algumas barreiras que controlam a sua absorção, impedindo que ocorra uma reação imunológica aos componentes da dieta. As enzimas presentes no lúmen intestinal, a produção de sIgA e o muco são um dos principais componentes dessa barreira cobrindo continuamente e de forma aderente a mucosa intestinal (MAYER, 2003). Caso ocorra uma disbiose, associada ou não a uma alteração dos componentes do epitélio intestinal, em um indivíduo geneticamente predisposto à resposta alérgica, pode desencadear uma alergia alimentar.

1.3 Efeitos da Dieta x Alergia alimentar

A alergia alimentar é uma doença de prevalência crescente, que pode associar-se a manifestações clínicas graves com comprometimento da qualidade de vida e com um aumento dramático do número de casos ao longo das décadas. É um problema de saúde em todo o mundo e está associada a um impacto negativo significativo na qualidade de vida. Trata-se de problema nutricional que apresentou

um elevado crescimento nas últimas décadas, provavelmente devido à maior exposição da população a um número maior de alergenos alimentares disponíveis (SICHERER e SAMPSON, 2010).

Outro aspecto importante que vale ser ressaltado é a “teoria da higiene”, apresentada por Strachan, em 1989, apontada também como uma possível explicação para esta evolução e, é suportada pela evidência nas regiões do globo onde as alergias são emergentes. Consequentemente, a falta de exposição a antígenos e a infecções numa idade precoce afeta negativamente o desenvolvimento do sistema imunitário. E isto significa que este não está preparado para, mais tarde, responder eficazmente perante agentes patogênicos, conduzindo, desta forma, ao desenvolvimento de processos inflamatórios anormais, incluindo a alergia alimentar e outras doenças do cunho alérgico e autoimune (DANESE & FIOCCHI, 2006; SCHIRBEL & FIOCCHI, 2010; QIN, 2012).

A Organização Mundial de Alergia (WAO - *World Allergy Organization*) propôs, em 2003, uma nova nomenclatura, definindo a alergia alimentar como um grupo de distúrbios gastrointestinais com resposta imunológica anormal ou exagerada, que aparecem após a ingestão de determinadas proteínas alimentares que podem ser mediadas por imunoglobulina do tipo E (IgE) ou não (FERREIRA, 2007; HENRIQUE, 2009).

Segundo o *Nacional Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID) dos Estados Unidos da América (EUA), e de acordo com as linhas de orientação da WAO, uma alergia alimentar decorre de um “efeito adverso para a saúde derivado de uma resposta imunológica específica, que ocorre consecutivamente à exposição a um dado alimento”. Isto engloba as respostas imunes mediadas por IgE, as não mediadas por IgE ou a combinação de ambas (BOYCE et al., 2010; JOHANSSON et al, 2004).

A maioria dos processos alérgicos é caracterizada por uma hipersensibilidade imediata, mediada por IgE, que ocorre após a ingestão de determinados alimentos por indivíduos previamente sensibilizados. Essas alergias são caracterizadas por um aumento na capacidade dos linfócitos B sintetizarem a IgE contra antígenos que acessam o organismo via inalação, ingestão ou penetração pela pele (MOREIRA, 2006).

A alergia alimentar afeta 3,0% da população adulta e 4-6% em idade pediátrica. Entre 100 e 125 pessoas morrem por ano nos EUA por causa de uma

reação alérgica alimentar (SICHERER & SAMPSON, 2010). Os riscos ao bem-estar aumentam à medida que os alimentos consumidos em uma população são cada vez mais processados e complexos, com rótulos inadequados (BURGGRAF et al., 2001; KOLACEK, 2011).

Há uma variedade de antígenos da dieta a que somos expostos diariamente, mas somente uma pequena porcentagem da população tem reações imunológicas adversas aos alimentos, podendo ser dividida em reações mediadas por IgE ou não mediadas por IgE. As alergias alimentares mediadas por IgE (também referidas como alergia alimentar do tipo 1) representam a maioria das reações alérgicas. São caracterizadas pela presença de anticorpos IgE antígeno-específicos no soro (WIJK e KNIPPELS, 2007).

Os alérgenos são antígenos que provocam as reações alérgicas; são, em geral, proteínas ambientais comuns. A maioria dos indivíduos em contato com esses antígenos não produz IgE específica nem desenvolve reações potencialmente lesivas. No entanto, essas reações podem se desenvolver em pessoas geneticamente susceptíveis quando as barreiras fisiológicas são rompidas (SILVA, 2007).

Na última década, muitos alérgenos foram identificados e caracterizados, tanto bioquímica quanto imunologicamente, demonstrando que a resposta alérgica depende da integridade estrutural da proteína, sendo que epítopos ligantes as IgE são responsáveis pela atividade funcional alergênica. Os alimentos que causam reações imunológicas têm propriedades comuns, sendo termolábeis e de peso molecular entre 18 e 36 kDa. Mas não se sabe o motivo de alguns alimentos serem mais alergênicos que outros (SICHERER, 2011).

É ilimitada a lista de alimentos que potencialmente podem induzir uma reação anafilática, sendo, na teoria, qualquer proteína alimentar capaz de causar uma reação anafilática. Alguns alimentos são potencialmente mais frequentes, sendo responsáveis por cerca de 80 a 90% das reações verificadas na alergia alimentar, tais como ovo, leite, amendoim, soja, nozes, castanhas, trigo, peixe e crustáceos (SICHERER, 2011).

O diagnóstico das alergias alimentares depende de história clínica minuciosa associada aos dados de exame físico que podem ser complementados por testes alérgicos. Um correto diagnóstico é fundamental para um tratamento adequado e para que não se instituam dietas desnecessárias. Não existe um medicamento

específico para prevenir ou tratar de forma curativa a alergia alimentar. Quando diagnosticada, são utilizados apenas medicamentos específicos para o tratamento dos sintomas e a suspensão parcial ou total do alimento desencadeador do processo alérgico (KUROWSKI, 2008; CIANFERONI, 2009).

A exposição acidental ocorre com certa frequência, e a exclusão de um determinado alimento da dieta na maioria das vezes não é uma tarefa fácil. As reações leves desaparecem espontaneamente ou respondem aos anti-histamínicos; já em pacientes com história de reações graves, é necessário em alguns casos portar medicamentos específicos como a adrenalina, administrada em casos de extrema urgência (ASBAI, 2017).

1.3.1 Mecanismos envolvidos na alergia alimentar

No processo desencadeador da alergia alimentar três fatores essenciais estão envolvidos: fatores genéticos, a desregulação da microbiota intestinal e o tipo de alérgeno (potência antigênica) envolvido nesse processo. A predisposição genética desempenha papel importante no desenvolvimento da doença atópica e existe um risco de alergia aumentado quando há história familiar positivo de alergia. A probabilidade de uma criança desenvolver alergia gira em torno de 30% quando um de seus pais apresenta alergia. Essa probabilidade dobra quando ambos os pais ou um dos pais e um irmão são alérgicos (SICHERER, 2011).

O desenvolvimento dessas reações alérgicas pode surgir em indivíduos geneticamente predispostos quando a capacidade seletiva da mucosa intestinal aos antígenos é alterada. Inúmeros fatores são capazes de alterar essa seletividade, como a imaturidade da mucosa intestinal em crianças, o uso prolongado de antiácidos, a ingestão de álcool e o stress (UNTERSMAYR & JENSEN-JAROLIM, 2008; EIGENMANN, 2009; KESHAVARZIAN *et al*., 2009; VICARIO et al., 2010).

O epitélio intestinal é a porta de entrada aos antígenos alimentares e às bactérias não patogênicas da microbiota, que representam uma fonte de interação da atividade imunológica no organismo. É também na mucosa intestinal que estão localizados o maior número de macrófagos, polimorfonucleares (PMN), células dendríticas (CD), linfócitos T e linfócitos B secretores de imunoglobulinas. Essas células reconhecem os antígenos, mas não são capazes de distinguir entre os que são ou não nocivos. Essa interpretação está na interação com o sistema imune intestinal (STONE et al., 2010).

A diminuição das barreiras imunológicas e não imunológicas da mucosa digestiva gera uma alteração na absorção de moléculas da dieta que interagem com células apresentadoras de antígeno (APC – *Antigen Presenting Cell*). Com a interação dessas moléculas e das APC, ocorre a apresentação dos antígenos provenientes dessas moléculas para linfócitos T helper (Th). Essa fase inicial leva à proliferação dos linfócitos T e à síntese de citocinas. Essa síntese leva à promoção de uma resposta característica de linfócitos Th2 (STONE et al., 2010).

Logo após a ingestão, as proteínas dos alimentos atravessam a barreira do intestino e entram em contato com o sistema imune. Fragmentos proteicos são processados pelas APC e expõem moléculas em sua superfície associadas ao MHC (*Major Histocompatibility Complex*) de classe II que podem ser reconhecidas pelos receptores específicos das células T. Na presença da IL-4, a sensibilização é iniciada pela diferenciação de células Th virgens antígeno-específico na célula efetora Th2. Tipicamente, as células Th2 produzem citocinas, incluindo IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, que por meio de outras ações estimulam linfócitos B a sofrerem a troca de isotipo da cadeia pesada, desenvolvendo plasmócitos produtores de IgE (WILLIAMS & BOCK, 1999; BACHARIER & GEHA, 2000; STONE et al., 2010).

O IgE circula como um anticorpo bivalente e está presente normalmente no plasma, em concentrações abaixo de 1 μg/mL. Em condições de atopia grave, esse nível pode aumentar para mais de 1.000 μg/mL (STONE et al., 2010). Anticorpos IgE antígeno-específicos secretados são distribuídos sistematicamente e ligam-se ao receptor de alta afinidade FcεRI nos mastócitos e basófilos. Em uma segunda exposição, o antígeno realiza uma ligação cruzada (*crosslinking*) com anticorpos IgE da superfície dos mastócitos, provocando a sua degranulação e liberação de mediadores (como histamina, citocinas e proteases), o que leva a uma variedade de reações características da alergia. As reações anafiláticas ocorrem dentro de minutos até horas depois da ingestão do alimento (WILLIAMS & BOCK, 1999).

A anafilaxia indica que anticorpos, especialmente IgE, podem conferir o oposto de proteção (profilaxia) em um indivíduo menos favorecido. Nessa forma sistêmica mais extrema das reações alérgicas, os mediadores derivados dos mastócitos podem desencadear a obstrução das vias aéreas até o ponto de asfixia e produzir um colapso cardiovascular que pode resultar em morte (KEMP & LOCKEY, 2002).

Os diferentes sintomas após a reação alérgica alimentar são determinados por diferenças na quantidade de mediadores inflamatórios liberados no intestino, na taxa de absorção dos antígenos ingeridos e na distribuição de mastócitos ligados à IgE específica ao antígeno. Além disso, esses sintomas refletem as quantidades de anticorpos IgA e IgG (imunoglobulina do tipo G) capazes de neutralizar o antígeno antes que esse possa se ligar às moléculas de IgE na superfície dos mastócitos (FINKELMAN et al., 2005).

Reações alérgicas são descritas como reações de hipersensibilidade imediata porque têm início rápido, em alguns minutos a partir do estímulo do antígeno (imediato) e trazem consequências patológicas significativas (FINKELMAN et al., 2005). Em um indivíduo alérgico a um antígeno em particular, uma grande proporção da IgE ligada aos mastócitos é específica para esse antígeno. Portanto, a exposição ao antígeno permitirá ligação cruzada suficiente de moléculas de IgE para desencadear a ativação dos mastócitos (ABBAS, 2005). A ativação desses mastócitos resultará na liberação de histamina, prostaglandina D2, fator ativador de plaquetas e outros mediadores que irão gerar muitas modificações locais responsáveis pelos sintomas imediatos da alergia alimentar (BINGHAM & AUSTEN, 2000).

Quando a histamina se liga ao endotélio, provoca a contração celular, levando ao extravasamento do plasma para os tecidos. A histamina estimula as células endoteliais a sintetizarem relaxantes vasculares para as células dos vasos sanguíneos, como a prostaciclina e o óxido nítrico (NO), que provocam a vasodilatação. Além disso, a histamina também provoca constrição da musculatura lisa intestinal, podendo contribuir para o aumento da peristalse associado aos alérgenos ingeridos (AKDIS & BLASER, 2003).

A prostaglandina D2 é um mediador lipídico, derivado do ácido araquidônico que, uma vez liberada, adere-se aos receptores nas células da musculatura lisa e atua como vasodilatador. Esse mediador também promove a quimiotaxia e o acúmulo de neutrófilos em sítios inflamatórios (BINGHAM & AUSTEN, 2000).

Outro mediador lipídico produzido pelos mastócitos é o fator ativador de plaquetas (PAF – *Platelet Activating Factor*) que provoca retração das células endoteliais, além de ser capaz de relaxar a musculatura lisa vascular. O PAF também pode ser importante em reações tardias, pois pode ativar leucócitos.

Entretanto, nessa situação, a principal fonte desse mediador pode ser representada pelos basófilos ou pelas células endoteliais vasculares (CHOI et al., 2003).

Nos tratos respiratório e digestivo, ocorre a produção de muco, sendo esse evento mediado principalmente pelas IL-4 e IL-13 (BLANCHARD et al., 2004). No TGI, há um desequilíbrio eletrolítico com perda de íons e água, levando a um estado de diarreia e aumento da permeabilidade a macromoléculas (WASSERMAN, 1983; PLAUT, 1993). O processo alérgico é seguido por uma resposta de fase tardia que é causada pela liberação de leucotrienos, citocinas e quimiocinas pelos mastócitos ativados. Esses mediadores recrutam outros leucócitos, incluindo eosinófilos e linfócitos Th2 para o local de inflamação (LUKACS, 2001).

As citocinas liberadas pelos mastócitos na inflamação alérgica são as responsáveis principais pela reação tardia e incluem: fator de necrose tumoral (TNF - *Tumor Necrosis Factor*), IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, “macrophage inflammatory protein” (MIP-1α), MIP-1β e o fator estimulador de granulócitos-monócitos (GM-CSF). O TNF, em especial, ativa a expressão endotelial das moléculas de adesão responsáveis pelos infiltrados de células mononucleares e PMN (BRESSLER et al., 1997; BURD et al., 1995; BINGHAM & AUSTEN, 2000).

Estudo realizado por Saldanha e colaboradores (2004) demonstrou, em um modelo de alergia alimentar, que a ingestão de clara de ovo por camundongos sensibilizados provocou um aumento da produção de IgE e IgG1 anti-OVA, gerando edema intestinal nas primeiras 24 horas e infiltrado de eosinófilos de 48 horas a 14 dias na mucosa intestinal, fundamentando esse modelo por reproduzir vários parâmetros encontrados na doença espontânea (SALDANHA et al., 2004). Os mecanismos envolvidos no processo alérgico podem ser observados na figura 4. O investimento em pesquisas no sentido de reduzir os danos causados por alimentos que contém alérgenos é de extrema importância, sendo o uso de probióticos uma das últimas adições a esse arsenal terapêutico.

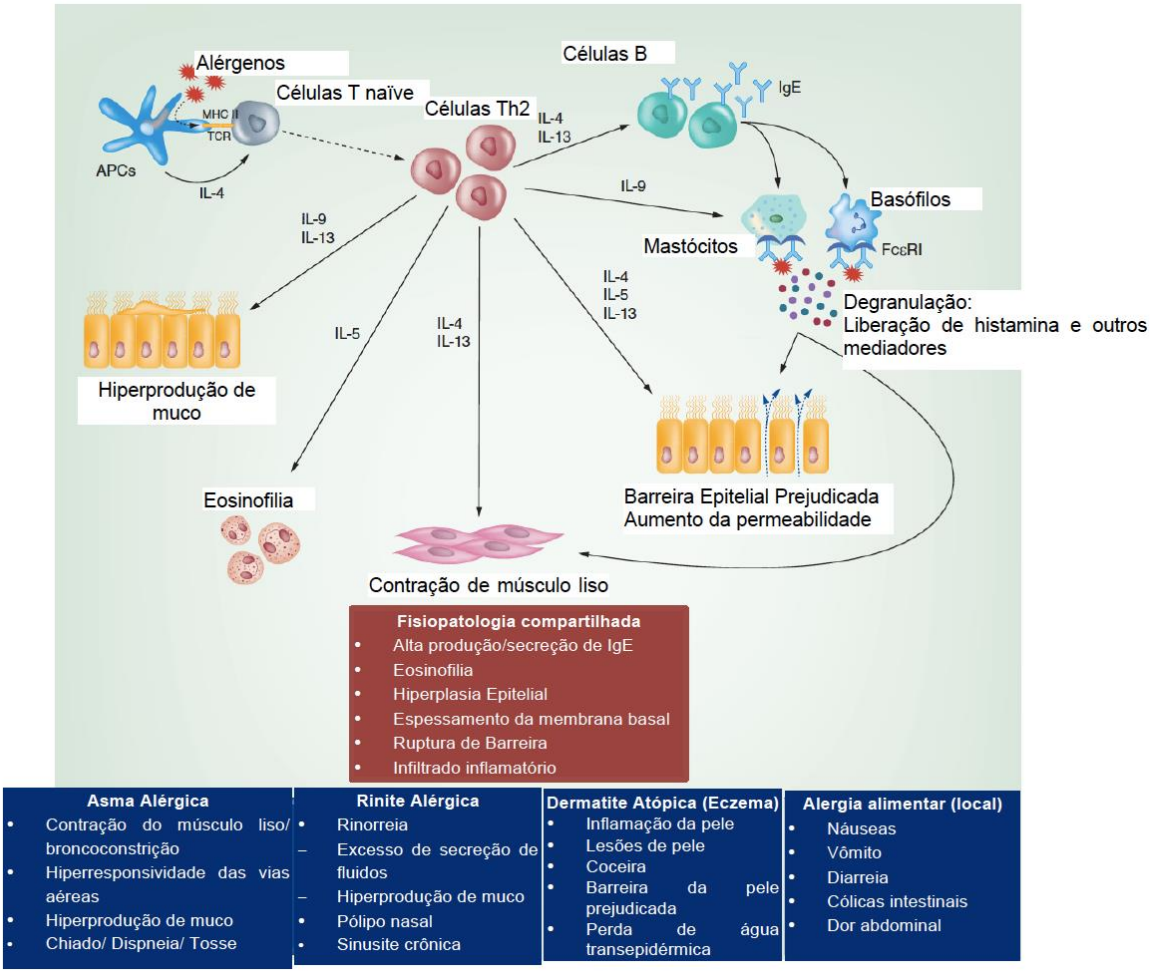


Figura 4. Mecânismo da alergia mediada por IgE. Mecanismos básicos, patofisiologia, e consequências clínicas selecionadas. Adaptado de Potaczek et al., 2017.

1.4 Probióticos

O consumo de alguns micro-organismos na alimentação é descrito já no Velho Testamento, onde a longevidade de Abraão foi associada ao consumo de leite azedo. Recentemente tem sido testada a associação de terapias tradicionais com o uso de probióticos na prevenção e até mesmo cura de desordens intestinais (HEGAZY & EL-BEDEWY, 2010).

A Organização Mundial da Saúde (WHO - *World Health Organization*) e a Organização para Alimentação e Agricultura (FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) definem probióticos como micro-organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Os probióticos são usados em alimentos, especialmente em produtos fermentados de uso diário e em preparações farmacêuticas. Os principais micro-organismos utilizados como probióticos são as

bactérias do ácido lático (BAL), como os lactobacilos, as bifidobactérias e algumas leveduras, como a *Saccharomyces boulardii*, sendo esta última, apontada como importante probiótico participante na proteção do TGI contra processos inflamatórios, com eficácia clínica e experimental, por meio de modulação do sistema imune (POTHOULAKIS, 2009).

Recentemente, foi avaliada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905, um potencial probiótico, em um modelo murino de mucosite induzida pelo irinotecano. Os resultados mostraram que ela foi capaz de reduzir a perda de peso, o aumento da permeabilidade intestinal e as lesões jejunais (encurtamento das vilosidades) observadas nos animais com mucosite. Além disso, o tratamento com a levedura reduziu o estresse oxidativo, evitou a diminuição das células caliciformes e estimulou a replicação de células nas criptas intestinais (BASTOS et al., 2016).

A influência da microbiota residente na função imunológica da mucosa intestinal tornou-se uma área de importância científica e clínica. Por isso, o TGI é considerado o maior alvo para terapias com probióticos (POTHOULAKIS, 2009). Além de infecções intestinais, probióticos demonstraram efeitos benéficos em doenças inflamatórias autoimunes como diabetes mellitus, artrite reumatoide e encefalomielite (LESSARD et al., 2009).

Nas últimas décadas, diversos estudos têm sido conduzidos com o objetivo de avaliar os efeitos do uso de micro-organismos probióticos, usando diferentes fórmulas e com propósitos de prevenção ou tratamento de doenças. Dessa forma, há um acúmulo de evidências descrevendo a capacidade de linhagens probióticas em apresentar algumas atividades protetoras como, por exemplo: modulação da microbiota intestinal, imunomodulação, redução de sintomas alérgicos, alívio de gastroenterite aguda, redução da intolerância à lactose, redução da inflamação intestinal, produção de AGCC e alívio da constipação intestinal, além de contribuir para a nutrição do hospedeiro, atuar contra micro-organismos patogênicos e influenciar a proliferação de células intestinais e a maturação do sistema imune (FEDORAK & MADSEN, 2004; BORCHERS et al., 2009; FEDORAK, 2010).

A ação benéfica destes micro-organismos está relacionada à sua ação direta sobre a mucosa intestinal estimulando a secreção de fatores citoprotetores como as mucinas, defensinas, IgA e proteínas, e auxiliando na manutenção da barreira epitelial pela reparação das junções firmes (GAREAU, SHERMAN & WALKER, 2010). (Figura 5). Efeitos moduladores da secreção de citocinas na supressão da

inflamação também parecem ser efeitos exercidos pelos probióticos (VANDERPOOL et al., 2008; BORCHERS et al., 2009).

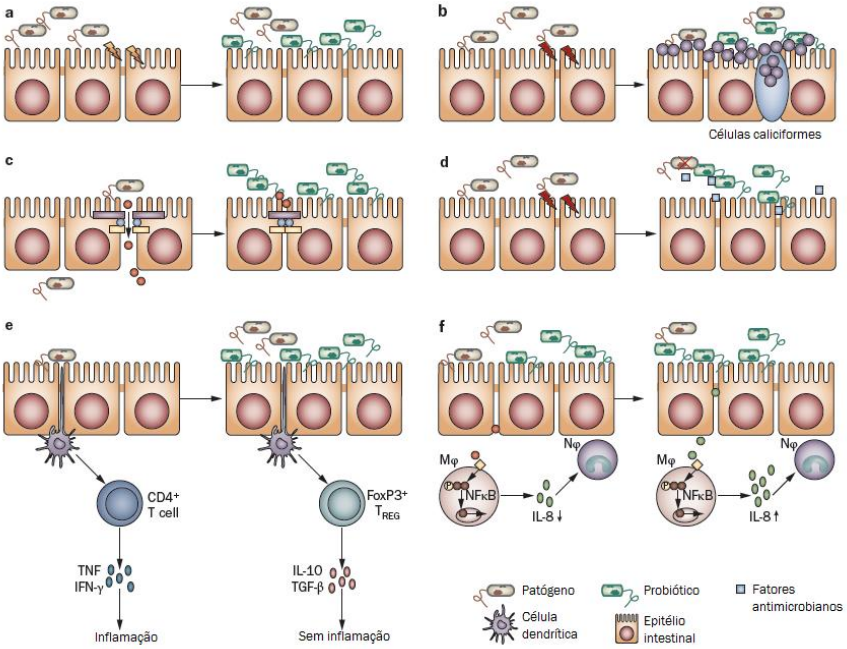


Figura 5- Mecanismos de ação dos probióticos. Organismos probióticos podem fornecer efeitos benéficos às células do epitélio intestinal por numerosas vias. Algumas linhagens podem bloquear a entrada de patógenos para dentro das células epiteliais (a) ao fornecerem uma barreira física (resistência à colonização) ou (b) ao fortalecerem a barreira de muco, estimulando a liberação de mucinas pelas células caliciformes. (c) outros micro-organismos mantêm a permeabilidade intestinal aumentando a integridade das junções adesivas, por exemplo, pelo aumento da expressão de Zona ocludina 1 (uma proteína das junções adesivas) ou prevenindo a redistribuição das proteínas dessas junções, o que evita a passagem de moléculas para dentro da lâmina própria. (d) alguns probióticos produzem substâncias antimicrobianas. (e) Algumas linhagens estimulam o sistema imunológico por meio das células dendríticas que, então, se translocam para os linfonodos e induzem células Treg a produzirem citocinas anti-inflamatórias, incluindo IL-10 e TGF- β. (f) Outros probióticos (ou seus produtos) podem, também, impedir a resposta imune inata atuando na ativação do NF-κB, com consequente diminuição na produção de IL-8 e no recrutamento de neutrófilos para o local de injúria (lado esquerdo) ou eles podem, também, fazer o inverso, aumentando o recrutamento de células inflamatórias (lado direito). Legenda: Mφ: Macrófagos; Nφ: Neutrófilos; Célula TReg: Linfócito T Regulatório. Fonte: GAREAU, SHERMAN & WALKER, 2010 (Adaptado).

Os probióticos induzem a supressão do crescimento de patógenos por meio da liberação de fatores antimicrobianos como os ácidos acético e lático, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas. Podem aumentar a função de barreira na mucosa e induzir a apoptose de células T na lâmina própria (LP). Os probióticos ainda promovem o aumento da produção de muco, protegendo o epitélio intestinal de bactérias invasivas, assim como a consistência deste muco, modificando o padrão de adesão bacteriana (FEDORAK & MADSEN, 2004; FEDORAK, 2010).

1.4.1 O gênero *Bifidobacterium*

As bifidobactérias foram originalmente isoladas e descritas no período de 1899-1900 por Henry Tissier, que observou uma bactéria abundante em forma de Y nas fezes de crianças que se alimentavam de leite materno, mas não naquelas que se alimentavam de fórmulas. Essa bactéria foi anteriormente denominada *Bacillus bifidus* (TISSIER, 1900; citado por LEAHY et al., 2005), devido à sua morfologia bifurcada. Contudo, sua localização taxonômica sofreu várias alterações, sendo denominada também *Bacteroides, Nocardia, Lactobacillus* e *Corynebacterium*, antes de ser reconhecida como um gênero à parte, em 1974 (VASILJEVIC & SHAH, 2008).

O gênero pertence ao Filo *Actinobacteria*, Classe *Actinobacteria*, Ordem *Bifidobacteriales* e Família *Bifidobacteriaceae*, sendo representado atualmente por 37 espécies, as quais foram isoladas principalmente do trato digestivo de mamíferos (LEAHY et al., 2005; TURRONI et al., 2011). As bactérias desse gênero são habitantes naturais do TGI de seres humanos e de outros animais de sangue quente. Representam a maioria da população bacteriana intestinal total em recém-nascidos saudáveis que se alimentam de leite materno; no entanto, sua população diminui no intestino adulto, representando 3-6% da microbiota fecal (HARMSEN et al., 2000; CRONIN et al., 2011; TURRONI et al., 2011).

As bifidobactérias são descritas como micro-organismos anaeróbios obrigatórios, embora algumas linhagens possam tolerar o oxigênio. São bactérias imóveis, catalase-negativa, Gram-positivo, heterofermentativas, não formadoras de esporos, em forma de bastonetes curvos, caracterizados, frequentemente, por uma bifurcação em forma de Y. Linhagens isoladas de fezes frescas apresentam formas que variam desde ramificadas, a formas bifurcadas de Y e V. Contudo, em meios de culturas não favoráveis, as bifidobactérias podem se apresentar pleomórficas (CRONIN et al., 2011).

A maioria das bifidobactérias isoladas de seres humanos cresce à temperatura ótima de 36-38ºC. São ácido tolerantes, e o pH ótimo para seu crescimento está entre 6,5-7,0. As bifidobactérias são micro-organismos sacarolíticos e todas as linhagens caracterizadas possuem a habilidade de fermentar glicose, galactose e frutose, com produção, principalmente, de ácido acético e ácido lático (LEAHY et al., 2005; CRONIN et al., 2011).

Devido à sua capacidade metabólica, estas bactérias são frequentemente incluídas no grupo das BAL, apesar de serem distintas, devido a diferenças no seu conteúdo de G-C, que varia entre 55% a 67% (VASILJEVIC e SHAH, 2008). Além disso, as bifidobactérias produzem, por uma via incomum a partir do metabolismo de 2 moles de glicose, ácido acético e ácido lático numa proporção teórica de 3:2. Produzem também a enzima frutose-6-fosfato fosfoquetolase (F6PPK), que quebra frutose-6-fosfato em acetil-1-fosfato e eritrose-4-fosfato. Esta enzima é utilizada como uma ferramenta na identificação do gênero; entretanto, não permite a distinção no nível de espécie (SHIN et al., 2000; FANDI et al., 2001; VENTURA et al., 2004).

Trabalhos recentes isolaram também bifidobactérias do leite materno, sugerindo que o leite humano pode ser um simbiótico natural contendo as bactérias benéficas (bifidobactérias) e o seu substrato (fator bifidus) para promover a saúde da criança. As espécies de bifidobactérias encontradas foram: *B. adolescentis, B. animalis, B. breve, B. bifidum, B. catenulatum* e *B. longum* (GUEIMOND et al., 2007; MARTIS et al., 2009; SOLÍS et al., 2010; ARBOLEYA et al., 2011; ZACARÍAS et al., 2011). No leite humano, estão presentes também os chamados fatores bifidus, oligossacarídeos do leite humano, HMO (*Human Milk Oligossaccharides*).

Algumas bifidobactérias, em particular as primeiras colonizadoras do intestino, são capazes de degradar HMO. Neste contexto, bifidobactérias típicas isoladas de crianças, como *B. infantis e B. bifidum* possuem diferentes capacidades de fermentar HMO, enquanto que bifidobactérias associadas ao adulto geralmente não o utilizam como substrato fermentável. O sequenciamento do genoma de *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 explica a capacidade desta linhagem de consumir HMO mediante um grupo de genes específicos que codifica glicosidases e transportadores de carboidratos necessários para a importação e metabolismo deles (SELA et al., 2008; SELA et al., 2011; TURRONI et al., 2011).

1.4.1.1 O probiótico *B. longum* 5^{1A}

Isolada no Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos (UFMG) a partir de fezes de uma criança saudável, a *B. longum* 5^{1A} foi identificada por ferramentas moleculares e mantida no estoque de nosso laboratório. A *B. longum* 5^{1A} possui diversas propriedades benéficas comprovadas *in vitro*, em modelos animais de infecção e inflamação e em humanos, o que permite descrevê-la como candidata ao uso em formulações probióticas.

Popularmente, pacientes têm creditado a melhora da constipação intestinal ao uso de alimentos contendo probióticos. Entretanto, até o momento, são poucas as evidências comprovando a eficácia dos probióticos na constipação intestinal. Um trabalho desenvolvido por Guerra e colaboradores (2011), em parceria com nosso laboratório, avaliou a eficácia de *B. longum* 5^{1A} na constipação intestinal crônica em crianças e adolescentes. Foi observado um efeito positivo em relação à consistência das fezes, frequência evacuatória, dor ao evacuar e dor abdominal com a suplementação da bifidobactéria. Entretanto, um aumento da frequência evacuatória e diminuição da dor abdominal e dor ao evacuar também foi observado para o grupo placebo que recebeu iogurte sem adição de bifidobactérias, mesmo em intensidade inferior. Uma hipótese para explicar este resultado é uma possível influência benéfica das bactérias fermentadoras do iogurte (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*) na constipação. Existe até mesmo uma discussão sobre a inclusão dessas bactérias no grupo dos probióticos. Como o efeito do iogurte sozinho foi aumentado pela adição do probiótico, este resultado encoraja a realização de novos ensaios clínicos nesta área. A administração de bifidobactérias pode ser benéfica também para a prevenção ou tratamento de várias outras doenças como: doenças atópicas, imunossupressão, hiperlipidemia, e infecções por *Helicobacter pylori* (GOTTELAND et al., 2006; VASILJEVIC & SHAH, 2008; HASAN AL-SHERAJI et al., 2012).

Em uma pesquisa realizada por pesquisadores da USP (Universidade de São Paulo) em um modelo murino de asma, foi observado que o consumo do probiótico *B. longum* 5^{1A} pode trazer benefícios frente a essa patologia. Os experimentos demonstraram que o tratamento diminuiu a quantidade de muco no pulmão e a presença de mediadores inflamatórios típicos de doença alérgica das vias aéreas. A hipótese é que o acetato, um AGCC produzido em grandes quantidades por bactérias da espécie *B. longum*, seja o responsável pela diminuição da inflamação alérgica nesse estudo (FAPESP, 2013).

Algumas propriedades *in vitro* foram investigadas por Souza e colaboradores (2013) com o uso probiótico de quatro linhagens de bifidobactérias isoladas de fezes de crianças saudáveis (*Bifidobacterium longum* 5^{1A}, *Bifidobacterium breve* 110^{1A}, *Bifidobacterium pseudolongum* 119^{1A} e *Bifidobacterium bifidum* 162^{2A}). Foram realizados testes *in vitro* para comparar a taxa de crescimento, atividade antagonista contra patógenos, perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e hidrofobicidade da

parede celular. A *B. longum* 5^{1A} apresentou o melhor potencial para uso probiótico entre as linhagens testadas, apresentando a maior sensibilidade aos antimicrobianos, a melhor taxa de crescimento e a maior capacidade de produção de substâncias antagonistas contra vários micro-organismos patogênicos.

Em 2015, Fonseca realizou um estudo com o objetivo de avaliar a ação probiótica de *B. longum* 5^{1A} e *Weissella paramesenteroides* WpK4 sobre *Giardia lamblia* em infecções experimentais, demonstrando que a administração destes probióticos reduziram a carga parasitária dos animais infectados com o parasita, sugerindo, assim, ação probiótica dessas bactérias na giardíase.

Bifidobacterium longum 5^{1A} também foi testada em modelo murino com o intuito de induzir proteção contra infecção pulmonar causada por *Klebsiella pneumoniae.* Os dados obtidos sugerem que, durante a infecção, o tratamento oral com *B. longum* 5^{1A} impediu a inflamação pulmonar, reduziu significativamente a carga bacteriana contribuindo para 100% da sobrevivência dos animais e recuperação da inflamação pulmonar pela produção da citocina IL-10 (VIEIRA et al., 2016). Em outro trabalho do nosso grupo, foi avaliado a administração oral de *B. longum* 5^{1A} no tratamento da artrite gotosa em modelo murino. O tratamento com *B. longum* 5^{1A} aliviou significativamente os parâmetros inflamatórios, reduziu o acúmulo de neutrófilos na articulação e atividade da mieloperoxidase em tecidos periarticulares. Houve inibição da produção de CXCL1 e IL-1β nas articulações. Os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 foram significativamente mais elevados no tecido de animais tratados (VIEIRA et al., 2015).

Desta maneira, a *B. longum* 5^{1A} demonstrou-se eficaz diante de várias patologias, bem como a capacidade de se manter viável em produtos láticos, em níveis de 10^9 UFC durante pelo menos sete dias em iogurte de cabra (GUERRA et al., 2011), podendo então ser produzida e comercializada em escala industrial (SOUZA et al, 2012).

Com o aumento na expectativa de vida da população, aliado ao crescimento exponencial dos custos médico-hospitalares, a sociedade necessita vencer novos desafios, como o desenvolvimento de novos conhecimentos científicos e de novas tecnologias que resultem em modificações importantes no estilo de vida das pessoas. A incidência de doenças alérgicas tem emergido como um importante problema de saúde no mundo ocidental devido à gravidade das reações e a um aumento dramático nas últimas décadas.

A alergia alimentar é uma reação de hipersensibilidade imediata que pode ser mediada por IgE que ocorre após a ingestão de determinados alimentos por indivíduos previamente sensibilizados. As citocinas produzidas pelas células Th2 (IL-4, IL-13, IL-10 e IL-5) têm participação importante no desencadeamento da reação alérgica, enquanto as citocinas de perfil Th1 inibem as repostas alérgicas. O único tratamento preconizado até o momento para as alergias alimentares é a restrição absoluta do alimento responsável por desencadear os sintomas, sendo uma tarefa árdua, visto que vários dos antígenos mais prevalentes estão presentes de modo constante na culinária habitual.

Devido à gravidade que pode acometer indivíduos sensíveis, são necessários novos planos terapêuticos para o controle das alergias alimentares, sendo uma das últimas adições a esse arsenal terapêutico os probióticos. Além do mais, uma das principais preocupações da Organização Mundial da Saúde é a implementação de novas terapias que não atuem como uma forte pressão seletiva sobre a microbiota intestinal. As bifidobactérias têm sido cada vez mais utilizadas em preparações de alimentos, e são particularmente atrativas como potenciais probióticos para seres humanos, por constituírem uma população predominante da microbiota indígena do cólon e extremamente adaptada a esse ecossistema. Embora alguns benefícios exercidos por essas bactérias nas alergias alimentares sejam relatados em ensaios clínicos, o seu modo de ação e de interação com o hospedeiro ainda é pouco conhecido.

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da administração oral da *B. longum* 5^{1A} em um modelo murino de alergia alimentar à ovalbumina.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1. Verificar o efeito do tratamento com *B. longum* 5^{1A}, avaliando a dose-resposta do tratamento, na alergia alimentar induzida, nas doses de 10^4, 10^6, 10^8 UFC e 10^8 células mortas, avaliando os sintomas clínicos (perda de peso e consumo de alimento), a permeabilidade intestinal e o infiltrado inflamatório (influxo de neutrófilos e eosinófilos no tecido), níveis séricos de IgE anti-OVA e níveis intestinais de sIgA.

3.2.2**.** Após a escolha da melhor dose de tratamento probiótico, avaliar seu efeito nos níveis:

3.2.2.1. Clínico (Peso e consumo de ração)

3.2.2.2. Avaliação da permeabilidade intestinal

3.2.2.3. Microbiológico, analisando a modificação da microbiota intestinal por métodos dependentes de cultivo.

3.2.2.4. Histológico, analisando infiltrado inflamatório, edema, destruição tecidual, altura de vilosidades e profundidade de criptas, muco, número de células caliciformes e proliferação celular.

3.2.2.5. Imunológico, analisando:

(i) níveis séricos de IgE anti-OVA,

(ii) níveis intestinais de sIgA,

(iii) infiltrado de neutrófilos e eosinófilos nos tecidos inflamados e suas respectivas quimiocinas [CCL11 (eotaxina-1), KC (CXCL-1)],

(iv) perfil séricos de citocinas (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 e TNF-α),

(iv) mielossupressão.

3.2.3. Analisar se os efeitos da *B. longum* 5^{1A} são via produção de acetato, avaliando os sintomas clínicos (perda de peso e consumo de ração), a permeabilidade intestinal e os níveis séricos de IgE anti-OVA e niveis intestinais de sIgA.

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos de seis a oito semanas de idade, fêmeas, da linhagem BALB/c. Os animais são provenientes do CEBIO – Centro de Bioterismo – (ICB/UFMG). Os animais foram mantidos em micro-isoladores modelo ALE. MIL.01.03 (Alesco Ind. e Com. Ltda, Campinas, SP, Brasil), no biotério NB2 do Departamento de Microbiologia do ICB/UFMG. Foi mantido um controle de temperatura (23°C) e um ciclo de luz diurno/noturno de 12 horas, conforme normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 2006). Os animais receberam uma dieta balanceada, segundo Reeves e colaboradores (1993) (Tabela 1) contendo caseína como fonte proteica durante 21 dias e posteriormente, até o fim do experimento, uma dieta contendo ovalbumina. Foi fornecido aos animais água “ad libitum” durante todo o experimento. No dia do sacrifício, os animais foram anestesiados usando cetamina/xilazina (0,6 mL de cetamina, 0,4 mL de xilazina e 4 mL de salina) (WIRTZ et al. 2007). Os procedimentos experimentais que foram realizados nesse estudo foram executados de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFMG nº 268/2015 (Anexo A).

Tabela 1- Receita padrão para roedores baseada na AING93. Fonte: REEVES et al. (1993). (Adaptada)

Ingredientes	Nutrientes (g)	Kcal
Caseína ou ovalbumina	200	800
Cistina (metionina)	3	12
Amido de milho (Maisena ®)	397,5	1590
Sacarose	100	400
Maltodextrina	132	528
Celulose	50	0
Óleo de soja	70	630
BHT	0,014	
Mistura de minerais	35	
Mistura de vitaminas	10	
Bitartaro de colina	2,5	

4.2 Micro-organismo

A *B*. *longum* 5^{1A} foi isolada de fezes de uma criança sadia de cinco anos de idade, da cidade de Salvador (Bahia, Brasil), e identificada por testes morfotintorias, respiratórios e bioquímicos, seguido de PCR Multiplex, de acordo com inúmeros estudos, e suas propriedades probióticas foram previamente avaliadas (GUERRA et al., 2011; SOUZA et al., 2012; VIEIRA et al., 2015; VIEIRA et al., 2016). A cultura foi

mantida a -80°C em caldo *de Man, Rogosa & Sharpe* (MRS, Difco, Sparks, USA), adicionado de 20% de glicerol esterilizado. A ativação foi feita em caldo MRS suplementado com L-cisteína 0,05% (p/v) (SIGMA Chemical Co., St. Louis, USA), a 37°C, durante 48 horas, em câmara anaeróbica (Forma Scientific, Marietta, USA), contendo uma atmosfera de 85% N_2, 10% H_2 e 5% CO_2.

4.3 Tratamento

Nos grupos pré-tratamento com a *B. longum* 5^{1A}, foi inoculada por via intragástrica (i.g.) as doses de $1x10^4$, $1x10^6$, $1x10^8$ UFC ou $1x10^8$ células mortas. Os camundongos receberam um inóculo diário com um volume de 200 µL contendo as concentrações acima citadas, três dias antes do desafio alergênico, até o fim do experimento. Nos grupos não tratados, os camundongos receberam inóculos com um volume de 200 µL de solução salina fisiológica (i.g.), três dias antes do desafio até o fim do experimento.

Para inativação da bactéria, a cultura foi centrifugada (5.000 rpm, 10 minutos, a 4ºC) e ressuspendida em PBS (tampão fosfato salino), congelada em nitrogênio líquido por 1 minuto e depois aquecida em banho maria a 65°C por 5 minutos. Esse procedimento de congelamento e aquecimento da bactéria foi realizado três vezes, e a inativação foi confirmada inoculando e incubando a cultura em ágar MRS (SILVA, 2016).

4.4 Desenho experimental

4.4.1 Para avaliar o efeito da dose resposta do probiótico na alergia experimental, os animais foram divididos nos seguintes sete grupos (6 animais por grupo) (Tabela 2): (i) animais controle, (ii) animais controle tratados com *B. longum* 5^{1A}, (iii) animais sensibilizados com OVA, (iv) animais sensibilizados tratados com a *B. longum* 5^{1A} na concentração de 10^8 UFC, (v) animais sensibilizados tratados com a *B. longum* 5^{1A} na concentração de 10^6 UFC (vi) animais sensibilizados tratados com a *B. longum* 5^{1A} na concentração de 10^4 UFC (vii) animais sensibilizados tratados com a *B. longum* 5^{1A} na concentração de 10^8 células mortas). Foram analisados os sintomas clínicos (perda de peso e consumo de ração), permeabilidade intestinal, IgE anti-OVA sérica e sIgA intestinal.

Tabela 2- Delineamento experimental com identificação dos grupos e os respectivos tratamentos utilizados (S: sensibilizado, 5^{1A}: *B. longum* 5^{1A}), o sinal positivo (+) e negativo (-) indicam a realização ou ausência de determinado tratamento no respectivo grupo.

Tempo Tratamento/Grupos	Dia 0 Sensibilização Primária	Dia 14 Sensibilização Secundária	Dia 18 Probióticos	Dia 21 Desafio OVA	Dia 28 Eutanásia
Controle	-	-	-	-	+
Controle 5^{1A}	-	-	+	+	+
Sensibilizado	+	+	-	+	+
S. Tratado 5^{1A} 10^8	+	+	+	+	+
S. Tratado 5^{1A} 10^6	+	+	+	+	+
S. Tratado 5^{1A} 10^4	+	+	+	+	+
S. Tratado 5^{1A} 10^8 inativada	+	+	+	+	+

4.4.2 Após escolha da melhor dose, foram avaliados perda de peso, consumo de ração, IgE, sIgA, permeabilidade, histologia, MPO, EPO e suas respectivas quimiocinas, citocinas séricas e microbiota fecal. Para isso, os animais foram divididos em 4 grupos (6 animais por grupo): (i) animais controle, (ii) animais controle tratados com *B. longum* 5^{1A}, (iii) animais sensibilizados com OVA, (iv) animais sensibilizados tratados com a *B. longum* 5^{1A} na concentração de 10^8 UFC.

4.4.3 Para avaliação dos efeitos da *B. longum* 5^{1A} via produção de acetato os animais foram divididos em 6 grupos (6 animais por grupo): (i) animais controle, (ii) animais controle tratados com *B. longum* 5^{1A}, (iii) animais controles tratados com acetato, (iv) animais sensibilizados com OVA, (v) animais sensibilizados tratados com a *B. longum* 5^{1A} na concentração de 10^8 UFC e (vi) animais sensibilizados tratados com acetato. Foram analisados os sintomas clínicos (perda de peso e consumo de ração), permeabilidade intestinal, IgE anti-OVA e sIgA.

4.5 Sensibilização, tratamento e desafio alergênico

4.5.1 Sensibilização

O processo de sensibilização foi executado em conformidade com os experimentos realizados por Dourado e colaboradores (2011). Os camundongos foram imunizados com OVA (albumina da clara de ovo, Sigma Grade V, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA), na dose de 10 µg, adsorvida em hidróxido de alumínio (1 mg) (Sigma) e salina (0,2 mL) por via subcutânea (s.c.) no dorso (dia 0). Receberam uma segunda sensibilização 14 dias depois (dia 14) apenas com o

antígeno (10 µg) diluído em salina. O grupo controle recebeu (s.c.) apenas o adjuvante diluído em salina no dia zero e apenas salina após 14 dias (Figura 6).

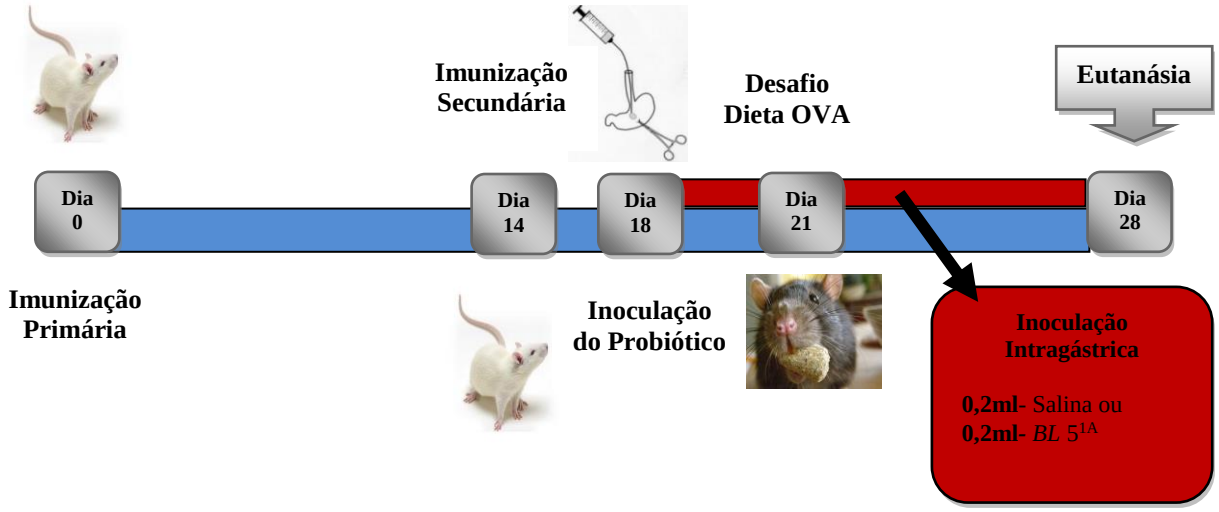


Figura 6- Esquema representativo do período de sensibilização, tratamento e desafio alergênico no modelo murino de alergia alimentar.

4.5.2 Desafio alergênico

No 21º dia, todos os camundongos receberam dieta balanceada de OVA no lugar de dieta contendo caseína. Para os grupos sensibilizados, a ingestão contínua de dieta contendo OVA caracterizou-se o desafio alergênico a partir do 21º dia (Figura 6).

4.6 Avaliação dos parâmetros clínicos

4.6.1 Avaliação do consumo de ração

Para medir o consumo de cada grupo de animais, a ração foi pesada antes e depois de ser colocada nas gaiolas, antes e após o desafio antigênico, com ração balanceada com OVA. O resultado foi expresso em gramas por meio do consumo semanal estimado por gaiola. Uma possível perda da ração no fundo da gaiola não foi computada.

4.6.2 Avaliação do peso corpóreo

O peso corpóreo foi expresso em gramas e avaliado individualmente uma vez por semana, desde o início do experimento (dia 0) até o final, ou seja, 7 dias após o início do desafio antigênico (dia 28).

4.7 Dosagem de Imunoglobulinas IgE anti-OVA no Soro

A dosagem de anticorpos IgE foi realizada por meio do teste de ELISA (Ensaio de Absorção Imunoenzimático). Microplacas de poliestireno (Nunc, Roskilde, Denmark) foram incubadas a -4ºC overnight, contendo anticorpo de rato anti-IgE de camundongo diluído 1:250 (Rat anti-mouse IgE, Southern Biotechnology, Birmingham, USA) em tampão carbonato pH 9,6, 50 µL/poço. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com PBS-Tween 20 e incubadas por 1 hora contendo 200 µL/poço de solução caseína a 0,25% em tampão salina fosfato (PBS), para bloqueio à temperatura ambiente (TA). Após este período a placa foi lavada três vezes com PBS-Tween 20 e foram adicionados 50 µL/poço do soro total das amostras dos animais a serem testados diluído 1:250, e as placas foram incubadas por 2 horas à TA e lavadas com solução PBS-Tween 20 por 5 vezes. As placas foram incubadas por 1 hora à TA com 1 µL de OVA Biotinilada em 50 µL de PBS-caseína, por poço. Após nova lavagem com PBS-Tween 20, as placas foram incubadas com 50 µL/poço com Streptavidina-Peroxidase (Southern Biotechnology) na concentração de 1:5000 por 45 minutos à TA. As placas foram lavadas 4 vezes com PBS-Tween 20 e em seguida foi realizada a etapa de revelação. Foram adicionados 100 µL/poço de uma solução de tampão citrato contendo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ortofenileno-diamino (OPD), e as placas foram incubadas em uma câmara escura por 15 minutos à TA até que a reação ocorresse. Decorridos os 15 minutos, as reações foram interrompidas pela adição de 20 µL/poço de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 2 N. Em todas as placas foi corrido um controle positivo padrão (pool de soros de animais imunes), um controle negativo (pool de soros de animais normais), além de um controle da própria placa (branco). A DO foi obtida em leitor de ELISA (Expert Plus, Asys Hitech GMBH, Eugenorf, Austria) e lida com filtro de 492 nm. Os resultados foram expressos como unidades arbitrárias (U.A.) sendo o controle positivo considerado como 1000 unidades e as demais amostras comparadas a este valor.

4.8 Dosagem de sIgA

Após a eutanásia dos animais por deslocamento cervical, o intestino delgado foi removido. O conteúdo foi retirado, pesado e lavado com salina fosfatada, pH 7,2, suplementada com inibidores de protease (1 µM de aprotinina; 25 µM de leupeptina; 1 µM de pepstatina e 1 mM de PMSF), na proporção de 2,0 mL de PBS para cada

500 mg do conteúdo intestinal. Depois de centrifugado a 9.000 *g* (Hermle Z 323 K, Alemanha) por 30 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi recolhido e congelado a -80°C, para posterior dosagem de imunoglobulina A. A sIgA total do fluido intestinal foi determinada utilizando anticorpos anti-IgA de camundongos desenvolvidos em cabra (M-8769, Sigma) para revestimento das placas e, anticorpos desenvolvidos em cabra, anti-IgA de camundongo conjugados com peroxidase (A-4789, Sigma) para detecção. A concentração de sIgA total foi determinada utilizando um padrão de IgA purificado (0106-01, Southern Biotechnology). A leitura foi feita a 492 nm em um leitor de microplacas (Spectromax M3, Molecular Devices Inc., Sunnyvale, USA), e a concentração de sIgA foi dada em µg/mL de fluído intestinal (PABST, 2012).

4.9 Determinação da permeabilidade intestinal

O ensaio de permeabilidade intestinal *in vivo* para verificar a função de barreira foi realizado utilizando-se o método do ^{99m}Tc-DTPA. Alimento e água foram removidos e, após 4 horas, os camundongos foram pesados e receberam 0,1 mL de solução de DTPA, por gavagem, marcada com 18,5 MBq de ^{99m}Tc. Quatro horas após a gavagem os animais foram anestesiados e tiveram seu sangue retirado pelo plexo braquial e, posteriormente, sacrificados.

O padrão de dose, que corresponde a alíquota de igual volume de ^{99m}Tc-DTPA oferecido aos animais foi utilizado para a determinação da radioatividade. Os resultados obtidos foram comparados com o padrão da dose e calculados em porcentual da dose de acordo com a seguinte formula: % dose = [(cpm do sangue*100)/cpm do padrão de dose].

4.10 Avaliação morfológica do jejuno proximal

O intestino foi lavado com PBS para retirada do conteúdo e então dividido em quatro partes, sendo da parte proximal para a distal, seu tamanho dividido em 20%, 30%, 30% e 20%. Essas porções foram designadas: duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo, respectivamente. Este procedimento foi adotado por não haver separação macroscópica nítida entre as porções do intestino delgado em camundongos, e foi utilizado o critério baseado em Ferraris e colaboradores (1992). O jejuno proximal foi estendido com a serosa em contato com o papel de filtro e abertos pela borda anti-mesentérica e retirou-se todo o seu conteúdo de forma cautelosa para não danificar a mucosa. Posteriormente, foram transferidos para um

recipiente contendo a solução de Bouin com 2% de ácido acético glacial por um período de 10 minutos para pré-fixação (PEDROSO et al., 2015). Os tecidos, pré-fixados, foram colocados sobre uma superfície plana e enrolados em espiral com a mucosa voltada para dentro de modo a formar rolos (rocamboles), da porção distal em direção à proximal. Os rolos amarrados com linha foram fixados por imersão em solução de formol a 4% por 24 horas. As amostras de cinco animais de cada grupo foram processadas rotineiramente para inclusão em parafina e submetidos à microtomia para obtenção de cortes histológicos de quatro µm de espessura. As lâminas foram coradas por Hematoxilina e Eosina (HE) para interpretação histológica e formulação do escore do grau de lesão. Além disso, cortes adicionais foram feitos para a coloração utilizando a técnica de Ácido Periódico de Schiff (PAS).

4.10.1 Coloração de HE

Os cortes de quatro µm do jejuno proximal de cada animal foram desparafinizados em dois banhos de xilol, 15 minutos cada, hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes (100%, 90%, 80% e 70%), por 3 minutos cada, e hidratados em água corrente por 5 minutos. Os cortes foram então corados por Hematoxilina de Harris por 50 segundos e lavados em água corrente durante 20 minutos. Posteriormente, corou-se com Eosina por 1 minuto e 30 segundos e iniciou-se o processo de desidratação em concentrações crescentes de álcool e diafanizadas em xilol. Os cortes histológicos foram montados.

4.10.2 Técnica de PAS

As lâminas contendo cortes de jejuno desparafinados em dois banhos de xilol, 10 minutos cada, hidratadas em concentrações decrescentes de soluções alcoólicas (100%, 90%, 80% e 70%), 3 minutos cada, foram lavadas em água corrente por 5 minutos, seguida de uma lavagem com água destilada. Em seguida, mergulharam-se as lâminas em solução aquosa de ácido periódico 0,5% por 5 minutos, lavaram-se com água destilada, dois mergulhos, e as incubou em reativo de *Schiff* por 10 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente (10 minutos), desidratadas e as lâminas montadas em Entellan.

4.10.3 Análise das lâminas e fotodocumentação

As lâminas montadas durante todo o processo foram codificadas e posteriormente analisadas pela Profª. Dra. Denise Carmona Cara Machado (Departamento de Morfologia, ICB, UFMG), que não teve acesso aos códigos, que foram decodificados somente após a emissão do laudo. Imagens obtidas por meio do microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão) foram transferidas por vídeo-câmera colorida Cool SNAP-Procf Color (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA) para um sistema de vídeo acoplado ao computador por meio do programa Image-Pro Express versão 4.0 para Windows (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA) (Martins et al., 2011), gerando os arquivos para documentação fotográfica.

4.10.4 Escore do grau de lesão

As fotografias do intestino foram realizadas em um aumento de 10X de modo a abranger a maior área possível do órgão. Posteriormente foi feita a elaboração de um escore (Tabela 3) levando em consideração a presença de infiltrado inflamatório, produção de muco, tamanho das vilosidades intestinais, hipertrofia das criptas e atividade das células de Paneth.

Tabela 3. Escore histopatológico.

Grau	Achados histopatológicos
0	Dentro dos padrões de normalidade
1	Mucosa com leve edema. Pouco ou nenhum infiltrado inflamatório
2	Mucosa apresentando leve infiltrado inflamatório (linfócito e eosinófilo) e aumento da produção de muco. Diminuição das vilosidades intestinais em 10%. Criptas apresentando leve hipertrofia das células de Paneth. Submucosa sem alterações celulares ou vasculares.
3	Mucosa apresentando infiltrado inflamatório (linfócito e eosinófilo) e aumento da produção de muco de leve a moderado. Diminuição das vilosidades intestinais em 15%. Criptas apresentando hipertrofia das células de Paneth de leve a moderada. Submucosa sem alterações celulares ou vasculares.
4	Mucosa apresentando moderado infiltrado inflamatório (linfócito e eosinófilo) e aumento da produção de muco. Diminuição das vilosidades intestinais em 20%. Criptas apresentando moderada hipertrofia das células de Paneth. Submucosa com leve infiltrado inflamatório e vasos dilatados.
5	Mucosa apresentando infiltrado inflamatório (linfócito e eosinófilo) e aumento da produção de muco de moderado a grave. Diminuição das vilosidades

	intestinais em 25%. Criptas apresentando hipertrofia das células de Paneth de moderada a grave. Submucosa com leve infiltrado inflamatório e vasos dilatados.
6	Mucosa apresentando intenso infiltrado inflamatório (linfócito e eosinófilo) e aumento da produção de muco. Diminuição das vilosidades intestinais em 30%. Criptas apresentando hipertrofia evidente das células de Paneth. Submucosa com moderado infiltrado inflamatório e vasos dilatados.

4.10.5 Avaliação da produção de muco

As fotografias das lâminas coradas por PAS foram utilizadas para avaliar o número de células caliciformes (coradas rosa escuro) por campo. Para tal, foram capturadas imagens na objetiva de 10X, de cinco campos aleatórios do jejuno proximal de cada animal (N = 4 animais/grupo), que foram analisadas com o auxílio do programa ImageJ. Os resultados foram expressos em número de células caliciformes/campo.

4.11 Medida da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase foi utilizada como índice de recrutamento de neutrófilos nos tecidos (SOUZA et al., 2000). Sumariamente, fragmentos do intestino delgado (jejuno proximal) dos animais foram removidos e congelados a -86ºC. Após o descongelamento, o tecido (100 mg de tecido em 1,9 mL de tampão) foi homogeneizado em tampão com pH 4,7 (0,1 M NaCl, 0,02 M $NaPO_4$, 0,015 M Na-EDTA), utilizando-se homogenizador de tecidos (Ultra-Turrax, IKA T10), centrifugado a 10.000 g por 15 minutos e o precipitado foi submetido à lise hipotônica (1,5 ml de solução de NaCl 0,2% seguido de adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5%, 30 segundos após) para lise de hemácias. Após nova centrifugação o precipitado foi ressuspendido em tampão $NaPO_4$ 0,05 M (pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetrilamônio (HTAB) 0,5% e re-homogeneizado. Alíquotas de 1 mL da suspensão foram transferidas para tubos Eppendorf de 1,5 mL e submetidos a três ciclos de congelamento/descongelamento utilizando-se nitrogênio líquido. Essas amostras foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 10.000 *g* e recolhido o sobrenadante. A atividade da MPO no precipitado ressuspendido foi calculada pela medida das alterações na densidade óptica (OD) a 450 nm utilizando tetrametilbenzidine (TMB) (1,6 mM) e H_2O_2 (0,5

mM). A leitura foi feita em leitor de ELISA (Molecular Devices) e os resultados foram expressos como unidades relativas.

4.12 Medida da atividade da enzima peroxidase eosinofílica (EPO)

A atividade da enzima peroxidase eosinofílica, como quantidade relativa de eosinófilos no tecido, foi avaliada por meio de testes enzimáticos como descrito anteriormente por Strath e colaboradores (1985). A quantificação dos níveis de EPO no tecido foi utilizada como uma maneira indireta de estimar a eosinofilia intestinal. Para tanto, para cada 100 mg de tecido pesado, foi adicionado 1,9 mL de PBS (pH 7.2), em seguida o tecido foi homogeinizado e centrifugado a 10.000 *g* por 10 minutos e o sobrenadante desprezado. Ao *pellet* foi realizada a lise hipotônica pela adição de 1,5 mL de salina 0,2%, seguido pela adição de 1,5 mL de salina 1,6% contendo glicose 5%. Em seguida, o material foi novamente centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante novamente desprezado e o *pellet* ressuspendido em 1,9 mL de PBS (pH 7,4), contendo HTAB (Sigma) 0,5%. Essa solução foi novamente homogeneizada, e o homogenato separado em alíquotas de 1 mL / eppendorf, congelado/descongelado 3 vezes em nitrogênio líquido e centrifugado a 10.000 *rpm* por 15 minutos. Apenas o sobrenadante foi utilizado para quantificação da enzima. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, sendo que em cada poço 75 µL de amostra ou branco (PBS) foi incubada com 75 µL do substrato (1,5 mM de *o*-fenilenodiamina, OPD, em tampão Tris-HCl - 0, 075 µM pH 8 suplementado de H_2O_2 6,6 mM). A placa foi incubada no escuro por aproximadamente 30 minutos, e a reação interrompida pela adição de 50 µL de H_2SO_4 1 M. A leitura ocorreu em leitor de ELISA com filtro de 492 nm.

4.13 Dosagem de citocinas

Para avaliar a expressão de citocinas, fragmentos do intestino delgado (jejuno proximal) com aproximadamente 100 mg foram ressuspendidos em 1 mL de solução de extração de citocinas (PBS contendo um coquetel de anti-proteases: 0,1 mM PMSF, 0,1 mM cloreto de benzetônio, 10 mM EDTA e 20 KI de aprotinina A) e 0,05% de Tween 20. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados a 4ºC por 10 minutos a 10.000 *rpm* (Eppendorf 5430 R, São Paulo, SP, Brasil). Os sobrenadantes foram imediatamente coletados e armazenados a -80ºC para posterior dosagem das citocinas. A dosagem de citocinas foi realizada pelo método

de ELISA. Os kits para as citocinas e quimiocinas foram obtidos da R&D Systems (DuoSet) (R&D Systems, Minneapolis, USA). As instruções do fabricante para a realização dos ensaios foram seguidas (MARTINS et al., 2011).

4.14 Avaliação da mielossupressão

Para avaliação da mielossupressão, realizou-se uma incisão na região acima do acetábulo, permitindo a remoção do fêmur e tíbia. Retirou-se o músculo e limpamos os ossos para expor o canal medular, cortando em seguida as extremidades epifisárias. A medula foi lavada com uma seringa de 26 gauge utilizando PBS 1X e, em seguida, homogeneizou-se a suspensão de células, que foi centrifugada a 1200 rpm por 10 minutos. O *pellet* foi ressuspendido em 2 mL de solução de lise de hemácias 1X, e incubado a 37°C por 5 minutos. Adicionaram-se 4 mL de PBS 1X, que foi, em seguida, centrifugado a 1200 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 1 mL de PBS 1X. Para contagem total das células, diluiu-se 5 µL da suspensão de células em 95 µL de TURCK. Dez µL foram utilizados para contagem nos quatro quadrantes na câmara de Neubauer.

$$\boldsymbol{Q = 40x104x\ 1mL\ x\ (n°\ de\ células)}$$

$$\boldsymbol{4}$$

Para medula**:** Número de células se encontra na faixa de 10^7 células/mL.

4.15 Avaliação da composição da microbiota intestinal na alergia alimentar após o tratamento probiótico por método dependente de cultivo

Amostras de fezes foram coletadas assepticamente no último dia do desafio alergênico, tendo sido pesadas e acrescidas de PBS em uma diluição inicial na ordem de 10^{-2}, seguindo a diluição seriada até a ordem de 10^{-8}. As alíquotas foram plaqueadas em meios ricos e diferenciais para avaliar a composição da microbiota intestinal cultivável. As diluições 10^{-6} e 10^{-8} foram utilizadas para plaqueamento dos meios incubados em anaerobiose [Ágar Sangue Suplementado (base *Brain Heart Infusion* suplementado com hemina, menadiona e extrato de levedura), para análise de micro-organismos anaeróbios totais; Ágar de Man, Rogosa e Sharpe (Ágar MRS), para análise da presença de bactérias do ácido láctico e BBE].

As diluições 10^{-4} e 10^{-6} foram utilizadas para plaqueamento dos meios incubados em aerobiose [Ágar Sangue Simples (base *Brain Heart Infusion*), para análise de micro-organismos aeróbios totais; Ágar MacConkey para análise da presença de enterobactérias; Ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) com azida, para análise da presença de *Enterococcus*; Ágar hipertónico manitol para análise de *Staphylococcus* e Ágar Sabouraud com cloranfenicol para análise de leveduras]. Os meios para avaliação de micro-organismos aeróbios foram incubados a 37°C por 24 horas, e aqueles referentes aos anaeróbios foram incubados a 37°C por até 7 dias em câmara anaeróbica. A contagem foi expressa em Log_{10} UFC/g de fezes (Tabela 4).

Tabela 4. Análise qualitativa e quantitativa da composição da microbiota intestinal presente nas fezes dos camundongos coletadas no dia do sacrifício.

Meio de cultura	***Atmosfera***	***Tempo de incubação***	***Micro-organismos***
Ágar AS-S	Anaerobiose	7 dias	Anaeróbios totais
Ágar BBE	Anaerobiose	7 dias	*Bacteroides* spp.
Ágar MRS	Anaerobiose	2 dias	Bactérias ácido lácticas
Ágar Sangue	Aerobiose	1 dia	Aeróbios totais
Ágar Manitol	Aerobiose	1 dia	*Staphylococcus* spp.
Ágar BHI azida	Aerobiose	1 dia	*Enterococcus* spp.
Ágar Sb	Aerobiose	2 dias	Leveduras

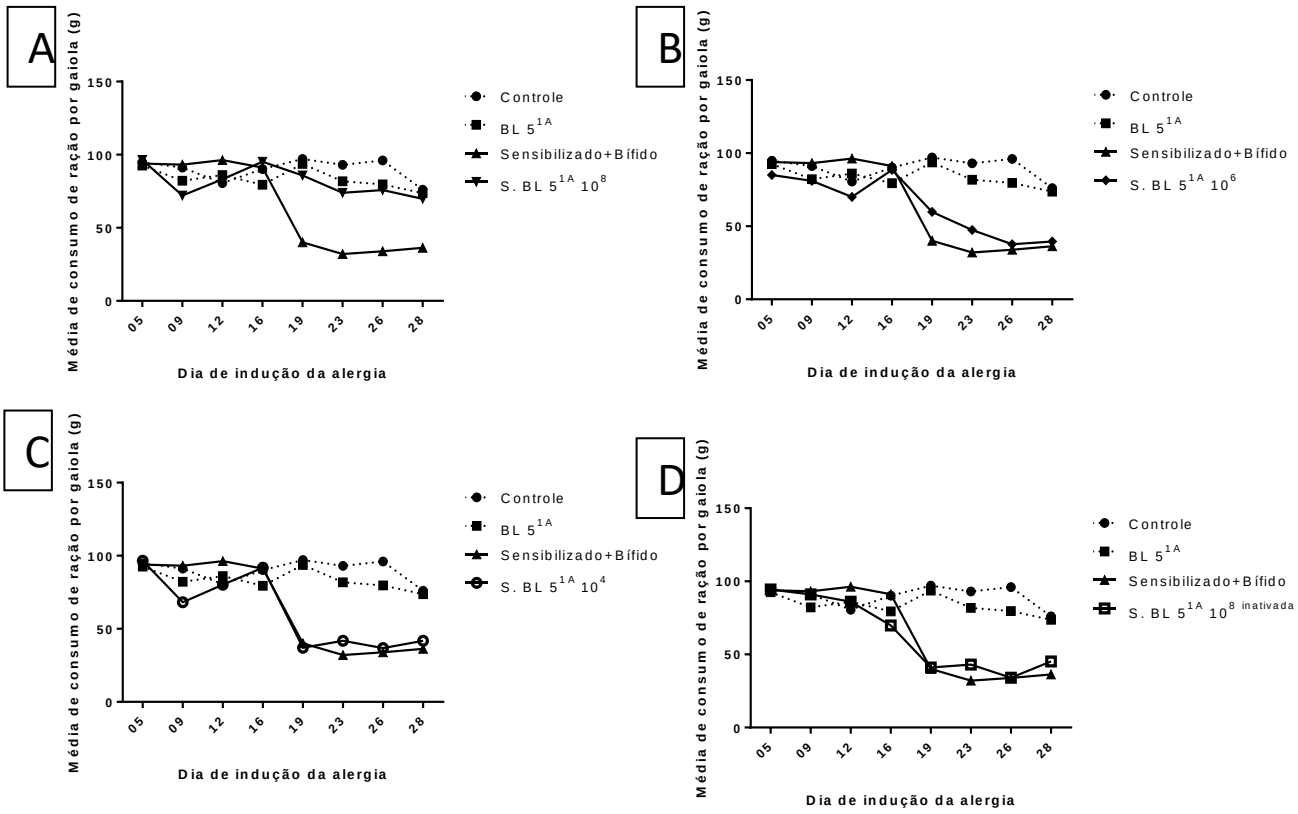
4.16 Análise estatística

Os dados estatísticos obtidos durante o trabalho foram avaliados utilizando o software GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, San Diego, USA) com a utilização do teste ANOVA, seguido do pós- teste Tukey (análise de variância). Os resultados com $p < 0,05$ foram considerados significativos.

DOSE RESPOSTA

5.1 Avaliação dos parâmetros clínicos: Consumo de ração e desenvolvimento ponderal

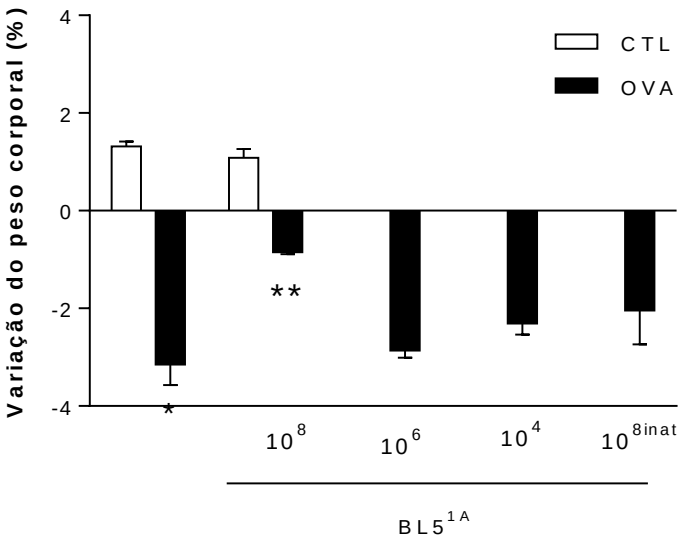
Para a avaliação do consumo de ração foi realizada uma quantificação do consumo de ração duas vezes por semana antes do desafio antigênico onde os animais receberam ração sem OVA e duas vezes na semana durante o desafio antigênico onde os animais receberam ração contendo OVA. O resultado expresso em gramas foi dado pelo consumo semanal de cada gaiola (n=6).



Figuras 7. Avaliação do fenômeno de aversão dependente de IgE. Camundongos BALB/c fêmeas sensibilizadas (alérgico) ou não (controle), receberam tratamento (com a *B. longum* 5^{1A}) ou não (grupo que recebeu somente salina). Os animais foram tratados do 18º ao dia 28º dia, a sensibilização ocorreu no dia 0, o reforço no dia 14 e do dia 21 ao dia 28 todos receberam o antígeno (ovalbumina) na ração, a eutanásia ocorreu no dia 28. N= 6 animais/grupo. (**A**= *B. longum* 5^{1A} $1X10^8$ UFC; **B**= *B. longum* 5^{1A} $1X10^6$ UFC; **C**= *B. longum* 5^{1A} $1X10^4$ UFC; **D**= *B. longum* 5^{1A} $1X10^8$ células mortas/mL).●: Controle; ■: *B. longum* 5^{1A}; ▲: Sensibilizado; ▼: *B. longum* 5^{1A} $1X10^8$ UFC; ♦: *B. longum* 5^{1A} $1X10^6$ UFC; ○: *B. longum* 5^{1A} $1X10^4$ UFC; □: *B. longum* 5^{1A} $1X10^8$ células mortas/mL. * indica diferença estatística em relação ao seu controle ($p < 0,05$; one-way ANOVA); ** indica diferença estatística em relação ao controle alérgico ($p < 0,05$; one-way ANOVA).

Foi observado que os animais do grupo alérgico apresentaram uma diminuição drástica no consumo de ração, quando a mesma foi trocada pela ração que continha o antígeno. O grupo tratado com a *B. longum* 5^{1A} na concentração de 10^8 UFC (Figura 7A) não reduziu o consumo de ração quando desafiado com a mesma ração contendo o antígeno, porém, na análise estatística esse parâmetro não foi detectado. Já quando comparado com os grupos na concentração de 10^6, 10^4 UFC e 10^8 células mortas (Figuras 7B, 7C e 7D, respectivamente), durante o desafio oral, foi demonstrado que essas concentrações não são eficazes, como forma terapêutica, para o parâmetro analisado.

A perda de peso observada na maioria dos processos alérgicos é decorrente do comprometimento epitelial, alteração da absorção e secreção de fluídos e eletrólitos e aumento da permeabilidade da mucosa. Nesse estudo, o peso dos animais foi analisado durante todo o experimento, uma vez por semana antes do desafio antigênico e durante todos os dias na semana do desafio antigênico.



Figuras 8. Avaliação da perda de peso induzida pela alergia alimentar. Camundongos BALB/c fêmeas sensibilizadas (alérgico) ou não (controle), receberam tratamento (com a *B. longum* 5^{1A}) ou não (grupo que recebeu somente salina). Os animais foram tratados do 18º ao dia 28º dia, a sensibilização ocorreu no dia 0, o reforço no dia 14 e do dia 21 ao dia 28 todos receberam o antígeno (ovalbumina) na ração, a eutanásia ocorreu no dia 28. N= 6 animais/grupo. * indica diferença estatística em relação ao seu controle ($p < 0,05$; one-way ANOVA); ** indica diferença estatística em relação ao controle alérgico ($p < 0,05$; one-way ANOVA).

Foi possível observar estatisticamente uma manutenção no peso dos animais do grupo que recebeu a dose de 10^8 UFC (Figura 8), já nos grupos que receberam o probiótico nas concentrações de 10^6, 10^4 UFC e 10^8 células mortas à perda de peso pode ser comparada ao grupo sensibilizado sem tratamento, demonstrando que nessas concentrações o probiótico não teve efeito.

5.2 *Bifidobacterium longum* 5^{1A} diminui a permeabilidade intestinal no modelo de alergia alimentar induzida por OVA

A permeabilidade intestinal está relacionada à função de barreira exercida pelo epitélio, capaz de permitir a passagem de moléculas menores pelo mecanismo de difusão não mediada que não exige o consumo de energia no nível da membrana, independente do gradiente de concentração ou de pressão e sem a assistência de um sistema carreador bioquímico passivo ou ativo. Apenas moléculas maiores que 150 Daltons (Da) utilizam essa via de acesso ao compartimento interno (PERSE & CESAR, 2012).

O presente estudo demonstrou um aumento exacerbado da permeabilidade no grupo sensibilizado em relação ao grupo controle (Figura 9).

Nos grupos tratados com a *B. longum* 5^{1A} nas concentrações de $1x10^8$, $1x10^6$ e $1x10^4$ UFC (Figura 9), foi observado uma proteção na integridade dessa barreira e da permeabilidade intestinal, demonstrando estatisticamente a efetividade do potencial probiótico ($P<0,05$). Já no grupo que utilizou a concentração de $1x10^8$ células mortas/mL (Figura 9), não houve redução da permeabilidade quando comparado ao grupo sensibilizado sem tratamento, demonstrando, assim, que o efeito depende da viabilidade do probiótico. Generoso e colaboradores (2010) observaram efeito protetor do epitélio intestinal pelo potencial probiótico *S. cerevisiae* UFMG A-905 usando a mesma técnica de avaliação da permeabilidade do nosso estudo pela determinação da radioatividade no plasma após a administração oral de ^{99m}Tc-DTPA em um modelo murinho; deste modo, podemos concluir o papel efetivo dos probióticos na manutenção e proteção do epitélio intestinal.

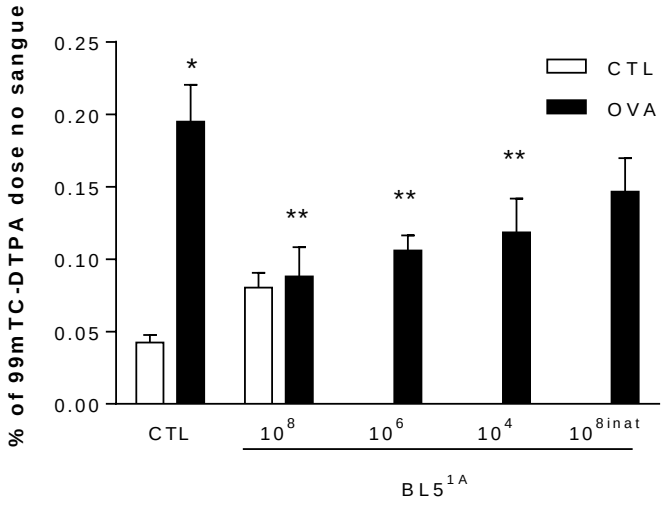


Figura 9. Avaliação da permeabilidade intestinal. Camundongos BALB/c fêmeas, sensibilizados (alérgico) ou não (controle). A sensibilização ocorreu no dia 0, o reforço no dia 14 e do dia 21 ao dia 28 todos receberam o antígeno (ovalbumina) na ração, a eutanásia ocorreu no dia 28. Ensaio utilizando ^{99m}Tc-DTPA. * indica diferença estatística em relação ao seu controle ($p < 0,05$; one-way ANOVA); ** indica diferença estatística em relação ao controle alérgico ($p < 0,05$; one-way ANOVA).

5.3 Quantificação sérica de IgE anti-ovalbumina

A fim de avaliar o processo alérgico nos animais e se os tratamentos influenciaram na alergia, foi feita a dosagem de IgE, no soro dos animais, após a eutanásia, realizando um experimento que visou analisar a melhor dose-resposta para um tratamento com várias concentrações da *B. longum* 5^{1A}. Indivíduos que sofrem de alergia alimentar apresentam um aumento nos níveis de IgE especifica para um antígeno.

Para avaliar a alergia, a produção de IgE é um parâmetro fundamental. O presente estudo mostrou o aumento da produção de IgE anti-OVA nos animais sensibilizados tratados ou não com os probióticos demonstrando assim que a resposta alérgica foi induzida quando os animais foram expostos ao antígeno.

Os animais alérgicos sem tratamento, produziram significativamente mais IgE anti-OVA em relação aos animais controle (Figura 10). Já os animais sensibilizados dos grupos tratados com a *B. longum* 5^{1A} na dose de $1x10^8$ UFC tiveram níveis de IgE reduzidos quando comparado aos níveis de IgE do grupo sensibilizado não

tratado (Figuras 10). Ambos os grupos foram comparados com o grupo alérgico sem tratamento, imunizados com OVA. O tratamento preventivo que começou três dias antes do desafio e terminou ao fim do experimento, reduziu significativamente a síntese da IgE nos animais sensibilizados e tratados. Sabendo que a IgE é a imunoglobulina fundamental para a indução dos sintomas clássicos da alergia alimentar, essa redução foi importante na melhora do quadro clinico dos animais. Quando administrada a *B. longum* 5^{1A} nas doses de $1x10^6$, $1x10^4$ UFC e $1x10^8$ células mortas/mL (Figura 10) não foi possível observar nenhuma diferença estatisticamente significativa na redução da síntese de IgE quando comparado ao grupo sensibilizado sem tratamento, mostrando que o efeito do probiótico é dose-dependente, e depende da viabilidade da bactéria.

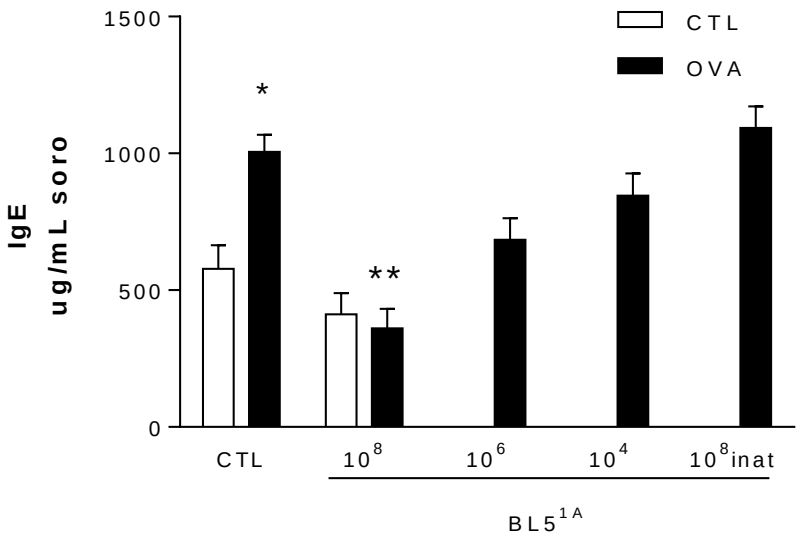


Figura 10. Avaliação do anticorpo IgE anti-OVA após o desafio com ração contendo OVA tratados com a *Bifidobacterium longum* 5^{1A} $1x10^8$, $1x10^6$, $1x10^4$ UFC e $1x10^8$ células mortas/mL. As barras representam a média dos valores de cada grupo (6 animais/grupo) obtidos em amostras de soro total para IgE. *indica diferença estatística em relação ao seu controle ($p < 0,05$; one-way ANOVA); **indica diferença estatística em relação ao controle alérgico ($p < 0,05$; one-way ANOVA).

5.4 Avaliação dos níveis séricos de anticorpos sIgA

A imunidade adaptativa intestinal tem a capacidade para gerar grandes quantidades de IgA por múltiplas vias foliculares e extrafoliculares que operam na presença ou ausência de interações celulares. O epitélio intestinal seleciona

mecanismos imunes efetores adequados neutralizando patógenos e evitando danos ao tecido

Camundongos sensibilizados com OVA apresentaram níveis de IgA estatisticamente maiores quando comparados com animais do grupo controle (Figura 11). Os grupos sensibilizados que receberam tratamento nas doses de $1x10^8$ e $1x10^6$ UFC da *B. longum* 5^{1A}, apresentaram níveis significativamente menores de IgA (semelhante ao grupo controle), quando comparados aos grupos sensibilizados não tratados (Figuras 11). Os camundongos tratados com a *B. longum* 5^{1A} nas doses de $1x10^4$ UFC e $1x10^8$ células mortas/mL não apresentaram redução estatisticamente significativa na produção de IgA em relação ao grupo sensibilizados sem tratamento (Figura 11).

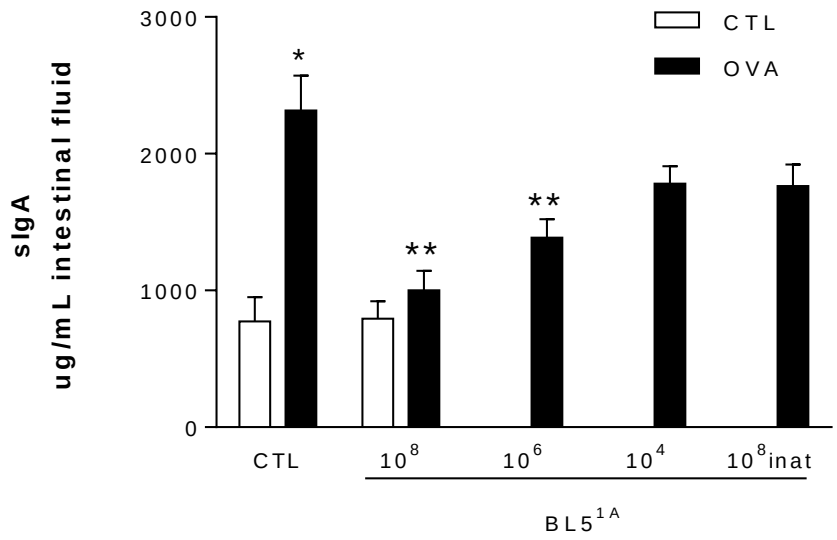


Figura 11. Avaliação dos anticorpos sIgA após o desafio com ração contendo OVA (não tratados). As barras representam a média dos valores de cada grupo (6 animais/grupo) obtidos em amostras de soro total para IgA. * indica diferença estatística em relação ao seu controle ($p < 0,05$; one-way ANOVA); ** indica diferença estatística em relação ao controle alérgico ($p < 0,05$; one-way ANOVA).

EFEITO DA RESPOSTA

5.5 Avaliação do desenvolvimento ponderal e do consumo de ração na melhor dose-resposta.

O ganho de peso corporal foi semelhante entre os grupos até o desafio alérgênico. Após o desafio, apenas o grupo alérgico apresentou perda de peso considerável (Figura 12). Neste mesmo período foram demonstrados, no presente estudo, mudanças imunológicas como aumento de diversas citocinas que participam ativamente na perda de peso, além da degradação de lipídios aumentada, diminuição do tecido adiposo e diminuição dos adipócitos em si, resultando na perda de peso após o contato com o alérgeno.

Ao serem desafiados, o grupo alérgico que não recebeu tratamento apresentou uma redução intensa do peso em relação à pesagem anterior ao desafio. O grupo tratado com a *B. longum* 5^{1A}, apresentou uma perda de peso discreta em relação ao grupo alérgico que não recebeu tratamento (Figura 12). Diante de certas condições patológicas a perda de peso pode estar associada a vários mecanismos, como por exemplo, o aumento do gasto energético requerido para a manutenção dos processos inflamatórios, a aversão alimentar por conter em sua composição o antígeno, resultando na diminuição do consumo.

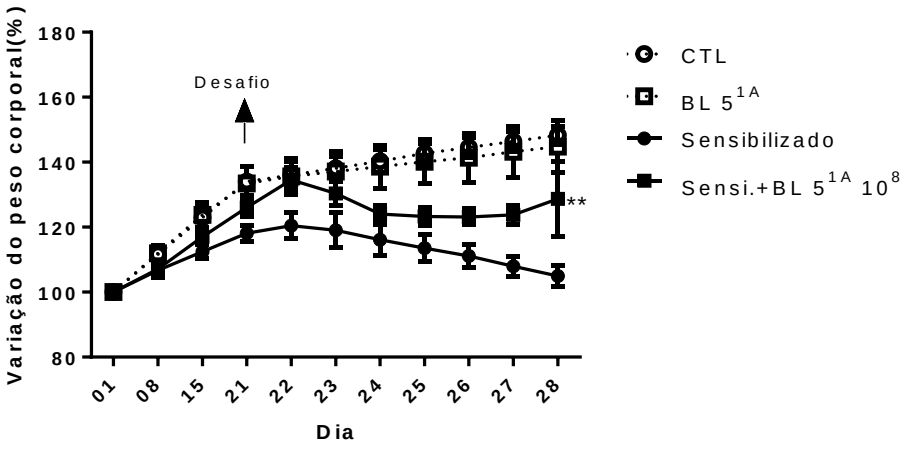
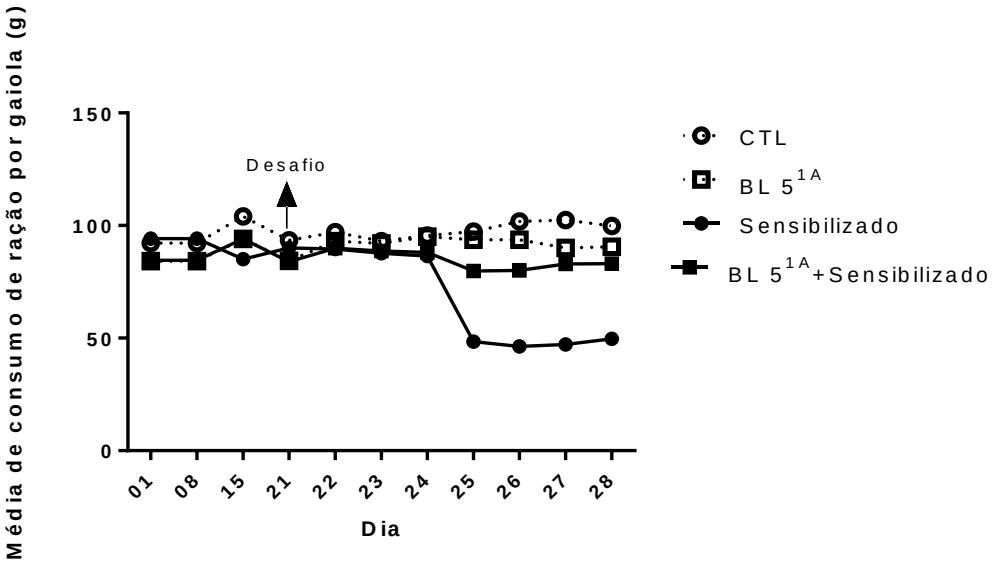


Figura 12. Avaliação da perda de peso induzida pela alergia alimentar. Camundongos BALB/c fêmeas sensibilizadas (alérgico) ou não (controle), receberam tratamento (com a *B. longum* 5^{1A}) ou não (grupo que recebeu somente salina). Os animais foram tratados do 18º ao dia 28º dia, a sensibilização ocorreu no dia 0, o reforço no dia 14 e do dia 21 ao dia 28 todos receberam o antígeno (ovalbumina) na ração, a eutanásia ocorreu no dia 28. N= 6 animais/grupo. * indica diferença estatística em relação ao seu controle ($p < 0,05$; one-way ANOVA); ** indica diferença estatística em relação ao controle alérgico ($p < 0,05$; one-way ANOVA).

Para avaliar uma possível diminuição do consumo de ração, pesou-se a mesma antes de colocá-la nos micro-isoladores, e de 4 em 4 dias realizou-se a pesagem, calculando então a diferença em gramas de ração que foi consumida pelos animais. É possível observar na Figura 13 que, após o desafio, os animais alérgicos reduziram o consumo de ração, corroborando com os dados da perda de peso. O principal mecanismo envolvido na diminuição do consumo de ração é o processo de aversão alimentar. Vários estudos já comprovaram a relação entre a aversão alimentar e a perda de peso, onde o animal para de comer na tentativa de cessar os sintomas apresentados na alergia.



Figuras 13. Avaliação do fenômeno de aversão dependente de IgE. Camundongos BALB/c fêmeas sensibilizadas (alérgico) ou não (controle), receberam tratamento (com a *B. longum* 5^{1A}) ou não (grupo que recebeu somente salina). Os animais foram tratados do 18º ao dia 28º dia, a sensibilização ocorreu no dia 0, o reforço no dia 14 e do dia 21 ao dia 28 todos receberam o antígeno (ovalbumina) na ração, a eutanásia ocorreu no dia 28. N= 6 animais/grupo. * indica diferença estatística em relação ao seu controle ($p < 0,05$; one-way ANOVA); ** indica diferença estatística em relação ao controle alérgico ($p < 0,05$; one-way ANOVA).

5.6 Quantificação sérica de IgE anti-OVA

O aumento de IgE é o principal marcador para a maioria das reações de hipersensibilidade imediata conhecida como alergia ou atopia (ISHIZAKA E ISHIZAKA, 1978). Na fase indutora (primeira fase), ocorre a sensibilização alérgica

onde o contato com o antígeno mobiliza células do sistema imunológico que leva a ativação dos linfócitos B e produção de IgE, que por sua vez é lançada na corrente sanguínea e se liga com alta afinidade aos receptores presentes na superfície dos mastócitos e basófilos, sensibilizando-os (STONE et al., 2010). Após a sensibilização, um novo contato com o antígeno inicia a fase efetora, onde os mastócitos sensibilizados com IgE ligam-se ao antígeno por meio de ligações cruzadas (*crosslinking*) e se degranulam, liberando histamina, prostaglandinas e outros mediadores lipídicos que vão desencadear o processo alérgico.

A ingestão oral do antígeno aumentou drasticamente a concentração de IgE anti-OVA nos camundongos sensibilizados (Figura 14). Quando administrado a *B. longum* 5^{1A}, os níveis de IgE se mantiveram em níveis basais quando comparado ao grupo controle e, portanto, não houve exacerbação da resposta alérgica de caráter imunológico.

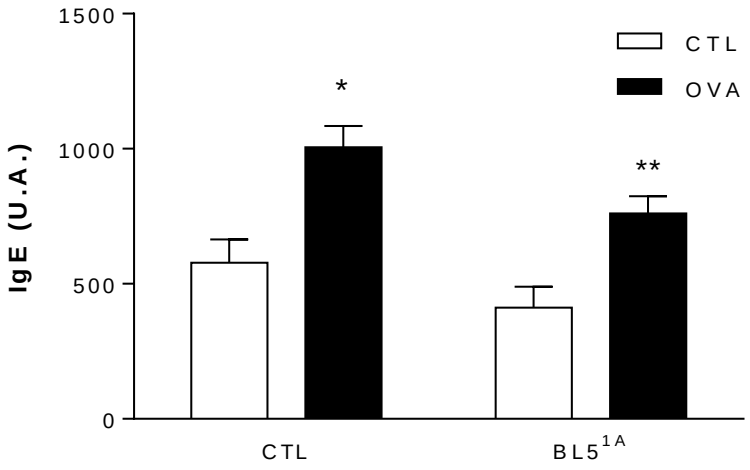


Figura 14. Avaliação do anticorpo IgE anti-OVA após o desafio com ração contendo OVA tratados com a *B. longum* 5^{1A} $1x10^8$ UFC. As barras representam a média dos valores de cada grupo (6 animais/grupo) obtidos em amostras de soro total para IgE. * indica diferença estatística em relação ao seu controle ($p < 0,05$; one-way ANOVA); ** indica diferença estatística em relação ao controle alérgico ($p < 0,05$; one-way ANOVA).

5.7 Avaliação dos níveis de sIgA

A sIgA favorece a manutenção de bactérias comensais não invasivas e a neutralização de patógenos invasivos por meio de múltiplos mecanismos. Ela bloqueia especificamente certos epítopos bacterianos para prevenir a adesão de bactérias comensais a superfície apical das IEC; além disso, ela limita a motilidade

microbiana por bactérias de ligação não especifica, também intercepta micróbios e toxinas dentro das IEC. A sIgA fornece funções de proteção sem ativar a cascata de complemento, impedindo, assim, danos inflamatórios à barreira epitelial.

Em nosso estudo, os níveis de sIgA aumentaram significativamente no grupo alérgico sem tratamento quando comparado ao grupo controle (Figura 15). Quando o grupo alérgico recebeu como tratamento a *B. longum* 5^{1A} na concentração de 10^8, os níveis de sIgA foram reduzidos quando comparados ao grupo controle alérgico.

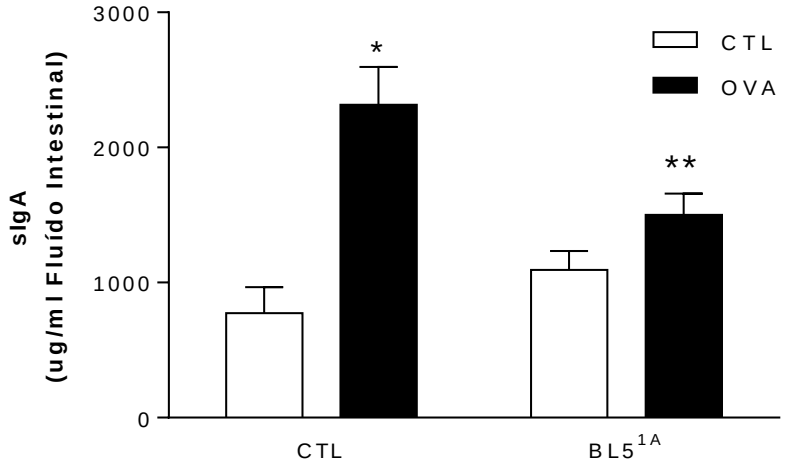


Figura 15. Avaliação dos anticorpos sIgA após o desafio com ração contendo OVA (não tratados). As barras representam a média dos valores de cada grupo (6 animais/grupo) obtidos em amostras de soro total para IgA e tratados com a *Bifidobacterium longum* 5^{1A} $1x10^8$ UFC. * indica diferença estatística em relação ao seu controle ($p < 0,05$; one-way ANOVA); ** indica diferença estatística em relação ao controle alérgico ($p < 0,05$; one-way ANOVA).

5.8 *Bifidobacterium longum* 5^{1A} diminui a permeabilidade intestinal no modelo de alergia alimentar induzida por OVA

A permeabilidade intestinal aumentada é uma condição patológica cujo interesse tem aumentado nas últimas décadas e que se correlaciona com intolerâncias alimentares.

A ingestão de dieta OVA por camundongos sensibilizados induziu aumento da porcentagem de DTPA marcado no sangue, o que significa alterações na integridade do epitélio intestinal e aumento da permeabilidade intestinal. Estas alterações não foram observadas em camundongos tratados com *B. longum* 5^{1A}. (Fig. 16).

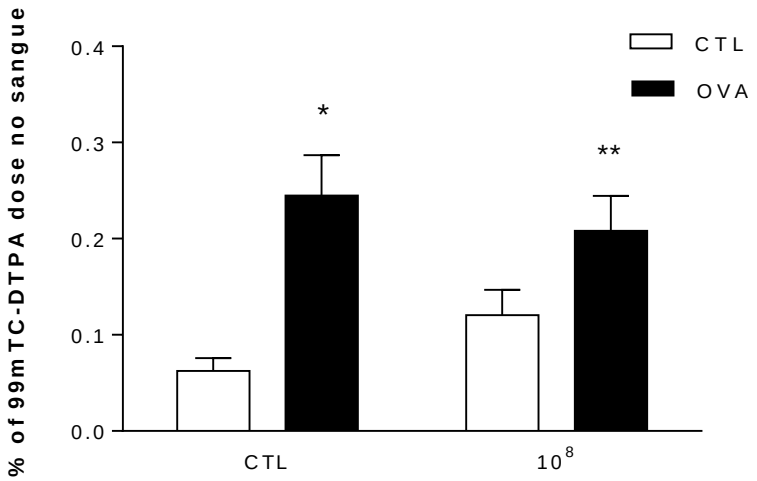


Figura 16. Avaliação da permeabilidade intestinal. Camundongos BALB/c fêmeas, sensibilizados (alérgico) ou não (controle). A sensibilização ocorreu no dia 0, o reforço no dia 14 e do dia 21 ao dia 28 todos receberam o antígeno (ovalbumina) na ração, a eutanásia ocorreu no dia 28. Ensaio utilizando ^{99m}Tc-DTPA. * indica diferença estatística em relação ao seu controle ($p < 0,05$; one-way ANOVA); ** indica diferença estatística em relação ao controle alérgico ($p < 0,05$; one-way ANOVA).

5.9 *Bifidobacterium longum* 5^{1A} preservou alterações funcionais e morfológicas induzidas pela ingestão de dieta OVA por camundongos sensibilizados com OVA

Na análise histopatológica do intestino delgado (Figura 17) foi observado que os camundongos do grupo sensibilizado, alimentados com dieta OVA, apresentavam infiltrado inflamatório, predominantemente de linfócitos e eosinófilos. Também foi observado aumento discreto no número de células caliciformes e aumento na atividade de células de Paneth evidenciadas pelo aumento no número e tamanho dos grânulos eosinofílicos. A submucosa apresentava moderado infiltrado inflamatório e alguns vasos dilatados, e as vilosidades apresentavam redução de estatura leve a moderada (escore histológico 5). Essas lesões foram reduzidas em camundongos sensibilizados tratados com *B. longum* 5^{1A}, como demonstrado por leve infiltrado inflamatório com um leve aumento no muco, e também uma discreta redução na atividade das vilosidades e das células de Paneth (Fig. 17F). Neste grupo, assim como no controle, não houve alterações celulares ou vasculares na

submucosa (escore histológico 2). Camundongos do grupo controle, bem como o grupo que recebeu apenas *B. longum* 5^{1A} (Figs. 17A e 17B mostraram preservação da mucosa intestinal com vilosidades intactas, epitélio contínuo, proporção normal de células caliciformes / enterócitos e linfócitos intraepiteliais / enterócitos regulares, lâmina fina própria, ausência de edema e criptas com celularidade e tamanhos normais (escore histológico 0). Estes resultados foram resumidos na Figura 17G, que mostra uma redução do escore de lesão em camundongos alérgicos tratados com *B. longum* 5^{1A} quando comparado ao grupo Sensibilizado ($p < 0,05$).

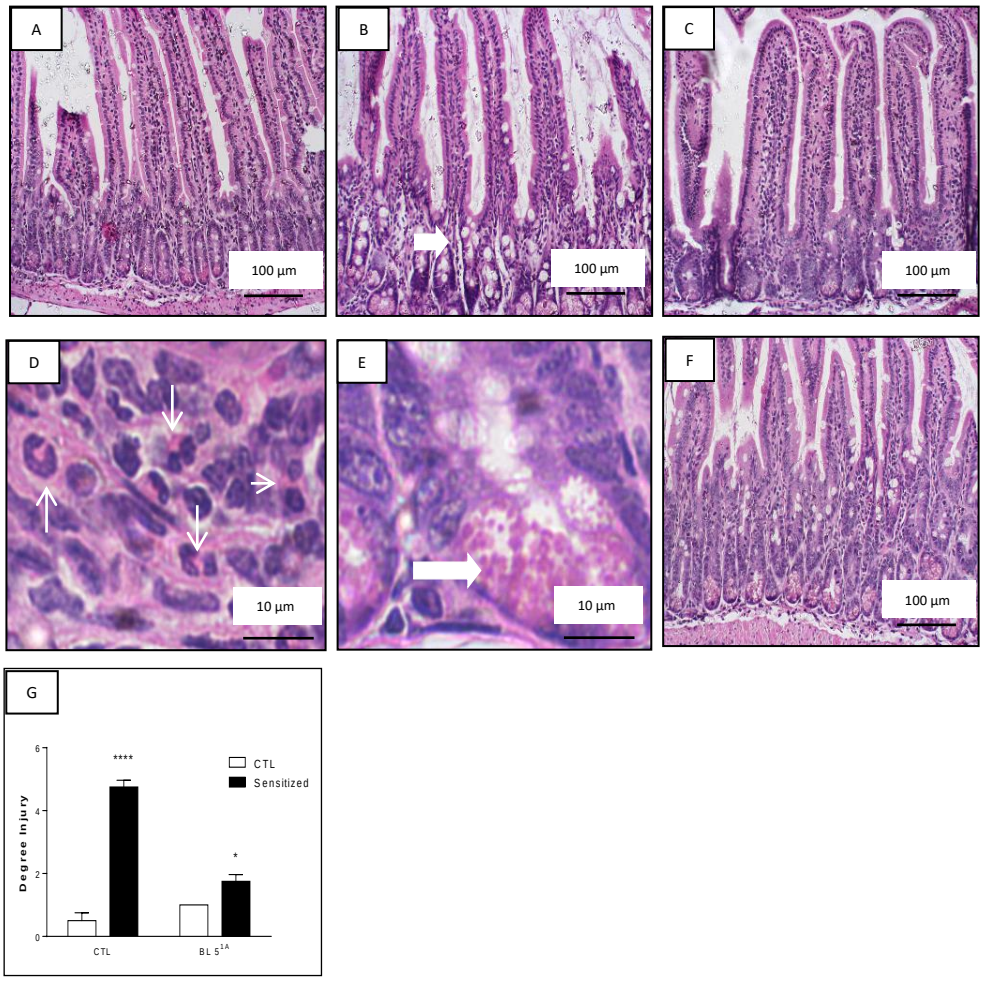


Figura 17. Análise histopatológica do intestino delgado de camundongos não tratados e não sensibilizados (A); camundongos tratados com *B. longum* 5^{1A} (B); camundongos sensibilizados com OVA (C, D e E); e camundongos tratados com *B. longum* 5^{1A} e sensibilizados com OVA (F), após desafio oral de OVA. (G) escore semi-quantitativo de lesão no intestino delgado de camundongos tratados com *B. longum* 5^{1A} ou não CTL com *B. longum* 5^{1A} e sensibilizados ou não. Flechas brancas finas apontam para eosinófilos, ponta de flecha curta e espessa para células caliciformes e ponta de flecha longa e espessa para células de Paneth. * indica diferença estatística em relação ao seu controle ($p < 0,05$; one-way ANOVA); **** indica diferença estatística em relação ao controle alérgico ($p < 0,05$; one-way ANOVA). H&E.

5.10 Análise da produção de muco

Responsável por revestir o intestino, a camada de muco produzida pelas células caliciformes, confere proteção e seletividade de substancias e micro-organismos através do epitélio. Na análise das lâminas coradas com a técnica de PAS, que evidencia o muco e as células caliciformes, observou-se que os camundongos alérgicos (Figura 18C) apresentaram aumento da quantidade de muco no lúmen intestinal, bem como aumento do número e tamanho das células caliciformes em comparação com os camundongos do grupo controle (Figura 18A), como já observado em estudos anteriores com esse modelo.

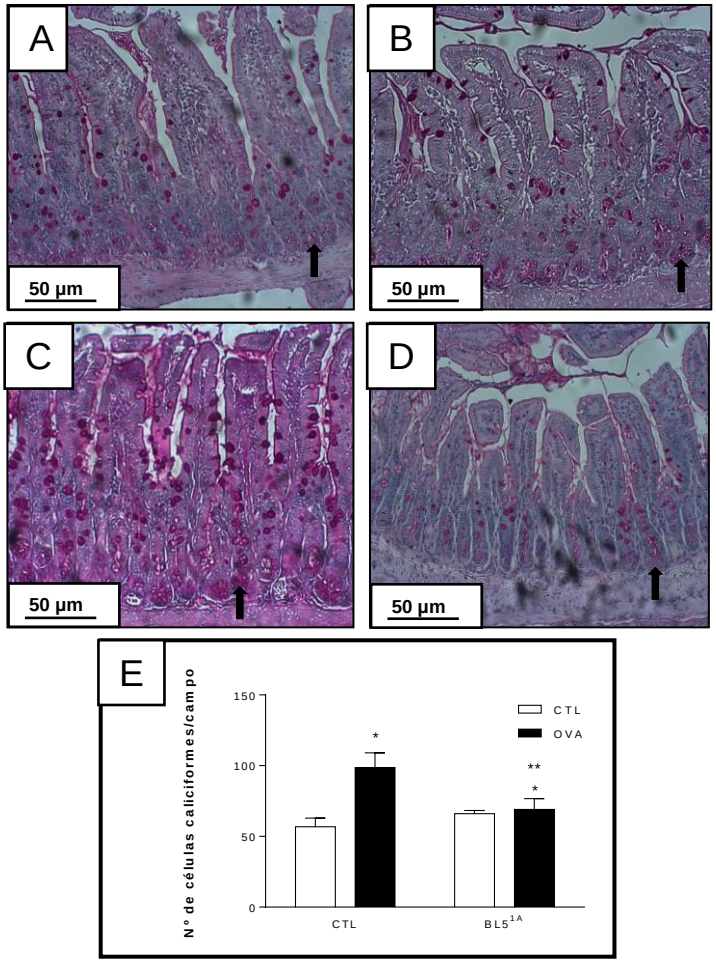


Figura 18- Fotomicrografias da histologia corada com PAS dos 4 grupos com aumento de 10X**.** Camundongos não tratados e não sensibilizados (A); camundongos tratados com *B. longum* 5^{1A} (B); camundongos sensibilizados com OVA (C); e camundongos tratados com *B. longum* 5^{1A} e sensibilizados com OVA (D), após desafio oral de OVA. Na figura E, a análise do número de células caliciformes por campo, realizada a partir de imagens capturadas na objetiva de 10X, de 5 campos aleatórios do jejuno proximal de cada animal. Flechas escuras apontam para células caliciformes e para células de Paneth. * indica diferença estatística em relação ao seu controle ($p < 0,05$; one-way ANOVA); ** indica diferença estatística em relação ao controle alérgico ($p < 0,05$; one-way ANOVA).

Na figura 18D pode-se observar que o tratamento com *B. longum* 5^{1A} promoveu a redução significativa do número de células caliciformes/campo, com consequente atenuação da produção de muco. A hiperprodução de muco pode ser considerada uma forma de defesa do epitélio intestinal para tentar atenuar a entrada de alérgenos e consequente aumento da inflamação (SALDANHA et al., 2004).

5.11 *Bifidobacterium longum* 5^{1A} diminui o influxo de eosinófilo e da quimiocina eotaxina-1 (CCL11) para o sitio primário da inflamação no modelo de alergia alimentar induzida por OVA

A EPO possui grande homologia com os eosinófilos, desempenhando também papel fundamental na lise de micro-organismos patogênicos; porém, sua liberação em massa, pode contribuir para a lesão de tecidos subjacentes ao foco inflamatório (O'BRIEN, 2000). Já a quimiocina CCL11 (eotaxina-1) é uma das responsáveis pela atração dos eosinófilos para o sítio da infecção, expressa em níveis elevados no epitélio intestinal e bastante presente nas doenças inflamatórias intestinais (DII). A dosagem da peroxidase eosinofílica reflete indiretamente o infiltrado de eosinófilos na mucosa intestinal, pois indica ativação destas células (HOLGATE & POLOSA, 2008).

No presente estudo, observou-se um aumento significativamente estatístico do influxo de eosinófilos (Figura 19A) nos animais sensibilizados em relação ao grupo controle, bem como na secreção da quimiocina Eotaxina (Figura 19B).

No grupo sensibilizado e tratado com a *B. longum* 5^{1A} na concentração de 10^8 UFC observou-se uma diminuição estatisticamente significativa da EPO e da Eotaxina em relação ao grupo alérgico sem tratamento (Figura 19A e B). *Bifidobacterium longum* 5^{1A} nessa concentração possui algum efeito anti-inflamatório que reduz o recrutamento dos eosinófilos.

A expressão da quimiocina CCL11 (eotaxina-1) confirmou as análises de EPO, demonstrando que nos grupos onde a atividade enzimática foi aumentada, os níveis da quimiocina foram também elevados.

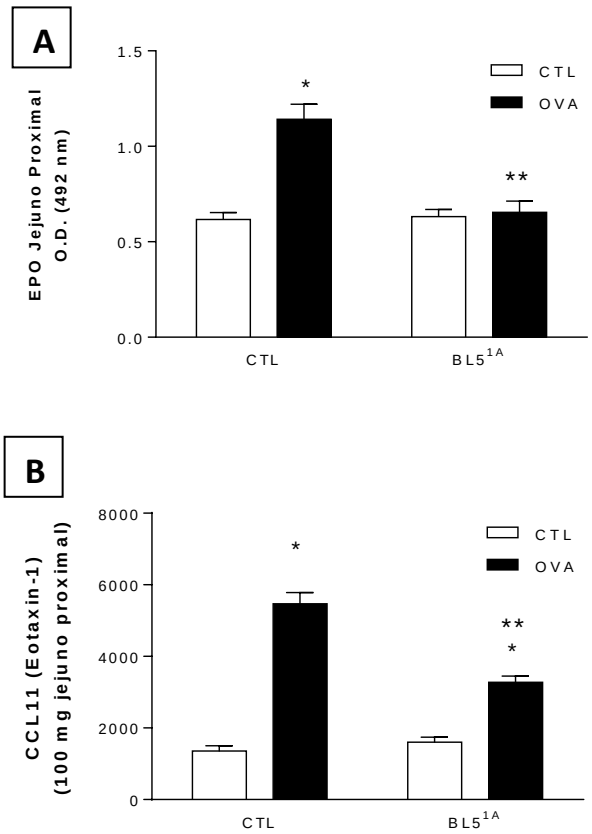


Figura 19. Avaliação das concentrações de EPO (A) e da atividade de CCL11/ Eotaxina-1 (B) no jejuno de animais dos seguintes grupos: camundongos controle (CTL / CTL); (BL 5^{1A} / CTL) camundongos tratados com *B. longum* 5^{1A}; camundongos (CTL / OVA) (sensibilizados) com OVA; (BL 51A / OVA) camundongos tratados com *B. longum* 5^{1A} e sensibilizados com OVA após desafio oral de OVA. Linhas verticais representam erro padrão. * indica diferença estatística em relação ao seu controle ($p < 0,05$; one-way ANOVA); ** indica diferença estatística em relação ao controle alérgico ($p < 0,05$; one-way ANOVA).

5.12 *Bifidobacterium longum* 5^{1A} diminui o influxo de neutrófilos e da quimiocina KC/CXCL-1 para o sitio primário da inflamação no modelo de alergia alimentar induzida por OVA

O papel dos neutrófilos durante os processos inflamatórios já é bem descrito na literatura, sendo um dos eventos essenciais para a proteção do organismo (LEY *et al*., 2007). O recrutamento dessa célula do sistema imune requer a participação de algumas quimiocinas responsáveis pela atração das mesmas ao sítio da infecção.

A quantificação da MPO foi feita de forma indireta a fim de mensurar o influxo de neutrófilos para o sítio inflamatório. A concentração da quimiocina KC/CXCL-1 também foi mensurada, já que é a principal quimiocina responsável pelo recrutamento dessas células de defesa (Figura 20). A quimiocina KC/CXCL-1

dosada nos camundongos, corresponde à citocina IL-8, tipicamente humana, desempenhando a mesma função de quimioatrair neutrófilos.

Os níveis de MPO no grupo tratado com a *B. longum* 5^{1A} foram significativamente reduzidos quando comparado ao grupo sensibilizado sem tratamento, este por sua vez, teve concentrações significativamente elevadas quando comparado ao grupo controle (Figura 20A). A quantificação da quimiocina KC/CXCL-1 (Figura 20B) corroborou com os dados da MPO, onde os seus valores foram reduzidos no grupo tratado com a *B. longum* 5^{1A} na concentração de 10^8 UFC em relação ao grupo sensibilizado sem tratamento.

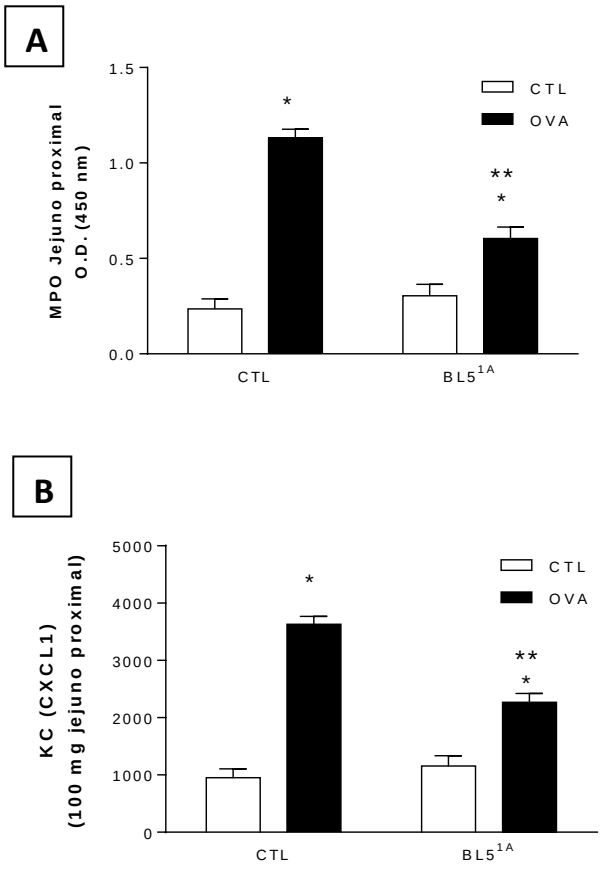


Figura 20. Avaliação das concentrações de MPO (A) e da atividade de KC (CXCL1) (B) no jejuno de animais dos seguintes grupos: camundongos controle (CTL / CTL); (BL 51A / CTL) camundongos tratados com *B. longum* 5^{1A}; camundongos (CTL / OVA) (sensibilizados) com OVA; (BL 5^{1A} / OVA) camundongos tratados com *B. longum* 5^{1A} e sensibilizados com OVA após desafio oral de OVA. Linhas verticais representam erro padrão. * indica diferença estatística em relação ao seu controle ($p < 0,05$; one-way ANOVA); ** indica diferença estatística em relação ao controle alérgico ($p < 0,05$; one-way ANOVA).

5.13 Avaliação das citocinas IL-4, IL-5, IL-6, TNF-α, IL-10 e IL-13 na alergia alimentar

O grupo sensibilizado que recebeu tratamento na dose de $1x10^8$ UFC da *B. longum* 5^{1A} apresentou nível significativamente menor de IL-4, quando comparado ao grupo sensibilizado que não receberau tratamento (Figura 21A). O tratamento com *B. longum* 5^{1A} também foi capaz de reduzir significativamente os níveis de IL-13 (Figura 21B) em animais alérgicos. Um aumento na expressão de IL-13 foi descrito em processos alérgicos após o desafio com antígeno, e esta citocina tem muita semelhança biológica e bioquímica com IL-4, devido a uma estrutura similar de seus receptores. Semelhante à IL-4, a IL-13 atua na síntese de linfócitos B e IgE, prolongando a sobrevida dos mastócitos nos tecidos e promovendo também o recrutamento seletivo de eosinófilos.

Como esperávamos, houve uma diminuição da produção de IL-5 no tecido investigado do grupo sensibilizado que recebeu tratamento na dose de $1x10^8$ UFC da *B. longum* 5^{1A} (Figura 21C), corroborando com Bae e colaboradores (1999) que sugere que essa citocina induz a infiltração eosinofílica na mucosa intestinal em modelos murinos de alergia alimentar. O aumento no número de eosinófilos na mucosa intestinal demonstrado previamente em nosso trabalho no grupo sensibilizado sem tratamento é semelhante ao aumento na produção da citocina IL-5 no grupo desafiado com a OVA.

As principais características observadas na alergia alimentar descrita por Delano e Moldawer (2006), é a perda de peso, perda de massa muscular, alterações do metabolismo e anemia. Essas características estão associadas a níveis elevados de TNF e IL-6 (CORCOS et al., 2003). Observou-se no presente estudo é que quando o grupo sensibilizado é tratado com a *B. longum* 5^{1A} na concentração de $1x10^8$ UFC, os níveis de TNF (Figura 21D) e IL-6 (Figura 21E) tem uma redução estatisticamente significativa quando comparado ao grupo sensibilizado sem tratamento.

Em nosso estudo, com a administração da *B. longum* 5^{1A} na dose de $1x10^8$ UFC foi possível observar um aumento significante na secreção de IL-10 (Figura 21F). Esse aumento nos níveis de IL-10 corrobora com estudos feitos por Zhang e colaboradores (2010), onde eles descrevem que em animais alérgicos tratados com uma Bifidobactéria, os níveis de IL-10 foram significativamente maiores em relação ao grupo não tratado.

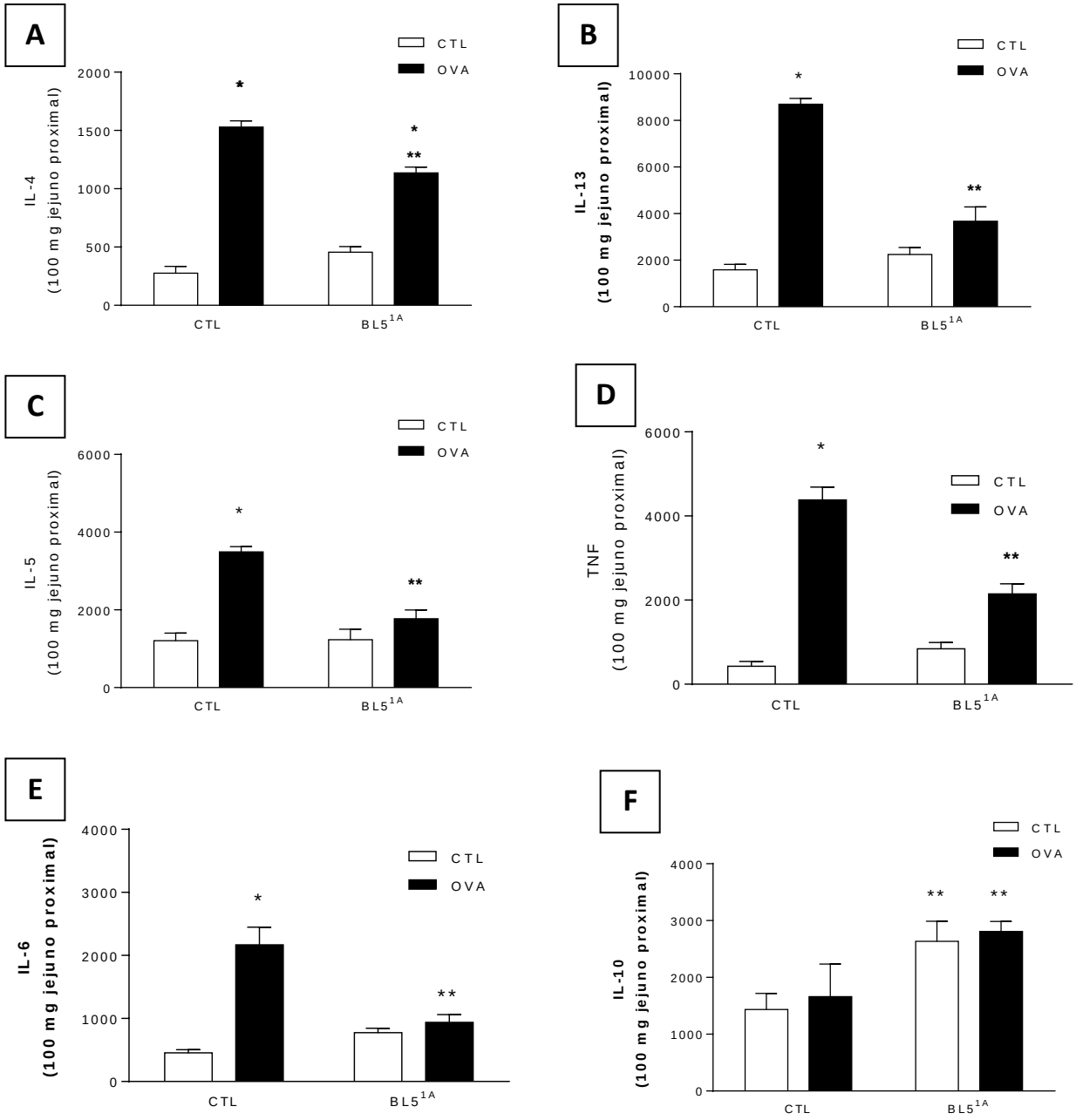


Figura 21. Avaliação da produção de citocinas. Níveis de IL-4 (A), IL-13 (B), IL-5 (C), TNF-α (D), IL-6 (E) e IL-10 (F) nos seguintes grupos: (CTL / CTL) camundongos controle; (BL 5^{1A} / CTL) camundongos tratados com B. longum 51A; camundongos (CTL / OVA) (sensibilizados) com OVA; (BL 5^{1A} / OVA) camundongos tratados com *B. longum* 5^{1A} e sensibilizados com OVA após desafio oral de OVA. Linhas verticais representam erro padrão. * indica diferença estatística em relação ao seu controle ($p < 0,05$; one-way ANOVA); ** indica diferença estatística em relação ao controle alérgico ($p < 0,05$; one-way ANOVA).

5.14 Avaliação da microbiota intestinal por método dependente de cultivo

Em condições normais, o hospedeiro e os micro-organismos comensais estabelecem uma relação simbiótica. Todavia, esta relação pode ser facilmente posta em risco por distúrbios da microbiota normal (alterações qualitativas e quantitativas da microbiota e alterações da sua atividade metabólica), resultando em efeitos negativos para o hospedeiro. Esta situação é conhecida como disbiose, podendo levar à inflamação e lesão do tecido da mucosa.

Neste modelo de alergia alimentar, na contagem das enterobactérias (Figura 22A) apesar de não ter sido demonstrado estatisticamente, houve uma redução desses micro-organismos quando administrado *B. longum* 5^{1A} em relação ao grupo alérgico, demonstrando que o probiótico é capaz de, numa disbiose, reduzir os níveis de enterobactérias.

No gênero *Enterococcus* (Figura 22B) houve uma redução estatisticamente significativa quando administrado o probiótico. Esse resultado pode demonstrar que a ação da bifidobactéria pode ser devido a alguma substancia secretada em sua parede.

Na contagem de anaeróbios totais (Figura 22C) não foi observado uma redução ou aumento com o uso da *B. longum* 5^{1A} nos grupos tratados. Observou-se na contagem de bactérias do ácido lático (Figura 22D) uma redução desse gênero no grupo sensibilizado e um aumento estatisticamente significativo quando administrado a *B. longum* 5^{1A}, um resultado importante, pois as bactérias desse gênero são benéficas ao hospedeiro e participam ativamente da modulação do sistema imune e proteção do epitélio intestinal.

No gênero *Staphylococcus* (Figura 22E) foi observado uma redução desse grupo de micro-organismos nos animais doentes que não receberam tratamento, já quando tratado com a *B. longum* 5^{1A} há um aumento significativo desse gênero. Uma hipótese para esse resultado seria posteriormente avaliar qual tipo de *Staphylococcus* está envolvido nesse processo, uma vez que diante de certas patologias há a predominância de certo gênero em relação ao outro.

Inversamente, a contagem de levedura (Figura 22F), apesar de não ter apresentado diferença estatística significativa, aumentou no grupo doente que não recebeu o tratamento, e quando tratado com a *B. longum* 5^{1A} essa contagem

diminuiu. Essa relação inversa entre o gênero *Staphylococcus* e as leveduras pode estar relacionada.

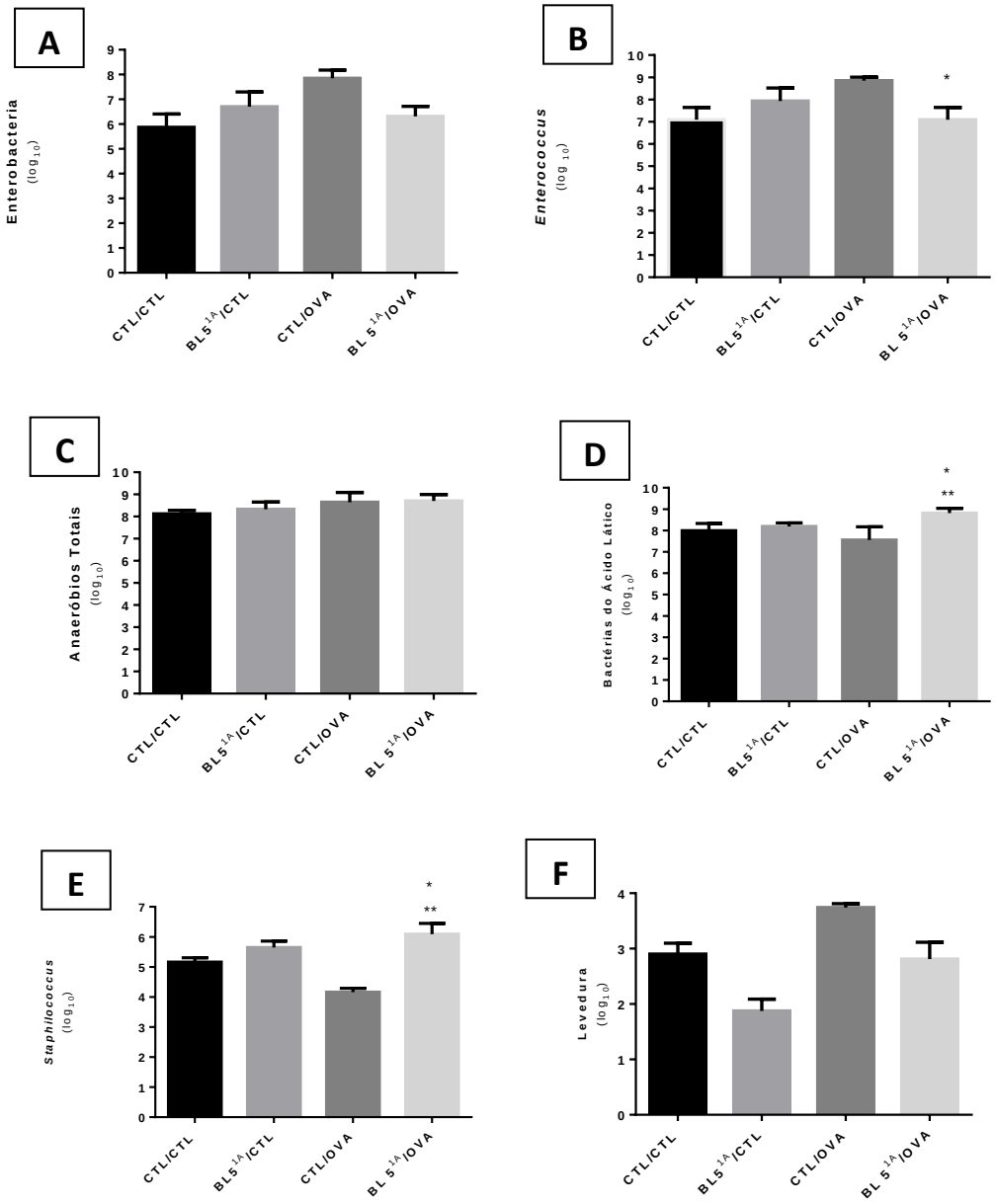


Figura 22: Avaliação da microbiota intestinal (A: Enterobactéria, B: *Enterococcus*, C: Anaeróbios totais, D: bactérias do ácido láctico, E: *Staphylococcus* e F: Levedura) após desafio com ração contendo OVA tratada com *B. longum* 5^{1A} na dose de $1x10^8$, UFC /mL nos seguintes grupos: camundongos controle (CTL / CTL); (BL 5^{1A} / CTL) camundongos tratados com *B. longum* 5^{1A}; camundongos (CTL / OVA) (sensibilizados) com OVA; (BL 5^{1A} / OVA) camundongos tratados com *B. longum* 5^{1A} e sensibilizados com OVA após desafio oral de OVA. Linhas verticais representam erro padrão. * indica diferença estatística em relação ao seu controle ($p < 0,05$; one-way ANOVA); ** indica diferença estatística em relação ao controle alérgico ($p < 0,05$; one-way ANOVA).

5.15 Efeito do tratamento B. *longum* 5^{1A} sobre a leucopenia induzida por OVA

No presente estudo, realizamos a contagem total de eosinófilos, monócitos, linfócitos e segmentados da medula e, em seguida, a contagem diferencial celular. Os resultados mostraram um padrão linear na contagem dessas células, sendo que apenas os eosinófilos tiveram sua contagem reduzida (Figura 23A) quando administrado a B. *longum* 5^{1A} comparado ao grupo alérgico controle**.**

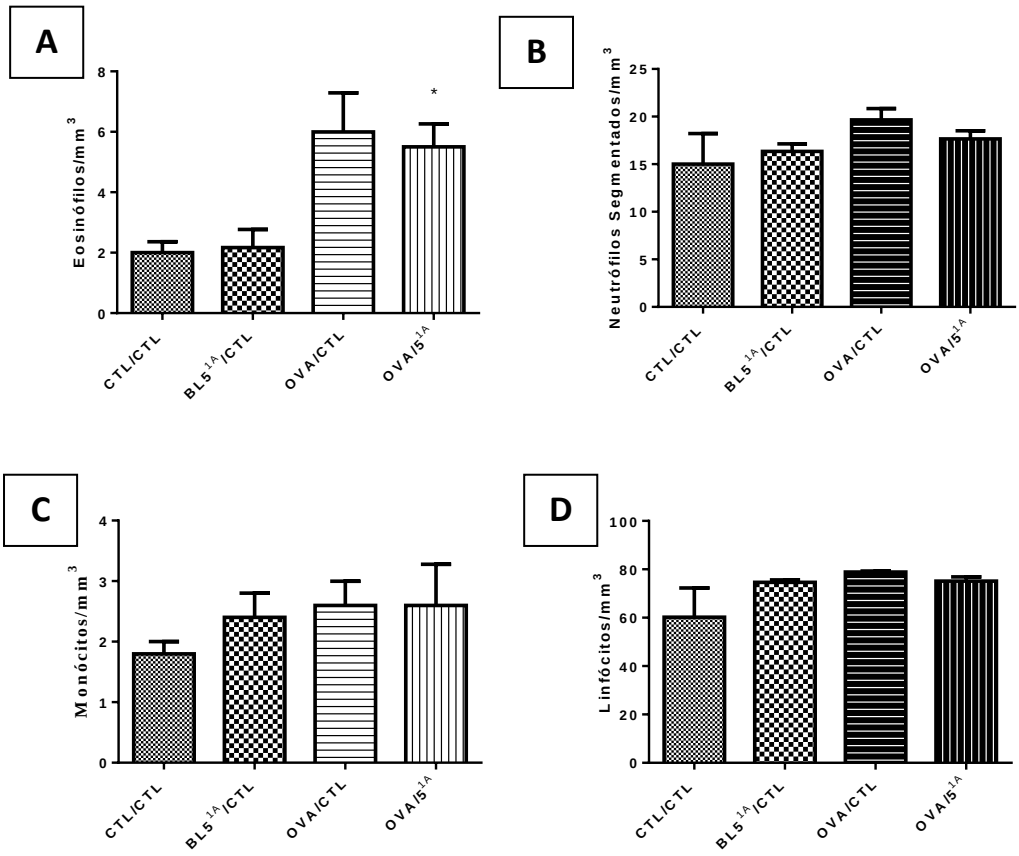


Figura 23: Contagem total e diferencial de leucócitos em camundongos tratados com *B. longum* 51A na alergia alimentar induzida por OVA. A análise estatística realizada foi ANOVA one-way 10 seguido do teste Newman-Keuls. Os valores de $p<0,05$ foram considerados significativos Grupos: CTL/CTL: Controle, 5^{1A}/CTL: *B. longum* 5^{1A}, OVA/CTL: Alérgico, OVA/5^{1A}: Alérgico tratado com *B. longum* 5^{1A}

Um dos mecanismos da alergia alimentar é aumentar os níveis de eosinófilos corroborando assim com os resultados de EPO demonstrado nesse estudo. Apesar de não apresentar diferença estatística significativa nas contagens de monócitos, linfócitos e segmentados, o tratamento reduziu o número dessas células quando comparados aos animais do grupo alérgico sem tratamento. Outros estudos

necessitam ainda serem realizados a fim de elucidar a relação da alergia alimentar e a modificação do número de células de defesa.

AVALIAÇÃO DO PAPEL DO ACETATO

5.16 Avaliação do consumo de ração, desenvolvimento ponderal, permeabilidade intestinal, níveis de IgE e sIgA na alergia alimenta a OVA, avaliando se o efeito probiótico da *B. longum* 5^{1A} é via produção de acetato

No sistema imune, AGCC possuem diversos efeitos anti-inflamatórios, mas também são importantes na estimulação da função imune, e seu papel parece ser importante para a regulação temporal das respostas imunes e na resolução da inflamação. O acetato é o AGCC produzido em maior quantidade durante a fermentação da pectina e é capaz de induzir efeitos fisiológicos benéficos localmente e sistemicamente, dentre os quais se destacam a modulação da microbiota intestinal e a resposta imune (KRANICH et al. 2011). Esse AGCC leva a um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e da fagocitose, mas também pode induzir apoptose e modula o recrutamento de neutrófilos (MASLOWSKI & MACKAY 2011). Os AGCC também diminuem o dano oxidativo ao DNA e regulam a produção de citocinas.

Objetivou-se avaliar se os efeitos probiótico da administração oral de *B. longum* 5^{1A} demonstrados neste trabalho seriam pela via do acetato.

Na avaliação dos sinais clínicos, observou-se que o acetato não preveniu a perda de peso nos grupos alérgicos em comparação ao grupo que recebeu a *B. longum* 5^{1A} e ao grupo alérgico sem tratamento (Figura 24A).

O acetato também não foi capaz de reverter a aversão alimentar nos grupos alérgicos (Figura 24B). Os efeitos da *B. longum* 5^{1A} demonstram não ter relação com a via de acetato, uma vez que a permeabilidade intestinal também não foi preservada quando administrado esse AGCC em animais alérgicos (Figura 24C). O acetato também não conseguiu reduzir os níveis de IgA e IgE (Figura 24 D) que é a principal imunoglobulina envolvida em processos alérgicos, consequentemente, todos os outros parâmetros analisados tiveram seus níveis alterados quando condicionados a alergia experimental.

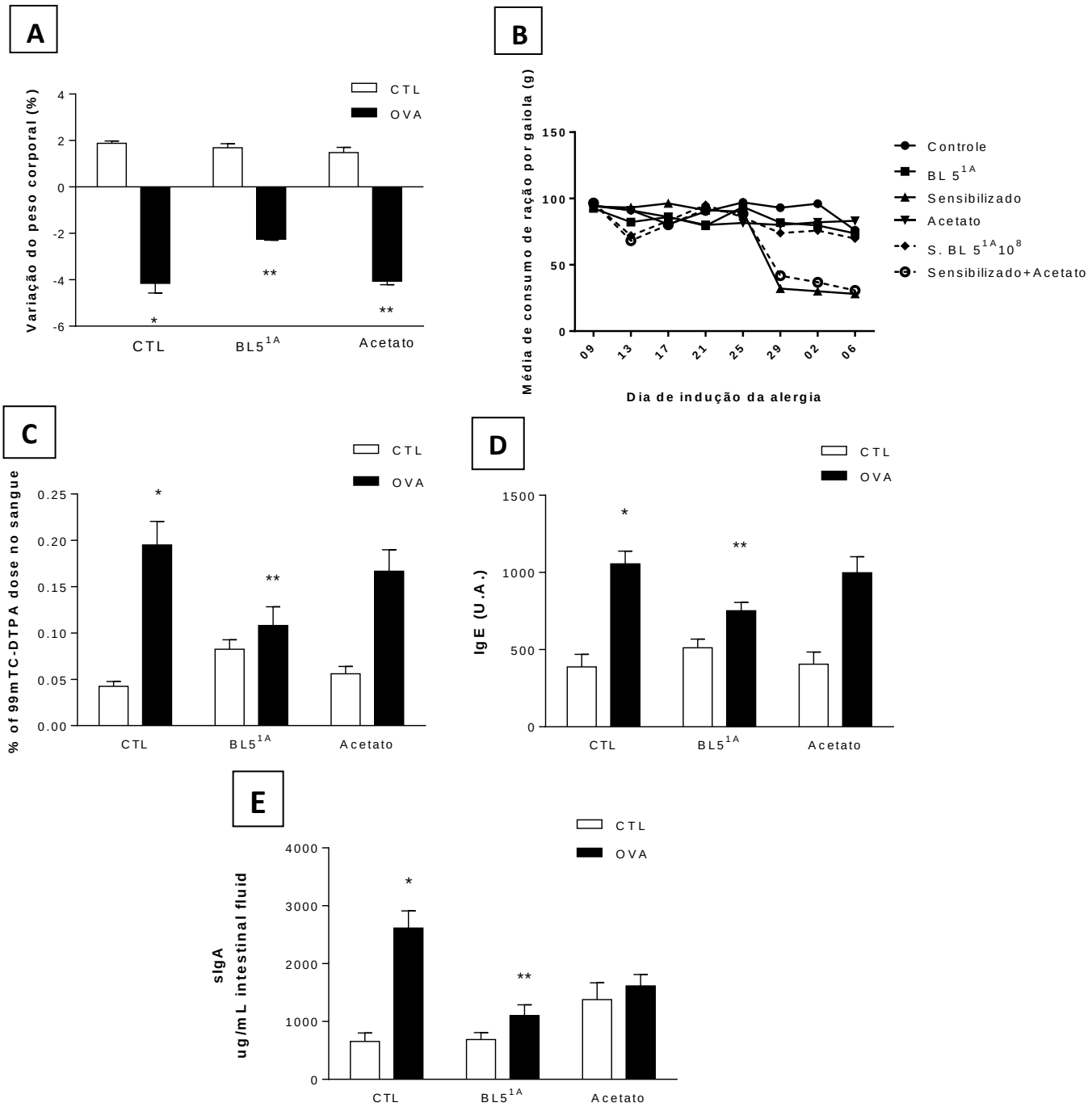


Figura 24. Avaliação dos parâmetros clínicos e imunológicos da *B. longum* 5^{1A} via produção de acetato. **A:** variação do peso corporal, **B:** média do consumo de ração, **C:** permeabilidade intestinal, **D:** níveis de IgE, **E:** níveis de sIgA. * indica diferença estatística em relação ao seu controle (p <0,05; one-way ANOVA); ** indica diferença estatística em relação ao controle alérgico (p <0,05; one-way ANOVA).

Nosso grupo está envolvido no estudo e desenvolvimento de micro-organismos probióticos por mais de uma década, e, dentre eles, *B. longum* 5^{1A} apresentou uma incrível variedade de características probióticas. Em particular, *B. longum* 5^{1A} demonstrou ser eficaz na redução da inflamação na gota experimental e no controle da asma induzida pela ovalbumina em modelos murinos (VIEIRA et al., 2015; MENDES et al., 2017).

O principal marcador para reações de hipersensibilidade imediata, conhecido como alergia ou atopia, é o aumento da produção IgE (ISHIZAKA & ISHIZAKA, 1978). A IgE é uma proteína que desempenha um papel primordial nas reações alérgicas IgE-dependentes. A partir da interação da IgE específica para o determinado antígeno com mastócitos e basófilos por meio dos receptores FcεRI, ocorre a degranulação dessas células, culminando na liberação dos mediadores inflamatórios e consequente desencadeamento dos sintomas alérgicos (VIEIRA et al., 2015; MENDES et al., 2017).

. Estudos realizados por Saldanha e colaboradores (2004) mostraram que camundongos BALB/c, ao serem sensibilizados no dia zero com uma injeção subcutânea de salina contendo OVA, seguindo de reforço imunológico no dia 14 e desafio no dia 21 com a exposição por via oral à OVA até o final do experimento, apresentaram altos níveis de IgE no soro. Além disso, animais que não foram sensibilizados, mas que receberam ou não OVA por via oral apresentaram níveis baixos de IgE anti-OVA. No presente estudo, o desafio oral e a sensibilização com OVA induziu concentrações aumentadas de IgE anti-OVA no soro, que foi inibido quando tratado com *B. longum* 5^{1A} na dose de 10^8 UFC/mL.

Segundo Bernardo e colaboradores (2013), os probióticos agem preservando a permeabilidade intestinal e aumentando a resistência da mucosa contra o trânsito de bactérias e suas toxinas, modificando a resposta do hospedeiro em relação aos produtos microbianos, aumentando a resposta das mucosas via produção de sIgA, produzindo substâncias bactericidas e excluindo competitivamente os patógenos em potencial.

Em outro método para avaliação da permeabilidade que não o utilizado neste trabalho, mas que vale ser ressaltado, Huang e colaboradores (2010) analisaram, em um modelo murino de alergia a OVA, a permeabilidade utilizando o Isotiocianato de fluoresceína (FITC), em animais tratados com um preparado de probióticos e observou-se que a quantidade do FITC encontrada no sangue dos animais

sensibilizados foi maior em relação ao grupo controle, e quando administrado os probióticos a quantidade de FITC foi reduzida na corrente sanguínea, demonstrando assim que alguns probióticos são muito eficazes na contensão de proteínas para o interstício e na manutenção da integridade do epitélio intestinal. Diversos estudos têm demonstrado a eficácia dos probióticos no controle da permeabilidade intestinal. Generoso e colaboradores (2010) observaram efeito protetor do epitélio intestinal pelo potencial probiótico de *S. cerevisiae* UFMG A-905 usando a mesma técnica de avaliação da permeabilidade do nosso estudo em um modelo murino.

Em camundongos não tratados com a *B. longum* 5^{1A}, a indução de alergia alimentar também induziu aumento da permeabilidade, que está associada à descamação da mucosa intestinal e ao relaxamento das junções intercelulares (STONE, PRUSSIN & METCALFE, 2010). A ingestão de macromoléculas como a ovalbumina agrava ainda mais a reação alérgica, induzindo a liberação de histamina e mediadores lipídicos que promovem aumento da permeabilidade vascular levando ao desequilíbrio eletrolítico, com perda de íons e água, causando diarreia (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

A quebra da integridade do epitélio intestinal pode envolver histamina de mastócitos (BISCHOFF, 2009) e serotonina de células de enterocromafins (BISCHOFF et al., 2009). Além disso, em camundongos alérgicos, foi observada a presença de TNF, o que pode estar associado ao aumento da taxa de disseminação celular e ao aumento da permeabilidade (KIESSLICH et al., 2007). Haub et al. (2010) demonstraram o papel da IL-10 na permeabilidade intestinal por deleção do transportador de recaptação de serotonina. Como notado neste estudo, a administração oral de *B. longum* 5^{1A} foi capaz de induzir a produção intestinal de IL-10, restaurar a permeabilidade intestinal, prevenir dano inflamatório tecidual e produção de níveis de TNF intestinal em camundongos alérgicos à OVA. Tal achado foi observado em outros estudos em modelos de mucosite com o uso de outros probióticos (JUSTINO et al., 2014 e BASTOS et al., 2016) sendo que, em nossos estudos, pode estar envolvido na redução de níveis específicos de IgE induzida por *B. longum* 5^{1A}. Além das alterações funcionais, podemos observar alterações morfológicas nos processos alérgicos.

Em estudos realizados por Dourado e colaboradores (2011), foi possível observar alguns sinais clínicos de processos alérgicos como perda de peso e diminuição no consumo de ração em animais sensibilizados com OVA. É bastante

clássica a perda de peso em camundongos BALB/c sensibilizados com OVA, seja pela aversão ao consumo de ração, interferência de fatores imunológicos, metabólicos ou endócrinos (SALDANHA et al., 2004). Este processo pode estar relacionado à memória de um estímulo nocivo que desencadeia aumento da ansiedade e, assim, o animal para de comer como tentativa de cessar os sintomas desencadeados pela alergia (CARA et al., 1994 e 1997, COSTA-PINTO et al., 2005; COSTA-PINTO et al., 2007; FARIA et al., 2013,).

Em estudo realizado por Kim e colaboradores (2008), utilizando *Bifidobacterium lactis* e *Lactobacillus acidophilus*, os animais sensibilizados tratados com o probiótico *L. acidophilus* tiveram uma perda de peso igual aos animais sensibilizados que não receberam tratamento; já os animais sensibilizados que receberam o probiótico *B. lactis* e o mix com os dois probióticos, apresentaram uma manutenção e ganho de peso a partir da quarta semana experimental.

Alguns estudos relacionam a perda de peso a níveis elevados de algumas citocinas como, por exemplo, a IL-6 e TNF. Delano e Moldawer (2006) observaram que animais alérgicos além do aumento dessas citocinas apresentam uma diminuição do tecido adiposo e aparência bastante debilitada logo após o desafio com o antígeno corroborando assim com os resultados obtidos em nosso estudo.

Como esperado no presente estudo, a perda de peso corporal e a redução no consumo de ração após a exposição ao antígeno foram observadas no grupo sensibilizado.

A redução no consumo de ração e consequente perda de peso são fenômenos que já foram estudados e estão fortemente relacionados ao aumento dos níveis séricos de IgE, desconforto intestinal causado por diarreia e sangramento (CARA et al., 1994; DOURADO et al., 2010). No entanto, quando tratado com *B. longum* 5^{1A}, a perda de peso foi reduzida e o consumo de alimento foi mantido, de forma dose-dependente.

Uma estratégia intestinal chave para gerar a proteção imunitária de uma forma não inflamatória é a produção de IgA, o isótipo do anticorpo mais abundante no nosso corpo (MACPHERSON et al., 2008). A IgA promove exclusão imune por aprisionamento de antígenos alimentares e micro-organismos no muco, modulando a expressão de epítopos bacterianos sobre bactérias comensais pró-inflamatórias e, em geral, promove a manutenção das comunidades bacterianas adequadas em segmentos intestinais específicos (FAGARASAN et al., 2002). A IgA pode, ainda,

participar na homeostase imune intestinal, interagindo com a microbiota local (MACPHERSON & HARRIS, 2008). Ratos mantidos em condições livres de germes que não possuem a microbiota intestinal têm valores reduzidos de IgA no intestino, sugerindo uma correlação direta entre essa imunoglobulina e a microbiota comensal.

Os camundongos sensibilizados com OVA apresentaram níveis de sIgA estatisticamente maiores quando comparados aos animais controle. Os grupos sensibilizados tratados nas doses de $1x10^8$ e $1x10^6$ UFC/mL de *B. longum* 5^{1A} apresentaram níveis significativamente menores de sIgA (semelhante ao grupo controle) quando comparados aos grupos sensibilizados não tratados.

Quando realizada a análise histopatológica do intestino delgado dos camundongos sensibilizados, observou-se a presença de infiltrados inflamatórios e aumento da lâmina própria, quando comparado aos camundongos CTL. Estas características são típicas de uma inflamação intestinal após desafio oral com OVA. O grupo controle tratado apenas com *B. longum* 5^{1A} mostrou um ligeiro aumento no número de células caliciformes. Vários estudos têm demonstrado uma hiperprodução de muco pelas células caliciformes em processos alérgicos (DOURADO et al., 2010; SALDANHA et al., 2004).

Quando os camundongos foram sensibilizados e tratados com *B. longum* 5^{1A}, observamos proteção do epitélio intestinal, como demonstrado pela preservação das vilosidades, bem como por camadas serosa e muscular dispostas regularmente, sem infiltração celular.

Outra característica importante da alergia alimentar a OVA, comprovada por testes bioquímicos, é o aumento de infiltrados de eosinófilos e neutrófilos na mucosa intestinal de grupos alérgicos quando comparado aos grupos controle. O grande infiltrado de eosinófilos e neutrófilos é também observado em outros tipos de doenças como a asma, resultante de reações alérgicas tardias e contribuindo para muitos processos patológicos em doenças de hipersensibilidade imediata (LUKACS, 2001). Os eosinófilos estão ativamente presentes no processo inflamatório intestinal, induzindo produção de citocinas pró-inflamatórias e CCL11/Eotaxina-1, que possuem propriedades antibacterianas (VIEIRA, 2009), enquanto o recrutamento de neutrófilos aumenta a produção de quimiocinas pela modificação da permeabilidade intestinal (TURNER, 2009). Em estudo realizado por Saldanha e colaboradores (2004) foi observado o aumento do infiltrado de eosinófilos durante o período de ingestão do antígeno em um modelo murino de alergia alimentar.

Porém o recrutamento de eosinófilos depende de outras citocinas, como descrito em estudos feitos por Scapini e colaboradores (2000), o que não permite afirmar que o probiótico impediu o recrutamento somente pela inibição de CCL11.

Eosinófilos são células que possuem a habilidade de realizar várias funções imunes, incluindo a apresentação de antígenos (MACKENZIE et al., 2011) e exacerbação das respostas inflamatórias pela capacidade de liberar citocinas e mediadores lipídicos (GLEICH & ADOLPHSON, 1986; WELLER, 1994).

A MPO, enzima presente nos grânulos azurófilos do citoplasma dos neutrófilos ativados, é responsável pela destruição dos micro-organismos fagocitados, quebrando os mesmos em pequenos fragmentos (NAUSEEF, 2007). Os neutrófilos são uma das principais células responsáveis pelas lesões e disfunções associadas às inflamações da mucosa intestinal (KUCHARZIK *et al*., 2001).

Níveis aumentados de neutrófilos, eosinófilos, CXCL1/KC e CCL11/Eotaxina-1 na mucosa jejunal de camundongos sensibilizados foram observados, e esses achados podem explicar o dano histológico e o aumento da permeabilidade intestinal observada nesse grupo. O efeito benéfico do tratamento com *B. longum* 5^{1A} foi confirmado pelos níveis reduzidos de MPO, EPO e quimiocinas encontrados na mucosa intestinal de animais tratados com o probiótico.

Estudos sugerem que a redução nos níveis de IL-4 deve ser o principal mecanismo do probiótico, uma vez que a redução dessa citocina juntamente com a IL-13 também diminuirá a IgE. A IL-4 produzida pelos linfócitos T é essencial para o desenvolvimento de linfócitos envolvidos na resposta do tipo Th2, enquanto a IL-4 liberada pelos mastócitos e basófilos pode amplificar as respostas já estabelecidas deste tipo (ROMAGNANI, 2000). Cardoso e colaboradores (2009) descreveram a IL-4 como uma citocina que está associada à alergia alimentar pelo fato de induzir a produção de IgE pelas células B. Segundo Romagnani e colaboradores (2000), a IL-4 também contribui com o aumento da adesão dos eosinófilos ás células endoteliais promovendo sua infiltração nos sítios inflamatórios. Quando analisados neste estudo, os níveis de IL-4 estiveram aumentados no intestino de animais sensibilizados em comparação com os níveis basais em animais CTL. Este aumento era esperado devido ao uso de hidróxido de alumínio como adjuvante na imunização dos animais, uma vez que este composto induz a produção de IgE através de um mecanismo dependente de IL-4 (FAQUIM & MACEDO, 2000). Quando os animais alérgicos receberam *B. longum* 5^{1A}, a secreção de IL-4 foi reduzida, novamente

demonstrando seu efeito protetor frente o processo inflamatório. O nosso trabalho corrobora com estudos feitos por Huang e colaboradores (2010), nas quais foi possível observar uma redução significativa nos níveis da IL-4 em relação aos animais não tratados, em dosagens de cultura celulares de baço e linfonodos de animais sensibilizados com OVA que receberam probióticos como tratamento. Em 2011, Santos observou em seus estudos que animais tratados com a bactéria *Lactococcus lactis*, tiveram uma redução da IL-4 em relação ao grupo de animais que não receberam a bactéria, demonstrando assim o importante papel dos probióticos na regulação das respostas Th1 e Th2.

O tratamento com *B. longum* 5^{1A} foi capaz de reduzir, significativamente, também, os níveis de IL-13 em animais alérgicos. Um aumento na expressão de IL-13 foi descrito em processos alérgicos após o desafio com antígeno, e esta citocina tem muita semelhança biológica e bioquímica com IL-4, devido a uma estrutura similar de seus receptores. Semelhante à IL-4, a IL-13 atua na síntese de linfócitos B e IgE, prolongando a sobrevida dos mastócitos nos tecidos e promovendo também o recrutamento seletivo de eosinófilos. Com a redução dessas duas citocinas (IL-4 e IL-13), consequentemente, menos mastócitos serão degranulados, reduzindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias IL6 e TNF. Delano e Moldawer (2006) relataram que as alterações associadas à caquexia incluem anorexia, perda de peso corporal, perda de massa muscular e lipídica, anormalidades metabólicas e anemia. Em pacientes com câncer, a perda de peso está associada a níveis elevados de TNF e IL-6 (CORCOS et al., 2003). Os altos níveis dessas citocinas levam a um quadro clínico semelhante ao observado em nosso modelo, não apenas pela perda de peso corporal, mas também pela aparência enfraquecida e diminuição do tecido adiposo observado em animais alérgicos (DELANO & MOLDAWER, 2006).

Em nosso estudo, observamos um aumento significativo de TNF e IL-6 após a ingestão de antígeno por animais sensibilizados e, uma vez tratados com *B. longum* 5^{1A}, os níveis dessas citocinas foram reduzidas. Embora os mecanismos que levam a esta situação não sejam claros, há uma grande quantidade de evidências sugerindo o envolvimento de vários fatores neurológicos, metabólicos, imunológicos e endócrinos (PLATA-SALAMÁN, 2000). Outra análise importante neste estudo foi a redução da IL-5 nos grupos tratados com o probiótico. Produzida pelos mastócitos sobre o estimulo de outras citocinas, a IL-5 tem a capacidade de atrair eosinófilos para o sitio inflamatório (ROMAGNANI, 2000). Vários trabalhos vêm demonstrando

que animais alérgicos a OVA submetidos a tratamentos com diversos probióticos obtiveram uma diminuição significativa da secreção de IL-5 nos grupos tratados (SCHIAVI et al., 2011).

A redução da IL-5 corrobora com a diminuição do número de eosinófilos já demonstrados nesta discussão. Quando os linfócitos Th2 estimulados produzem citocinas, como a IL-5, há aumento da produção de eosinófilos na medula óssea que são subsequentemente liberados na corrente sanguínea e atraídos para locais de inflamação por fatores quimiotáticos, como a eotaxina. Uma vez instalados, esses granulócitos liberam mediadores citotóxicos, como proteína básica maior, proteína catiônica eosinófílica e peroxidase, além de outros mediadores inflamatórios.

Esses compostos aumentam a permeabilidade vascular e a produção de muco e atuam com células apresentadoras de antígenos, promovendo o aumento de células Th2 em tecidos inflamados, exacerbando o processo inflamatório (LUKACS, 2001; HOGAN et al., 2000; ROTHENBERG, 2001; SHI, 2004). Como esperado, houve um aumento na produção de IL-5 no grupo sensibilizado, uma vez que foi sugerido que essa citocina pode induzir infiltração eosinófílica na mucosa intestinal em modelos murinos de alergia alimentar (BAE et al., 1999). No grupo que recebeu *B. longum* 5^{1A} como tratamento, os níveis dessa citocina foram reduzidos.

Após a demonstração da eficácia de *B. longum* 5^{1A} na redução de várias citocinas envolvidas no processo alérgico, foi analisada a citocina IL-10, principal citocina reguladora em processos inflamatórios. A IL-10 tem um caráter anti-inflamatório e sua elevação caracteriza uma tentativa de resolver o processo inflamatório. Como descrito por Hawrylowicz & O'Garra 2005, não apenas produzido por células Th2, mas também por células Th1, macrófagos, células T, entre outros, a IL-10 é uma citocina que inibe a produção de outras citocinas pró-inflamatórias. Com a capacidade de modular funções celulares em várias doenças, bem como na alergia alimentar, a IL-10 tem a capacidade de inibir a ativação de células Th2 e, consequentemente, inibe a função de eosinófilos, mastócitos e troca de isótipo por IgE pelas células B. Como era imaginado, neste estudo com a administração de *B. longum* 5^{1A}, foi demonstrado um aumento significativo na secreção de IL-10. Esse aumento nos níveis de IL-10 corrobora com o estudo de Zhang et al. (2010), que observaram em animais alérgicos tratados com uma linhagem de *Bifidobacterium*, que os níveis de IL-10 eram significativamente maiores quando comparados ao grupo não tratado. Hawrylowicz e O'Garra (2005) também descreveram em seu

estudo uma relação inversa entre os níveis de IL-10 e a gravidade das doenças alérgicas. Uma possível hipótese do mecanismo de *B. longum* 5^{1A} pode estar associada à indução da produção de IL-10 como uma resolução do processo inflamatório na alergia.

Mais de 99% da microbiota intestinal é composta por espécies que fazem parte de quatro filos bacterianos: Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria e Actinobacteria. No intestino delgado proximal prevalecem espécies Gram-positivo e aeróbicas; enquanto na porção distal predominam as espécies Gram-negativo anaeróbias obrigatórias. O cólon é a região do TGI mais densamente povoada por bactérias (principalmente nos gêneros *Bacteroides, Bifidobacterium, Fusobacterium, Clostridium* e *Peptostreptococus*) (JANDHYALA, 2015). Em condições normais, os micro-organismos hospedeiros e comensais estabelecem uma relação simbiótica. No entanto, essa relação pode ser facilmente comprometida por distúrbios da microbiota normal (alterações qualitativas e quantitativas da microbiota e mudanças em sua atividade metabólica), resultando em efeitos negativos no hospedeiro. Esta condição é conhecida como disbiose, que pode levar à inflamação e lesão do tecido da mucosa.

Na alergia alimentar, que também resulta numa inflamação do epitélio intestinal, a proporção de micro-organismos hospedeiros pode ser modificada, resultando no aumento da permeabilidade intestinal, uma vez que o intestino se torna menos seletivo para absorver algumas substâncias. Pouco descrita e desconhecida, a relação entre a microbiota e a alergia alimentar ainda requer uma grande quantidade de pesquisas para desvendar os mecanismos envolvidos nesse processo. Neste modelo de alergia alimentar, o número de enterobactérias, embora não estatisticamente demonstrado, foi reduzido quando administrada a concentração de 10^8 UFC/mL de *B. longum* 5^{1A} em relação ao grupo controle, demonstrando que o probiótico é capaz, na disbiose, de reduzir os níveis de enterobactérias.

No gênero *Enterococcus* houve redução estatisticamente significativa quando administrado o probiótico a 10^8 UFC. Este resultado pode demonstrar que a ação das bifidobactérias pode ser devida a algo secretado por ela ou alguma função em sua parede. Na contagem anaeróbia total não houve redução ou aumento com o uso de *B. longum* 5^{1A} nos grupos tratados. Uma redução no grupo sensibilizado foi observada na contagem de bactérias lácticas e um aumento estatisticamente significativo quando administrado a *B. longum* 5^{1A}.

As bactérias deste gênero são benéficas para a saúde do hospedeiro e participam ativamente da modulação do sistema imunológico e da proteção do epitélio intestinal. No gênero *Staphylococcus* observou-se uma redução desse grupo de micro-organismos em animais doentes que não receberam tratamento, e quando tratados com *B. longum* 5^{1A} houve um aumento significativo. Uma perspectiva para esse resultado seria avaliar posteriormente qual tipo de *Staphylococcus* está envolvido nesse processo, pois em determinadas patologias há predomínio de um gênero em relação ao outro.

Por outro lado, a contagem de leveduras, embora não significativa, aumentou no grupo de animais não tratados e quando tratados com *B. longum* 5^{1A}, essa contagem diminuiu. Essa relação inversa entre o gênero *Staphylococcus* e as leveduras pode estar relacionada.

Os resultados sugerem que a *B. longum* 5^{1A} teria a capacidade de atuar não só reduzindo os sintomas da alergia alimentar, mas também acelerando a recuperação dos animais.

O presente trabalho demonstrou que a administração oral de *B. longum* 5^{1A} promove um efeito probiótico, dose-dependente e que depende da viabilidade da bactéria. Esse efeito probiótico pode estar associado a manutenção do peso e do consumo de ração nos animais tratados com a bífido; a proteção da integridade do epitélio intestinal e manutenção da permeabilidade; a redução da síntese de IgE; a capacidade de restaurar a secreção de sIgA no epitélio intestinal para os níveis basais; a redução dos níveis de EPO, MPO e seus respectivos quimioatraentes nos animais alérgicos; a redução da secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 e TNF) e ao aumento da citocina anti-inflamatória IL-10; a modificação da microbiota intestinal e na contagem diferencial celuar.

A *Bifidobacterium longum* 5^{1A} tem um efeito protetor clínico, imunológico e também na mucosa de animais com alergia a OVA. Os dados apresentados auxiliarão novas investigações que poderão contribuir para o desenvolvimento de novas formas de tratamento visando promover o bem-estar dos pacientes que são acometidos pela alergia alimentar.

ABBAS, A. K. E A. H. Lichtman. Imunologia celular e molecular. Rio de Janeiro: **Elsevier**. p. 576, 2005.

AKDIS, C. A. AND K. BLASER. Histamine in the immune regulation of allergic inflammation. **Journal Allergy Clinical Immunology**. v. 112, p.15-22, 2003.

ANDRADE, M. E. R. et al. The role of immunomodulators on intestinal barrier homeostasis in experimental models. **Clinical Nutrition**, v. 34, n. 6, p. 1080–1087, 2015.

ARBOLEYA, S.; RUAS-MADIEDO, P.; MARGOLLES, A.; SOLÍS, G.; SALMINEN, S.; REYES-GAVILÁN, C.G.; GUEIMOND, M. Characterization and in vitro properties of potentially probiotic *Bifidobacterium* strains isolated from breast-milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, p.28-36, 2011.

ARTIS, D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. **Nature Review Immunology**, v. 8, p. 411–20, 2008.

ARUMUGAM M, RAES J, PELLETIER E, LE PASLIER D, YAMADA T, MENDE DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome, **Nature**. v.473, p. 174-80, 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ALERGIA E IMUNOPATOLOGIA – ASBAI. Alergia alimentar. Disponível em: www.asbai.or.br, acesso em: 1 fev. 2017.

BACHARIER, L. B. AND R. S. GEHA. Molecular mechanisms of IgE regulation. J **Allergy Clinical Immunology**. v.105, p. 547-58, 2000.

BAE, S. J., Y. TANAKA, et al. Interleukin-5 involvement in ovalbumin-induced eosinophil infiltration in mouse food-allergy model. **Jounal of Dermatology Science**, v.21, n.1, Sep, p.1-7. 1999.

BARBOSA, F. H. F, et al., Microbiota indígena do trato gastrintestinal. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. v.10, p. 10, 2010.

BASTOS R. W.; PEDROSO S. H. S.; VIEIRA A. T.; MOREIRAL. M. C.; FRANÇA C. S.; CARTELLE C. T.; ARANTES R. M. E.; GENEROSO S. V.; CARDOSO V. N.; NEVES M. J.; NICOLI J. R.; MARTINS F. S. *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 treatment reduces intestinal damage in a murine model of irinotecan-induced mucositis. **Beneficial Microbes**, p. 1-10, 2016.

BERNARDO, W.M; AIRES, F.T; CARNEIRO, R.M; SÁ, F.P; RULLO, V.E.V; BURNS, D.A. Effectiveness of probiotics in the prophylaxis of necrotizing enterocolitis in preterm neonates: a systematic review and meta-analysis. **Jornal de Pediatria**, v.89, n.1, p.18-24, 2013.

BINGHAM, C.O, AUSTEN, K.F. Mast-cell responses in the development of asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 105, p. S527-534, 2000.

BISCHOFF SC. Physiological and pathophysiological functions of intestinal mast cells. **Seminars in Immunopathology**, 2009.

BISCHOFF SC, MAILER R, PABST O, WEIER G, SEDLIK W, LI Z, CHEN JJ, MURPHY DL, GERSHON MD. Role of serotonin in intestinal inflammation: knockout of serotonin reuptake transporter exacerbates 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice. **American Journal of Physiology**, 2009.

BLANCHARD, C.; DURUAL, S.; ESTIENNE, M.; BOUZAKRI, K.; HEIM, M.H.; BLIN, N.; CUBER, J.C. IL-4 and IL-13 up-regulate intestinal trefoil factor expression: requirement for STAT6 and de novo protein synthesis. **Journal of Immunology**, v. 172, p. 3775-3783, 2004.

BORBA LM, FERREIRA CLLF. Probióticos em bancos de leite humano. In: Ferreira CLLF. **Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção**. Viçosa: UFV; p.103-22.2, 2003.

BORCHERS ANDREA T.; CARLO SELMI; FREDERICK J. MEYERS; CARL L. KEEN and M. ERIC GERSHWIN. Probiotics and Immunity. **Journal of Gastroenterology**; v.44, p.26–46, 2009.

BOYCE, J.A., ASSA'AD, A., BURKS, A.W., JONES, S.M., SAMPSON, H.A., WOOD, R.A., et al., Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the UnitedStates: report of the NIAID-sponsored expert panel. **Journal Allergy Clinical Immunology**, 126 (S), pp. 1-58. 10, 2010.

BRESSLER, R. B., J. LESKO, et al. Production of IL-5 and granulocytemacrophage colony-stimulating factor by naive human mast cells activated by highaffinity IgE receptor ligation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** 99(4): 508-14, 1997.

BURD, P. R., W. C. THOMPSON, et al. Activated mast cells produce interleukin 13. **The Journal of Experimental Medicine**. v.181, p.1373-80, 1995.

BURGGRAF M, NAKEJIMA-ADACHI H, HACHIMURA S et al. Oral tolerance induction does not resolve gastrointestinal inflammation in a mouse of food allegy. **Molecular Nutrition & Food Research**. v. 55, p.1475-83, 2001.

CANI, P. D.; DELZENNE, N. M. Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 10, p. 729–734, set. 2007.

CARA, D. C., CONDE, A. A., VAZ, N. M. Immunological induction of flavor aversion in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, *27*(6), 1994.

CARA, D. C., CONDE, A. A., VAZ, N. M. Immunological induction of flavour aversion in mice. II. Passive/adoptive transfer and pharmacological inhibition. **Scandinavian Journal of Immunology**, *45*(1), 16-20, 1997.

CARDOSO, C.R.; PROVINCIATTO, P.R.; GODOI, D.F.; FERREIRA, B.R.; TEIXEIRA, G.; ROSSI, M.A.; CUNHA, F.Q.; SILVA, J .S. IL-4 regulates susceptibility to intestinal inflammation in murine food allergy. **American Journal of Physicology-Gastrointestinal and Liver Physiology**. v. 296, n. 3, p. G593-600, 2009.

CARREIRO, D MADI; VASCONCELOS, L; AYOUD, M E. **Síndrome Fúngica**. 1ª Ed. São Paulo. Editora Referência, 175p, 2009.

CARVALHO, G; PERUCHA, V. Doença Inflamatória Intestinal. **Nutrição Saúde e Performance**. v.29, p.9-16, 2006.

CETEA. **Comitê de Ética em Experimentação Animal** - UFMG (2011). Protocolos anestésicos comumente utilizados em animais de pequeno porte. Disponível em: http://www.ufmg.br/bioetica/cetea, acesso em janeiro de 2019.

CHOI, I. W., Y. S. KIM, et al. Platelet-activating factor-mediated NF-kappaB dependency of a late anaphylactic reaction. **The Journal of Experimental Medicine**. v.198, p.145-51, 2003.

CIANFERONI, A.; SPERGEL, J.M. Food allergy: review, classification and diagnosis. **Allergology International**, v. 58, p. 457-466, 2009.

COBEA. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (2006) **Legislação e Ética**. Disponível em: http://www.cobea.org.br. Acesso em: 12 jan. 2019.

CORCOS, M., O. GUILBAUD, et al. Involvement of cytokines in eating disorders: a critical review of the human literature. **Psychoneuroendocrinology**, v.28, n.3, Apr, p.229-49. 2003.

COSTA-PINTO, F. A., BASSO, A. S., BRITTO, L. R. G., MALUCELLI, B. E., RUSSO, M. Avoidance behavior and neural correlates of allergen exposure in a murine model of asthma. **Brain, Behavior, and Immunity**, *19*(1), 52-60, 2005.

COSTA-PINTO, F. A., BASSO, A. S., RUSSO, M. Role of mast cell degranulation in the neural correlates of the immediate allergic reaction in a murine model of asthma. **Brain, Behaviour, and Immunity**, *21*(6), 783-790, 2007.

CRONIN, M.; VENTURA, M.; FITZGERALD, G.F.; SINDEREN, D. Progress in genomics, metabolism and biotechnology of bifidobacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, p. 4-18, 2011.

DANESE, S. E FIOCCHI, C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. **World Journal Gastroenterology**, 12, 4807-12, 2006.

DAS, P. et al. Comparative tight junction protein expressions in colonic Crohn's disease, ulcerative colitis, and tuberculosis: A new perspective. **Virchows Archiv**, v. 460, n. 3, p. 261–270, 2012.

DELANO, M. J. E L. L. MOLDAWER. The origins of cachexia in acute and chronic inflammatory diseases. **Nutrition in Clinical Practice**, v.21, n.1, Feb, p.68-81. 2006.

DIBAISE, J. K.; ZHANG, H.; CROWELL, M. D.; KRAJMALNIK-BROWN, R.; DECKER, G. A.; RITTMANN, B. **Gut Microbiota and Its Possible Relationship With Obesity. Mayo Clinic Proceedings**. V. 83, N. 4, P.460-69, april 2008.

DOURADO, L. P. A., DA SILVA SALDANHA, J. C., GARGIULO, D. L., NOVIELLO, M. D. L. M., BRANT, C. C., REIS, M. L. C., & CARA, D. C. Role of IL-4 in aversion induced by food allergy in mice. Cell Immunol, 262, 62-68, 2010.

DOURADO, L .P.; NOVIELLO, M. DE L.; ALVARENGA, D.M.; MENEZES, Z.; PEREZ, D.A.; BATISTA, N.V.; MENEZES, G.B.; FERREIRA, A.V.; DE SOUZA, D. DA G.; CARA, D .C. Experimental food allergy leads to adipose tissue inflammation, systemic metabolic alterations and weight loss in mice. **Cell Immunology**, v. 270, n. 2, p.198-206, 2011.

EIGENMANN, P. A. Mechanisms of food allergy. **Pediatric Allergy Immunology**, v. 20, n. 1, Feb, p.5-11. 2009.

Elliott, E. N., Kaestner, K. H. Epigenetic regulation of the intestinal epithelium. **Cellular and Molecular Life Sciences**, *72*(21), 4139-4156, 2015.

FAGARASAN, SIDONIA et al. Critical roles of activation-induced cytidine deaminase in the homeostasis of gut flora. **Science**, v. 298, n. 5597, p. 1424-1427, 2002.

FANDI, K.G.; GHAZALI, H.M.; YAZID, A.M.; RAHA, A.R. Purification and N-terminal amino acid sequence of fructose-6-phosphat phosphoketolase from *Bifidobacterium longum* BB536. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, p. 235-239, 2001.

FAQUIM-MAURO, E. L., & MACEDO, M. S. Induction of IL-4-dependent, anaphylactic-type and IL-4-independent, non-anaphylactic-type IgG1 antibodies is modulated by adjuvants. **Internatiol Immunology**, 12, 1733-1740, 2000.

FARIA, A. M. C., GOMES-SANTOS, A. C., GONÇALVES, J. L., MOREIRA, T. G., MEDEIROS, S. R., DOURADO, L. P., CARA, D. C. Food components and the immune system: from tonic agents to allergens. **Frontiers in Immunology**, 4, 102, 2013.

FAO/WHO Report. Food And Agricultural **Organization/World Health** Organization Working Group. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada. April 30 And May 1, 2002.

FAPESP (Fundação de amparo à pesquisa do estado de São Paulo). Disponível em: http://www.bv.fapesp.br/pt/bolsas/144297/efeito-dos-acidos-graxos-de-cadeia-curta-produzidos-por-bacterias-probioticas-na-profilaxia-e-tratam/ 2013.

FEDORAK RN, & MADSEN KL. Probiotics and the management of inflammatory bowel disease. **Inflammatory Bowel Diseases** v.10, p.286-99, 2004.

FEDORAK RN. Advances in IBD. Current developments in the treatment of inflammatory bowel diseases. **Inflammatory Bowel Diseases** v.6, p.688-690, 2010.

FERRARIS, R.P.; VILLENAS, S. A.; DIAMOND, J. Regulation of brush-border enzyme activities and enterocyte migration rates in mouse small intestine. **American Journal of Physiology**., v.262, n.6, p.G1047-1059, 1992.

FERREIRA CT, SEIDMAN E. Alergia alimentar: atualização prática do ponto de vista Gastroenterológico. **Journal of Pediatrics** (Rio J). v.83, p.7-20, 2007.

FINKELMAN, F.D.; ROTHENBERG, M.E.; BRANDT, E.B.; MORRIS, S.C.; STRAIT, R.T. Molecular mechanisms of anaphylaxis: lessons from studies with murine models. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, p.449-457, 2005.

FONSECA, J. F. Efeito de *Bifidobacterium longum* 51A e *Weissella paramesenteroides* WpK4 em giardíase experimental. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

GALLO, R. L.; HOOPER, L. V. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. **Nature Reviews. Immunology**, v. 12, n. 7, p. 503–16, jul. 2012.

GAREAU, M. G.; SHERMAN, P. M.; WALKER, W. A. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. **Nature Reviews Gastroenterology Hepatology**. v.7, p.503-14, 2010.

GENEROSO SV, VIANA M, SANTOS R, MARTINS FS, MACHADO JA, ARANTES RM, NICOLI JR, CORREIA MI, CARDOSO VN. *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 protects against bacterial translocation preserves gut barrier integrity and stimulates the immune system in a murine intestinal obstruction model. **Archives of Microbiology**, p.477-484, 2010.

GLEICH, G. J. AND C. R. ADOLPHSON. "The eosinophilic leukocyte: structure and function." **Advvances in Immunology** 39: 177-253, 1986.

GOTO, Y.; KIYONO, H. Epithelial barrier: an interface for the cross-communication between gut flora and immune system. **Immunological Reviews**, v. 245, n. 1, p. 147– 163, 2012.

GOTTELAND, M.; BRUNSER, O.; CRUCHET. Systematic review: are probiotics useful in controlling gastric colonization by *Helicobacter pylori*? **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 23, p. 1077-1086, 2006.

GUEIMONDE, M.; LAITINEN, K.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation? **Neonatology**, v. 92, p.64-66, 2007.

GUERRA, P.V.P.; LIMA, L.N.; SOUZA, T.C.; MAZOCHI, V.; PENNA, F.J.; SILVA, A.M.; NICOLI, J.R.; GUIMARAES, E.V. Pediatric functional constipation treatment with *Bifidobacterium* containing yogurt: a crossover, double-blind, controlled trial. **World Journal of Gastroenterology**, v. 17, p. 3916-3921, 2011.

HARMSEN, H.J.; WILDEBOER-VELOO, A.C.; RAANGES, G.C.; WAGENDORP, A.A.; KLIJN, N.; BINDELS, J.G.; WELLING, G.W. Analysis of intestinal flora development in breat-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 30, p. 61-67, 2000.

HASAN AL-SHERAJI, S.; ISMAIL, A.; MANAP, M.Y.; MUSTAFA, S.; YOUF, R.M.; HASSAN, F.A. Hypocholesterolaemic effect of yoghurt containing *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G4 or *Bifidobacterium longum* BB536. **Food Chemistry**, v. 135, p. 356-361, 2012.

HAUB S, RITZE Y, BERGHEIM I, PABST O, GERSHON MD, BISCHOFF SC. Enhancement of intestinal inflammation in mice lacking interleukin 10 by deletion of the serotonin reuptake transporter. **Neurogastroenterology & Motility**; 22:826–834, 2010.

HAWRELAK, J.A.; MYERS, S.P. The causes of intestinal dysbiosis. **Alternative Medicine Review**, v. 9, p.180-197, 2004.

HAWRYLOWICZ, C. M.; O'GARRA, A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 4, p.271283, 2005.

HEGAZY, S.K. AND M.M. EL-BEDEWY. Effect of probiotics on pro-inflammatory cytokines and NF-κB activation in ulcerative colitis. **World Journal of Gastroenterology**, v.16, p. 4145-4151, 2010.

HENRIQUE E. Immunotherapy in the treatment of food allergy. Does it have a future? **Allergol Immunopathology**. v.37, p.143-5, 2009.

HOGAN, S. P., MISHRA, A., BRANDT, E. B., FOSTER, P. S., & ROTHENBERG, M. E. A critical role for eotaxin in experimental oral antigen-induced eosinophilic gastrointestinal allergy. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 97, 6681-6686, 2000.

HOLGATE, S.T. & POLOSA, R. Treatment strategies for allergy and asthma. **Nature Reviews Immunology**., v.8, n.3, p.218-30. 2008.

HUANG, J.; ZHONG, Y.; CAI, W.; ZHANG, H.; TANG, W.; CHEN, B. The effects of probiotics supplementation timing on an ovalbumin-sensitized rat model. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v. 60, n. 2, p. 132-141, 2010.

ISHIZAKA, T., & ISHIZAKA, K. Triggering of histamine release from rat mast cells by divalent antibodies against IgE-receptors. **The Journal of Immunology**, 120, 800-805, 1978.

IZCUE, A.; COOMBES, J.L.; POWRIE, F. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. **Annual Review Immunology**, v.27, p.313–38, 2009.

JÄGER, SIMON; STANGE, EDUARD F.; WEHKAMP, JAN. Doença intestinal inflamatória: uma doença de barreira prejudicada. **Arquivos de cirurgia de Langenbeck** , v. 398, n. 1, p. 1-12 de 2013.

JANDHYALA SM, TALUKDAR R, SUBRAMANYAM C, VUYYURU H, SASIKALA M, NAGESHWAR REDDY D. Role of the normal gut microbiota. **World Journal of Gastroenterology** ;21(29):8787-803, 2015.

JOHANSSON, S., BIEBER, T., DAHL, R., FRIEDMANN, P., BOBBY, Q., LANIER, B., LOCKEY, R., Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization. **Journal Allergy Clinical Immunology**; 113(5), pp. 832-6, 2004.

JUSTINO PF, MELO LF, NOGUEIRA AF, COSTA JV, SILVA LM, SANTOS CM, MENDES WO, COSTA MR, FRANCO AX, LIMA AA, RIBEIRO RA, SOUZA MH, & SOARES PM. Treatment with *Saccharomyces boulardii* reduces the inflammation and dysfunction of the gastrointestinal tract in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. **British Journal of Nutrition**, 111, 1611–1621, 2014.

KADAOUI, K. A.; CORTHESY, B. Secretory IgA mediates bacterial translocation to dendritic cells in mouse Peyer's patches with restriction to mucosal compartment. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 11, p. 7751–7757, 2007.

KEMP, S. F. & R. F. Lockey**???**. Anaphylaxis: a review of causes and mechanisms. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.110, n.3, Sep, p.341-8. 2002.

KESHAVARZIAN, A.; FARHADI, A.; FORSYTH, C.B.; RANGAN, J.; JAKATE, S.; SHAIKH, M.; BANAN, A.; FIELDS, J.Z. Evidence that chronic alcohol exposure promotes intestinal oxidative stress, intestinal hyperpermeability and endotoxemia prior to development of alcoholic steatohepatitis in rats. **Journal of Hepatology**, v. 50, n. 3, p.538-547, 2009.

KIESSLICH R, GOETZ M, ANGUS EM, HU Q, GUAN Y, POTTEN C, ALLEN T, NEURATH MF, SHROYER NF, MONTROSE MH, WATSON AJ. Identification of epithelial gaps in human small and large intestine by confocal endomicroscopy. **Gastroenterology**. ~~Dec;~~ 133(6):1769-78, 2007.

KIM, J.Y.; CHOI, Y.O.; JI, G.E. Effect of oral probiotics (*Bifidobacterium lactis* AD011 and *Lactobacillus acidophilus* AD031) administration on ovalbumin induced food allergy mouse model. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 18, n. 8, p. 13931400, 2008.

KIM, Y. S.; HO, S. B. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: Recent insights and progress. **Current Gastroenterology Reports**, v. 12, n. 5, p. 319–330, 2010.

KLEIN S. COHN SM. ALPERS DH. O trato alimentar em nutrição: um guia. In: Shills ME, editor. **Tratado de Nutrição e Dietoterapia**. 9ª ed. São Paulo: Manole; p.647-72, 2003.

KOLACEK S. Food hypersensitivity in children. **Acta Medica Croatica**. v.65, p.155, 2011.

KORECKA, A.; ARELAMPALAM, V. The gut microbiome: scourge, sentinel or spectator? **Journal of Oral Microbiology**, v. 4, jan. 2012.

KRANICH J, MASLOWSKI KM, MACKAY CR. Commensal flora and the regulation of inflammatory and autoimmune responses. **Seminars in Immunology**, 23, 139-45, 2011.

KUCHARZIK, T., WALSH, S.V., CHEN, J., PARKOS, C.A. e NUSRAT. Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differented expression of epithelial intercelular junction proteins. **The American Journal of Pathology**, v.159, p. 2001-9, 2001.

KUROWSKI K, BOXER RW. Food allergies: detection and management. **American Family Physician**. v.77, p.1678-86, 2008.

LAGE, D. G.; BRITO, G. A. P. A Relação da microbiota intestinal com obesidade e resistência à insulina. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, São Paulo v.6, n.31, p.31-34, Jan/fev. 2012.

LAPAQUETTE, P., et al.. Etiology of Crohn's disease: many roads lead to autophagy. **Journal of Molecular Medicina**, 90, 987-96, 2012.

LEAHY, SC et al. Ficando melhor com bifidobactérias. **Jornal de microbiologia aplicada**, v. 98, n. 6, p. 1303-1315, 2005.

LESSARD, M.; DUPUIS, M.; GAGNON, N.; NADEAU, E.; MATTE, J.J.; GOULET, J.; FAIRBROTHER, J.M. Administration of *Pediococcus acidilactici* or *Saccharomyces cerevisae boulardii* modulates development of porcine mucosal immunity and reduces intestinal bacterial translocation after *Escherichia coli* challenge. **Journal of Animal Science.** v. 55, p. 922-934, 2009.

LEY, K., LAUDANNA, C., CYBULSKY, M.I. NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature Reviews Immunology**, v.7, p.678-89. 2007.

LEY, R. E.; PETERSON, D.A. AND GORDON, J. I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. **Cell.** 124: p. 837-48, 2006.

LUCKEY, THOMAS D. Introduction to intestinal microecology.**The American Journal of Clinical Nutrition**, 1972.

LUKACS, N. W. Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. **Nature Reviews Immunology** 1(2): 108-16, 2001.

MABBOTT, N. et al. Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. **Mucosal Immunology**, v. 6, n. 4, p. 666-677, 2013.

MACKENZIE, J. R., J. MATTES, et al. Eosinophils promote allergic disease of the lung by regulating CD4(+) Th2 lymphocyte function. **The Journal of Immunology** 167(6): 314655, 2011.

MACPHERSON AJ & HARRIS NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. **Nature Reviews Immunology** v.4, p.478-485, 2008.

MALOY, K. J.; POWRIE, F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 474, n. 7351, p. 298–306, 2011.

MANICHANH, C.; RIGOTTIER-GOIS, L.; BONNAUD, E.; GLOUX, K.; PELLETIER, E.; FRANGEUL, L., et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. **Gut** v.55, p.205–211; 2006.

MARTINS FS, ELIAN SDA, VIEIRA AT, TIAGO FCP, MARTINS AKS, SILVA FCP, SOUZA ELS, SOUSA LP, ARAÚJO HRC, PIMENTA PF, BONJARDIM CA, ARANTES RME, TEIXEIRA MM, NICOLI JR. Oral treatment with *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 modulates immune responses and interferes with signal pathways involved in the activation of inflammation in a murine model of typhoid fever. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, p.359-364, 2011.

MARTINS, F.S.; SILVA, A.A.; VIEIRA, A.T.; BARBOSA, F.H.F.; ARANTES, R.M.E.; TEXEIRA, M.M.; NICOLI, J.R. Comparative study of *Bifidobacterium animalis, Escherichia coli, Lactobacillus casei* and *Saccharomyces boulardii* probiotic properties. **Archives of Microbiology**, v. 191, p. 623-630, 2009.

MAYER, L. Mucosal immunity. **Pediatrics**, v.111, p.1595-600. 2003.

MASLOWSKI KM, MACKAY CR. Diet, gut microbiota and immune responses. **Nature Immunology**, 12:5-9, 2011.

MENDES, E., ACETTURI, B. G., THOMAS, A. M., MARTINS, F. D. S., CRISMA, A. R., MURATA, G., ... & RIBEIRO, W. R. Prophylactic supplementation of *Bifidobacterium longum* 51A protects mice from ovariectomy-induced exacerbated allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness. **Frontiers in Microbiology**, 8, 1732, 2017.

MOREIRA, L. F. **Estudo dos componentes nutricionais e imunológicos na perda de peso em camundongos com alergia alimentar**. (Mestrado). Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, p.99, 2006.

MOWAT, A. M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 4, p. 331–341, 2003.

MUSSO, G.; GAMBINO, R.; CASSADER, M. Obesity, diabetes and gut microbiota: The hygiene hypotheses expanded? **Diabetes care**. v.33, n. 10, p. 2277-2284, dez, 2018.

NAUSEEF, W.M. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. **Immunological Reviews**, v.219, p.88-102. 2007.

NICOLI JR, VIEIRA LQ. Probióticos, prebióticos e simbióticos. **Revista Ciências Hoje**; v. 163, p. 34-8 2000.

O'BRIEN, P.J. Peroxidases. **Chemico-Biological Interactions**, v.129, p.113-39. 2000.

PABST, O., MOWAT, A. M. Oral tolerance to food protein. **Mucosal Immunology**, *5*(3), 232, 2012.

PEDROSO, S. H., VIEIRA, A. T., BASTOS, R. W., OLIVEIRA, J. S., CARTELLE, C. T., ARANTES, R. M., NICOLI, J. R. Evaluation of mucositis induced by irinotecan after microbial colonization in germ-free mice. **Microbiology**, 161(10), 1950-1960, 2015.

PERSE, M.; CERAR, A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.2012, p.01-13, 2012.

PETERSON, D. A., D. N. FRANK, N.R. PACE, J. I. GOSRDON. Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Cell Host & Microbe** 3(6):417-427, 2008.

PETERSON, L. W.; ARTIS, D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. **Nature Reviews. Immunology**, v. 14, n. 3, p. 141–53, 2014.

PLATA-SALAMAN, C. R. Central nervous system mechanisms contributing to the cachexiaanorexia syndrome. **Nutrition**, v.16, n.10, Oct, p.1009-12. 2000.

PLAUT, M. "Cytokines and modulation of diseases of immediate hypersensitivity." **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.685, p.512-20, 1993.

POTHOULAKIS, C. Review article: anti-inflammatory mechanisms of action of *Saccharomyces boulardii*. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**. v. 15, p.-826-833, 2009.

PÓVOA, HÉLION. **O cérebro desconhecido**: **como o sistema digestivo afeta nossas emoções, regula nossa imunidade e funciona como órgão inteligente**. Rio de Janeiro. Editora Objetiva, 222p, 2002.

QUIN J, LI R, RAES J, ARUMUGAM M, BURGDORF KS, MANICHANH C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature;** v. 464, p. 59-65, 2010.

QIN, X. Etiology of inflammatory bowel disease: a unified hypothesis. **World Journal Gastroenterology**, 18, 1708-22, 2012.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of american institute of nutrition. ad hoc writing commitee on the reformulation of AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, v.193, p.1939-1951, 1993.

ROMAGNANI, S. The role of lymphocytes in allergic disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 105, n. 3, p.399-408, 2000.

ROTHENBERG, M. E. Gastrointestinal eosinophils. Allergy, 56 Suppl 67, 21-2, 2001.

ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. The gut microbiota shapes intestinal imune responses during health and disease. **Nature Reviews Immunology**. v. 9, p. 313–323; 2009.

SALDANHA, J. C., D. L. GARGIULO, et al. A model of chronic IgE-mediated food allergy in ovalbumin-sensitized mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, n.6, Jun, p.809-16. 2004.

SALVO, R. E., ALONSO, C. C., PARDO, C. C., CASADO, B. M., VICARIO, M. The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. **Revista Espanola de Enfermedades Digestivas: Organo Oficial de la Sociedad Espanola de Patologia Digestiva**, *107*(11), 686-696, 2015.

SANTOS, A. C. G. **Estratégias alternativas de imunomodulação nas doenças inflamatórias intestinais**. Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 164 p., 2011.

SARTOR RB. Bacteria in crohn disease: mechanisms of inflammation and therapeutics implications. **Journal of Clinical Gastroentrology** v. *41*, p. 37-43, 2007.

SARTOR RB. Targeting enteric bacteria in treatment of inflammatory bowel diseases: why, how, and when. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 19, p. 358-65, 2003.

SARTOR, R.B.. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, 134, 577-94, 2008.

SCAPINI, PATRIZIA et al. The neutrophil as a cellular source of chemokines. **Immunological Reviews**, v. 177, n. 1, p. 195-203, 2000.

SCHELL, M.A.; KARMIRANTZOU, M.; SNEL, B.; VILANOVA, D.; BERGER, B.; PESSI, G.; ZWAHLEN, M.; DESIERE, F.; BORK, P.; DELLEY, M.; PRIDMORE, R.D.; ARIGONI, F. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. **Proceedings of the National Academy os Sciences of the United States of America**, v. 99, p. 14422-14427, 2002.

SCHIAVI, E.; BARLETTA, B.; BUTTERONI, C.; CORINTI, S.; BOIRIVANT, M.; DI FELICE, G. Oral therapeutic administration of a probiotic mixture suppresses established Th2 responses and systemic anaphylaxis in a murine model of food allergy. **Allergy**, v. 66, n. 4, p. 499-508, 2011.

SCHIRBEL, A. E FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: Established and evolving considerations on its etiopathogenesis and therapy. **Journal of Digestive Diseases**, 11, 266- 76, 2010.

SEIBOLD, F. Food-induced immune responses as origin of bowel disease? **Digestion**, v.71, p.251-60. 2005.

SEKIROV, I.; RUSSELL, S. L.; ANTUNES, C. M.; FINLAY, B. B. Gut microbiota in health and disease. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 3, p. 859-904, may. 2010.

SELA, D.A. Bifidobacterial utilization of human milk oligosaccharides. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, p. 58-64, 2011.

SELA, D.A.; CHAPMAN, J.; ADEUYA, A.; KIM, J.H.; CHEN, F.; WHITEHEAD, T.R.; LAPIDUS, A.; ROKHASAR, D.S.; LEBRILLA, C.B.; GERMAN, J.B.; PRICE, N.P.; RICHARDSON, P.M.; MILLS, D.A. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *Infantis* reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome. **Proceedings of the National Academy os Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 18964-18969, 2008.

SELLERS, R. S.; MORTON, D. The colon: from banal to brilliant. **Toxicologic pathology**, v. 42, n. 1, p. 67–81, 2014.

SENDER, RON, SHAI FUCHS E RON MILO. Estimativas revisadas para o número de células humanas e bacterianas no corpo. **PLoS Biology** 14.8 e1002533; 2016.

SHIN, H.S.; LEE. J.H.; PESTKA, J.J.; USTUNOL, Z. Growth and viability of commercial *Bifidobacterium spp* in skim milk containing oligosaccharides and inulin. **Journal of Food Science**, v. 65, p. 884-887, 2000.

SICHERER, S.H.; SAMPSON, H.A. Food allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.125, p. 116-125, 2010.

SICHERER, S.H. Epidemiology of food allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 127, n. 3, p. 594-602, 2011.

SILVA, S. M. C. S. da; MURA, J. D. P. **Tratado de Alimentação, Nutrição e Dietoterápica**. 1ª Edição. São Paulo: Ed Roca, 2007.

SILVA, A. K. S. Avaliação *in vitro* da produção de citocinas e de proteínas da matriz 10 extracelular em linhagens celulares cutâneas e de ações antimicrobianas estimuladas por *Bifidobacterium* spp. **Dissertação De Mestrado**, Universidade Federal de Minas Gerais, 2016.

SHI, H. Z. Eosinophils function as antigen-presenting cells. **Journal of Leukocyte Biology**, 76, 520-527, 2004.

SLACK, E. et al. Functional flexibility of intestinal IgA -broadening the fine line. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 1–10, 2012.

SLACHZHANG, L.L; CHEN, X.; ZHENG, P.Y.; LUO, Y.; LU, G.F.; LIU, Z.Q.; HUANG, H.; YANG, P.C. Oral *Bifidobacterium* modulates intestinal immune inflammation in mice with food allergy. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**. v. 25, n. 5, p. 928-934, 2010.

SOLÍS, G.; REYES-GAVILAN, C.G.; FERNÁNDEZ, N.; MARGOLLES, A.; GUEIMONDE, M. Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. **Anaerobe**, v. 16, p. 307-310, 2010.

SOUZA, D.G; CARA, D.C; CASSALI, G.D; COUTINHO, S.F; SILVEIRA, M.R; ANDRADE, S.P; POOLE, S.P; TEIXEIRA, M.M. Effects of the PAF receptor antagonist UK74505 on local and remote reperfusion injuries following ischaemia of

the superior mesenteric artery in the rat. **British Journal of Pharmacology**, v.131, p.1800-1808, 2000.

SOUZA, T. C.; SILVA, A. M.; DREWS, J. R. P.; GOMES, D. A.; VINDEROLA, C. G.; NICOLI, J. R. *In vitro* evaluation of *Bifidobacterium* strains of human origin for potential use in probiotic functional foods. **Beneficial Microbes**, v. 4, n. 2, p. 179-186, 2013.

SOUZA, T. C.; ZACARÍAS, M. F.; SILVA, A. M.; BINETTI, A.; REINHEIMER, J.; NICOLI, J. R.; VINDEROLA, G. Cell viability and immunostimulating and protective capacities of *Bifidobacterium longum* 51A are differentially affected by technological variables in fermented milks. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, n. 6, p. 1184-1192, 2012.

STONE, K.; PRUSSIN, C.; METCALFE, D. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. **Journal Allergy Clinical Immunology**., v. 125, n. 2 Suppl 2, p.S73-80, 2010.

STRACHAN DP. Hay fever, hygiene, and household size. **British Medical Journal**; 299:1259-60, 1989.

STRATH M, WARREN DJ, SANDERSON CJ. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. **Journal of Immunological Methods**, v. 83, p. 209-215, 1985.

SUNADA, Y., S. NAKAMURA, et al. Effects of *Lactobacillus acidophilus* strain L-55 on experimental allergic rhinitis in BALB/c mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin** 30(11): 2163-6, 2007.

TAGLIABUE, A.; ELLI, M.. The role of gut microbiota in human obesity: recente findings and future perspectives. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 23, p. 160-168, 2013.

TANG Y, WU Y, HUANG Z, DONG W, DENG Y, WANG F, LI M, & YUAN J. Administration of probiotic mixture DM#1 ameliorated 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis and dysbiosis in rats. **Nutrition**, 33, 96–104, 2017.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R.; KASER, A. Obesity and the microbiota. **Gastroenterology**, v. 136, n. 5, p. 1476-1483, 2009.

TISSIER, H. **Recherches sur la flore intestinale des nourrissons** (Etat normal et pathologique). Thesis, ed. CARRÉ G. ET MAUD C., University of Paris, Paris, France, pp.253, 1900.

TURNBAUGH, P. J.; LEY, R. E.; MAHOWALD, M. A.; MAGRINI, V.; MARDIS, E. R.; GORDON, J. I. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, v. 444, n. 7122, p. 1027–1031, 2006.

TURNER JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, 9, 799–809, 2009.

TURRONI, F.; SINDEREN, D.; VENTURA, M. Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, p. 37-44, 2011.

UNTERSMAYR, E.; JENSEN-JAROLIM, E. The role of protein digestibility and antacids on food allergy outcomes. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**., v. 121, n. 6, p.1301-1308, 2008.

VANDERPOOL C, YAN F, POLK DB. Mechanisms of probiotic action: implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases. **Inflammatory Bowel Diseases**; v. 14, p.1585–96, 2008.

VASILJEVIC, T.; SHAN, N.P. Probiotics: From Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 714-728, 2008.

VENTURA, M.; van SINDEREN, D.; FITZGERALD, G.F.; ZINK, R. Insights into taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 86, p. 205-223, 2004.

VICARIO, M.; GUILARTE, M; ALONSO, C; YANG, P.; MARTÍNEZ, C.; RAMOS, L.; LOBO, B.; GONZÁLEZ, A.; GUILÀ, M.; PIGRAU, M.; SAPERAS, E.; AZPIROZ, F.; SANTOS, J. Chronological assessment of mast cell-mediated gut dysfunction and mucosal inflammation in a rat model of chronic psychosocial stress. **Brain Behaviour Immunity**., v. 24, n. 7, p.1166-1175, 2010.

VIEIRA AT, FAGUNDES CT, ALESSANDRI AL, CASTOR MGM, GUABIRABA R, BORGES VO, SILVEIRA KD, VIEIRA ELM, GONÇALVES JL, SILVA TA, DERUAZ M, PROUDFOOT AEI, SOUSA LP, & TEIXEIRA MM. Treatment with a novel chemokine-binding protein or eosinophil lineage-ablation protects mice from experimental colitis. **The American Journal of Pathology**, 175, 2382–2391, 2009.

VIEIRA, A. T.; GALVÃO, I.; AMARAL, F. A.; TEIXEIRA, M. M.; NICOLI, J. R.; MARTINS F. S. Oral treatment with *Bifidobacterium longum* 51A reduced inflammation in a murine experimental model of gout. **Beneficial Microbes**, v. 6, n. 6, p. 799-806, 2015.

VIEIRA, A. T.; ROCHA, V. M.; TAVARES, L.; GARCIA, C. C.; TEIXEIRA, M. M.; OLIVEIRA, S. C.; CASSALI, G. D.; GAMBA, C.; MARTINS, F. S.; NICOLI, J. R. Control of *Klebsiella pneumoniae* pulmonary infection and immunomodulation by oral treatment with the commensal probiotic *Bifidobacterium longum* 5 1A. **Microbes and Infection**, 2015.

VILLELA, N. B.; NETO, O. B.; CURVELLO, K. L.; PANEILI, B. E.; SEAL, C.; SANTOS, D.; CRUZ, T. Quality of life of obese patients submitted to bariatric surgery. **Nutrición Hospitalaria**., v. 19, n. 6, p. 367-371, 2004.

WALTER, J.; LEY, R. The human gut microbiome: ecology and recente evolutionary changes. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 65, p. 411–29, jun. 2011.

WASSERMAN, S. I. "Mediators of immediate hypersensitivity." **Journal Allergy Clinical Immunology**. v.72, p. 101-19, 1983.

WELLER, P. F. "Eosinophils: structure and functions." **Current Opinion in Immunology** 6(1): 85-90, 1994.

WIJK F. VAN, KNIPPELS L. Initiating mechanisms of food allergy: oral tolerance versus allergic sensitization. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v.61, p. 8–20, 2007.

WILLIAMS, L. W. AND S. A. BOCK. Skin testing and food challenges in allergy and immunology practice. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology** 17(3): 323-38, 1999.

WIRTZ S & NEURATH MF. Mouse models of inflammatory bowel disease. **Advanced Drug Delivery Reviews** v. 59, p. 1073-1083, 2007.

XU, X; Xu, P.; MA, C.; TANG, J.; ZHANG, X. Gut microbiota, host health, and polysaccharides .**Biotechnology advances**, v. 31, n. 2, p. 318-337, dec. 2012.

ZACARÍAS, M.F.; BINETTI, A.; LACO, M.; REINHEIMER, J.; VINDEROLA, G. Preliminary technological and potential probiotic characterisation of *Bifidobacteria* isolated from breast milk for use in dairy products. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 548-555, 2011.

ZHANG, L. L., CHEN, X., ZHENG, P. Y., LUO, Y., LU, G. F., LIU, Z. Q., ... & YANG, P. C. Oral *Bifidobacterium* modulates intestinal immune inflammation in mice with food allergy. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, 25, 928-934, 2010.

ZECHNER, ELLEN L. Doença inflamatória causada por patobiontes intestinais. **Current Opinion in Microbiology**, v. 35, p. 64-69, 2017.

9.0 ANEXO

ANEXO A- CETIFICADO (CEUA)

UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO
Certificamos que o Protocolo nº. 268 / 2015, relativo ao projeto intitulado "Efeitos da administração oral de probióticos em um modelo murino de alergia alimentar", que tem como responsável Flaviano dos Santos Martins, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 29/09/2015. Este certificado espira-se em 29/09/2020.

CERTIFICATE
We hereby certify that the Protocol nº. 268 / 2015, related to the Project entilted "Effects of oral administration of probiotics in a murine model of food allergy", under the supervision of Flaviano dos Santos Martins, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 29/09/2015. This certificates expires in 29/09/2020.

Cleuza Maria de Faria Rezende
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 29/09/2015.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG
https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO B- ATIVIDADES CURSADAS DURANTE O DOUTORADO

Período	Turma	Nome Atividade	Nota	Conceito	Crédito
2015/1	DCR GER000	DISPENSA DE CRÉDITOS	-	-	17
2015/1	DIP MIC 824	BACTERIOLOGIA DE ANAÉROBIOS	93	A	4
2015/1	DIP MIC 835	TOP. ESP. EM MICROBIOLOGIA	94	A	2
2015/1	DIP MIC 848	BACTERIOLOGIA DE AÉROBIOS	100	A	4
2015/2	DIP MIC840	TÓPICOS ESPECIAIS EM VIROLOGIA I	80	B	10
2016/2	DIP MIC 808	SEMINÁRIOS EM MICROBIOLOGIA	100	A	2
2017/1	DIP MIC	TREINAMENTO DIDÁTICO EM MICROBIOLOGIA II	100	A	2
2017/1	EQP MIC005	EXAME DE QUALIFICAÇÃO	-	A	-
2018/2	ETF GER000	ELABORAÇÃO DE TRABALHO FINAL	-	-	-

ANEXO C- PUBLICAÇÕES E PARTICIPAÇÕES EM PROJETOS E EVENTOS

1. PUBLICAÇÕES

- Luís Cláudio Lima de Jesus, Mariana Martins Drumond, André de Carvalho, Spencer S. Santos, Flaviano S. Martins, Ênio Ferreira, Renata Salgado Fernandes, André Luís Branco de Barros, Filipe L. R. do Carmo, Pablo F. Perez, Vasco Azevedo, Pamela Mancha-Agresti. (2018). Protective effect of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. lactis CIDCA 133 in a modelo f 5 Fluorouracil-Induced intestinal mucositis. *Journal of Functional Foods*. doi.org/10.1016/j.jff2018.12.027.

2. SUBMISSÃO ARTIGO DO DOUTORADO

- Spencer S. Santos, Valbert N. Cardoso, Jacques R. Nicoli, Denise C. Cara, Flaviano S. Martins. Effects of oral administration of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 5^{1A} in a murine model of food allergy. (2019). *Clinical & Experimental Allergy.*

3. PARTICIPAÇÃO EM CURSOS E EVENTOS

- Fourth Internacional Symposium on Inflammatory Disease 2018- INFLAMMA IV. Realizado pela Sociedade Brasileira de Inflamação. 6-8 de junho de 2018, Belo Horizonte-MG.
    - Pôster: Efeitos da Administração Oral de *Bifidobacterium longum* 5^{1A} em um Modelo Murino de Alergia Alimentar. Autores: Spencer Silva Santos, Denise Carmona Cara, Jacques Robert Nicoli e Flaviano dos Santos Martins.
    - Pôster: Immunological Effect of *Saccharomyces crevisiae* UFMG A-905 in a *in vivo* modelo f food allergy. Autores: Vivian Miranda, Spencer Santos, Mônica Quintanilha, Rodrigo Morão, Jacques Nicoli, Denise Cara e Flaviano Martins.
    - Pôster: Effect protective os *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856, of the inflammatory response induce oral challenge by *Salmonella* entérica serovar *Typhimurium* ATCC 14028 in model murine. Autores:

Rodrigo Morão, Spencer Santos, Mônica Quintanilha, Vivian Miranda, Fernando Dias, Jacques Nicoli e Flaviano Martins.

- V Simpósio de Microbiologia da UFMG, 2018, Belo Horizonte-MG, Brasil.
  - Pôster: A *Bifidobacterium longum* 5^{1A} é capaz de melhorar os sinais e sintomas da alergia alimentar a ovalbumina em camundongos. Autores: Spencer Santos, Gabriele M.G., Denise Cara, Jacques Nicoli e Flaviano Martins.
  - Pôster: Efeito probiótico da levedura *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 em um modelo murino de alergia. Autores: Vivian Miranda, Spencer Santos, Mônica Quintanilha, Jacques Nicoli, Denise Cara e Flaviano Martins.

- XXIV Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2018, Santiago, Chile.
  - Pôster: Evaluation of Immunogical effects in the model murino of food allergy treated whit *Bifidobacterium longum* 5^{1A}. Autores: Spencer Santos, Denise Cara, Jacques Nicoli e Flaviano Martins.
  - Pôster: Probiotic effect of *Bifidobacterium longum* 51ª on the development and severity of mucositis induced by chemotherapy in a murine model. Autores: Mônica Quintanilha, Rodrigo Morão, Vivian Miranda, Spencer Santos, Leda Trindade, Jacques Nicoli e Flaviano Martins.
  - Pôster: Evaluation of the probiotic effect of *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 in a murine modelo f food allergy. Autores: Vivian Miranda, Spencer Santos, Mônica Quintanilha, Jacques Nicoli, Denise Cara e Flaviano Martins.

- International Congresso of Genetics, 10-14/09, 2018, Paraná-Brasil.
  - Pôster: Therapeutic affect of wild type and recombinant *Lactobacillus delbrueckii* subsp. Lactis CIDCA 133 on 5-FU-induce intestinal mucositis. Autores: André Henrique Barbosa Carvalho, Luís Claudio Lima, Viviane Lima, Nina Dias, Spencer Santos, Flaviano Martins, Pamela Mancha, Vasco Azevedo.

- Gene Time Conference 2018, Pós-graduação em Genética UFMG, 23-24 de agosto.
    - Pôster: Therapeutic affect of wild type and recombinant *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 on 5-FU-induce intestinal mucositis. Autores: André Henrique Barbosa Carvalho, Luís Claudio Lima, Viviane Lima, Nina Dias, Spencer Santos, Flaviano Martins, Pamela Mancha, Vasco Azevedo.
    - Pôster: Protective effect of recombinant strain of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 (pEXU: hsp65) on intestinal mucositis. Autores: Viviane Lima, Luís Claudio Lima, André Henrique Barbosa Carvalho, Nina Dias, Spencer Santos, Flaviano Martins, Pamela Mancha, Vasco Azevedo.

- 6Th World Congresso n Targeting Microbiota Tawards Clinical Revolution, 28-30/10, 2018, Porto-Portugal.
    - Pôster: Fermented milk by *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA 133 is able to ameliorate the chemotherapy- Induced intestinal mucositis in BALB/c mice. Autores: Drumond, Mariana Martins; Jesus, Luís Claudio; Carvalho, André; Santos, Spencer Silva; Martins, Flaviano dos Santos; Mancha-Agresti, Pamela; Azevedo, Vasco.

4. MENÇÃO HONROSA

- Gene Time Conference 2018, Pós-graduação em Genética UFMG, 23-24 de agosto. Pôster: Protective effect of recombinant strain of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133 (pEXU: hsp65) on intestinal mucositis. Autores: Viviane Lima, Luís Claudio Lima, André Henrique Barbosa Carvalho, Nina Dias, Spencer Santos, Flaviano Martins, Pamela Mancha, Vasco Azevedo.

APÊNDICE A- ESBOÇO DO ARTIGO DO DOUTORADO

Effects of oral administration of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 5[1A] in a murine model of food allergy

Spencer S. Santos[1], Valbert N. Cardoso[2], Jacques R. Nicoli[1], Denise C. Cara[3], Flaviano S. Martins[1,*]

[1]Department of Microbiology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.
[2]Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.
[3]Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

*Correspondence: Martins F. S. Department of Microbiology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos 6627, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil. E-mail: flaviano@icb.ufmg.br. Tel: +55 31 3409 2738.

We, the undersigned authors, declare that we have contributed significantly to the research, preparation, revision and final production of the manuscript and approve its submission to the Journal. The contents of the manuscript have not been previously published and are not currently submitted elsewhere.

Signatures of authors

Summary

Background Food allergy is defined as an adverse reaction to a food antigen fundamentally mediated by immunological mechanisms. The number of cases of this nutritional problem increased in the last decades, probably due to a higher exposure of population to a greater number of food allergens. Researches to reduce food allergies have been developed, and among them ingestion of probiotics seem to be an efficient and safe alternative.

Goals The objective of this study was to evaluate a possible probiotic effect of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 5^{1A} ($BL5^{1A}$) against food allergy induced by ovalbumin (OVA).

Methods The clinical determinations (body weight and feed intake), histological (small intestine), functional (intestinal permeability), immunological (IgE anti-OVA, IgA and recruitment of eosinophilic leukocytes, cytokines and chemokines) and intestinal microbiota were performed in OVA-induced murine model of food allergy, treated or not by oral daily administration of 10^8, 10^6, 10^4 and 10^8 inactivated UFC of $BL5^{1A}$.

Results Oral administration of $BL5^{1A}$ to OVA-sensitized mice prevented weight loss and reduced levels of anti-OVA, IgA, intestinal permeability, and intestinal recruitment of eosinophils and neutrophils. In addition, treatment with $BL5^{1A}$ reduced intestinal levels of proinflammatory cytokines (TNF-α, IL-4, IL-5, IL-6 and IL-13) and increased anti-inflammatory cytokines (IL-10). Also in the evaluation of the microbiota by the culture-dependent method, treatment with bifido reduced the levels of some microorganisms and elevated others.

Conclusion The results demonstrate that treatment with $BL5^{1A}$ prevented most of the adverse effects observed in experimental food allergy.

Keywords: Probiotic, *Bifidobacterium longum* 5^{1A}, food allergy, anti-OVA IgE.

1. Introduction

Food allergy is a pathological condition that may be associated to severe clinical manifestations with impaired quality of life. It is a health problem worldwide with a dramatic increase in the number of cases over the last decades, probably due to a higher exposure of the population to a greater number of food allergens [1]. Allergens have been identified and characterized, both biochemically and immunologically, in

various studies, which have demonstrated that allergic response depends on its structural integrity where IgE-binding epitopes are responsible for allergenic functional activity. Allergens have common properties, being thermolabile and of molecular weight between 18 and 36 kDa [1].

In the process of triggering food allergy three key factors are involved: patient genetic, intestinal microbiota dysbiosis and allergen type. Genetic predisposition plays an important role in the development of atopic disease and there is an increased risk of allergy when there is a positive family history of allergy. The probability of a child developing allergy is around 30% when one of their parents has an allergy. This probability doubles when both parents or one parent and one sibling are allergic [2].

The worldwide interest in the use of functional foods containing probiotic microorganisms for health promotion and disease prevention has increased significantly. The main microorganisms used as probiotics are lactic acid bacteria (BAL such as lactobacilli), bifidobacteria and yeasts, such as *Saccharomyces boulardii* [3]. *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 5^{1A} has been shown to be promising as a potential probiotic because of its ability to decrease inflammatory and allergic processes in mice. In an experimental murine model of gout, treatment with *B. longum* 5^{1A} significantly alleviated the inflammatory parameters, as seem by reduced hypernociception, reduced neutrophil accumulation in the joint and myeloperoxidase activity in periarticular tissue. There was also inhibition of production CXCL1 and IL-1ß in joints and levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 were significantly higher in the knee tissue of mice treated with the bifidobacterium [4]. Another study had demonstrated the ability of *B. longum* 5^{1A} to decrease the amount of mucus in the lung and the presence of inflammatory mediators in an experimental murine model of allergic airway disease. In addition, there was a decrease in bronchial hyper reactivity and exaggerated contraction of bronchial smooth muscle characteristic of asthma [5].

Thus, in the present study, the effect of an oral treatment with *B. longum* 5^{1A} in a murine model of food allergy induced by ovalbumin was evaluated.

2. Materials and methods

2.1 Animals

Female 6-8 weeks-old Swiss mice were supplied by the Centre for Animal Care (CEBIO) of the Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil. Animals were maintained in a ventilated animal caging system (Alesco®, Monte Mor, SP, Brazil) with controlled lighting (12-h light-dark cycle), humidity (60-80%) and temperature (22±1°C). Water and a commercial autoclavable pelleted food (Nuvilab CR1, Nuvital®, Curitiba, PR, Brazil) were sterilized by steam and administered *ad libitum*. All experimental procedures were carried out according to the standards set forth by the Brazilian Society of Laboratory Animal Science/Brazilian College for Animal Experimentation (available at http://www.cobea.org.br/). This study was approved under protocol nº. 268/2015 by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG).

2.2. *Bifidobacterium* and growth conditions

Bifidobacterium longum subsp. *longum* 5^{1A} was isolated and characterized at the Laboratory of Ecology and Physiology of Microorganisms (ICB/UFMG). This bacterium was isolated from feces of a healthy 5-year-old child from the city of Salvador (BA) and identified by morphotinctorial (Gram staining), growth atmosphere and biochemical tests, followed by multiplex PCR, according to Kwon et al. [6]. Bifidobacteria were grown in de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth (Acumedia, Lansing, USA) for 48 hours at 37ºC without agitation in an anaerobic chamber (Forma Scientific Company, Marietta, OH, USA) containing an atmosphere of 85% N_2, 10% H_2 and 5% CO_2. The culture was then concentrated by centrifugation to obtain 10^9 colony forming units CFU/ mL.

2.3. *Bifidobacterium* treatment

The mice belonging to the experimental groups received a daily dose of 10^8, 10^6 and 10^4 CFU (0.1 mL culture containing 10^9, 10^7 and 10^5 CFU / mL respectively) of *B. longum* 5^{1A} three days before the allergen challenge and until the end of the experiment. We also had an experimental group that received a daily dose of 10^8 UFC / mL of *B. longum* 5^{1A} inactivated by gavage. The control group received sterile saline solution following the same schedule.

2.4 Allergen sensitization and challenge

The first sensitization was performed when mice were inoculated subcutaneously (s.c.) on the back with 10 µg of OVA (Ovalbumin, Sigma Grade V, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) adsorbed on aluminum hydroxide (1 mg) (Sigma) in saline (0.2 mL). They received a second sensitization 14 days later with only the antigen (10 µg) diluted in saline. The control group received only the adjuvant diluted in saline at day zero and only saline after 14 days. On day 21 till day 28, all animals received, in a place of standard chow, the OVA diet, which was prepared using lyophilized egg white (Salto's Belo Horizonte, MG, Brazil) and nutrient contents were in accordance with AIN-93G [7].

2.5 Experimental design

The animals were divided into seven groups: (CTL/CTL) - non treated and non OVA sensitized mice, (CTL / OVA) – non treated and OVA sensitized mice, ($BL5^{1A}$ / CTL) tread with $BL5^{1A}$ and non OVA sensitized, ($BL5^{1A}$ 10^8 / OVA, $BL5^{1A}$ 10^6 / OVA, $BL5^{1A}$ 10^4 / OVA and $BL5^{1A}$ 10^8 inactivated / OVA) treated with $BL5^{1A}$ and sensitized with OVA. Changes in body weight and feed intake were measured weekly prior to challenge of the allergen and then daily until the end of the experiment (day 28). In a first set of experiments, the mice of the seven groups (5 animals per group) were anesthetized at day 28 for intestinal permeability determination and then sacrificed by cervical dislocation for histopathological examination. In a second set of experiments, using the same groups described above, mice were sacrificed and tissues and blood were collected for determination of myeloperoxidase (MPO) and eosinophil peroxidase (EPO), as well as production of CXCL-1 / KC chemokines, anti-OVA IgE and IgA. In a later experiment with the standardized dose response (10^8 CFU / mL), the proinflammatory cytokines (TNF, IL-4, IL-5, IL-6 and IL-13) and the anti-inflammatory cytokine (IL-10) and the evaluation of the microbiota by the culture-dependent method.

2.6 Dosage of anti-OVA IgE in serum

IgE antibody titration was performed by ELISA (Immunoenzymatic Absorption Assay). Polystyrene microplates (Nunc, Roskilde, Denmark) containing (50 µL/well) of rat anti-mouse IgE antibody (Southern Biotechnology, Birmingham, AL, USA) diluted 1:250 in carbonate buffer pH 9,6, were incubated at -4°C overnight.

Subsequently, the plates were washed three times with PBS-Tween 20 and incubated for 1 hour after addition of 0.25% casein solution in PBS (200 µL/well) for blocking at room temperature. Then, the plates were washed three times with PBS-Tween 20, and 50 µL/well of the blood samples (diluted 1:250) were added and the plates incubated for two hours at room temperature. After this incubation, plates were washed five times with solution PBS-Tween 20 and incubated for one hour at room temperature with 1 µL of biotinylated OVA in 50 µL of PBS-casein per well. After further washing with PBS-Tween 20, the plates were added with 50 µl/well of streptavidin-peroxidase (Southern Biotechnology, Birmingham, AL, USA) at a concentration of 1:5000 and incubated for 45 minutes at room temperature. Then, the plates were washed four times with PBS-Tween 20 and 100 µL/well of citrate buffer solution containing H_2O_2 and orthophenylene diamine (OPD) were added, and the plates were incubated in a darkroom for 15 minutes at room temperature. After 15 minutes, reaction was stopped by the addition of 20 µl /well of 2 N H_2SO_4. A standard positive control (sera from immune animals), a negative control (sera of normal animals) and a control of the plate were also used. Absorbance was determined at with an ELISA reader (Expert Plus, Asys Hitech GMBH, Eugenorf, Austria). Results were expressed as arbitrary units (U.A.), the positive control being considered as 1000 units.

2.7 Dosage IgA

After euthanasia of the animals by cervical displacement, the small intestine was removed. The contents were withdrawn, weighed and washed with phosphate saline, pH 7.2, supplemented with protease inhibitors (1 µM aprotinin, 25 µM leupeptin, 1 µM pepstatin and 1 mM PMSF), in the ratio of 2.0 ml PBS for every 500 mg of intestinal contents. After centrifugation at 9,000 g (Hermle Z 323 K, Germany) for 30 minutes at 4ºC, the supernatant was collected and frozen at -80ºC for further dosing of immunoglobulin A. Total intestinal fluid secretion was determined using anti-mouse IgA antibodies developed in goat (M-8769, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) for plate coating and peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgA antibodies (A-4789, Sigma) for detection. The concentration of total sIgA was determined using a purified IgA standard (0106-01, Southern Biotechnology Associates, Birmingham, USA). The reading was made at 492 nm on a microplate reader (Spectromax M3, Molecular

Devices Inc., Sunnyvale, USA), and the concentration of sIgA was given in µg / ml of intestinal fluid (PABST, 2012).

2.8 Determination of intestinal permeability

For the determination of intestinal permeability animals received by oral administration 0.1 mL of DTPA (diethylenetriaminepenta acetic acid) labeled with 18.5 MBq ^{99m}technetium. Four hours after gavage, animals were anesthetized and 500 µL of blood was collected and placed in appropriate tubes for radioactivity determination using an automated gamma counter (Perkin Elmer, Wallac Wizard 1470-020, Cary, NC, USA). Data were expressed as % dose, using the following equation: % dose = [(cpm of blood/cpm of administered dose)] × 100, according to Andrade *et al.* [8].

2.9 Histological analysis of the small intestine

After euthanasia, small intestines were isolated and opened along the anti-mesenteric border, and the luminal contents were gently removed. Subsequently, the tissue was prefixed in Bouin's fixative for 30 minutes, rolled to form "Swiss rolls" and fixed for an additional 18 to 20 hours in 4% buffered formaldehyde as previously described [9]. The material was then processed for paraffin inclusion and sections of 4 µm of each sample were stained with hematoxylin and eosin (HE). The microscopic slides were analysed by a single pathologist who was unaware of the experimental conditions of each group and the mucosal and muscular lesions were evaluated using a histopathological grading system described elsewhere [10]. Histopathological scores: normal histological findings (score 0); Mucosa presenting mild mucosal edema and little or no inflammatory infiltrate (score 1); Mucosa presenting mild inflammatory infiltrate (lymphocyte and eosinophil) and increased mucus production, 10% decrease of intestinal villus height, crypts presenting slight hypertrophy of Paneth cells, submucosa without cellular or vascular alterations (score 2); Mucosa presenting inflammatory infiltrate (lymphocyte and eosinophil) and increased mucus production from mild to moderate, 15% decrease of intestinal villus height, crypts presenting mild to moderate hypertrophy of Paneth cells, submucosa without cellular or vascular alterations (score 3); Mucosa presenting moderate inflammatory infiltrate (lymphocyte and eosinophil) and increased mucus production, 20% decrease of

intestinal villus height, crypts presenting moderate hypertrophy of Paneth cells, submucosa with mild inflammatory infiltrate and dilated vessels (score 4); Mucosa presenting inflammatory infiltrate (lymphocyte and eosinophil) and moderate to severe increase of mucus production, 25% decrease of intestinal villus height, crypts presenting moderate to severe Paneth cell hypertrophy, submucosa with slight inflammatory infiltrate and dilated vessels (score 5); Mucosa presenting intense inflammatory infiltrate (lymphocyte and eosinophil) and increased mucus production, 30% decrease of intestinal villus height, crypts showing evident hypertrophy of Paneth cells, submucosa with moderate inflammatory infiltrates and dilated vessels (score 6).

2.10 Determination of intestinal myeloperoxidase and eosinophil peroxidase activities

The extent of neutrophil accumulation was measured in jejunum samples by determining MPO activity, as described previously by Elian *et al* [11]. For MPO quantification 100 mg of jejunum were homogenized in 1.9 mL of phosphate buffer saline (PBS) and centrifuged at 12,000 *g* for 10 minutes. The supernatant was discarded, and the cells were lysed. The samples were then centrifuged, the supernatant discarded, and the pellet resuspended in 1.9 mL of 0.5% hexadecyltrimethyl ammonium bromide (HTAB) in PBS, followed by three cycles of freezing in liquid nitrogen, and finally centrifuged at 12,000 *g* at 4°C for 10 minutes. The supernatant was used for the enzymatic assay with the addition of an equal amount of substrate (1.5 mM/L o-phenylenediamine and 6.6 mM/L of H_2O_2 in 0.075 mM/L Tris-HCl pH 8.0). The reaction was stopped with 50 μL of 1 M H_2SO_4, and the absorbance was read at 492 nm in a microplate spectrophotometer (Spectramax M3, Molecular Devices, LLC., Sunnyvale, CA, USA). The extent of eosinophil infiltration was also evaluated in jejunum samples by determining EPO activity. For EPO quantification, 100 mg of jejunum were homogenized in 1.9 mL of PBS and centrifuged at 12,000 g for 10 minutes [12]. After centrifugation, supernatant was removed and the pellet was resuspended in 1.9 mL of 0.5% HTAB in PBS saline. The samples was frozen in liquid nitrogen three times and centrifuged at 4ºC and 12,000 g for 10 minutes. Then, 75 µL of supernatant was added to 75 µL of OPD (*o*-phenylenediamine dihydrochloride) diluted in Tris-HCl and H_2O_2 and incubated at 37

ºC for 30 minutes. The reaction was stopped by adding 50 µL of 1 M H_2SO_4 and absorbance determined at 492 nm in a microplate spectrophotometer (Spectramax M3).

2.11 Determination of CXCL-1/KC and CCL11/Eotaxin-1

Chemokine level was determined by ELISA as described by Elian *et al*. [11] in jejunum samples using commercially available antibodies and according to manufacturer instructions (R&D Systems). The jejunum tissue (100 mg) was homogenized in PBS (0.4 M NaCl and 10 mM $NaPO_4$) containing anti-proteases (0.1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 0.1 mM benzethonium chloride, 10 mM EDTA and 20 kallikrein inhibitor units of aprotinin A) and 0.05% Tween 20. Samples were centrifuged for 10 minutes at 3,000 *g* and the supernatant immediately used for ELISA assays.

2.12 Determinations of cytokines in the jejunum

To evaluate the expression of cytokines, fragments of the small intestine (proximal jejunum) with approximately 100 mg were resuspended in 1 ml of cytokine extraction solution (PBS containing an anti-protease cocktail: 0.1 mM PMSF, 0.1 mM benzethonium chloride, 10 mM EDTA and 20 KI aprotinin A) and 0.05% Tween 20. The homogenates were then centrifuged at 4ºC for 10 minutes at 10,000 g (Eppendorf 5430 R, São Paulo, SP, Brazil). Supernatants were immediately collected and stored at -80 °C for further cytokine analysis. Cytokine determination was performed by using ELISA kits for cytokines and chemokines (DuoSet, R & D Systems, Minneapolis, MN, USA) and following manufacturer's instructions [13].

2.13 Evaluation of the composition of the intestinal microbiota in food allergy after probiotic treatment by culture-dependent method

Stool samples were collected aseptically on the last day of the allergen challenge and weighed and added to PBS at an initial dilution of 10^{-2}, following the serial dilution up to the order of 10^{-8}. Aliquots were plated in rich and differential media to evaluate the composition of the cultured intestinal microbiota. Dilutions 10^{-6} and 10^{-8} were used for plating of the media incubated in anaerobiosis [Supplementary Blood Agar (Brain Heart Infusion base supplemented with hemin, menadione and yeast

extract) for analysis of total anaerobic microorganisms; Agar of Mann, Rogosa and Sharp (Agar MRS), for analysis of the presence of lactic acid bacteria]. Dilutions 10^{-4} and 10^{-6} were used for plating the media incubated in aerobiose (Simple Brain Agar Base for analysis of total aerobic microorganisms); Agar MacConkey for analysis of the presence of Enterobacteria); Brain Heart Infusion Agar (BHI) with azide for analysis of the presence of Enterococcus); Agar mannitol for analysis of Staphylococcus and Sabouraud Agar with chloramphenicol for yeast analysis]. Means for evaluating aerobic microorganisms were incubated at 37 ° C for 24 h and those for anaerobes were incubated at 37 ° C for up to 7 days. The count was expressed in Log^{10} UFC / g feces.

2.14 Statistical analysis

Results are expressed as means with standard errors for each group. Data were submitted to analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test (parametric data) or Newman-Keuls test (non-parametric data) using the GraphPad Prism 6.00 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Results were considered statistically different for at least $p<0.05$.

3. Results

Bifidobacterium longum 5^{1A} prevented body weight loss and decreased consumption of food during ovalbumin-induced allergy in mice

The consumption of OVA diet and weight loss are features by allergic mice in our experimental model [8] and figure 1A confirms that the consumption of OVA diet by OVA sensitized mice caused these signals. Oral treatment with *B. longum* 5^{1A} prevented both signals reducing significantly the decrease in feed intake and reduced the body weight loss ($p<0.05$).

Bifidobacterium longum 5^{1A} reduced IgE serum levels during ovalbumin-induced allergy in mice

As predicted by our experimental model of food allergy, sensitized mice showed higher serum anti-OVA IgE levels in comparison to non sensitized animals. However,

levels of specific IgE in mice treated with *B. longum* 5^{1A} were significantly decreased in comparison to non treated sensitized mice ($p<0.05$) (Figure 1B).

***Bifidobacterium longum* 5^{1A} reduced IgA levels during ovalbumin-induced allergy in mice.**

As predicted by our experimental model of food allergy, sensitized mice had higher IgA levels compared to non-sensitized animals. However, IgA levels in mice treated with *B. longum* 5^{1A} were significantly reduced compared to the sensitized and untreated mice ($p<0.05$) (Figure 1C).

***Bifidobacterium longum* 5^{1A} preserved functional and morphological changes induced by the ingestion of OVA diet by OVA sensitized mice.**

The ingestion of OVA diet by sensitized mice induced increased percentage of labeled DTPA in the blood, which means changes in intestinal epithelium integrity and increased intestinal permeability. This changes were not observed in treated *B. longum* 5^{1A} mice. (Fig. 1D). Additionally, histopathological analysis of the small intestine (Figs. 2C, D and E) showed that mice in the sensitized group, feed with OVA diet, had inflammatory infiltrate, predominantly of lymphocytes and eosinophils. Discrete increase in the number of goblet cells and increase in the activity of Paneth cells evidenced by the increase in the number and size of the eosinophilic granules were also observed. The submucosa presented moderate inflammatory infiltrate and some dilated vessels, and the villi presented mild to moderate height reduction (histological score 5). These lesions were reduced in allergic mice treated with *B. longum* 5^{1A} as demonstrated by mild inflammatory infiltrate with a slight increase in mucus, and also a discrete reduction in villi and Paneth cell activity (Fig. 2F). In this group, as well as in the control, there were no cellular or vascular changes in the sub layer (histological score 2). Control group mice, as well as group receiving only *B. longum* 5^{1A} (Figs. 2A and B) showed preservation of the intestinal mucosa with intact villi, continuous epithelium, normal proportion of goblet cells/enterocytes and regular intraepithelial/enterocyte lymphocytes, thin lamina propria, absence of edema, and crypts with normal cellularity and size (histological score 0). These results were resumed in figure 2G which shows a reduction of injury score in allergic mice treated with *B. longum* 5^{1A} when compared to Sensitized group ($p<0.05$).

***Bifidobacterium longum* 5^{1A} reduced EPO and MPO activity levels, CCL11/Eotaxin-1 and CXCL1/KC during ovalbumin-induced allergy in mice**

The leukocyte infiltration was also determined by the dosage of eosinophilic peroxidase (EPO) and myeloperoxidase (MPO), an indirectly parameter which reflects the infiltrate of eosinophils and neutrophils in the intestinal mucosa, respectively [14,15,16]. Figure 5 shows an increase in both EPO and MPO activities in Sensitized animals when compared to CTL and BL 5^{1A} groups. When allergic animals were treated with *B. longum* 5^{1A}, both MPO and EPO were significantly reduced ($p<0.05$), reaching basal levels for the second enzymatic activity. CCL11/Eotaxin-1 selectively recruits eosinophils, whereas CXCL1/KC has neutrophil chemoattractant activity. Similarly, a reduction of the CXCL1/KC and CCL11/Eotaxin-1 chemokine levels was observed in the jejunum of the *B. longum* 5^{1A} treated group when compared to Sensitized animals (Fig. 3).

***Bifidobacterium longum* 5^{1A} altered jejunal levels of IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 and TNF cytokines during ovalbumin-induced allergy in mice**

To assess whether inflammation in the proximal jejunum of allergic mice would be associated with altered local production of cytokines, levels of IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 and TNF were determined by ELISA technique in this tissue. Levels of pro-inflammatory cytokines were all increased in Sensitized group (Figs. 4A, B, C, E and F) when compared to CTL and BL 5^{1A} groups, and these levels were statistically reduced when allergic mice were treated with *B. longum* 5^{1A} ($p<0.05$). On the other hand, the levels of anti-inflammatory cytokine IL-10 were significantly increased only in both groups treated with *B. longum* 5^{1A}, and sensitized or not ($p<0.05$) (Fig. 4D).

***Bifidobacterium longum* 5^{1A} alters the intestinal microbiota during ovalbumina-induced food allergy in mice**

In food allergy, the number of Enterobacteria (Figure 5A), although not statistically demonstrated, was reduced when administered to *B. longum* 5^{1A} in relation to the control group, demonstrating that the probiotic is capable of reducing enterobacteria levels in dysbiosis.

In the Enterococcus genus (Figure 5B) there was a statistically significant reduction when administered the probiotic at concentrations of 10^8 UFC / mL of *B. longum* 5^{1A}.

This result may demonstrate that the action of bifidobacteria may be due to something secreted by it or some function on its wall.

In the total anaerobic count (Figure 5C) no reduction or increase was observed with the use of *B. longum* 5^{1A} in the treated groups. A reduction of this genus in the sensitized group was observed in the count of lactic bacteria (Figure 5D) and a statistically significant increase when administered to *B. longum* 5^{1A}, an important result, since bacteria of this species are beneficial to the host and participate actively in the modulation of the immune system and protection of the intestinal epithelium.

In the genus *Staphylococcus* (Figure 5E) there was a reduction of this group of microorganisms in diseased animals that did not receive treatment, whereas when treated with *B. longum* 5^{1A} there is a significant increase of this genus. One hypothesis for this result would be to later evaluate which type of *Staphylococcus* is involved in this process, because in certain pathologies there is a predominance of one gender in relation to the other.

On the other hand, yeast count (Figure 5F), although not statistically demonstrated, increased in the group of untreated mice, and when treated with *B. longum* 5^{1A}, that count decreased. This inverse relationship between the genus *Staphylococcus* and yeasts may be related.

4. Discussion

Our group has been involved in the study and development of probiotic microorganisms for more than a decade, and among them, *B. longum* 5^{1A} has presented an incredible variety of probiotic characteristics. In particular, *B. longum* 5^{1A} has been shown to be effective in reducing inflammation in experimental gout and ovalbumin-induced asthma control in murine models [4,5]. The major marker for most immediate hypersensitivity reactions, known as allergy or atopy, is the increased production of isotype E (IgE) immunoglobulin [24]. In a first phase, called induction, allergic sensitization occurs when the contact with the antigen mobilizes cells of the immune system that lead to the activation of B lymphocytes and production of IgE, which is released into the bloodstream and binds with high affinity to the receptors present on the surface of mast cells and basophils, sensitizing them [17]. From this sensitization, a new exposure to the antigen initiates the effector phase, where mast

cells, sensitized by IgE, bind to the antigen through crosslinking and degranulation, releasing histamine, prostaglandins and other lipid mediators that will trigger the allergic process. In the present study, oral challenge and OVA sensitization induced increased concentrations of anti-ovalbumin IgE in serum, which was inhibited when treated with *B. longum* 5^{1A} at 10^8 CFU / mL. In untreated mice, the induction of food allergy also induced increased permeability, which is associated with desquamation of the intestinal mucosa and relaxation of the intercellular junctions [17]. The ingestion of macromolecules such as ovalbumin further aggravates the allergic reaction, inducing the release of histamine and lipid mediators that promote increased vascular permeability leading to electrolyte imbalance, with loss of ions and water, causing diarrhea [18]. As expected in the present study, body weight loss and reduction in feed intake after antigen exposure were observed in the sensitized group. The loss of body weight may be associated with reduced feed intake, more intense inflammation of adipose tissues and a greater tendency to lose fat, due to the high caloric expenditure during the inflammatory process. The reduction in feed intake and consequent weight loss are phenomena that have already been studied and have been strongly related to the increase in serum IgE levels, intestinal discomfort caused by diarrhea, bleeding and increased levels of some cytokines [22 23]. However, when treated with *B. longum* 5^{1A} at 10^8 CFU / mL, weight loss was reduced and feed intake was maintained, which may be associated with the previous effect of *B. longum* 5^{1A} on the specific production of IgE. Mice sensitized with OVA had statistically significant higher IgA levels when compared to control animals. Sensitized groups treated at the doses of $1x10^8$ and $1x10^6$ CFU / mL of *B. longum* 5^{1A} had significantly lower levels of IgA (similar to the control group) when compared to the untreated sensitized groups. The mice treated with *B. longum* 5^{1A} in the doses of $1x10^6$ and $1x10^8$ inactivated UFC/ mL did not present a statistically significant reduction in IgA production in relation to the sensitized group without treatment.

The breakdown of intestinal permeability integrity may involve histamine from mast cells [41] and serotonin from enterocromaffin cells [42]. In addition, in allergic mice, intestinal TNF was observed, which may be associated with increased rate of cell spread and increased permeability [43]. Haub et al [44] demonstrated the role of IL-10 in intestinal permeability by deletion of the serotonin reuptake transporter. As noted in this study, oral administration of *B. longum* 5^{1A} was able to induce intestinal

IL-10 production, restore intestinal permeability, prevent tissue inflammatory damage and production of intestinal TNF levels in ovalbumin-induced allergic mice. Such a finding has been observed in other studies in models of inflammatory bowel disease with the use of other probiotics [19,20,21] and in this study may be involved in the reduction of specific levels of IgE induced by *B. longum* 5^{1A}. Besides the functional alterations, we can observe morphological alterations in the allergic processes. When the histopathological analysis of the small intestine of the sensitized mice was carried out, the presence of inflammatory infiltrates and increase of the lamina propria were observed when compared to the CTL mice. These characteristics are typical of an intestinal inflammation after oral challenge with OVA. The control group treated only with *B. longum* 5^{1A} showed a slight increase in the number of goblet cells. When the mice were sensitized and treated with *B. longum* 5^{1A}, a protection of the intestinal epithelium, as demonstrated by the preservation of the villi, as well as by serous and muscular layers arranged regularly, without cellular infiltration.

Another important characteristic of the OVA food allergy, proven by biochemical tests, is the increase of eosinophil and neutrophil infiltrates in the intestinal mucosa of allergic groups when compared to the control groups. The large infiltrate of eosinophils and neutrophils is also observed in other types of diseases such as asthma, resulting from late allergic reactions and contributing to many pathological processes in diseases of immediate hypersensitivity [25]. Eosinophils are actively present in the inflammatory bowel process, inducing production of proinflammatory cytokines and CCL11/ Eotaxin-1, and EPO activity, which have antibacterial properties [26], whereas neutrophil recruitment increases the production of chemokines by modifying permeability intestinal [27].]. Increased levels of neutrophils, eosinophils, CXCL1 / KC and CCL11 / Eotaxin-1 in the jejunal mucosa of sensitized mice, and these findings may explain the histological damage and increased intestinal permeability observed in this group. The beneficial effect of treatment with *B. longum* 5^{1A} was confirmed by the reduced levels of neutrophils, eosinophils and chemokines CXCL1 / KC and CCL11 / Eotaxin-1 found in the intestinal mucosa of BL 5^{1A} animals. All of these results may be related to the ability of BL 5^{1A} treatment to reduce IgE production and these results are in accordance with the investigation of Th2 cytokine levels.

The study clearly demonstrates that the reduction in IL-4 levels should be the main mechanism of the probiotic, since the reduction of this cytokine together with IL-13 will also decrease IgE. IL-4 produced by T lymphocytes is essential for the development of lymphocytes involved in the Th2-type response, whereas IL-4 released by mast cells and basophils may amplify already established responses of this type [31]. This cytokine has been strongly associated with food allergy due to its relation with the exchange of IgE isotypes. When analyzed in this study, IL-4 levels were increased in the gut of sensitized animals compared to baseline levels of CTL animals. This increase was expected due to the use of aluminum hydroxide as adjuvant in the immunization of the animals, since this compound induces the production of IgE through an IL-4 dependent mechanism [32]. When allergic animals received *B. longum* 5^{1A}, IL-4 secretion was reduced, again demonstrating its protective effect against the inflammatory process. As for IL-4, treatment with *B. longum* 5^{1A} was able to significantly reduce IL-13 levels in allergic animals. An increase in IL-13 expression has been described in allergic processes following challenge with antigen, and this cytokine has much biological and biochemical similarity to IL-4, due to a similar structure of its receptors. Similar to IL-4, IL-13 acts on the synthesis of B lymphocytes and IgE, prolonging the survival of mast cells in tissues and also promoting the selective recruitment of eosinophils.

With the reduction of these two cytokines (IL-4 and IL-13), consequently, fewer mast cells will be degranulated, reducing the secretion of proinflammatory cytokines IL6 and TNF. Delano and Moldawer [36] reported that changes associated with cachexia include anorexia, body weight loss, loss of muscle and lipid mass, metabolic abnormalities and anemia. In cancer patients, weight loss is associated with elevated levels of TNF and IL-6 [37]. The high levels of these cytokines lead to a clinical picture similar to that observed in our model, not only for the loss of body weight, but also for the weakened appearance and decrease of the adipose tissue observed in allergic animals 36. In our study, we observed a significant increase in TNF and IL-6 after antigen intake by sensitized animals and, once treated with *B. longum* 5^{1A}, levels of these cytokines were reduced. Although the mechanisms that lead to this situation are not clear, there is a great amount of evidence suggesting the involvement of several neurological, metabolic, immunological and endocrine factors [38].

Another important analysis in this study was the reduction of IL-5 in the groups treated with Bifido. The reduction of this proinflammatory cytokine corroborates with the decrease in the number of eosinophils already demonstrated in this discussion. When stimulated Th2 lymphocytes produce cytokines, such as IL-5, there is increased production of eosinophils in the bone marrow that are subsequently released into the bloodstream and attracted to sites of inflammation by chemotactic factors such as eotaxin. Once installed, these granulocytes release cytotoxic mediators, such as major basic protein, eosinophil cationic protein and peroxidase, in addition to other mediators inflates matrices capable of inducing the production of adhesion molecules. These compounds increase vascular permeability and mucus production and act as antigen-presenting cells, promoting the increase of Th2 cells in inflamed tissues, exacerbating the inflammatory process [25,28,29,30]. As expected, there was an increase in IL-5 production in the intestinal tissues of the sensitized group, since it has been suggested that this cytokine can induce eosinophilic infiltration into the intestinal mucosa in murine models of food allergy [34]. In vitro secretion of IL-5 by mast cells after binding of IgE to the high affinity receptor has been described [35].

In the group that received *B. longum* 5^{1A} as treatment, the levels of this cytokine were reduced.

After demonstrating the efficacy of *B. longum* 5^{1A} in the reduction of various cytokines involved in the allergic process, the cytokine IL-10, the main regulatory cytokine in inflammatory processes, was analyzed. IL-10 has an anti-inflammatory character and its elevation characterizes an attempt to resolve the inflammatory process. As described by Hawrylowicz & O'Garra [39], not only produced by Th2 cells, but also by Th1 cells, macrophages, T cells, among others, IL-10 is a cytokine that inhibits the production of other proinflammatory cytokines. With the ability to modulate cellular functions in various diseases as well as in food allergy, IL-10 has the ability to inhibit the activation of Th2 cells and, consequently, inhibits the function of eosinophils, mast cells and isotype exchange by IgE by cells B. As was imagined, in this study with the administration of *B. longum* 5^{1A}, a significant increase in IL-10 secretion has been demonstrated. This cytokine is involved in several parameters of allergic response, from the production of IgE to the effects of inflammatory mediators. This increase in IL-10 levels corroborates with the study by Zhang et al. [40], who

observed in allergic animals treated with a strain of Bifidobacterium, that IL-10 levels were significantly higher when compared to the untreated group. Hawrylowicz and O'Garra [39] also described in their study an inverse relationship between IL-10 levels and the severity of allergic diseases. A possible hypothesis of the mechanism of *B. longum* 5^{1A} may be associated with the production of IL-10 as a resolution of the inflammatory process in allergy.

More than 99% of the intestinal microbiota is composed of species that are part of four bacterial phyla: *Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria* and *Actinobacteria*. In the proximal small intestine prevails Gram-positive and aerobic species; while in the distal portion Gram-negative species predominate. In contrast to the ileocecal valve, the concentration of bacteria increases drastically, the colon being the region of the TGI more densely populated by bacteria (mainly *Bacteroides, Bifidobacteria, Fusobacteria, Clostridia* and *Peptostreptococci*) [45]. Under normal conditions, host and commensal microorganisms establish a symbiotic relationship. However, this relationship can easily be jeopardized by mild disturbances of the normal microbiota (qualitative and quantitative changes of the microbiota and changes in its metabolic activity), resulting in negative effects on the host. This condition is known as dysbiosis, which can lead to inflammation and lesion of mucosal tissue. In food allergy, which also results in an inflammation of the intestinal epithelium, this ratio of host microorganisms can be modified resulting in increased intestinal permeability, as the intestine becomes less selective to absorb some substances. Little described and unknown, the relationship between the microbiota and the food allergy still requires a great deal of research in order to unravel the mechanisms involved in this process.

In the food allergy, the number of enterobacteria, although not statistically demonstrated, was reduced when administered at the concentration of 10^8 CFU / mL of *B. longum* 5^{1A} in relation to the control group, demonstrating that the probiotic is able, in dysbiosis, to reduce levels of enterobacteria. In the *Enterococcus* genus there was a statistically significant reduction when administered the probiotic at 10^8 and 10^8 inactivated UFC/ mL of *B. longum* 5^{1A}. This result may demonstrate that the action of bifidobacteria may be due to something secreted by it or some function on its wall. In the total anaerobic count no reduction or increase was observed with the use of *B. longum* 5^{1A} in the treated groups. A reduction of this genus in the sensitized

group was observed in the lactic acid bacteria count and a statistically significant increase when administered to *B. longum* 5^{1A} at a concentration of 10^8 CFU / mL, a result because the bacteria of this genus are beneficial to the host and actively participate in the modulation of the immune system and protection of the intestinal epithelium. In the genus *Staphylococcus* a reduction of this group of microorganisms was observed in diseased animals that did not receive treatment, whereas when treated with *B. longum* 5^{1A} there was a significant increase of this genus. One hypothesis for this result would be to later evaluate which type of *Staphylococcus* is involved in this process, since in certain pathologies there is a predominance of one gender in relation to the other. Conversely, the yeast count, although not statistically demonstrated, increased in the untreated patient group, and when treated with *B. longum* 5^{1A}, that count decreased. This inverse relationship between the genus *Staphylococcus* and yeasts may be related.

5. Conclusion

In conclusion, the present study showed that oral administration of *B. longum* 5^{1A} protected mice against the inflammatory effects associated with ovalbumin-induced food allergy. *B. longum* 5^{1A} had a positive effect on intestinal permeability and protected the intestinal epithelium against tissue damage through a reduce leukocytes recruitment and a simultaneous decrease in pro-inflammatory cytokines and increase of anti-inflammatory cytokine.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES). The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript. SSS received a PhD fellowship from CAPES and DCC, VNC, JRN and FSM are CNPq fellowship holders.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Sicherer, S.H. & Sampson, H.A. (2010) Food allergy. J Allergy *Clin Immunol*, 125, S116-S125. doi.org/10.1016/j.jaci.2009.08.028.

2. Portelli, M. A., Hodge, E., & Sayers, I. (2015). Genetic risk factors for the development of allergic disease identified by genome-wide association. Clin Exp Allerg, 45, 21-31. doi.org/10.1111/cea.12327

3. Pothoulakis, C. (2009) Review article: anti-inflammatory mechanisms of action of *Saccharomyces boulardii*. Aliment Pharmacol Ther, 30, 826-833. doi.org/10.1111/j.1365-2036.2009.04102.x.

4. Vieira, A. T., Galvao, I., Amaral, F. A., Teixeira, M. M., Nicoli, J. R., & Martins, F. S. (2015). Oral treatment with *Bifidobacterium longum* 51A reduced inflammation in a murine experimental model of gout. Benef Microbes, 6, 799-806. doi.org/10.3920/BM2015.0015

5. Mendes, E., Acetturi, B. G., Thomas, A. M., Martins, F. D. S., Crisma, A. R., Murata, G., ... & Ribeiro, W. R. (2017). Prophylactic supplementation of *Bifidobacterium longum* 51A protects mice from ovariectomy-induced exacerbated allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness. Front Microbiol, 8, 1732. doi.org/10.3389/fmicb.2017.01732

COBEA. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (2006) Legislação e Ética. Available in http://www.cobea.org.br. Access in: 01/12/2018.

6. Kwon, H. S., Yang, E. H., Lee, S. H., Yeon, S. W., Kang, B. H., & Kim, T. Y. (2005). Rapid identification of potentially probiotic *Bifidobacterium* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. FEMS Microbiol Lett, 250, 55-62. doi.org/10.1016/j.femsle.2005.06.041

7. Dourado, L. P. A., Noviello, M. D. L. M., Alvarenga, D. M., Menezes, Z., Perez, D. A., Batista, N. V., & Cara, D. C. (2011). Experimental food allergy leads to adipose tissue inflammation, systemic metabolic alterations and weight loss in mice. Cell Immunol, 270, 198-206. doi.org/10.1016/j.cellimm.2011.05.008.

8. Andrade ME, Santos RD, Soares AD, Costa KA, Fernandes SO, de Souza CM, Cassali GD, de Souza AL, Faria AM, & Cardoso VN (2016) Pretreatment and treatment with l-arginine attenuate weight loss and bacterial translocation in dextran sulfate sodium colitis. J Parenter Enteral Nutr, 40, 1131–1139. doi:10.1177/ 0148607115581374

9. Arantes RME, Marche HHF, Bahia MT, Cunha FQ, Rossi MA, & Silva JS (2004) Interferon-γ-induced nitric oxide causes intrinsic intestinal denervation in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. Am J Pathol, 164, 1361–1368. doi:10.1016/j.pt.2016.08.009

10. Soares PMG, Mota JMSC, Gomes AS, Oliveira RB, Assreuy AMS, Brito GAC, Santos AA, Ribeiro RA, & Souza MHLP (2008). Gastrointestinal dysmotility in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. *Cancer Chemother Pharmacol,* 63, 91–98. doi:10.1007/ s00280-008-0715-9

11. Elian SD, Souza EL, Vieira AT, Teixeira MM, Arantes RM, Nicoli JR, & Martins FS (2015) *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* BB-02 attenuates acute murine experimental model of inflammatory bowel disease. Benef Microbes, 6, 277–286. doi:10.3920/ BM2014.0070

12. Strath M, Warren DJ, & Sanderson CJ (1985) Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. J Immunol Methods, 83, 209–215. doi:10.1016/ 0022-1759(85)90242-X

13. Martins FS, Elian SD, Vieira AT, Tiago FC, Martins AK, Silva FC, Souza EL, Sousa LP, Araújo HR, Pimenta PF, Bonjardim CA, Arantes RM, Teixeira MM, &

Nicoli JR (2011). Oral treatment with *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 modulates immune responses and interferes with signal pathways involved in the activation of inflammation in a murine model of typhoid fever. Int J Med Microbiol, 301, 359–364. doi:10.1016/j.ijmm.2010.11.002

14. Bischof, R. J., & Meeusen, E. T. (2002). Cellular kinetics of an allergic-type response in a sheep mammary gland model of inflammation. Clin Exp *Allergy*, 32, 619-626. doi.org/10.1046/j.0954-7894.2002.01345.x

15. Holgate, S. T., & Polosa, R. (2008). Treatment strategies for allergy and asthma. Nat Rev Immunol, 8, 218. doi: 10.1038/nri2262

16. Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G. L., Metzler, K. D., & Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil function: from mechanisms to disease. Annu Rev Immunol, 30, 459-489. doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074942

17. Stone, K. D., Prussin, C., & Metcalfe, D. D. (2010). IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. J Allergy Clin Immunol. 125, S73-S80. doi.org/10.1016/j.jaci.2009.11.017

18. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2005). Immunol Cel Mol. Elsevier Brasil. Rio de Janeiro: Elsevier. p. 576.

19. Justino PF, Melo LF, Nogueira AF, Costa JV, Silva LM, Santos CM, Mendes WO, Costa MR, Franco AX, Lima AA, Ribeiro RA, Souza MH, & Soares PM (2014) Treatment with *Saccharomyces boulardii* reduces the inflammation and dysfunction of the gastrointestinal tract in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. Br J Nutr, 111, 1611–1621. doi:10.1017/S0007114513004248

20. Bastos RW, Pedroso SHSP, Vieira AT, Moreira LMC, França CS, Cartelle CT, Arantes RME, Generoso SV, Cardoso VN, Neves MJ, Nicoli JR, & Martins FS (2016) *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG A-905 treatment reduces intestinal damage

in a murine model of irinotecan-induced mucositis. Benef Microbes, 7, 549–557. doi: 10.3920/ BM2015.0190

21. Tang Y, Wu Y, Huang Z, Dong W, Deng Y, Wang F, Li M, & Yuan J (2017) Administration of probiotic mixture DM#1 ameliorated 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis and dysbiosis in rats. Nutrition, 33, 96–104. doi: 10.1016/j.nut.2016.05.003

22. Cara, D. C., Conde, A. A., & Vaz, N. M. (1994). Immunological induction of flavor aversion in mice. Braz J Med Biol Res, 27, 1331-1341. doi.org/10.1046/j.1365-3083.1997.d01-363.x

23. Dourado, L. P. A., da Silva Saldanha, J. C., Gargiulo, D. L., Noviello, M. D. L. M., Brant, C. C., Reis, M. L. C., ... & Cara, D. C. (2010). Role of IL-4 in aversion induced by food allergy in mice. Cell Immunol, 262, 62-68. doi.org/10.1016/j.cellimm.2009.12.010

24. Ishizaka, T., & Ishizaka, K. (1978). Triggering of histamine release from rat mast cells by divalent antibodies against IgE-receptors. J Immunol, 120, 800-805.

25. Lukacs, N. W. (2001). Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. Nat Rev Immunol, 1, 108. doi: 10.1038/35100503

26. Vieira AT, Fagundes CT, Alessandri AL, Castor MGM, Guabiraba R, Borges VO, Silveira KD, Vieira ELM, Gonçalves JL, Silva TA, Deruaz M, Proudfoot AEI, Sousa LP, & Teixeira MM (2009) Treatment with a novel chemokine-binding protein or eosinophil lineage-ablation protects mice from experimental colitis. Am J Pathol, 175, 2382–2391. doi: 10.2353/ ajpath.2009.090093

27. Turner JR (2009). Intestinal mucosal barrier function in health and disease. Nat Rev Immunol, 9, 799–809. doi: 10.1038/ nri2653

28. Hogan, S. P., Mishra, A., Brandt, E. B., Foster, P. S., & Rothenberg, M. E. (2000). A critical role for eotaxin in experimental oral antigen-induced eosinophilic

gastrointestinal allergy. Proc Natl Acad Sci USA, 97, 6681-6686. doi.org/10.1073/pnas.97.12.6681

29. Rothenberg, M. E. (2001). Gastrointestinal eosinophils. Allergy, 56 Suppl 67, 21-2. doi.org/10.1034/j.1398-9995.2001.00905.x

30. Shi, H. Z. (2004). Eosinophils function as antigen-presenting cells. J Leuko Bio, 76, 520-527. doi.org/10.1189/jlb.0404228

31. Romagnani, S. (2000). The role of lymphocytes in allergic disease. J Allergy *Clin Immunol*, 105, 399-408. doi.org/10.1067/mai.2000.104575

32. Faquim-Mauro, E. L., & Macedo, M. S. (2000). Induction of IL-4-dependent, anaphylactic-type and IL-4-independent, non-anaphylactic-type IgG1 antibodies is modulated by adjuvants. Int Immunol, 12, 1733-1740. doi.org/10.1093/intimm/12.12.1733

33. Teixeira, L. K., Fonseca, B. P., Barboza, B. A., & Viola, J. P. (2005). The role of interferon-gamma on immune and allergic responses. Mem Inst Oswaldo Cruz, 100, 137-144. doi.org/10.1590/S0074-02762005000900024

34. Bae, S. J., Tanaka, Y., Hakugawa, J., & Katayama, I. (1999). Interleukin-5 involvement in ovalbumin-induced eosinophil infiltration in mouse food-allergy model. J Dermatol Sci, 21, 1-7. doi.org/10.1016/S0923-181 (98)00082-6

35. Bressler, R. B., Leskob, J., Jonesb, M. L., Wassermanb, M., Dickason, R. R., Huston, M. M., & Huston, D. P. (1997). Production of IL-5 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by naive human mast cells activated by high-affinity IgE receptor ligation. J Allergy *Clin Immunol*, 99, 508-514. doi.org/10.1016/S0091-6749 (97)70078-2

36. Delano, M. J., & Moldawer, L. L. (2006). The origins of cachexia in acute and chronic inflammatory diseases. Nutr Clin Pract, 21, 68-81. doi.org/10.1177/011542650602100168

37. Corcos, M., Guilbaud, O., Paterniti, S., Moussa, M., Chambry, J., Chaouat, G., & Jeammet, P. (2003). Involvement of cytokines in eating disorders: a critical review of the human literature. Psychoneuroendocrinology, 28, 229-249. doi.org/10.1016/S0306-4530 (02)00021-5

38. Plata-Salamán, C. R. (2000). Central nervous system mechanisms contributing to the cachexia–anorexia syndrome. Nutrition, 16, 1009-1012. doi.org/10.1016/S0899-9007(00)00413-5

39. Hawrylowicz, C. M., & O'Garra, A. (2005). Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. Nature Rev Immunol, 5, 271. doi: 10.1038/nri1589

40. Zhang, L. L., Chen, X., Zheng, P. Y., Luo, Y., Lu, G. F., Liu, Z. Q., ... & Yang, P. C. (2010). Oral *Bifidobacterium* modulates intestinal immune inflammation in mice with food allergy. J Gastroenterol Hepatol, 25, 928-934. doi.org/10.1111/j.1440-1746.2009.06193.x

41. Bischoff SC (2009). Physiological and pathophysiological functions of intestinal mast cells. Semin Immunopathol. 31:185–205. doi: 10.1007/s00281-009-0165-4

42. Bischoff SC, Mailer R, Pabst O, Weier G, Sedlik W, Li Z, Chen JJ, Murphy DL, Gershon MD (2009). Role of serotonin in intestinal inflammation: knockout of serotonin reuptake transporter exacerbates 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice. Am J Physiol.;296: G685–G695. doi: 10.1152/ajpgi.90685.2008

43. Kiesslich R, Goetz M, Angus EM, Hu Q, Guan Y, Potten C, Allen T, Neurath MF, Shroyer NF, Montrose MH, Watson AJ (2007). Identification of epithelial gaps in human small and large intestine by confocal endomicroscopy. Gastroenterology. Dec; 133(6):1769-78. doi.org/10.1053/j.gastro.2007.09.011

44. Haub S, Ritze Y, Bergheim I, Pabst O, Gershon MD, Bischoff SC (2010). Enhancement of intestinal inflammation in mice lacking interleukin 10 by deletion of

the serotonin reuptake transporter. Neurogastroenterol Motil. ;22:826–834. doi: 10.1111/j.1365-2982.2010.01479.x

45. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Nageshwar Reddy D (2015). Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology*; 21(29):8787-803. doi: 10.3748/wjg.v21.i29.8787

Figure legends

Figure 1. Evolution of body weight and food intake (A), Serum IgE (B), Evaluation of sIgA antibodies (C) and Intestinal permeability (D) in the following groups: (CTL / CTL) control mice; (BL 5^{1A} / CTL) mice treated with *B. longum* 5^{1A} at concentrations 10^8, 10^6, 10^4 and 10^8 inactivated UFC; (CTL / OVA) mice (sensitized) with OVA; (BL 51A / OVA) mice treated with B. longum 51A and sensitized with OVA after oral challenge of OVA. Vertical lines represent standard error. * indicates statistical difference in relation to your control ($p<0.05$; one-way ANOVA); ** indicates statistical difference in relation to allergic control ($p<0.05$; one-way ANOVA).

Figure 2. Histopathological analysis of the small intestine of mice not treated and not sensitized (A); mice treated with *B. longum* 5^{1A} (B); mice sensitized with OVA (C, D and E); and mice treated with *B. longum* 5^{1A} and sensitized with OVA (F), after OVA oral challenge. (G) Semi quantitative score of injury in the small intestine of mice treated BL 5^{1A} or not CTL with *B. longum* 5^{1A} and sensitized or not. Fine white arrows point to eosinophils, short thick arrow point to goblet cells and long thick arrow point to Paneth cells. * indicates statistical difference in relation to your control ($p<0.05$; one-way ANOVA); ** indicates statistical difference in relation to allergic control ($p<0.05$; one-way ANOVA). H&E.

Figure 3. Evaluation of MPO (A), EPO (B), concentrations of CXCL1/KC (C) and CCL11/Eotaxin-1 (D) activities in the jejunum of animals from the following groups: (CTL / CTL) control mice; (BL 5^{1A} / CTL) mice treated with B. longum 5^{1A}; (CTL / OVA) mice (sensitized) with OVA; (BL 5^{1A} / OVA) mice treated with B. longum 5^{1A} and sensitized with OVA after oral challenge of OVA. Vertical lines represent

standard error. * indicates statistical difference in relation to your control ($p<0.05$; one-way ANOVA); ** indicates statistical difference in relation to allergic control ($p<0.05$; one-way ANOVA).

Figure 4. Jejunal levels of IL-4 (A), IL-13 (B), IL-5 (C), IL-6 (D) TNF-α (E), and IL-10 (F) in the following groups: (CTL / CTL) control mice; (BL 5^{1A} / CTL) mice treated with B. longum 5^{1A}; (CTL / OVA) mice (sensitized) with OVA; (BL 5^{1A} / OVA) mice treated with B. longum 5^{1A} and sensitized with OVA after oral challenge of OVA. Vertical lines represent standard error. * indicates statistical difference in relation to your control ($p<0.05$; one-way ANOVA); ** indicates statistical difference in relation to allergic control ($p<0.05$; one-way ANOVA).

Figure 5. Evaluation of intestinal microbiota (A: Enterobacteria, B: *Enterococcus*, C: Total Anaerobes, D: Lactic acid bacteria, E: *Staphylococcus* and F: Yeast) after challenge with OVA-containing ration treated with *B. longum* 5^{1A} at doses of $1x10^8$, $1x10^6$, $1x10^4$, $1x10^8$ inactivated UFC / mL in the following groups: (CTL / CTL) control mice; (BL 5^{1A} / CTL) mice treated with B. longum 5^{1A}; (CTL / OVA) mice (sensitized) with OVA; (BL 5^{1A} / OVA) mice treated with B. longum 5^{1A} and sensitized with OVA after oral challenge of OVA. Vertical lines represent standard error. * indicates statistical difference in relation to your control ($p<0.05$; one-way ANOVA); ** indicates statistical difference in relation to allergic control ($p<0.05$; one-way ANOVA).

APÊNDICE B- FIGURAS DO ARTIGO

Figure 1

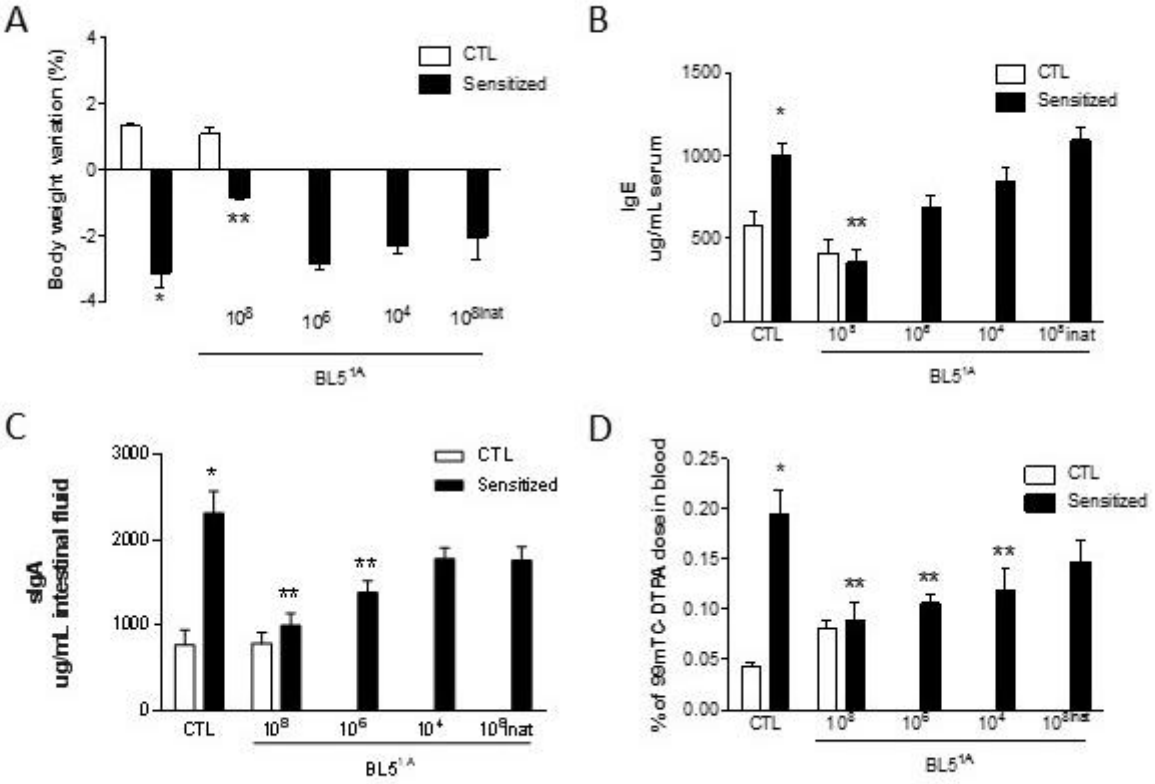
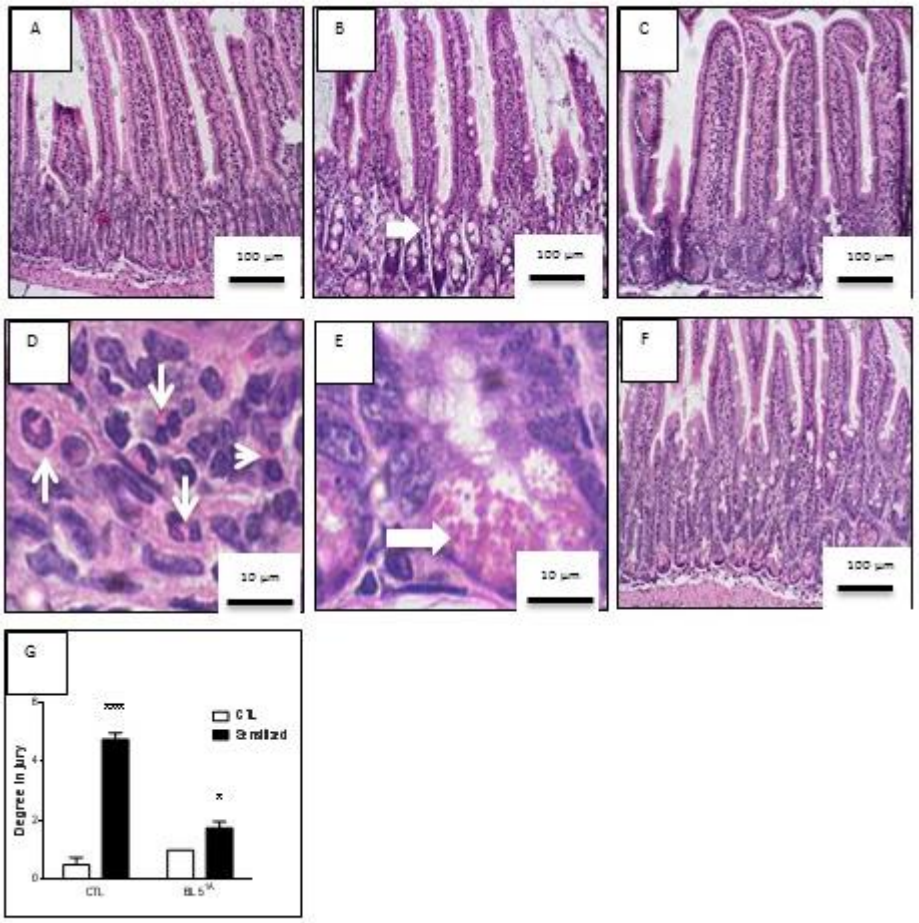

A
Body weight variation (%)
CTL
Sensitized
*
**
10^8
10^6
10^4
10^8inat
BL5^1A
B
IgE
ug/mL serum
CTL
Sensitized
*
**
CTL
10^8
10^6
10^4
10^8inat
BL5^1A
C
sIgA
ug/mL intestinal fluid
CTL
Sensitized
*
**
**
CTL
10^8
10^6
10^4
10^8inat
BL5^1A
D
% of 99mTc-DTPA dose in blood
CTL
Sensitized
*
**
**
**
CTL
10^8
10^6
10^4
10^8inat
BL5^1A

Figure 2



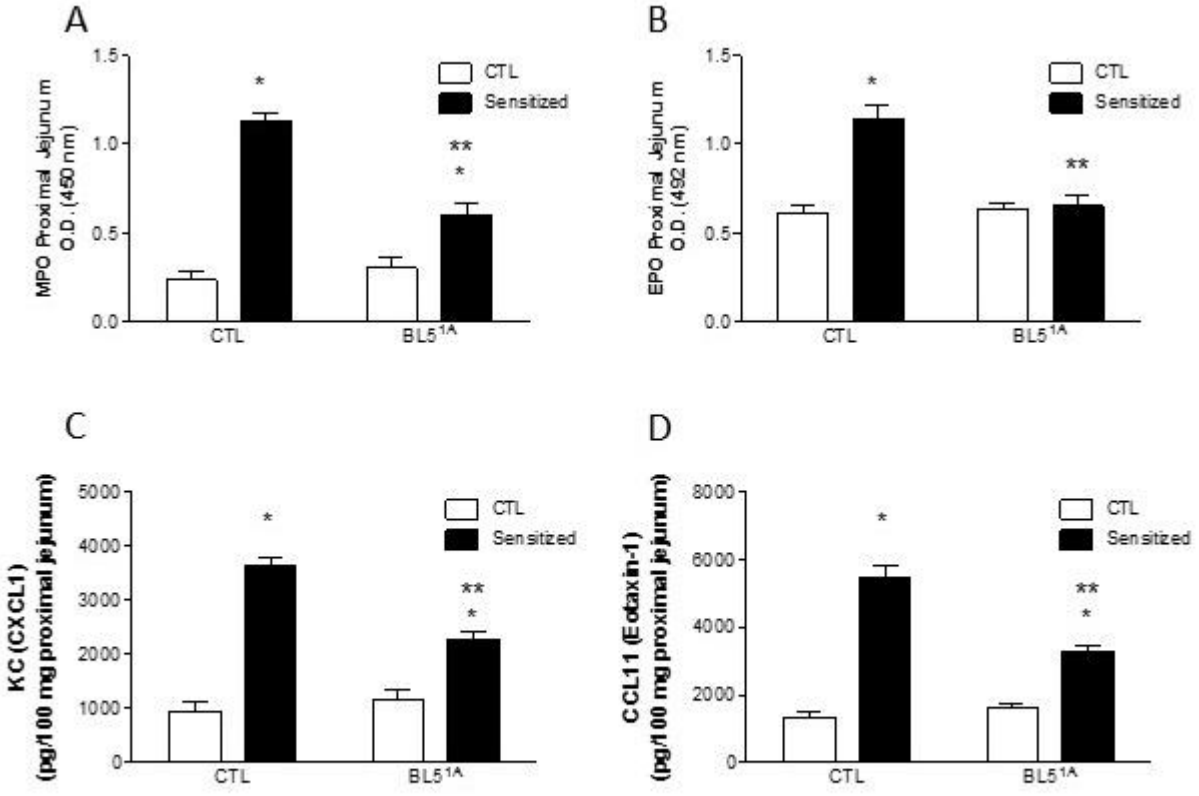

A
MPO Proximal Jejunum O.D. (450 nm)
1.5
1.0
0.5
0.0
CTL
Sensitized
*
**
*
CTL
BL5 1A
B
EPO Proximal Jejunum O.D. (492 nm)
1.5
1.0
0.5
0.0
CTL
Sensitized
*
**
CTL
BL5 1A
C
KC (CXCL1) (pg/100 mg proximal jejunum)
5000
4000
3000
2000
1000
0
CTL
Sensitized
*
**
*
CTL
BL5 1A
D
CCL11 (Eotaxin-1) (pg/100 mg proximal jejunum)
8000
6000
4000
2000
0
CTL
Sensitized
*
**
*
CTL
BL5 1A

Figure 3

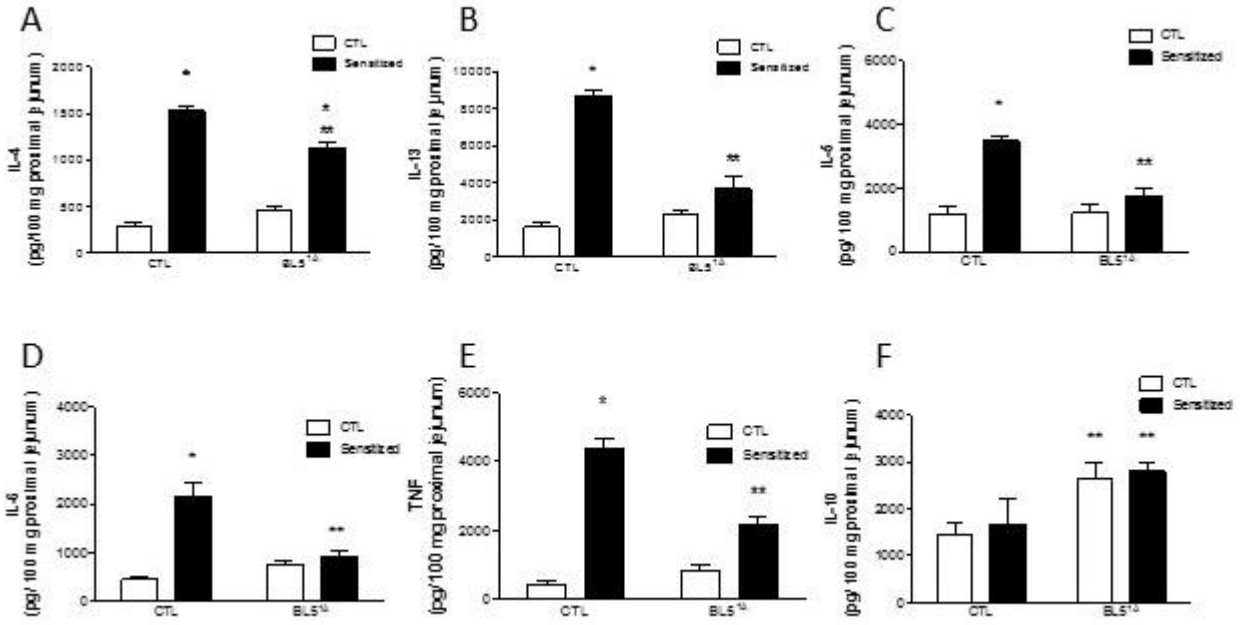

A
B
C
D
E
F
CTL
Sensitized
IL-4 (pg/100 mg proximal jejunum)
IL-13 (pg/100 mg proximal jejunum)
IL-6 (pg/100 mg proximal jejunum)
IL-6 (pg/100 mg proximal jejunum)
TNF (pg/100 mg proximal jejunum)
IL-10 (pg/100 mg proximal jejunum)
CTL
BL5^1J

Figure 4

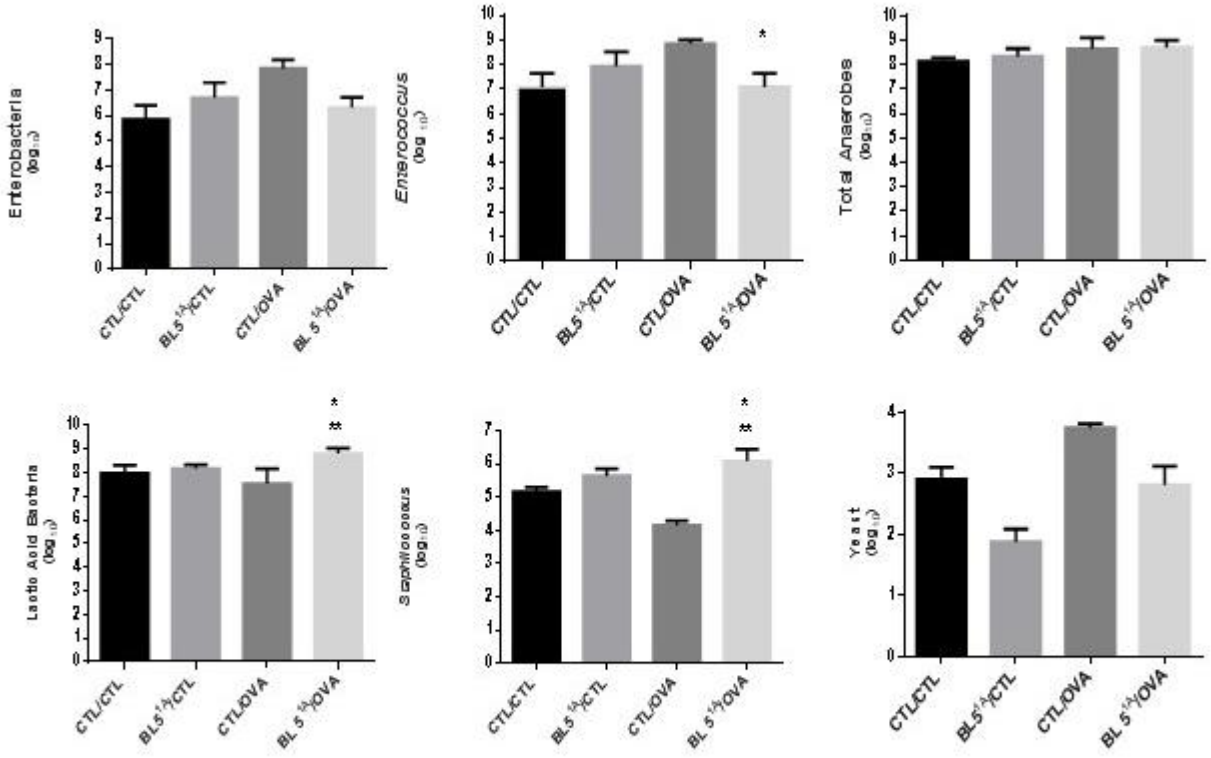

Enterobacteria
Enterococcus
Total Anaerobes
Lactic Acid Bacteria
Staphilococcus
Yeast
CTL/CTL
BL5 1A/CTL
CTL/OVA
BL 5 1A/OVA

Figure 5