

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Efeitos da Administração Oral de *Saccharomyces
cerevisiae* Linhagem UFMG A-905 em um
Modelo Murino de Doença de Crohn Induzida
por TNBS**

Spencer Silva Santos

Belo Horizonte/MG

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Efeitos da Administração Oral de *Saccharomyces
cerevisiae* Linhagem UFMG A-905 em um
Modelo Murino de Doença de Crohn Induzida
por TNBS**

Spencer Silva Santos

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientador

Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins

(Departamento de Microbiologia, ICB-UFMG)

Co-orientadora

Profa. Dra. Simone de Vasconcelos Generoso

(Departamento de Nutrição- Escola de Enfermagem-UFMG)

Belo Horizonte/MG

2015

LABORATÓRIOS ENVOLVIDOS E COLABORADORES

Laboratório de Agentes Bioterapêuticos, Departamento de Microbiologia, ICB/UFMG

-Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins

Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais

- Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins

- Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli

Laboratório de Patologia Comparada, Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais

- Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali

Apoio Financeiro:



“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espíritos, que nem vivem muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem a vitória, nem a derrota.”
(Theodore Roosevelt).

AGRADECIMENTOS

A **DEUS**, pelo amor único e verdadeiro, pelas graças, pela amizade verdadeira e por todo amor que ELE dedica a mim;

A minha **família**, por todo apoio, confiança e amor que depositaram em mim diante de todos os meus sonhos;

Aos meus pais **João** e **Marcia**, e aos meus irmãos **Tassio** e **Thiago** por todo amor, carinho e ajuda incondicional;

A minha avó **Lourdes** por todo carinho, amor e sabedoria doados a mim;

A minha irmã **Karise**, por todo amor e pelo maior presente que recebi, o meu sobrinho **Nícolas**;

Ao meu orientador **Flaviano dos Santos Martins** por ter sido a primeira pessoa a ter me proporcionado uma oportunidade de estágio dentro da UFMG, por ter acompanhado de perto toda minha trajetória acadêmica e por todo apoio, sempre estando pronto a me ajudar;

A minha co-orientadora **Simone de Vasconcelos** pelo apoio, ajuda, amizade e ensinamentos durante o desenvolvimento do meu trabalho;

A professora **Ana Silva** por todo apoio, amizade, suporte e disponibilidade nessa árdua trajetória;

A professora Dr.^a **Vera Lucia dos Santos**, por ter me recebido em seu laboratório, obrigado pelo incentivo e disponibilidade dos recursos do Laboratório de Microbiologia Aplicada do Departamento de Microbiologia da UFMG;

As amigas, **Ariane Martins**, **Luciana Mara**, **Éricka Lorena**, **Fabiana Pereira**, **Bárbara Abranches**, **Bruna Nascimento**, **Quésia Damasceno**, **Rafaela Avelar**,

Angélica Vieira e Caroline Leonel pela companhia, carinho, ajuda e apoio diante da difícil trajetória dentro da UFMG;

Ao professor **Jacques Nicoli** por todo apoio, disponibilidade e ensinamentos dedicados ao longo desse trabalho;

Aos amigos do **Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos**, ICB-UFMG;

Ao meu amigo/irmão **Galileu**, por toda amizade, ajuda e apoio nos momentos mais complicados de minha estadia em Belo Horizonte, sem a sua ajuda tudo seria muito mais complicado.

Aos Amigos do **LABio**, pelo apoio, amizade e auxílio durante todo tempo que precisei;

A secretaria do curso de pós-graduação da **Faculdade de medicina** e do **ICB-UFMG**;

Por fim, agradeço a todos que de certa forma participaram de toda minha trajetória pessoal e acadêmica, o meu muito Obrigado!

RESUMO

As Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) são um grupo de doenças crônicas de etiologia desconhecida que possuem duas formas principais de apresentação: a Doença de Crohn (DC) e a Reto-Colite Ulcerativa (RCU). A DC é caracterizada por inflamação crônica da mucosa, não curável por tratamento clínico ou cirúrgico e que acomete o trato gastrointestinal de forma uni ou multifocal, de intensidade variável e transmural. A introdução dos probióticos (micro-organismos vivos que quando ingeridos em quantidades suficientes, conferem um benefício à saúde do hospedeiro), tem-se mostrado eficaz no prolongamento do tempo de remissão da DC, permitindo uma melhora significativa na qualidade de vida dos indivíduos acometidos por essa patologia. Dentre as linhagens de probióticos existentes, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* linhagem UFMG A-905 foi capaz de reduzir a ação de alguns enteropatógenos e de prevenir aumento da permeabilidade intestinal em modelos de inflamação intestinal quando utilizada como probiótico. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito probiótico dessa levedura em modelo murino da DC induzida por ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS). Foram utilizados camundongos BALB/c, fêmeas, com indução da DC pelo TNBS (solução de TNBS 5% w/v) 10 dias após o início do tratamento com o probiótico. No quinto dia após a indução, os animais foram sacrificados e diferentes parâmetros avaliados. Observou-se uma melhora no grupo tratado com o probiótico nos sinais clínicos da doença em relação ao grupo não tratado. Na análise morfométrica e histopatológica, o efeito benéfico da levedura pode ser observado com redução da área inflamada. A permeabilidade intestinal estava aumentada no grupo TNBS, e reduzida de maneira significativa no grupo tratado com probiótico. A condição inflamatória foi reduzida significativamente quando a levedura foi administrada de maneira preventiva, com a diminuição dos sinais clínicos, do recrutamento de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos para o foco da inflamação e de citocinas pro-inflamatórias. Com esses resultados, conclui-se que o probiótico *S. cerevisiae* UFMG A-905 possui um efeito atenuante em modelo agudo da DC, sendo que mais estudos são necessárias para elucidar os mecanismos responsáveis por este efeito.

Palavras-chave: Doenças Inflamatórias Intestinais, Doença de Crohn, Ácido 2,4,6 Trinitrobenzenosulfônico, Probiótico, *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

The Inflammatory Bowel Diseases (IBD) are chronic diseases of unknown etiology that have two main forms of presentation: Crohn's disease (CD) and Ulcerative Colitis (UC). CD is characterized by chronic inflammation of the mucosa, not curable through clinical or surgical treatment that attacks the gastrointestinal tract unilaterally or multifocal, with a transmurial and variable intensity. CD results in a series of symptoms such as diarrhea, bloody stools, abdominal pain, anemia, fever, fatigue and weight loss. It is believed that these events results from a multifactorial interaction involving genetically susceptible individuals, specific environmental conditions, and unbalanced intestinal microbiota and immune response. The introduction of probiotics (live microorganisms, which when administered in adequate amounts confer a health benefit to the host), have proven to be effective in prolonging the remission of CD, allowing a significant improvement in life quality of individuals affected. Among the existing probiotic strains, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG A-905 was able to reduce the action of some intestinal pathogens and to prevent increase in intestinal permeability in models of intestinal inflammation when used as probiotic. The objective of this study was to evaluate the effect probiotic yeast *S. cerevisiae* strain UFMG A-905 in a murine model of CD induced by 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS). Balb/c female mice were challenged with TNBS 10 days after initiation of treatment with the probiotic. On the fifth day after induction, the animals were sacrificed and different parameters evaluated. There was an improvement in the group treated with the yeast in clinical signs of the disease compared to the untreated group. In the morphometric and histopathological analysis, the beneficial effect of the yeast could be observed with a reduction in inflamed area. The intestinal permeability was significantly reduced in probiotic-treated group compared to the CD positive control group. The induced inflammatory condition was significantly reduced when the yeast was administered preventively, and a decrease of clinical signs and recruitment of neutrophils, eosinophils and macrophages to the focus of inflammation and proinflammatory cytokines were also observed. We can conclude that the probiotic *S. cerevisiae* strain UFMG A-905 has an attenuating effect in the acute model of CD, and more studies are needed to elucidate the mechanisms responsible for this effect.

Key-words: Inflammatory Bowel Diseases (IBD), Crohn's disease (CD), 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid, Probiotic, *Saccharomyces cerevisiae*.

SUMÁRIO

	1. INTRODUÇÃO	15
	1.1 Microbiota intestinal.....	15
	1.2 Doença inflamatória intestinal	18
10	1.3 Doença de Crohn.....	21
	1.4 Modelo experimental da doença de Crohn induzida pelo ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS)	27
	1.5 Probióticos	29
	1.6 A levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> linhagem UFMG A-905	33
15	2. JUSTIFICATIVA.....	35
	3. OBJETIVOS	37
	3.1 Objetivo geral.....	37
20	3.2 Objetivos específicos	37
	4. MATERIAIS E MÉTODOS	38
	4.1 Animais	38
	4.2 Micro-organismo.....	38
25	4.3 Desenho experimental.....	39
	4.4 Tratamento	39
	4.5 Indução da doença de Crohn por TNBS	40
	4.6 Índice diário de atividade da doença (DAI).....	40
	4.7 Análise do comprimento do cólon	41
30	4.8 Análise histológica.....	41
	4.9 Determinação da permeabilidade intestinal	41
	4.10 Dosagem de IgA	42
	4.11 Medida da atividade da mieloperoxidase (MPO)	42
	4.12 Medida da atividade de N-acetilglicosaminidase (NAG)	43
35	4.13 Medida da atividade da peroxidase eosinofílica (EPO)	44
	4.14 Dosagens de citocinas	44
	4.15 Análise estatística.....	45

5		
	5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
	5.1 Avaliação clínica dos animais.....	46
	5.2 Análise histopatológica do cólon	48
	5.2.1 Análise morfométrica do cólon.....	53
10	5.3 Avaliação da permeabilidade intestinal	54
	5.4 Produção de IgA	56
	5.5 Avaliação da presença de infiltrado de neutrófilos por meio da medida de sua enzima mileoperoxidase (MPO) e da quimiocina CXCL1 (KC)	59
15	5.6 Avaliação da presença de eosinófilos por meio da medida de sua enzima peroxidase eosinofílica (EPO) e da quimiocina eotaxina-1 (CCL11).....	60
	5.7 Avaliação do recrutamento de macrófagos por meio da medida da atividade da enzima N-acetilglicosaminidase (NAG)	61
	5.8 Avaliação das citocinas.....	62
20	6. SÍNTESE DOS RESULTADOS	66
	7. CONCLUSÃO	67
	8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
25	9. ANEXO.....	84

5 LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- ABCD**- Associação Brasileira de Colite Ulcerativa e Doença de Crohn
- AGCC**- Ácidos graxos de cadeia curta
- AINES'S**- Anti-inflamatórios não esteroides
- 10 **AP-1**- Ativador de Proteína 1
- APC**- Células Apresentadoras de Antígenos
- CD**- Células Dendríticas
- CEI**- Células Epiteliais Intestinais
- DAI**- Índice Diário de Atividade da Doença
- 15 **DC**- Doença de Crohn
- DII**- Doença Inflamatória Intestinal
- DSS**- Sulfato de Sódio Dextrano
- EcN**- *Escherichia coli* Nissle 1917
- EDTA**- Ácido Etilenodiamina
- 20 **EPO**- Peroxidase Eosinofílica
- FAO**- Organização para Alimentação e Agricultura
- FITC**- Isotiocianato de fluoresceína
- H&E**- Hematoxilina e Eosina
- HTAB**- Brometo de Hexadeciltrimetilamônio
- 25 **Ig**- Imunoglobulina
- IL**- Interleucina
- INF**- Interferon
- MAC**- Macrófagos
- MAP**- *Mycobacterium avium paratuberculosis*
- 30 **MPO**- Mieloperoxidase
- N.S**- No Significance
- NAG**- N-acetilglicosaminidase
- NFkB**- Fator de Transcrição Nuclear Kapa B
- NOD**- Domínio de Ligação e Oligomerização de Nucleotídeos
- 35 **OD**- Densidade Ótica
- OPD**- Dicloridrato de o-Fenilenodiamina
- PAS**- Ácido Periódico Combinado de Schiff

- 5 **pH**- Potencial Hidrogeniônico
 PMSF- Fluoreto de Fenilmetilsulfonil
 PTG- Pepitidoglicano
 RCU- Retrocolite Ulcerativa
 ROS- Espécies Reativas de Oxigênio
- 10 **TGF**- Fator de Crescimento Tumoral
 TGI- Trato Gastrointestinal
 Th- Célula T reguladora
 TMB- Tetrametilbenzidina
 TNBS- Ácido Trinitro Benzeno Sulfônico
- 15 **TNF**- Fator de Necrose Tumoral
 UFC- Unidade Formadora de Colônia
 w/v- Peso/Volume
 WHO- Organização Mundial da Saúde

5 LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Figura 1- Distribuição dos filotipos bacterianos predominantes no TGI humano	16
	Figura 2- Desregulação imunológica associada à disbiose da microbiota.	18
	Figura 3- Aspectos e manifestação das DII.....	20
10	Figura 4- Taxa de incidência anual (média) para a DC.....	23
	Figura 5- Diferentes respostas à lesão intestinal na DC.....	25
	Figura 6- Estrutura do gene NOD2/CARD5 formado pelo CARD2 E CARD15, uma região designada NBD e outra LRR.....	26
	Figura 7- Mecanismo de indução da DC pelo TNBS.....	29
15	Figura 8- Ação dos probióticos na mucosa intestinal	31
	Figura 9- Delineamento experimental dos grupos	39
	Figura 10- Esquema representativo do período de administração do probiótico e indução da DC por TNBS	39
	Figura 11- Aspecto clínico da DC induzida por TNBS	47
20	Figura 12- Avaliação do comprimento do cólon.....	48
	Figura 13- Análise histológica do cólon (Hematoxilina-Eosina).....	50
	Figura 14- Análise histológica do cólon (<i>Alcian Blue</i> e <i>Ácido Periódico Schiff</i>).....	52
	Figura 15- Análise segundo parâmetros morfométricos	54
	Figura 16- Ensaio de permeabilidade intestinal <i>in vivo</i>	56
25	Figura 17- Dosagem de imunoglobulina (Ig) A secretada	58
	Figura 18- <i>Saccharomyces. cerevisiae</i> UFMG A-905 diminui o influxo de neutrófilos e da quimiocina CXCL1 (KC) para o sitio primário da inflamação no modelo de DC induzida por TNBS.	59
30	Figura 19- <i>Saccharomyces. cerevisiae</i> UFMG A-905 diminui o influxo de eosinófilo e da quimiocina EOTAXINA -1 (CCL11) para o sitio primário da inflamação no modelo de DC induzida por TNBS.	

5		61
	Figura 20- <i>Saccharomyces. cerevisiae</i> UFMG A-905 diminui o recrutamento de macrófagos para o sítio primário da inflamação no modelo de DC induzida por TNBS	
		62
	Figura 21- Avaliação das citocinas na DC induzida por TNBS (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-2 e IL-10)	
10		65

1.1 Microbiota intestinal

O trato gastrointestinal (TGI) do homem é o sítio orgânico mais densamente povoado por micro-organismos comensais e simbióticos, na maioria bactérias, mas também fungos, archaea e vírus (QUIN *et al.*, 2010; ARUMUGAM *et al.*, 2011). Ao nascimento o TGI apresenta-se estéril, mas após o nascimento as superfícies e mucosas são colonizadas rapidamente 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).

No adulto, o número de bactérias da microbiota intestinal é 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). 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 (Figura 1). 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).

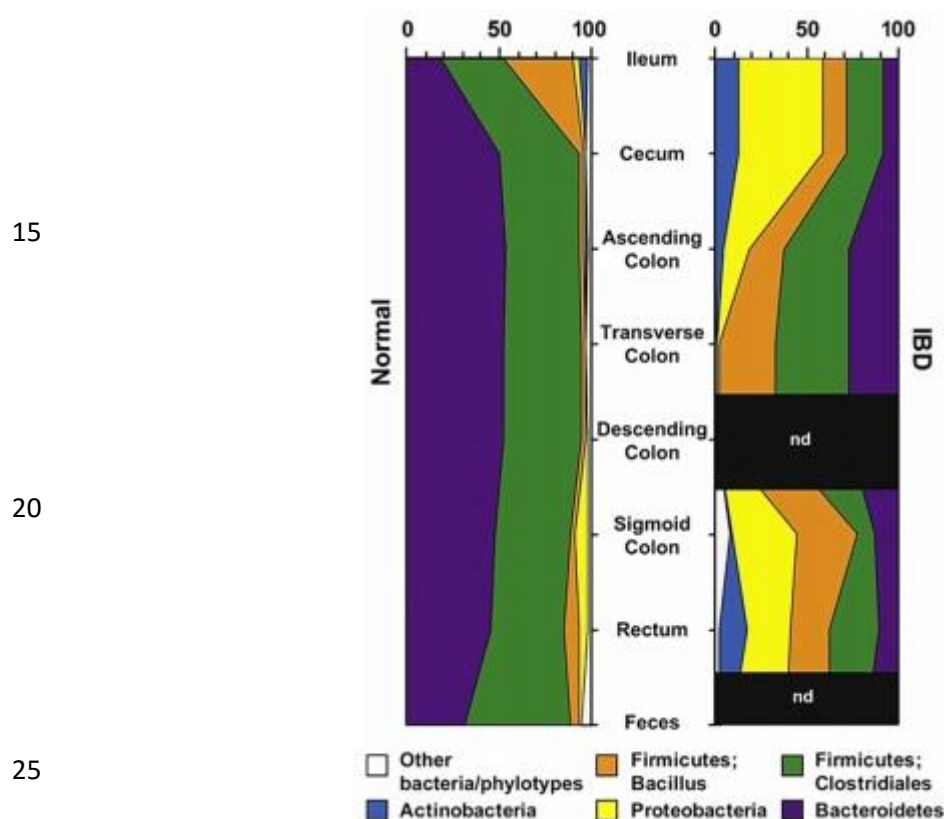


Figura 1- Distribuição de filotipos bacterianos predominantes no trato intestinal humano. Abundância relativa é ilustrada como uma função da posição ao longo do intestino saudável e intestino inflamado (íleo) e cólon. Fonte: MANICHANH *et al.* (2006).

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 combustíveis 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 (KEIN, 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 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, 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).

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, pode ocorrer uma destruição da mucosa, resultando em uma hiperpermeabilidade, seguida de hiperativação do sistema imune, o que ocasiona inúmeras patologias, sendo as mais estudadas as doenças inflamatórias intestinais (DII) (CARVALHO & PERUCHA, 2006; ROUND, 2009) (Figura 2).

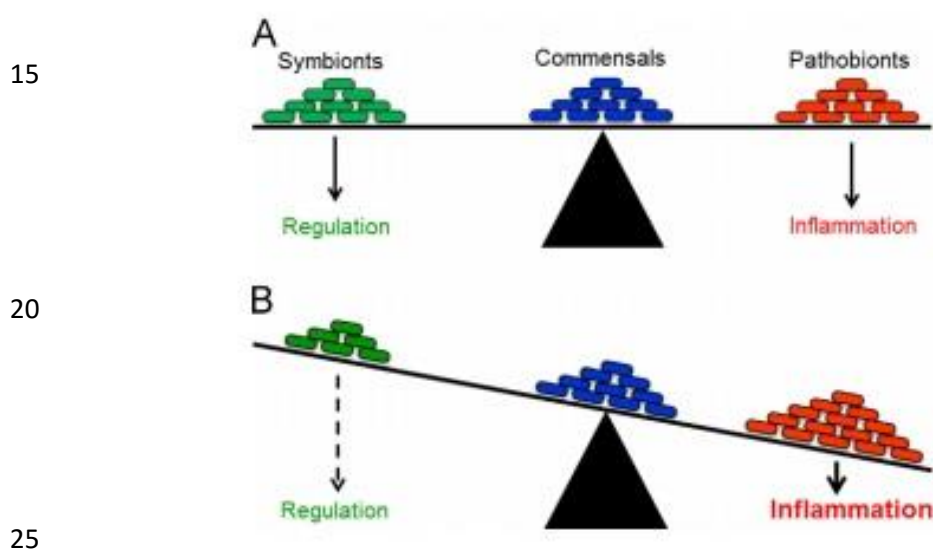


Figura 2- Desregulação imunológica associada à disbiose da microbiota. (A) Uma microbiota saudável contém uma composição equilibrada de várias classes de bactérias. Simbiontes são organismos com funções de promoção da saúde conhecidos. Comensais são residentes permanentes deste complexo ecossistema e não fornecem nenhum benefício ou prejuízo para o hospedeiro. Patobiontes também são residentes permanentes da microbiota e têm o potencial de induzir a patologia. (B) 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 inflamação em indivíduos geneticamente suscetíveis. Fonte: ROUND (2009).

1.2 Doenças inflamatórias intestinais

As DII são patologias inflamatórias crônicas que afetam o TGI e podem apresentar-se com manifestações extra-intestinais em alguns pacientes. São caracterizadas por episódios de recidiva e remissão da doença. Atualmente não há cura para as DII, e o que se tem feito é o controle da inflamação e dos sintomas (CATAPANI, 2012). As formas mais comuns das DII são: Reto-Colite Ulcerativa (RCU) e Doença de Crohn (DC). Elas

podem ser distinguidas por padrões de inflamação distintos, como descritos na tabela 1 (DAMIÃO *et al.*, 2012).

Tabela 1- Características clínicas diferenciais de CU e DC. Fonte: DAMIÃO *et al.* (2012). (Adaptada)

Clínica	RCU	DC
Sangue nas fezes	Sim	Ocasional
Muco	Sim	Ocasional
Sintomas sistêmicos	Ocasional	Frequente
Eritema nodoso	Ocasional	Frequente
Pioderma gangrenoso	Ocasional	Frequente
Uveíte/episclerite	Ocasional	Frequente
Espondilite equílosante	Ocasional	Ocasional
Dor abdominal	Ocasional	Frequente
Massa abdominal	Raro	Sim
Doença renal	Não	Frequente
Fistulas	Não	Frequente
Abcessos	Não	Frequente
Obstrução intestinal	Raro	Frequente
Resposta a antibióticos	Não	Frequente
Recorrência após cirurgia	Não	Sim

Os achados macro e microscópicos em um paciente com DII podem determinar se o paciente tem a DC ou a RCU. A maioria dos achados clínicos é muito semelhante nas duas patologias (Figura 3) e diversos pesquisadores acreditam que elas na verdade são uma única doença, e que as manifestações clínicas e morfológicas diferem de acordo com a resposta orgânica do paciente (NAKAMURA *et al.*, 2006; SARTOR, 2006; DAMIÃO *et al.*, 2012).

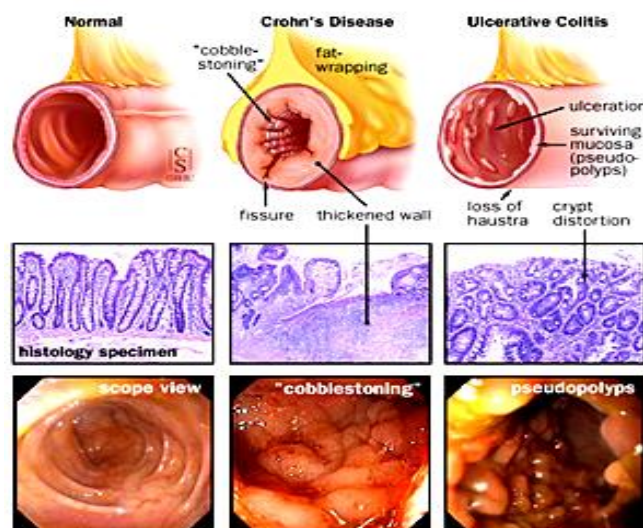


Figura 3- Aspectos e manifestações das DII. Fonte: Damião *et al.* (2012)

Na RCU ocorre um processo inflamatório crônico, restrito às camadas mucosa e sub-mucosa do intestino grosso, que geralmente tem início no reto, podendo estender-se sempre em continuidade, comprometendo parte ou todo o cólon. Em aproximadamente 10% dos casos não é possível, no momento do diagnóstico, a diferenciação entre a RCU e a DC (ABRAHAM, 2009).

Sintomas comuns associados com RCU incluem: dor abdominal e câimbra, diarreia com sangue, tenesmos e urgência de evacuação (CHANDLER *et al.*, 2011). Em RCU, existe uma resposta do tipo Th2 no cólon, e ocorre um aumento na produção de citocinas inflamatórias, tais como TNF, IL-6, IL-12 e IL-2. Para o desenvolvimento da inflamação intestinal, um importante processo é a migração de leucócitos para o intestino, assim como a adesão de moléculas, tais como as integrinas, mediante a ligação entre leucócitos e células endoteliais e, então, a migração de leucócitos levando à inflamação (NAKAMURA *et al.*, 2006).

A DC é uma doença intestinal inflamatória granulomatosa crônica do íleo terminal, sendo, agora considerada um membro distinto da família das DII (ABRAHAM, 2009). É um processo inflamatório crônico, não curável por tratamento clínico ou cirúrgico e que acomete o TGI de forma uni ou multifocal, de intensidade variável e transmural (SARTOR, 2006).

A etiologia ainda é desconhecida e várias hipóteses têm sido propostas. A hipótese mais consensual postulada é que a DC resulta de uma interação entre fatores genéticos, ambientais, sistema imunitário, micro-organismos e epitélio intestinal (BRAUN *et al.*, 2007) Acredita-se que as respostas imunes inata e adaptativa são inadequadas, com incapacidade de reconhecimento e eliminação dos antígenos bacterianos, ativação exagerada do sistema imune, diminuição da apoptose das células Th1 e inativação de células T regulatórias. Como resultado de todo esse desequilíbrio ocorre uma perda da tolerância à microbiota indígena e o desenvolvimento de mecanismos inflamatórios exagerados resultando na DC (SARTOR, 2007).

Em intestinos afetados por DC uma forte resposta do tipo Th1 é induzida, enquanto que a resposta de Th2 é mais regulada no cólon. Uma particularidade evidente da DC é que a resposta Th1 é dominante no processo imune desempenhando um importante papel na patogênese da doença (NAKAMURA *et al.*, 2006). A DC pode envolver qualquer segmento do TGI, mas o mais comum é afetar as partes distal do intestino delgado e terminal do íleo.

Os principais tratamentos para as DII são baseados no equilíbrio nutricional, melhora na qualidade de vida, controle dos sintomas e remissão da doença feito pelo uso de medicamentos que bloqueiam receptores e mediadores da cascata inflamatória, interrompendo assim a inflamação. Geralmente são usados como forma de tratamentos os aminosalicilatos, imunossupressores, antibióticos e em casos mais graves a terapia biológica como é o caso dos anticorpos monoclonais e a cirurgia (ABRAHAM, 2009).

1.3 Doença de Crohn

A DC foi descrita inicialmente em 1932 por Burril B. Crohn *et al.* como ileíte, e caracterizada como uma inflamação crônica granulomatosa. Posteriormente Crohn descobriu que a doença não estava restrita apenas ao íleo e sim se tratava de um processo inflamatório em que outras regiões do TGI podiam ser acometidas. Diante desta descoberta, em 1967 Crohn revisou diversos trabalhos que relatavam as DII e a partir daí esta patologia passou a ser chamada de doença de Crohn.

A DC pode acometer qualquer segmento do TGI desde a boca até o ânus, mas em sua maior frequência atinge o íleo terminal, colón e ânus, comprometendo todas as camadas da parede intestinal, mesentérios e vasos linfáticos (RIBEIRO, 2009).

- 10 A incidência da DC varia de acordo com a área geográfica, o que pode sugerir a intervenção de fatores ambientais (LAKATOS, 2006). As maiores taxas são observadas na Europa ocidental e do norte, assim como nos Estados Unidos, enquanto as mais baixas são registradas na África, América do Sul e Ásia. É mais comum nos países desenvolvidos e industrializados, onde a urbanização também é sugerida como um
- 15 possível fator de risco (LAKATOS, 2006).

Estudos relatam a incidência da DC na Suécia, Grã-Bretanha, América do Norte, África, Oriente Médio e Ásia (ALDHOUS *et al.*, 2007). Há poucos dados relativos as Américas do Sul e Central, mas que sugerem uma baixa prevalência da DC. No entanto, alguns

20 países demonstraram tendências crescentes na DC como observado em outros países em desenvolvimento (Figura 4).

Um relatório recente do Brasil foi o primeiro a estimar a prevalência da DC em uma parte do Estado de São Paulo composta por 533.508 habitantes entre os anos de 1986 e

25 2005. Um aumento na incidência anual da DC em sua forma mais lenta foi verificado passando de 0,24 por 100.000 habitantes nos primeiros cinco anos para 1,48 por 100.000 nos 15 anos seguintes, e para 3,5 por 100.000 nos últimos cinco anos do estudo (LOGAN & BOWLUS, 2010).

30

35

40

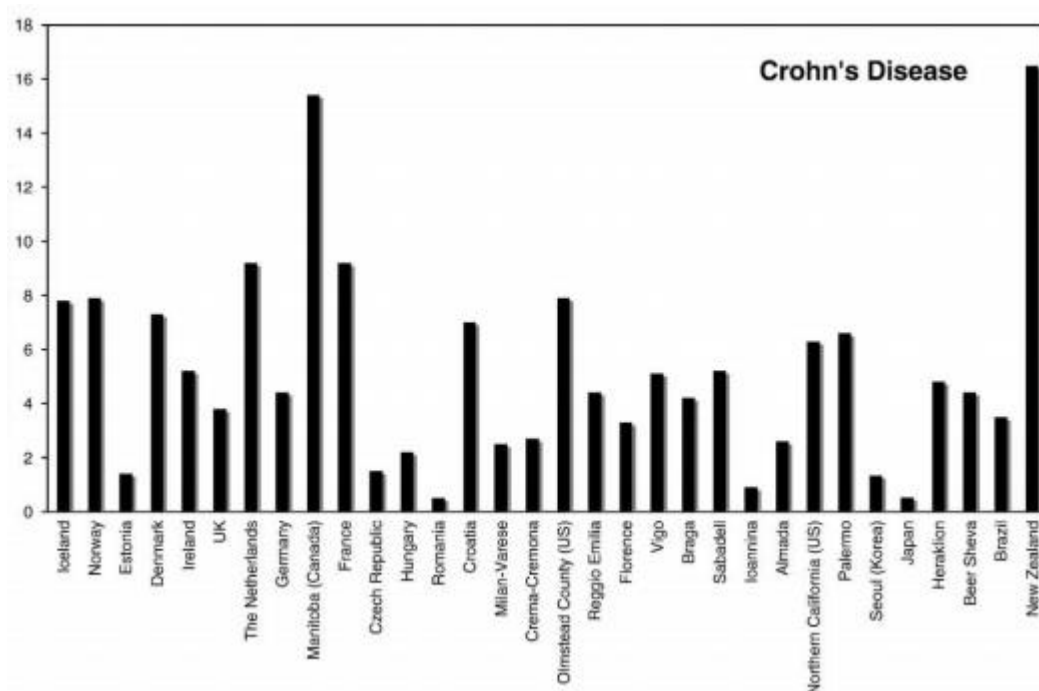


Figura 4: Taxas de incidência (por 100 mil pessoas-ano) média anual para a DC com posições classificadas de latitude norte (direita) para latitude sul (esquerda). (LOGAN & BOWLUS, 2010-modificada).

10

Na DC a inflamação não é contínua, intercalando áreas saudáveis ao lado de outras áreas doentes. Pode ocorrer em qualquer idade, mas seu pico de acometimento é tipicamente entre 20 e 40 anos de idade e as mulheres são frequentemente mais afetadas. A doença ocorre em classes sociais mais elevadas (ARAÚJO *et al.*, 2009).

15

As manifestações clínicas da doença são múltiplas, pois resultam da localização da doença, do tipo de padrão da doença e da gravidade da mesma. No entanto, os sintomas que são mais frequentemente encontrados nos pacientes que sofrem desta doença são a diarreia em 70 a 90% dos casos, perda de peso em 65 a 75% e dor abdominal em 45 a 65% dos doentes. Com a progressão da doença, os períodos sintomáticos passam a ser mais frequentes, mais duradouros e mais graves (RIBEIRO, 2009).

20

Portadores da DC apresentam evacuações reduzidas e as fezes raramente apresentam muco, pus ou sangue e em alguns casos mais graves podem apresentar complicações como obstrução e perfuração intestinal (ARAÚJO *et al.*, 2009). Em 10 a 20 % dos pacientes com DC ocorre perda de peso, cuja causa pode ser a diminuição da ingestão

25

motivada por anorexia ou medo da dor desencadeada pela ingestão de alimentos ou ser consequência da má absorção secundária à diarreia (FAUCI *et al.*, 2008).

10 As manifestações clínicas de obstrução intestinal variam conforme o grau de estenose e o tempo de evolução da doença. Assim, os estágios iniciais são dominados pelos espasmos e edema da parede, obstruções intermitentes com sintomas crescentes de dor abdominal pós-prandial e, com o decorrer dos anos, a inflamação vai evoluindo para um padrão fibroestenótico e estenótico. Neste contexto a diarreia diminui e é substituída por obstrução intestinal crônica. No entanto os episódios de obstrução aguda não deixam de
15 existir, pois podem ser desencadeados pela inflamação, espasmos, ingestão de alimentos e determinados fármacos (D'HAENS *et al.*, 2005).

Como fatores de risco destacam-se o tabaco e os contraceptivos orais (ALDHOUS *et al.*, 2007), proporcionando um aumento da gravidade da doença. A apendicectomia,
20 geralmente apresenta um papel protetor na RCU, mas não desempenha qualquer proteção na CD (PHAVICHITR *et al.*, 2003; PINSK *et al.*, 2007; FAUCI *et al.*, 2008).

Manifestações perianais podem ocorrer em mais de 50% dos pacientes. Já as manifestações extra-intestinais, associadas ou isoladas, podem ocorrer e atingem mais
25 frequentemente a pele, as articulações, os olhos, o fígado e trato urinário (HANAUER & SANDBORN, 2001; SARTOR, 2006).

A anamnese destes doentes é de extrema importância e deve incluir a data de início dos sintomas, a evolução da sintomatologia, a existência de um contexto epidemiológico
30 para patologia infecciosa, a história medicamentosa (antibióticos, anti-inflamatórios não-esteróides (AINES's), as co-morbilidades, a história alimentar inclusive as intolerâncias, os comportamentos aditivos e o histórico familiar (MAGRO *et al.*, 2008).

As alterações nas junções célula-célula, na produção de muco, IgA e defensinas, e o
35 aumento da permeabilidade contribuem para uma inflamação persistente característica da DC. Uma alteração no balanço entre os micro-organismos protetores e agressivos da microbiota intestinal altera a homeostasia, tendo como consequência uma inflamação intestinal crônica em indivíduos susceptíveis, onde a DC pode ser desencadeada por diversos agentes patogênicos específicos, entre os quais *E. coli* aderente-invasiva,

Mycobacterium avium paratuberculosis (MAP), *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* e paramixovírus (SARTOR, 2007; CHASSAING & DARFEUILLE-MICHAUD, 2011) (Figura 5).

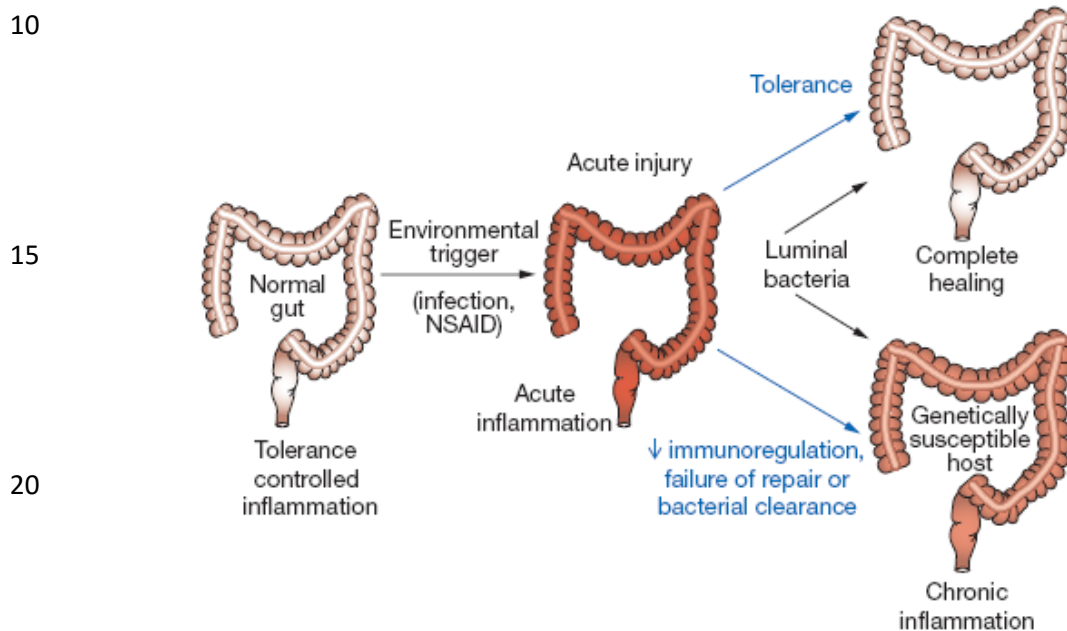


Figura 5- Diferentes respostas à lesão intestinal na DC. Uma lesão na mucosa é rapidamente reparada por respostas imunitárias adequadas em situações normais, mantendo-se a tolerância aos micro-organismos comensais. Em pessoas suscetíveis, há uma incapacidade da resposta imunitária, defeitos na função de barreira da mucosa intestinal, disbiose, infecções patogênicas persistentes e a incapacidade de eliminar as bactérias e de reparar o epitélio intestinal, o que origina uma ativação contínua e excessiva das respostas imunitárias adaptativas efetoras. Fonte: SARTOR (2007).

A DC é considerada uma doença poligênica complexa, o que significa que vários genes contribuem para o seu desenvolvimento. Uma série de evidências demonstra a importância da genética na DC. Em 1996, Hugot *et al.* relataram pela primeira vez a existência de um gene envolvido (NOD2/CARD15) (Figura 6) com localização no locus IBD1 do cromossomo 16. Subsequentemente novos estudos foram realizados, permitindo confirmar os achados prévios (BAPTISTA, 2008).

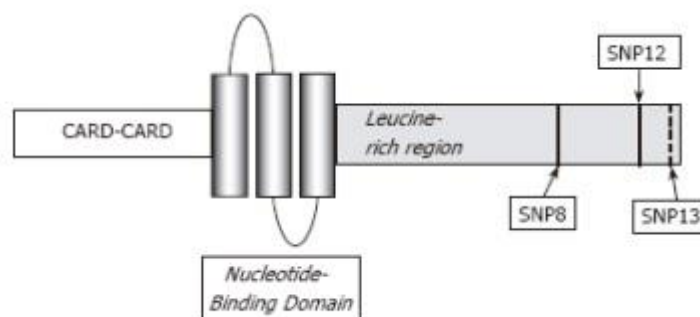


Figura 6- Estrutura do gene NOD2/CARD15 formado pelos CARD2 e CARD15, uma região designada NBD e outra designada LRR. As mutações SPN12, SPN13 e SPN8, localizadas no domínio LRR estão associadas com o desenvolvimento da DC. Fonte: LAKATOS (2006).

O gene NOD2/CARD15, foi o primeiro gene que se descobriu estar associado à DC e um dos mais importantes. Codifica uma proteína com o mesmo nome, expressa nos macrófagos, neutrófilos, linfócitos B e T, células dendríticas (CD), células de Paneth e células epiteliais intestinais (CEI). O NOD2/CARD15 é um receptor de reconhecimento padrão citoplasmático do sistema imunitário inato, cujo domínio LRR é responsável pelo reconhecimento intracelular de produtos bacterianos de que é exemplo o peptidoglicano (PTG), encontrado na membrana de quase todas as bactérias. O CARD está envolvido na ativação do NF- κ B (PODOLSKY, 2007).

O NOD2/CARD15 é também responsável pela expressão de várias moléculas protetoras essenciais para uma eliminação bacteriana eficaz: as defensinas. Produzidas pelas células de Paneth (um tipo de CEI especializadas), as defensinas são peptídeos antibióticos naturais que representam um importante mecanismo de defesa da imunidade inata, uma vez que eliminam rapidamente os micro-organismos, ajudando assim a prevenir a invasão bacteriana da mucosa intestinal e mantendo uma homeostasia intestinal (BAPTISTA, 2008).

As mutações no gene NOD2/CARD15 estão presentes em até 30% dos indivíduos com DC. Os portadores heterozigóticos têm o risco aumentado de doença de cerca de 2-4 vezes e os homozigóticos de cerca de 20-40 vezes. Além disso, estas mutações têm outras importantes consequências: diminuição do reconhecimento bacteriano e da produção de citocinas (como a IL-1) e quimiocinas (como a IL-8), o que origina um defeito na eliminação das bactérias invasoras, aumento da susceptibilidade para

infecções, diminuição de citocinas anti-inflamatórias (IL-10) pelas CD e consequente perda de respostas reguladoras, diminuição do reconhecimento das bactérias comensais, o que reduza à tolerância à microbiota comensal, levando ao desencadeamento de respostas inflamatórias exageradas. No entanto, estas teorias ainda são muito especulativas e não explicam de forma definitiva a patogênese da doença (BAPTISTA, 2008).

A experiência clínica é fundamental no diagnóstico da DC, necessitando da colaboração de um gastroenterologista, um endoscopista e um patologista. Os dados macroscópicos e histológicos do TGI irão documentar os aspectos típicos focais, assimétricos, transmurais e granulomatosos, excluindo assim outras possibilidades diagnósticas como síndrome do intestino irritável, diverticulite e o câncer colorretal (ARAÚJO *et al.*, 2009).

1.4 Modelo experimental da doença de Crohn induzida pelo ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS)

Os modelos animais são importantes ferramentas para se investigar os mecanismos pelos quais as doenças têm início e se perpetuam. Por isso, modelos animais de inflamação intestinal em modelos murinos, têm se tornado indispensável para o entendimento de vários aspectos da patogênese das DII.

A indução quimicamente realizada é comumente usada para estudar as DII, uma vez que o início da inflamação é imediato, o procedimento é relativamente simples e se assemelha em importantes aspectos imunológicos e histopatológicos às DII humanas (WIRTZ *et al.* 2007).

A ideia desse modelo baseia-se em um processo químico onde ocorrerá um aumento na permeabilidade da mucosa, que facilita a entrada de antígeno luminal na lâmina própria, o qual não é adequadamente eliminado pelo sistema imunológico. O modelo de DC induzido por TNBS foi desenvolvido por Morris *et al.* (1989), e se baseia no uso de uma solução de TNBS em etanol 50%, no qual o etanol agiria como um “rompedor de barreira”, enquanto que o ácido TNBS, atuaria como um hapteno, que ao associar-se com substância de alto peso molecular, como as proteínas teciduais, seriam capazes de

desencadear uma resposta imunológica (GONÇALVES *et al.*, 2008). O TNBS associado ao etanol promove o desenvolvimento de uma inflamação grave, transmural e granulomatosa no cólon distal, sendo um modelo útil tanto para o estudo da etiopatogênese da inflamação intestinal, como para o estudo de novas drogas para o tratamento dessas doenças.

O modelo experimental por TNBS é considerado o mais adequado para o estudo de novos compostos ativos na DII, sendo a técnica mais adequada por simular de forma muito parecida o que ocorre com a DC em humanos (JURJUS *et al.*, 2004).

A inflamação produzida pelo TNBS é caracterizada pela presença de úlceras focais, distorções das criptas, depleção das células caliciformes, presença de granulomas, espessamento da parede intestinal, edema, infiltração de células inflamatórias e necrose (FOLIGNÉ *et al.*, 2006). Bioquimicamente, é observado um aumento da atividade de enzimas como a mieloperoxidase, fosfatase alcalina, além do aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias como o TNF e de interleucinas, bem como alterações no sistema antioxidante da mucosa intestinal (SÁNCHEZ-HIDALGO *et al.*, 2007).

Strober *et al.* (1998) relatam que após ser administrada, a solução de TNBS/etanol é apresentada para as células T pelas células apresentadoras de antígeno da lâmina própria. A presença e o reconhecimento do TNBS promovem a secreção de IL-12 e indução da resposta das células Th1, que produz principalmente INF- γ , este por sua vez age nos macrófagos induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF, IL-1 β e IL-6, que desencadeiam imediatamente o processo inflamatório representado pela Figura 7.

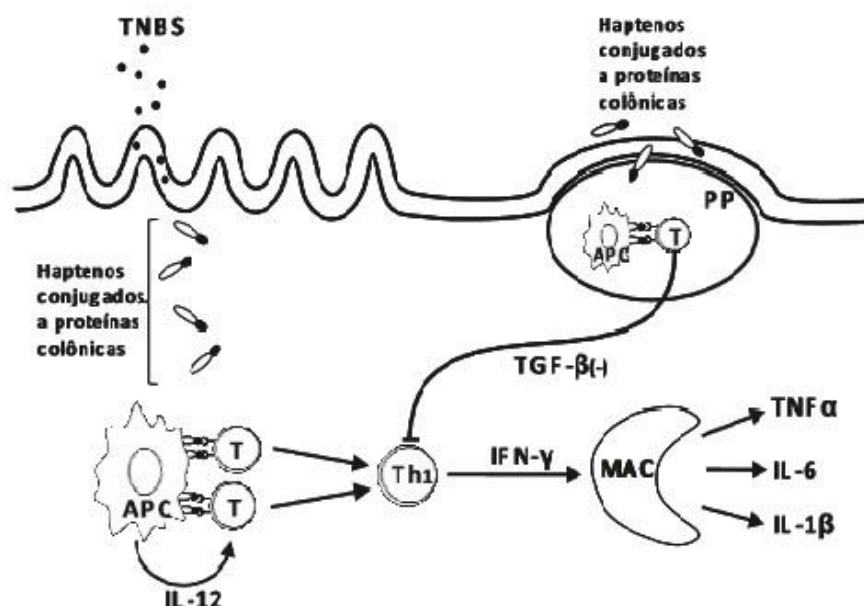


Figura 7: Mecanismo de indução da DC pelo TNBS (APC: células apresentadoras de antígenos; PP: placa de peyer; T: células T; MAC: macrófagos), (STROBER *et al.*, 1998-adaptada)

10

1.5 Probióticos

O consumo de alguns micro-organismos na alimentação é descrito já no Velho Testamento, onde associava a longevidade de Abraão 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 distúrbios intestinais (HEGAZY & EL-BEDEWY, 2010).

15

A Organização Mundial da Saúde (WHO) e a Organização para Alimentação e Agricultura (FAO) 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 láctico, 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 intermédio de modulação do sistema imunológico (POTHOULAKIS, 2009).

20

25

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 ácidos graxos de cadeia curta 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).

Os probióticos são importantes agentes na terapia das DII, atuando na competição com patógenos por sítios de adesão no epitélio intestinal, como também na modulação do sistema imune (FEDORAK, 2010).

A ação benéfica destes micro-organismos estão relacionadas 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 oclusivas (POLK, 2010) (Figura 8). 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).

Os probióticos ainda induzem a supressão do crescimento de patógenos por meio da liberação de fatores antimicrobianos como o ácido acético e láctico, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas. Podem aumentar a função de barreira na mucosa e induzir a apoptose de células T na lâmina própria. 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).

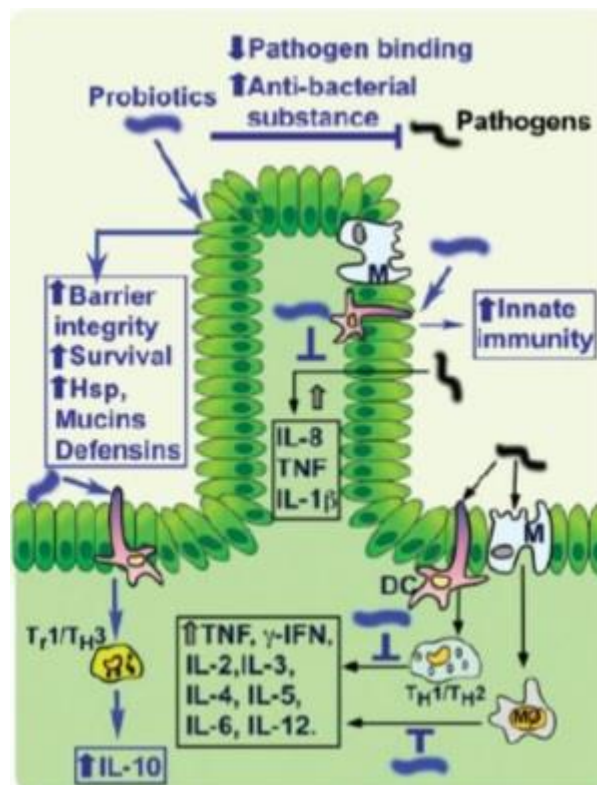


Figura 8- Ação dos probióticos na mucosa intestinal. Os probióticos aumentam a integridade da barreira epitelial, a sobrevivência das CEI, a produção de mucina e defensinas, estimulam a imunidade inata, aumentam a produção de citocinas protetoras como a IL-10 e inibem a liberação de citocinas pró-inflamatórias: TNF, IL-2, IFN- γ (VANDERPOOL *et al.*, 2008).

Pesquisas estimulam o desenvolvimento de produtos que possam favorecer o crescimento e o estabelecimento de bactérias benéficas ao intestino humano como é o caso dos probióticos, e ao mesmo tempo buscam elucidar o real papel da microbiota intestinal na etiopatogênese das DII (SARTOR, 2003; TAMBOLI *et al.*, 2003; SEKSIK *et al.*, 2004; SHANAHAN *et al.*, 2005). Estudo publicado por Seksik *et al.* (2004), relacionando probióticos com DII, sugeriu uma modulação da microbiota intestinal e da imunidade em humanos portadores de DC e RCU. Em estudo citado por Pothoulakis (2009) utilizando a levedura *S. boulardii*, houve proteção do TGI em processos inflamatórios, com eficácia clínica e experimental, por intermédio de modulação do sistema imunológico. Dados obtidos em modelos animais, também mostram que a

translocação de *S. boulardii* é reduzida (LESSARD *et al.*, 2009). Além disso, estudos farmacocinéticos indicam que *S. boulardii* não persiste no organismo após 3-5 dias de interrompido o tratamento (KLEIN *et al.*, 1993). *Saccharomyces boulardii* tem sido usado para melhorar a permeabilidade intestinal em pacientes com DC (VILELA *et al.*, 2008) e pode representar uma importante ferramenta na manutenção do tratamento da doença (GUSLANDI *et al.*, 2000; PLEIN & HOTZ, 1993).

Outro probiótico de grande importância nas DII é a linhagem não-patogênica de *E. coli* Nissle 1917 (EcN). Ela é provavelmente o probiótico mais explorado para o tratamento destes pacientes (ROGLER, 2011). Essa bactéria, em um ensaio clínico, foi tão eficaz quanto o anti-inflamatório intestinal mesalazina na prevenção da recidiva da RCU (REMBACHEN *et al.*, 1999). Seus mecanismos de ação incluem atividade sobre patógenos, células epiteliais do hospedeiro, e sistema imune do hospedeiro. *In vitro*, EcN mostrou-se eficaz na prevenção da invasão de células do hospedeiro por alguns patógenos, incluindo *Salmonella*, *Yersinia*, *Shigella*, *Legionella*, *Listeria* e *E. coli* aderente-invasiva (SCHIERACK *et al.*, 2011). Os dados mais recentes obtidos com EcN estão relacionados a manutenção da remissão na RCU. Estudos destacam ainda a habilidade de EcN em iniciar a maturação e produção de citocinas (IL-6, IL-10, TNF em baixas quantidades) nas células dendríticas das placas de Peyer, de linfonodos mesentéricos e do baço (ROGLER, 2011).

Bibilone *et al.* (2005) em seus estudos utilizando o probiótico VSL#3, que contém uma combinação de quatro linhagens de *Lactobacillus* (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*), três linhagens de *Bifidobacterium* (*B. longum*, *B. breve*, *B. infantis*) e uma de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, promoveu uma indução da remissão da doença em pacientes com RCU.

Segundo Pothoulakis (2009), para auxílio no tratamento e prevenção das doenças inflamatórias intestinais, os probióticos poderiam atuar em três distintos mecanismos:

- ☐ Bloqueando os efeitos de bactérias patogênicas por meio da produção de substâncias bactericidas e da competição por aderência no epitélio intestinal;
- ☐ Regulando a resposta imune por meio da imunidade inata por modulação das vias de sinalização inflamatórias (receptor *Toll like*);
- ☐ Regulando a homeostase do epitélio intestinal.

Vários mecanismos de ação de micro-organismos usados como probióticos em infecções experimentais foram extensivamente estudados. Ensaio em animais e seres humanos, assim como estudos *in vitro*, mostraram que *S. boulardii*, *E. coli* Nissle 1917 dentre outros micro-organismos podem ter um papel protetor e atividades específicas contra vários patógenos entéricos, conforme revisado por Czerucka *et al.* (2007) e Pothoulakis (2009).

1.6 A levedura *Saccharomyces cerevisiae* linhagem UFMG A-905

Muita atenção tem sido dada à modulação da microbiota intestinal normal por meio dos probióticos, e uma das principais preocupações da Organização Mundial da Saúde é também a implementação de novas terapias que não atuem como uma forte pressão seletiva, propiciando a geração de patógenos cada vez mais agressivos e resistentes (MARTINS *et al.*, 2005).

Estudos prévios em nosso laboratório mostraram que a *S. cerevisiae* linhagem UFMG A-905 foi capaz de reduzir a ação de alguns enteropatógenos quando utilizada como probiótico, foi também capaz de diminuir a mortalidade de animais com febre tifoide induzida experimentalmente (15% de sobrevivência no grupo controle contra 55% no grupo tratado com a levedura) e os dados histopatológicos mostraram que a levedura apresentou uma boa proteção contra o desafio oral com *C. difficile* em camundongos gnotobióticos e uma boa preservação do fígado de animais convencionais tratados com a levedura e desafiados com *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium (MARTINS *et al.*, 2005). A levedura também foi capaz de aumentar a resposta imune do hospedeiro e diminuir a translocação bacteriana em dois modelos murinos (MARTINS *et al.*, 2007; GENEROSO *et al.*, 2010).

Um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa mostrou que o tratamento com *S. cerevisiae* UFMG A-905 inibiu a perda de peso e aumentou a sobrevivência de animais após o desafio com *Salmonella*. Dados imunológicos demonstraram que a *S. cerevisiae* UFMG A-905 diminuiu os níveis de citocinas inflamatórias e modulou a ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos, assim como as vias de NF- κ B e AP-1 (ativador de proteína 1) (MARTINS, 2007).

Outros estudos realizados em animais isentos de germes revelaram que os efeitos benéficos da levedura poderiam estar ligados, pelo menos em parte, à ligação da *Salmonella* e *E. coli* em sítios da parede da levedura (MARTINS *et al.*, 2011, THIAGO *et al.* 2012).

O aumento da expectativa de vida da população humana, aliado ao crescimento exponencial dos custos médico-hospitalares, trouxe novas demandas à sociedade, por meio do desenvolvimento de novos conhecimentos científicos e de novas tecnologias que resultem em modificações importantes no estilo de vida da população. Nos últimos anos, muita atenção tem sido dada à modulação da microbiota intestinal normal por probióticos, e uma das principais preocupações da Organização Mundial da Saúde é também a implementação de novas terapias que não atuem como uma forte pressão seletiva, propiciando a geração de patógenos cada vez mais agressivos e resistentes (Martins *et al.*, 2005).

O número de casos de DII é grande no Mundo e, de acordo com a ABCD (Associação Brasileira de Colite Ulcerativa e Doença de Crohn, 2006) têm-se observado aumento considerável no número de casos de DII também no Brasil. São escassos os estudos epidemiológicos que permitem conhecer a incidência e a prevalência das doenças inflamatórias intestinais no Brasil. Sabe-se, hoje, que as DII já não são tão raras como se acreditava há alguns anos e vem ocorrendo um aumento das suas incidências, associado diretamente à ocidentalização no estilo de vida, incluindo hábitos alimentares e tabagismo, e ao maior grau de industrialização das regiões estudadas.

Desde a descoberta dos efeitos benéficos do anti-inflamatório sulfasalazina em casos de RCU e DC, o número de drogas usadas para o tratamento das DII vêm aumentando. Uma das últimas adições a esse arsenal terapêutico são os probióticos. O interesse no uso destes agentes microbianos vivos tem aumentado com o propósito de prevenção ou tratamento de um grande número de desordens gastrointestinais, o que inclui a DC.

A grande vantagem da terapia com os probióticos é a ausência de efeitos secundários, como a seleção de bactérias resistentes, já que os mecanismos benéficos destes microrganismos são basicamente os mesmos da microbiota normal do corpo humano. O que se faz neste caso é a utilização, em grande quantidade, daqueles que possuem eficácia comprovada, podendo ser constituintes normais da microbiota, como é o caso das bifidobactérias e dos lactobacilos, ou não, como a levedura *S. boulardii*.

Resultados prévios em nosso laboratório mostraram que a *S. cerevisiae* linhagem UFMG A-905 foi capaz de reduzir a ação de alguns enteropatógenos quando utilizada

como probiótico. Nesse contexto, nosso objetivo central foi avaliar o efeito da levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905, em modelo experimental da DC, avaliando o efeito na patologia e na resposta imune do hospedeiro.

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito profilático da levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905 em modelo murino de DC induzida por TNBS, assim como os efeitos envolvidos nesse efeito.

10

3.2 Objetivos específicos

1) Avaliar o efeito profilático de *S. cerevisiae* UFMG A-905 no modelo murino de DC, determinando-se:

- 15
- Índice diário de atividade da doença (DAI),
 - Comprimento do cólon,
 - Histopatologia e morfometria do cólon.

2) Avaliar possível parâmetro responsável pelo efeito profilático de *S. cerevisiae* UFMG A-905 no modelo murino de DC, determinando-se:

- 20
- Permeabilidade intestinal, utilizando a técnica de FITC-dextran.

3) Avaliar alguns parâmetros imunológicos responsáveis pelo efeito profilático de *S. cerevisiae* UFMG A-905 no modelo murino de DC, determinando-se:

- 25
- Níveis de sIgA intestinal,
 - Grau de infiltração de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos,
 - Perfil de citocinas pro e anti-inflamatórias do cólon (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-10).

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c (CEBIO, ICB/UFMG), fêmeas, de 6 a 8 semanas de idade. 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 procedimentos para experimentação animal foram aprovados pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG-protocolo 004/2011).

4.2 Micro-organismo

A levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905 pertence à coleção do Laboratório de Agentes Bioterapêuticos do Departamento de Microbiologia do ICB/UFMG. A linhagem foi identificada e classificada como *S. cerevisiae* segundo métodos descritos por Kurtzman & Fell (1998) e Yarrow (1998). A identidade da levedura foi confirmada utilizando o programa YEASTCOMPARE (CIRIELLO & LACHANCE, 2001).

O micro-organismo foi mantido em meio contendo 1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 25% de glicerol e conservada a -80°C, em tubos criogênicos de 2 mL. Para todos os experimentos a levedura foi crescida em meio YPG (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose), a 37°C, por 24 h, sob agitação constante (150 rpm) e em seguida concentrada 10X para se obter uma quantidade de 10⁹ UFC/mL (MARTINS *et al.*, 2011).

4.3 Desenho experimental

Os animais foram divididos em cinco grupos (11 animais em cada, sendo 5 previstos para histologia e 6 para as diferentes dosagens): (i) Controle: tratamento oral com salina; (ii) Etanol: tratamento oral com salina e aplicação retal de etanol; (iii) TNBS: tratamento oral com salina e aplicação retal de etanol/TNBS; (iv) 905: tratamento oral com *S. cerevisiae* UFMG A-905; (v) 905/TNBS: tratamento oral com *S. cerevisiae* UFMG e aplicação retal de etanol/TNBS.



Figura 9- Delineamento experimental com identificação dos grupos e os respectivos tratamentos utilizados. Legenda: Controle, Etanol e TNBS (Inoculação intragástrica com salina), UFMG A-905 e UFMG A-905 + TNBS (Inoculação intragástrica com *S. cerevisiae* UFMG A-905). [n=6/ análises imunológicas e n=5/ análises histopatológicas]

4.4 Tratamento

Os camundongos dos grupos tratados (UFMGA-905 e TNBS+UFMGA-905) receberam diariamente 10^8 UFC/ml da levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905, por inoculação intragástrica, com início dez dias antes da indução da DC e término cinco dias após a indução. Os grupos Controle, Etanol e TNBS receberam o inóculo de salina estéril, para que estivessem expostos às mesmas condições de estresse que os animais submetidos a tratamento com a levedura como descrito por Martins e colaboradores (2009).

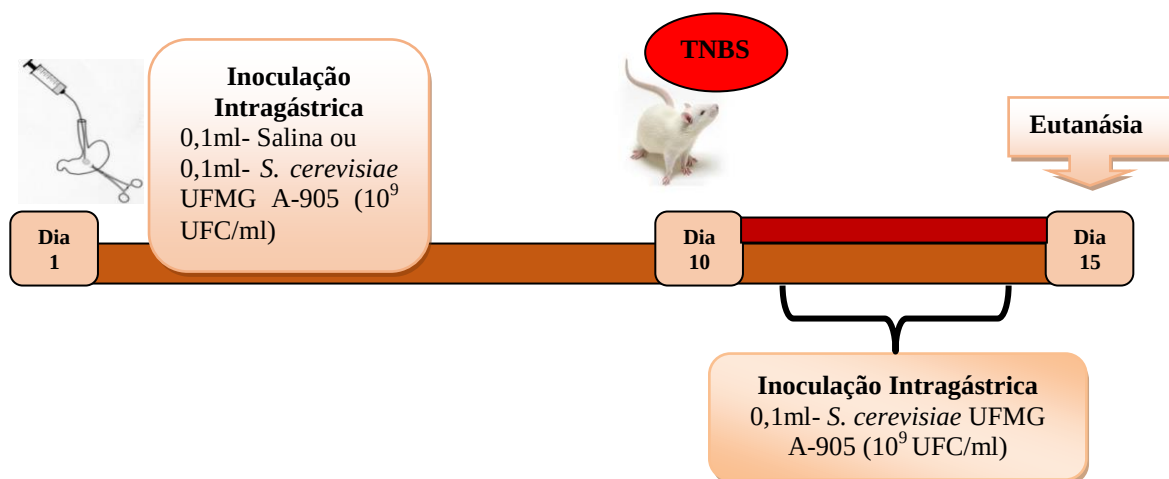


Figura 10- Esquema representativo do período de administração do probiótico e indução da DC por TNBS. O tratamento teve a duração de 15 dias. A administração do TNBS 5% foi realizada uma única vez por via retal (intracolônica) utilizando um catéter de teflón (diâmetro de 2 mm) no décimo dia após o início da inoculação intragástrica com o probiótico. Após a indução da doença seguiu-se com a inoculação do probiótico no grupo UFMG A-905 (Protocolo preventivo) até o dia do sacrifício.

4.5 Indução da doença de Crohn por TNBS

Para a indução do modelo de DC o método usado foi o descrito inicialmente por Morris e colaboradores (1989) e modificado por Mccafferty e colaboradores (1999) e Hara e colaboradores (2007), com pequenas adaptações. Para a indução da DC, após o décimo dia de inoculação intragástrica com o probiótico, os animais foram submetidos a um período de jejum de 12 horas e, posteriormente, anestesiados. O ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS) a 5% foi preparado a partir de uma solução aquosa comercial diluído em etanol a 50%. O TNBS foi administrado (0,1 mL) via intra-retal (intracolônica) com a ajuda de um catéter de teflón (diâmetro de 2 mm), o qual foi introduzido pelo ânus do animal até uma distância de 4 cm. Os animais foram mantidos em posição vertical (de cabeça para baixo) por 60 segundos para completa instilação do hapteno. Os animais dos grupos controles foram submetidos ao mesmo procedimento, mas com administração de solução salina em substituição ao TNBS. Os animais foram eutanasiados cinco dias após a indução.

4.6 Índice diário de atividade (DAI) da doença

A evolução da doença foi avaliada como índice diário de atividade (DAI) da doença conforme descrito por Albert e colaboradores (2010) com modificações, baseado em um *score* clínico acumulativo (0 a 14) pela análise de 3 diferentes parâmetros: (1) consistência das fezes (0 = normal; 1 = mole porém ainda formada; 2 = muito mole; 3 = liquefeita), (2) presença de sangue nas fezes (0 = negativo para presença de sangue oculto; 1 = positivo para presença de sangue oculto; 2 = sangue visível nas fezes; 3 = sangramento retal), e (3) peso dos animais (0 = < 1% de perda de peso; 1 = 1 a 5% de perda de peso; 2 = 5 a 10% de perda de peso; 3 = 10 a 15% de perda de peso; 4 = >15% de perda de peso). Para o *score* histológico foi utilizada a seguinte escala: 0 = nenhuma evidência de inflamação; 1 = baixo nível de inflamação com infiltrados de neutrófilos e polimorfonucleares espaçados; 2 = moderado nível de inflamação, com múltiplos focos de neutrófilos; 3 = alto grau de inflamação com aumento da densidade vascular e engrossamento da parede intestinal; 4 = nível máximo de inflamação com infiltração de leucócitos e perda das células caliciformes e ulceração.

4.7 Análise do comprimento do cólon

Após a eutanásia dos animais, o cólon foi cuidadosamente retirado, lavado, e o comprimento foi mensurado considerando sua extensão desde a junção com o ceco até o reto. Para a realização da medida utilizou-se o auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo Digimatic Caliper, Japão).

4.8 Análise histológica

As amostras (cólon) foram fixadas em formaldeído 4% e processadas para a inclusão e microtomia em parafina. Para análise das lesões intestinais, os tecidos foram enrolados (rocamboles) e fixados em etanol 70%. Segmentos foram mantidos em Tissue-Tech e mantidos congelados para demais análises necessárias. Foram executados cortes de 3 a 5 micrômetros de espessura, posteriormente corados pela Hematoxilina-Eosina (HE). Para o exame morfométrico, foram obtidas imagens utilizando uma microcâmera JVC TK-1270/RGB e o programa analisador de imagens KS 300 Software da Kontron Elektronik/Carl Zeiss image analyzer (Oberkochen, Alemanha). O *score* foi avaliado conforme descrito no item 4.6, *score* histológico (MARTINS *et al.*, 2007).

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 FITC dextran marcado, como descrito por Yan e colaboradores (2009). Alimento e água foram removidos e, após 4 horas, os camundongos foram pesados e receberam inoculação intragástrica de FITC-dextran (0,6 mg/g de peso corporal, PM 4000; Sigma-Aldrich). Quatro horas após a gavagem, os animais foram anestesiados com ketamina/xilazina (0,6 mL de ketamina, 0,4 mL de xilazina e 4 mL de salina) (Wirtz *et al.*, 2007), o sangue retirado por punção cardíaca e, posteriormente, foram sacrificados por deslocamento cervical. O sangue foi centrifugado a 10000 rpm g por 3 minutos à 4°C e o soro coletado. Cem µL de soro foram pipetados em poços de placas de ELISA com 96 poços. Foi, então, realizada a medida da intensidade de fluorescência de cada amostra (excitação, 492 nm; emissão, 525 nm; Spectromax M3, Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA, USA).

4.10 Dosagem de sIgA

Após a eutanásia dos animais por deslocamento cervical, o intestino delgado foi removido, pelo corte nas junções gastroduodenal e ileocecal. O conteúdo foi retirado, pesado e lavado com salina fosfatada, pH 7,2, suplementada com inibidores de protease (1 μ M de aprotinina; 25 μ M de leupeptina; 1 μ M 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. sIgA total do fluido intestinal foi determinada utilizando anticorpos anti-IgA de camundongos desenvolvidos em cabra (M-8769, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) 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 Associates, Birmingham, USA). 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 μ g/mL de conteúdo intestinal (PABST, 2012).

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 cólon dos animais foram removidos e congelados a -86°C. 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 NaPO₄, 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 ressuspensionado em tampão NaPO₄ 0,05 M (pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) 0,5% e re-homogeneizado. Aliquotas 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 H₂O₂ (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 de N-acetilglicosaminidase (NAG)

A atividade da enzima NAG, como medida indireta da atividade de macrófagos, foi avaliada por meio de testes enzimáticos utilizando como substrato p-nitrofenil-N-acetil-D-glicosamina. Homogenatos do cólon foram incubados juntamente com o substrato e o produto dessa reação, p-nitrofenol, foi quantificado por meio de um ensaio colorimétrico, conforme descrito por Bailey (1988). Este protocolo também se destinou a obtenção de amostras para a dosagem de citocinas. Fragmentos dos tecidos 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 aprotinina A) e 0,05% de Tween 20. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados a 4°C por 10 minutos a 10.621 g (Eppendorf 5430 R, São Paulo, SP, Brasil). Os sobrenadantes foram imediatamente coletados e armazenados a -80°C para posterior dosagem das citocinas. O pellet (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 NaH₂PO₄.1H₂O, 0,015 M Na₂-EDTA). As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 10.621 g. O precipitado foi submetido à lise hipotônica (500 µL 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, sendo em seguida centrifugado a 10.621 g por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi então descartado e foram adicionados 800 µL de solução salina 0,9% acrescida de Triton x-100 (Sigma) a 0,1%. As amostras foram homogeneizadas e utilizadas para o ensaio enzimático. O mesmo consistiu na adição de 100 µL de p-nitrofenil-N-acetil D-glicosamina (Sigma) dissolvida em tampão citrato/fosfato (pH 4,5) a uma concentração final de 2,24 mM, a 100 µL do sobrenadante. A reação ocorreu a 37°C por 10 minutos, em placas de 96 poços. O término da reação foi pela adição de 100 µL de tampão glicina 0,2 M (pH 10,6) e a leitura foi realizada em leitor de

microplacas (Spectromax M3, Molecular Devices Inc.) a 405 nm. Os resultados foram expressos em unidade relativa.

4.13 Medida da atividade da enzima peroxidase eosinofílica (EPO)

10

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 peroxidase de eosinófilos no tecido foi utilizada como uma maneira indireta de estimar a eosinofilia intestinal.

15

Para tanto, para cada 100 mg de tecido pesado, foi adicionado 1,9 mL de PBS (pH 7.2), em seguida o tecido foi homogeneizado 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 g por 10 minutos, e o

20

sobrenadante novamente desprezado e o *pellet* ressuspensionado em 1,9 mL de PBS (pH 7.4), contendo HTAB (*Hexadecyl trimethyl ammonium bromide*; Sigma) 0,5%. Essa solução foi novamente homogeneizada, e o homogenato separado em alíquotas de 1 mL / eppendorf, congelado 3 vezes em nitrogênio líquido e centrifugado a 10.000 g por 15 minutos. Apenas o sobrenadante foi utilizado para quantificação da enzima. O ensaio foi

25

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 H₂O₂ 6,6 mM). A placa foi incubada no escuro por aproximadamente 30 minutos, e a reação interrompida pela adição de 50 µL de H₂SO₄ 1 M. A leitura ocorreu em leitor de ELISA com filtro de 492

30

nm.

4.14 Dosagem de citocinas

35

Para avaliar a expressão de citocinas, fragmentos do cólon com aproximadamente 100 mg foram ressuspensionados 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 4°C por 10 minutos a 10.621 g (Eppendorf 5430 R, São Paulo, SP, Brasil). Os sobrenadantes foram imediatamente coletados e armazenados a -80°C

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).

10

4.15 Análise estatística

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

15

5.1 Avaliação clínica dos animais

Na fase ativa da DC, os sinais clínicos podem variar desde a redução do peso corporal decorrente da diminuição da ingestão de alimentos até distúrbios gastrointestinais, como diarreia e sangramento, semelhante ao que observados em pacientes portadores da DC (PERSE & CESAR, 2012).

No presente trabalho a indução da DC utilizando TNBS demonstrou semelhança aos sinais clínicos da doença observados em humanos, como a perda de peso, diarreia, presença de sangue nas fezes e sangramento retal, corroborando com estudos feitos por Morris e colaboradores (1989) e Cestori e colaboradores (2011). A mensuração dos sinais clínicos foi feita utilizando um *score* permitindo a construção de um índice diário da atividade da doença (DAI) (Figura 11A).

A utilização da levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905 como forma de tratamento preventivo, permitiu uma melhora nos sinais clínicos da doença, como demonstrado pela redução do DAI (redução significativa na perda de peso, na consistência das fezes e no sangramento retal) (Figura 11A). Estes achados corroboram com o estudo feito por Garrido e colaboradores (2011), que demonstraram que o probiótico *Escherichia coli* Nissle 1917 foi capaz de promover melhora no aspecto clínico dos camundongos quando comparados ao grupo não tratado, em um modelo murino de DII.

A perda de peso observada na maioria dos indivíduos afetados com a DC é decorrente do comprometimento epitelial, alteração da absorção e secreção de fluídos e eletrólitos e aumento da permeabilidade da mucosa (CHASSAING & DARFEUILLE-MICHAUD, 2011). Observou-se no estudo a perda de peso dos animais logo nas 24 horas após a indução da DC e se perpetuando nos grupos não tratados com a levedura até o dia da eutanásia. Já no grupo tratado houve uma redução significativa na perda de peso em relação ao grupo TNBS, melhorando assim os sinais clínicos dos animais (Figura 11B).

Probióticos quando administrado em quantidades adequadas desenvolvem uma interação com a microbiota comensal e tem como principais mecanismos a inibição do crescimento de patógenos microbianos, preservação das junções epiteliais, modulação da permeabilidade intestinal, modulação da resposta imune do epitélio intestinal e das células imunes da mucosa, secreção de produtos antimicrobianos e decomposição de

antígenos luminais patogênicos, diminuindo assim a evolução da doença (PENNER, FEDORAK, MADSEN, 2005; BAI & OUYANG, 2006) tais mecanismos podem ter contribuído para a menor perda de peso observado nos animais que receberam o tratamento com a levedura.

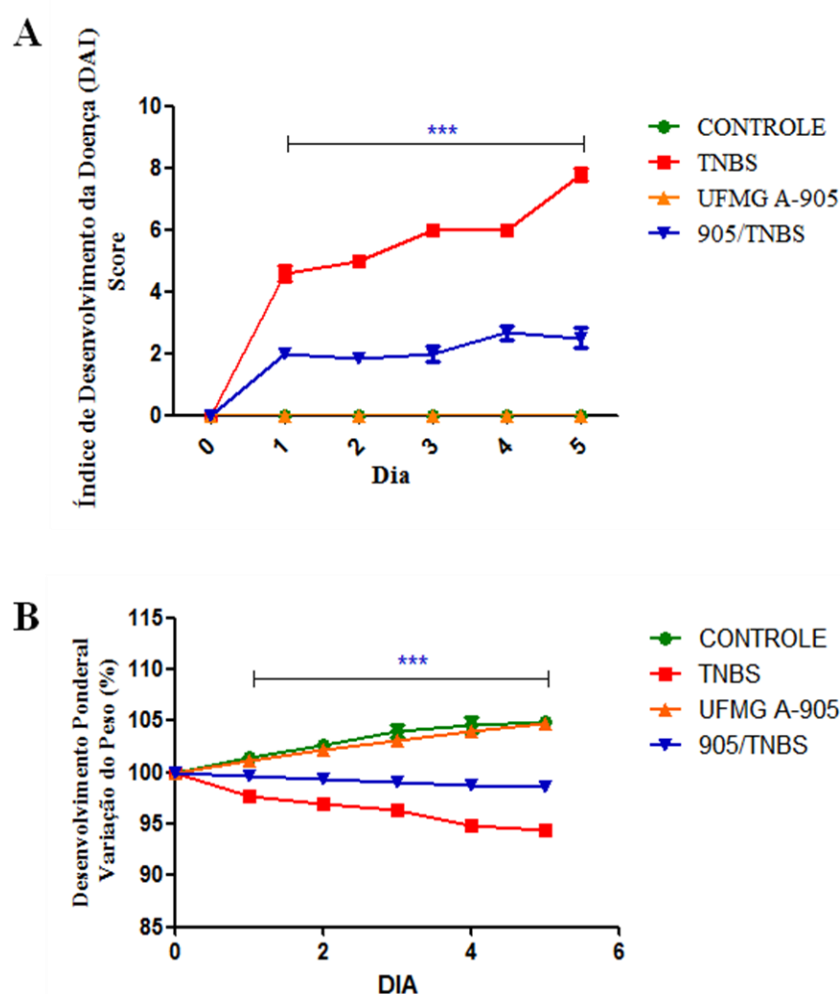


Figura 11- Aspectos clínicos da DC induzida por TNBS. (A) Índice Diário de Atividade da Doença (peso; consistência das fezes; presença de sangue nas fezes); (B) Desenvolvimento ponderal (percentual de variação do peso em relação ao início do tratamento (dia 0)). A diferença estatística analisada foi dada entre o grupo tratado com a *S. cerevisiae* UFMG A-905 e o grupo TNBS. Análise realizada utilizando o teste Two-way ANOVA e pós-teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$. [n= 6].

A progressão da DC leva ao espessamento da parede intestinal com fibrose, ocasionando uma tração da camada muscular e consequentemente o encurtamento do cólon (FOLIGNÉ *et al.*, 2006). No exame visual, foi observado um moderado encurtamento do cólon dos animais tratado com salina e TNBS, porém estatisticamente

não foi possível confirmar este fenômeno ainda que visivelmente reduzido no gráfico. O uso do probiótico como forma de tratamento não apresentou melhora significativa neste processo equiparando-se ao grupo doente (Figura 12).

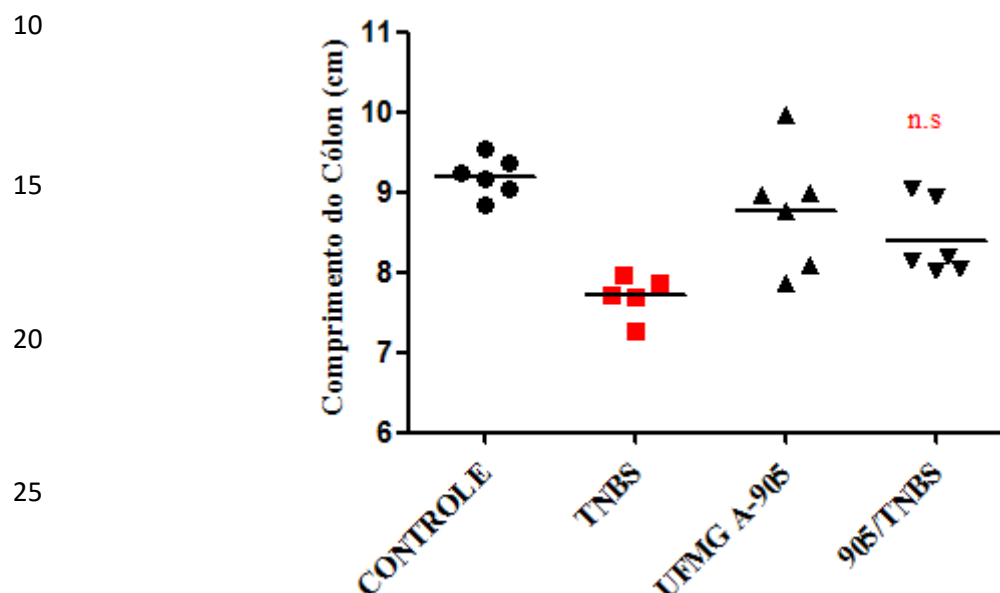


Figura 12- Avaliação do comprimento do cólon. Utilizou para a análise comparativa entre os grupos o teste One-way ANOVA seguido do Teste de Tukey, sendo N.S (no significance). $p > 0,05$. [n= 6].

5.2 Análise histopatológica do cólon

O padrão das lesões observado histologicamente em pacientes com a DC é caracterizado por áreas inflamadas do epitélio intestinal que se intercalam com áreas preservadas. Vieira e colaboradores (2009) observaram em modelo de DII, o estabelecimento de inflamação no cólon com extensas ulcerações da camada epitelial de segmento contínuo, dano de cripta e denso infiltrado inflamatório.

No modelo estudado, o TNBS induziu uma inflamação intensa no cólon, com destruição da mucosa, desestruturação das células epiteliais, alteração na camada muscular, necrose, presença de edema, intenso recrutamento de células inflamatórias e aumento nas placas de Peyer (Figuras 13B) quando comparado aos animais do grupo controle (13A). Esse processo inflamatório do epitélio intestinal justifica um agravamento dos sinais clínicos dos animais no grupo não tratado com o probiótico.

Macroscopicamente, o envolvimento morfológico da DC em humanos se dá predominantemente no intestino delgado (íleo), e intestino grosso (cólon). Já no modelo murino, por se tratar de uma indução química, as lesões são restritas ao cólon (COTRAN, KUMAR, COLLINS, 2000). Em estudo realizado por Garrido e colaboradores (2005) em um modelo de RCU induzida por Sulfato de Sódio Dextrano (DSS), observou-se ulcerações de mucosa, hiperplasia de criptas e diminuição de células caliciformes, características também observadas no modelo desenvolvido nesse estudo.

Além disso, Jurjus e colaboradores (2004) demonstraram uma diminuição na absorção de água na mucosa inflamada, podendo ser este um dos fatores responsáveis pela ocorrência de diarreia que acomete não apenas em animais colíticos como também em pacientes portadores de DII.

O tratamento com *S. cerevisiae* UFMG A-905 demonstrou uma pequena proteção no grupo que recebeu a levedura em relação ao grupo não tratado, resultando em um abrandamento das lesões e da extensão das mesmas (Figura 13C).

Na figura (13B), que representa o grupo TNBS, a presença de placas de Peyer aumentadas em seu volume e quantidade gerou uma tendência ao aumento do percentual do perímetro intestinal ocupado pelas mesmas e sugerindo ser desencadeado pelo processo inflamatório instalado, visto que 90% de toda estrutura epitelial encontra-se destruída.

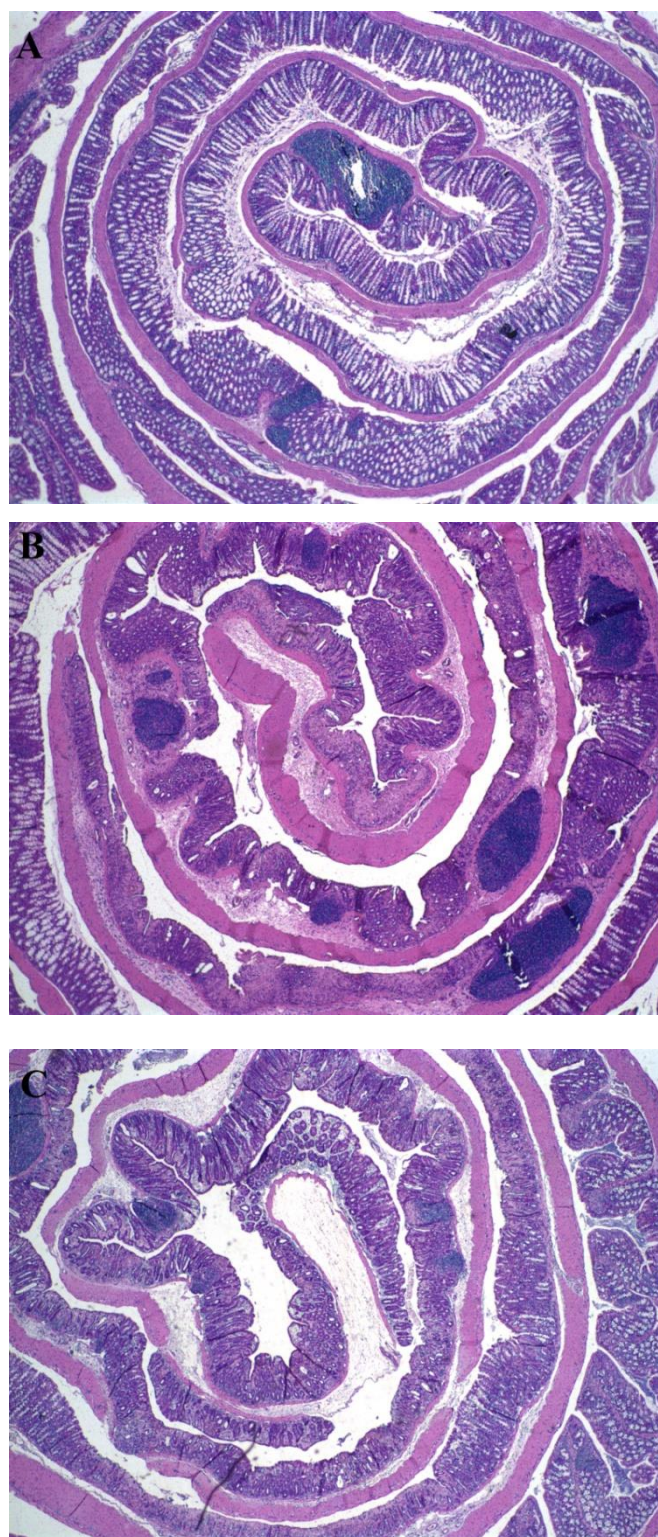


Figura 13- Fotomicrografias do cólon de camundongos. A figura (A) representa o grupo controle com o epitélio intestinal, sem a presença de necrose, edema ou inflamação. Já figura (B) representa o grupo controle positivo TNBS onde é possível observar uma destruição quase que total da mucosa, atingindo a camada muscular, presença de necrose, edema, uma inflamação grave e transmural e um aumento no número e no tamanho das Placas de Peyer. Na figura (C) representando o grupo tratado com o probiótico *S. cerevisiae* UFMG A-905, observamos uma maior preservação do epitélio intestinal com evidências de áreas integras e vilosidades preservadas, demonstrando assim que a levedura promoveu um abrandamento na lesão desencadeada pelo TNBS. 5X, HE. (n = 5)

A DC também gera destruição e diminuição do número e tamanho das células caliciformes. O uso do probiótico *E. coli* linhagem Nissle 1917 na RCU, já descrita por Kim & Ho (2010), melhora o perfil inflamatório, criando um biofilme na mucosa que promoverá uma proteção das células caliciformes, bem como uma competição com bactérias patogênicas e não patogênicas pela associação a mucosa. Estudos realizados por Martins *et al.* (2007, 2009, 2011) e Generoso e colaboradores (2010) demonstraram que a *S. cerevisiae* UFMG A-905 é capaz de diminuir a translocação bacteriana e preservar a mucosa intestinal, podendo levar a proteção das células caliciformes observada na DC em animais tratados com a levedura, (Figura 14A, 14B e 14C).

Observou-se nas imagens histopatológicas com a coloração PAS/*Alcian Blue* que no grupo TBNS (Figura 14B) a existência de células caliciformes é limitada apenas á uma mínima porção do epitélio, demonstrando que a droga indutora da doença de crohn é capaz de promover uma inflamação grave que resulta na destruição das células caliciformes. No grupo tratado com a levedura (Figura C), nota-se uma preservação maior da mucosa, com lesões bem localizadas e pouca destruição das células caliciformes, demonstrando o papel protetor da levedura.

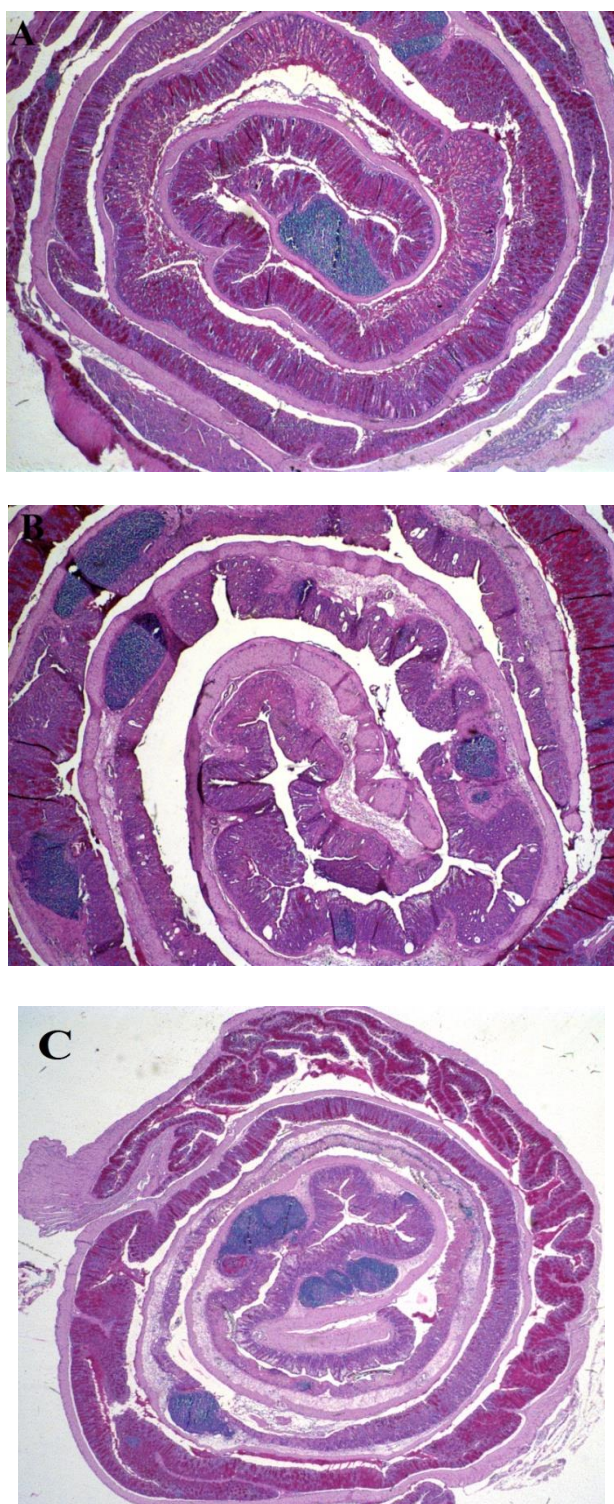


Figura 14- Fotomicrografias do cólon de camundongos BALB/C. Na imagem (A) grupo controle observa-se a células caliciformes preservadas em números e tamanho. A imagem (B) grupo TNBS nota-se uma vasta destruição das células caliciformes e consequentemente na produção de muco e na proteção do epitélio intestinal. Na imagem (C) grupo tratado com a levedura observa-se uma maior integridade das células caliciformes em relação ao grupo TNBS demonstrando uma proteção na extensão do cólon. 2X e 4X. PAS/Alcian Blue. (n=5)

5.2.1 Análise morfométrica do cólon

A análise morfométrica para avaliação da extensão das lesões, das áreas de necrose, das áreas de inflamação e das áreas de mucosa e muscular do cólon foi realizada. Observou-se aumento significativo nas áreas de necrose do grupo TNBS e uma preservação do grupo tratado com a levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905 (Figura 15A). O mesmo também pode ser observado na área inflamada do cólon, em que a extensão da área de inflamação no grupo TNBS e uma preservação de área no grupo tratado com a UFMG A-905 mantiveram-se (Figura 15B).

O TNBS causa uma inflamação grave e transmural, capaz de danificar a camada muscular do cólon. Foi observado no presente estudo uma extensa área de dano muscular no grupo TNBS e uma preservação significativa no grupo tratado com a *S. cerevisiae* UFMG A-905 (Figura 15C). O TNBS é altamente tóxico para as células epiteliais quando em contato com o cólon, uma vez que promove inflamação da mucosa, caracterizada por uma infiltração densa de células T e macrófagos em toda parede intestinal (NEURATH *et al.*, 2012). Foi observada uma extensa área de mucosa preservada no grupo tratado com a levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905, contrapartida no grupo TNBS a área de mucosa preservada foi mínima (Figura 15D). A integridade e a manutenção do epitélio intestinal dependem de inúmeros fatores como as junções célula-célula, a camada de muco e a participação da microbiota como fator coadjuvante no processo de proteção (SANDERS *et al.*, 2012).

Os resultados morfométricos do presente estudo corroboram com as informações descritas na literatura, em que os danos teciduais produzidos pelo TNBS são extremamente agressivos causando necrose, inflamação grave, danos na camada muscular e destruição da mucosa do cólon (MARCHESI *et al.*, 2007, MAHAVADI, 2011; FLYNN, 2011).

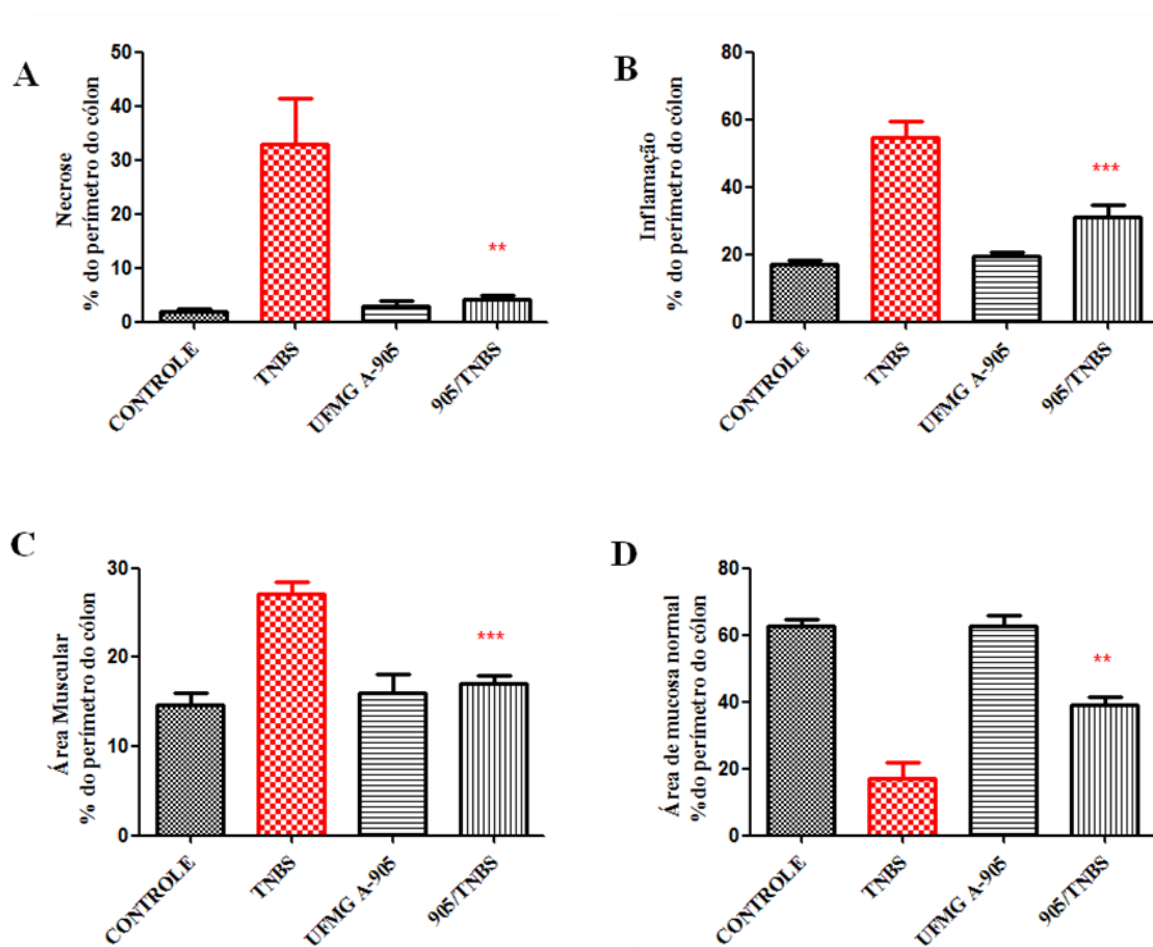


Figura 15- Morfometria do cólon. As análises foram feitas com a maior área possível do órgão, sendo capturadas 20 imagens em HE na objetiva de 20x e com a utilização de uma gotícula de 25 pontos para cada imagem utilizando o CorelDraw11. Foram avaliados necrose (A), inflamação (B), área muscular (C) e mucosa (D). Todos os dados foram expressos em forma de percentual. A análise estatística foi realizada utilizando o teste One-way ANOVA seguido do Teste de Tukey, sendo N.S $p > 0,05$, ** $< 0,01$ e *** $p < 0,001$. (n= 5/grupo).

5.3 *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 diminui a permeabilidade intestinal no modelo de DC induzida por TNBS

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 Dáltons (Da) utilizam essa via de acesso ao compartimento interno (PERSE & CESAR, 2012).

O método utilizado nesse estudo para mensurar a permeabilidade foi da fluorescência do FITC-dextran translocado do intestino para o soro. Estudos apontam a existência na DC de uma resposta imunológica alterada ou exagerada a antígenos luminais na mucosa intestinal provocando um dano à barreira do epitélio levando a um aumento da permeabilidade intestinal (SANDERES *et al.*, 2012).

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.

O presente estudo demonstrou que os animais do grupo TNBS apresentaram um aumento da permeabilidade intestinal, sugerindo que a droga indutora da DC provocou um dano no epitélio do cólon levando a esse aumento (Figura 16). O aumento da permeabilidade intestinal é justificado pelos dados histológico que demonstram um dano a integridade do epitélio intestinal.

No grupo tratado com a levedura ocorreu uma discreta preservação da integridade dessa barreira e da permeabilidade intestinal, demonstrando a efetividade do potencial probiótico em promover uma imunomodulação e conseqüentemente uma proteção do epitélio ($P < 0,05$). No grupo etanol não houve aumento ou redução da permeabilidade demonstrando assim que este veículo do TNBS não exerce danos à permeabilidade. Generoso e colaboradores (2010) observaram efeito protetor da *S. cerevisiae* UFMG A-905 usando a técnica de permeabilidade intestinal avaliada pela determinação da radioatividade no plasma após a administração oral de ^{99m}Tc -DTPA em um modelo murino, corroborando com nosso estudo.

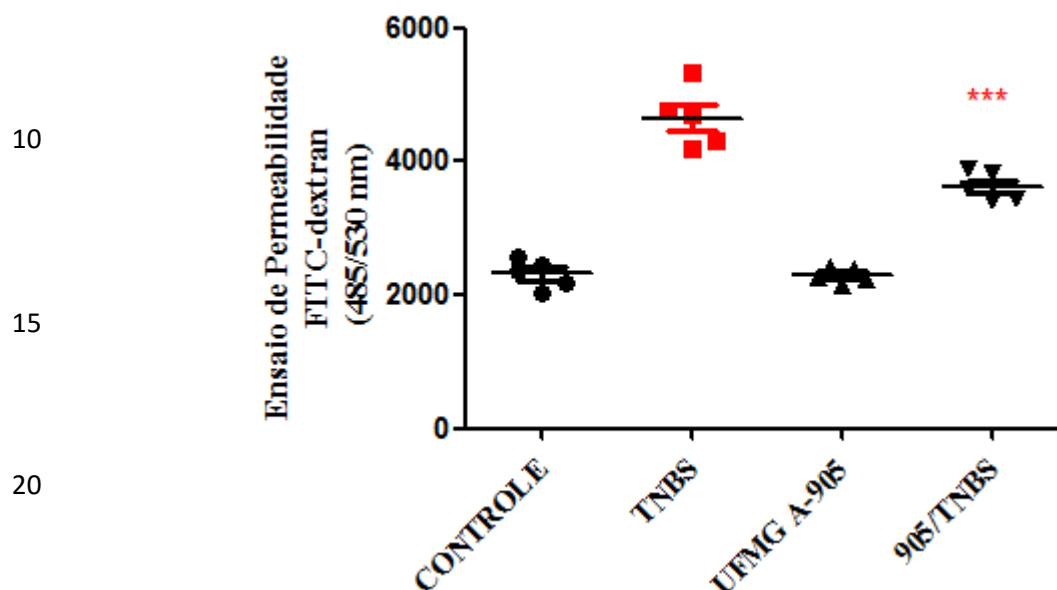


Figura 16- Avaliação da permeabilidade intestinal. Ensaio utilizando um dextrano marcado com fluorescência. Análise usando teste One-away ANOVA, seguido do Test de Tukey. (***= $p < 0,001$). [n=5].

5.4 Produção de sIgA

A imunidade adaptativa intestinal tem a capacidade para gerar grandes quantidades de imunoglobulina do tipo A (IgA) por múltiplas vias foliculares e extra-foliculares que operam na presença ou ausência de interações celulares T e B cognatos. O epitélio intestinal seleciona mecanismos imunes efetores adequados neutralizando patógenos e evitando danos ao tecido. Desta forma fornece uma proteção imunitária adequada sem comprometer a integridade da barreira epitelial (MACPHERSON *et al.*, 2008). Uma estratégia intestinal chave para gerar a proteção imunitária de uma forma não inflamatória é a produção de IgA, o isotipo 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 epítomos 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, 2004). 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.

Na avaliação dos níveis de IgA no fluído intestinal foi possível observar um aumento no grupo TNBS e uma redução estatisticamente significativa no grupo onde a levedura foi administrado (Figura 17). O etanol associado ao TNBS promove, por um processo químico, um comprometimento da integridade da camada de muco e um aumento da permeabilidade da mucosa ocorrendo, assim, a liberação de IgA para o fluído intestinal e também a entrada de um antígeno luminal que não é adequadamente eliminado pelo sistema imune (GONÇALVES *et al.*, 2008). O aumento dos níveis de IgA no fluído intestinal é justificado pela destruição do epitélio intestinal, bem como pelo aumento da permeabilidade no presente estudo.

Observou-se no grupo TNBS um acentuado aumento de sIgA, justificado em resposta do hospedeiro ao aumento da permeabilidade e comprometimento da integridade da camada de muco e consequente liberação para o fluido intestinal da mesma. No grupo tratado com a levedura à agressão epitelial foi mais branda e, consequentemente, a destruição da camada de muco foi menor levando os níveis de sIgA liberado mais próximos dos níveis basais. Este processo pode estar relacionado ao fato de que as moléculas de IgA se ligam aos antígenos luminiais evitando assim a sua passagem e dispersão para o epitélio intestinal controlando a resposta imunológica nesse processo como descrito em estudos feitos por Dongarrá e colaboradores (2012) e Duerkop, 2009.

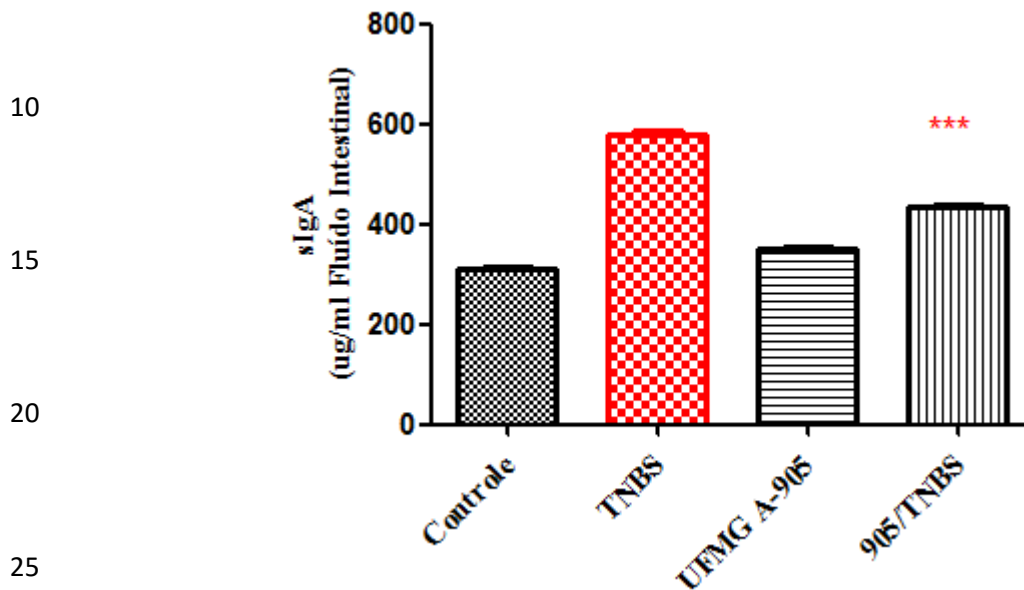


Figura 17- Análise e avaliação da produção de sIgA no modelo de DC induzida por TNBS. O teste usado para a análise estatística foi o teste One-way ANOVA seguido do Teste de Tukey, sendo *** $p < 0,001$; O.D. 492nm. [n= 6].

5.5 *Saccharomyces. cerevisiae* UFMG A-905 diminui o influxo de neutrófilos e da quimiocina KC/CXCL-1 para o sítio primário da inflamação no modelo de DC induzida por TNBS

O papel dos neutrófilos durante os processos inflamatórios já é bem descrito na literatura, sendo um dos eventos essenciais para a proteção do organismo (SMITH, 1994; XIAO *et al.*, 2005; 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 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 DII (KUCCHARZIK *et al.*, 2001; WILLIAMS & PARKOS, 2007).

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 responsável pelo recrutamento dessas células de defesa.

A quimiocina KC/CXCL-1 dosada nos camundongos, corresponde a citocina IL-8 tipicamente humana desempenhando a mesma função de quimioatrair neutrófilos.

Os níveis de MPO no grupo tratado com a levedura foram significativamente reduzidos ($P < 0,05$) quando comparado ao grupo da DC induzida por TNBS que teve concentrações muito elevadas quando comparadas ao grupo controle (Figuras 18A e 18B). A quantificação da quimiocina KC/CXCL-1 corroborou os dados da MPO, onde a sua taxa esteve elevada no grupo da DC induzida pelo TNBS em relação ao grupo controle e reduzida nos grupos tratados com a levedura em relação ao grupo TNBS.

Alguns estudos clínicos têm apontado correlação positiva entre o número de neutrófilos, através da atividade da MPO, e a severidade da DC em biópsias de tecido de pacientes, gerando uma semelhança aos modelos murinos de DII (Carlson *et al.*, 1999; Saitoh *et al.*, 1999; Jeziorska *et al.*, 2001; Sangfelt *et al.*, 2001).

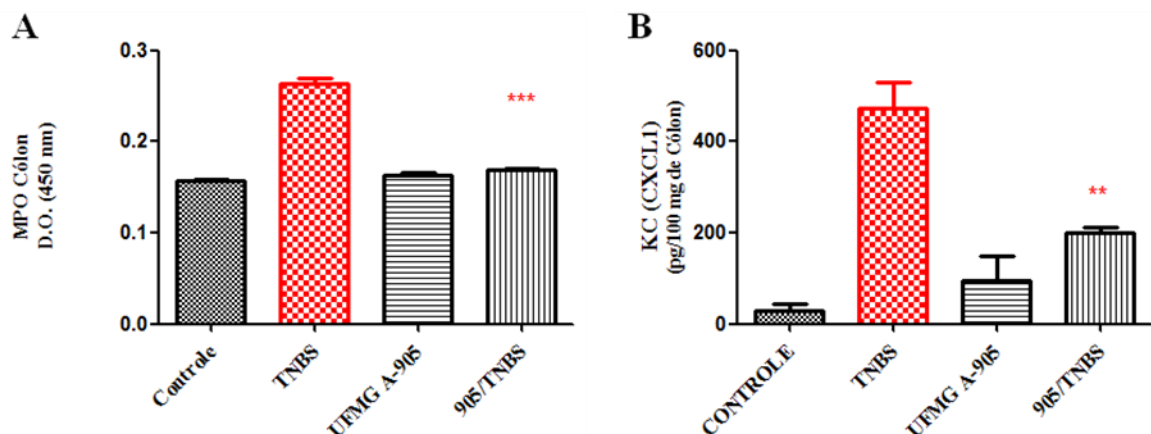


Figura 18- Avaliação da presença de infiltrados de neutrófilos em modelo da DC induzida por TNBS. Foram avaliados os níveis da enzima mieloperoxidase (MPO) (A) e da quimiocina KC/CXCL-1 (B). Teste: ANOVA one-away, seguido PELO Teste de Tukey. (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$). [n = 6].

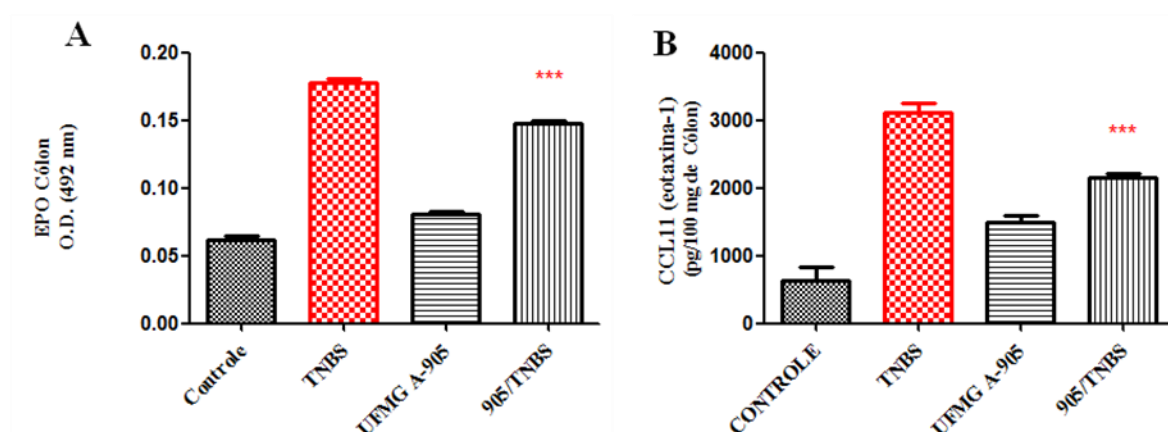
5.6 *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 diminui o influxo de eosinófilo e da quimiocina Eotaxina-1 (CCL11) para o sítio primário da inflamação no modelo de DC induzida por TNBS

10 Vários estudos clínicos apontam relação direta entre o número de eosinófilos, determinado pela atividade da enzima EPO, e a gravidade das DII em biópsias de tecido de pacientes (CARLSON *et al.*, 1999; SAITOH *et al.*, 1999; JEZIORSKA *et al.*, 2001; SANGFELT *et al.*, 2001). A EPO possui grande homologia com a MPO, desempenhando também papel fundamental na lise de micro-organismos patogênicos; 15 porém, sua liberação em massa, pode contribuir para a lesão de tecidos subjacentes ao foco inflamatório (MCCORMICK *et al.*, 1994; O'BRIEN, 2000).

Os eosinófilos têm a capacidade de iniciar ou potencializar uma resposta inflamatória, pela liberação de uma variedade de citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos 20 (GLEICH *et al.*, 1993; ROTHENBERG, 1998; ROTHENBERG *et al.*, 2001). Os eosinófilos podem produzir disfunções gastrointestinais pela ação de proteínas presentes em seus grânulos citoplasmáticos sendo amplamente estudados em modelos de DII (FORBES *et al.*, 2004; AL-HADDAD & RIDDELL, 2005; EIJKELKAMP *et al.*, 2007; HUNTER *et al.*, 2007). A quimiocina CCL11 (eotaxina-1) é uma das responsáveis pela 25 atração dos eosinófilos para o sítio da infecção, expressa em níveis elevados no epitélio intestinal e bastante presente nas DII (HUNTER *et al.*, 2007).

No presente estudo, observou-se uma redução significativa estatisticamente ($P < 0,05$) do influxo de eosinófilos nos animais tratados com a levedura em relação ao grupo da 30 DC induzida pelo TNBS. No grupo TNBS foi observado um aumento da EPO quando comparada ao grupo controle, demonstrando, assim, que em um processo inflamatório os eosinófilos são capazes de secretar do interior de suas vesículas, mediadores tóxicos (Figura 19A e 19B).

35 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. 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 a levedura estimulou o recrutamento somente pela CCL11.



10 **Figura 19- Avaliação da presença de infiltrados de eosinófilos em modelo da DC induzida por TNBS.** Foram avaliados os níveis da peroxidase eosinofílica (EPO) (A) e da quimiocina CCL11 (eotaxina-1) (B). Teste: ANOVA one-away, seguido PELO Teste de Tukey. (** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$). [n = 6]

15

5.7 *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 diminui o recrutamento de macrófagos para o sítio primário da inflamação no modelo de DC induzida por TNBS

Os macrófagos participam do processo de patogenicidade das DII, produzindo uma grande variedade de citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo TNF, IL-6 e IL-1 β (ROGLER & ANDUS, 1998; KANAI *et al.*, 2001; AUTSCHBACH *et al.*, 2002; BANKS *et al.*, 2003). Kanai e colaboradores (2001) demonstraram que há um aumento do número de macrófagos ativados no cólon de animais com colite experimental, e que a diminuição da ativação destas células reduz a inflamação intestinal.

25

Essas células inflamatórias geram metabólitos reativos de oxigênio e de nitrogênio, além de proteases que degradam a matriz extracelular causando dano tecidual (MAHIDA, 2000). Os macrófagos podem apresentar diferentes fenótipos funcionais, produzindo fatores imunossupressores e anti-inflamatórios, os quais podem atuar no reparo do tecido lesado (GARSIDE, 1999; JURJUS *et al.*, 2004).

30

Para avaliar indiretamente o recrutamento de macrófagos para o sítio inflamatório avaliamos a enzima NAG. A indução da DC com o TNBS elevou os níveis de macrófagos quando comparado ao grupo controle, enquanto o tratamento com a

levedura foi capaz de reduzir significativamente os valores dessas células inflamatórias promovendo no sítio da inflamação uma maior proteção do epitélio intestinal e consequentemente um menor recrutamento de células (Figura 20).

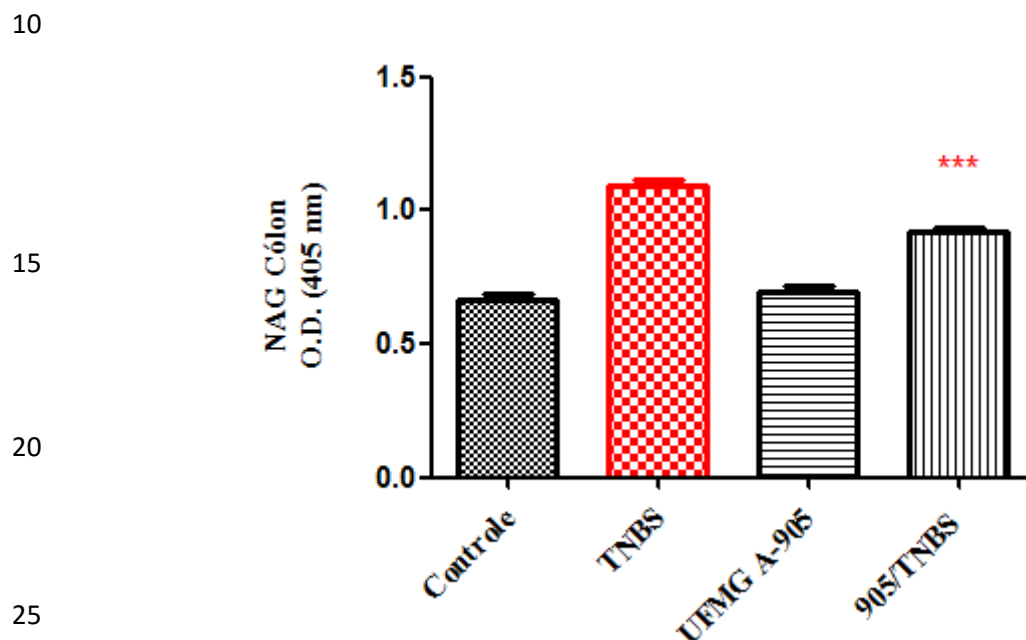


Figura 20- Avaliação do influxo de macrófagos no sítio da inflamação da DC induzida por TNBS. Análise estatística realizada pelo teste One-way ANOVA, seguido do Teste de Tukey, sendo *** $p < 0,001$. [n=6].

5.8 *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 diminui o recrutamento de citocinas pró-inflamatórias para o sítio primário da inflamação no modelo de DC induzida por TNBS

Na DC há um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias relevantes. Níveis elevados de IL-1 β , TNF e IL-6 foram encontrados na mucosa intestinal inflamada e em monócitos obtidos de sangue periférico de portadores destas doenças em estudos realizados por Brynskov e colaboradores (1992), sendo que a IL-6 se manteve em maiores concentrações durante a atividade inflamatória. O TNF, a IL-12 e a IL-6 são citocinas envolvidas nos processos inflamatórios graves, principalmente em estudos realizados em linhagens animais susceptíveis ao desenvolvimento da DC (NAITO *et al.*, 2003; TAKAGI *et al.*, 2003; NAITO *et al.*, 2004).

A administração da levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905 no grupo DC induzido pela ação do TNBS foi capaz de reduzir a ativação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6 ($P < 0,05$) como demonstrado nas figuras 21A e 21B. A elevação dos níveis dessas citocinas no grupo TNBS pode estar associada à destruição do epitélio intestinal pela
10 ação do fármaco que induz uma resposta imunológica inflamatória intensa e transmural.

Uma importante citocina considerada crucial na fisiopatologia das DII é o TNF, como evidenciado por estudos clínicos com o objetivo de avaliar a eficácia de anticorpos monoclonais contra esta citocina nas DII (ROGLER & ANDUS, 1998). A ligação do
15 TNF no processo inflamatório intestinal tem sido estudada amplamente, sendo que atualmente o anticorpo monoclonal anti-TNF é um dos medicamentos mais eficazes para o tratamento e indução da fase de remissão em pacientes com DII (POPIVANOVA *et al.*, 2008). A dosagem de TNF no presente estudo demonstrou um acentuado aumento no grupo da DC induzido com TNBS em relação ao grupo controle. Já no grupo tratado
20 com a levedura observou-se uma redução dos níveis de TNF ($P < 0,05$), demonstrando, assim, que o probiótico foi capaz de promover uma imunomodulação na secreção desta citocina e com isso abrandar o processo inflamatório instalado no cólon dos animais com a DC induzida com TNBS (Figura 21C).

25 As citocinas TNF e IL-1 β induzem a síntese e a secreção de quimiocinas e outras citocinas, promovendo indiretamente a migração de neutrófilos para o foco inflamatório (LIN *et al.*, 2002). O aumento dessas citocinas nos grupos DC induzidos pelo TNBS corroboram os dados obtidos na dosagem de MPO do presente estudo, onde o mesmo se encontra elevado nos grupos da DC.

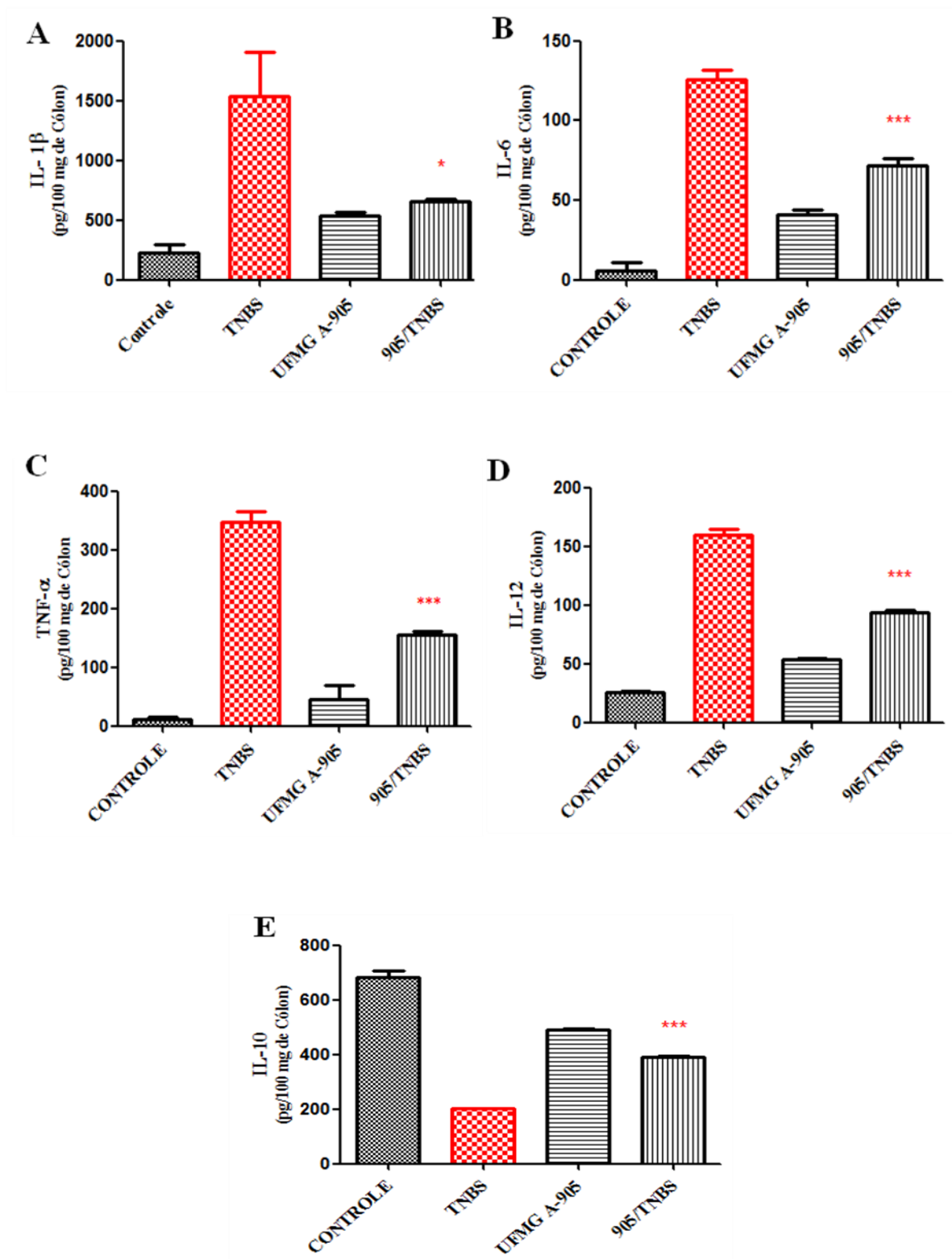
30 Na colite experimental induzida pelo TNBS, estudos demonstram que o uso de anticorpo monoclonal contra a IL-12 foi capaz de reverter completamente o processo inflamatório, demonstrando que a IL-12 seria a principal citocina da resposta imune do tipo Th1 (NEURATH *et al.*, 1995; LIU *et al.*, 2001). Tanto a utilização de anticorpo
35 anti-TNF quanto anti-IL-12p40 demonstraram resultados positivos no tratamento contra as DII (MANNON *et al.*, 2004). Foi demonstrado, também, no estudo citado, que o anticorpo anti-IL-12p40 age na remissão em pacientes com DC resistentes ao tratamento com anti-TNF, sugerindo que a citocina IL-12 atua como um dos principais alvos de estudo na patogênese das DII.

Nossos resultados demonstraram que a produção de IL-12 na DC induzida pelo TNBS, foi significativamente maior que o grupo controle ($P < 0,05$), confirmando sua participação no processo de desenvolvimento da colite experimental. No grupo tratado com a levedura os níveis dessa citocina foram reduzidos ($P < 0,05$) sugerindo um controle do processo inflamatório (Figura 21D).

Sabe-se que a IL-10 é uma importante citocina anti-inflamatória produzida por uma variedade de células, incluindo os linfócitos T e B, tímócitos, macrófagos, mastócitos, queratinócitos e células do epitélio intestinal (PAPADAKIS & TARGAN, 2000).

Estudos em camundongos com deleção gênica para a IL-10 mostraram que há o desencadeamento de uma inflamação intestinal espontânea, e esse processo pode ser impedido pela reposição de IL-10 (KUHN *et al.*, 1993; PAPADAKIS & TARGAN, 2000; LINDSAY *et al.*, 2004; SHIRAKI *et al.*, 2004). A IL-10 inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias secretadas por macrófagos, tais como IL-1 β , IL-6 e TNF (FIORENTINO *et al.*, 1991; FIOCCHI, 1998).

Estudo feito por Generoso e colaboradores (2010), demonstrou que a *S. cerevisiae* UFMG A-905 foi capaz de aumentar significativamente os níveis de IL-10 em um modelo murino de obstrução intestinal. Deste modo, os resultados obtidos no presente estudo sugerem que a secreção aumentada de IL-10 no grupo tratado com a levedura ($P < 0,05$) seria responsável pela redução simultânea das citocinas pró-inflamatórias, promovendo uma regulação da resposta inflamatória da mucosa intestinal (Figura 21E).



25 **Figura 21- Avaliação de citocinas.** Quantificação de citocinas (A) IL1- β , (B) IL-6, (C) TNF, (D) IL-12 e (E) IL-10 no cólon. Teste: One-away ANOVA, seguido Teste de Tukey. (* = p<0,05; ***= p<0,001). [n=6].

- 10 I. O modelo murino de aplicação retal de TNBS se mostrou bastante adequado para simular a DC em humano como demonstrado pelos dados clínicos, histopatológicos, imunológicos e de permeabilidade intestinal (Objetivos 1, 2 e 3).
- 15 II. A levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905, usada como probiótico numa forma preventiva, foi capaz de promover uma atenuação dos sinais clínicos como demonstrado pela redução do DAI no grupo tratado com a levedura quando comparado ao grupo controle TNBS (Objetivo 1).
- 20 III. O probiótico promoveu uma redução da inflamação intensa e transmural do epitélio intestinal observada no grupo TNBS, promovendo um abrandamento da área lesada, diminuindo a inflamação e o processo de necrose e promovendo uma maior preservação da área muscular e de mucosa (Objetivo 1).
- IV. A *S. cerevisiae* UFMG A-905 trás os níveis de sIgA para valores basais, no fluido intestinal (Objetivo 3).
- 25 V. Com a administração oral do probiótico foi possível observar uma redução no recrutamento para o sítio inflamatório de neutrófilos (MPO), eosinófilos (EPO) e macrófagos (NAG), bem como em suas respectivas quimiocinas CXCL1 (KC) e CCL11 (eotaxina-1) (Objetivo 3).
- 30 VI. Com a administração oral do probiótico, foi observada uma redução das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, TNF- γ e IL-12, concomitante com um aumento da citocina regulatória IL-10 quando comparado com os mesmos dados determinados no grupo controle TNBS. (Objetivo 3).
- 35 VII. Com a administração oral do probiótico, foi possível observar uma discreta preservação da permeabilidade intestinal quando comparado ao grupo TNBS, demonstrando a efetividade do probiótico em promover uma proteção do epitélio. (Objetivo 2)

Com os dados expostos no presente trabalho, conclui-se que a levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905 tem potencial probiótico preventivo, promovendo um abrandamento no modelo murino da DC induzida por TNBS em todos os aspectos estudados. É necessário que novos estudos sejam realizados para avaliar de maneira mais detalhada os mecanismos de ação pelos quais os efeitos observados são desencadeados. Experimentos de administração curativa da levedura seriam importantes para poder ampliar a possibilidade de uso deste probiótico potencial. São necessários enfim, mais estudos para que o modelo murino da DC induzido por TNBS seja capaz de reproduzir de forma ainda mais adequada à doença em humanos.

ABCD. **Revista da associação brasileira de Colite Ulcerativa e doença de Crohn.** São Paulo: Ano VI, 27, 2006.

10 ABRAHAM C, CHO JH. Inflammatory bowel disease. **The New England Journal of Medicine**; v. 361, p. 2066–78, 2009.

15 ALBERT, E; WALKER, J; THIESEN A; CHURCHILL, T; MADSEN K. Cis-urocanic acid attenuates acute dextran sodium sulphate-induced intestinal inflammation. **PLoS ONE**, v.5, e13676, 2010.

20 ALDHOUS MC, DRUMMOND HE, ANDERSON N, SMITH LA, ARNOTT IDR, SATSANGI J, PHIL D. Does cigarette smoking influence the phenotype of Crohn's disease? Analysis using the Montreal classification. **The American Journal of Gastroenterology**; v. 102, p. 577–88, 2007.

AL-HADDAD, S. RIDDELL, R.H. The role of eosinophils in inflammatory bowel disease. **Gut**, v.54, p.1674-5. 2005.

25 ARAUJO SEA, OLIVEIRA JR O, MOREIRA JPT, HABR-GAMA A, CERSKI CTS, CASERTA NMG. Doença de Crohn Intestinal: **Manejo. Projeto Diretrizes.** Associação Médica Brasileira. Conselho Federal de Medicina. São Paulo. 2008.

30 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.

35 AUTSCHBACH, F., GIESE, T., GASSLER, N., SIDO, B., HEUSCHEN, G., HEUSCHEN, U., ZUNA, I., SCHULZ, P., WECKAUF, H., BERGER, I., OTTO, H.F. MEUER, S.C. Cytokine/chemokine messenger-RNA expression profiles in ulcerative colitis and Crohn's disease. **Virchows Arch**, v.441, p.500-13. 2002.

- BAI, A. P.; OUYANG, Q. Probiotics and inflammatory bowel diseases. **Postgrad. Medical Journal**. v. 82, p. 376-382, 2006.
- 10 BANKS, C., BATEMAN, A., PAYNE, R., JOHNSON, P. SHERON, N. Chemokine expression in IBD. Mucosal chemokine expression is unselectively increased in both ulcerative colitis and Crohn's disease. **The Journal of Pathology**, v.199, p.28-35. 2003.
- 15 BAPTISTA ML. **Associação de Polimorfismo dos genes CARD15 e IL23R com Doença de Crohn em uma População Brasileira**. 113 f. Dissertação de Doutorado de Medicina Interna, setor de Ciências da Saúde-Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.
- BARBOSA, F. H. F, et al., Microbiota indígena do trato gastrointestinal. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.10, p. 10, 2010.
- 20 BIBILONI R, FEDORAK RN, TANNOCK GW, MADSEN KL, GIONCHETTI P, CAMPIERI M, DE SIMONE C & SARTOR RB; VSL#3 probiotic mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. **American Journal of Gastroenterology** v.100, p.1539–1546, 2005.
- 25 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.
- 30 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.
- BRAUN J, WEI B. Body. **Annual Review of Pathology. Mechanisms of Disease**. v.2, p. 401–29, 2007.
- 35 CARLSON, M., RAAB, Y., PETERSON, C., HALLGREN, R. VENGE, P. Increased intraluminal release of eosinophil granule proteins EPO, ECP, EPX, and cytokines in ulcerative colitis and proctitis in segmental perfusion. **The American Journal of Gastroenterology**, v.94, p.1876-83. 1999.

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

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

- 15 CATAPANI, WR. Tratamento clínico convencional da retrocolite ulcerativa. Em: Cardozo, WS, Sobrado, CW. **Doença Inflamatória Intestinal**. Barueri: Manole; p.215-222, 2012.

- 20 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/index.php?option=com_content&task=view&id=22&Itemid=35 Acesso em: 12 jul. 2014.

- 25 CHANDLER MB, ZEDDUN SM., BORUM ML. The role of positron emission tomography in the evaluation of inflammatory bowel disease. **Annals of the New York Academy of Sciences** v.1228, p.59–63, 2011.

- CHASSAING B, DARFEUILLE-MICHAUD A. The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology** v.140, p.1720-1728, 2011.

- 30 CIRIELLO, C. J. & LACHANCE, M. A. **YEASTCOMPARE**. University of Western Ontario, London, Canada, 2001.

- COBEA. Colegio Brasileiro de Experimentação Animal (2006) **Legislação e Ética**. Disponível em: <http://www.cobea.org.br> Acesso em: 12 jul. 2014.

- 35 COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Doença inflamatória intestinal. In: _____. **Patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 732-734, 2000.

CROHN BB, GINZBURG L, OPPENHEIMER MD. Regional ileitis: apathologic and clinical entity. **JAMA**; v.99, p.1323-1329, 1932.

10 CZERUCKA, D.; PICHE, T.; RAMPAL, P. Review article: yeast as probiotics - *Saccharomyces boulardii*. **Alimentary Pharmacology e Therapeutics.**, v. 26, p. 767-778, 2007.

15 DAMIÃO, AOM, FEITOSA, F, MILANI, LR. Tratamento clínico convencional da doença de Crohn. Em: Cardozo. WS, Sobrado, CW. **Doença Inflamatória Intestinal**. Barueri: Manole; p.223-240, 2012.

20 DAVIDISON, P; CARVALHO, G. Ecologia e Disbiose Intestinal. In: PASCHOAL, V; NAVES; FONSECA, ANA B.B.L. **Nutrição Clínica Funcional: Dos princípios à prática clínica**. São Paulo. VP Editora, p.142-169, 2008.

D'HAENS G, HOMMES D, BAERT F, et al, Mucosal healing is associated with a top down strategy in the treatment of Crohn's disease'. **Gut**, 54(suppl 1):A17, 2005.

25 DONGARRÁ, M.L.; RIZZELLO, V.; MUCCIO, L.; FRIES, W.; CASCI, A.; BONACCORSI, L.; FERLAZZO, G. Mucosal immunology and probiotics. **Current Allergy and Asthma Reports**, v.13, p.19-26, 2013.

30 DUERKOP, B.A.; VAISHNAVA, S.; HOOPER, L.V. Immune responses to the microbiota at the intestinal mucosal surface. **Immunity**, v.31, p.368-76, 2009.

EIJKELKAMP, N., HEIJNEN, C.J., LUCAS, A., PREMONT, R.T., ELSENBRUCH, S., SCHEDLOWSKI, M. KAVELAARS, A. G protein-coupled receptor kinase 6 controls chronicity and severity of dextran sodium sulphate-induced colitis in mice. **Gut**, v.56, p.847-54. 2007.

35 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.

FAUCI AS, BRAUNWALD E, ISSELBACHER KJ, WILSON JD, MARTIN JB, KASPER DL, EDITORS. **Harrison's Principles Of Internal Medicine**. 17th Ed. New York: McGraw Hill, Health; Professions Division; 2008.

- 10 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.

15

FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. **Gastroenterology**, v.115, p. 182-205, 1998.

- 20 FIORENTINO, D.F., ZLOTINIK, A., MOSMANN, T.R., HOWARD, M. e O'GARRA, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **The Journal of Immunology**, v.147, p.3815-22, 1991.

- 25 FOLIGNÉ, B.; NUTTEN, S.; STEIDLER, L.; DENNIN, V.; GOUDERCOURT, D.; MERCENIER, A.; POT, B. Recommendations for improved use of the murine tnbs-induce colitis model in evaluating anti-inflammatory properties of lact acid bacteria: technical and microbiological aspect. **Digestive Diseases and Science.**, v.51, p.390-400, 2006

- 30 FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **World Health Organization** (WHO). Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, 34 p., 2001.

- 35 FORBES, E., MURASE, T., YANG, M., MATTHAEI, K.I., LEE, J.J., LEE, N.A., FOSTER, P.S. HOGAN, S.P. Immunopathogenesis of experimental ulcerative colitis is mediated by eosinophil peroxidase. **The Journal of Immunology**, v.172, p.5664-75. 2004.

- GARSDIE, P. Cytokines in experimental colitis. **Clinical & Experimental Immunology**, v.118, p.337-9. 1999.
- 10 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.
- 15 GLEICH, G.J., ADOLPHSON, C.R. LEIFERMAN, K.M. The biology of the eosinophilic leukocyte. **Annual Review of Medicine**, v.44, p.85-101. 1993.
- 20 GONÇAVES, C.C.M.; HERNANDES, L.; OLIVEIRA, N.L.B.; NATALI, M.R.M. Alternativas terapêuticas em modelos experimentais de doença inflamatória intestinal. **Ciências Cuidado e Saúde**, v.7, p. 107-111, 2008.
- 25 GUSLANDI, M., MEZZI, G., SORGI, M., TESTONI, P.A. *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. **Digestive Diseases and Sciences**. v.45, p.1462-1464, 2000.
- HANAUER SB, SANDBORN W. Practice parameters committee of the American college of gastroenterology. management of Crohn's disease in adults. **The American Journal of Gastroenterology**, v.96, p. 635-43, 2001.
- 30 HARA, D. B.; E. S. FERNANDES; M. M. CAMPOS E J. B. CALIXTO. Pharmacological and biochemical characterization of bradykinin B(2) receptors in the mouse colon: Influence of the TNBS-induced colitis. **Regulatory Peptides**, v.141, p.25-34. 2007.
- 35 HAWRELAK, J.A.; MYERS, S.P. The causes of intestinal dysbiosis. **Alternative Medicine Review**, v. 9, p.180-197, 2004.

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

- 10 HUGOT, J. P., CHAMAILLARD, M., ZOUALI, H., LESAGE, S., CÉZARD, J P, BELAICHE J., ALMER, S., TYSK, C., O'MORAIN, GASSULL, M., VIBEKE, B., FINKEL, Y. & CORTOR, A., 'Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease.', **Nature**, v.411, p.599-603, 2001.

- 15 HUNTER, M.M., WANG, A. MCKAY, D.M. Helminth infection enhances disease in a murine TH2 model of colitis. **The American Journal of Gastroenterology**, v.132, p.1320-30. 2007.

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

- 25 JEZIORSKA, M., HABOUBI, N., SCHOFIELD, P. e WOOLLEY, D.E. Distribution and activation of eosinophils in inflammatory bowel disease using an improved immunohistochemical technique. **The Journal of Pathology**, v.194, p. 484-92, 2001.

- 25 JEZIORSKA, M., HABOUBI, N., SCHOFIELD, P. WOOLLEY, D.E. Distribution and activation of eosinophils in inflammatory bowel disease using an improved immunohistochemical technique. **The Journal of Pathology**, v.194, p.484-92. 2001.

- 30 JURJUS, A.R.; KHOURY, N.M.; REIMUND, J.M. Animal models of inflammatory bowel disease. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**., v.50, p.81-99, 2004.

- 35 KANAI, T., WATANABE, M., OKAZAWA, A., SATO, T., YAMAZAKI, M., OKAMOTO, S., ISHII, H., TOTSUKA, T., IYAMA, R., OKAMOTO, R., IKEDA, M., KURIMOTO, M., TAKEDA, K., AKIRA, S. HIBI, T. Macrophage-derived IL-18-mediated intestinal inflammation in the murine model of Crohn's disease. **The American Journal of Gastroenterology**, v.121, p.875-88. 2001.

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.

- 10 KLEIN, S.M.; ELMER, G.W.; MCFARLAND, L.V.; SURAWICZ, C.M.; LEVY, R.H. Recovery and elimination of the biotherapeutic agent, *Saccharomyces boulardii*, in healthy human volunteers. **Pharmaceutical Research**., v. 10, p. 1615-1619, 1993.

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

- 20 KUHN, R., LOHLER, J., RENNICK, D., RAJEWSKY, K. MULLER, W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. **Cell Press**, v.75, p.263-74. 1993.

LAKATOS L., LAKATOS P.L. [Medical therapy of inflammatory bowel diseases: ulcerative colitis]. **Orvosi Hetilap Journal** v.148, p.1163-1170, 2007c.

- 25 LAKATOS PL. Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: up or down? **World Journal of Gastroenterology**, v.12, p.6102-08, 2006.

- 30 LESSARD, M.; DUPUIS, M.; GAGNON, N.; NADEAU, E.; MATTE, J.J.; GOULET, J.; FAIRBROTHER, J.M. Administration of *Pediococcus acidilactici* or *Saccharomyces cerevisiae 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.

- 35 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.

- 10 LIN, W., TSAI, W.L., SHAO, R.X., WU, G., PENG, L.F., BARLOW, L.L., CHUNG, W.J., ZHANG, L., ZHAO, H., JANG, J.Y. CHUNG, R.T. Hepatitis C virus regulates transforming growth factor beta1 production through the generation of reactive oxygen species in a nuclear factor kappaB-dependent manner. **The American Journal of Gastroenterology**, v.138, p.2509-18, 2518 e1. 2011.
- 15 LINDSAY, J.O, SANDISON, A., COHEN, P., BRENNAN, F.M e HODGSON, H.J. IL-10 gene therapy is therapeutic for destran sodium sulfate-induce murine colitis. **Digestive Diseases and Sciences**, v.49, p. 1327-34, 2004.
- 20 LIU, Z., GEBOES, K., HEREMANS, H., OVERBERGH, L., MATHIEU, C., RUTGEERTS, P. CEUPPENS, J.L. Role of interleukin-12 in the induction of mucosal inflammation and abrogation of regulatory T cell function in chronic experimental colitis. **European Journal of Immunology**, v.31, p.1550-60. 2001.
- LOGAN, I.; BOWLUS, C.L. The geoepidemiology of autoimmune intestinal diseases. **Autoimmunity Reviews**, v.9, p.372-8, 2010.
- 25 MACPHERSON AJ & HARRIS NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. **Nature Reviews Immunology** v.4, p.478-485, 2004.
- MAGALHÃES, A. F. N. Doença de Crohn. In: _____. **Gastroenterologia clínica**. 3. ed. v.1. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 765-777, 1993.
- 30 MAGRO, F., PORTELA, F.; **Doença Inflamatória Intestinal** Tópicos de relevância clínica; GEDII Medisa, 2008.
- 35 MAHIDA, Y.R. The key role of macrophages in the immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, v.6, p.21-33. 2000.
- 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.

- MANNON, P.J., FUSS, I.J., MAYER, L., ELSON, C.O., SANDBORN, W.J., PRESENT, D., DOLIN, B., GOODMAN, N., GRODEN, C., HORNUNG, R.L., QUEZADO, M., YANG, Z., NEURATH, M.F., SALFELD, J., VELDMAN, G.M., SCHWERTSCHLAG, U. STROBER, W. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. **The New England Journal of Medicine**, v.351, p.2069-79. 2004.
- MARCHESI JR, HOLMES E, KHAN F, KOCHHAR S, SCANLAN P, SHANAHAN F, WILSON ID, WANG Y. Rapid and noninvasive metabonomic characterization of inflammatory bowel disease. **Journal of Proteome Research** v.6, p.546–551, 2007.
- 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 FS., NARDI RMD., ARANTES RM E., ROSA CA., NEVES MJ., NICOLI JR. Screening of yeasts as probiotic based on capacities to colonize the gastrointestinal tract and to protect against enteropathogen challenge in mice. **The Journal of General and Applied Microbiology** v. 51, p. 83–92, 2005.
- MARTINS FS., RODRIGUES ACP., TIAGO FCP, PENNA FJ., ROSA CA., ARANTES RME, NARDI RMD., NEVES MJ., NICOLI JR. *Saccharomyces cerevisiae* strain 905 reduces the translocation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and stimulates the immune system in gnotobiotic and conventional mice. **Journal of Medical Microbiology** v. 56, p. 352–359, 2007.
- MARTINS, F.S; SILVA, A.A; VIEIRA, A.T; BARBOSA, F.H; ARANTES, R.M; TEIXEIRA, 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.

MCCAFFERTY, D.M., MIAMPAMBA, M., SIHOTA, E., SHARKEY, K.A. KUBES, P. Role of inducible nitric oxide synthase in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in mice. **Gut**, v.45, p.864-73, 1999.

- 10 MCCORMICK, M.L., ROEDER, T.L., RAILSBACK, M.A. BRITIGAN, B.E. Eosinophil peroxidase-dependent hydroxyl radical generation by human eosinophils. **The Journal of Biological Chemistry**, v.269, p.27914-9. 1994.

- 15 MORRIS, G.P., BECK, P.L., HERRIDGE, M.S., DEPEW, W.T., SZEWCZUK, M.R. WALLACE, J.L. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. **The American Journal of Gastroenterology**, v.96, p.795-803. 1989.

- 20 NAITO, Y., TAKAGI, T., HANDA, O., ISHIKAWA, T., NAKAGAWA, S., YAMAGUCHI, T., YOSHIDA, N., MINAMI, M., KITA, M., IMANISHI, J. YOSHIKAWA, T. Enhanced intestinal inflammation induced by dextran sulfate sodium in tumor necrosis factor- α deficient mice. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.18, p.560-9. 2003.

- 25 NAITO, Y., TAKAGI, T., UCHIYAMA, K., KURODA, M., KOKURA, S., ICHIKAWA, H., YANAGISAWA, R., INOUE, K., TAKANO, H., SATOH, M., YOSHIDA, N., OKANOUE, T. YOSHIKAWA, T. Reduced intestinal inflammation induced by dextran sodium sulfate in interleukin-6-deficient mice. **International Journal of Molecular Medicine**, v.14, p.191-6. 2004.

- 30 NAKAMURA K., HONDA K., MIZUTANI T., AKIHO H., HARADA N. Novel strategies for the treatment of inflammatory bowel disease: selective inhibition of cytokines and adhesion molecules. **World Journal Of Gastroenterology** v. 29, p. 4628-4635, 2006.

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

NEURATH, M. F. & TRAVIS, S. P. Mucosal healing in inflammatory bowel diseases: a systematic review. **Gut** v. 61, p.1619–1635, 2012.

NEURATH, M.F., FUSS, I., KELSALL, B.L., STUBER, E. STROBER, W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v.182, p.1281-90. 1995.

- 10 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.

- 15 PAPADAKIS, K.A. e TARGAN, S.R. Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Annual Review of Medicine**, v.51, p. 289-98, 2000.

- PENNER, R.; FEDORAK, R. N.; MADSEN, K. L. Probiotics and nutraceuticals: non-medicinal treatments of gastrointestinal diseases. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 5, p. 596-603, 2005.
- 20

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

- 25 PHAVICHITR N, CAMERON DJ, CATTO-SMITH AG. Increasing incidence of crohn's disease in victorian children. **The Journal of Gastroenterology and Hepatology**; v. 18, p. 329-332. 2003.

- PINSK V, LEMBERG DA, GREWAL K, BARKER CC, SCHREIBER RA, JACOBSON K. Inflammatory bowel disease in the South Asian pediatric population of British Columbia. **The American Journal of Gastroenterology**; v. 102, p. 1077-1083, 2007.
- 30

- PLEIN, K., HOTZ, J. Therapeutic effects of *Saccharomyces boulardii* on mild residual symptoms in a stable phase of Crohn's disease with special respect to chronic diarrhea--a pilot study. Z. **The American Journal of Gastroenterology**. v. 31, p. 129-134, 1993.
- 35

PODOLSKY DK, XAVIER RJ. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature** v. 26, p. 448:427-34, 2007.

POLK DB; YAN F., Probiotics: progress toward novel therapies for intestinal diseases. **Current Opinion in Gastroenterology**. v. 26, p. 95-101, 2010.

10 POPIVANNOVA, B.K., KITAMURA, K., WU, Y., KONDO, T., KAGAYA, T., KANEKO, S., OSHIMA, M., FUJII, C. MUKAIDA, N. Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. **The Journal Clinical Investigation**, v.118, p.560-70. 2008.

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

20 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.

25 QIN 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.

REMBACHEN, B.J., SNELLING, A.M., HAWKEY, P.M., CHALMERS, D.M., AXON, A.T.R. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. **Lancet** v. 354, p. 635-639, 1999.

30 RIBEIRO ICT. **Doença de Crohn: Etiologia, Patogênese e suas Implicações**. 99f. Dissertação de Mestrado de Medicina – Universidade da Beira Interior. Covilhã, 2009.

35 ROGLER G. Prebiotics and probiotics in ulcerative colitis: where do we stand? **Digestion** v. 84, p. 126-127, 2011.

ROGLER, G. ANDUS, T. Cytokines in inflammatory bowel disease. **World Journal of Surgery**, v.22, p.382-9. 1998.

ROTHENBERG, M.E. Eosinophilia. **The New England Journal of Medicine**, v.338, p.1592-600. 1998.

- 10 ROTHENBERG, M.E., MISHRA, A., BRANDT, E.B. HOGAN, S.P. Gastrointestinal eosinophils. **Immunological Reviews**, v.179, p.139-55. 2001.

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

SAITOH, O., KOJIMA, K., SUGI, K., MATSUSE, R., UCHIDA, K., TABATA, K., NAKAGAWA, K., KAYAZAWA, M., HIRATA, I. KATSU, K. Fecal eosinophil granule-derived proteins reflect disease activity in inflammatory bowel disease. **The American Journal of Gastroenterology**, v.94, p.3513-20. 1999.

20 SÁNCHEZ-HIDALGO, M.; MARTIN, A.R.; VILLEGAS, I.; LASTRA, C.A. Rosiglitazone, a PPAR γ ligand, modulates signal transduction pathways during the development of acute TNBS-induced colitis in rats. **European Journal of Pharmacology**, v.562, p.247-258, 2007.

25 SANDERS, K.M.; KOH, S.D.; RO, S.; WARD, S.M. Regulation of gastrointestinal motility insights from smooth muscle biology. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v.9, p. 633-645, 2012.

30 SANGFELT, P., CARLSON, M., THORN, M., LOOF, L. RAAB, Y. Neutrophil and eosinophil granule proteins as markers of response to local prednisolone treatment in distal ulcerative colitis and proctitis. **The American Journal of Gastroenterology**, v.96, p.1085-90. 2001.

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

SARTOR RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of crohn's disease and ulcerative colitis. **Nature** p. 390-407, 2006.

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.

10 SCHIERACK, P; KLETA, S; TEDIN, K; BABILA, J.T; OSWALD, S; OELSCHLAEGER, T.A; HIEMANN, R; PAETZOLD, S; WIELER, L.H. E. coli Nissle 1917 affects *Salmonella* adhesion to porcine intestinal epithelial cells. **PloS One**, v.6, e14712, 2011.

15 SEKSIK P, MARTEAU P. Probiotics in inflammatory bowel disease: controlled trials and perspectives. **Therapie**, v. 59, p. 83-7, 2004.

20 SHANAHAN F. Physiological basis for novel drug therapies used to treat the inflammatory bowel diseases I. Pathophysiological basis and prospects for probiotic therapy in inflammatory bowel disease. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 288, p. G417-21, 2005.

25 SHIRAKI, M., AIHARA, H., KINOCHI, Y., TAKAHASHI, S., OKI, M., NOGUCHI, M. TAKAHASHI, K., MIYAZAKI, J. e SHIMOSEGAWA, T. IL-12 p40 prevents the development of chronic enterocolitis in IL-10 deficient mice. **Laboratory Investigation**, v.84, p.1491-500, 2004.

SMITH, J.A. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. **J Journal of leukocyte Biology**, v.56, p.672-86. 1994.

30 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.

35

STROBER, W.; LUDVIKSSON, B.R.; FUSS, I.J.; The pathogenesis of mucosal inflammation in murine models of inflammatory bowel disease and Crohn disease. **Annals of internal Medicine**, v.128, p.1756-67, 1998.

- 10 TAKAGI, H., KANAI, T., OKAZAWA, A., KISHI, Y., SATO, T., TAKAISHI, H., INOUE, N., OGATA, H., IWAO, Y., HOSHINO, K., TAKEDA, K., AKIRA, S., WATANABE, M., ISHII, H. HIBI, T. Contrasting action of IL-12 and IL-18 in the development of dextran sodium sulphate colitis in mice. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v.38, p.837-44. 2003.
- 15 TAMBOLI CP, CAUCHETEUX C, CORTOT A, COLOMBEL JF, DESREUMAUX P. Probiotics in inflammatory bowel disease: a critical review. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 17, p. 805-20, 2003.
- 20 TIAGO, F. C. ; MARTINS, F. S. ; SOUZA, E. L.; PIMENTA, P. F. ; ARAUJO, H. R. ; CASTRO, I. M. ; BRANDAO, R. L. ; NICOLI, J. R. Adhesion on yeast cell surface as a trapping mechanism of pathogenic bacteria by *Saccharomyces* probiotics. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, p. 1194-1207, 2012.
- 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.
- 25 VILELA, G.E., FERRARI, M.L.A., TORRES, H.O.G., PINTO, A.G., AGUIRRE, A.C.C., MARTINS, F.P., GOULART, E.M.A.G., CUNHA, A.S. Influence of *Saccharomyces boulardii* on the intestinal permeability of patients with Crohn's disease in remission. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**. v. 43, p. 842-848, 2008.
- 30 WILLIAMS, I.R. PARKOS, C.A. Colonic neutrophils in inflammatory bowel disease: double-edged swords of the innate immune system with protective and destructive capacity. **Gastroenterology**, v.133, p.2049-52. 2007.
- 35 WIRTZ S & NEURATH MF. Mouse models of inflammatory bowel disease. **Advanced Drug Delivery Reviews** v. 59, p. 1073-1083, 2007.
- XIAO, H., HEERINGA, P., LIU, Z., HUUGEN, D., HU, P., MAEDA, N. FALK, R.J e JENNETTE, J.C. The role of neutrophils in the induction of glomerulonephritis by anti-myeloperoxidase antibodies. **The American Journal of Pathology**, v.169, p.39-45, 2006.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -**

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 4/2011**, relativo ao projeto intitulado "**Efeito do probiótico *Saccharomyces Cerevisiae* linhagem UFMG 905 em modelos experimentais de inflamação intestinal**", que tem como responsável(is) **Flaviano dos Santos Martins**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **25/ 05/2011**.

Este certificado expira-se em **25/ 05/ 2016**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 4/2011**, related to the project entitled "**Effects of the probiotic *Saccharomyces Cerevisiae* strain UFMG 905 in experimental models of inflammatory bowel diseases**", under the supervisors of **Flaviano dos Santos Martins**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **May 25, 2011**.

This certificate expires in **May 25, 2016**.

Belo Horizonte, 27 de Maio de 2011.

Prof^a. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

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

www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

