

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Tese de Doutorado

Avaliação do efeito probiótico de *Bifidobacterium longum* 5^{1A} em modelo murino e de cultura celular de lesões inflamatórias cutâneas

Belo Horizonte/MG

2017

Yasmin Chalfoun Pomárico de Souza

Avaliação do efeito probiótico de *Bifidobacterium longum* 5^{1A} em modelo murino e de cultura celular de lesões inflamatórias cutâneas

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para o grau de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Orientadores: Dr. Jacques Robert Nicoli
Dra. Jaqueline Germano de Oliveira

Belo Horizonte/MG

2017

SUMÁRIO

1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
1.1	Os probióticos	16
1.2	Administração oral de probióticos e a pele – ENSAIOS CLÍNICOS	18
1.3	Administração oral de probióticos e a pele – MODELO MURINO	19
1.4	Administração tópica de probióticos e a pele	22
1.5	Bifidobactérias na saúde cutânea	26
1.6	Microbiota cutânea	28
1.7	Imunologia cutânea	31
1.8	Substância P	36
2	JUSTIFICATIVA	41
3	HIPÓTESE	43
4	OBJETIVOS	43
4.1	Objetivo geral	43
4.2	Objetivos específicos	43
5	ETAPA 1	45
5.1	Linhagens bacterianas	45
5.2	Animais	46
5.3	Ensaio piloto 1 e 2	47
5.3.1	Análise estatística	49
5.3.2	Resultados dos ensaios piloto 1 e 2	49
5.4	Ensaio piloto 3	51
5.4.1	Atividade de peroxidase eosinofílica (EPO)	55
5.4.2	Atividade de mieloperoxidase (MPO)	56
5.4.3	Análise estatística	56
5.4.4	Resultados do ensaio piloto 3	57
5.4.4.1	Perda de água transepidérmica (TWEL)	57
5.4.4.2	Resultados de EPO	58
5.4.4.3	Resultados de MPO	62
6	ETAPA 2	64
6.1	Delineamento experimental da Etapa 2	64
6.2	Metodologia	65
6.2.1	Linhagens bacterianas.....	65
6.2.2	Lisados bacterianos	65
6.2.3	Cultura de pele de mama	66
6.2.4	Tratamentos com BL51A e LPST11	67
6.2.5	Análise histológica das culturas de pele de mama	70
6.2.6	Análise imunohistoquímica das culturas de pele de mama	70

6.2.6.1	Parâmetros imunohistoquímicos	71
6.3	Análise estatística	73
6.4	Resultados e discussão da Etapa 2	73
6.4.1	Curva de crescimento das bactérias BL51A e LPST11	73
6.4.2	Análise histológica das culturas de pele de mama	75
6.4.3	Análise imunohistoquímica das culturas de pele de mama	79
7	ETAPA 3	82
7.1	Delineamento experimental da Etapa 3	82
7.2	Metodologia	83
7.2.1	Linhagens bacterianas	83
7.2.2	Lisados bacterianos	83
7.2.3	Cultura de pele de mama	83
7.2.4	Tratamentos.....	83
8	ETAPA 4	88
8.1	Delineamento experimental da Etapa 4	88
8.2	Metodologia	88
8.2.1	Linhagem bacteriana.....	88
8.2.2	Lisado bacteriano.....	89
8.2.3	Cultura de pele de pálpebra humana	89
8.2.4	Tratamentos.....	90
8.2.5	Análise histológica das culturas de pele de pálpebra	92
8.2.6	Análise imunohistoquímica das culturas de pele de pálpebra	95
8.3	Análise estatística	95
8.4	Resultados e discussão das Etapas 3 e 4	97
8.4.1	Análise histológica em pele de mama e pálpebra	97
8.4.1.1	Contagem não padronizada do número de células	97
8.4.1.2	Contagem padronizada do número de células	99
8.4.2	Análises comparativas	101
8.4.3	Análise imunohistoquímica em pele de mama e pálpebra	104
8.4.3.1	Intensidade de expressão das citocinas em pele de mama e pálpebra.....	104
8.4.3.2	Distribuição da expressão das citocinas em pele de mama e pálpebra ..	106
8.4.4	Correlação da análise histológica e análise imunohistoquímica	108
9	SUMÁRIO DOS RESULTADOS	114
10	CONCLUSÃO	115
11	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116
12	ANEXOS	129

*Á minha família, em especial minha avó Maria,
meus pais Sara e Alberto
e ao meu irmão Igor.*

Todas as minhas vitórias sempre serão dedicadas a vocês.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente, ao meu orientador Dr. Jacques Robert Nicoli. Ao longo desses anos com o senhor, aprendi não somente sobre microbiologia, mas também sobre sabedoria, educação, cordialidade, bom humor, disciplina, compreensão e amizade. A minha maior motivação durante o andamento deste estudo foi entregar ao senhor bons resultados, para demonstrar minha gratidão pela confiança que o senhor depositou em todos os momentos em mim. Nunca poderei agradecer o suficiente ao senhor por ter me acolhido com tanto carinho. É um orgulho e uma honra ser sua aluna. Guardo lembranças muito alegres do tempo que passei em seu laboratório. Minha gratidão e admiração ao senhor são eternas. Obrigada de coração.

Da mesma forma, quando precisei de ajuda durante o andamento do projeto, fui recebida com alegria e entusiasmo pela grande pesquisadora Dra. Jaqueline Germano de Oliveira, minha outra orientadora. Ela abriu as portas de sua instituição tão importante, o Centro de Pesquisas René Rachou, me fazendo sentir em casa. Obrigada infinitamente por todo carinho e apoio. Enorme presente você me ofereceu: um conhecimento cujo valor é imensurável e um exemplo tão poderoso de uma mulher vitoriosa.

Ao Dr. Marcelo Pascoal Xavier, por ter me recebido com alegria em seu laboratório na Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. Foi uma honra muito grande trabalhar com o senhor. O senhor me dedicou o seu tempo, seu apoio e atenção para me ensinar todas as técnicas, tudo o que estávamos vendo, para que eu entendesse e soubesse fazer tudo o que estávamos executando. Com seus ensinamentos, eu fui capaz de entender com confiança muitos detalhes deste trabalho. Essa dedicação ao trabalho e a mim, me fazendo realmente aprender, é de imenso valor. Serei sempre muito grata!

Agradeço imensamente também à bióloga Fernanda Césari, por ter me acompanhado com todo carinho, por todos ensinamentos, pela amizade e por me fazer ficar cada dia melhor na execução das técnicas de histologia e imunohistoquímica.

À Dra. Roberta Oliveira Prado, pela imensa colaboração e por toda sua ajuda na realização deste trabalho. Você me ajudou a vencer os obstáculos nesta jornada! Obrigada por ter estado ao meu lado sempre, me ensinando tudo com muito carinho e amizade!

Aos professores Dra. Elisabeth Neumann, Dra. Sílvia Moura e Dr. Flaviano Martins, por todos os ensinamentos e apoio.

À Dra. Jacqueline Fiúza, Dr. Rafael Assis, Dra. Soraya Gaze, Clari Gandra e Dra. Érica Alves, pela imensa colaboração, amizade e conselhos. É uma honra ter trabalhado ao lado de vocês durante esse tempo. Obrigada por me receberem tão bem.

Ao Dr. Rodrigo Corrêa e ao Dr. Carlos Eduardo Calzavara, por terem me acolhido tão carinhosamente no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, como se fosse minha própria casa.

Aos membros da minha banca de admissão e qualificação Dra. Andreia Marçal e Dr. Antônio Carlos Martins Guedes, por terem contribuído tanto no avanço e crescimento deste projeto e por aceitarem prontamente o convite de participação para a banca de defesa. Vocês são parte importante deste trabalho e da minha história!

À Dra. Fabiana Pereira Tiago e ao Dr. Leonardo Borges Acurcio, pela gentileza de aceitarem ao convite de composição da banca de defesa da tese.

Ao Dr. Leonardo Araujo e à Dra. Ana Luiza Firmato Glória, que cederam as amostras de pele utilizadas neste trabalho. Obrigada pelo entusiasmo e por me receberem tão bem em suas instituições.

À Dra. Ana Luiza Gomes Mendes, pela ajuda na observação das lâminas e colaboração neste trabalho.

Aos meus queridos amigos da UFMG: Carol, Camila, Karine, Adriano, Sávio, Felipe, Kelly, Julliana, Rodrigo, Fabiana, Marliete, Hellem, Lorena, Alide, Mateus, Noelly, Mário, Bárbara, Clarice, Amanda, Samir, Anna Karolina, Zulema, Maria Cecília, Natália, Thayná e Rebeca e a todos os colegas que fizeram parte dessa etapa feliz em minha vida.

Aos meus queridos amigos da Fiocruz: Vinícius, Anna Carolina, Jacqueline, Amanda, Martinha, Victor, Izabella, Guilherme, Emerson, Karina, Luciana, Dilly, Jorge, Juliana, Nayara, Talita, Guilherme, Eneida, Rafael, Dirli, Roberta e Teresiana.

Ao Prof. Marco Antônio da Silva Campos e aos amigos que compõem seu laboratório, por terem me recebido tão bem quando precisei utilizar suas capelas durante a maior parte dos ensaios, após o incêndio que ocorreu no nosso laboratório LICM.

Às minhas amigas queridas: Ana Luiza e Érika, que sempre estão ao meu lado!

À Naná, minha amiga linda, por todo o carinho de irmã e pela amizade eterna!

Aos meus amigos, que me receberam em BH e se tornaram minha família: Rafa, Silvinha, Leo e Mayra. Vocês quatro me acolheram quando mais precisei, e não nos separamos mais desde então. Que todos os momentos que passamos juntos se multipliquem, que o amor que temos uns pelos outros se perpetue e que eu possa fazer

tão bem a vocês quanto vocês fazem a mim. Obrigada por sermos a versão mais legal e sincera da palavra “amigos”.

À minha mãe. Por ter entendido a distância. Por ter sido meu exemplo de vida. Por me encher de orgulho com seu trabalho na pesquisa. Pelo encorajamento. Pelo amor. Ao meu pai, por todo o carinho e dedicação comigo, e mesmo estando longe, está sempre presente em minha vida e pronto a me ajudar. Ao meu irmão, Igor, pela amizade eterna, e por ser exemplo de profissional e sucesso. Minha avó Maria, que é meu exemplo de inteligência e amor, queridas tias Cecília e Rosemary, Jamille, Enrico, Luidy, Ivana, Viviane e Ana Júlia.

Ao meu noivo, Henrique, que traz tanta coragem e felicidade aos meus dias! Obrigada pelo apoio, por cuidar tão bem de mim e por ser a pessoa que me ilumina e me faz querer ser melhor sempre. Você é o maior presente da minha vida e minha maior alegria! Amo você! Agradeço também aos queridos Eduardo e Ana Paula, por todo o apoio e carinho.

Ao Nix, Amora e Magal, que são anjos de quatro patas que me fazem companhia nos estudos sempre! Eles já ouviram tanto sobre este trabalho que poderiam até explicá-lo melhor do que eu!

Ao Fabrício (*in memoriam*), por ter me ensinado tantas coisas que foram essenciais para o meu crescimento, e por ter me fortalecido. Que você esteja em paz aí no céu.

E a Deus, por ter colocado todas essas pessoas tão especiais e tantas bênçãos na minha vida!

RESUMO

Os probióticos possuem diversos efeitos benéficos além da saúde intestinal, inclusive sobre aspectos cutâneos, tanto clínicos quanto estéticos. No entanto, os mecanismos de ação pelos quais esses efeitos benéficos são alcançados ainda não estão completamente elucidados. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial probiótico da bactéria *Bifidobacterium longum* 5^{1A} (BL51A) sobre aspectos inflamatórios cutâneos em um modelo murino de camundongos *hairless* e em um modelo de cultura de pele humana. Para tal, foram estudados efeitos imunomoduladores de BL51A, em sua forma ativa, em camundongos *hairless*, com indução da inflamação por administração de oxazolona, analisando-se a perda de água transepidérmica (TWEL) e a atividade enzimática da peroxidase eosinofílica (EPO) e da mieloperoxidase (MPO). Pode-se observar uma maior atividade de EPO na pele dos camundongos sensibilizados pela oxazolona, que foi reduzida de maneira significativa pela administração oral do probiótico BL51A, demonstrando seu efeito imunomodulador sobre este parâmetro. No modelo de cultivo tridimensional de amostras de pele de mama e pálpebra humana, foi investigado o efeito do lisado bacteriano do probiótico BL51A, diante de indução da inflamação por aplicação de substância P. Análises histológicas e de imunohistoquímica, mensurando os níveis das citocinas IL-1 β , IL-18, IL-10, IFN- γ , IL-33, IL-6 e TNF- α *in situ* foram realizadas. A mama não foi uma região anatômica ideal para este modelo. Na análise histológica em pele de pálpebra, ocorreu uma discreta reação inflamatória provocada pela substância P, enquanto o lisado de BL51A provocou um aumento no número de células perivasculares na derme, que quando correlacionadas à imunohistoquímica, revelaram ser células de caráter anti-inflamatório, com correlação negativa para IL-1 β e TNF- α e correlação positiva para a expressão de IFN- γ e IL-10, confirmando a importância de IL-10 na homeostase cutânea. Nossos dados sugerem uma capacidade probiótica do lisado de BL51A sobre a saúde cutânea via imunomodulação, que precisa ser confirmada em estudos futuros.

Palavras-chave: Probiótico; *Bifidobacterium longum* 5^{1A}; *Hairless*; Cultura de pele humana; Cultura de órgão; Saúde cutânea; Imunomodulação.

ABSTRACT

Probiotics have many beneficial effects beyond intestinal health, including over clinical and aesthetic cutaneous aspects. Despite there are many studies in the area, the action mechanisms by which these beneficial effects are performed are not completely elucidated yet. In this study, we aimed to evaluate the probiotic potential of *Bifidobacterium longum* 5^{1A} (BL51A) over inflammatory cutaneous aspects in a murine model of hairless mice and in an organ culture model. We assessed immunomodulatory effects of BL51A on its active state, in hairless mice, with inflammation induction by oxazolone topical administration, performing evaluation of transepidermal water loss (TWEL), enzymatic assays of eosinophil peroxidase (EPO) and myeloperoxidase (MPO). Higher EPO activity was observed on sensitized mice, indicating teidual eosinophilia on sensitized mice. This teidual eosinophilia caused by oxazolone was reduced, in a significative way, by oral administration of BL51A probiotic, showing its immunomodulatory effect over this parameter. On histological analysis of eyelid human skin, there was a small inflammatory reaction caused by Substance P, and BL51A lysate caused an increase in perivascular cells in the dermis, which were correlated to immunohistochemistry results, indicating anti-inflammatory function, with negative correlation to IL-1 β and TNF- α and positive correlation to IFN- γ and IL-10, showing this cytokyne's importance on cutaneous homeostasis. Our data suggest a probiotic capacity of BL51A lysate over cutaneous health, by immunomodulation, which needs validation on future studies.

Key words: Probiotic; *Bifidobacterium longum* 5^{1A}; Hairless; Human skin culture; Organ culture; Cutaneous health; Immunomodulation.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% – Porcentagem
μg – Micrograma
μL – Microlitro
μm – Micrômetro
μM - Micromolar
a. C. – Antes de Cristo
AGCC – Ácido graxo de cadeia curta
ANOVA – Análise de variância
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BL - *Bifidobacterium longum* 5^{1A}
BL51A – *Bifidobacterium longum* 5^{1A}
Cel - Células
CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais
CGRP – *Calcitonin gene-related peptide* - Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CI – Células inflamatórias
cm – Centímetro
cm² – Centímetro quadrado
cm³ – Centímetro cúbico
CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO₂ – Ácido carbônico
COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COEP - Comitê de Ética em Pesquisa
CONEP – Conselho Nacional de Saúde
DA – Dermatite atópica
DAB - Diamino-benzidina 3,3
DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* – Meio de cultura DMEM
DO – Densidade óptica
DP – Derme profunda
DS – Derme superficial
EGF – *Epidermal growth factor* - Fator de crescimento epidérmico
ELISA – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* – Ensaio imunoenzimático
EPO – *Eosinophil peroxidase* - Peroxidase eosinofílica
EROS – Espécies reativas ao oxigênio
Et - Etanol
FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations* - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
fg - Fentograma
Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz
g – Grama
GM-CSF - *Granulocyte-macrophage colony stimulating factor* – Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
h - Hora
HBD-2 – *Human beta-defensin 2* - Betadefensina humana-2
HE – Hematoxilina-eosina
HTAB - *Hexadecyltrimethylammonium bromide* - Brometo de hexadeciltrimetilamônio
HuNoV – *Human Norovirus* - Norovirus humano
IFN-α – Interferon *alpha*
IFN-β – Interferon *beta*

IFN- γ – Interferon *gamma*
IgE – Imunoglobulina E
IHQ – Imunohistoquímica
II – Infiltrado inflamatório
IL – Interleukin - Interleucina
IL-1 – Interleucina-1
IL-10 – Interleucina10
IL-1 α – Interleucina-1 *alpha*
IL-1 β – Interleucina-1 *beta*
IL-2 – Interleucina-2
IL-4 – Interleucina-4
IL-5 – Interleucina-5
IL-6 – Interleucina-6
IL-7 – Interleucina-7
IL-8 – Interleucina-8
IL-10 – Interleucina-10
IL-12 – Interleucina-12
IL-13 – Interleucina-13
IL-15 – Interleucina-15
IL-17 – Interleucina-17
IL-18 – Interleucina-18
IL-33 – Interleucina-33
IOBH – Instituto de Olhos de Belo Horizonte
LaBio – Laboratório de Agentes Bioterapêuticos
LEFM – Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos
LICM – Laboratório de Imunologia Celular e Molecular
LP - *Lactobacillus paracasei* CNCM I-2116 (ST11)
LPST11 – *Lactobacillus paracasei* CNCM I-2116 (ST11)
M - Mama
M – Molar
mg – Miligrama
mL – Mililitro
mM – Milimolar
mm - Milímetro
mm² – Milímetro quadrado
MPO – Mieloperoxidase
mRNA – Ácido desoxirribonucleico mensageiro
MRS – Caldo De Man, Rogosa & Sharpe
MRSA – *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* - *Staphylococcus aureus* resistente à metilina
n – Número
NB2 – Nível de biossegurança 2
NF- $\kappa\beta$ – *Nuclear transcription factor kappa beta* - Fator nuclear *kappa beta*
ng – Nanograma
NK – *Natural killer*
NK-1R – Receptor neuroquinina-1
NLR's – *Nod-like Receptors*
nm - Nanômetro
O₂ - Oxigênio
°C – Graus Celsius

OD -Densidade óptica
Ox -Oxazolona
p – Página
P - Pálpebra
PAMP's – *Pathogen associated molecular pattern* - Padrões moleculares associados a patógenos
PBS –*Phosphate buffered saline* - Salina tamponada com fosfato
PCR – *Polymerase chain reaction* - Reação em cadeia da polimerase
pg – Picograma
pH – Potencial hidrogênionico
PRR – *Pattern recognition receptor* - Receptor de reconhecimento padrão
r – Coeficiente de correlação de Pearson
rpm – Rotações por minuto
SALT – *Skin associated lymphoid tissue* - Tecido linfoide associado à pele
SBCAL – Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SCORAD – *Scoring Atopic Dermatitis* – Índice de classificação da dermatite atópica
SP – Substância P
TGF- β 1 - *Transforming growth factor- β 1* – Fator de crescimento transformador- β 1
Th1 – T helper 1
Th2 – T helper 2
TLR2 – *Toll Like Receptor 2*
TLR4 – *Toll Like Receptor 4*
TLR9 – *Toll Like Receptor 9*
TNF- α – *Tumor Necrosis Factor-alpha* - Fator de necrose tumoral- α
TTO - Tratamento
TWEL – *Transepidermal water loss* - Perda de água transepidermica
U - Unidade
UFC – Unidades formadoras de colônia
UV – Ultravioleta
WHO – *World Health Organization* - Organização Mundial de Saúde

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da histologia cutânea em corte transversal com micro-organismos e apêndices cutâneos	29
Figura 2. Anatomia cutânea e células efetoras	33
Figura 3. Delineamento experimental geral do primeiro e segundo ensaio piloto do modelo murino	48
Figura 4. Perda de água transepidermica (g/h/m^2) em animais sensibilizados com a oxazolona, no piloto 1 (n=10) e piloto 2 (n=10)	50
Figura 5. Distribuição de camundongos no grupo que recebeu as sensibilizações com oxazolona	52
Figura 6. Distribuição de camundongos no grupo controle, que não recebeu as sensibilizações com oxazolona	53
Figura 7. Cronograma de administração das sensibilizações com oxazolona, administração dos probióticos BL (<i>Bifidobacterium longum</i> 5 ^{1A}) e LP (<i>Lactobacillus paracasei</i> ST11), momento de indução da DA (dermatite atópica) e momento da eutanásia e análises	54
Figura 8. Perda de água transepidermica (g/h/m^2) nos animais controle tratados com o veículo (etanol) e dos animais sensibilizados com a oxazolona, no piloto 3 (n=28)	57
Figura 9. Avaliação qualitativa da presença de eosinófilos, por meio da atividade da enzima específica EPO, expressa em unidades relativas, na pele dos animais tratados com o veículo (etanol) e dos animais sensibilizados com a oxazolona (n=28), como descrito no item 5.4.1.	60
Figura 10. Avaliação qualitativa da presença de neutrófilos, por meio da atividade da enzima específica MPO, expressa em unidades relativas na pele dos animais tratados com o veículo (etanol) e dos animais sensibilizados com a oxazolona (n=28), como descrito no item 5.4.2.	63
Figura 11. Delineamento geral experimental da Etapa 2. Início dos testes <i>in vitro</i> utilizando cultura de pele humana (mama)	64
Figura 12. Representação do modelo experimental	68
Figura 13. Tratamentos administrados a cada amostra de pele de cada um dos 4 casos, concentração, volume e localização de administração dos lisados bacterianos de BL51A e LPST11 e de SP, desenho esquemático das placas contendo as amostras de pele com seus respectivos tratamentos	69

Figura 14. Análise descritiva dos dados de contagem de células perivasculares na derme profunda (DP)	76
Figura 15. Intensidade da resposta inflamatória epitelial para IL-1 β	80
Figura 16. Delineamento experimental geral da Etapa 3	82
Figura 17. Número de células inflamatórias correspondente à curva de dose-resposta da concentração de SP	84
Figura 18. Tratamentos administrados a cada amostra de pele de cada um dos casos, concentração, volume e localização de administração dos lisados bacterianos de BL51A e LPST11 e de SP, desenho esquemático da placa contendo as amostras de pele com seus respectivos tratamentos	86
Figura 19. Delineamento experimental geral da Etapa 4 com pele de pálpebra	88
Figura 20. Tratamentos administrados a cada amostra de pele de cada um dos casos, concentração, volume e localização de administração do lisado bacteriano de BL51A e de SP, desenho esquemático da placa contendo as amostras de pele com seus respectivos tratamentos	91
Figura 21. Lâmina da amostra de pele de pálpebra do controle negativo, com coloração hematoxilina eosina em aumento 10x	92
Figura 22. Esquema simplificado das camadas da pele, demonstrando o tamanho de cada uma delas e sua proporção na composição da amostra cutânea coletada	93
Figura 23. Número médio de células contadas na mama (M) e na pálpebra (P) na derme superficial (II DS), na derme profunda (II DP) e a soma das duas regiões (II DS + II DP = II Total)	99
Figura 24. Contagem padronizada - número médio de células por mm ² contadas na mama (M) e na pálpebra (P) na derme superficial (Iip DS), na derme profunda (Iip DP) e a soma das duas regiões (II DS + II DP = Iip Total)	101
Figura 25. Distribuição da imunomarcagem de IFN- γ na pele de pálpebra, aumento de 20x, com marcação forte para epitélio, endotélio e infiltrado celular perivascular	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Curva de crescimento de <i>Bifidobacterium longum</i> 5 ^{1A} (BL51A).....	74
Tabela 2. Curva de crescimento de <i>Lactobacillus paracasei</i> ST11 (LPST11).....	75
Tabela 3. Correlação entre infiltrado inflamatório e os biomarcadores IL-1 β , IL-10, IL-6, IL-18, TNF- α e IFN- γ	109

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Os probióticos

Os benefícios dos probióticos na regulação da saúde intestinal vêm sendo explorados e reconhecidos há séculos. Relatos dos efeitos benéficos das bactérias na alimentação datam desde a versão persa do Velho Testamento (Gênesis 18:8), que relata que “Abraão atribuiu sua longevidade ao consumo de leite azedo”. Plínio, um historiador romano, em 76 a.C., recomendou o uso de leite fermentado para o tratamento de gastroenterites (Teitelbaum & Walker, 2002). O termo probiótico, proposto por Lilley e Stillwell (1965), foi criado como um antônimo ao termo antibiótico e, originalmente, significando “aquele que favorece o crescimento de micro-organismos”. Em 1974, foram definidos como probióticos “organismos ou substâncias que contribuem para o equilíbrio microbiano intestinal”. Em 1989, Fuller definiu o termo probiótico como “um suplemento microbiano vivo que afeta benéficamente o animal hospedeiro graças à melhoria no balanço microbiano intestinal” (Zuccotti et al., 2008; Khani et al., 2012). Desde então, o interesse sobre o assunto foi crescendo, mas ainda com foco na saúde intestinal. Ao longo dos anos, o termo probiótico foi redefinido para “micro-organismos vivos que produzem efeitos saudáveis no hospedeiro, quando consumidos em quantidades adequadas”. Uma definição mais recente já aceita o papel dos probióticos sem uma rota de administração oral. Assim sendo, de acordo com a definição da Organização Mundial da Saúde (WHO) e da Organização das Nações Unidas para Alimentos e Agricultura (FAO), probióticos são “micro-organismos vivos que quando administrados em quantidade suficiente conferem um benefício à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002).

A base conceitual de “probióticos” é bem fundamentada. No entanto, o conceito de que somente “micro-organismos vivos” podem induzir benefícios merece discussão. A sinalização provocada pelos padrões moleculares associados aos micro-organismos (PAMPs) possui efeitos claros sobre a citoproteção epitelial, os mecanismos de sobrevivência e proliferação e função de barreira. Muitos estudos mostraram que os receptores de reconhecimento padrão (PRRs), *Toll-like receptors* (TLRs) e *Nod-like receptors* (NLRs) possuem papéis cruciais na manutenção de uma relação estável e saudável entre o intestino do hospedeiro e sua microbiota (Vieira et al., 2013).

Entre as principais bactérias probióticas estão os gêneros: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Bifidobacterium*, sendo que os lactobacilos e as bifidobactérias são os mais comumente utilizados como probióticos (Narayan et al., 2010). Dentre as leveduras estão *Saccharomyces boulardii* e algumas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (Martins et al., 2010; Martins et al., 2011).

Com o tempo, houve um aumento progressivo do interesse sobre os efeitos benéficos dos probióticos em outros aspectos além da saúde intestinal. Atualmente, existem inúmeras pesquisas que confirmam esses efeitos nos mais diversos sistemas, inclusive sobre a o ecossistema cutâneo (Messaoudi et al., 2011; Hsiao et al., 2013; Tillisch et al., 2013; Costa et al., 2014; Xu et al., 2016; Mogna et al., 2016).

Os probióticos são capazes de exercer efeitos desejáveis sobre o hospedeiro de diversas maneiras, tais como: competição com patógenos por nutrientes e sítios de adesão (Prince et al., 2012; Assis et al., 2015), produção de metabólitos antimicrobianos (Ornellas et al., 2017), agregação aos patógenos (Tiago et al., 2012) e efeitos imunomoduladores (Vieira et al., 2015a; Vieira et al., 2015b). De fato, além da capacidade de influenciar positivamente a composição da microbiota intestinal, alguns probióticos podem modular o sistema imune tanto localmente quanto sistemicamente, melhorando os mecanismos de defesa imune e/ou diminuindo reações exacerbadas, como alergias ou inflamações intestinais. Várias linhagens de probióticos atuam na melhoria da imunidade específica e não específica, inclusive proporcionando efeitos desejáveis sobre a pele (Guéniche et al., 2010b), estando eles em sua forma ativa (Sugimoto et al., 2012) ou em forma de lisados bacterianos (Guéniche et al., 2010a).

A capacidade de um micro-organismo de ativar células monocíticas-macrofágicas dormentes está ligada à presença de estruturas presentes na parede bacteriana (por exemplo, peptídeoglicanos ou lipopolissacarídeos) contra os quais alguns receptores, como os TLRs, são especificamente direcionados. Os TLRs são expressos na superfície da membrana monocítica. A interação entre as estruturas bacterianas e os TLRs resulta na ativação de monócitos, sua diferenciação para células dendríticas imaturas e posterior maturação para células dendríticas maduras, que podem ser consideradas células apresentadoras de antígenos profissionais (Braidó et al., 2007).

A utilização de antígenos bacterianos obtidos por lise mecânica ou química é, dessa forma, capaz de ativar as células monocíticas-macrofágicas, induzindo a

diferenciação para células dendríticas imaturas e sua maturação em células dendríticas maduras. A apresentação de antígenos bacterianos pelas células dendríticas maduras resulta no estímulo de células T (com uma consequente indução de uma função *helper* intensa) e do compartimento de células B da resposta imune, com posterior maturação a plasmócitos e secreção de anticorpos especificamente direcionados. A ativação de tal mecanismo resulta em um estímulo adequado da resposta imune, portanto, a administração de lisados bacterianos é capaz de induzir uma resposta *T helper* e uma maturação de linfócitos B específicos (Braido et al., 2007).

1.2. Administração oral de probióticos e a pele – ENSAIOS CLÍNICOS

Existem vários estudos nos quais são documentados efeitos desejáveis dos probióticos sobre a pele, trazendo benefícios ao tratamento da dermatite atópica, das dermatites de contato e na inibição de infecções cutâneas pelo *Staphylococcus aureus* (Baba et al., 2010; Han et al., 2012; Prince et al., 2012; Shah et al., 2012). No entanto, os mecanismos ou os compostos exatos responsáveis pelos benefícios dos probióticos na saúde cutânea ainda não foram completamente elucidados (Lew & Liong, 2013; Niccoli et al., 2014). Portanto, a demanda crescente por formulações empregando esses micro-organismos reforça a necessidade do entendimento dos mecanismos de ação envolvidos (Lew & Liong, 2013).

A ligação entre probióticos, dermatologia e saúde mental vem sendo cada vez mais explorada, com a hipótese de que a integridade funcional e micro-organismos residentes do trato intestinal podem desempenhar um papel mediador tanto na inflamação cutânea quanto no comportamento emocional (Bowe et al., 2014).

Kalliomaki e colaboradores (2001) verificaram que o consumo diário perinatal de *L. rhamnosus* GG por mulheres gestantes e sua administração via oral aos bebês das mães tratadas com o probiótico por seis meses após o nascimento, reduziu de modo significativo a incidência de eczema em crianças de dois a quatro anos de idade. Essas crianças foram avaliadas após seus quatro anos e foi verificado que os efeitos preventivos dos probióticos contra o eczema persistiram até a idade avaliada (Kalliomaki et al., 2003). Após sete anos de acompanhamento dessas crianças, foi verificado que o risco cumulativo de desenvolvimento de eczema nos primeiros sete anos de vida permaneceu reduzido de maneira significativa nas crianças tratadas com o probiótico (Kalliomaki et al., 2007).

Este efeito imunomodulador também foi observado em pacientes com dermatite atópica, diante da ingestão por oito semanas de uma combinação de *B. bifidum*, *L. acidophilus*, *L. casei* e *L. salivarius* na dose de 2×10^9 UFC (unidades formadoras de colônia) por dia. Houve redução no índice de *Scoring Atopic Dermatitis* (SCORAD) - que é a ferramenta utilizada mundialmente para medir a intensidade de sintomas da dermatite atópica - níveis séricos de interleucina-5 (IL-5), interleucina-6 (IL-6), interferon- γ (IFN- γ) e níveis séricos totais de imunoglobulina E (IgE) (Yesilova et al., 2012).

Uma redução no SCORAD também foi verificada por Niccoli e colaboradores (2014), com uma redução do prurido mediante a administração oral de *L. salivarius* LS01, na forma liofilizada, a crianças com dermatite atópica.

Um dos efeitos benéficos dos probióticos com administração oral em pacientes com dermatite atópica seria o aumento significativo e relevante na concentração de ceramidas cutâneas, o que demonstra a ação dos micro-organismos sobre aspectos estruturais da pele tratada, além de seus efeitos de imunomodulação (Di Marzio et al., 2003).

O *L. paracasei* ST11, administrado por via oral por Guéniche e colaboradores (2014), em um ensaio clínico com 60 mulheres, foi capaz de diminuir a perda de água transepidermica (TWEL) e a sensibilidade cutânea. Estes efeitos benéficos podem ter sido exercidos pela ação direta, por meio da inibição da liberação de neuromediadores envolvidos na reação de sensibilidade, ou pela diminuição na inflamação neurogênica.

1.3. Administração oral de probióticos e a pele – MODELO MURINO

Atualmente, existem poucos modelos animais para reproduzir uma complicada condição de um paciente com dermatite atópica. Dessa forma, há dificuldade na análise patológica e desenvolvimento de medicamentos para esta condição. Alguns modelos foram propostos e desenvolvidos, mas o modelo espontâneo em camundongos NC/Tnd, que expressam anormalidades imunológicas, patológicas, dermatológicas e biológicas a nível molecular, similares às encontradas na dermatite atópica humana é, atualmente, o modelo murino mais eficaz (Tanaka et al., 2011).

Testando a capacidade dos probióticos em diversos modelos murinos, Shin e colaboradores (2016) observaram que um *pool* de probióticos (*L. acidophilus*, *L.*

rhamnosus, *L. plantarum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *Lactococcus lactis* e *Streptococcus thermophilus*) foi capaz de melhorar os sintomas em camundongos em um modelo de dermatite atópica, com supressão das citocinas Th2 (*T helper 2*) e um aumento nas citocinas Th1 (*T helper 1*). Uma supressão da resposta Th2 e da produção de IgE também foi verificada por Inoue e colaboradores (2009), mediante a administração via oral de *B. breve* em um modelo murino.

As células Th1 secretam IFN- γ e TNF- β e são eficientes em eliminar patógenos intracelulares, enquanto as células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 que afetam a imunidade humoral a helmintos e são responsáveis por respostas imunes a alérgenos persistentes. Essa diferenciação das células CD4+ é influenciada pelo microambiente no qual essas células encontram os antígenos, sendo as citocinas IL-12 a maior indutora da resposta Th1 e IL-4 a maior indutora da resposta Th2. O balanço das respostas Th1 e Th2 é extremamente importante e pode determinar se a resposta imune é apropriada ou se ela pode causar imunopatologias. Uma superprodução de citocinas Th1, é relacionada à hipersensibilidade tardia e doenças auto-imunes. Por outro lado, a base para desordens alérgicas é o desequilíbrio do fenótipo Th2 (Abbas et al., 1996).

Alterando o perfil de produção de citocinas Th2 pela indução de respostas Th1 tem efeito protetor contra desordens relacionadas a resposta Th2, como a asma e alergias (Teixeira et al., 2005).

Phillipe e colaboradores (2011) verificaram uma diminuição na TWEL e uma diminuição na inflamação local, utilizando diferentes doses de *L. paracasei* (de 10^6 a 10^9 UFC) via oral, em um modelo inflamatório em camundongos *hairless*.

Uma redução nos sintomas respiratórios de origem alérgica em camundongos, utilizando *Bifidobacterium breve*, *B. infantis*, *B. animalis*, *L. plantarum* e *L. rhamnosus*, todos na dose de 10^9 UFC por dia, via oral foi constatada por Hougee e colaboradores (2010). Neste estudo, o *B. breve* foi identificado como o agente antialérgico mais potente dentre os micro-organismos testados.

Mediante a administração oral de *B. breve* a camundongos, houve prevenção de um aumento na TWEL causada pela exposição à radiação UV e prevenção da diminuição da hidratação do estrato córneo. Além disso, o micro-organismo suprimiu um aumento nos níveis de peróxido de hidrogênio, na oxidação de proteínas e lipídios e na atividade de xantina-oxidase na pele (Ishii et al., 2014).

A administração via oral de *B. breve* B-3 a camundongos expostos à radiação UVB diminuiu alterações na TWEL, na hidratação cutânea, espessamento epidérmico e diminuiu os danos à estrutura das junções celulares e membrana basal induzidos pela exposição crônica à radiação UVB (Sato et al., 2015).

Os estudos acerca dos efeitos dos probióticos vêm crescendo cada vez mais além dos aspectos clínicos da saúde cutânea, abordando também aspectos estéticos da pele. Levkovich e colaboradores (2013) observaram que camundongos recebendo *L. reuteri* via oral apresentaram uma pele com aparência mais saudável, com aumento na espessura da derme, crescimento robusto dos pêlos e pH cutâneo significativamente mais baixo, sugerindo uma interação com a microbiota residente. Além disso, em camundongos machos mais velhos, a ingestão de *L. reuteri* estimulou o crescimento dos pêlos, devido a uma mudança folicular para 70% desses folículos na fase anágena, graças à ação de micro-organismos. Esses efeitos foram relacionados a aumento sérico de interleucina-10 (IL-10) e diminuição concomitante de interleucina-17 (IL-17), associada a infecções microbianas patogênicas.

Em camundongos mutantes, com ausência da produção de IL-10, a administração de probióticos não foi capaz de induzir o brilho no pêlo e esses animais possuíam níveis de pH cutâneos mais alcalinos. Dessa forma, foi verificado que a IL-10 e níveis de pH do hospedeiro são de imensa importância para um tegumento saudável (Levkovich et al., 2013).

Diversos pesquisadores utilizaram, com sucesso, o modelo de inflamação induzida pela oxazolona, um agente sensibilizador irritante (Sheu et al., 2002; Fowler et al., 2003; Hatano et al., 2010, Man et al., 2007, Man et al., 2008; Man et al., 2012).

A oxazolona é uma substância utilizada como adjuvante que aumenta, estimula, ativa, potencializa ou modula a resposta imune a nível celular e humoral. Seu mecanismo de ação pode ser não-específico, resultando em uma responsividade imunológica aumentada a uma ampla variedade de antígenos, ou específico a alguns antígenos, afetando um tipo restrito de resposta imune a um seletivo grupo de antígenos. A eficácia terapêutica deste modificador de respostas biológicas está relacionada à sua imunoadjuvância antígeno-específica. O principal dano encontrado mediante sua utilização é uma reação alérgica cutânea, sendo utilizado em diversos artigos acadêmicos como um sensibilizador cutâneo (Pubchem, 2017; Man et al., 2007; Hatano et al., 2010).

Man e colaboradores (2007) demonstraram a eficiência do modelo utilizando a oxazolona em camundongos *hairless*, considerado um modelo efetivo, de baixo custo, reprodução fácil e de alta previsibilidade. Após dez sensibilizações utilizando oxazolona, foi observada uma reação de hipersensibilidade tipo Th2, com múltiplas características semelhantes à dermatite atópica humana. A atividade da serino-protease aumentou, acarretando falha na função de permeabilidade da barreira – permitindo uma maior TWEL e facilitando a entrada de antígenos. O aumento na expressão de interleucina-4 (IL-4) e nos níveis séricos de IgE foi observado. Houve uma diminuição no conteúdo lipídico do estrato córneo e secreção lamelar prejudicada, resultando em membranas lamelares anormais, como na dermatite atópica humana. Além disso, a atividade de peptídeos antimicrobianos diminuiu, tornando a pele mais suscetível à infecção por *S. aureus*.

Hatano e colaboradores (2010) utilizaram o mesmo modelo experimental utilizando sensibilizações subsequentes com a oxazolona (uma sensibilização com oxazolona a 1% e depois sensibilizações sucessivas com oxazolona a 0,1%), podendo aferir alterações na TWEL, na hidratação do estrato córneo, pH de superfície do estrato córneo, níveis séricos de IgE e níveis de fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina-1 α (IL-1 α), antes e depois do tratamento com o composto de interesse.

O aumento da atividade da serino-protease, induzido pelo aumento do pH, pode levar a camadas lamelares anormais em camundongos com dermatite atópica induzida pela oxazolona, pela degradação de enzimas processadoras de lipídios e pelo bloqueio da secreção lamelar corporal (Hatano et al., 2010).

Vale ressaltar que o modelo murino é útil em alguns aspectos, mas não reflete a variabilidade observada em pacientes humanos e não pode ser utilizado quando as estrutura proteicas murinas e os mecanismos de ligação diferem, de maneira significativa, dos humanos (Nolte et al., 2013).

1.4. Administração tópica de probióticos e a pele

O primeiro relato avaliando a “bacterioterapia tópica” foi publicado em 1912. Na época, observando a similaridade de processos inflamatórios da pele e do “canal alimentar”, Peyri administrou a partes doentes da pele - com impetigo contagioso, impetigo de Bockhart, eczema, acne, seborreia - grandes quantidades de bactérias

inofensivas à saúde, da mesma forma que ele costumava testar em doenças do “canal intestinal”. O pesquisador relatou ter administrado a levedura de cerveja, bacilos do leite, leite combinado com *L. bulgaricus* (na época, chamado de *Bulgarian bacillus*) e culturas de *Staphylococcus*. Ele concluiu, nesta experimentação, que os micro-organismos atuaram favoravelmente, por meio de autofagia natural dos patógenos com os quais eles entraram em contato. Além disso, ele observou que nas piодermites superficiais, a aplicação da levedura de cerveja sempre resultou em melhora mais rápida das lesões e em todas as lesões associadas com seborreia, a utilização de culturas de *L. bulgaricus* no leite atuou de forma muito favorável (Peyri, 1912).

A partir de então, é crescente o número de artigos científicos descrevendo a administração tópica de micro-organismos. Uma composição de leite fermentado contendo *L. helveticus* promoveu a diferenciação de queratinócitos em uma cultura de células humanas e aumentou a expressão de RNA-mensageiro (mRNA) de profilagrina, precursor da filagrina, proteína essencial para a formação e manutenção da integridade da barreira cutânea (Baba et al., 2006). Em um modelo murino de camundongos *hairless* tratados oralmente com esse mesmo leite fermentado contendo *L. helveticus*, os camundongos apresentaram uma melhora na TWEL, com recuperação mais rápida após a indução da dermatite, diminuição das áreas afetadas e melhora na umidade do estrato córneo (Baba et al., 2010).

A melhora de lesões decorrentes da dermatite atópica, uma diminuição no prurido, na TWEL, no SCORAD e uma diminuição na colonização por *S. aureus* foram observados com a administração de um creme contendo o lisado da bactéria Gram-negativa *Vitreoscilla filiformi*, na concentração de 5%, aplicado na pele afetada de pacientes com dermatite atópica (Guéniche et al., 2008b). Utilizando-se a *V. filiformi* incorporada a uma água termal, foi verificada também uma melhora nos sintomas de pacientes com dermatite seborreica (Guéniche et al., 2008c).

A administração tópica de um extrato de *L. plantarum* na concentração de 5% em seres humanos apresentou efeitos anti-inflamatórios e melhorou a propriedade antimicrobiana da pele. Observou-se diminuição do eritema, recuperação da barreira cutânea e uma diminuição no tamanho das lesões provocadas pela acne (Muizzudin et al., 2012).

Nesses testes de utilização tópica dos probióticos, os explantes *ex vivo* vêm ganhando importância. Os explantes de pele são tipicamente adquiridos de recém-

nascidos, cadáveres ou pela retirada de amostras a partir de cirurgias realizadas e podem ser mantidos em meio de cultura celular diretamente ou em suporte, com interface ar-líquido e permanecer viáveis em cultura por até duas semanas. A cultura de pele tem a vantagem de conter todos os tipos celulares residentes da epiderme e derme, bem como os apêndices cutâneos (Popov et al., 2014).

Segundo Freshney (2010), a cultura de tecidos foi inventada no início do século 20, como um método para estudo do comportamento de células animais livre de variações sistêmicas que podem surgir *in vivo* tanto durante a homeostase normal quanto durante o estresse causado durante a execução de um experimento. Como o próprio termo implica, a técnica foi primeiramente elaborada com fragmentos não desagregados de tecido e o crescimento acontecia pela migração radial de células do fragmento tecidual, com mitoses ocasionais durante o crescimento. Como a cultura de células destes explantes primários dominou o campo por mais de 50 anos, o termo “cultura de tecidos” permaneceu em uso como um termo genérico, apesar do fato que a expansão explosiva do campo na segunda metade do século 20 tornou possível a utilização de culturas de células dispersas.

As principais vantagens da utilização de culturas celulares são: **(1)** a possibilidade de controlar de maneira precisa o ambiente físico-químico (pH, temperatura, pressão osmótica e tensão de O₂ e CO₂); **(2)** a homogeneidade das amostras; **(3)** uma vez que as replicatas experimentais são praticamente idênticas, a necessidade de análise estatística de variância é simplificada; **(4)** as culturas podem ser expostas diretamente a um reagente em uma concentração definida, mais baixa e com acesso direto à célula. Dessa forma, menos reagentes são requeridos do que *in vivo*, onde mais de 90% pode ser perdido por excreção e distribuição a tecidos que não são foco do estudo. Além disso, as questões legais, morais e éticas da experimentação animal são evitadas (Freshney, 2010).

O folículo piloso, por exemplo, é um tecido que pode continuar a produzir novos pêlos, aparentemente sem interrupção, por até duas semanas após sua dissecação e colocação em uma placa. O modelo de cultura de pele replica a fisiologia e função normais da pele, podendo ter comportamento elaborado, com coordenação de divisão celular, diferenciação e migração (Oh et al., 2013).

No entanto, vale ressaltar que a principal deficiência do modelo de cultura de órgão é a ausência do sistema vascular (Freshney, 2010). O modelo replica a organização e função da pele somente parcialmente, tendo um repertório de tipos celulares muito mais simples e falta de um *feedback* de sinalização que normalmente chega à pele de uma

variedade de fontes sistêmicas. Além disso, a difusão dos nutrientes do meio de cultura ao tecido pode ser ineficiente (Popov et al., 2014; Oh et al., 2013).

Guéniche e colaboradores (2010a), utilizando um modelo de cultura de pele verificaram que a aplicação tópica de lisado de *B. longum* resultou em um efeito benéfico sobre vários parâmetros de inflamação, como diminuição na vasodilatação, no edema, na liberação de TNF- α e na degranulação de mastócitos.

Também foi verificado que o *L. paracasei* CNCM I-2116 (ST11), aqui denominado LPST11, administrado em uma cultura de pele, como lisado bacteriano de 1×10^7 UFC/mL, impediu a vasodilatação, edema, degranulação de mastócitos e liberação de TNF- α induzida pela substância P (SP), um neuromediador pró-inflamatório. Utilizando-se cultura de pele humana, tal micro-organismo foi capaz de induzir uma recuperação mais rápida na função de barreira (Guéniche et al., 2010b). Além disso, LPST11 foi capaz de promover melhora na cicatrização de feridas, recuperação na homeostase cutânea mais rápida após a exposição à radiação UV, servindo como potencial estratégia de fotoproteção (Guéniche et al., 2008a; Guéniche et al., 2009; Rodrigues et al., 2005).

Em um modelo de cultura de queratinócitos tratados com lisados de *B. longum*, *L. plantarum*, *L. reuteri* e *L. rhamnosus* GG, foi verificada uma melhora na função de barreira nas junções celulares em 24 horas, sendo o *B. longum* e *L. rhamnosus* GG os probióticos de maior eficiência (Sultana et al., 2013). Também utilizando um modelo de cultura de queratinócitos, Muhammedsaeed e colaboradores (2014), verificaram que a utilização do *L. rhamnosus* GG em sua forma viável ou na forma de lisado celular, quando aplicado antes ou simultaneamente ao *S. aureus*, foi capaz de aumentar a sobrevivência dos queratinócitos, pelo mecanismo de competição exclusiva. O probiótico foi capaz de inibir o crescimento de *S. aureus* e reduzir a adesão bacteriana.

A ação antibacteriana de *L. acidophilus* foi demonstrada *in vitro* contra diferentes patógenos, como *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter cloacae* (Bernet-Camard et al., 1997).

Gan e colaboradores (2002) mostraram que *L. fermentum* RC-14 foi capaz de inibir a adesão bacteriana de *S. aureus* em próteses cirúrgicas colocadas em camundongos, inibindo de modo significativo a infecção cirúrgica causada por *S. aureus*, enquanto Prince e colaboradores (2012) verificaram a presença de um mecanismo

protetor do *L. reuteri* contra o *S. aureus* por exclusão competitiva do patógeno de seus locais de ligação, em um modelo de cultura de queratinócitos. Tais dados sugerem que a utilização profilática de um probiótico tópico poderia inibir a colonização da pele pelo *S. aureus*, e, dessa forma, auxiliar na prevenção de infecções.

Em células Hs68 (fibroblastos dérmicos humanos), a administração de *Lactobacillus plantarum* HY7714 aumentou os níveis de mRNA de serina palmitoiltransferase e diminuiu os níveis de mRNA da enzima ceramidase, auxiliando na manutenção da hidratação cutânea mediante a exposição à radiação UV (Ra et al., 2014). Utilizando o mesmo micro-organismo – *L. plantarum* HY7714, foi verificado, nas mesmas células Hs68, que o tratamento com o micro-organismo recuperou de maneira efetiva a expressão reduzida de pró-colágeno pela inibição da expressão da metaloproteinase de matriz induzida pela radiação UVB (Kim et al., 2014).

1.5. Bifidobactérias na saúde cutânea

As bifidobactérias foram isoladas pela primeira vez em fezes de crianças recebendo aleitamento materno, em 1899, por Henri Tissier, e foram denominadas *Bacillus bifidus*. Apesar de Orla-Jensen ter proposto o gênero *Bifidobacterium* em 1924, elas foram classificadas como *Bacteroides bifidus* de 1923 a 1934, da primeira à quarta edição do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. De 1939 a 1957, da quinta à sétima edição do mesmo manual, foram classificadas como *Lactobacillus bifidus*, permanecendo assim por várias décadas. Em 1973, Poupard e a oitava edição do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* reclassificaram as bifidobactérias como pertencentes à família *Bifidobacteriaceae*, que contém um único gênero, *Bifidobacterium*, consistindo de 11 espécies. Em 1986, o gênero foi atualizado a 24 espécies e atualmente há 31 espécies propostas (Lee & O'Sullivan, 2010).

As bifidobactérias pertencem ao filo *Actinobacteria*, que é formado por bactérias Gram-positivas, caracterizadas por genoma rico em guanina e citosina. A denominação de bifidobactérias deriva da morfologia bífida, apesar de serem pleomórficas *in vitro*, dependendo das condições de cultura (Sela & Mills, 2010). Além disso, são imóveis, não esporulam e não produzem gás a partir de metabolismo fermentativo. A maioria das espécies são anaeróbicas obrigatórias, e algumas poucas foram caracterizadas como microaerófilas. As bifidobactérias já foram isoladas a partir vários nichos ecológicos de

mamíferos, como cavidade oral, trato geniturinário, trato gastrointestinal. Também já foram isoladas a partir do trato gastrointestinal de alguns pássaros e insetos, além de leite cru (Lee & O'Sullivan, 2010; Sela & Mills, 2010).

As bifidobactérias exercem efeito imunomodulador com possível aplicação para tratamento de alergias, prevenção de danos causados à pele pela radiação UV, tratamento de dermatite atópica, além de inibir o crescimento e reduzir a adesão de bactérias patogênicas (Inoue et al., 2009).

As propriedades probióticas de *Bifidobacterium longum* 5^{1A} (BL51A) vêm sendo estudadas pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microorganismos (LEFM) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) há mais de uma década, com abordagem em diferentes ecossistemas.

Em testes de potencial probiótico de diferentes bifidobactérias (*B. breve* 1101A, *Bifidobacterium pseudolongum* 1191A, *B. bifidum* 1622A e BL51A), a BL51A demonstrou ter o melhor potencial probiótico entre as bactérias testadas, apresentando maior sensibilidade a antimicrobianos, uma melhor taxa de crescimento e maior capacidade de produção de substâncias antagonistas contra diversos patógenos (Souza et al., 2013). Além disso, a BL51A incorporada a um leite fermentado demonstrou capacidade de proteção de camundongos infectados por *S. Typhimurium*, por meio da indução da proliferação de imunoglobulina-A (IgA) intestinal mesmo após a perda de viabilidade das células bacterianas em um período de estoque dos leites fermentados por 28 dias, mostrando que mesmo suas células não viáveis são capazes de exercer efeitos desejáveis (Souza et al., 2012).

Quando incorporada a um iogurte à base de leite de cabra, BL51A foi capaz de promover uma melhora na frequência de defecação e dor abdominal em pacientes diagnosticados com constipação intestinal funcional crônica (Guerra et al., 2011). Em um modelo murino de infecção pulmonar por *K. pneumoniae*, BL51A foi capaz de promover uma melhora mais rápida da inflamação, com efeitos benéficos associados à produção de IL-10. Nos animais que receberam administração oral do probiótico, foi verificada uma diminuição dos danos pulmonares, com redução significativa da carga bacteriana pulmonar, que reduziu a mortalidade em 100% dos camundongos infectados. Estes efeitos foram atribuídos, pelo menos em parte, à ativação da via TLRs, que resulta

na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e protege o hospedeiro contra a morte por pneumonia (Vieira et al., 2015b).

A administração via oral de BL51A em camundongos nos quais foi induzida uma inflamação semelhante à gota (elevado ácido úrico) foi capaz de aliviar parâmetros inflamatórios, diminuindo a hipernociceção, o acúmulo de neutrófilos na articulação fêmorotibial / fêmoropatelar e a atividade de mieloperoxidase no tecido periarticular. Houve inibição da produção da quimiocina CXCL1 e de IL-1 β nas articulações dos animais tratados com BL51A e os níveis de IL-10 foram significativamente mais altos nos tecidos do joelho de animais tratados com o probiótico, mais uma vez relacionando os efeitos imunomoduladores de BL51A à produção da citocina anti-inflamatória IL-10 (Vieira et al., 2015a).

1.6. Microbiota cutânea

Micro-organismos comensais na microbiota da pele humana atuam no combate de patógenos e na manutenção da homeostase da própria microbiota (Wang et al., 2014).

A percepção da pele como um ecossistema, composto de componentes biológicos vivos e componentes físicos ocupando diversos *habitats*, pode melhorar nosso entendimento sobre a grande delicadeza do balanço entre hospedeiro e micro-organismos. Qualquer problema no equilíbrio em um dos lados da equação pode resultar em doenças cutâneas ou infecções (Grice & Segre, 2011).

Os micro-organismos residentes pertencem a um grupo relativamente fixo encontrado rotineiramente na pele e que se reestabelece após perturbações. Frequentemente, os micro-organismos residentes são considerados comensais, o que significa que não são prejudiciais e podem oferecer efeitos benéficos aos hospedeiros. O outro grupo são os micro-organismos transitórios, que não se estabelecem permanentemente na superfície, mas têm origem ambiental e persistem por horas a dias (Kong & Segre, 2012).

Os micro-organismos que fazem parte da microbiota cutânea residente possuem características físicas comuns, tais como paredes celulares Gram-positivas conferindo alta estabilidade estrutural, tornando-os resistentes ao ressecamento, choque osmótico e estresse mecânico. Estes são atributos importantes tendo em vista que a superfície da pele

é relativamente deficiente em água livre e sujeita a flutuações de temperatura, radiação solar e concentração de sal e íons (Bojar & Holland, 2002).

Os micro-organismos e os ácaros cobrem a superfície da pele e residem profundamente nos pelos e glândulas (Figura 1). Na superfície cutânea, uma grande variedade de bactérias, como as proteobactérias e *S. epidermidis* formam comunidades que estão profundamente entrelaçadas entre si e outros micro-organismos. Fungos comensais, como *Malassezia* sp., crescem tanto como hifas filamentosas ramificadas quanto como células individuais. Partículas virais vivem nas células bacterianas. Ácaros cutâneos, como o *Demodex folliculorum* e *Demodex brevis* são alguns dos menores artrópodes, e vivem perto dos folículos pilosos (Grice & Segre, 2011).

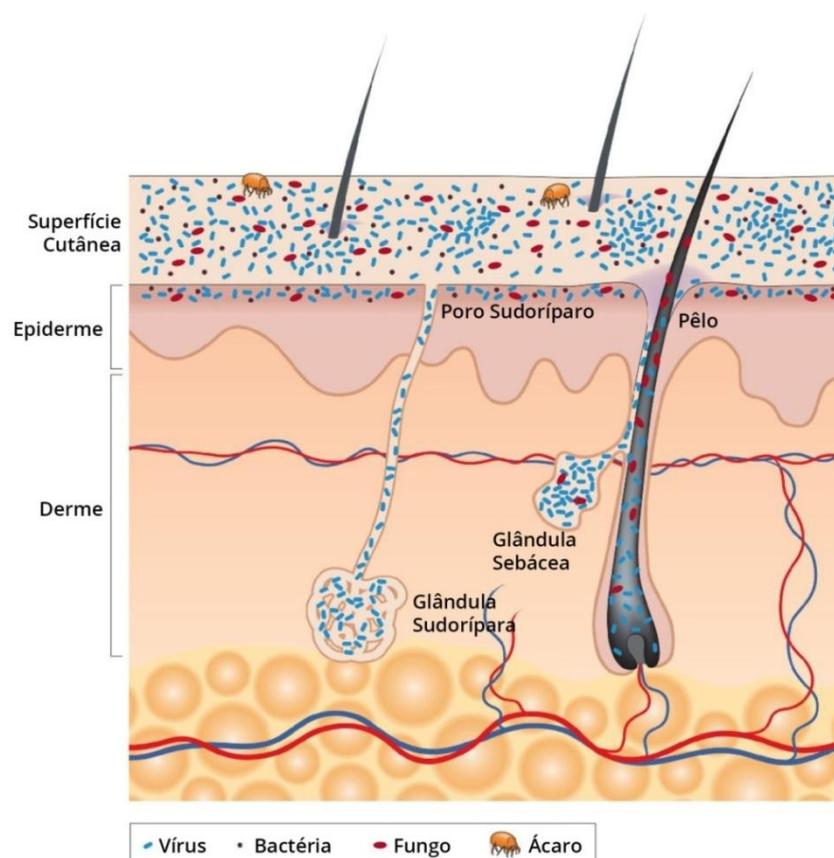


Figura 1 – Representação esquemática da histologia cutânea em corte transversal com micro-organismos e apêndices cutâneos. (Fonte: adaptado de Grice & Segre, 2011).

Em adultos, bactérias do filo Actinobacteria foram encontradas em maior quantidade nos indivíduos estudados, seguido por membros dos filos Firmicutes,

Proteobacteria e Bacteroidetes. Dos 205 gêneros identificados, três deles foram associados com: *Corynebacterium* (22,8%; Actinobacteria), *Propionibacterium* (23,0%; Actinobacteria), e *Staphylococcus* (16,8%; Firmicutes) (Grice et al., 2009).

O ecossistema formado pela microbiota cutânea tem uma ampla variação, com nichos diferindo entre si tanto fisiologicamente quanto topograficamente. Por exemplo, as axilas contêm pelos e umidade e ficam a uma distância pequena do antebraço, que contém pele seca. No entanto, esses dois nichos, apesar da grande proximidade anatômica, são ecologicamente distintos, como uma floresta tropical e um deserto (Grice et al., 2009). Além disso, as estruturas cutâneas, como folículos pilosos, sebáceos, e glândulas écrinas e apócrinas são sub-*habitats* que podem ser associados com suas próprias microbiotas, que são únicas (Grice et al., 2008).

Micro-organismos residentes ou transitórios são não patogênicos em condições normais, se a higiene própria é mantida e se a microbiota residente, a resposta imune e a função de barreira estão intactas. No entanto, após alguma perturbação, tais populações de micro-organismos residentes ou transitórios podem causar doenças. Por exemplo, o *S. epidermidis* é considerado um micro-organismo comensal, mas pode ser um patógeno oportunista em hospedeiros imunocomprometidos. Da mesma forma, o *S. aureus* pode ser um micro-organismo residente em casos assintomáticos, mas também é um patógeno importante em determinados casos, podendo causar infecções localizadas e sistêmicas (Kong, 2011; Kong & Segre, 2012).

P. acnes é o principal micro-organismo comensal da pele, responsável pela manutenção da saúde da mesma. No entanto, é considerado um fator patogênico na acne, uma doença cutânea comum, que afeta mais de 80% da população mundial. No entanto, é de fundamental importância entender as diferenças entre diferentes linhagens da microbiota humana na patogênese das mais diversas doenças (Johnson et al., 2016). A suplementação com vitamina B12 aumenta a produção de porfirinas por *P. acnes*, um grupo de metabólitos pró-inflamatórios importante no desenvolvimento da acne (Kang et al., 2015). Comparando linhagens tipo IA-2 de *P. acnes*, associadas à acne, e linhagens tipo II de *P. acnes*, associadas a uma pele saudável, verificou-se que as linhagens tipo IA-2 produziram níveis significativamente mais altos de porfirinas, que, depois, foram aumentados pela suplementação com vitamina B12. Por outro lado, as linhagens associadas a uma pele saudável, tipo II, produziram baixos níveis de porfirinas e não responderam à suplementação com vitamina B₁₂ (Johnson et al., 2016).

Dessa forma, o papel da microbiota humana na doença ou na saúde ainda precisa de muita pesquisa para ser compreendido. Em particular, os mecanismos moleculares de diferentes linhagens da mesma espécie comensal com funções distintas em manter a saúde ou desencadear a doença ainda precisam ser elucidados (Johnson et al., 2016).

1.7. Imunologia cutânea

A pele humana constitui a interface do organismo com o ambiente externo e é composta por uma camada superficial, a epiderme, uma camada intermediária, derme e, uma camada profunda, a hipoderme. A inter-relação harmônica entre estas camadas mantém a homeostasia do tecido mais importante na proteção do organismo contra agentes de agressão ambiental (Elias, 2009).

Das diversas agressões ambientais é importante citar a perda de umidade com consequente desidratação e a entrada de micro-organismos patogênicos; agressões químicas, como poluentes, tabaco, xenobióticos; agressões mecânicas e físicas, como radiação UV e oscilações de temperatura (Elias, 2009; Grice et al., 2009; Valdman-Grinshpoun et al., 2012; Guéniche et al., 2014).

A defesa cutânea do hospedeiro ocorre através da ação combinada de uma grande variedade de sistemas complementares. Estes incluem a barreira física, pH de superfície hostil (em torno de 5,4 a 5,9) que inibe colonização de bactérias patogênicas e favorece a adesão de bactérias não patogênicas e a síntese ativa de moléculas de defesa do hospedeiro, tais como os peptídeos antimicrobianos, proteases, lisozimas, citocinas e quimiocinas que servem como ativadores de respostas imunes celular e adaptativa (Cork et al., 2009; Cogen et al., 2008).

As citocinas representam uma família heterogênea de glicoproteínas; que podem ser induzidas, produzidas por vários tipos celulares, que fazem a mediação entre a interação local e a comunicação distante entre elementos celulares das respostas imune e inflamatória. As citocinas podem agir diretamente como indutoras e reguladoras do crescimento, divisão e diferenciação celular, como estimuladoras do movimento e multiplicação celular e como controladoras da função celular e interação via mudanças induzidas na expressão das moléculas de adesão e receptores de citocinas (Corsini & Galli, 2000).

As citocinas são produzidas por quase todas as células nucleadas, quando estimuladas ou ativadas, incluindo queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans na epiderme, fibroblastos, células endoteliais, células musculares, mastócitos, linfócitos e outras células inflamatórias da derme (Kondo, 2000).

A pele e o trato intestinal estão em “contato direto” com o ambiente externo, portanto, são continuamente expostos a um grande número de micro-organismos e agressões. Para lidar com esses desafios/agressões, os epitélios produzem um arsenal diverso de componentes imunológicos que combatem a infecção por micro-organismos e lesões físicas e químicas (Bernet-Camard et al., 1997; Rodrigues et al., 2005; Nestle et al., 2009; Gallo & Hopper, 2012).

Estudos iniciais já destacavam os tipos individuais de células na pele, entretanto, foram os conceitos visionários do “tecido linfoide associado à pele” (SALT) e do “sistema imune cutâneo”, responsáveis pela interpretação moderna e a definição do paradigma geral para imunologistas. O conceito inicial do SALT introduziu a ideia de células imunes circulantes, que se movimentam de maneira direta entre a pele, os linfonodos e a circulação e proporcionam uma imunovigilância ideal ao organismo (Nestle et al., 2009).

Células especializadas da epiderme incluem melanócitos, que produzem o pigmento melanina e as células de Langerhans, que são as principais células imunes residentes da pele. Além disso, células T, principalmente células CD8+, podem ser encontradas no estrato basal e estrato espinhoso (Nestle et al., 2009).

A derme é anatomicamente mais complexa do que a epiderme, apresentando enorme diversidade celular, como representado na Figura 2. A derme contém muitas células imunes especializadas, incluindo células dendríticas, células T *helper* CD4+, células T $\gamma\delta$ e células T *natural killer* (NK). Além disso, estão presentes na derme macrófagos, mastócitos, fibroblastos e tipos celulares relacionados aos nervos. A derme é drenada pela circulação linfática e vascular, pelas quais células migratórias trafegam (Nestle et al., 2009).

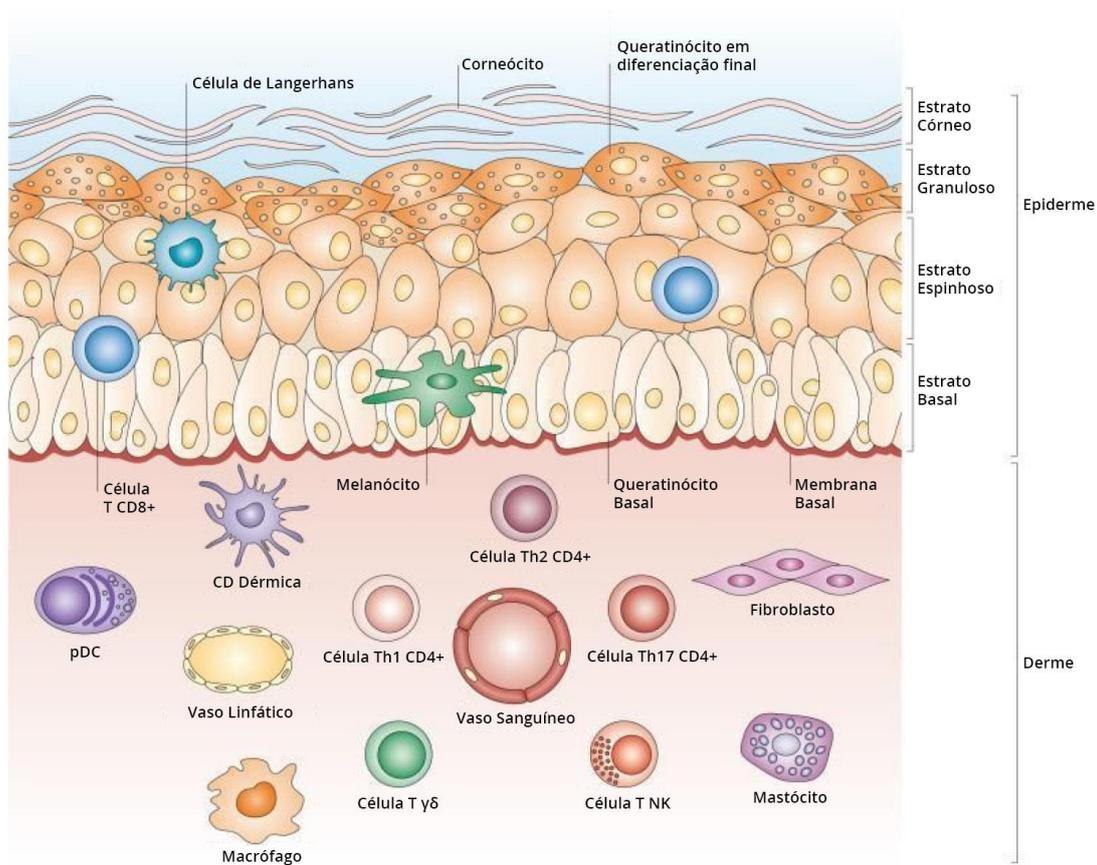


Figura 2 – Anatomia cutânea e células efectoras. (Fonte: adaptado de Nestle et al., 2009).

As células na derme e epiderme, incluindo células dendríticas dérmicas, células de Langerhans epidérmicas, melanócitos, linfócitos migradores e queratinócitos produzem uma grande variedade de citocinas (Welss et al., 2004). Anteriormente, acreditava-se que os queratinócitos eram meramente uma barreira física entre o ambiente externo e órgãos internos. No entanto, na década de 70, descobriu-se que os próprios queratinócitos são os principais contribuintes para a produção de citocinas epidérmicas, seja de forma constitutiva ou por indução de vários estímulos (Welss et al., 2004). Os queratinócitos são células pró-inflamatórias efectoras que estão estrategicamente posicionadas na camada exterior do corpo para reagir em tempo hábil a danos causados por agentes externos pela produção coordenada de peptídeos antimicrobianos, citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (Nestle et al., 2009).

Na epiderme, os queratinócitos são a principal fonte de citocinas, junto com as células de Langerhans e melanócitos. As células epidérmicas podem produzir constitutivamente, ou após ativação, um arsenal de citocinas, apoiando, fortemente, as funções da pele como um órgão imune, constituindo-se em uma barreira imune entre o ambiente externo e tecidos internos. O padrão histopatológico da maioria das doenças cutâneas é causado pela ação de uma citocina ou pela combinação de diversas citocinas (Corsini & Galli, 2000).

De maneira semelhante às células epiteliais intestinais, os queratinócitos podem identificar os patógenos e mediar respostas imunes para discriminar entre microorganismos comensais e patógenos. As células eucariotas detectam produtos microbianos usando receptores que reconhecem vários componentes microbianos conservados evolutivamente, chamados PAMPs, que incluem lipopolissacarídeos, peptídoglicanos, flagelinas e ácidos nucleicos. Os PAMPs se ligam a TLRs, que por sua vez, induzem a ativação das vias celulares sinalizadoras e subsequentes respostas imunes inata e adaptativa. Os queratinócitos epidérmicos expressam vários TLRs, localizados na superfície celular (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6) ou nos endossomos (TLR3 e TLR9). A expressão de TLRs pelos queratinócitos é crucial na indução das respostas imunes cutâneas, uma vez que a ativação desses receptores nos queratinócitos humanos leva a uma resposta imunológica do tipo Th1 e à produção de IFNs do tipo I (Nestle et al., 2009).

Após a exposição a haptenos ou altas doses de radiação ultravioleta, os sensores intracelulares presentes no complexo inflamossoma dos queratinócitos são ativados, levando à ativação da caspase 1 e ao processamento e secreção de citocinas pró-inflamatórias. Por sua vez, isso resulta na ativação das células imunes residentes no tecido, que induzem e perpetuam uma resposta inflamatória (Nestle et al., 2009).

Dentre as citocinas produzidas pelos queratinócitos, estão IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, TNF- α e os interferons *alpha*, *beta* e *gamma* (IFN- α , - β e - γ), os quais exercem múltiplos efeitos na migração de células inflamatórias, tendo efeitos sistêmicos no sistema imune e influência nos processos de proliferação e diferenciação dos queratinócitos, bem como na produção de outras citocinas (Uchi et al., 2000; Gröne, 2002; Welss et al., 2004).

Os queratinócitos desempenham o papel principal na produção de mediadores imunes na dermatite de contato provocada por irritantes. A quebra da barreira cutânea

leva à liberação de IL-1 α , que representa o passo inicial na cascata inflamatória. A ativação de IL-1 α estimula uma posterior produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, como IL-1 β , TNF- α , IL-6 e CXCL8 (IL-8) pelas células epidérmicas próximas e células dérmicas. Junto com IL-1 α , as ações subsequentes de IL-1 β são pleiotrópicas e envolvem a ativação de células dendríticas e células T, posterior produção de citocinas e quimiocinas e estímulo à produção de moléculas de adesão, como ICAM-1 nas células endoteliais e fibroblastos, que levam à perpetuação da inflamação cutânea (Lee et al., 2013).

Outra citocina chave na dermatite de contato é TNF- α . Os efeitos de TNF- α também são pleiotrópicos, levando a uma maior produção de moléculas de adesão celular, como ICAM-1 nos queratinócitos e células endoteliais e posterior indução de mediadores inflamatórios como IL-1, IL-6, GM-CSF, IFN- γ e CXCL8. Além disso, TNF- α em conjunto com IL-1 α atua como o primeiro sinal de alarme, que leva à liberação de CCL20 secundária e sinaliza à quimiocina CXCL8. Esses níveis aumentados de CCL20 e CXCL8 têm potencial para iniciar o processo de infiltração de células imunes, como células T CCR6+ e células dendríticas imaturas na área exposta ao irritante (Lee et al., 2013).

Queratinócitos em repouso contêm uma grande quantidade, em termos biológicos, de IL-1 α pré-formada e biologicamente ativa, além de pró-IL-1 β inativa. Uma agressão aos queratinócitos provoca a liberação de IL-1 α , que é, essencialmente, o evento primário na defesa cutânea. IL-1 α estimula a posterior produção e liberação de outras citocinas, como IL-8, IL-6, GM-CSF. Dessa forma, por uma cascata e uma rede de citocinas, uma resposta inflamatória pode ser rapidamente gerada. Neste cenário, os queratinócitos agem como transdutores de sinais pró-inflamatórios, respondendo a estímulos externos não específicos com a produção de citocinas inflamatórias, moléculas de adesão e fatores quimiotáticos preparando a derme para atividade imunológica específica (Corsini & Galli, 2000). Além disso, IL-1 também promove a diferenciação de queratinócitos e a ativação de células de Langerhans na epiderme a potentes células apresentadoras de antígenos (Uchi et al., 2000).

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica, tendo papel crucial na transição da imunidade inata para a adquirida. Ela é responsável pela substituição do infiltrado inicial de neutrófilos, induzindo a apoptose dos mesmos, contribuindo, dessa forma, pela resolução do conteúdo neutrofílico agudo, que é substituído por monócitos e células T após 24 a 48

horas, prevenindo dano tecidual excessivo pelo acúmulo de proteases e ROS secretadas pelos neutrófilos no local de inflamação (Scheller et al., 2011).

Posteriormente, a IL-6 estimula a diferenciação dos monócitos em macrófagos, sendo necessária para o recrutamento das células T, ativando quimiocinas que as atraem e evitando sua apoptose. Ela também tem grande atuação na diferenciação de células B e T, aumentando a produção de anticorpos nas células B. Levam à diferenciação de células T “*helper*” *naive* a células apresentadoras de antígenos com tendência maior a Th2 ou Th17 (Scheller et al., 2011).

Já a IL-10 é produzida pelos queratinócitos e células T e possui ação anti-inflamatória, inibindo a produção de IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ e diminuindo a produção de moléculas de adesão (Lee et al., 2013). A IL-10 suprime a fase de elicitacão das respostas de hipersensibilidade de contato para inibir a produção de IFN- γ por células T. Também inibe as respostas Th1 pela prevenção de um aumento na expressão de CD80, que é um co-estimulador para a geração de células Th1, nas células de Langerhans. Em camundongos *knockout* para a produção de IL-10, foi observado que esta citocina funciona para completar reações inflamatórias e restaurar as interações entre citocinas epidérmicas aos níveis basais, pela inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e TNF- α (Uchi et al., 2000).

1.8. Substância P (SP)

A substância P (SP) é um neuropeptídeo e possui efeitos pró-inflamatórios nas células imunes e epiteliais e participa da patogenia de doenças inflamatórias em diversos sistemas (O'Connor et al., 2004).

Os neuropeptídeos representam um grupo heterogêneo de moléculas. A menor delas contém somente dois aminoácidos, enquanto os maiores peptídeos possuem 40 ou mais aminoácidos. Mais de 50 neuropeptídeos estão envolvidos na transmissão de sinais não somente entre células nervosas, mas também entre células nervosas e células do sistema imune (Lotti et al., 1995).

A pele possui vários neuropeptídeos, como a SP, a neuroquinina A, a somatostatina, o peptídeo intestinal vasoativo, o peptídeo histidina isoleucina e o peptídeo histidina metionina, o peptídeo calcitonina relacionado ao gene, neurotensina, neuropeptídeo Y, peptídeo natriurético atrial, galanina e o hormônio estimulador de

melanócitos- γ (Lotti et al., 1995). Na pele, os neuropeptídeos estão envolvidos na mediação da inflamação, imunomodulação e termoregulação, e dessa forma, estão envolvidos na patogênese de diversas afecções cutâneas (Branchet-Gumila et al., 1999).

A SP é liberada por fibras-C aferentes primárias sensitivas da pele e apresenta importantes variações de concentração local de acordo com os efeitos de dor, estresse e infecção. Este peptídeo da família taquicinina está envolvido na patogênese de diversas doenças cutâneas de origem multifatorial, como, por exemplo, a dermatite atópica (N'Diaye et al., 2016).

As taquicininas são uma família extensa de peptídeos que compartilham a sequência C-terminal comum Fe-X-Gli-Leu-MetNH₂. Quatro taquicininas mamíferas foram descritas: substância P, neuroquinina A, neuroquinina B e neuropeptídeo K (uma forma estendida da neuroquinina A com terminação N). Essas quatro taquicininas são reconhecidas por diferentes seletividades por vários diferentes receptores de superfície celulares (Lotti et al., 1995).

A SP é um neuropeptídeo curto que é sintetizado e liberado pelos neurônios do sistema nervoso central, neurônios aferentes primários sensíveis à capsaicina e neurônios GIT intrínsecos não sensíveis à capsaicina, bem como células inflamatórias não-neuronais. Como um ligante endógeno, a SP se liga preferencialmente à proteína-G acoplada à NK-1R expressa no sistema nervoso central, bem como células imunes, queratinócitos e mastócitos. Após a despolarização, as fibras-C não mielinizadas liberam a SP nos tecidos adjacentes. Apesar de serem rapidamente degradadas pela enzima conversora de angiotensina e endopeptidase cutânea neutra, a SP tem vários efeitos eferentes. Ela se liga a NK-1R em queratinócitos e fibroblastos, dessa forma, estimulando a secreção de IFN- γ , IL-1 β e IL-8. Nos mastócitos, a ligação NK-1R leva à degranulação e secreção de histamina, leucotrieno B₄, prostagladina D₂, TNF e fator de crescimento endotelial vascular. Nos vasos, esse processo leva à vasodilatação e inflamação neurogênica, cujos sintomas clínicos incluem eritema, edema e prurido (Lotts & Ständer, 2014; N'Diaye et al., 2016).

A SP é o neuropeptídeo mais efetivo e abundante da pele (Branchet-Gumila et al., 1999), sendo o principal neuropeptídeo que ativa a resposta inflamatória cutânea (Guéniche et al., 2010a). A SP e taquicininas relacionadas estão presentes no sistema nervoso central e nos aferentes primários de pequeno diâmetro, que pertencem ao grupo de fibras-C (Branchet-Gumila et al., 1999). A SP e/ou peptídeos relacionados estão

principalmente envolvidos em transmissão de dor e no processo de reparação tecidual, sendo um dos vasodilatadores mais potentes e aumentando a permeabilidade vascular. A SP é considerada 100 vezes mais potente que a histamina e possui receptores nos mastócitos, leucócitos polimorfonucleares e macrófagos (Lotti et al., 1995).

A SP libera óxido nítrico das células endoteliais. Ela ativa os mastócitos, aumenta a produção de histamina, leucotrienos e TNF- α e também ativa as células endoteliais, que aumentam sua expressão de moléculas de adesão intercelular-1 (ICAM-1), moléculas de adesão celular vascular (VCAM-1) e interleucinas. Além disso, a SP aumenta a produção de IL-1 e IL-8 nos queratinócitos, sendo quimiotática nas células T, aumentando a proliferação e a função de células T e B, induzindo a expressão de IL-1 e IL-6, aumentando a produção de imunoglobulinas e a atividade de células NK (Freitas et al., 2015).

A SP pode agir diretamente na parede vascular ou indiretamente pela estimulação da degranulação de mastócitos, com liberação subsequente de histamina e serotonina. Além dos efeitos vasculares, também ocorre a liberação de mediadores pró-inflamatórios como IL-1 α , IL-6 e TNF (Branchet-Gumila et al., 1999). Além disso, ela interage com células endoteliais, mastócitos, células imunes e os vasos sanguíneos, iniciando uma cascata de respostas inflamatórias caracterizadas por eritema e hiperemia (secundárias à vasodilatação), edema local (secundário ao extravasamento de proteínas plasmáticas) e hipersensibilidade (secundária a alterações na excitabilidade de determinados neurônios sensitivos). Este fenômeno, que envolve a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular, é denominado “inflamação neurogênica” (Malhotra, 2016).

A SP induz, tanto diretamente quanto indiretamente, a inflamação por meio da modulação da liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas na pele. Ela estimula a proliferação de mastócitos, a degranulação e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como: IL-1, IL-2 e TNF- α . Possui efeito quimiotático nos monócitos, linfócitos T e neutrófilos (Lee et al., 2008). Ela estimula a produção de IL-1 em macrófagos, que sensibilizam neutrófilos e aumentam a liberação de dopamina. Além disso, ela leva à liberação de prostaglandina pela via do ácido araquidônico, levando a uma maior produção de corticosteróides pela adrenal (Datar et al., 2004).

Lee e colaboradores (2008) comprovaram a participação da SP na etiopatogenia da acne. Foi verificado que a incubação de glândulas sebáceas em um meio de cultura com neuropeptídeos selecionados, como a SP, peptídeo intestinal vasoativo,

neuropeptídeo Y, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), revelou que somente a SP afetou a estrutura das glândulas sebáceas e que este efeito foi dose-dependente.

Pacientes com acne possuem uma maior concentração média de SP em comparação com os que não têm este acometimento cutâneo. O estresse emocional pode afetar a microbiota intestinal e aumentar a permeabilidade intestinal, o que leva a uma inflamação sistêmica no corpo (Rokowska-Waluch et al., 2016).

Até mesmo a acne branda ou moderada é uma doença crônica, imprevisível, com desfiguração cosmética da face. A ligação entre a secreção de neuropeptídeos durante um período de estresse emocional e o desenvolvimento de inflamação cutânea resulta na exacerbação dessas condições dermatológicas, como dermatite atópica, psoríase e alopecia. A pele e seus apêndices são alvos proeminentes dos mediadores de estresse, como a SP (Arck et al., 2006).

Arck e colaboradores (2001) verificaram que com a administração de SP em camundongos, foi mimetizado um estado de estresse, que inibiu o crescimento de pelos, em resultado da estimulação realizada pela SP sobre a degranulação de mastócitos, no contexto do eixo cérebro-folículo piloso. Liu e colaboradores (2013) também verificaram uma inibição do crescimento de pelos diante de estresse crônico causado pela SP.

A SP induz a liberação de citocinas de mastócitos com função inflamatória, anti-proliferativa e pró-apoptótica, que exercem grande efeito sobre o epitélio do folículo piloso (Peters et al., 2006).

Em feridas de pacientes diabéticos, a SP está suprimida, o que leva à falha na cicatrização das mesmas nestes pacientes (Ni et al., 2016). A cicatrização de uma ferida na pele é um processo complexo que envolve a reepitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e matriz de deposição intersticial, que são executadas por diferentes tipos de células, como queratinócitos, fibroblastos e células inflamatórias e endoteliais. Inicialmente, o estresse mecânico nas margens da ferida estimula os nociceptores mecânico-sensitivos nas fibras sensitivas da pele. As fibras estimuladas liberam neuropeptídeos, como a SP e o CGRP. O principal gatilho para inflamação neurogênica é a ativação de substâncias imunoinflamatórias e pró-inflamatórias, resultando em um aumento no fluxo sanguíneo e um conseqüente edema causado pela exsudação do plasma da vênula pós-capilar (Freitas et al., 2015).

Os mecanismos da cicatrização de feridas prejudicada na diabetes incluem uma inflamação sistêmica e uma bioviabilidade cutânea reduzida de SP, o que resulta em um estado pró-inflamatório cutâneo crônico, que leva à inabilidade de formar uma resposta inflamatória aguda, culminando na falha de cicatrizar uma ferida crônica. Nestes casos, o tratamento com a SP induz uma resposta inflamatória aguda, que possibilita a progressão da fase proliferativa e modula a ativação macrofágica para o fenótipo M2, que promove a cicatrização da ferida, dessa forma, revertendo o estado pró-inflamatório crônico na pele diabética, promovendo cicatrização de feridas (Leal et al., 2015).

Em fibroblastos da pele de camundongos geneticamente diabéticos, em co-cultura com macrófagos, a SP induziu a migração de fibroblastos e a secreção de fatores pró-inflamatórios. A SP promoveu respostas inflamatórias em fibroblastos pela ativação do fator nuclear- κB (NF- κB), melhorando a cicatrização (Ni et al., 2016).

A dexametasona não foi capaz de exercer seu efeito anti-inflamatório diante dos níveis aumentados de SP em camundongos, durante o processo de inflamação neurogênica na cicatrização de feridas de pele. Independentemente de sua influência inibitória sobre o componente inflamatório imuno-endócrino, a dexametasona não reduz a liberação destas substâncias inflamatórias pelas terminações nervosas (Freitas et al., 2015).

A SP entre concentrações de nano a micromolar atua sobre as bactérias e leva a um aumento geral na virulência das mesmas. Ela potencializa a virulência de *S. aureus*, e *S. epidermidis*, com aumento de sua atividade de formação de biofilmes. O aumento na adesão destes micro-organismos aos queratinócitos, quando tratados com a SP foi observado. Dessa forma, conclui-se que a SP atua na regulação da homeostase da microbiota cutânea (N'Diaye et al., 2016).

A SP também aumentou massivamente a citotoxicidade de *Bacillus cereus*, tendo impacto direto na microbiota cutânea, sendo um mecanismo de ação à parte, somando com a potente inflamação neurogênica que o neuropeptídeo provoca (Mijouin et al., 2013).

A administração de *L. paracasei* normalizou a sensibilidade visceral e a imunomarcagem de SP, previamente aumentadas no cólon, após antibioticoterapia em camundongos (Verdu et al., 2006).

Além disso, a inflamação cutânea provocada pela SP foi inibida por LPST11 nas pesquisas de Philippe e colaboradores (2011) e Guéniche e colaboradores (2010b).

Ainda segundo Lee e colaboradores (2008), o papel da SP neste processo anti-inflamatório induzido pelos probióticos é notável, uma vez que a SP pode ser um mediador primário da amplificação da inflamação e produção de sebo induzidas por estresse na patogenia da acne.

2. JUSTIFICATIVA

Os probióticos foram intensamente explorados por seus efeitos benéficos sobre a saúde intestinal e, atualmente, a sua atuação em outros ecossistemas tem sido estudada, com resultados muito positivos. Estudos recentes dos efeitos dos probióticos sobre a pele sugerem um grande potencial de função imunomoduladora e antimicrobiana, com papel na restauração da função de barreira cutânea, na prevenção do fotoenvelhecimento, da acne, entre outros. O foco está tanto na parte clínica, explorando seu efeito preventivo e curativo diante das mais variadas afecções cutâneas, quanto na parte estética, que tem como público-alvo mulheres e homens de diversas idades no mundo todo. No entanto, os mecanismos de ação envolvidos nesses efeitos não estão esclarecidos. Após o levantamento bibliográfico sobre o tema, pode-se constatar que faltam dados mais detalhados e uniformes para que a terapia cutânea com probióticos possa ser empregada com confiança na rotina clínica, criando protocolos de utilização seguros, e ainda existe um campo enorme de exploração de efeitos desses micro-organismos sobre diversos aspectos da pele.

Atualmente, existem no mercado poucos produtos à base de probióticos com benefício à saúde cutânea que têm, verdadeiramente, seus efeitos benéficos comprovados por trabalhos científicos. Não existe no mercado brasileiro nenhum produto de utilização tópica à base de probióticos desenvolvido para ser administrado na pele com o intuito de prevenir ou tratar lesões de caráter inflamatório decorrentes de doenças cutâneas ou acometimentos cutâneos, com objetivo clínico ou estético.

No mercado brasileiro, por exemplo, são encontrados os produtos da linha Innéov®, em especial o Innéov Duocap®, que é de uso oral, à base do micro-organismo LPST11, produzido pela Nestlé e L'Oréal, que possui suas propriedades probióticas descritas nos trabalhos de Guéniche e colaboradores (2010b) e Phillippe e colaboradores (2011). No entanto, trata-se de um produto importado, e, dessa forma, com preço de venda mais elevado no Brasil. Como é comercializado como cosmético, não é passível de

regulamentação de valor pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) ao contrário do que ocorre com medicamentos. Geralmente, a indicação é de uso prolongado e o alto custo do tratamento muitas vezes impede que pacientes possam dar continuidade a essa opção de terapia, que apesar de bem sucedida, é onerosa e faltam opções mais viáveis aos consumidores.

Os fatos acima descritos encorajam a exploração, identificação e esclarecimento dos mecanismos de ação de micro-organismos probióticos isolados no Brasil, que podem dar origem a um produto nacional e trazer efeitos benéficos à saúde da pele a um preço mais viável, tornando-o mais acessível a um maior número de pessoas.

O objetivo no presente estudo é elucidar o potencial probiótico da bactéria *Bifidobacterium longum* 5^{1A} (BL51A) sobre a pele inflamada, uma vez que já foram comprovados, pelo nosso grupo de pesquisa, os efeitos benéficos deste probiótico em diversos outros ecossistemas.

A BL51A demonstrou a melhor capacidade probiótica entre quatro linhagens de bifidobactérias testadas (*B. breve* 1101A, *B. pseudolongum* 1191A, *B. bifidum* 1622A e BL51A), apresentando maior sensibilidade a antimicrobianos, melhor taxa de crescimento e maior capacidade de produção de substâncias antagonistas em teste de antagonismo *in vitro*. Além disso, foi verificado em modelo murino de infecção por *S. Typhimurium* que a BL51A incorporada a um leite fermentado, mesmo com suas células não viáveis, foi capaz de exercer efeitos benéficos, protegendo os animais contra a infecção. Em um estudo em pacientes com constipação intestinal funcional crônica, nossa equipe verificou que a BL51A incorporada a um iogurte à base de leite de cabra foi capaz de melhorar a frequência de defecação e a dor abdominal. Além da saúde intestinal, a BL51A diminuiu danos pulmonares causados pela infecção por *K. pneumoniae* e diminuiu parâmetros inflamatórios em um modelo murino de gota.

Assim sendo, a partir da avaliação dos efeitos benéficos de BL51A sobre a pele inflamada, vislumbra-se a utilização desta bactéria na formulação de um produto probiótico de uso tópico para tratamento de doenças inflamatórias cutâneas. Para tal, neste estudo foram utilizados dois modelos experimentais: (i) o modelo murino de camundongos *hairless*, com indução de inflamação pela administração de oxazolona; e (ii) cultura de pele humana com indução da inflamação pela substância P (SP), o principal neuropeptídeo cutâneo. O modelo de pele humana foi testado no intuito de obtermos uma redução na utilização de animais de laboratório, de acordo com princípios éticos e morais

e respeitando a rejeição crescente dos consumidores por esses tipos de testes que geram sofrimento em animais.

3. HIPÓTESE

A bactéria probiótica BL51A exerce efeito imunomodulador quando administrada na sua forma ativa, via oral, em camundongos *hairless* inflamados pela administração tópica de oxazolona e também quando administrada topicamente em forma de lisado em cultura de pele humana inflamada pela substância P.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos de potencial probiótico de BL51A sobre aspectos cutâneos inflamatórios, ou seja, capacidade imunomoduladora, em sua forma ativa em um modelo murino de animais *hairless*, com inflamação induzida pela administração tópica de oxazolona ou na forma de lisado bacteriano em um modelo de cultura de órgão de pele humana com inflamação induzida pela substância P.

4.2. Objetivos específicos

- Reproduzir o modelo de indução da inflamação pela administração tópica de oxazolona em camundongos *hairless*, para testes do potencial probiótico de BL51A.
- Reproduzir o modelo de indução da inflamação pela administração tópica de substância P em um modelo de cultura de pele humana, para testes do potencial probiótico de BL51A.
- Verificar a existência de efeitos imunomoduladores de BL51A em sua forma ativa, sobre aspectos inflamatórios cutâneos, no modelo utilizando animais *hairless* e indução de inflamação pela administração tópica de oxazolona.

- Verificar a existência de efeitos imunomoduladores de BL51A sob a forma de lisado bacteriano, sobre aspectos inflamatórios cutâneos, no modelo de cultura de órgão e indução de inflamação pela administração tópica de substância P.

Para facilitar o entendimento das alterações na metodologia ao longo deste trabalho, a Metodologia, Resultados e Discussão de cada uma destas fases, serão divididos em quatro etapas, sendo elas:

1) **Etapa 1:** *Modelo de camundongos hairless*

Nesta etapa foi necessária a formação da colônia dos *camundongos hairless*. Realização de vários ensaios com o modelo de camundongos *hairless*, sendo a indução de inflamação pela administração tópica de oxazolona e tratamento com BL51A e LPST11 em forma ativa, via oral.

2) **Etapa 2:** *Modelo de cultura de pele da mama humana (substância P a 10 μ M)*

Quatro amostras de pele de mama, com administração tópica dos lisados de BL51A e LPST11, em 10 tratamentos distintos (preventivo e curativo), tratadas ou não com SP a 10 μ M.

3) **Etapa 3:** *Modelo de cultura de pele da mama humana (substância P a 40 μ M)*

Cinco amostras de pele de mama, com administração tópica dos lisados de BL51A e LPST11, em seis tratamentos, sendo a SP utilizada na concentração de 40 μ M.

4) **Etapa 4:** *Modelo de cultura de pele da pálpebra humana (substância P a 10 μ M)*

Cinco amostras de pele de pálpebra, com administração somente do lisado de BL51A, em quatro tratamentos, sendo a SP utilizada na concentração de 10 μ M.

5. ETAPA 1

5.1. Linhagens bacterianas

A espécie de bifidobactéria utilizada neste estudo foi isolada e identificada como *Bifidobacterium longum* 5^{1A} (BL51A) no Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos (LEFM) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), e já demonstrou sua capacidade probiótica como mencionando anteriormente no item 1.5. Este micro-organismo foi isolado de fezes de uma criança sadia de cinco anos de idade, da cidade de Salvador (Bahia, Brasil), e identificado por testes morfológicos, respiratórios e bioquímicos, seguido de *Polymerase Chain Reaction* Multiplex (PCR Multiplex), de acordo com Kwon e colaboradores (2005). A BL51A é criopreservada a -80°C em leite desnatado (Cat#232100, Difco, Sparks, EUA) e sua multiplicação foi realizada pela inoculação de 100 µL da cultura criopreservada em 5 mL de caldo De Man, Rogosa & Sharpe (caldo MRS, Difco) suplementado com cisteína (1 g/1000 mL), hemina e menadiona (100 µL/100 mL) com posterior incubação a 37°C, durante 24 horas, em câmara de anaerobiose (Forma Scientific Company, Marietta, EUA) contendo uma atmosfera de N₂ a 85%, H₂ a 10% e CO₂ a 5%. Após, foi realizado o inóculo de repique de 100 µL desta cultura em 5 mL de caldo MRS e nova incubação a 37°C, durante 24 horas, em condições anaeróbicas. Em seguida foi feito mais um repique, sob as mesmas condições e incubação por mais 24 horas.

A amostra de *Lactobacillus paracasei* CNCM I-2116 (LPST11), utilizada como controle positivo (Guéniche et al., 2010b; Phillipe et al., 2011) foi isolada do produto probiótico Innéov Duocap® comercialmente disponível no mercado. A cultura de LPST11 foi mantida em ultrafreezer (-80°C) em caldo MRS (Difco) contendo 20% de glicerol esterilizado e seu crescimento foi realizado pela inoculação de 50 µL da cultura em 5 mL de caldo MRS, por 24 horas, em condições aeróbicas.

5.2. Animais

Neste estudo, foram utilizados camundongos convencionais *hairless* (SKH1-E Mouse, Crl:SKH1-*Hr^{hr}*) de 21 a 23 dias de idade, machos, provenientes da colônia instalada no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, estabelecida por mim, a partir de três matrizes provenientes do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Maria Vitória Lopes Badra Bentley. O tempo de gestação dos camundongos foi de, aproximadamente, 21 dias.

Os animais foram mantidos em micro-isoladores modelo ALE.MIL.01.03 (Alesco, Monte Mor, SP) em *racks* ventiladas (Alesco) com filtro HEPA e pré-filtro (lavado 1 vez por mês e trocado 1 vez por ano), com temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) por ar-condicionado (um termômetro é mantido na sala para verificar a temperatura), com um ciclo diurno/noturno de 12 horas. As trocas de serragem foram feitas em módulo de troca (CLII A1, Alesco) e os inóculos de micro-organismos, quando realizados, foram feitos em capelas de fluxo laminar, equipadas com luz UV, que foram ligadas 15 minutos antes e 15 minutos após a manipulação, além do uso de etanol a 70% para desinfecção. Os animais foram mantidos no biotério nível de biossegurança 2 (NB2) do Departamento de Microbiologia do ICB/UFMG. Para os experimentos, os animais receberam *ad libitum* uma ração sólida autoclavável (Nuvilab Nuvital, Curitiba, PR) e água, esterilizadas por calor úmido.

A manutenção, assim como o uso dos animais nos experimentos, foi conduzida respeitando as normas da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório / Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA, 2013). A realização desta etapa do projeto de pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), sob o número de protocolo 100/2014, aprovado em 20/05/2014 (Anexos).

Os animais machos da colônia, mesmo quando eram da mesma família, não conviviam no mesmo micro-isolador, mostraram comportamento muito agressivo, conferindo mutilações e morte uns aos outros, dificultando, extremamente, sua manutenção, uma vez que, para os experimentos, eles precisavam ficar mantidos um a cada micro-isolador. Nos experimentos foram utilizados machos devido a uma menor influência hormonal nos animais deste sexo.

5.3. Ensaios piloto 1 e 2

No primeiro e segundo ensaios piloto, o objetivo foi testar o modelo proposto por Man e colaboradores (2008) e Hatano e colaboradores (2010), que induziram um fenótipo tipo dermatite atópica em camundongos *hairless*, com administração tópica de oxazolona. Nesta etapa, objetivou-se observar a indução do fenótipo, com anormalidades imunológicas, estruturais, funcionais e bioquímicas similares à dermatite atópica humana após sensibilizações subsequentes por meio da administração tópica de oxazolona.

Para conferir se houve a indução da dermatite, foi mensurada a TWEL, que, de acordo com os pesquisadores, tem seu valor aumentado após esta série de sensibilizações.

Para isso, foram utilizados camundongos *hairless* machos (n=10, em cada um dos experimentos), retirados da colônia formada no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Seguindo o modelo de sensibilização com administração tópica de oxazolona a 1%, adaptado de Hatano e colaboradores (2010), no primeiro dia do experimento, os animais (n=5) foram sensibilizados com uma aplicação tópica de 50 µL de oxazolona (4-Ethoxymethylene-2-phenyl-2-oxazolin-5-one, 862207-1G-A, Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) na concentração de 1% diluída em etanol em ambos os flancos, enquanto no outro grupo de animais controle (n=5) foi administrado somente o veículo (etanol), no mesmo volume, 50 µL, em ambos os flancos (Figura 3).

Após uma semana desta primeira sensibilização com 50 µL de oxazolona a 1%, os animais foram tratados topicamente com 60 µL de oxazolona a 0,1%, em ambos os flancos, duas vezes ao dia, em dias alternados, totalizando mais 10 sensibilizações, feitas ao longo de 20 dias.

A partir da 10^a sensibilização com oxazolona, quando o fenótipo tipo dermatite atópica foi estabelecido, segundo metodologia de Man e colaboradores (2008) e Hatano e colaboradores (2010), após 48 horas da última sensibilização, foi mensurada a TWEL, na unidade de g/h/m², com a utilização do equipamento Tewameter® TM300 (Courage + Khazaka Electronic GmbH, Cologne, Germany).

Segundo Corsini e Galli (2000), a reexposição ao mesmo antígeno resulta na elicitação de reação inflamatória após um atraso característico de 12 a 48 horas (fase de elicitação).

A medida da TWEL foi feita no aparelho Tewameter (Courage + Khazaka Eletronic GmbH), no Laboratório de Agentes Bioterapêuticos (LABio), na UFMG, em ambiente fechado, sem circulação de ar, com temperatura controlada com utilização de ar-condicionado, conforme recomenda o fabricante, conferindo o posicionamento correto da sonda em cada animal. Para tal, foram feitas 10 leituras sucessivas em cada um dos 10 animais utilizados no experimento (n=10). O Tewameter fornece uma medida a cada 30 segundos. As medidas fornecidas foram registradas e depois, foi tirada a média destas leituras sucessivas, a qual foi considerada para análises.

Após as leituras, os animais foram anestesiados e eutanasiados por deslocamento cervical (CETEA/UFMG). Nesta primeira etapa dos ensaios piloto, não foram coletadas amostras de sangue ou pele, uma vez que o objetivo inicial era somente verificar a indução da TWEL por meio da administração tópica da oxazolona nestes animais, o que foi verificado com os animais ainda vivos, 48 horas após a última sensibilização com a oxazolona.

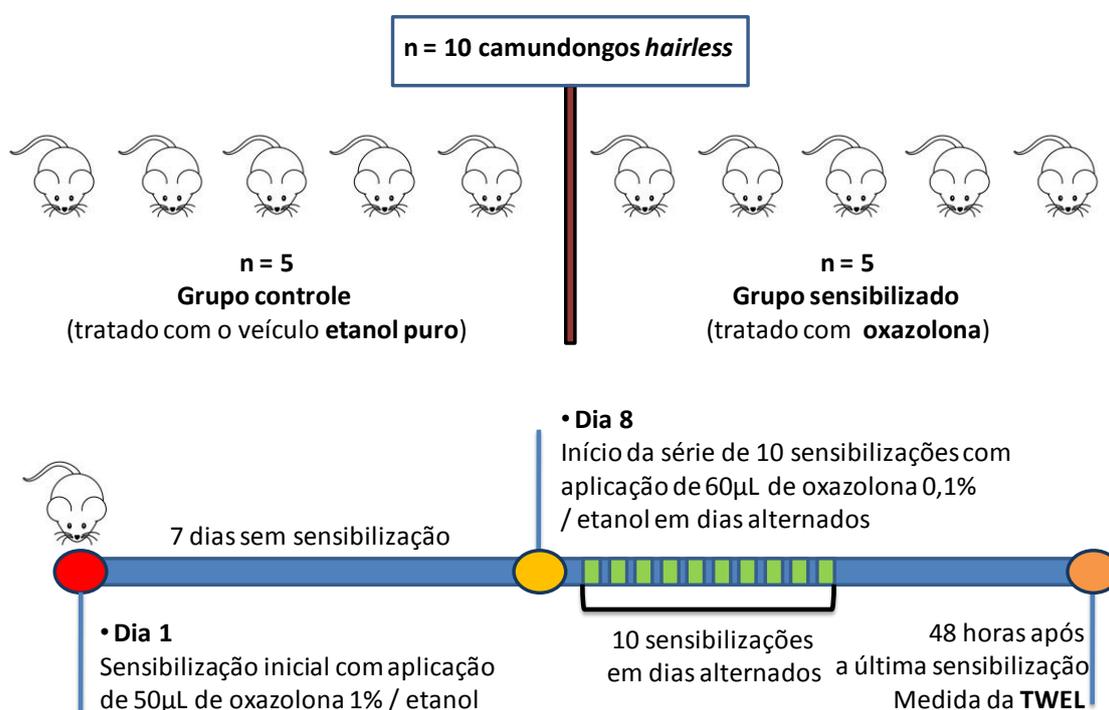


Figura 3 – Delineamento experimental geral do primeiro e segundo ensaio piloto do modelo murino. Foram utilizados 10 camundongos *hairless*, sendo 5 não sensibilizados pela oxazolona, sendo controle negativo de inflamação e 5 sensibilizados pela oxazolona, sendo controle positivo para inflamação. A primeira sensibilização foi feita com aplicação de 50 µL de oxazolona a 1% em ambos os flancos dos camundongos e depois de 7 dias, foi realizada uma sequência de sensibilizações com aplicação de 60 µL de

oxazolona a 0,1% em ambos os flancos dos camundongos, 2 vezes ao dia, em dias alternados. Nos animais do grupo controle, foi aplicado somente o veículo etanol, sem oxazolona. 48 horas após a última sensibilização foi medida a TWEL. n = número de camundongos. TWEL: perda de água transepidermica.

5.3.1. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão e analisados usando o teste T. Os gráficos e as análises estatísticas foram realizados no programa GraphPad Prism versão 7.02 para Windows (GraphPad Software, San Diego, E.U.A.) e consideradas significativas as diferenças que apresentaram $p \leq 0,05$.

5.3.2. Resultados dos ensaios piloto 1 e 2

Como resultado na análise de TWEL no primeiro e segundo ensaio piloto, realizados com 10 animais por ensaio, sendo cinco animais pertencentes ao grupo controle e cinco animais sensibilizados com aplicação tópica de oxazolona na concentração de 1% (na primeira sensibilização) e depois 0,1% (nas demais administrações tópicas sucessivas), foi constatado que não ocorreu um aumento na TWEL nos animais sensibilizados, quando comparados com os animais controle, após 48 horas da última sensibilização, conforme pode ser observado na Figura 4.

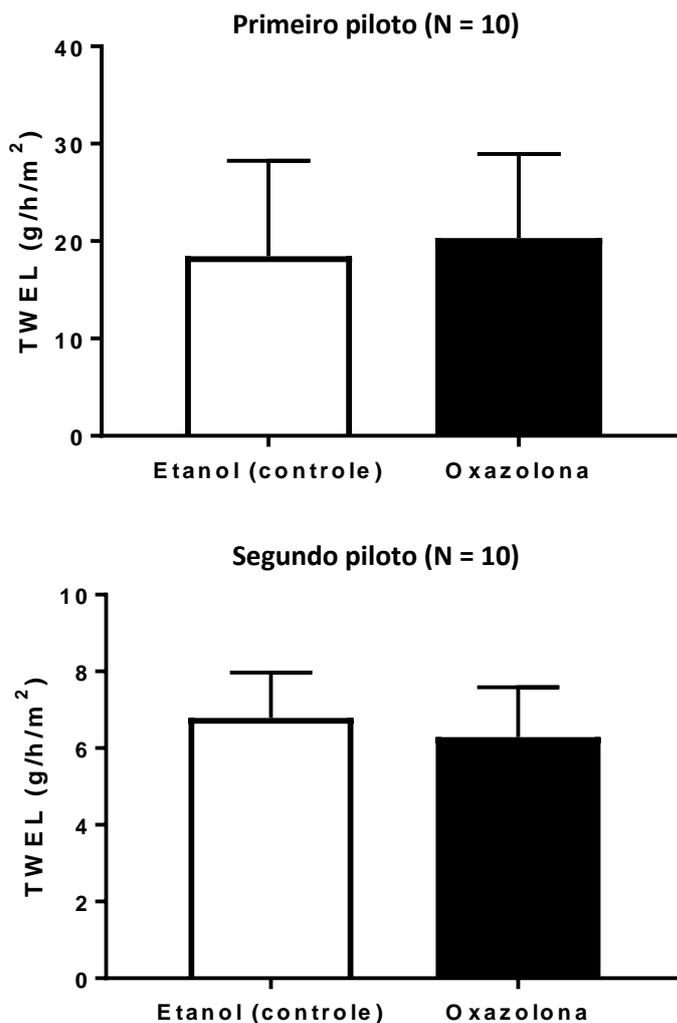


Figura 4 – Perda de água transepidérmica (TWEL) em animais sensibilizados com oxazolona, no piloto 1 (n=10) e no piloto 2 (n=10). O grupo controle foi tratado com etanol (veículo). Teste T com $p \leq 0,05$.

A TWEL observada nos animais do grupo controle (registrada entre 15 e 30 g/h/m²) foi semelhante aos valores de TWEL encontrados no grupo controle de camundongos *hairless* utilizado no estudo de Man e colaboradores (2007) e Hatano e colaboradores (2010).

No entanto, nos animais sensibilizados com oxazolona, não foi verificado um aumento significativo desta TWEL, ao contrário do observado nos animais sensibilizados com oxazolona por Hatano e colaboradores (2010), no qual foram observados valores de até 160 g/h/m² nos animais sensibilizados.

Segundo Man e colaboradores (2007), uma única sensibilização com oxazolona produz uma condição tipo dermatite atópica, porém aguda, eritematosa e edematosa por 6 a 12 horas, enquanto 9 a 10 sensibilizações com oxazolona ao longo de 22 a 25 dias

provocam uma dermatose persistente, crônica, com prurido moderado a severo. Os pesquisadores observaram, após a 10^a sensibilização, um aumento significativo na TWEL, que chegou a mais de 165 g/h/m² em camundongos *hairless*.

5.4. Ensaio piloto 3

Para o terceiro ensaio piloto, foram utilizados animais machos (n=28), obtidos da nossa colônia formada no ICB/UFMG.

A sensibilização dos camundongos foi feita da mesma maneira descrita no item 5.3, seguindo a metodologia de Hatano e colaboradores (2010).

A partir do 10^a sensibilização com oxazolona, quando o fenótipo tipo dermatite atópica foi estabelecido, com anormalidades imunológicas, estruturais, funcionais e bioquímicas similares à dermatite atópica humana, segundo metodologia de Man e colaboradores (2008) e Hatano e colaboradores (2010), foi iniciado o tratamento com as bactérias BL51A a LPST11, a 10⁸ UFC/mL, por meio de gavagem com seringa de 1 mL com administração de 100 µL por animal, sendo os animais controles gavados com 100 µL de salina tamponada (PBS), com os tratamentos descritos a seguir.

O grupo de 14 animais sensibilizados com a oxazolona foi dividido aleatoriamente, conforme a Figura 5:

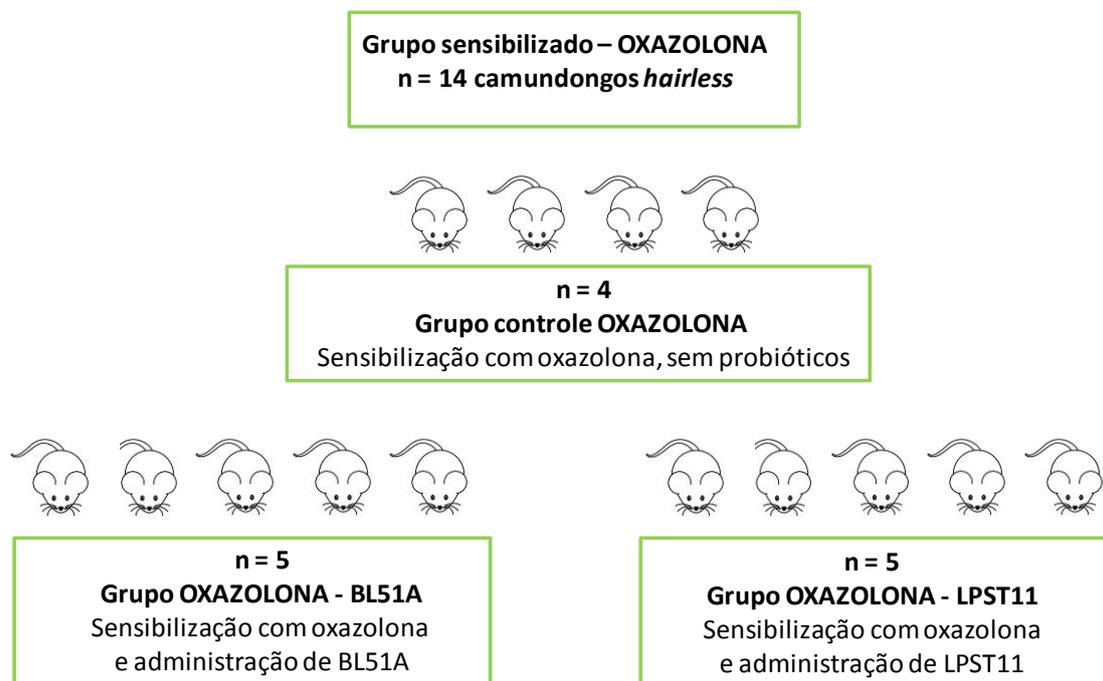


Figura 5 – Distribuição de camundongos no grupo que recebeu as sensibilizações com oxazolona. 14 camundongos foram sensibilizados, com aplicação de oxazolona diluída em etanol em ambos os flancos, sendo que 4 deles não receberam administração oral de BL51A e LPST11, 5 receberam administração oral de BL51A ativa, na concentração de 10^8 UFC por 30 dias a partir da 10^a sensibilização com oxazolona e 5 receberam administração oral de LPST11 ativo, na concentração de 10^8 UFC por 30 dias a partir da 10^a sensibilização com oxazolona (26^o dia de experimento). n = número de camundongos. BL51A: *Bifidobacterium longum* 5^{1A}. LPST11: *Lactobacillus paracasei* ST11.

O grupo de animais tratado com etanol (Et) puro, sendo o controle negativo para irritação, foi dividido aleatoriamente, conforme a Figura 6:

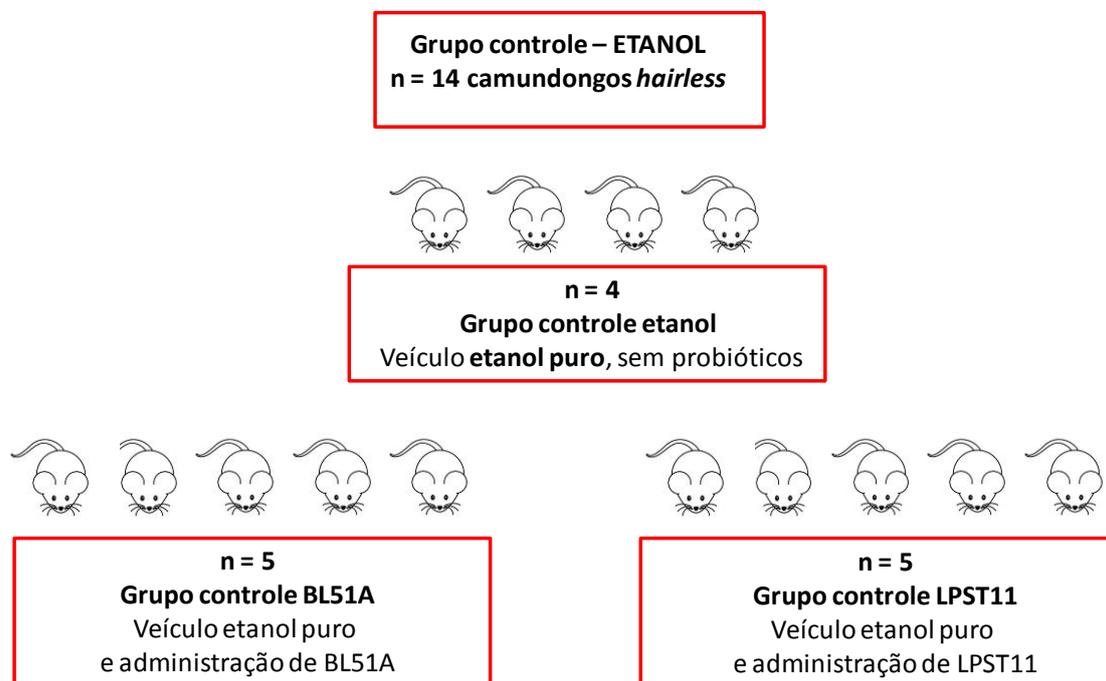


Figura 6 – Distribuição de camundongos no grupo controle negativo para inflamação, que não recebeu as sensibilizações com oxazolona. 14 camundongos receberam a aplicação de etanol puro em ambos os flancos, sem incorporação de oxazolona. Destes 14 camundongos, 4 não receberam administração oral de BL51A e LPST11, 5 camundongos receberam administração oral de BL51A ativa na concentração de 10^8 UFC por 30 dias a partir da 10^a aplicação de etanol e 5 receberam administração oral de LPST11 ativo na concentração de 10^8 UFC por 30 dias a partir da 10^a aplicação de etanol (26^o dia de experimento). n = número de camundongos. BL51A: *Bifidobacterium longum* 5^{1A}. LPST11: *Lactobacillus paracasei* ST11. O etanol foi o veículo utilizado para diluir a oxazolona.

O cronograma da administração tópica com etanol/oxazolona, a administração via oral de salina/BL51A ou LPST11 foi seguido conforme representado na Figura 7:

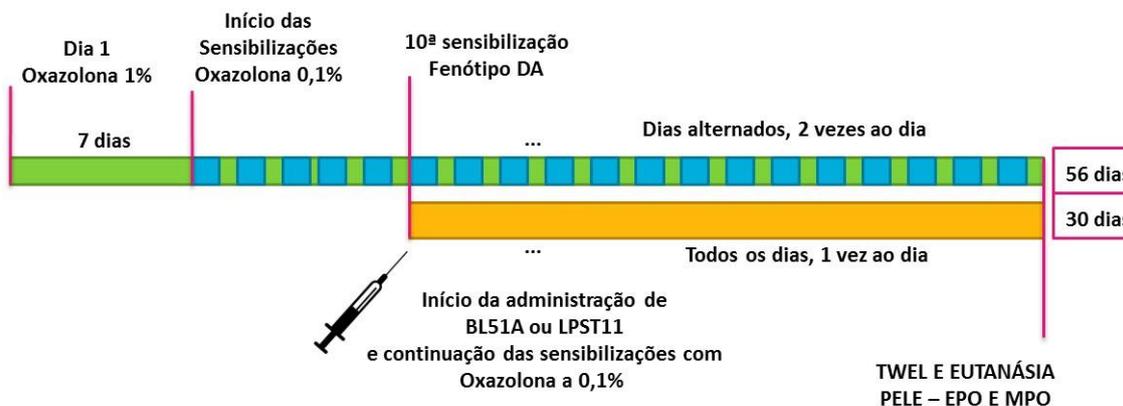


Figura 7 – Cronograma de administração das sensibilizações com oxazolona, administração dos probióticos BL (*Bifidobacterium longum* 5^{1A}) e LP (*Lactobacillus paracasei* ST11), momento de indução da DA (dermatite atópica) e momento da eutanásia e análises. A primeira sensibilização dos camundongos do grupo sensibilizado com oxazolona ($n = 14$) foi feita pela aplicação de 50 μ L de oxazolona a 1% em ambos os flancos. Após 7 dias, foi iniciada a série de sensibilizações pela aplicação de oxazolona a 0,1% em dias alternados, duas vezes ao dia. A partir da 10ª sensibilização, quando o fenótipo de dermatite atópica foi estabelecido, foi iniciado o tratamento dos animais que receberam BL51A ou LPST11 via oral, diariamente, por 30 dias. Neste período as sensibilizações com oxazolona a 0,1% em ambos os flancos dos camundongos em dias alternados continuou sendo feita. Nos animais não sensibilizados (controle negativo para inflamação) foi aplicado somente o etanol. 48 horas após a última sensibilização, foi mensurada a TWEL, os camundongos foram eutanasiados e amostras de pele da região sensibilizada com oxazolona foram retiradas para realização dos ensaios de atividade enzimática de EPO e MPO. EPO: peroxidase eosinofílica. MPO: mieloperoxidase. TWEL: perda de água transepidermica.

Vale ressaltar que, ao longo do experimento, os camundongos apresentaram eritema na região na qual foram sensibilizados (flancos). No entanto, esse sinal clínico foi inconstante ao longo dos dias, e ao final do experimento, o eritema foi observado.

A TWEL foi mensurada, na unidade de $g/h/m^2$, com a utilização do equipamento Tewameter após 48 horas da última sensibilização no LABio/UFMG, sob as mesmas condições relatadas no item 5.3.

Após a medição da TWEL, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical.

Amostras cutâneas dos flancos onde foram aplicados o etanol ou a oxazolona, foram coletadas com *punch* de 12 mm, de acordo com a metodologia de Sugimoto e colaboradores (2012), em cada um dos 28 animais, para as dosagens das enzimas peroxidase eosinofílica (EPO) e mieloperoxidase (MPO).

Vale ressaltar que as amostras cutâneas, para cada análise correspondente, foram coletadas nas mesmas regiões em cada animal, padronizando as condições de cada amostra, para que não ocorressem discrepâncias devido a coletas em regiões diferentes, em relação à microbiota e características próprias da pele, ou de sua coleta.

5.4.1. Atividade da peroxidase eosinofílica (EPO)

A atividade da enzima EPO, como medida da quantidade relativa de eosinófilos no tecido foi avaliada, como descrito por Strath e colaboradores (1985). A quantificação dos níveis de peroxidase de eosinófilos no tecido é utilizada como uma maneira indireta de estimar a eosinofilia tecidual.

Para cada 100 mg de tecido pesado, foram adicionados 1,9 mL de PBS 5X (pH 7.2). Em seguida o tecido foi homogeneizado e centrifugado a 10.000 rpm (10.621 x g) por 10 minutos e o sobrenadante desprezado. O *pellet* obtido foi submetido à lise hipotônica por adição de 500 µL de salina a 0,2%, seguido pela adição de 500 µL de salina a 1,6%, suplementada com glicose a 5%. Em seguida, o material foi novamente centrifugado a 10.621 x g por 10 minutos, e o sobrenadante novamente desprezado. O *pellet* foi ressuscitado em 1,9 mL de PBS (pH 7.4), contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB). Essa solução foi novamente homogeneizada e 1 mL do homogenato foi transferido para um microtubo de 1,5 mL, seguido de três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido. A amostra foi, então, centrifugada a 10.621 x g por 15 minutos a 4°C. Apenas o sobrenadante foi utilizado para quantificação da peroxidase. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, sendo que em cada poço 75 µL de amostra ou branco (PBS) foi incubada com 75 µL de substrato (1,5 mM de *o*-fenilenodiamina, OPD, em tampão Tris-HCl a 0,075 µM, pH 8, suplementado de H₂O₂ a 6,6 mM). A placa foi incubada no escuro, em temperatura ambiente, por aproximadamente 30 minutos e a reação interrompida pela adição de 50 µL de H₂SO₄ a 1M. A leitura foi realizada em leitor de microplacas, com densidade óptica (OD) de 450

nm (Spectromax M3, Molecular Devices Inc.). Os resultados foram expressos como unidades relativas.

5.4.2. Atividade da Mieloperoxidase (MPO)

A avaliação da atividade da enzima MPO é utilizada como índice de recrutamento de neutrófilos nos tecidos. Segundo Vieira e colaboradores (2015a), a enzima MPO está presente em uma atividade altamente específica no interior dos neutrófilos.

Para dosagem de MPO os fragmentos da pele dos animais foram removidos e congelados a -80°C . Após o descongelamento, o tecido (100 mg de tecido em 1,9 mL de tampão) foi homogeneizado em tampão com pH 4.7 (NaCl a 0,1 M; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$ a 0,02 M; $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ a 0,015 M), utilizando-se homogenizador de tecidos (Ultra-Turrax, IKA T10 basic), centrifugado a $10.621 \times g$ por 15 minutos. O *pellet* obtido foi submetido à lise hipotônica (500 μL de solução de NaCl 0,2% seguido de adição de igual volume de solução contendo NaCl a 1,6% e glicose a 5%, 30 segundos após) para lise de hemácias. Após nova centrifugação o *pellet* foi ressuspenso em tampão NaH_2PO_4 a 0,05 M (pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) a 0,5% e re-homogeneizado. Alíquotas de 1 mL da suspensão foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e submetidas a três ciclos de congelamento/descongelamento utilizando-se nitrogênio líquido. Essas amostras foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 10.000 rpm ($10.621 \times g$). O sobrenadante foi descartado e a atividade da mieloperoxidase no precipitado ressuspenso foi calculada pela medida das alterações na OD a 492 nm utilizando tetrametilbenzidine (TMB) a 1,6 mM e H_2O_2 a 0,5 mM. A leitura foi feita em leitor de microplacas (Spectromax M3, Molecular Devices Inc.) e os resultados foram expressos em unidades relativas.

5.4.3. Análises estatísticas

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão e analisados usando teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo pós-teste de Tukey. Os gráficos e as análises estatísticas foram realizados no programa GraphPad Prism versão 7.02 para

Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, E.U.A.) e consideradas significativas as diferenças que apresentaram $p \leq 0,05$.

5.4.4 Resultados do ensaio piloto 3

5.4.4.1. Perda de água transpidérmica (TWEL)

Como resultado na análise de TWEL no terceiro piloto realizado com 28 animais, sendo 14 animais pertencentes ao grupo controle (somente com administração tópica de etanol, sem oxazolona) e 14 animais sensibilizados com aplicação tópica de oxazolona, foi constatado que não ocorreu um aumento na TWEL nos animais sensibilizados com a oxazolona, quando comparados aos animais controle, conforme pode ser observado na Figura 8.

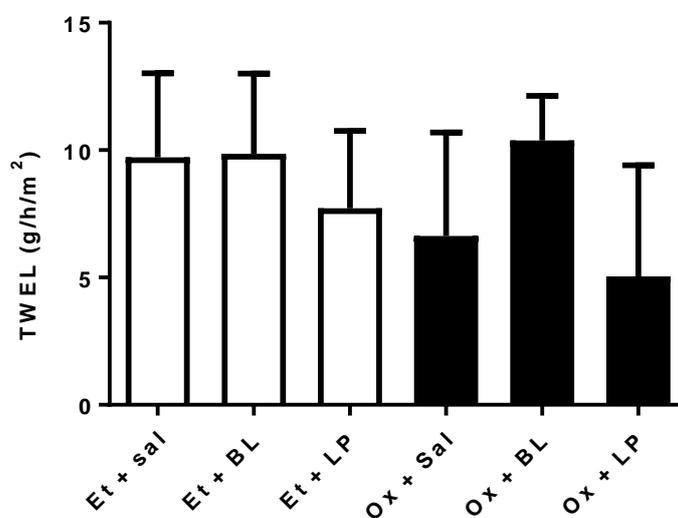


Figura 8 – Perda de água transepidermica (g/h/m²) nos animais controle tratados com o veículo (etanol) e nos animais sensibilizados com a oxazolona, no piloto 3 (n=28) como descrito no item 5.4. TWEL: perda de água transepidermica; Et + Sal: etanol + salina; Et + BL: etanol + BL51A; Et + LP: etanol + LPST11; Ox + Sal: oxazolona + salina; Ox + BL: oxazolona + BL51A; Ox + LP: oxazolona + LPST11. ANOVA com pós-teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Não ocorreu uma diferença estatística significativa na elevação na TWEL dos camundongos *hairless* sensibilizados com oxazolona, como verificado no estudo de

Hatano e colaboradores (2010), que utilizaram o mesmo modelo murino. Dessa forma, com base neste parâmetro de TWEL, não foi possível afirmar que ocorreu a indução de dermatite pela administração tópica pela oxazolona no nosso ensaio, e, dessa forma, não foi possível avaliar o potencial efeito probiótico de BL51A e LPST11 oferecido aos camundongos *hairless*.

Acreditamos que a TWEL, mensurada com o equipamento Tewameter, não foi o melhor parâmetro para avaliar a indução de inflamação. Man e colaboradores (2007) e Hatano e colaboradores (2010) utilizaram, além da TWEL, a medida de outros parâmetros para comprovar a inflamação tais como o aumento na expressão de IL-4, aumento sérico de IgE, diminuição do conteúdo lipídico do estrato córneo, aumento de serino-protease (Man et al., 2007) e aumento nos níveis séricos de IgE, TNF e IL-1 α (Hatano et al., 2010).

Caso tais parâmetros tivessem sido avaliados no presente estudo, eles poderiam nos dar uma informação completa sobre o que realmente ocorreu, uma vez que, ao longo do experimento foi observado eritema, o principal sintoma de inflamação. Medidas de TWEL intervaladas ao longo do ensaio também poderiam ter revelado dados importantes.

5.4.4.2. Resultados da atividade da EPO

Na mensuração da atividade da enzima EPO, utilizada como uma maneira indireta de estimar a eosinofilia tecidual, verificou-se diferença significativa entre os tratamentos ($p \leq 0,05$), no Anova, pelo pós-teste de Newman-Keuls, conforme registrado na Figura 9.

Diferença significativa foi observada entre o grupo dos camundongos *hairless* tratados com etanol (não sensibilizados) e salina (que não receberam probióticos), ou seja, o controle negativo de inflamação e o grupo dos camundongos sensibilizados com oxazolona e tratados com salina (que não receberam probióticos), ou seja, controle positivo de inflamação, demonstrando que, para o parâmetro EPO, ocorreu inflamação, representada pela eosinofilia tecidual, confirmando a eficácia da administração de oxazolona como um sensibilizador cutâneo irritante no modelo murino de camundongos *hairless*, como foi proposto por Hatano e colaboradores (2010).

Foi encontrada diferença significativa também entre o grupo de camundongos *hairless* tratados com etanol (não sensibilizados) e tratados com a bactéria BL51A (controle positivo de BL) e camundongos sensibilizados com oxazolona e tratados com salina (controle positivo de inflamação), demonstrando, mais uma vez, a indução de

eosinofilia tecidual provocada pela administração tópica de oxazolona, validando o modelo proposto por Hatano e colaboradores (2010).

Na análise dos dados dos camundongos sensibilizados com oxazolona e tratados com salina (que não receberam probióticos, ou seja, controle positivo para inflamação e dos camundongos sensibilizados com oxazolona e tratados com o probiótico BL51A também foi constatada diferença significativa, demonstrando uma ação protetora de BL51A administrada via oral aos animais que foram sensibilizados.

O probiótico BL51A foi capaz, no presente modelo, de diminuir a atividade da enzima EPO, um importante parâmetro inflamatório, na pele dos camundongos, sugerindo um efeito imunomodulador desta bactéria.

A bactéria LPST11 não exerceu efeitos protetores no presente modelo testado.

Dessa forma, observou-se que a administração tópica de oxazolona, em animais não tratados com probióticos induziu uma maior produção de eosinófilos na pele dos animais, demonstrando uma indução de resposta inflamatória, validando o modelo utilizado.

Ocorreu diferença estatística significativa entre o grupo tratado com o probiótico BL51A comparado ao grupo do controle positivo para inflamação. Dessa forma, na utilização do parâmetro de mensuração de eosinofilia tecidual, foi possível observar efeitos imunomoduladores de BL51A administrado em sua forma ativa, via oral aos animais *hairless*, que apresentaram maior eosinofilia tecidual provocada pela administração tópica de oxazolona do que os animais do grupo controle, não sensibilizados e apresentaram menor eosinofilia tecidual quando sensibilizados e tratados com este probiótico.

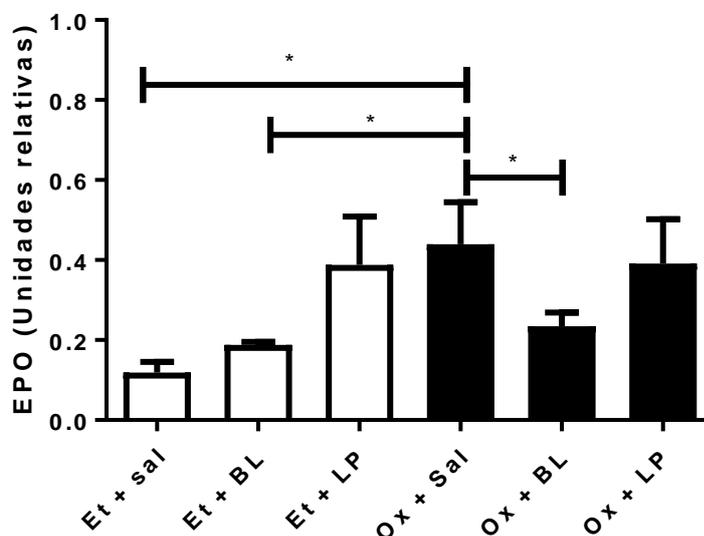


Figura 9 – Avaliação qualitativa da presença de eosinófilos, por meio da atividade da enzima específica EPO, expressa em unidades relativas, na pele dos animais sensibilizados com a oxazolona (n=14) e na pele dos animais tratados com o veículo etanol (n=14), como descrito no item 5.4.1. EPO: peroxidase eosiofílica; Et + Sal: etanol + salina; Et + BL: etanol + BL51A; Et + LP: etanol + LPST11; Ox + Sal: oxazolona + salina; Ox + BL: oxazolona + BL51A; Ox + LP: oxazolona + LPST11. ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls ($p \leq 0,05$).

Doenças alérgicas estão relacionadas com a resposta imune Th2, que são caracterizadas por altos níveis de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, citocinas que estimulam o recrutamento e ativação de diferentes células efetoras, como eosinófilos e mastócitos (Teixeira et al., 2005).

A atividade imunomoduladora de *B. breve* liofilizado, em um modelo murino de rinite alérgica, reduzindo a infiltração de eosinófilos na mucosa e submucosa nasal foi observada por Ren e colaboradores (2015).

Em nossa equipe, Souza e colaboradores (2016), em um modelo de doença inflamatória intestinal, verificaram um efeito protetor exercido pela bactéria *E. coli* Nissle 1917, com redução da atividade de EPO nos animais tratados oralmente com esta bactéria.

Várias funções são descritas à microbiota intestinal, como o metabolismo de carboidratos complexos para gerar ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs). Os carboidratos fibrosos (incluindo celulose, pectina, beta-glucanos, lignina) não são digeridos pelo trato gastrointestinal superior, uma vez que ele não possui capacidade

enzimática para degradá-los. No entanto, essas substâncias são fermentadas, seletivamente, por bactérias residentes em AGCCs, particularmente acetato, propionato, butirato e lactato no cólon (Vieira et al., 2013).

A maioria das bactérias do cólon são anaeróbias estritas, que adquirem energia a partir da fermentação devido à expressão de diversas enzimas e proteínas transportadoras (Vieira et al., 2013). Em avaliação de nossa equipe (LEFM/UFMG), comparando BL51A a outras bifidobactérias, inclusive bactérias probióticas comerciais, verificou-se que BL51A foi a maior produtora de acetato (Dados não publicados).

Os receptores GPR41 (Ffar1), GPR109A e GPR43 (Ffar2) foram identificados como os receptores para os AGCCs butirato, propionato e acetato. Enquanto a expressão de GPR41 ocorre no tecido adiposo e em um nível muito baixo nas células mononucleares do sangue periférico, a expressão de GPR43 é quase exclusiva ao sistema imune e é particularmente alta nas células polimorfonucleares - eosinófilos e neutrófilos – exercendo seu efeito anti-inflamatório (Vieira et al., 2013).

Devido à alta produção de acetato pela BL51A viva, administrada via oral aos camundongos *hairless*, acredita-se que o efeito imunomodulador exercido por este probiótico sobre a eosinofilia tecidual no foco da inflamação, pode ser, entre outros mecanismos, causado pela ligação do acetato aos receptores GPR43 presentes nos eosinófilos, diminuindo os níveis de EPO encontrados, que são uma avaliação indireta do infiltrado eosinofílico pela mensuração desta enzima presente nos grânulos dentro dos eosinófilos.

Vieira e colaboradores (2017) em um modelo murino de gota em camundongos, verificaram que a administração de acetato foi efetiva na resolução da inflamação, observando a resolução neutrofílica local, que foi associada a uma diminuição na atividade do fator nuclear- κ B (NF- κ B) e uma produção aumentada de mediadores anti-inflamatórios, incluindo IL-10. No presente trabalho, como veremos a seguir, o tratamento com BL51A, grande produtora de acetato, não foi capaz de influenciar os níveis da enzima MPO, no entanto, seu efeito imunomodulador ficou claro na mensuração dos níveis de EPO.

5.4.4.3. Resultados da atividade da MPO

Na mensuração da atividade da enzima MPO, como marcador de neutrófilos ativados, não ocorreu diferença estatística significativa entre nenhum dos tratamentos. Os animais sensibilizados com oxazolona não apresentaram uma atividade de MPO maior na pele do que os animais que não foram sensibilizados com a oxazolona, e receberam apenas o veículo, etanol, conforme registrado na Figura 10.

Elían e colaboradores (2015), Tiago e colaboradores (2015) e Souza e colaboradores (2016) verificaram aumento na atividade de MPO, em modelos de doença inflamatória intestinal, e uma diminuição na atividade desta enzima diante da administração de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* BB-02, *Saccharomyces cerevisiae* cepa UFMG A-905 e *E. coli* Nissle 1917, respectivamente.

Segundo Scheller e colaboradores (2011), o infiltrado inicial de neutrófilos é substituído por monócitos e células T após 24 a 48 horas, prevenindo dano tecidual excessivo pelo acúmulo de proteases e espécies reativas ao oxigênio (EROS) secretadas pelos neutrófilos no local de inflamação, devido ao acúmulo neutrofílico agudo. Essa alteração é promovida, principalmente, pela produção de IL-6. Dessa forma, como as amostras de pele analisadas foram coletadas após 48 horas da última sensibilização, o conteúdo neutrofílico no local já poderia ter sido dissipado, corroborando com as informações de Scheller e colaboradores (2011).

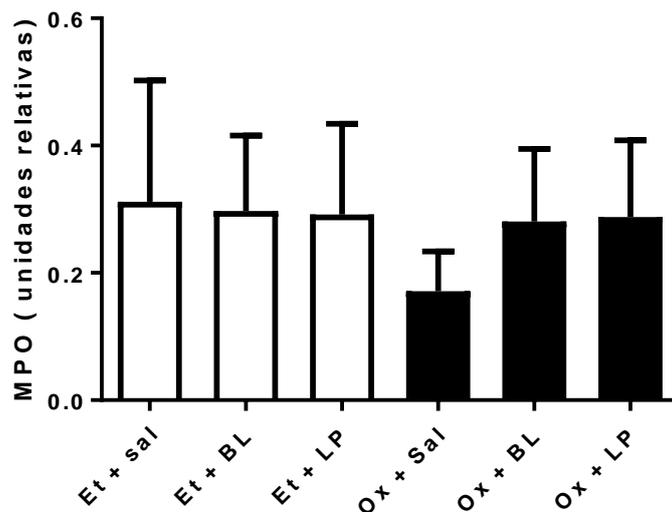


Figura 10 – Avaliação qualitativa da presença de neutrófilos, por meio da atividade da enzima específica MPO, expressa em unidades relativas nas peles dos animais tratados com o veículo (etanol) e dos animais sensibilizados com a oxazolona (n=28), como descrito no item 5.4.2. MPO: mieloperoxidase Et + Sal: etanol + salina; Et + BL: etanol + BL51A; Et + LP: etanol + LPST11; Ox + Sal: oxazolona + salina; Ox + BL: oxazolona + BL51A; Ox + LP: oxazolona + LPST11. ANOVA com pós-teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

6. ETAPA 2

6.1. Delineamento experimental da Etapa 2

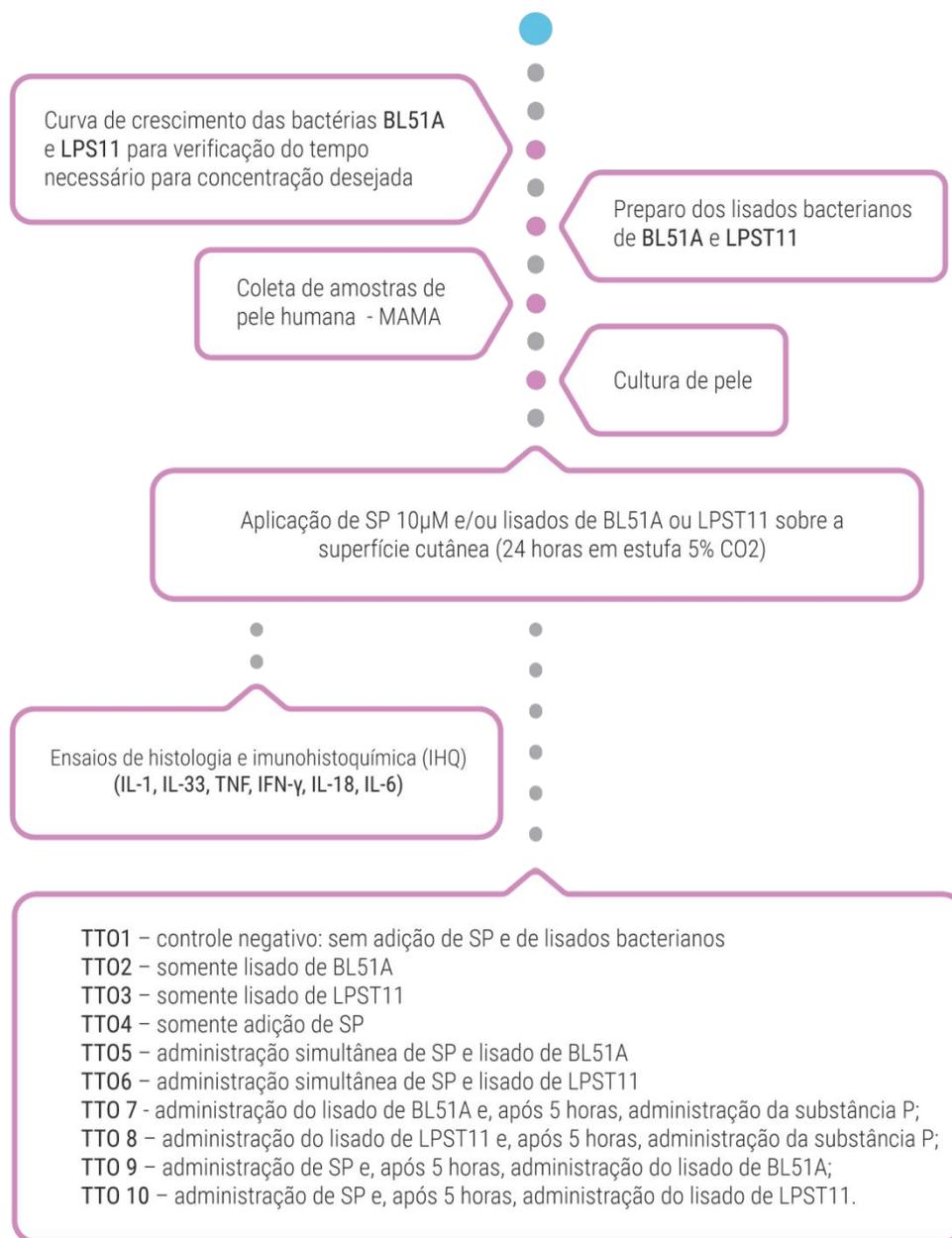


Figura 11 – Delineamento geral experimental da Etapa 2. Início dos testes *in vitro* utilizando cultura de pele humana (mama). TTO – tratamentos. BL51A – *Bifidobacterium longum* 5^{1A}. LPST11: *Lactobacillus paracasei* ST11. SP: substância P.

6.2. METODOLOGIA

6.2.1. Linhagens bacterianas

As espécies bacterianas utilizadas nesta etapa do estudo são as mesmas descritas no item 5.1, ou seja, *Bifidobacterium longum* 5^{1A} (BL51A) e *Lactobacillus paracasei* CNCM I-2116 (LPST11), como controle positivo (Guéniche et al., 2010b) isolado do produto probiótico Innéov Duocap® comercialmente disponível no mercado.

6.2.2. Lisados bacterianos

Para determinação da concentração desejada dos micro-organismos para confecção do lisado bacteriano (10^8 UFC/mL) para a realização dos experimentos, foi realizada uma curva de crescimento de ambas as bactérias.

Após ativação e dois repiques dos BL51A e LPST11, ambas foram inoculadas no caldo MRS suplementado com cisteína, hemina e menadiona e no caldo MRS sem suplementação para BL51A e LPST11, respectivamente. Foram inoculados 100 μ L de BL51A e 50 μ L de LPST11 a cada 5 mL dos caldos. A cultura de BL51A foi incubada a 37°C em condições anaeróbicas e a cultura de LPST11 em condições aeróbicas.

Nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 horas após inoculação, alíquotas de 100 μ L de cada cultura bacteriana foram transferidas, em triplicata, em uma placa de 96 poços para posterior determinação da densidade óptica a 600 nm no Multiskan Spectrum (Thermo Scientific).

Para a determinação do número de unidades formadoras de colônia, também foram coletadas alíquotas do mesmo tubo base, nos mesmos tempos mencionados acima. Tais alíquotas foram plaqueadas em placas contendo meio MRS (suplementado para BL51A), por meio da técnica de microgota (10 μ L por microgota), realizada em triplicata em três diluições, crescentes a cada tempo de medição. Para o tempo 0, foram plaqueadas as diluições -1, -2 e -3; para o tempo 2 horas, as diluições -2, -3 e -4; para o tempo 4 horas, as diluições -2, -3 e -4; para o tempo 6 horas, as diluições -3, -4 e -5; para o tempo 8 horas, -4, -5 e -6 e do tempo 10 horas em diante, as diluições -5, -6 e -7.

As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C em condições anaeróbicas para BL51A e aeróbicas para LPST11. Em seguida, foi realizada a contagem das UFCs.

Para o preparo dos lisados, foi seguida a metodologia de Sultana e colaboradores (2013) e Mohammedsaeed e colaboradores (2014), com algumas modificações. Culturas com aproximadamente 10^8 UFC/mL foram centrifugadas (Thermo Scientific) a 4000 rpm por 15 minutos, lavadas três vezes com 5 mL de PBS (pH 7.4) e, em seguida, ressuspensas em 1 mL do meio utilizado na cultura celular – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* com alta glicose (DMEM) (Cat#D7777-1L, Sigma-Aldrich), suplementado com antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Cat#15240-062, Gibco, Grand Island, EUA), fator de crescimento epidérmico EGF (10 ng/mL) (Cat#E9644, Sigma-Aldrich) e soro fetal bovino a 10% (Cat#12657-029, Gibco).

As amostras bacterianas foram lisadas utilizando-se sonicador (Vibra-Cell, Sonics, Newtown, EUA), aplicando-se cinco pulsos de um minuto cada, com intervalos de 30 segundos, amplitude de 40%. Os lisados foram filtrados em filtro 0,22 µm (Filtropur V100 0.2, cat#83.1824.001, Sarstedt, Newton, EUA) para remover quaisquer resíduos de bactérias inteiras. Alíquotas de 0,5 mL foram armazenadas em criotubos para estoque a -80°C.

6.2.3. Cultura de pele de mama

Este projeto foi aprovado pelo Conselho Nacional de Saúde (CONEP), com o número CAAE 44452015.3.0000.5149 (Anexos).

O modelo de cultura de pele humana empregado foi semelhante ao utilizado por Guéniche e colaboradores (2010a), Boisnic e colaboradores (1999), Boisnic e colaboradores (2001) e Boisnic e colaboradores (2003). Vale ressaltar que tais autores não relatam a região anatômica da qual foram retiradas as amostras de pele utilizadas nos seus estudos.

No presente estudo foi utilizada pele retirada de quatro mulheres submetidas a mamopexias no Hospital LT Diamond, situado em Belo Horizonte, Minas Gerais, com a colaboração do Dr. Leonardo Araújo. Todas as quatro pacientes assinaram termo de consentimento livre esclarecido (Anexos).

A região da mama foi selecionada pela pequena exposição ao sol, menor interferência da utilização de cremes, maquiagens, entre outros.

As amostras de pele de mama foram coletadas de forma asséptica e transferidas para tubos de polipropileno de 50 mL estéreis contendo DMEM com alta glicose

(Cat#D7777-1L, Sigma-Aldrich), transportadas e processadas imediatamente no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular (LICM) do Centro de Pesquisas René Rachou.

As amostras de pele foram lavadas três vezes em meio DMEM contendo 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. O excesso de gordura foi retirado com auxílio de bisturis e tesouras. Em seguida, cada amostra de pele foi cortada em 10 pedaços redondos de aproximadamente 1 cm² com o auxílio de tesouras de ponta fina. Os fragmentos de pele foram colocados em insertos para cultura de tecido (filtros de poro de tamanho 8 µm Cat#MCEP12H48, Millipore, Billerica, EUA) com o epitélio voltado para cima.

Os insertos contendo os fragmentos de pele foram colocados em placas de 12 poços (Cat#PIMWS1250, Millipore) contendo 500 µL de meio/poço, quantidade suficiente para alcançar o nível do filtro do inserto. O meio de cultura utilizado foi o DMEM alta glicose (Cat#D7777-1L, Sigma-Aldrich), suplementado com antibióticos nas concentrações finais de 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Cat#15240-062, Gibco), fator de crescimento epidérmico (10 ng/mL) (Cat#E9644, Sigma-Aldrich) e 10% de soro fetal bovino (Cat#12657-029, Invitrogen, América do Sul).

A coesão entre a pele e o inserto foi feita por meio da aplicação de um selo de vinil de polissiloxano (Kit Express XT Pasta Fluida, 3M), de forma que nem a retração da pele nem a passagem lateral de líquidos aplicado topicamente na pele fossem possíveis.

Para confirmar se a vedação perfeita foi obtida por meio do procedimento de aplicação do selo de vinil de polissiloxano ao redor da amostra de pele no interior do inserto, foi feito o teste de aplicação do cristal de violeta, no qual vedamos as amostras de pele em vários insertos e administramos 1 mL de cristal violeta sobre cada uma das amostras. O comportamento do líquido no interior do inserto foi monitorado por 24 horas, o mesmo tempo utilizado no experimento com os lisados bacterianos. Nesse período, não houve qualquer vazamento do líquido.

6.2.4. Tratamentos com BL51A e LPST11

Para a verificação da eficácia da BL51A em modelo de cultivo de pele inflamada ou não pela adição da SP foram utilizados os parâmetros descritos por Boisnic e colaboradores (2003) e Guéniche e colaboradores (2010a). Para tal, a SP (Cat#05-23-

0600; Calbiochem, China), foi adicionada diretamente ao meio de cultura (DMEM suplementado), na tentativa de reproduzir *ex vivo* os efeitos inflamatórios descritos *in vivo* em diversas afecções e acometimentos cutâneos. Dessa forma, a SP entrou em contato com o fragmento de pele colocado e vedado no inserto suspenso pela derme profunda, enquanto os lisados bacterianos foram aplicados sobre o epitélio (Figura 12).

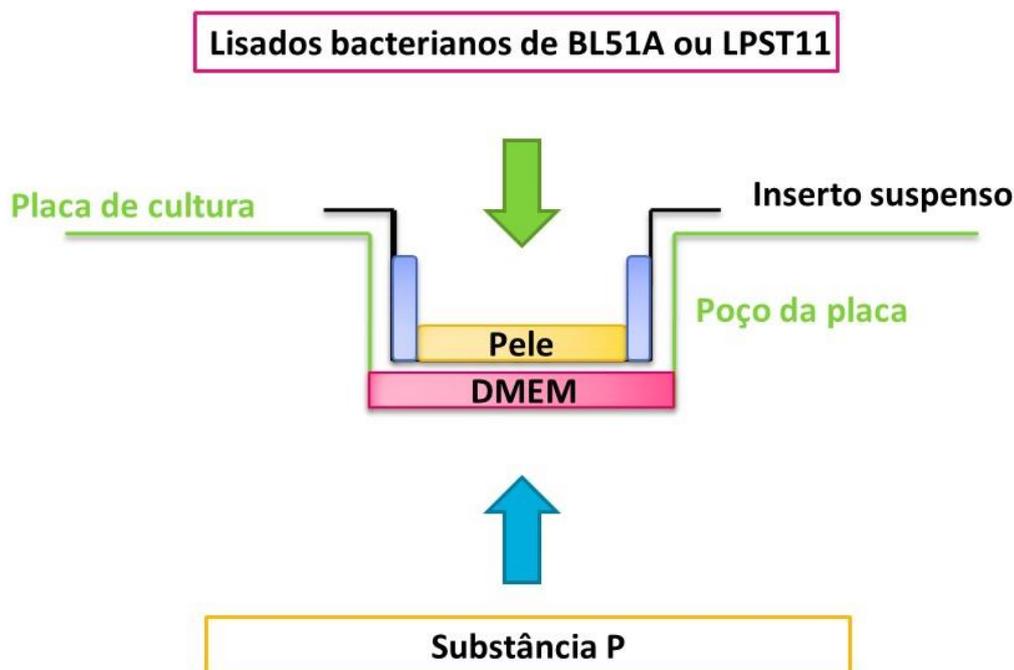


Figura 12 – Representação do modelo experimental. O meio de cultura DMEM foi colocado em cada poço da placa com administração de SP ou não, tendo contato com a pele pela derme profunda. Os lisados bacterianos de BL51A e LPST11 foram administrados topicamente, sobre a superfície epitelial do fragmento de pele. Para que não ocorresse a descida do lisado bacteriano até o DMEM, não houvesse subida de SP para a parte superior do epitélio e não ocorresse retração do fragmento de pele, foi feita a vedação com o selo de vinil de polissiloxano, representado na cor azul.

Antes de qualquer um dos tratamentos, todas as amostras de pele permaneceram em estufa 37°C, com 5% de CO₂ por cinco horas, como realizado por Guéniche e colaboradores (2010a).

Três estratégias foram utilizadas para investigar a atuação dos micro-organismos em diferentes circunstâncias: *(i)* efeito preventivo – na qual os lisados foram aplicados antes do estímulo pró-inflamatório; *(ii)* efeito curativo – na qual os lisados foram aplicados depois do estímulo pró-inflamatório e; *(iii)* aplicação da SP e dos lisados de forma simultânea, sendo esta última *(iii)* a estratégia utilizada por Boisnic e colaboradores (2003) e Guéniche e colaboradores (2010a).

As amostras de pele foram mantidas em cultura por 24 horas, em presença ou ausência de 10 μM de SP (adicionada ao meio de cultura) e a preparação de BL51A na concentração de 10^8 UFC/mL, no volume de 40 μL ou LPST11, na mesma concentração e mesmo volume, aplicada topicamente à pele (Figura 13).

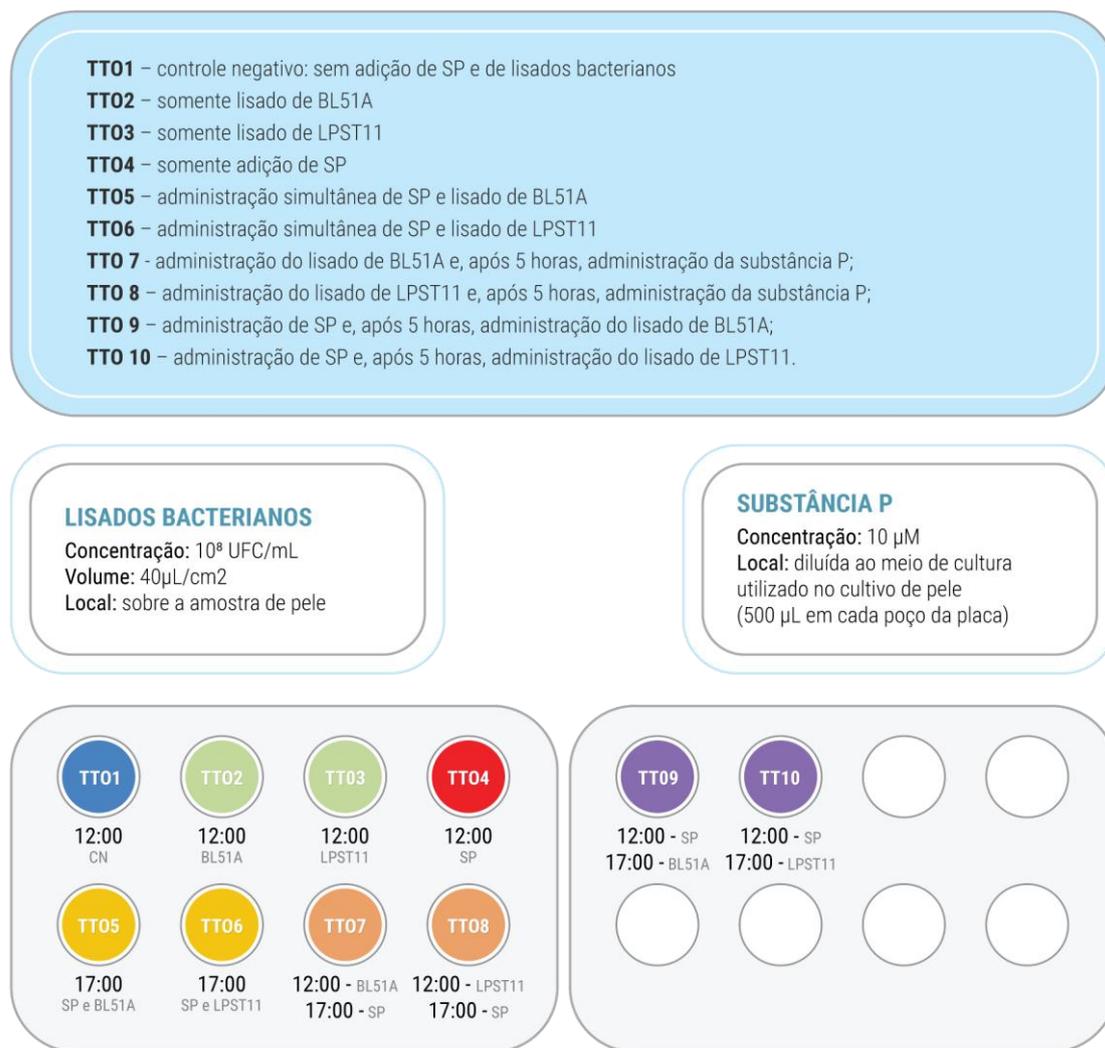


Figura 13 – Tratamentos administrados a cada amostra de pele de cada um dos quatro casos, concentração, volume e localização de administração dos lisados bacterianos de BL51A e LPST11 e de SP, desenho esquemático das placas contendo as amostras de pele com seus respectivos tratamentos. Os horários de 12:00 e 17:00 são os horários nos quais foi aplicada cada substância. BL51A: *Bifidobacterium longum* 5^{1A}. CN: controle negativo. LPST11: *Lactobacillus paracasei* ST11. SP: substância P. TTO: tratamento.

Após 24 horas, os fragmentos de pele foram retirados dos inserts, fixados em formaldeído a 3,7 % e transportados para o Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFMG para a realização dos experimentos de histologia e da

imunohistoquímica, sob supervisão do Prof. Dr. Marcelo Pascoal Xavier e da bióloga Fernanda Cesari.

6.2.5. Análise histológica da cultura de pele de mama

No Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina da UFMG, as amostras de pele foram retiradas do formaldeído a 3,7%, e embebidas em parafina. Cortes de 5 µm de espessura foram feitos em micrótomo (RM2125RT, Leica Biosystems). Após montagem das lâminas, foi feita a coloração de hematoxilina eosina (HE).

As lâminas com cortes histológicos foram codificadas. Os cortes foram examinados em microscópio óptico (BX, Olympus) pelo Dr. Marcelo Pascoal e por mim em exames cegos. Os seguintes parâmetros foram avaliados: *(i)* a epiderme e a derme foram observadas quanto à sua estrutura e foi realizada a estimativa do número de células inflamatórias presentes nas regiões perivascular superficial e perivascular profunda; *(ii)* foi realizada a contagem do número total de vasos por corte, e posteriormente, a contagem do número de células inflamatórias ao redor do vaso de maior celularidade; *(iii)* foi analisada a razão entre a quantidade de células inflamatórias da derme superficial e derme profunda.

6.2.6. Análise imunohistoquímica da cultura de pele de mama

Para realização dos ensaios imunohistoquímicos para a investigação da expressão das citocinas IL-1β, IL-6, IL-18, IL-33, TNF-α e IFN-γ foi utilizado o kit *Novo Link Max Polymer Detection* (Cat#RE7140-K, Novocastra, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). As lâminas silanizadas contendo os cortes seriados de 5 µm das amostras parafinadas foram incubadas em estufa a 56°C por 18 horas. Posteriormente, as amostras foram submetidas a etapas de desparafinização e re-hidratação, com lavagens com xilol, por 20 minutos e com álcool etílico (PA), por cinco minutos. Após a re-hidratação, foi realizada a recuperação antigênica, processo necessário para induzir a exposição dos antígenos, no qual as lâminas foram aquecidas em solução de citrato de sódio a 0,01 M (pH 6,0) a 90°C por 20 minutos no vapor e resfriadas em temperatura ambiente por 20 minutos.

A peroxidase endógena dos tecidos e as proteínas inespecíficas foram bloqueadas nas diferentes etapas utilizando-se as soluções específicas fornecidas pelo kit Novo Link. A coloração para imunohistoquímica foi feita separadamente com os seguintes anticorpos primários: anti-IL-1 β (Cat#SC-130323, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EUA); anti-IL-18 (Cat#SC-7954, Santa Cruz Biotechnology), anti-IFN- γ (Cat#Ab9657, Abcam, Cambridge, Reino Unido), anti-IL-33 (Cat#Ab54385, Abcam), anti-IL-6 (Cat#Ab9324, Abcam) e anti-TNF- α (Cat# 9579, Abcam).

Vários testes foram realizados para verificação da concentração ideal dos anticorpos primários, incluindo diluições de anticorpos que variaram de 1:50 até 1:300 em diluente fornecido pelo kit Novo Link. A diluição 1:200 foi definida para todos os anticorpos primários utilizados neste estudo, exceto para o anti-TNF- α , para o qual foi empregada a diluição de 1:100.

Assim, após a adição de 50 μ L das respectivas diluições dos anticorpos primários às lâminas, estas foram incubadas, em câmara úmida, por 1 hora, em temperatura ambiente. Em seguida, foi feito o bloqueio por 30 minutos, utilizando-se a solução de bloqueio pós-primário específica do kit Novo Link. Os cortes foram incubados com o sistema universal de detecção por polímeros do kit Novo Link por 30 minutos em temperatura ambiente seguido da adição de 200 μ L da solução reveladora fornecida pelo kit contendo o cromógeno diamino-benzidina 3,3 (DAB) e a reação incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. A contra coloração foi realizada mergulhando-se as lâminas em solução de hematoxilina (Cód. 248, Vetec, Saint Louis, EUA) por 30 segundos. As lâminas foram lavadas em água corrente por dois minutos e, em seguida, lavadas três vezes em álcool etílico e duas vezes em xilol antes da montagem com as lamínulas.

As lâminas foram analisadas utilizando-se o microscópio óptico Olympus BX, conforme os parâmetros do estudo descritos no item 6.2.6.1.

6.2.6.1. Parâmetros imunohistoquímicos

Para análise de marcação imunohistoquímica dos cortes histológicos das amostras de pele submetidos aos diversos tratamentos foram adotados parâmetros e *scores* (discriminados entre parênteses) abaixo discriminados.

1) Epitélio:

- (a) presença ou ausência de reação:** (0) negativa; (1) positiva.
- (b) intensidade de reação:** (0) negativa; (1) fraca; (2) moderada; (3) forte.
- (c) topografia da reação:** (0) negativa; (1) somente terço basal; (2) em dois terços e (3) em todo o epitélio.
- (d) percentual de células reativas:** (0) de 0 a 25% do total de células; (1) de 26 a 50%; (2) de 51 a 75%; (3) mais que 75% das células.
- (e) localização da reação:** (0) ausente; (1) somente no citoplasma; (2) somente no núcleo; (3) no citoplasma e núcleo.

2) Infiltrado inflamatório presente na derme superficial e profunda:

- (a) presença ou ausência de reação:** (0) negativa; (1) positiva.
- (b) intensidade de reação:** (0) negativa; (1) fraca; (2) moderada e (3) forte.
- (c) quantidade de células reativas:** (0) de 0 a 25%; (1) de 26 a 50%; (2) de 51 a 75% e (3) mais que 75%.
- (d) percentual de células reativas:** (0) de 0 a 25%; (1) de 26 a 50%; (2) de 51 a 75% e (3) mais que 75%.
- (e) tipo celular prevalente:** (0) ausente; (1) mononuclear; (2) polimorfonuclear; (3) – misto.
- (f) topografia do infiltrado:** (0) ausente; (1) perivascular superficial; (2) perivascular profundo; (3) perianexial; (4) perineural; (5) difuso.
- (g) localização da reação:** (0) ausente; (1) somente no citoplasma; (2) somente no núcleo; (3) citoplasma e núcleo.

3) Endotélio

- (a) presença ou ausência de reação:** (0) negativa; (1) positiva.
- (b) intensidade de reação:** (0) negativa; (1) fraca; (2) moderada e (3) forte.
- (c) percentual de células reativas:** (0) de 0 a 25%; (1) de 26 a 50%; (2) de 51 a 75% e (3) mais que 75%.

(d) topografia de endotélio positivo: (0) ausente; (1) derme superficial; (2) derme profunda; (3) derme superficial e profunda.

(e) localização da reação: (0) ausente; (1) somente no citoplasma; (2) somente no núcleo; (3) citoplasma e núcleo.

6.3. Análise estatística

Para a imunohistoquímica, foi utilizada a estatística descritiva para análise dos dados. Foram avaliadas: (1) *distribuição do infiltrado* - a presença ou ausência de reação nas áreas epiteliais, na derme superficial e derme profunda (infiltrado inflamatório) e na região endotelial, para cada citocina; (2) *intensidade da reação* - para cada citocina, em cada um destes compartimentos. Os dados foram plotados em gráficos *boxplot* no programa MiniTab7 para representação e análise dos resultados obtidos. As lâminas nas quais a leitura não foi possível devido à montagem mal realizada ou coloração ineficaz foram agrupadas na coluna com o símbolo *.

Os resultados da contagem de células inflamatórias também foram analisados no programa MiniTab7, empregando-se o teste ANOVA, com pós-teste de Tukey.

6.4. Resultados e Discussão da Etapa 2

6.4.1. Curva de crescimento das bactérias BL51A e LPST11

As curvas de crescimento das bactérias BL51A e LPST11 foram determinadas para verificar o tempo de incubação necessário e a densidade óptica correspondente ao número de UFCs desejadas (10^8 UFC/mL) para a confecção dos lisados bacterianos.

Após o período de 24 horas de incubação a 37°C, em condições anaeróbicas para BL51A e condições aeróbicas para LPST11, foi realizada a contagem de colônias bacterianas nas placas. A contagem de cada placa foi registrada para que depois pudesse ser comparada às DOs obtidas por análise fotométrica com comprimento de onda de 600 nm mensuradas nos tempos correspondentes.

A concentração de 10^8 UFC/mL foi obtida com 12 horas de incubação para a BL51A, com DO_{600nm} média correspondente de 0,2245 obtida, como demonstrado na Tabela 1.

Comparando-se os resultados obtidos por meio do emprego da técnica de um único tubo e tubos múltiplos, verificou-se que não houve diferença entre os valores obtidos, o que nos remete à consideração da grande capacidade de aerotolerância de BL51A nas consecutivas retiradas do tubo único da câmara de anaerobiose, como relatado por Souza e colaboradores (2013), que verificaram que BL51A tem aerotolerância por 72 horas.

Tabela 1 – Curva de crescimento de *Bifidobacterium longum* 5^{1A} (BL51A)

<i>Tempo (h)</i>	<i>Plaqueamento UFC (log/mL)</i>		<i>Densidade óptica (600 nm)</i>	
	<i>Único tubo</i>	<i>Múltiplos tubos</i>	<i>Único tubo</i>	<i>Múltiplos tubos</i>
0	-	-	0,0775	0,076
2	6,45	6,02	0,0775	0,075
4	6,6	6,69	0,0745	0,079
6	6,92	7,41	0,084	0,1085
8	6,67	7,22	0,1035	0,155
10	-	-	0,1435	0,2925
12	8,19	8,34	0,2245	0,2295
14	8,61	-	0,3665	0,3665
16	8,47	8,44	0,453	0,305
18	8,54	8,63	0,542	0,632
20	8,43	8,58	0,6305	0,5455
22	-	8,43	0,631	0,8365
24	-	8,7	0,723	0,806

(-) não houve crescimento de colônias na placa após 24 horas de incubação.

Valores obtidos nos tempos 0 a 24 horas pós-inoculação e valores da densidade óptica nos tempos correspondentes.

A concentração de 10^8 UFC/mL foi obtida após 8 horas de incubação para LPST11, com DO_{600nm} média correspondente de 0,553 neste tempo, como demonstrado na Tabela 2.

Para LPST11, também não houve diferença entre valores das técnicas de tubo único e múltiplos tubos, o que já era esperado, considerando que LPST11 é um micro-organismo fermentador, e não depende do oxigênio para obter energia.

Tabela 2 – Curva de crescimento de *Lactobacillus paracasei* ST11 (LPST11)

<i>Tempo (h)</i>	<i>Plaqueamento UFC (log/mL)</i>		<i>Densidade óptica (600 nm)</i>	
	<i>Único tubo</i>	<i>Múltiplos tubos</i>	<i>Único tubo</i>	<i>Múltiplos tubos</i>
0	6,83	6,81	0,0665	0,068
2	6,88	6,95	0,1005	0,09
4	7,28	7,53	0,129	0,1505
6	7,77	7,83	0,269	0,3335
8	8,32	8,48	0,533	0,553
10	8,66	8,68	0,8695	0,7815
12	8,79	8,67	1,057	0,9685
14	8,83	8,58	1,1325	1,04

Valores de UFC (unidade formadora de colônia) obtidos nos tempos 0 a 14 horas pós-inoculação e de densidade óptica a 600 nm nos momentos correspondentes.

Estes resultados foram utilizados para a confecção dos lisados bacterianos, na qual foi realizada a incubação dos micro-organismos nos tempos determinados (12 horas para BL51A e oito horas para LPST11). Nesses momentos, foi realizada a conferência das densidades ópticas correspondentes, confirmando a concentração do lisado bacteriano utilizado nos experimentos.

6.4.2. Análise histológica das culturas de pele de mama

A análise histológica foi realizada para a verificação da estrutura da epiderme e derme da pele de mama cultivada submetida aos diferentes tratamentos utilizados. Além disso, a partir da coloração de HE, foi possível realizar a estimativa do número de células inflamatórias perivasculares presentes na derme superficial (DS) e derme profunda (DP). Para isso, foram contados os números de vasos de cada corte correspondente ao seu caso (quatro casos) e foi feita a contagem das células ao redor do vaso de maior celularidade.

Para as lâminas de HE foi realizada a análise estatística descritiva e ANOVA com pós-teste de Tukey para a estimativa do número de células inflamatórias presentes na derme superficial e derme profunda, feitas no programa MiniTab7. A partir dessa contagem, observou-se uma diferença estatística significativa somente na derme profunda entre controle negativo (1) e a administração de SP e BL51A simultânea (5), como representado na Figura 14.

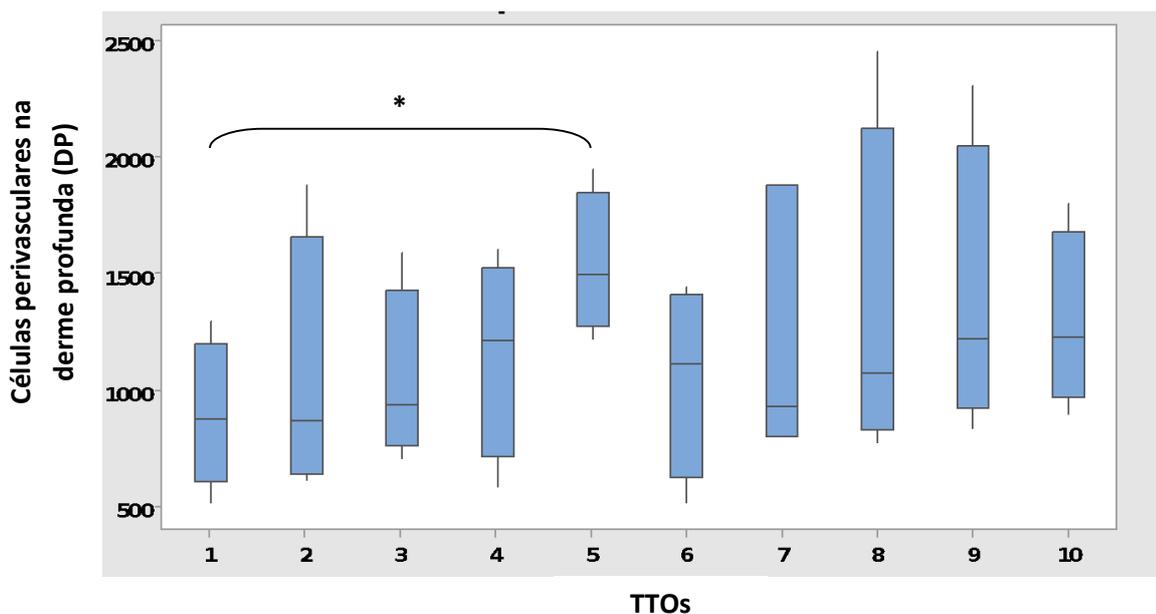


Figura 14 – Análise descritiva dos dados de contagem de células perivasculares na derme profunda (DP). As contagens de CI foram realizadas por estimativas, multiplicando-se o maior número de células encontrado em um vaso sanguíneo pelo número de vasos presentes nos cortes da derme profunda, corada com HE. Os cultivos de pele foram submetidos aos seguintes tratamentos (TTO):

TTO 1 – controle negativo: sem adição de SP e de lisados bacterianos;

TTO 2 – somente lisado de BL51A;

TTO 3 – somente lisado de LPST11;

TTO 4 – somente adição de SP;

TTO 5 – administração simultânea de SP e lisado de BL51A;

TTO 6 – administração simultânea de SP e lisado de LPST11;

TTO 7 - administração do lisado de BL51A e, após 5 horas, administração da substância P;

TTO 8 – administração do lisado de LPST11 e, após 5 horas, administração da substância P;

TTO 9 – administração de SP e, após 5 horas, administração do lisado de BL51A;

TTO 10 – administração de SP e, após 5 horas, administração do lisado de LPST11.

* Simboliza diferença estatística significativa entre os tratamentos, no caso TTO1 e TTO 5. Teste ANOVA, com pós-teste Tukey ($p \leq 0,05$).

Era esperada uma diferença significativa no número de células extravasadas entre o tratamento controle negativo (TTO1) e o tratamento controle de SP (TTO4). Entretanto, para os tratamentos 1 e 4, verificou-se que a mediana teve um aumento no tratamento 4, comparada à mediana do tratamento 1, no entanto, tal diferença não foi significativa. O aumento do número de células perivasculares foi maior, e significativo, entre o tratamento 1 e 5, o que nos leva a acreditar que o lisado de BL51A exerceu algum efeito para contribuir com este aumento no número de células extravasadas.

No presente estudo, o predomínio do tipo celular encontrado tanto na derme superficial quanto na derme profunda foi de mononucleares, principalmente linfócitos. Guéniche e colaboradores (2010a) apresentaram somente os dados de resultados acerca da *avaliação do extravasamento de mastócitos*, e não apresentaram em seus resultados “o número de células do infiltrado inflamatório principalmente consistido de linfócitos, histiócitos ou mastócitos”, como apresentado na metodologia proposta pelos pesquisadores (Material e Métodos, Parte I do artigo citado).

Guéniche e colaboradores (2010a) observaram um aumento no extravasamento de mastócitos diante da administração de SP e uma diminuição de extravasamento de mastócitos a partir da administração do lisado de *B. longum*. No entanto, para essa avaliação de mastócitos, os pesquisadores realizaram uma análise qualitativa do número de células, em quatro campos, classificando a quantidade de células presentes em: 0 – ausente, 1 – células ocasionais, 2 – infiltrado moderado, 3 – infiltrado presente, 4 – infiltrado significativo e valores intermediários, que não foram descritos no artigo, foram atribuídos às amostras nas quais a reação inflamatória não foi homogênea entre as diferentes regiões analisadas. Os pesquisadores representaram estes resultados como um número médio e erro padrão para a média, a partir desta avaliação de caráter qualitativo.

No presente trabalho, não foi utilizada a coloração de azul de toluidina para avaliação de mastócitos, sendo realizada a coloração de HE para contagem do número de células do infiltrado inflamatório, predominantemente de linfócitos. Foi adotada a avaliação semi-quantitativa, realizando a contagem do número de vasos e do número de células ao redor do vaso de maior celularidade, fornecendo informação mais fidedigna do que ocorreu no tecido.

Na derme superficial, não houve diferença estatística significativa entre o número de células inflamatórias nos diferentes tratamentos analisados. Verificou-se que houve uma tendência a ter diferença significativa pelo desenho dos dados, o que precisaria de posterior confirmação em outras amostras a serem coletadas.

Os dados obtidos mostram que houve uma resposta inflamatória na pele cultivada mediante a aplicação dos lisados bacterianos, o que nos levou ao questionamento do motivo deste aumento da função dessas células presentes ao redor dos vasos, e se seriam células com função inflamatória ou anti-inflamatória.

No entanto, verificou-se que não houve um estímulo inflamatório robusto pela SP na pele cultivada, como afirmado por Guéniche e colaboradores (2010a), de acordo com os parâmetros e condições testadas no presente estudo, de avaliação semi-quantitativa das células perivasculares da derme da pele de mama, com sensibilização pela SP na concentração de 10 μ M.

Guéniche e colaboradores (2010a) não relatam a região anatômica da qual foram retiradas as amostras de pele. No presente trabalho, foram utilizadas amostras de pele de mama de pacientes submetidas à mamopexia. Essa região foi escolhida para coleta por ser uma área pouco exposta ao sol e menos suscetível a alterações pela utilização de cremes, perfumes, produtos cosméticos que poderiam interferir em nossas avaliações. Além disso, o tamanho das amostras retiradas permitia que pudéssemos realizar os 10 tratamentos propostos nesta etapa, avaliando a atividade de ambos os micro-organismos, com as diferentes estratégias utilizadas (como descrito no item 6.2.4).

Portanto, a partir desses resultados, foram ponderados quais pontos poderiam ter prejudicado a replicação dos experimentos realizados pela equipe de Guéniche e colaboradores (2010a): (i) uma região anatômica diferente poderia ter sido utilizada pelos pesquisadores, o que alteraria a resposta inflamatória, de acordo com a espessura e estrutura da pele da região; (ii) a concentração de SP a 10 μ M foi insuficiente para promover a inflamação, sendo a pele de mama mais espessa do que a utilizada pelos pesquisadores; (iii) o tempo de sensibilização com SP na concentração de 10 μ M de 24 horas foi insuficiente.

Assim, como descrito na Etapa 3 (item 7.2.4 deste manuscrito) a concentração ideal de substância P seria determinada em experimentos de dose-resposta e ajustada de acordo com a espessura das amostras de pele de mama utilizadas. O tempo de exposição

do tecido à SP também poderia ter sido insuficiente, portanto, foi feita uma cinética, acompanhando a resposta inflamatória em função do tempo.

6.4.3. Análise imunohistoquímica das culturas de pele de mama

A análise imunohistoquímica foi realizada com intuito de avaliação *in situ* da função cutânea, a partir da quantificação da expressão das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-18, IL-33, IFN- γ e TNF- α .

Foram avaliados 17 parâmetros em cada corte, de cada uma das quatro pacientes, para todos os anticorpos como descrito no item 6.2.6.1 da Metodologia. Com seis anticorpos analisados em cada um dos 10 tratamentos, dos quatro casos, foram feitas 240 lâminas de imunohistoquímica e 40 lâminas com coloração HE. Todos esses parâmetros citados acima foram avaliados e registrados em tabelas com *scores*.

A primeira leitura das lâminas de imunohistoquímica e das lâminas de HE foi realizada por mim e a segunda leitura foi realizada com acompanhamento do Dr. Marcelo Pascoal. Todos os dados foram digitados em tabelas no programa Microsoft Excel.

Na presente etapa, foram analisados estatisticamente os dados de presença e ausência de reações epiteliais, com suas respectivas intensidades de reação, que foram agrupadas em **0 – as de classificação ausente e fraca** (*scores* 0 e 1) e em **1 – as de classificação moderada e acentuada** (*scores* 2 e 3). As células inflamatórias perianexiais não foram contadas.

Na análise imunohistoquímica para IL-1 β , foi verificado que, na camada epitelial, houve uma resposta inflamatória discreta diante da aplicação da SP (TTO4), como pode ser observado na Figura 15, na qual 75% das amostras testadas (número absoluto de 3 amostras) receberam o *score* 1, que indica hiperexpressão de IL-1 β na camada epitelial. O mesmo pode ser observado nos tratamentos 9 (no qual foi feita a sensibilização com a SP, e depois de 5 horas foi administrado o lisado de BL51A) e 10 (no qual foi feita a sensibilização com a SP, e depois de 5 horas foi administrado o lisado de LPST11), nos quais 75% (3 amostras de cada grupo) das amostras receberam o *score* 1, indicando, da mesma forma, hiperexpressão de IL-1 β na camada epitelial.

Acredita-se que esta hiperexpressão de IL-1 β nos tratamentos 4, 9 e 10 demonstra que ocorreu uma reação inflamatória com a administração da SP nestes três tratamentos. Nos tratamentos 9 e 10, nos quais os lisados de BL51A e LPST11 foram administrados,

respectivamente, a aplicação dos lisados posterior à sensibilização com a SP não foi capaz de inibir a resposta inflamatória que já estava ali presente, sugerindo que os lisados de BL51A e LPST11, da maneira que foram preparados no presente estudo, e da maneira que foram analisados, não possuem um efeito terapêutico ou imunomodulador no sentido de diminuir a resposta inflamatória exacerbada já instalada. O efeito terapêutico de probióticos com ação cutânea também não foi encontrado por Muhammedsaeed e colaboradores (2014), que encontraram efeitos benéficos exercidos por micro-organismos de potencial probiótico somente quando administrados previamente à indução de inflamação.

Como o número de amostras foi pequeno, mostrou-se necessária a coleta de um maior número de amostras para confirmação desta possibilidade.

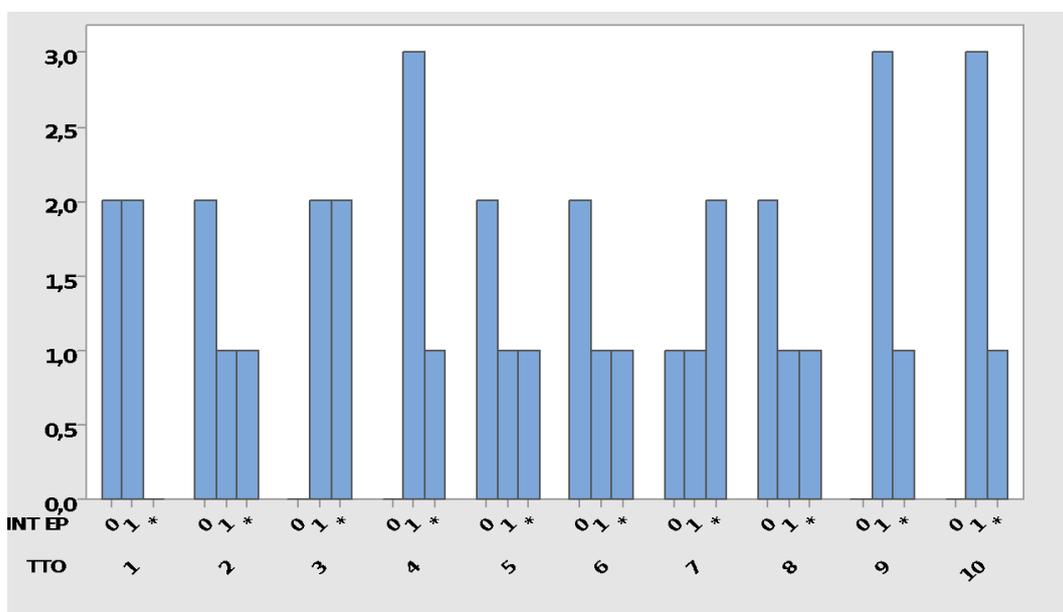


Figura 15 – Intensidade da resposta inflamatória epitelial para IL-1 β . Amostras de pele foram coletadas de quatro pacientes distintas e o material foi processado para detecção da expressão de IL-1 β pela técnica de imunohistoquímica. A classificação de intensidade foi agrupada nos scores 0 e 1, sendo que a intensidade epitelial (INT EP) de 0 (ausente) ou 1 (fraca) foi agrupada no score 0 e a intensidade epitelial de 2 (moderada) ou 3 (forte) foi agrupada no score 1. O * representa os dados perdidos. Foi utilizada a estatística descritiva para análise dos dados, no programa MiniTab7. Os cultivos de pele foram submetidos aos seguintes tratamentos (TTO):

TTO 1 – controle negativo: sem adição de SP e de lisados bacterianos;

TTO 2 – somente lisado de BL51A;

TTO 3 – somente lisado de LPST11;

TTO 4 – somente adição de SP a 10 μ M por 24 horas;

TTO 5 – administração simultânea de SP e lisado de BL51A;

TTO 6 – administração simultânea de SP e lisado de LPST11;

TTO 7 - administração do lisado de BL51A e, após 5 horas, administração da substância P;

TTO 8 – administração do lisado de LPST11 e, após 5 horas, administração da substância P;

TTO 9 – administração de SP e, após 5 horas, administração do lisado de BL51A;

TTO10 – administração de SP e, após 5 horas, administração do lisado de LPST11.

- TTO: tratamento; INT EP: intensidade epitelial -

Os dados acerca da reação endotelial e de infiltrado inflamatório foram mais heterogêneos, indicando um estímulo inflamatório insuficiente da SP na concentração e tempo de exposição utilizados (10 μ M por 24 horas). Dessa forma, como mencionado anteriormente, a concentração de SP utilizada foi estudada para posterior alteração, para que fosse obtida uma resposta inflamatória robusta (Etapa 3 deste manuscrito).

Vale ressaltar que os vasos da derme superficial respondem ao estímulo inflamatório causado por SP primeiro que os vasos da derme profunda, devido a seu calibre e composição. Estes vasos da derme superficial enviam, então, o estímulo para os vasos da derme profunda, que respondem em seguida. Como essa cascata não foi verificada nesta etapa, presumiu-se que a concentração de SP utilizada (10 μ M em amostras de pele de mama) foi insuficiente para causar o estímulo inflamatório desejado.

Dessa forma, com as análises de histologia e imunohistoquímica, concluiu-se que a SP não provocou uma resposta inflamatória robusta na concentração e tempo utilizados no cultivo de pele de mama e, portanto, houve a necessidade de ajuste destes parâmetros para a continuação do estudo. Além disso, o número de amostras ainda era muito pequeno, o que interferiu na realização das análises estatísticas. A partir de então, foram colocadas metas para a Etapa 3 do projeto e foi delineado um novo planejamento experimental, relatado a seguir.

7. ETAPA 3

7.1. Delineamento experimental da Etapa 3

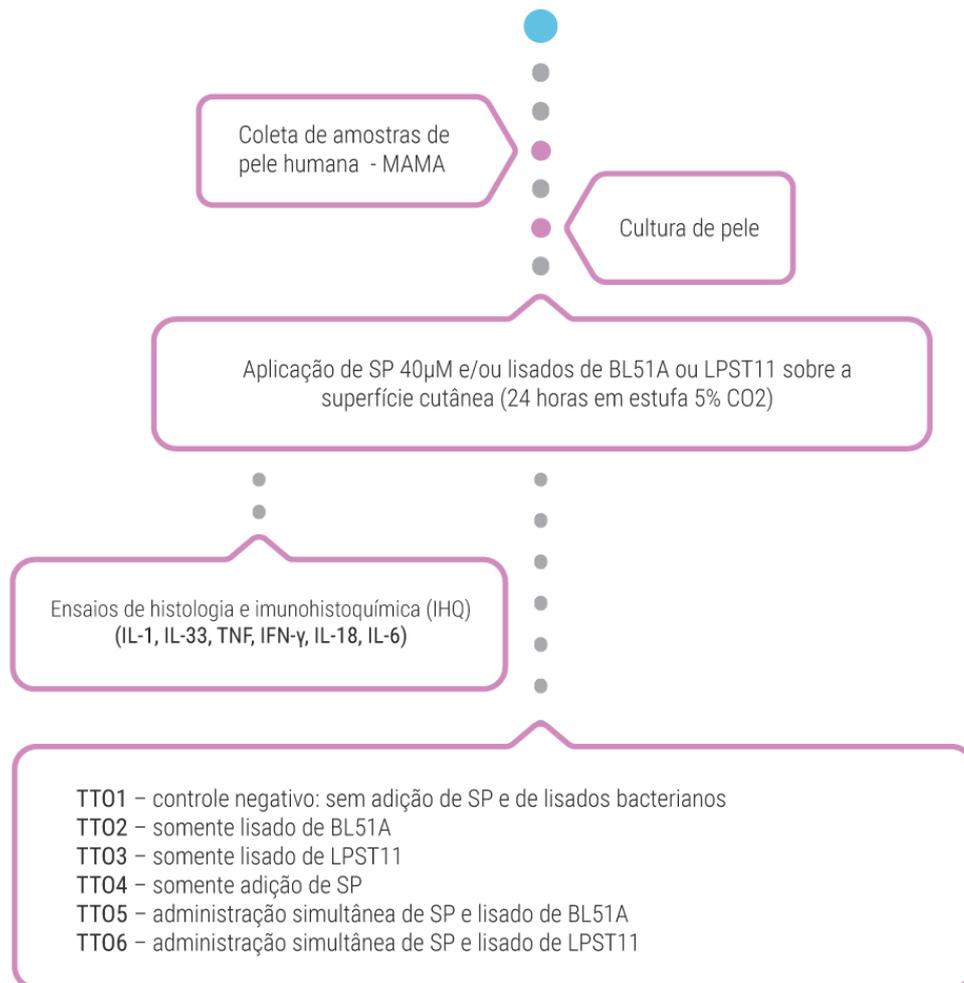


Figura 16 - Delineamento geral experimental da Etapa 3. Testes *in vitro* utilizando cultura de pele humana (mama).

7.2. Metodologia

7.2.1. Linhagens bacterianas

As espécies bacterianas utilizadas nesta etapa e condições de cultivo foram as mesmas descritas no item 5.1 do presente trabalho, sendo elas *Bifidobacterium longum* 5^{1A} (BL51A) e *Lactobacillus paracasei* CNCM I-2116 (LPST11), utilizada como controle positivo.

7.2.2. Lisados bacterianos

Os lisados utilizados nesta etapa do trabalho foram os mesmos feitos na segunda etapa, na concentração de 10^8 UFC/mL, volume de 40 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$, como descrito no item 6.2.2.

7.2.3. Cultura de pele de mama

A coleta e cultivo das peles de mama seguiram os mesmos procedimentos descritos no item 6.2.3.

7.2.4. Tratamentos

Após a constatação de um estímulo inflamatório insuficiente com a utilização da SP na concentração de 10 μM , foi realizada uma cinética, com amostras de pele provenientes de ambas as mamas de uma paciente submetida a mamoplastia redutora no Hospital LT Diamond, pelo Dr. Leonardo Araújo, para avaliação de diferentes concentrações e diferentes tempos. Foram testadas as concentrações de SP de 10, 20, 30, 40 e 50 μM , com os tempos de incubação de 24 horas, 48 horas e 72 horas.

Em todos os casos, as peles foram mantidas em cultura com DMEM por cinco horas previamente à troca de meio por DMEM contendo SP diluída nas diferentes concentrações. O estímulo inflamatório máximo foi observado com a concentração de 40 μM , com incubação de 24 horas, conforme mostrado na Figura 17. Dessa forma, a

concentração de 40 μM de SP e o período de incubação por 24 horas foram adotados como padrão no presente estudo.

A estimativa do número de células do infiltrado inflamatório foi feita pela contagem do número de vasos presentes em 10 campos da derme e a contagem do número de células perivasculares ao redor do vaso de maior celularidade.

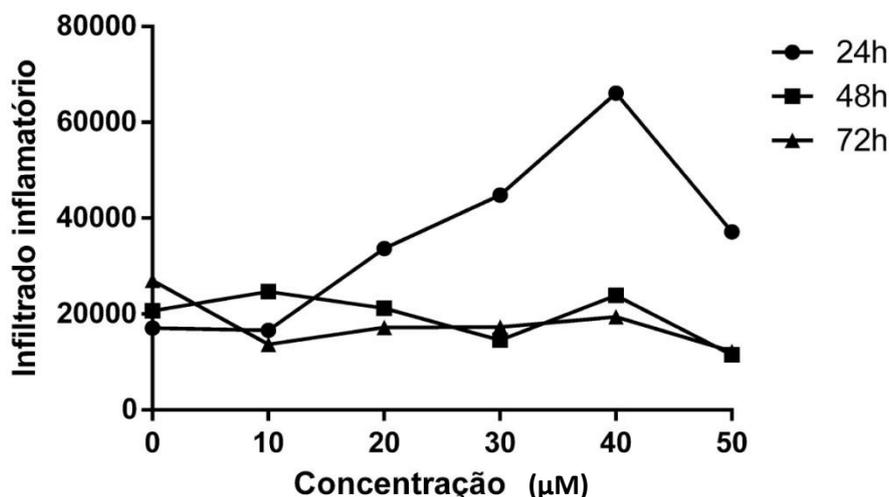


Figura 17. Número de células inflamatórias correspondente à curva de dose-resposta da concentração de SP das amostras provenientes de uma paciente. A curva varia as concentrações de SP de 10 μM , 20 μM , 30 μM , 40 μM e 50 μM para a pele de mama cultivada em laboratório por 24, 48 e 72 horas de incubação para verificação do efeito de número máximo de extravasamento das células perivasculares na derme. Gráfico feito no programa GraphPad Prism. h – horas.

Dando continuidade ao estudo, foram coletadas novas amostras de pele de mama de cinco doadoras (n=5), pacientes submetidas a mamopexias redutoras no Hospital LT Diamond, nas quais foram realizadas somente a administração da SP e dos lisados bacterianos de BL51A e LPST11 de forma simultânea, seguindo exatamente a metodologia utilizada por Boisnic e colaboradores (2003) e Guéniche e colaboradores (2010a), que também tiveram a indução da inflamação pela administração da SP simultânea aos tratamentos cuja atividade anti-inflamatória foi testada.

Nesta Etapa 3 da pesquisa, foram descartados os tratamentos e sensibilizações com diferença de 5 horas (preventivo para BL51A e LPST11 e curativo para BL51A e LPST11) e mantida somente a administração simultânea do lisado de BL51A e SP e do lisado de LPST11 e SP, devido à redução do tamanho das amostras provenientes das

mamopexias realizadas no período, priorizando o estudo, portanto, da ação preventiva dos lisados de BL51A e LPST11 frente à inflamação provocada pela administração de SP, uma vez que a administração dos lisados foi feita na superfície do epitélio e a administração de SP foi pela incorporação da mesma no meio de cultura (DMEM) em contato com a derme profunda do fragmento de pele utilizado. Dessa forma, quando a cascata inflamatória provocada pela SP chega até a derme superficial e a epiderme, o lisado bacteriano já haverá agido nestes locais, exercendo, portanto, seu possível efeito de proteção àquele estímulo inflamatório.

Mesmo mantendo somente a administração simultânea de SP com o lisado de BL51A ou de SP com o lisado de LPST11, as peles foram mantidas em cultura com DMEM por cinco horas previamente à troca do DMEM pelo DMEM contendo a SP diluída e a administração dos lisados bacterianos.

Após a administração da SP e/ou dos lisados bacterianos, as amostras de pele foram mantidas em cultura por 24 horas, em presença ou ausência de 40 μM de SP incorporada ao meio de cultura e a preparação de BL51A (40 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$) ou LPST11, na mesma concentração, aplicada topicamente à pele (Figura 18).

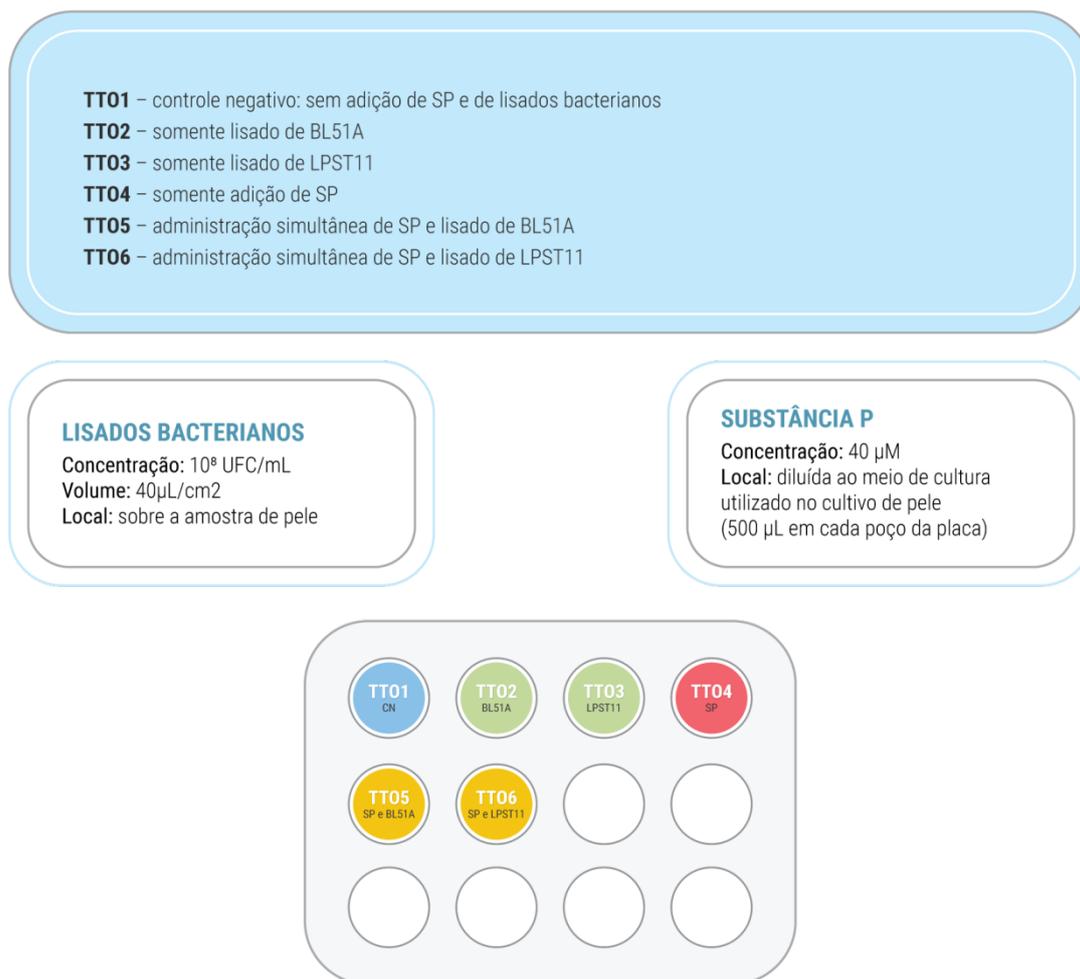


Figura 18 – Tratamentos administrados a cada amostra de pele de cada um dos casos, concentração, volume e localização de administração dos lisados bacterianos de BL51A e LPST11 e de SP, desenho esquemático da placa contendo as amostras de pele com seus respectivos tratamentos. BL51A: *Bifidobacterium longum* 5^{1A}; CN: controle negativo; LPST11: *Lactobacillus paracasei* ST11; SP: substância P; TTO - tratamentos.

TT01: controle negativo, sem sensibilização com SP e sem administração de BL51A ou LPST11;

TT02: controle do lisado de BL51A, sem sensibilização com SP e com administração do lisado de BL51A;

TT03: controle do lisado de LPST11, sem sensibilização com SP e com administração do lisado de LPST11;

TT04: controle de inflamação, com sensibilização com SP e sem administração dos lisados de BL51A e LPST11;

TT05: sensibilização com SP e, simultaneamente, administração do lisado de BL51A;

TT06: sensibilização com SP e, simultaneamente, administração do lisado de LPST11.

De forma semelhante à Etapa 2, seguindo o tempo indicado pela cinética realizada, após 24 horas de incubação em estufa a 5% CO₂, os fragmentos de pele foram fixados em

formaldeído a 3,7% e transportados para o Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFMG para a realização dos experimentos de histologia e da imunohistoquímica.

A metodologia das análises histológicas e imunohistoquímicas desta etapa, realizadas no Laboratório de Anatomia Patológica, descritas no item 6.2.5; 6.2.6; 6.2.6.1, bem como sua análise estatística e seus resultados e discussão, serão apresentados juntamente aos da próxima etapa, na qual foram realizadas coletas de cinco amostras de pele de pálpebra humana.

8. Etapa 4

8.1. Delineamento experimental da etapa 4

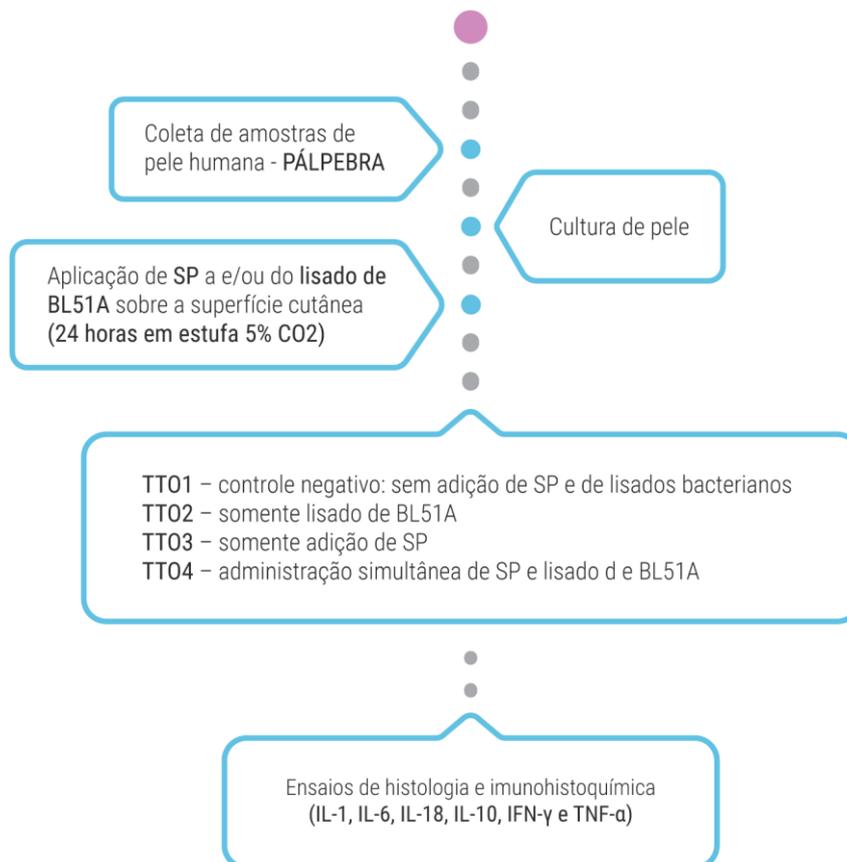


Figura 19 – Delineamento experimental da Etapa 4, com amostras de pele de pálpebra humana. BL51A – *Bifidobacterium longum* 5^{1A}. SP: Substância P. TTO: tratamentos

8.2. Metodologia

8.2.1. Linhagem bacteriana

A espécie de bifidobactéria utilizada nesta etapa e suas condições de cultivo são as mesmas descritas no item 5.1: *Bifidobacterium longum* 5^{1A} (BL51A) no LEFM/ICB/UFMG.

Nesta última etapa, não foi utilizado o *Lactobacillus paracasei* ST11, devido a uma diminuição no tamanho da amostra de pele obtida.

8.2.2. Lisado bacteriano

Para a terceira etapa dos experimentos (pele de pálpebra, com SP a 10 μ M), o lisado de BL51A foi feito, de acordo com metodologia empregada pela equipe do LEFM e LaBio da UFMG. Em dois tubos, 50 μ L da cultura de BL51A foram inoculados em 5 mL de caldo MRS suplementado com hemina, menadiona e cisteína. Estas preparações foram mantidas em estufa a 37°C em condições anaeróbicas, por 24 horas. Foi realizada uma nova inoculação de 50 μ L em 5 mL de caldo MRS suplementado, mantidas por 24 horas nas mesmas condições descritas acima.

Após esta ativação, as culturas foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos. Os *pellets* de ambos os tubos foram unidos, resultando em 500 μ L, que foram ressuspendidos em 4,5 mL de PBS (1:10). Este ajuste da cultura para a concentração de 10% foi realizado de acordo com a metodologia empregada por Guéniche et al. (2010a).

Para a inativação, a cultura foi congelada por um minuto em nitrogênio líquido e aquecida a 65°C em banho-maria por cinco minutos. Este procedimento foi repetido por três vezes seguidas.

Para confirmação da inativação, foi realizado o plaqueamento em placas contendo agar MRS suplementado com hemina, menadiona e cisteína, com incubação em estufa 37°C, em condições anaeróbicas por 24 horas e a incubação de três microtubos contendo o lisado bacteriano pronto, nas condições da cultura de pele, em estufa de CO₂, a 37°C, também por 24 horas. Em nenhum dos dois locais houve crescimento bacteriano.

Os microtubos contendo o lisado bacteriano de BL51A foram mantidos em freezer -80°C, de onde foram retirados somente no momento da realização do experimento.

8.2.3. Cultura de pele de pápebra humana

Este projeto foi aprovado pelo CONEP, em sua primeira fase, com as amostras de pele de mama com o número CAAE 44452015.3.0000.5149, com uma emenda para substituição da pele de mama pela pele de pálpebra em sua quarta fase (Anexos).

O modelo de cultura de pele empregado foi semelhante ao utilizado por Guéniche e colaboradores (2010a), Boisnic e colaboradores (1999), Boisnic e colaboradores (2001) e Boisnic e colaboradores (2003). Foram utilizadas amostras de pele de pálpebra superior, de cinco pacientes a partir de 18 anos, coletadas de blefaroplastias realizadas no Instituto

de Olhos de Belo Horizonte (IOBH), com a colaboração da Dra. Ana Luiza Firmato. Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre esclarecido (Anexos).

A coleta e cultivo de pele de pápebra seguiram os mesmos procedimentos descritos no item 6.2.3, no entanto, como a pele de pálpebra possuía espessura menor, ela se aderiu às bordas do inserto, preenchendo-o completamente, não sendo necessária a aplicação do selante de selo de vinil de polissiloxano.

8.2.4. Tratamentos

Na quarta etapa do nosso estudo, utilizando a metodologia semelhante à utilizada por Boisnic e colaboradores (2003) e Guéniche e colaboradores (2010a), foram coletadas cinco amostras de pele de pálpebra superior humana de pacientes submetidos a blefaroplastias.

Como a pele humana utilizada nesta etapa do trabalho foi retirada da região da pálpebra superior, sendo significativamente menor do que a pele obtida da região da mama utilizada anteriormente, foi realizada uma escolha nos tratamentos de maior interesse no presente estudo. Dessa forma, foram mantidos nesta etapa, os tratamentos considerados de maior relevância para o presente estudo: TTO1: controle negativo; TTO2: somente BL51A; TTO3: somente SP; TTO4: administração simultânea de BL51A e SP) representados na Figura 20:

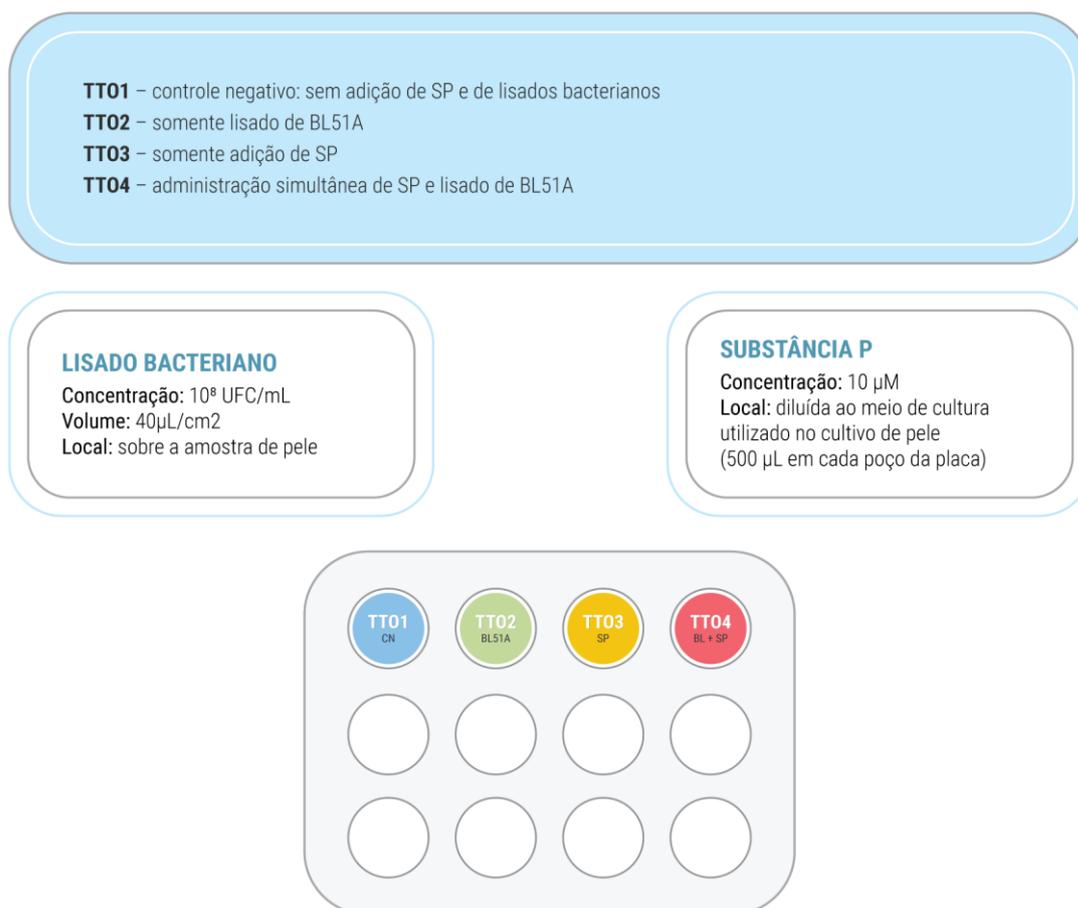


Figura 20 - Tratamentos administrados a cada amostra de pele de pálpebra cada um dos casos, concentração, volume e localização de administração do lisado bacteriano de BL51A e de SP, desenho esquemático da placa contendo as amostras de pele com seus respectivos tratamentos. BL51A: *Bifidobacterium longum* 5^{1A}; CN: controle negativo; SP: substância P; TTO - tratamentos. TTO1: controle negativo, sem sensibilização com SP e sem administração de BL51A; TTO2: controle do lisado de BL51A, sem sensibilização com SP e com administração do lisado de BL51A; TTO3: controle de inflamação, com sensibilização com SP e sem administração do lisado de BL51A; TTO4: sensibilização com SP e, simultaneamente, administração do lisado de BL51A.

Como nas etapas anteriores, e de acordo com a metodologia de Guéniche e colaboradores (2010a), as peles foram mantidas em cultura por cinco horas, e depois de cinco horas, foi administrada a SP diluída em DMEM (troca de meios) e, 40 µL/cm² de lisado de BL51A foram aplicados. As culturas foram mantidas por 24 horas em incubação após a adição de SP e/ou lisado de BL51A em estufa a 5% CO₂, a 37°C.

Em seguida, os fragmentos de pele foram retirados dos insertos, fixados em formaldeído a 3,7% e transportados para o Laboratório de Anatomia Patológica da

Faculdade de Medicina da UFMG para a realização dos experimentos de histologia e da imunohistoquímica.

Vale ressaltar que a avaliação histológica das amostras de pele pela coloração hematoxilina-eosina (HE), retrata o ponto de vista estático, como uma fotografia da composição e estrutura do tecido, no nosso caso, da pele cultivada. Entretanto, a análise imunohistoquímica permite a avaliação da função celular. Assim, por meio da imunomarcagem de diversas citocinas foi possível investigar o papel das células imunes presentes na pele cultivada.

8.2.5. Análise histológica das culturas de pele de pálpebra

No Laboratório de Anatomia Patológica, as amostras de pele de mama e de pálpebra foram retiradas do formaldeído a 3,7% e embebidas em parafina. Cortes de 5 µm de espessura foram feitos em micrótomo (RM2125RT, Leica). Após montagem das lâminas, foi feita a coloração de HE, como mostrado na Figura 21.

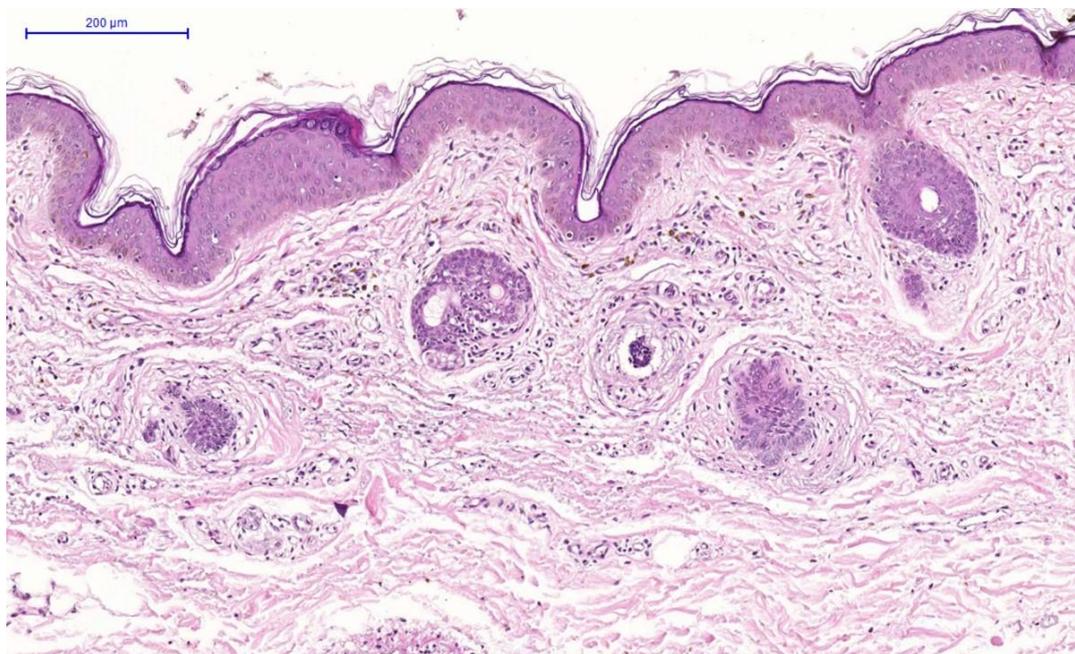


Figura 21 – Lâmina da amostra de pele de pálpebra do controle negativo, com coloração hematoxilina eosina em aumento 10x.

Os cortes histológicos foram visualizados em microscópio óptico (BX, Olympus), analisadas por dois observadores (Dr. Marcelo Pascoal e eu) em ensaio cego, pois as lâminas foram codificadas.

Nas amostras de pele de mama e de pele de pálpebra, foi realizada a semi-quantificação das células ali presentes. Primeiramente, foi realizada observação geral da derme nos cortes, no aumento de 10X. Depois, no aumento de 40X, foram escolhidos, de forma aleatória, dez campos da derme profunda e dez campos da derme superficial, nos quais foram contados o número de vasos presentes, o número de células inflamatórias ao redor do vaso de maior celularidade, em cada uma das áreas, em todos os quatro tratamentos dos dez pacientes. Estes valores absolutos foram utilizados para observação dos dados.

Para a análise estatística, esses resultados absolutos foram padronizados de acordo com a área. Isso foi feito tanto para a pele de mama quanto para a pele de pálpebra. Esta padronização foi feita com o objetivo de considerar a área na qual a contagem havia sido realizada, considerando as devidas proporções, para que o número de células perivasculares na derme pudesse ser analisado entre áreas de diferentes tamanhos e proporções dos fragmentos coletados.

É importante lembrar que as amostras de pele utilizadas possuem a seguinte estrutura, conforme a Figura 22.

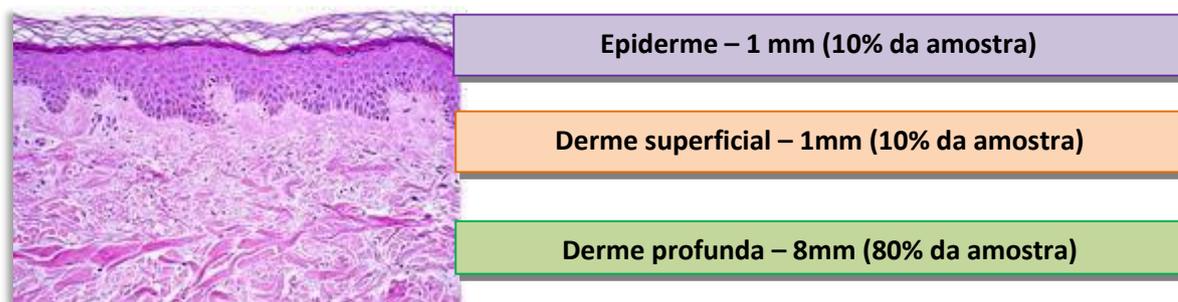


Figura 22 – Esquema simplificado das camadas da pele, demonstrando o tamanho de cada uma delas e sua proporção na composição da amostra cutânea coletada.

Dessa forma, o número de células foi padronizado de acordo com o tamanho da camada da pele em que se encontrava, transformando em média o número absoluto de células contadas em média do número de células/mm². Para isso, foi realizado o seguinte procedimento:

- Derme superficial

- Foram medidos os fragmentos de pele na lâmina – comprimento e largura – em sua área total.
- Foram contados o número de vasos e o número de células ao redor do vaso de maior celularidade em 10 campos da derme superficial.
- Foi multiplicado o número de vasos pelo número de células encontrado ao redor do vaso de maior celularidade, para os 10 campos analisados.
- Foi feita a média dessas 10 contagens.
- Como a derme superficial representa 10% da amostra, foi feito o seguinte cálculo:

$$\frac{\text{Média} \times 10\%}{\text{Área}} = \text{Índice total de células (cél/mm}^2\text{)}$$

- Derme profunda

- Foram medidos os fragmentos de pele na lâmina – comprimento e largura – em sua área total.
- Foram contados o número de vasos e o número de células ao redor do vaso de maior celularidade em 10 campos da derme profunda.
- Foi multiplicado o número de vasos pelo número de células encontrado ao redor do vaso de maior celularidade, para os 10 campos analisados.
- Foi feita a média dessas 10 contagens.
- Como a derme profunda representa 80% da amostra, foi feito o seguinte cálculo:

$$\frac{\text{Média} \times 80\%}{\text{Área}} = \text{Índice total de células (cél/mm}^2\text{)}$$

Considerando o tamanho da área da pele na qual as contagens foram feitas, padronizamos esses dados para que os mesmos pudessem ser comparados entre si, cada um em sua devida proporção.

8.2.6. Análise imunohistoquímica das culturas de pele de pálpebra

Para realização dos ensaios imunohistoquímicos para a investigação da expressão das citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-18, IL-10, TNF- α e IFN- γ) foi utilizado o kit *Novo Link Max Polymer Detection* (Cat#RE7140-K, Novocastra, Leica Microsystems). A metodologia empregada nesta etapa foi a descrita no item 6.2.6.

As lâminas foram analisadas utilizando-se o microscópio óptico Olympus BX, conforme os parâmetros do estudo descritos no item 6.2.6.1.

8.3. Análise estatística

Como análise inicial, para triagem dos dados, foi realizada a estatística descritiva tanto na análise histológica quanto na análise imunohistoquímica.

Após registro no Excel, os dados foram plotados em gráficos *boxplot* no programa MiniTab7 para representação e análise dos resultados obtidos.

Para confirmação dos resultados da estatística descritiva, os dados também foram analisados como não paramétricos, utilizando o teste de Mann-Whitney.

As seguintes análises estatísticas foram realizadas para os dados da etapa 3, com pele de mama (n = 5) e etapa 4, com pele de pálpebra (n = 5). As análises foram feitas separadamente por região anatômica (mama e pálpebra).

- **Análise histológica descritiva (HE)**
 - ✓ Contagem não padronizada (números absolutos) do número de células ao redor dos vasos – realizada para amostras de mama e pálpebra separadamente, analisando *derme superficial*, *derme profunda* e depois a soma do número de células da derme superficial com as da derme profunda (*total de células da derme*);
 - ✓ Contagem padronizada para o tamanho da área do número de células ao redor dos vasos – realizada para amostras de mama e pálpebra separadamente, analisando *derme superficial*, *derme profunda* e depois a soma do número de células da derme superficial com as da derme profunda (*total de células da derme*);

- **Análise imunohistoquímica descritiva (IHQ)**
 - ✓ Intensidade da marcação para as citocinas (IL-1, IL-18, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ) – quantas amostras marcaram *score* 0, 1, 2, 3 nas amostras analisadas de mama e pálpebra. Essa análise serviu de base para uma triagem para as análises comparativas entre os tratamentos.
 - ✓ Distribuição da marcação das células – quantas amostras receberam os *scores* 0, 1, 2, 3 quanto à distribuição da marcação.

- **Análises histológicas comparativas entre os tratamentos (T1, T2, T3 e T4)**
 - ✓ Para a contagem de infiltrado inflamatório nas amostras de mama (sem as de pálpebra), para as análises comparativas entre os tratamentos foi realizado o teste T, considerando uma diferença significativa para os dados nos quais $p \leq 0,05$. Foram analisados separadamente os dados não padronizados (números absolutos) e os dados previamente padronizados de acordo com a área. Esta padronização foi o que nos permitiu comparar fragmentos de tamanhos diferentes. Comparação T1/T2, T1/T3, T1/T4, T2/T3, T2/T4, T3/T4;
 - ✓ Para a contagem de infiltrado inflamatório nas amostras de pálpebra (sem as de mama), para as análises comparativas entre os tratamentos foi realizado o teste T, considerando uma diferença significativa para os dados nos quais $p \leq 0,05$. Foram analisados separadamente os dados não padronizados (números absolutos) e os dados previamente padronizados de acordo com a área. Esta padronização foi o que nos permitiu comparar fragmentos de tamanhos diferentes. Comparação T1/T2, T1/T3, T1/T4, T2/T3, T2/T4, T3/T4.

- **Análises imunohistológicas comparativas entre os tratamentos (T1, T2, T3 e T4)**
 - ✓ Na imunohistoquímica, na análise entre todos os tratamentos entre si, para as amostras de mama e pálpebra juntas, das citocinas previamente selecionadas a

partir da análise descritiva, foi utilizado o Teste de Fisher, considerando significativa a diferença entre os dados nas quais $p \leq 0,05$. Foram comparados os seguintes dados (a partir da triagem realizada na estatística descritiva):

- **IL-18** – *Epitélio* - T1/T2, T1/T3, T1/T4, T2/T3, T2/T4, T3/T4;
 - **IL-18** – *Infiltrado inflamatório* - T1/T2, T1/T3, T1/T4, T2/T3, T2/T4, T3/T4;
 - **TNF- α** – *Epitélio* - T1/T2, T1/T3, T1/T4, T2/T3, T2/T4, T3/T4;
 - **IFN- γ** – *Infiltrado inflamatório* - T1/T2, T1/T3, T1/T4, T2/T3, T2/T4, T3/T4.
- **Correlação entre resultados da análise histológica e da análise imunohistoquímica**
 - ✓ Comparação dos resultados obtidos em HE com os dados obtidos na IHQ, ou seja, qual a função das células encontradas ao redor dos vasos na derme superficial e derme profunda na técnica de HE.

8.4. Resultados e discussão das Etapas 3 e 4

8.4.1. Análise histológica em pele de mama e pálpebra

8.4.1.1. Contagem não padronizada do número de células

Os números absolutos de células em cada uma das regiões da derme (derme superior e derme profunda) e a soma das duas regiões tanto nas amostras de pálpebra (n=5) quanto nas amostras de mama da etapa anterior (n=5) foram registrados. Os tratamentos com LPST11 da etapa anterior (TTO3 e TTO6) foram excluídos, para que fosse possível fazer uma comparação com os dados que tínhamos e dos que encontramos nesta última etapa, utilizando pele de pálpebra.

Na Figura 23, pode-se observar que tanto a pele de mama quanto a pele de pálpebra já possuem um fenótipo inflamatório constitutivo, observando-se os controles negativos (TTO1). Entretanto, os valores das medianas mostram que o número de células

perivasculares foi baixo no controle negativo (TTO1), no qual as amostras não foram sensibilizadas com SP e não foram tratadas com o lisado bacteriano.

O aspecto que mais chama atenção é que, na derme profunda e na derme superficial das amostras de mama e pálpebra, tratadas apenas com o lisado de BL51A (TTO2) houve um aumento no número de células extravasadas, observadas ao redor dos vasos. Tal achado também foi observado na etapa 2 deste trabalho (item 6.4.2.). Como a histologia permite a avaliação somente no número de células, mas não a função das células presentes no tecido, todas as amostras de pele desta etapa foram submetidas a ensaios de imunohistoquímica para imunomarcação de citocinas pró ou anti-inflamatórias comumente expressas na pele. Assim pudemos investigar se as células em maior número verificadas após o tratamento com o lisado de BL51A teriam um perfil pró-inflamatório ou anti-inflamatório.

No TTO3 (administração de SP, sem adição do lisado), de pele de mama tratada com 40 μ M de SP, não foi observado aumento no número de células do infiltrado inflamatório. No entanto, na pele de pálpebra foi observado um aumento no número médio de células após sensibilização com 10 μ M de SP (TTO3), quando comparado ao controle (TTO1) na derme superficial (DS), na derme profunda (DP) e no total (soma DS + DP). Este resultado corrobora o modelo utilizado por Guéniche e colaboradores (2010a), mostrando um maior extravasamento de células dos vasos microvasculares.

Contudo, o aumento de células causado pela administração da SP foi menor do que o aumento do número de células causado pela administração do lisado bacteriano de BL51A (TTO2) em ambos os tipos de pele, observando-se que, neste modelo de cultivo de pele, foi possível avaliar com maior precisão os efeitos provocados pela administração tópica do lisado bacteriano de BL51A do que a reação da movimentação das células do interior para o exterior dos vasos devida a uma sensibilização provocada pela adição de SP ao meio de cultura em contato com a derme profunda.

Nas amostras de pele de mama sensibilizadas com 40 μ M de SP e tratadas com o lisado de BL51A (TTO4), pode-se observar que houve uma grande redução do número de células extravasadas em comparação às amostras que receberam o TTO2, que não foram sensibilizadas pela SP e foram tratadas com o lisado de BL51A. Em relação ao TTO3, das amostras somente sensibilizadas com SP, sem tratamento do lisado de BL51A, não foi verificada diferença.

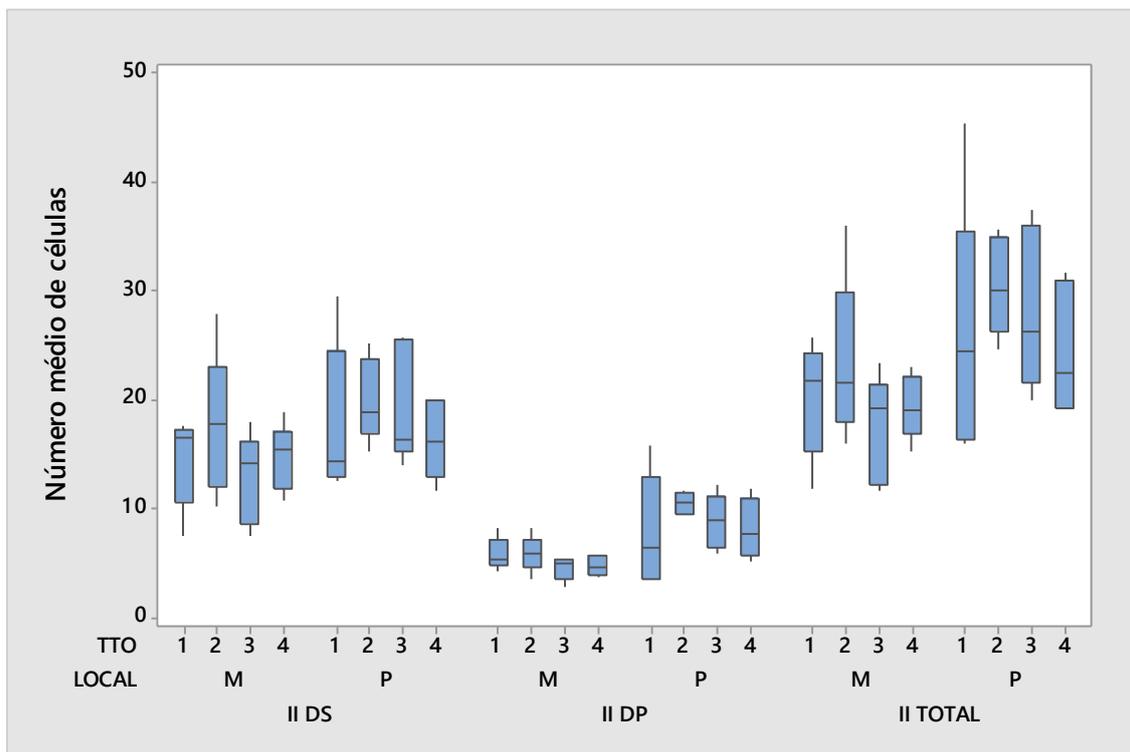


Figura 23 – Número médio de células perivasculares contadas na mama (M) e na pálpebra (P) na derme superficial (II DS), na derme profunda (II DP) e a soma das duas regiões (II DS + II DP = II Total). II: infiltrado inflamatório; TTO: tratamentos. TTO1: controle negativo, sem sensibilização com SP e sem tratamento do lisado de BL51A

TTO2: controle do lisado de BL51A;

TTO3: controle de inflamação, somente com sensibilização pela SP, sem tratamento com o lisado de BL51A;

TTO4: pele sensibilizada pela SP e tratada com o lisado de BL51A.

8.4.1.2. Contagem padronizada do número de células perivasculares da derme

Nesta análise, foi realizada a padronização do número de células perivasculares da derme pela área do fragmento de pele, conforme descrito no item 8.2.5. Essa padronização foi feita para que, em todas as amostras, fossem obtidos os números de células por mm^2 , permitindo que todas as amostras fossem comparadas entre si, independente do tamanho da área avaliada.

- Nesta análise, como pode ser observado na Figura 24, também foi constatado que a pele de pálpebra apresentou mais células perivasculares que a mama tanto na derme superficial quanto na derme profunda e na contagem total do número médio de células por mm^2 . A derme superficial apresenta maior número de células

inflamatórias do que a derme profunda, nas amostras de pele de mama (M) e pele de pálpebra (P).

- No tratamento 1 (controle negativo), na derme superficial de mama e pálpebra, há uma inflamação natural da pele.
- A administração do lisado bacteriano de BL51A (TTO2) provocou um aumento no número médio de células/mm² nas amostras não sensibilizadas pela SP, mais uma vez. Esse aumento ocorreu em todas as amostras de pele testadas, tanto de mama quanto de pálpebra, na derme superficial e na derme profunda. A função dessas células foi investigada por IHQ. Esse dado confirma a análise dos dados absolutos e os dados encontrados na etapa anterior do trabalho.
- A sensibilização feita com SP, sem o tratamento com o lisado bacteriano (TTO3) gerou um pequeno aumento no número médio das células inflamatórias/mm² nas amostras de pálpebra, o que corrobora com o modelo proposto por Guéniche e colaboradores (2010a).
- Nas amostras de mama sensibilizadas com SP (TTO3), não houve aumento no número de células inflamatórias.
- Nas amostras de pálpebra, sensibilizadas com SP e tratadas com o lisado de BL51A (TTO4), ocorreu uma redução no número de células por mm² quando comparado ao TTO2, no qual foi administração o lisado bacteriano de BL51A.

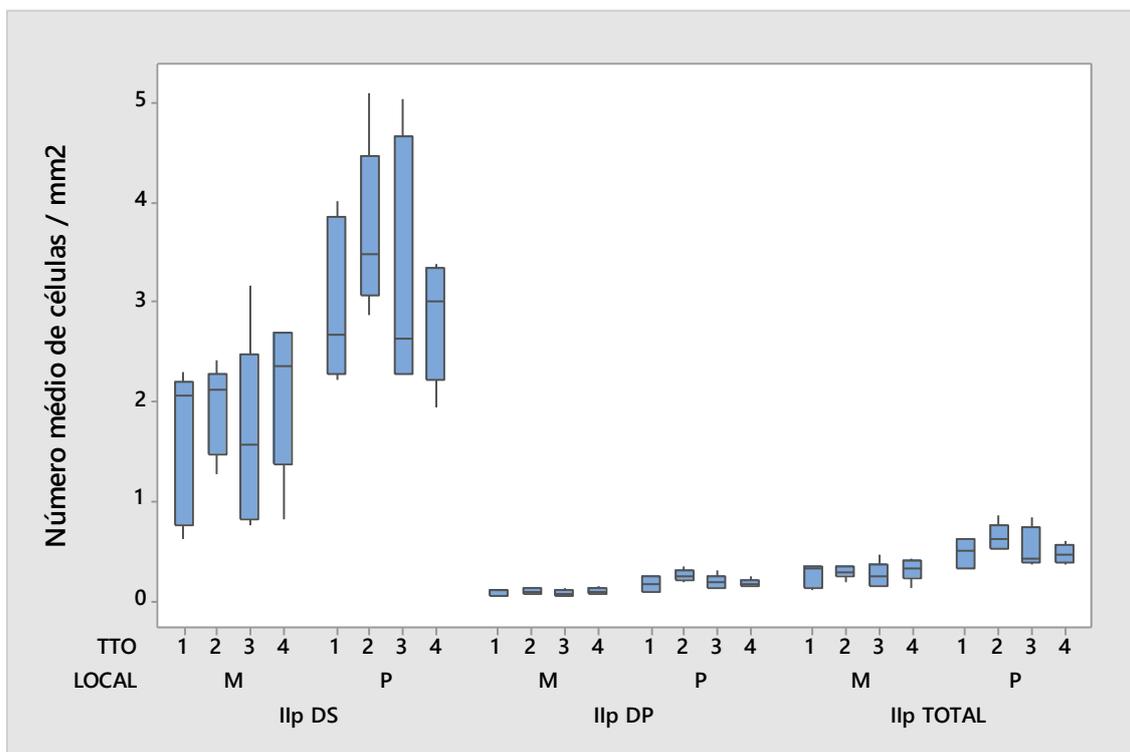


Figura 24 – Contagem padronizada - número médio de células perivasculares por mm^2 contadas na mama (M) e na pálpebra (P) na derme superficial (IIp DS), na derme profunda (IIp DP) e a soma das duas regiões (II DS + II DP = IIp Total). TTO: tratamentos. II: infiltrado inflamatório.

TTO1: controle negativo, sem sensibilização com SP e sem tratamento do lisado de BL51A;

TTO2: controle do lisado de BL51A;

TTO3: controle de inflamação, somente com sensibilização pela SP, sem tratamento com o lisado de BL51A;

TTO4: pele sensibilizada pela SP e tratada com o lisado de BL51A.

Como relatado anteriormente, realizando a análise histológica, temos um retrato das amostras, acerca do número de componentes que estão ali. Quando se observa um aumento no número médio de células ou no número médio de células por mm^2 , a histologia não nos permite afirmar qual a função exercida por tais células. Para isso, realizamos análises imunohistoquímicas para detecção da expressão de diversas citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias nas mesmas amostras.

8.4.2. Análises comparativas

As análises comparativas para análises histológicas foram realizadas por meio do teste T com $p \leq 0,05$, para os seguintes dados:

- Todas as amostras de mama e de pálpebra – dados não padronizados pela área e dados padronizados pela área;
- Somente as amostras de mama - dados não padronizados pela área e dados padronizados pela área;
- Somente as amostras de pálpebra - dados não padronizados pela área e dados padronizados pela área.

Não foi encontrada diferença significativa entre nenhum dos tratamentos realizados (TTO1, TTO2, TTO3, TTO4) para as amostras totais (mama + pele) e amostras de mama com a realização do teste T ($p \leq 0,05$).

No entanto, observou-se resultados com valor de p muito próximos a 0,05 nos testes de:

- ✓ *SOMENTE PÁLPEBRA* ($p=0,09$) - Derme superficial padronizada – tratamento 2 (controle de BL51A) e tratamento 4 (BL51A + SP)
- ✓ *SOMENTE PÁLPEBRA* ($p=0,06$) - Derme profunda padronizada - tratamento 2 (controle de BL51A) e tratamento 4 (BL51A + SP)
- ✓ *SOMENTE PÁLPEBRA* ($p=0,07$) - Total padronizada (derme superficial + derme profunda) - tratamento 2 (controle de BL51A) e tratamento 4 (BL51A + SP).

Essa tendência a existir uma diferença significativa entre os tratamentos 2 (tratamento com o lisado de BL51A, sem sensibilização) e 4 (sensibilização com SP e tratamento com BL51A), corroboram com os dados observados na estatística descritiva da análise histológica, nos quais observamos:

- No tratamento 2 (controle do lisado de BL51A: tratado com o lisado de BL51A, sem sensibilização de SP): um grande aumento no número de células ao redor dos vasos após a administração do lisado de BL51A.
- No tratamento 4 (sensibilizado com SP e tratado com lisado de BL51A): uma diminuição no número de células ao redor dos vasos com a administração do lisado de BL51A e administração da SP.

Com a administração de BL51A, há um aumento do número de células presentes. Qual seria o perfil destas células, aumentadas pela administração de um lisado de um micro-organismo de potencial probiótico? Seriam células com produção de citocinas anti-inflamatórias ou inflamatórias? Sabe-se que, quando o lisado de BL51A e a SP foram aplicadas simultaneamente, houve uma diminuição neste número de células (em comparação ao TTO2, conforme verificado na análise histológica).

Supostamente, tendo estas células ao redor dos vasos uma função anti-inflamatória, no tratamento 2 (administração somente do lisado de BL51A) ocorreria um aumento do número de células de funções anti-inflamatórias, que produzem citocinas, como a IL-10, por exemplo. No tratamento 4 (BL51A + SP), veríamos uma diminuição do número de células de função anti-inflamatória devido à administração de SP, um neuropeptídeo pró-inflamatório.

Como veremos a seguir, este dado foi confirmado pela correlação entre HE e biomarcadores da IHQ, sendo o papel dessas células extravasadas ao redor dos vasos sanguíneos da derme superficial e da derme profunda de caráter anti-inflamatório, e esse resultado é explicado por:

- ✓ Um maior número de células anti-inflamatórias, no tratamento 2.
- ✓ Uma diminuição destas células anti-inflamatórias pela administração de SP, no tratamento 4, não permitindo o efeito protetor realizado pelo lisado de BL51A.

Com testes posteriores, essa tendência a uma diferença significativa pode ser confirmada.

Com o tratamento 3, no qual foi administrada somente a substância P, sem administração de BL51A (controle de funcionamento da SP), verificou-se que houve pequeno aumento no número de células ao redor dos vasos somente nas amostras de pele de pálpebra. Este aumento foi menor do que o aumento do número de células causado pela administração somente do lisado de BL51A, sem SP, ou não houve aumento algum no número de células quando comparado ao tratamento controle (TTO1), não caracterizando uma reação inflamatória robusta.

Branchet-Gumila e colaboradores (1999) verificaram que mesmo separada da circulação sanguínea, em fragmentos de cultura de pele, após a aplicação da substância P

tanto diretamente sobre a pele, quanto no meio de cultura, foram observados edema e vasodilatação na derme superficial e extravasamento de linfócitos após a aplicação tópica e extravasamento de mastócitos pela parede microvascular, tanto após a aplicação diretamente sobre a pele e quando colocada no meio de cultura. Além disso, a liberação de mediadores pró-inflamatórios IL-1 e TNF foram observados.

Mesmo na ausência de circulação sanguínea sistêmica, a adição de SP ao meio de cultura no cultivo da pele viva induziu um edema dose-dependente, vasodilatação e extravasamento de linfócitos pelas paredes microvasculares e degranulação de mastócitos. Além disso, a resposta inflamatória foi associada com a liberação de mediadores pró-inflamatórios, como o TNF- α (Guéniche et al., 2010a).

8.4.3. Análise imunohistoquímica de pele de pálpebra e mama

Para todos os cinco pacientes, os *scores* de expressão das seis citocinas analisadas foram idênticos. Para cada uma das seis citocinas as seguintes análises:

- Análise do parâmetro “Intensidade” da coloração da reação, contando o número de amostras apresentando intensidade 0 (ausente – na qual não tivemos nenhuma amostra), na intensidade 1 (baixa), na intensidade 2 (moderada) ou na intensidade 3 (intensa).
- Análise do parâmetro “Distribuição” de reação, contando o número de amostras apresentando distribuição 0 (0 a 25%), distribuição 1 (25 a 50%), na distribuição 2 (50 a 75%) ou na intensidade 3 (mais de 75%).
- Realização do teste de correlação entre os biomarcadores (pela IHQ) e o infiltrado inflamatório (pela HE), para demonstrar a função do infiltrado perivascular presente na derme superficial e derme profunda, nas amostras de pele.

8.4.3.1. Intensidade de expressão das citocinas em pele de pálpebra e mama

As tabelas de análise estatística descritiva da intensidade das citocinas foram feitas como um método de triagem para selecionar as citocinas que poderiam ter uma diferença significativa, para as quais, seria realizado o teste de Fisher.

- IL-1 β

A expressão da IL-1 β no epitélio, no infiltrado inflamatório e no endotélio, apresentou intensidade 1, ou seja, baixa intensidade, e este padrão de marcação foi verificado nos quatro tratamentos, sem variação entre eles. Como ocorreu este padrão homogêneo de intensidade de marcação para IL-1 β em todos os tratamentos, na análise estatística descritiva, essa citocina não foi selecionada para realização da comparação de dados pelo Teste de Fisher.

- IL-10

A intensidade de expressão da citocina IL-10 no epitélio, infiltrado inflamatório e endotélio foi predominantemente 2, ou seja, moderada, em todos os tratamentos. Como ocorreu este padrão de intensidade de marcação para IL-10 em todos os tratamentos na análise estatística descritiva, esta citocina também não foi selecionada para realização da comparação de dados pelo Teste de Fisher.

- IL-6

Não houve variação na intensidade de expressão da citocina IL-6, sendo que a maioria das amostras de pele teve sua expressão classificada entre moderada (2) ou forte (3). Dessa forma, pelo padrão de variação das intensidades de expressão vistos na análise estatística descritiva, esta citocina não foi selecionada para a realização do Teste Fisher.

- IL-18

Para a intensidade de expressão de IL-18 no epitélio e infiltrado inflamatório, ocorreu uma variação de marcações dos tratamentos, e estes dois compartimentos (epitélio e infiltrado inflamatório) foram selecionados para a realização de comparação quanto à intensidade de marcação entre os tratamentos (TTO1, TTO2, TTO3, TTO4), com utilização do Teste de Fisher. No entanto, não foi encontrada diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$).

- TNF- α

Na estatística descritiva, houve variação na marcação da expressão de TNF- α , no epitélio, dessa forma, este compartimento foi selecionado para a comparação feita com o Teste Fisher, acerca dos diferentes tratamentos testados (TTO1, TTO2, TTO3, TTO4). No entanto, não foi encontrada diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$).

- IFN- γ

Na avaliação da intensidade da expressão do infiltrado inflamatório, observou-se uma variação na intensidade de expressão de IFN- γ entre os tratamentos. Dessa forma, foi realizado o Teste de Fisher, comparando os tratamentos entre si (TTO1, TTO2, TTO3, TTO4). No entanto, não foi encontrada diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$).

8.4.3.2. Distribuição da imunomarcção das citocinas na pele de pálpebra

- IL-1 β

Na avaliação da distribuição de IL-1 β , observou-se que no epitélio e infiltrado inflamatório da pele de pálpebra, apresentou o padrão de distribuição 1 (25 a 50% das células marcadas) e no endotélio, distribuição 0 (0 a 25% das células marcadas).

- IL-10

O padrão de distribuição da marcação da citocina IL-10 no epitélio e endotélio, foi padrão 1 (25 a 50% das células marcadas) e no infiltrado inflamatório, padrão 2 (50 a 75%).

- IL-6

Para a citocina IL-6, verificou-se que houve predomínio da marcação de distribuição máxima, que seria o *score* 3 (marcação em mais de 75% das células).

- IL-18

A imunomarcção da citocina IL-18, no epitélio e infiltrado inflamatório apresentou padrão de a distribuição 2 e 3 e, no endotélio prevaleceu o padrão de distribuição 0 (0 e 25%).

- TNF- α

A distribuição da imunomarcção de TNF- α com padrão *scores* 1 e 3 em todos os tratamentos foi verificada no epitélio e infiltrado inflamatório, entretanto, no endotélio foi observado o padrão 3 (marcação em mais de 75% das células).

- IFN- γ

A distribuição da imunomarcção de IFN- γ foi semelhante à observada para IL-6. Nos três compartimentos – epitélio, infiltrado inflamatório e endotélio, foi verificado um *score* de distribuição 3, ou seja, com mais de 75% das células marcadas, como mostrado na Figura 24.

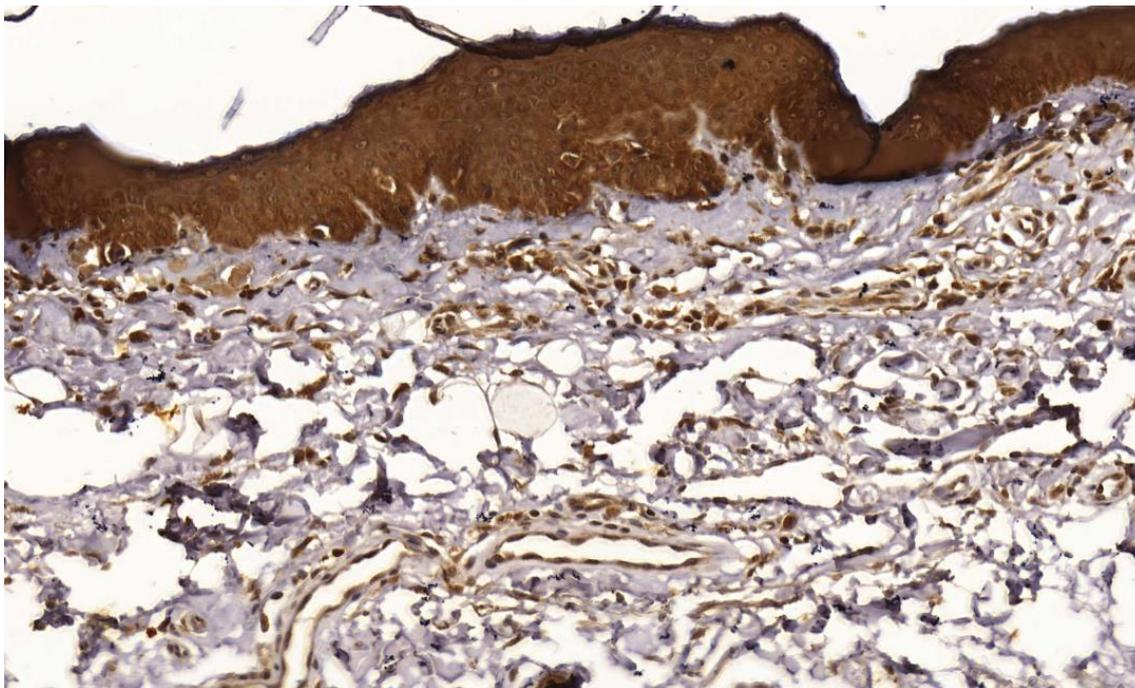


Figura 24 – Distribuição da imunomarcagem de IFN- γ na pele de pálpebra, aumento de 20x, com marcação forte para epitélio, endotélio e infiltrado celular perivascular.

8.4.4. Correlação da análise histológica e análise imunohistoquímica

Ao longo do trabalho, as técnicas de análise histológica em coloração HE e de imunohistoquímica para verificação da expressão de citocinas foram realizadas em todas as amostras de pele (mama e pálpebra), explorando as vantagens de cada uma delas.

Na análise histológica, verificou-se, a partir da administração do lisado de BL51A (TTO2), um aumento no número médio das células inflamatórias ao redor dos vasos sanguíneos. E é esse o papel de uma análise histológica: um retrato daquele momento, mostrando o número de componentes presentes. No entanto, a técnica de análise histológica não revela qual é a função das células observadas, o que pode ser verificado por meio da técnica da imunohistoquímica.

Dessa forma, foi realizada uma correlação entre o número de células observado na análise histológica com sua função, produção de citocinas anti e/ou pró-inflamatórias, o que foi verificado pela técnica de imunohistoquímica.

De acordo com a Tabela 3, verificou-se que correlacionando a expressão de citocinas com o infiltrado inflamatório, houve resultados significativos.

Houve uma correlação negativa para IL-1 β e o número de células perivasculares e TNF- α e o número de células perivasculares e uma correlação positiva entre a expressão de IL-10 e o número de células perivasculares e IFN- γ e o número de células perivasculares, revelando uma função anti-inflamatória das células perivasculares da derme superficial e da derme profunda consideradas juntas, observadas nas lâminas de HE.

Tabela 3 – Correlação entre o número de células perivasculares total e a expressão as citocinas IL-1 β , IL-10, IL-6, IL-18, TNF- α e IFN- γ em pele de mama e pálpebra (n = 10).

Citocinas	Número de células perivasculares total (derme superficial + derme profunda)
IL-1β	r = - 0,531 p = 0,001
IL-10	r = 0,433 p = 0,039
IL-6	r = 0,316 p = 0,056
IL-18	r = 0,043 p = 0,811
TNF-α	r = -0,454 p = 0,007
INF-γ	r = 0,388 p = 0,016

r: coeficiente de correlação de Pearson; p: nível de significância

Em amostras de pele de pálpebra e mama tratadas com BL51A, houve um aumento no número de células inflamatórias extravasadas, apresentando uma maior produção da citocina anti-inflamatória IL-10, bem como diminuição na expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , indicando que tais células possuíam função anti-inflamatória.

Nas amostras de pele tratadas simultaneamente com de BL51A e SP, foi verificada uma diminuição no número de células anti-inflamatórias perivasculares, com menor produção de IL-10.

Segundo Lee e colaboradores (2013), após o estímulos irritantes na pele, ocorre a perda da barreira epidérmica com liberação de mediadores pró-inflamatórios, como IL-1 e TNF- α . Isso resulta na estimulação da produção de citocinas e quimiocinas, por queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais, estímulo à produção de moléculas de adesão em células endoteliais e subsequente recrutamento de leucócitos, dessa forma perpetuando uma inflamação contínua. No presente estudo, houve correlação negativa entre o número de células perivasculares e a expressão de IL-1 β , indicando que essas células tiveram a produção dessa citocina inibida. As ações de IL-1 β e de IL-1 α são pleiotrópicas e envolvem a ativação de células dendríticas e células T, posterior produção de citocinas e quimiocinas e estímulo à produção de moléculas de adesão, como ICAM-1 nas células endoteliais e fibroblastos, que levam à perpetuação da inflamação cutânea (Lee et al., 2013). Os nossos resultados corroboram com os dados de Sugimoto e colaboradores (2012), que verificaram que a administração oral de *B. breve* na dose de $1,7 \times 10^9$ UFC por dia em um modelo murino, via oral, preveniu danos causados à pele pela radiação UV, tendo diminuído a atividade da elastase e níveis de IL-1 β na pele, diminuindo a formação de sulcos, melhorando a elasticidade e aparência da pele de animais expostos à radiação UV.

Observou-se uma correlação negativa entre o infiltrado e a expressão de TNF- α , ou seja, inibição da expressão nas células perivasculares extravasadas. Os efeitos de TNF- α também são pleiotrópicos, levando a uma maior produção de moléculas de adesão celular, como ICAM-1 nos queratinócitos e células endoteliais e posterior indução de mediadores inflamatórios como IL-1, IL-6, GM-CSF, IFN- γ e CXCL8 (Lee et al., 2013). Esses dados corroboram com Guéniche e colaboradores (2010a) e Guéniche e colaboradores (2010b), que também verificaram menor expressão de TNF- α mediante a administração de LPST11. Vale ressaltar que o trabalho de Guéniche e colaboradores (2010a) utilizou o mesmo modelo de cultura de pele empregado no presente trabalho.

Vieira e colaboradores (2012) verificaram uma redução nos níveis de TNF- α , por ELISA, no tecido da articulação tarsotibial em um modelo de artrite em camundongos tratados oralmente com *S. cerevisiae* enriquecida com selênio (Selemax).

A administração de *S. boulardii* oral a camundongos infectados por *S. Typhimurium* também resultou em uma menor expressão da citocina inflamatória TNF- α (Martins et al., 2013). O mesmo foi observado pela administração de *S. cerevisiae* 905 a camundongos também infectados por *S. Typhimurium* (Martins et al., 2011).

Vieira e colaboradores (2015a) verificaram em um modelo murino de gota que, mediante a administração oral de BL51A, os parâmetros inflamatórios foram aliviados, com um número menor de neutrófilos na articulação, uma menor atividade de mieloperoxidase no tecido periarticular e menores níveis de IL-1 β na articulação dos animais tratados. Os níveis de IL-10 na articulação do joelho, determinados por ELISA, foram maiores do que os níveis dessa citocina nos animais não tratados com BL51A. Além disso, Vieira e colaboradores (2015b), em um modelo murino de infecção pulmonar por *Klebsiella pneumoniae*, verificaram uma resolução do quadro mais rápida nos animais tratados com BL51A, com menor dano pulmonar, uma atenuação da mortalidade e uma grande redução na carga bacteriana graças à maior produção de IL-10 no pulmão, que desempenhou o papel principal na resolução da infecção e restaurou a homeostase do tecido. Esses dados demonstram que a capacidade imunomoduladora de BL51A está intimamente ligada à expressão de IL-10, como visto no presente trabalho, no qual foi observado um aumento da expressão da citocina IL-10 indicando estímulo da função anti-inflamatória mediante a administração do lisado de BL51A no nosso modelo *in vitro* de cultura de pele humana.

Levkovich e colaboradores (2013) observaram que camundongos recebendo *Lactobacillus reuteri* em sua forma ativa, via oral, tinham a pele com aparência mais saudável apresentando aumento na espessura da derme, crescimento robusto dos pelos e pH cutâneo significativamente mais baixo, sugerindo uma interação com a microbiota residente. Esses efeitos foram relacionados a um aumento sérico de IL-10. Em camundongos *knock-out* para IL-10, a administração de probióticos não foi capaz de induzir o brilho no pelo, e esses animais possuíam níveis de pH cutâneos mais alcalinos demonstrando a importância de IL-10 para controle da inflamação.

A IL-10 é produzida pelos queratinócitos e células T. Possui ação anti-inflamatória, inibindo a produção de IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, TNF- α e IFN- γ e diminuindo a produção de moléculas de adesão (Lee et al., 2013). Em camundongos *knock-out*, foi observado que IL-10 funciona para completar reações inflamatórias e restaurar as interações entre citocinas epidérmicas aos níveis basais, pela inibição da

produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e TNF- α (Uchi et al., 2000), corroborando com os dados encontrados no presente trabalho, demonstrando que, quanto maior o número de células no infiltrado, maior a expressão de IL-10 e menor a expressão de IL-1 β e TNF- α .

Acerca dos dados de IFN- γ , no presente estudo foi encontrada uma correlação positiva da expressão de IFN- γ e o número de células perivasculares. O IFN- γ é a principal citocina efetora da resposta Th1 e é crucial na resolução de imunopatologias relacionadas a alergias devido a seu perfil inibitório de resposta contra alérgenos (Teixeira et al., 2005).

O balanço Th1/Th2 é extremamente importante e pode determinar se a resposta imune é apropriada ou se ela leva à ocorrência de doenças relacionadas ao sistema imunológico. Uma superprodução de citocinas Th1 é relacionada à hipersensibilidade tardia e doenças auto-imunes. Por outro lado, a base para as doenças alérgicas é o desequilíbrio no fenótipo Th2 (Abbas et al., 1996).

INF- γ promove a diferenciação de linfócitos Th0 em subpopulações Th1, age nas células B para inibir a produção de IgE e inibe a proliferação de linfócitos Th2 (Drago et al., 2012).

Esse aumento na expressão de IFN- γ mediante um aumento no número de células perivasculares, causado pela administração do lisado de BL51A corrobora com os dados de Kamyia e colaboradores (2016), que também verificaram um aumento na expressão de IFN- γ diante da administração de *Streptococcus termophilus*, promovendo imunidade protetora aos camundongos que receberam o probiótico. A administração de bactérias ácido láticas aumentou significativamente a produção de IFN- γ e, simultaneamente, suprimiu as citocinas Th2, modulando a diferenciação das células Th para Th1 e células produtoras de IFN- γ , tornando-as predominantes na cultura celular.

A administração de *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC a camundongos levou ao aumento de INF- γ , em um modelo de dermatite atópica, com diminuição dos sinais clínicos de dermatite, uma menor frequência de prurido e menores níveis de IgE sanguíneos (Tanaka et al., 2009).

Lei e colaboradores (2016) também verificaram que a administração oral de *L. rhamnosus* GG e *Escherichia coli* Nissle 1917 combinados estimulou a produção de IFN- γ , em modelo gnotobiótico, que levou a um aumento na IgA intestinal e IgG, protegendo os animais e diminuindo a diarreia causada por norovírus humano (HuNoV).

Drago e colaboradores (2010), em um modelo *in vitro* verificaram que diferentes cepas de um mesmo micro-organismo podem ter ações contrárias na imunomodulação. Enquanto a administração de *L. salivarius* LDR0723 (depois patenteado como *L. salivarius* LS01 DSM 22775) e *L. salivarius* CRL1528 levaram ao aumento na produção de INF- γ e diminuição na produção de IL-4 e IL-5, favorecendo uma resposta Th1, a administração de *L. salivarius* BNL1059 e *L. salivarius* RGS1746 provocou um efeito inverso, favorecendo a produção de citocinas Th2, ou seja, cepas diferentes da mesma espécie tiveram efeitos opostos, demonstrando que é necessário muito cuidado na avaliação de propriedades anti-inflamatórias de bactérias, que devem ser realizadas sempre com a mesma cepa antes de considerar sua utilização como probiótico.

Em um ensaio clínico realizado com pacientes adultos com diagnóstico de dermatite atópica, a administração via oral de *Lactobacillus salivarius* LS01 DSM 22775 em sua forma ativa foi capaz de diminuir o SCORAD dos pacientes, bem como a carga bacteriana de *Staphylococcus aureus* na pele, estimulando a produção de citocinas Th1, com aumento na produção de INF- γ . Mais uma vez, os pesquisadores encontraram resultados de imunomodulação opostos em cepas bacterianas distintas da mesma espécie (Drago et al., 2012).

Devido ao pequeno número de amostras, não foi possível fazer a correlação para cada tratamento separadamente. No entanto, um maior número de células perivasculares foi correlacionado a uma maior atividade anti-inflamatória, sendo que esse maior número de células foi observado, predominantemente, no TTO2, que recebeu a administração do lisado de BL51A, atribuindo a presença dessas células à atividade imunomoduladora deste probiótico.

Nas amostras de pele tratadas somente com SP (TTO3), tratadas simultaneamente com lisado de BL51A e SP (TTO4) e também nas amostras controle não tratadas (TTO1) foi verificado baixo número de células perivasculares.

Em estudos futuros, com maior número de amostras, a correlação de acordo com cada tratamento poderá complementar as informações obtidas no presente estudo. A análise da expressão de TGF- β , citocina anti-inflamatória também irá contribuir para o entendimento da função das células perivasculares no modelo experimental estudado.

9. SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Os resultados obtidos no presente estudo podem ser resumidos como a seguir:

- Sensibilizações tópicas sucessivas com o agente irritante oxazolona induziu um aumento na atividade da enzima peroxidase eosinofílica (EPO) na pele de camundongos *hairless* indicando a eliciação de processo inflamatório na pele.
- O tratamento com BL51A levou a uma redução significativa da medida da EPO nos camundongos *hairless* sensibilizados pela oxazolona e tratados com BL51A ativa, via oral, demonstrando efeito modulador desta bifidobactéria sobre este indicador de eosinofilia tecidual.
- O modelo de cultura de pele humana descrito por Guéniche e colaboradores (2010) funcionou melhor em amostras de pele de pálpebra do que em amostras de pele de mama, uma vez que, comparando-se as amostras de pele de mama e de pálpebra, ocorreu um maior extravasamento de células perivasculares com perfil anti-inflamatório nas amostras de pele de pálpebra tratadas com BL51A.
- Para pálpebra, a administração de substância P na cultura de pele induziu um pequeno aumento no número médio de células ao redor dos vasos sanguíneos na derme. Para mama, não houve aumento do número de tais células.
- A pele em cultura, tanto de mama quanto de pálpebra, apresenta uma resposta inflamatória natural, como verificado nas amostras não tratadas.
- A administração do lisado de BL51A induziu um aumento no número médio de células ao redor dos vasos sanguíneos da derme. Na derme superficial, esse número foi maior do que na derme profunda, em todos os casos. A análise imunohistoquímica da expressão de várias citocinas sugeriu uma função anti-inflamatória destas células perivasculares.
- O tratamento com o lisado de BL51A (aplicado por cima do epitélio) simultaneamente com o tratamento com a SP (diluída no meio de cultura DMEM – em contato com a derme profunda) levou a uma diminuição no número de células ao redor dos vasos sanguíneos da derme nas amostras de pálpebra, o que revela, indiretamente, o mecanismo inflamatório da SP, diante de uma diminuição do número de células anti-inflamatórias extravasadas observado neste tratamento.

- Esses resultados demonstraram que o modelo de inflamação em cultura de células induzida pela SP proposto na literatura para simular um quadro de dermatite não apresentou o efeito inflamatório robusto descrito pelos autores, nas condições do presente estudo.

10. CONCLUSÃO

A sensibilização de camundongos *hairless* com a oxazolona gerou um aumento na atividade de peroxidase eosinofílica na pele e esse aumento foi controlado pela administração oral de BL51A em sua forma ativa, na concentração de 10^8 UFC/mL. A administração tópica do lisado de BL51A em modelo de cultura de pele induziu um maior extravasamento de células dos vasos da derme superficial e derme profunda, provocando o aumento dos níveis de IL-10, IFN- γ e diminuição dos níveis de IL-1 β e TNF- α produzidos por tais células, indicando que a capacidade probiótica deste microrganismo seria via imunomodulação da pele tratada.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; MURPHY, K. M.; SHER, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, v. 383, p. 787-793, 1996.
- ARCK, P. C.; HANDJISK, B.; HAGEN, E. et al. Indications for a “brain-hair follicle axis (BHA)”: inhibition of keratinocyte proliferation and up-regulation of keratinocyte apoptosis in telogen hair follicles by stress and substance P. *FASEB Journal*, v. 15, p. 2536-2538, 2001.
- ARCK, P. C.; SLOMINSKI, A.; THEORARIDES, T. C. et al., Neuroimmunology of stress: skin takes center stage. *The Journal of Investigative Dermatology*, v. 126, p. 1697-1704, 2006.
- ASSIS, B. S.; GERMON, P.; SILVA, A. M. et al. *Lactococcus lactis* V7 inhibits the cell invasion of bovine mammary epithelial cells by *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Beneficial Microbes*, v. 6, p. 879-886, 2015.
- BABA, H.; MASUYAMA, A.; TAKANO, T. Short Communication: effects of *Lactobacillus helveticus* fermented milk on the differentiation of cultured normal human epidermal keratinocytes. *Journal of Dairy Science*, v. 89, p. 2072-2075, 2006.
- BABA, H.; MASUYAMA, A.; YOSHIMURA, C. et al. Oral intake of *Lactobacillus helveticus* – fermented milk whey decreased transipidermal water loss and prevented the onset of sodium dodecylsulfate-induced dermatitis in mice. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 74, p. 18-23, 2010.
- BERNET-CAMARD, M.; LIÉVIN, V.; BRASSART, D. et al. The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substance(s) active *in vitro* and *in vivo*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, p. 2747-2753, 1997.
- BOISNIC, S.; BRANCHET-GUMILA, M. C.; CHARPENTIER, Y. L.; et al. Repair of UVA-induced elastic fiber and collagen damage by 0,05% retinaldehyde cream in an *ex vivo* human skin model. *Dermatology*, v. 199, p. 43-48, 1999.
- BOISNIC, S.; BRANCHET-GUMILA, M. C.; COUNTACEAU, C. Inhibitory effect of Avene spring water on vasoactive intestinal peptide-induced inflammation in

- surviving human skin. *International Journal of Tissue Reactions*, v. 23, p. 89-95, 2001.
- BOISNIC, S.; BRANCHET-GUMILA, M. C.; COUNTACEAU, C. Inhibitory effect of oatmeal extract oligomer on vasoactive intestinal peptide-induced inflammation in surviving human skin. *International Journal of Tissue Reactions*, v. 25, p. 41-46, 2003.
- BOJAR, R.A.; HOLLAND, K.T. Review: the human cutaneous microflora and factors controlling colonisation. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 18, p. 889-903, 2002.
- BOWE, W.; PATEL, N. B.; LOGAN, A. C. Acne vulgaris, probiotics, and the gut-brain-skin axis: from anecdote to translational medicine. *Beneficial Microbes*, v. 5, p. 185-199, 2014.
- BRAIDO, F.; TARANTINI, F.; GHIGLIONI, V. et al. Bacterial lysate in the prevention of acute exacerbation of COPD and in respiratory recurrent infections. *International Journal of COPD*, v. 2, p. 336-345, 2007.
- BRANCHET-GUMILA, M. C.; BOISNIC, S.; LE CHARPENTIER, Y. et al. Neurogenic modifications induced by substance P in an organ culture of human skin. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, v. 12, p. 211-220, 1999.
- CETEA/UFMG (Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais). *Protocolos anestésicos: Protocolos anestésicos comumente utilizados em animais de pequeno porte*. Link: <https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/>. Acesso em Março de 2013.
- COGEN, A.L.; NIZET, V.; GALLO, R.L. Skin microbiota: a source of disease or defence? *British Journal of Dermatology*, v. 158, p. 442-455, 2008.
- CORK, M. J.; DANBY, S. G.; VASILOPOULOS, Y. Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis. *The Journal of Investigative Dermatology*, v. 129, p. 1892-1908, 2009.
- CORSINI, E.; GALLI, C. L. Epidermal cytokines in experimental contact dermatitis. *Toxicology*, v. 152, p. 203-211, 2000.
- COSTA, D. J.; MARTEAU, P.; AMOUYAL, M. et al. Efficacy and safety of the probiotic *Lactobacillus paracasei* LP-33 in allergic rhinitis: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial (GA2LEN Study). *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 68, p. 602-607, 2014.

- DATAR, P.; SRIVASTAVA, S.; COUTINHO, E. et al. Substance P: Structure, function and therapeutics. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 4, p. 75-103, 2004.
- DI MARZIO, L.; CENTI, C.; CINQUE, B. et al. Effect of the lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus* on stratum corneum ceramide levels and signs and symptoms of atopic dermatitis patients. *Experimental Dermatology*, v. 12, p.615-620, 2003.
- DRAGO, L.; NICOLA, L.; IEMOLI, E. et al. Strain-dependent release of cytokines modulated by *Lactobacillus salivarius* human isolates in an *in vitro* model. *BMC Research Notes*, v. 3, doi: 10.1186/1756-0500-3-44, 2010.
- DRAGO, L.; TOSCANO, M.; VECCHI, E. et al. Changing of fecal flora and clinical effect of *L. salivarius* LS01 in adults with atopic dermatitis. *Journal of Clinical Gastroenterology*, v. 46, p. 56-63, 2012.
- ELIAN, S. D. A.; SOUZA, E. L. S.; VIEIRA, A. T. et al. *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* BB-02 attenuates acute murine experimental modelo f inflammatory bowel disease. *Beneficial Microbes*, v. 6, p. 277-286, 2015.
- ELIAS, P. M. An appropriate response to the black-box warning: corrective, barrier repair therapy in atopic dermatitis. *Clinical and Medical Dermatology*, v. 2, p. 1-3, 2009.
- FAO/WHO.Food and Agriculture Organization / World Health Organization. *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. London, Ontario, Canada. 11p. April 30 and May 1, 2002.
- FOWLER, A. J.; SHEU, M. Y.; SCHMUTH, M. et al. Liver X receptor activators display anti-inflammatory activity in irritant and allergic contact dermatitis models: liver-x-receptor-specific inhibition of inflammation and primary cytokine production. *The Society for Investigative Dermatology*, v. 120, p. 246-255, 2003.
- FREITAS, O. G. de; QUIEREGATTO, P. R.; HOCHMAN, B. et al. Does dexamethasone act in neuropeptides SP and CGRP in neurogenic inflammation of the skin? An experimental study. *Acta Cirurgica Brasileira*, v. 30, p. 523-528, 2015.
- FRESHNAY, R. I. *Culture of Animal Cells: A manual of Basic Technique and Specialized Applications*. Sixth edition. New Jersey: JohnWiley & Sons, 2010. 732p.
- GALLO, R. L.; HOPPER, L. V. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nature Reviews Immunology*, v. 12, p. 503-516, 2012.

- GAN, B. S.; KIM, J.; REID, G. et al. *Lactobacillus fermentum* RC-14 inhibits *Staphylococcus aureus* infection of surgical implants in rats. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 185, p. 1369-1372, 2002.
- GRICE, E. A.; KONG, H. H.; RENAUD, G. et al. A diversity profile of the human skin microbiota. *Genome Research*, v. 18, p. 1043-1050, 2008.
- GRICE, E. A.; KONG, H. H.; COLAN, S. et al. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science*, v. 324, p. 1190-1192, 2009.
- GRICE, E. A.; SEGRE, J. A. The skin microbiome. *Nature Reviews. Microbiology*, v. 9, p. 244-253, 2011.
- GRÖNE, A. Keratinocytes and cytokines. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 88, p. 1-12, 2002.
- GUÉNICHE, A.; BUETLER, T.; BENYACOUB, J. et al. *Lactobacillus johnsonii* provides a dose dependent protection against UVR-induced immunosuppression. *European Journal of Dermatology*, v. 18, p. 466-467, 2008a.
- GUÉNICHE, A.; KNAUDT, B.; SCHUCK, E. et al. Effects of non-pathogenic Gram-negative bacterium *Vitreoscilla filiformis* lysate in atopic dermatitis: a prospective, randomized, double-blind, placebo controlled clinical study. *British Journal of Dermatology*, v. 159, p. 1357-1363, 2008b.
- GUÉNICHE, A.; CATHELIN, A. C.; BASTIEN, P. et al. *Vitreoscilla filiformis* biomass improves seborrheic dermatitis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 22, p. 1014-1015, 2008c.
- GUÉNICHE, A.; PHILIPPE, D.; BASTIEN, P. et al. Probiotics for photoprotection. *Dermato-Endocrinology*, v. 1, p. 275-279, 2009.
- GUÉNICHE, A.; BASTIEN, P.; OVIGNE, J. M. *Bifidobacterium longum* lysate, a new ingredient for reactive skin. *Experimental Dermatology*, v. 19, p. e1-e8, 2010a.
- GUÉNICHE, A.; BENYACOUB, J.; PHILIPPE, D. et al. *Lactobacillus paracasei* CNCM I-2116 (ST11) inhibits substance P-induced skin inflammation and accelerates skin barrier function recovery *in vitro*. *European Journal of Dermatology*, v. 20, p. 731-737, 2010b.
- GUÉNICHE, A.; PHILIPPE, D.; BASTIEN, P. et al. Randomised double-blind placebo-controlled study of the effect of *Lactobacillus paracasei* NCC2461 on skin reactivity. *Beneficial Microbes*, v. 5, p. 137-145, 2014.

- GUERRA, P. V. P.; LIMA, L. N.; SOUZA, T. C. et al. Pediatric functional constipation treatment with *Bifidobacterium*-containing yogurt: A crossover, double-blind, controlled trial. *World Journal of Gastroenterology*, v. 17, p. 3916-3921, 2011.
- HAN, Y.; KIM, B.; BAN, J. et al. A randomized trial of *Lactobacillus plantarum* CJLP133 for the treatment of atopic dermatitis. *Pediatric Allergy and Immunology*, v. 23, p. 667-673, 2012.
- HATANO, Y.; MAN, M.; UCHIDA, Y. Murine atopic dermatitis responds to peroxisome proliferator-activated receptors α and β/δ (but not γ) and liver X receptors activators. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 125, p. 160-169, 2010.
- HOUGEE, S.; VRIESEMA, A. J.; WIJERING, S. C. et al. Oral treatment with probiotics reduces allergic symptoms in ovalbumin-sensitized mice: a bacterial strain comparative study. *International Archives of Allergy and Immunology*, v. 151, p. 107-117, 2010.
- HSIAO, E. Y.; MCBRIDE, S. W.; HSIEN, S. et al. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell*, v. 155, p. 1451-1463, 2013.
- INOUE, Y.; IWABUCHI, N.; XIAO, J. Z. et al. Suppressive effects of *Bifidobacterium breve* strain M-16V on T helper type 2 immune responses in a murine model. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 32, p. 760-763, 2009.
- ISHII, Y.; SUGIMOTO, S.; IZAWA, N. et al. Oral administration of *Bifidobacterium breve* attenuates UV-induced barrier perturbation and oxidative stress in hairless mice skin. *Archives of Dermatological Research*, v. 306, p. 467-473, 2014.
- JOHNSON, T.; KANG, D.; BARNARD, E. et al. Strain-level differences in porphyrin production and regulation in *Propionibacterium acnes* elucidate disease associations. *mSphere*, v. 1, doi: 10.1128/mSphere.00023-15, 2016.
- KALLIOMAKI, M.; SALMINEN, S.; ARVILOMMI, H. et al. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *The Lancet*, v. 357, p. 1076-1079, 2001.
- KALLIOMAKI, M.; SALMINEN, S.; POUSSA, T. et al. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow up of a randomised placebo-controlled trial. *The Lancet*, v. 361, p. 1869-1871, 2003.
- KALLIOMAKI, M.; SALMINEN, S.; POUSSA, T. et al. Probiotics during the first 7 years of life: a cumulative risk reduction of eczema in a randomized, placebo-

- controlled trial. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 119, p 1019-1021, 2007.
- KAMYIA, T.; WATANABE, Y.; MAKINO, S. et al. Improvement of intestinal immune cell function by acid lactic bacteria for dairy products. *Microorganisms*, v. 5, doi: 10.3390/microorganisms5010001, 2016.
- KANG, D.; SHI, B.; ERFE, M. C. et al. Vitamin B12 modulates the transcriptome of the skin microbiota in acne pathogenesis. *Science Translational Medicine*, v. 7, doi: 10.1126/scitranslmed.aab2009, 2015.
- KHANI, S.; HOSSEINI, H. M.; TAHERI, M. et al. Probiotics as an alternative strategy for prevention and treatment of human diseases: a review. *Inflammation & Allergy - Drug Targets*, v. 11, p. 79-89, 2012.
- KIM, H. M.; LEE, D. E.; PARK, S. D. et al. Oral administration of *Lactobacillus plantarum* HY7714 protects hairless mouse against ultraviolet-B induced photoaging. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 24, p. 1583-1591, 2014.
- KONDO, S. The roles of cytokines in photoaging. *Journal of Dermatological Science*, v. 23, p. 30-36, 2000.
- KONG, H. H. Skin microbiome: genomics-based insights into the diversity and role of skin microbes. *Trends in Molecular Medicine*, v. 17, p. 320-328, 2011.
- KONG, H. H.; SEGRE, J. A. Skin microbiome: looking back to move forward. *The Journal of Investigative Dermatology*, v. 132, p. 933-939, 2012.
- KWON, H. S.; YANG, E. H.; LEE, S. H. et al. Rapid identification of potentially probiotic *Bifidobacterium* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S RNA. *FEMS Microbiology Letters*, v. 250, p. 55-62, 2005.
- LEAL, E. C.; CARVALHO, E.; TELLECHEA, A. et al. Substance P promotes wound healing in diabetes by modulating inflammation and macrophage phenotype. *The American Journal of Pathology*, v. 185, p. 1638-1648, 2015.
- LEE, W. J.; JUNG, H. D.; LEE, H. J. et al. Influence of substance P on cultured sebocytes. *Archives of Dermatological Research*, v. 300, p. 311-316, 2008.
- LEE, J.; O'SULLIVAN, D. J. Genomic insights into bifidobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 74, p. 378-416, 2010.

- LEE, H. Y.; STIEGER, M.; YAWALKAR, N. et al. Cytokines and chemokines in irritant contact dermatitis. *Mediators in Inflammation*, 2013:916497, 7p., doi: 10.1155/2013/916497, 2013.
- LEI, S.; RAMESH, A.; TWITCHELL, E. et al. High protective efficacy of probiotics and rice bran against Human Norovirus infection and diarrhea in gnotobiotic pigs. *Frontiers in Microbiology*, 7:1699, 2016.
- LEVKOVICH, T.; POUTAHIDIS, T.; SMILLIE, C. et al. Probiotic bacteria induce a “glow of health”. *Plos One*, v. 8, e53867, 2013.
- LEW, L.; LIONG, M. Bioactives from probiotics for dermal health: functions and benefits. *Journal of Applied Microbiology*, v. 114, p. 1241-1253, 2013.
- LILLEY, D. M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, v. 147, p. 747-748, 1965.
- LOTTI, T.; HAUTMANN, G.; PANCONESI, E. Neuropeptides in skin. *Journal of American Academy of Dermatology*, v. 33, p. 482-496, 1995.
- LOTTI, T.; STÄNDER, S. Research in practice: substance P antagonism in chronic pruritus. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, v. 12, p. 557-559, 2014.
- LIU, N.; WANG, L. H.; GUO, L. L. et al. Chronic restraint stress inhibits hair growth via substance P mediated by reactive oxygen species in mice. *PLoS One*, v. 8, e61574, 2013.
- MALHOTRA, R. Understanding migraine: potential role of neurogenic inflammation. *Annals of Indian Academy of Neurology*, v. 19, p. 175-182, 2016.
- MAN, M.; HATANO, Y.; LEE, S. H. et al. Characterization of a hapten-induced, murine model with multiple features of atopic dermatitis: structural, immunologic and biochemical changes following single versus multiple oxazolone challenges. *The Journal of Investigative Dermatology*, v. 128, p. 79-86, 2007.
- MAN, M.; SHI, Y.; MAN, M. et al. Chinese herbal medicine (Tuhuai extract) exhibits anti-proliferative and anti-inflammatory activity in murine disease models. *Experimental Dermatology*, v. 17, p. 681-687, 2008.
- MAN, M.; HUPE, M.; SUN, R. et al. Topical apigenin alleviates cutaneous inflammation in murine models. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2012, 7 p., 2012.

- MARTINS, F. S.; DALMASSO, G.; ARANTES, R. M. et al. Interaction of *Saccharomyces boulardii* with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium protects mice and modifies T84 cell response to the infection. *PLoS One*, v. 5, p. e8925, 2010.
- MARTINS, F. S.; ELIAN, S. D. A.; VIEIRA, A. T. et al. Oral treatment with *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 modulates immune responses and interferes with signal pathways involved in the activation of inflammation in a murine model of typhoid fever. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 301, p. 359-364, 2011.
- MARTINS, F. S.; VIEIRA, A. T.; ELIAN, S. D. et al. Inhibition of tissue inflammation and bacterial translocation as one of protective mechanisms of *Saccharomyces boulardii* against *Salmonella* infection in mice. *Microbes and Infection*, v. 15, p. 270-279, 2013.
- MESSAOUDI M., LALONDE R., VIOLLE N. et al. Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects. *The British Journal of Nutrition*, v. 105, p. 755-764, 2011.
- MIJOUIN, L.; HILLION, M.; RAMDANI, Y. et al. Effects of a skin neuropeptide (Substance P) on cutaneous microflora. *PLoS One*, v. 8, e78773, 2013.
- MOGNA, L.; DEIDDA, F.; NICOLA, S. et al. *In vitro* inhibition of *Klebsiella pneumoniae* by *Lactobacillus delbrueckii* LDD01 (DSM 22106): an innovative strategy to possibly counteract such infections in humans? *Journal of Clinical Gastroenterology*, v. 50, p. 136-139, 2016.
- MUHAMMEDSAEED, W.; MCBAIN, A. J.; CRUICKSHANK, S. M. et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG inhibits the toxic effects of *Staphylococcus aureus* on epidermal keratinocytes. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 80, p. 5573-5781, 2014.
- MUIZZUDIN, N.; MAHER, W.; SULLIVAN, M. et al. Physiological effect of a probiotic on skin. *Journal of Cosmetic Science*, v. 63, p. 385-395, 2012.
- NARAYAN, S. S.; JALGAONKAR, S.; SHAHANI, S. Probiotics: current trends in the treatment of diarrhoea. *Hong Kong Medical Journal*, v. 16, p. 213-218, 2010.

- N'DIAYE, A.; MIJOUIN, L.; HILLION, M. et al. Effect of substance P in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* virulence: implication for skin homeostasis. *Frontiers in Microbiology*, 2013:916497, 2016.
- NESTLE, F. O.; MEGLIO, P. D.; QIN, J. et al. Skin immune sentinels in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, v. 9, p. 679-691, 2009.
- NI, T. LIU, Y.; PENG, Y. et al. Substance P induces inflammatory responses involving NF- κ B in genetically diabetic mice skin fibroblasts co-cultured with macrophages. *American Journal of Translational Research*, v. 8, p. 2179-2188, 2016.
- NICCOLI, A. A.; ARTESI, A. L.; CANDIO, F. et al. Preliminary results on clinical effects of probiotic *Lactobacillus salivarius* LS01 in children affected by atopic dermatitis. *Journal of Clinical Gastroenterology*, v. 48, p. 34-36, 2014.
- NOLTE, T.; ZADEH-KHORASANI, M.; SAFAROV, O. et al. Induction of oxazolone-mediated features of atopic dermatitis in NOD-scid IL2 γ^{null} mice engrafted with human peripheral blood mononuclear cells. *Disease Models & Mechanisms*, v. 6, p. 125-134, 2013.
- O'CONNOR, T. M.; O'CONNEL, J.; O'BRIEN D. I. et al. The role of substance P in inflammatory disease. *Journal of Cellular Physiology*, v. 201, p. 167-180, 2004.
- OH, J. W.; HSI, T.; GUERRERO-JUAREZ, C. F. et al. Organotypic skin culture. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 133, doi: 10.1038/jid.2013.387, 2013.
- ORNELLAS, R. M.; SANTOS, T. T.; ACURCIO, L. B. et al. Selection of lactic acid bacteria with probiotic potential isolated from the fermentation process of "cupuaçu" (*Theobroma grandiflorum*). *Advances in Experimental Medicine and Biology, Early View*, doi: 10.1007/5584_2017_5, 2017.
- PETERS, E. M.; ARCK, P. C.; PAUS, R. Hair growth inhibition by psychoemotional stress: a mouse model for neural mechanisms in hair growth control. *Experimental Dermatology*, v. 15, p. 1-10, 2006.
- PEYRI, J. Topical bacteriotherapy of the skin. *The Journal of Cutaneous Diseases*, v. 30, p. 688-689, 1912.
- PHILIPPE, D.; BLUM, S.; BENYACOU, J. Oral *Lactobacillus paracasei* improves skin barrier function recovery and reduces skin local inflammation. *European Journal of Dermatology*, v. 21, p. 279-280, 2011.

- POPOV, L.; KOVALSKI, J.; GRANDI, G. et al. Three-dimensional human skin models to understand *Staphylococcus aureus* skin colonization and infection. *Frontiers in Immunology*, v. 5, doi: 10.3389/fimmu.2014.00041, 2014.
- PRINCE, T.; MCBAIN, A. J.; O'NEILL, C. A. *Lactobacillus reuteri* protects epidermal keratinocytes from *Staphylococcus aureus* – induced cell death by competitive exclusion. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, p. 5119-5126, 2012.
- PUBCHEM – Open Chemistry Database / NCBI. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1712093#section=Pharmacology-and-Biochemistry>. Consultado em 23 de fevereiro de 2017.
- RA, J.; LEE, D. E.; KIM, S. H. et al. Effect of oral administration of *Lactobacillus plantarum* HY7714 on epidermal hydration in ultraviolet-B irradiated hairless mice. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 24, p. 1736-1743, 2014.
- REN, J. J.; YU, Z.; YANG, F. L. et al. Effects of *Bifidobacterium breve* feeding strategy and delivery modes on experimental allergic rhinitis mice. *Plos One*, 10(10):e0140018, 2015.
- RODRIGUES, K. L.; CAPUTO, L. R. G.; CARVALHO, J. C. T. et al. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 25, p. 404-408, 2005.
- ROKOWSKA-WALUCH, A.; PAWLACZYK, M. CYBULSKI, M. et al. Stressful events and serum concentration of substance P in acne patients. *Annals of Dermatology*, v. 28, p. 464-469, 2016.
- SATOH, T.; MURATA, M.; IWABUCHI, N. et al. Effect of *Bifidobacterium breve* B-3 on skin photoaging induced by chronic UV irradiation in mice. *Beneficial Microbes*, v. 6, p. 497- 504, 2015.
- SBCAL/COBEA (Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório / Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). Link: <http://www.cobea.org.br/>. Acesso em Março de 2013.
- SELA, D. A.; MILLS, D. A. Nursing our microbiota: molecular linkages between bifidobacteria and milk oligosaccharides. *Trends in Microbiology*, v. 18, p. 298-307, 2010.
- SHAH, M. M.; SAIO, M.; YAMASHITA, H. et al. *Lactobacillus acidophilus* strain L-92 induces CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells and supresses allergic contact dermatitis, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 35, p. 612-616, 2012.

- SCHELLER, J.; CHALARIS, A.; SCHMIDT-ARRAS, D. et al. Pro and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1813, p. 878-888, 2011.
- SHEU, M. Y.; FOWLER, A. J.; KAO, J. et al. Topical peroxisome proliferator activated receptor- α activators reduce inflammation in irritant and allergic contact dermatitis models. *The Journal of Investigative Medicine*, v. 118, p. 94-101, 2002.
- SHIN, J. H.; CHUNG, M. J.; SEO, J. G. A multistrain probiotic formulation attenuates skin symptoms of atopic dermatitis in a mouse model through the generation of CD4+Foxp3+T cells. *Food & Nutrition Research*, v. 60. doi: 10.3402/fnr.v60.32550, 2016.
- SOUZA, T. C.; ZACARIAS, M. F.; SILVA, A. M. et al. Cell viability and immunostimulating and protective capacities of *Bifidobacterium longum* 5^{1A} are differentially affected by technological variables in fermented milks. *Journal of Applied Microbiology*, v. 112, p. 1184-1192, 2012.
- SOUZA, T. C.; SILVA, A. M.; DREWS, J. R. et al. In vitro evaluation of *Bifidobacterium* strains of human origin for potential use in probiotic functional foods. *Beneficial Microbes*, v. 4, p. 179-186, 2013.
- SOUZA, E. L.; ELIAN, S. D.; PAULA, L. M. et al. *Escherichia coli* strain Nissle 1917 ameliorates experimental colitis by modulating intestinal permeability, the inflammatory response and clinical signs in a faecal transplantation model. *Journal of Medical Microbiology*, v. 65, p. 201-210, 2016.
- STRATH M, WARREN DJ, SANDERSON CJ. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. *Journal of Immunological Methods*, 83:209-215, 1985.
- SUGIMOTO, S.; ISHII, Y.; IZAWA, N. Photoprotective effects of *Bifidobacterium breve* supplementation against skin damage induced by ultraviolet irradiation in hairless mice. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, v. 28, p. 312-319, 2012.
- SULTANA, R.; MCBAIN, A. J.; O'NEILL, C. A. Strain-dependent augmentation of tight-junction barrier function in human primary epidermal keratinocytes by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* lysates. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 79, p. 4887-4894, 2013.

- TANAKA, A.; JUNG, K.; BENYACOUB, J. et al. Oral supplementation with *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724 prevents development of atopic dermatitis in NC/NgaTnd mice possibly by modulating local production of IFN- γ . *Experimental Dermatology*, v. 18, p. 1022-1027, 2009.
- TANAKA, A.; AMAGAI, Y.; OIDA, K. et al. Recent findings in mouse models for human atopic dermatitis. *Experimental Animals*, v. 61, p. 77-84, 2011.
- TEITELBAUM, J. E.; WALKER, W. A. Nutritional impact of pre and probiotics as protective gastrointestinal organisms. *Annual Review of Nutrition*, v. 22, p. 107-138, 2002.
- TEIXEIRA, L. K.; FONSECA, B. P. F.; BARBOZA, B. A. et al. The role of interferon- γ on immune and allergic responses. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, p. 137-144, 2005.
- TIAGO, F. C. P.; MARTINS, F. S.; SOUZA, E. L. S. et al. Adhesion to the yeast cell surface as a mechanism for trapping pathogenic bacteria by *Saccharomyces* probiotics. *Journal of Medical Microbiology*, v. 61, p. 1194 – 1207, 2012.
- TIAGO, F. C.; PORTO, B. A.; RIBEIRO, N. S. et al. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG A-905 in experimental model of inflammatory bowel disease. *Beneficial Microbes*, v. 6, p. 807-815, 2015.
- TILLISCH, K.; LABUS, J.; KILPATRICK, L. et al. Consumption of fermented milk product with probiotic modulates brain activity. *Gastroenterology*, v. 144, p. 1394-1401, 2013.
- UCHI, H.; TERAOKA, H.; KOGA, T. et al. Cytokines and chemokines in the epidermis. *Journal of Dermatological Science*, v. 24, p. 29-38, 2000.
- VALDMAN-GRINSHPOUN, Y.; BEN-AMITAI, D.; ZVULUNOV, A. Barrier restoring therapies in atopic dermatitis: current approaches and future perspectives. *Dermatology Research and Practice*, v. 2012, 923134, 2012.
- VERDU, E. F.; BERCIK, P.; VERMA-GANDHU, M. et al. Specific probiotic therapy attenuates antibiotic induced visceral hypersensitivity in mice. *Gut*, v. 55, p. 182-190, 2006.
- VIEIRA, A. T.; SILVEIRA, K. D.; ARRUDA, M. C. et al. Treatment with Selemax®, a selenium enriched-yeast, ameliorates experimental arthritis in rats and mice. *The British Journal of Nutrition*, v. 108, p. 1829-1838, 2012.

- VIEIRA, A. T.; TEIXEIRA, M. M.; MATIRNS, F. S. The role of probiotics and prebiotics in inducing gut immunity. *Frontiers in Immunology*, 4:445, 2013.
- VIEIRA, A. T.; GALVÃO, I.; AMARAL, F. A. et al. Oral treatment with *Bifidobacterium longum* 5^{1A} reduced inflammation in a murine experimental model of gout. *Beneficial Microbes*, v. 6, p. 799-806, 2015a.
- VIEIRA, A. T.; ROCHA, V. M.; TAVARES, L. et al. Control of *Klebsiella pneumonia* pulmonary infection and immunomodulation by oral treatment with the commensal probiotic *Bifidobacterium longum* 5^{1A}. *Microbes and Infection*, v. 18, p. 180-189, 2015b.
- VIEIRA, A. T.; GALVÃO, I.; MARCIA, L. M. et al. Dietary fiber and the short-chain fatty acid acetate promote resolution of neutrophilic inflammation in a model of gout in mice. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 101, p. 275-284, 2017.
- WANG, Y.; KUO, S.; SHU, M. et al. *Staphylococcus epidermidis* in the human skin microbiome mediates fermentation to inhibit the growth of *Propionibacterium acnes*: implications of probiotics in acne vulgaris. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 98, p. 411-424, 2014.
- WELSS, T.; BASKETTER, D. A.; SCHÖDER, K. R. *In vitro* skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. *Toxicology in Vitro*, v. 18, p. 231-243, 2004.
- XU, L. Z.; YANG, L. T.; QIU, S. T. et al. Combination of specific allergens and probiotics induces specific regulatory B cells and enhances specific immunotherapy effects on allergic rhinitis. *Oncotarget*, v. 7, 54360-54369, 2016.
- YESILOVA, Y.; ÇALKA, O.; AKDENIZ, N. et al. Effect of probiotics on the treatment of children with atopic dermatitis. *Annals of Dermatology*, v. 24, p. 189-193, 2012.
- ZUCCOTTI, G. V.; MENEGHIN, F.; RAIMONDI, C. et al. Probiotics in clinical practice: an overview. *The Journal of International Medical Research*, v. 36, p. 1A-53A, 2008.

12. ANEXOS



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE – MG – BRASIL**

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Pesquisador Responsável: Dr. Jacques Robert Nicoli

Endereço: Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627, C.P. 486

CEP: 31270-901, Belo Horizonte – MG, Brasil

Telefone: (31) 3409-2737

E-mail: jnicoli@icb.ufmg.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A senhora está sendo convidada como voluntária a participar da pesquisa “*AVALIAÇÃO DO EFEITO PROBIÓTICO DE BIFIDOBACTERIUM LONGUM 5^{1A} EM UM MODELO DE CULTURA CELULAR DE LESÕES INFLAMATÓRIAS CUTÂNEAS E INFECÇÃO POR STAPHYLOCOCCUS AUREUS*”. Neste estudo, pretendemos comparar os efeitos de potencial próbiótico sobre aspectos cutâneos inflamatórios e infecciosos de *Bifidobacterium longum 5^{1A}* como cultura pura ou lisado, com os efeitos do *Lactobacillus paracasei* CNCM I-2116 ST11 em um modelo de cultura de órgão e cultura de queratinócitos de epiderme humana normal.

O motivo que nos leva a estudar esses micro-organismos é que os probióticos foram intensamente explorados por seus efeitos benéficos sobre a saúde intestinal e, atualmente, vêm ganhando espaço em estudos que avaliam sua atuação em outros ecossistemas, com resultados muito positivos. Seus efeitos sobre a pele vêm sendo analisados em artigos recentes, com indícios de um grande potencial de ação anti-inflamatória e antimicrobiana, auxiliando na restauração da função de barreira cutânea, prevenindo fotoenvelhecimento, entre outros. O foco se situa tanto na parte clínica,

explorando seu efeito preventivo e curativo diante das mais variadas afecções cutâneas, quanto na parte estética, que tem como público-alvo mulheres e homens de diversas idades no mundo todo. No entanto, existem poucas pesquisas a respeito dos mecanismos de ação envolvidos nesses efeitos.

Após o levantamento bibliográfico sobre o tema, pode-se constatar que faltam dados mais detalhados e uniformes para que a terapia com probióticos possa ser empregada com confiança na rotina clínica, formando protocolos de utilização seguros, e ainda existe um campo enorme de exploração de efeitos desses micro-organismos sobre diversos aspectos da pele. Além disso, o emprego da cultura celular vem sendo cada vez mais utilizado como um modelo experimental eficaz, reduzindo, dessa forma, a utilização de animais de laboratório nas pesquisas. Atualmente, existem no mercado poucos produtos à base de probióticos com benefício à saúde cutânea que têm, verdadeiramente, seus efeitos benéficos comprovados por trabalhos científicos. No entanto, se tratam de produtos importados, e, dessa forma, com preço de venda mais elevado no Brasil. Como são comercializados como cosméticos, não são passíveis de regulamentação de valor pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), ao contrário do que ocorre com medicamentos. Geralmente, a indicação é de uso prolongado e o alto custo do tratamento muitas vezes impede que pacientes possam dar continuidade a essa opção de terapia, que apesar de bem sucedida, é onerosa e faltam opções mais viáveis aos consumidores. Esse fato encoraja a exploração, identificação e esclarecimento dos mecanismos de ação de micro-organismos isolados no país, que podem dar origem a um produto nacional e trazer efeitos benéficos à saúde cutânea a um preço mais viável, tornando-o mais acessível a um maior número de pessoas, o que justifica a realização desse trabalho. E, para isso, estudaremos o potencial probiótico da bactéria *Bifidobacterium longum* 5^{1A} sobre a pele, por já ter tido propriedades probióticas demonstradas por nosso grupo de pesquisa em outros ecossistemas, em diversas publicações.

Para este estudo, as amostras cutâneas serão levadas ao Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou (Fiocruz Minas), onde serão processadas e submetidas a ensaios de cultura de órgão, nos quais testaremos as propriedades dos micro-organismos em questão em aspectos inflamatórios e infecciosos, com foco na saúde cutânea.

Para participar deste estudo você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Você será esclarecida sobre o estudo em qualquer aspecto que

Nome**Assinatura da testemunha****Data**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE – MG – BRASIL**

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Pesquisador Responsável: Dr. Jacques Robert Nicoli

Endereço: Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627, C.P. 486

CEP: 31270-901, Belo Horizonte – MG, Brasil

Telefone: (31) 3409-2737

E-mail: jnicoli@icb.ufmg.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O(a) senhor(a) está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa “*AVALIAÇÃO DO EFEITO PROBIÓTICO DE BIFIDOBACTERIUM LONGUM 5^{1A} EM UM MODELO DE CULTURA DE PELE HUMANA DE LESÕES INFLAMATÓRIAS CUTÂNEAS*”. Neste estudo, pretendemos comparar os efeitos de potencial próbiótico sobre aspectos cutâneos inflamatórios e infecciosos de *Bifidobacterium longum 5^{1A}* como cultura pura ou lisado, com os efeitos do *Lactobacillus paracasei* CNCM I-2116 ST11 em um modelo de cultura de pele humana.

O motivo que nos leva a estudar esses micro-organismos é que os probióticos foram intensamente explorados por seus efeitos benéficos sobre a saúde intestinal e, atualmente, vêm ganhando espaço em estudos que avaliam sua atuação em outros ecossistemas, com resultados muito positivos. Seus efeitos sobre a pele vêm sendo analisados em artigos recentes, com indícios de um grande potencial de ação anti-inflamatória e antimicrobiana, auxiliando na restauração da função de barreira cutânea, prevenindo fotoenvelhecimento, entre outros. O foco se situa tanto na parte clínica, explorando seu efeito preventivo e curativo diante das mais variadas afecções cutâneas, quanto na parte estética, que tem como público-alvo mulheres e homens de diversas

idades no mundo todo. No entanto, existem poucas pesquisas a respeito dos mecanismos de ação envolvidos nesses efeitos. Após o levantamento bibliográfico sobre o tema, pode-se constatar que faltam dados mais detalhados e uniformes para que a terapia com probióticos possa ser empregada com confiança na rotina clínica, formando protocolos de utilização seguros, e ainda existe um campo enorme de exploração de efeitos desses micro-organismos sobre diversos aspectos da pele. Além disso, o emprego da cultura celular vem sendo cada vez mais utilizado como um modelo experimental eficaz, reduzindo, dessa forma, a utilização de animais de laboratório nas pesquisas. Atualmente, existem no mercado poucos produtos à base de probióticos com benefício à saúde cutânea que têm, verdadeiramente, seus efeitos benéficos comprovados por trabalhos científicos. No entanto, se tratam de produtos importados, e, dessa forma, com preço de venda mais elevado no Brasil. Como são comercializados como cosméticos, não são passíveis de regulamentação de valor pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), ao contrário do que ocorre com medicamentos. Geralmente, a indicação é de uso prolongado e o alto custo do tratamento muitas vezes impede que pacientes possam dar continuidade a essa opção de terapia, que apesar de bem sucedida, é onerosa e faltam opções mais viáveis aos consumidores. Esse fato encoraja a exploração, identificação e esclarecimento dos mecanismos de ação de micro-organismos isolados no país, que podem dar origem a um produto nacional e trazer efeitos benéficos à saúde cutânea a um preço mais viável, tornando-o mais acessível a um maior número de pessoas, o que justifica a realização desse trabalho. E, para isso, estudaremos o potencial probiótico da bactéria *Bifidobacterium longum* 5^{1A} sobre a pele, por já ter tido propriedades probióticas demonstradas por nosso grupo de pesquisa em outros ecossistemas, em diversas publicações.

Para este estudo, as amostras cutâneas serão levadas ao Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou (Fiocruz Minas), onde serão processadas e submetidas a ensaios de cultura de pele, nos quais testaremos as propriedades dos micro-organismos em questão em aspectos inflamatórios e infecciosos, com foco na saúde cutânea.

Para participar deste estudo você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Você será esclarecida sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é

voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido pelo pesquisador

O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo.

Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão.

O(a) senhor(a) não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais e a outra será fornecida a você.

Eu, _____, portador do documento de identidade _____ fui informado(a) dos objetivos do estudo “Avaliação do efeito probiótico de *Bifidobacterium longum* 5^{1A} em um modelo de cultura de pele humana de lesões inflamatórias cutâneas”, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada à oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Belo Horizonte, _____ de _____ de _____ .

Nome

Assinatura do participante

Data

Nome	Assinatura do pesquisador	Data
-------------	----------------------------------	-------------

Nome	Assinatura da testemunha	Data
-------------	---------------------------------	-------------

Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA)



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 100 / 2014, relativo ao projeto intitulado “Avaliação do efeito probiótico de *Bifidobacterium longum* 51A em um modelo murino de dermatite atópica induzida por oxazolona”, que tem como responsável Jacques Robert Nicoli, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 20/05/2014. Este certificado espira-se em 20/05/2019.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 100 / 2014, related to the Project entitled “Evaluation of probiotic effect of *Bifidobacterium longum* 51A in a murine model of atopic dermatitis induced with oxazolona”, under the supervision of Jacques Robert Nicoli, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 20/05/2014. This certificate expires in 20/05/2019.

Jacqueline Isaura Alvarez Leite
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 20/05/2014.

Atenciosamente.

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

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005

<https://mail.icb.ufmg.br/zimbra/>

Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Humana (COEP)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 44452015.3.0000.5149

Interessado(a): Prof. Jacques Robert Nicoli
Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 28 de julho de 2015, o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação do efeito probiótico de Bifidobacterium longum 51A em um modelo de cultura celular de lesões inflamatórias cutâneas e infecção por Staphylococcus aureus**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto através da Plataforma Brasil.

Profa. Dra. Telma Campos Medeiros Lorentz
Coordenadora do COEP-UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 44452015.3.0000.5149

Interessado(a): Prof. Jacques Robert Nicoli
Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 03 de outubro de 2016, a emenda abaixo relacionada, do projeto de pesquisa intitulado **"Avaliação do efeito probiótico de Bifidobacterium longum 51A em um modelo de cultura celular de lesões inflamatórias cutâneas e infecção por Staphylococcus aureus"**.

- Substituição das amostras de pele de mama por amostras de pele de pálpebras.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto através da Plataforma Brasil.

A handwritten signature in blue ink, reading 'Vivian Resende'.

Profa. Dra. Vivian Resende
Coordenadora do COEP-UFMG

Immunomodulation by probiotic *Bifidobacterium longum* 5^{1A} lysate in human skin explants

Yasmin Chalfoun Pomárico De Souza^{1δ}; Marcelo Antônio Pascoal-Xavier^{2,3δ}; Roberta Oliveira Prado³; Ana Luiza Gomes Mendes²; Flaviano Santos Martins¹; Fernanda Cesari e Silva Barros²; Leonardo Araújo e Araújo⁵; Ana Luiza Firmato Glória⁵; Jacques Robert Nicoli^{1*}✉; Jaquelline Germano de Oliveira³✉

¹Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

²Setor de Anatomia Patológica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

³Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Instituto René Rachou, Fiocruz Minas, Belo Horizonte, MG, Brazil.

⁴Hospital LT Diamond, Belo Horizonte, MG, Brazil.

⁵Instituto de Olhos de Belo Horizonte, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Running title: Immunomodulatory effect of *Bifidobacterium longum* 5^{1A} lysate

δ These authors contributed equally to this work

✉ These senior authors contributed equally to this work

***Corresponding author:**

Jacques Robert Nicoli, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil. jnicoli@icb.ufmg.br

ABSTRACT

Aim: To investigate the immunomodulatory effects of the probiotic *Bifidobacterium longum* 5^{1A} (BL51A) lysate on human skin explant model.

Methods and Results: Eyelid and breast human skin fragments were collected from plastic surgeries and cultured at air/liquid interface. To evaluate the immunomodulatory effect of human skin exposure to BL51A lysate, the number of dermis' perivascular immune cells was counted and the expression of several cytokines by those immune cells was evaluated by immunohistochemistry. Topically administered, BL51A lysate was associated with an increase of the number of perivascular immune cells, mainly mononuclear cells, in the dermis of eyelid and breast skin explants. Using Pearson's Correlation Coefficient, we observed a negative correlation of IL-1 β and TNF- α immunostaining of perivascular immune cells and a positive correlation of the IFN- γ and IL-10 expression levels by mononuclear cells present in the dermis of skin treated with BL51A lysate when compared to the untreated controls.

Conclusions: Our data indicate that the BL51A lysate has an immunomodulatory effect in the skin. Further investigation will be necessary to elucidate the specific role of each cytokine.

Significance and Impact of the Study: Our findings shed light on the immunomodulatory effects of a new strain of the probiotic *B. longum* 5^{1A}, over skin health and also on mechanisms by which its lysate form exerts its beneficial effects.

Keywords: Probiotics; Biopharmaceuticals; Immunology; Lactic acid bacteria; Bioproducts.

INTRODUCTION

Probiotics are capable of exerting beneficial effects by several ways such as: competition with pathogenic microorganisms over nutrients and adhesion sites (Prince et al., 2012), antimicrobial metabolite production (Ornellas et al., 2017), pathogen co-aggregation (Tiago et al., 2012) and immunomodulatory effects (Vieira et al., 2015a; Vieira et al., 2015b). The effects of probiotics beyond the gut were confirmed in several studies (Messaoudi et al., 2011; Hsiao et al., 2013; Tillisch et al., 2013; Costa et al., 2014; Xu et al., 2016; Mogna et al., 2016), including skin health, modulating the immune system locally and systemically acting on specific and nonspecific immunity (Guéniche et al., 2010b), on its active form, i.e. viable cells (Sugimoto et al., 2012) or as bacterial lysate form (Guéniche et al., 2010a).

Probiotics can inhibit cutaneous infection by *Staphylococcus aureus* (Baba et al., 2010; Prince et al., 2012; Shah et al., 2012), reduce the risk of atopic dermatitis in children (Kalliomaki et al., 2001; Kalliomaki et al., 2003; Kalliomaki et al., 2007), improve the symptoms in patients with atopic dermatitis (Niccoli et al., 2014) reducing IL-5, IL-6, IgE and IFN- γ levels (Yesilova et al., 2012) and transepidermal water loss (Guéniche et al., 2014).

The first data regarding topical dermatological treatment with bacteria was published in 1912 by Peyri, in which he locally administered brewer's yeast, milk bacilli, milk combined with the "Bulgarian bacillus" and with *Staphylococcus* cultures in lesioned skin, with impetigo contagiosa, impetigo of Bockhart, ecthyma, sycosis, eczema, acne, and seborrhea oritinea tonsurans. Peyri verified that "harmless microorganisms" acted favorably such as for superficial pyodermias where the application of brewer's yeast always resulted in a more rapid care of the lesions than is the case under ordinary forms

of treatment. In all lesions associated with seborrhoea, the use of *Bulgarian bacillus* cultures in milk seemed to act also very favorably (Peyri, 1912). Since then, a large number of studies have related beneficial effects of probiotics topically applied in human skin (Baba et al., 2006; Guéniche et al., 2008a; Guéniche et al., 2008b; Muizzudin et al., 2012). Nowadays, cell and organ skin cultures have been widely used to prove these desirable effects (Baba et al., 2010; Guéniche et al., 2010b; Sultana et al., 2013; Kim et al., 2014; Mohammedsaeed et al., 2014; Ra et al., 2014).

As an example, it has been demonstrated that topical administration of *Bifidobacterium longum* lysate, in a skin explant model, resulted in a beneficial effect over many inflammation parameters, such as reduced vasodilatation, oedema, tumour necrosis factor- α (TNF- α) expression and mast cells degranulation (Guéniche et al., 2010a).

A new strain of *Bifidobacterium longum* isolated by our group and named BL51A had its beneficial effects over intestinal, respiratory and articular pathologies demonstrated in several studies (Guerra et al., 2011; Souza et al., 2012; Vieira et al., 2015a; Vieira et al., 2015b; Mendes et al., 2017). These effects were obtained mainly through immunomodulatory actions, such as faster inflammation resolution, with increase of interleukin-10 (IL-10) expression, less tissue damage, with substantial reduction of bacterial charge and saving 100% of mice in the case of mice infected intra-tracheally with *Klebsiella pneumoniae* (Vieira et al., 2015b). In addition, in a murine model of gout, BL51A reduced hypernociception, neutrophil accumulation in the joint and myeloperoxidase activity in periarticular tissue. Oral administration of the viable form of BL51A also inhibited the production of CXCL1 and interleukin-1 β in the joints and increased IL-10 expression in the knee tissue, (Vieira et al., 2015b). When compared to other bifidobacteria such as *B. breve* 110^{1A}, *B. pseudolongum* 119^{1A} and *B. bifidum* 1622,

BL51A showed the best probiotic potential as demonstrated by its greatest sensitivity to antimicrobials, best growth rate and highest capacity to produce antagonistic substances against various pathogenic agents (Souza et al., 2013).

The aim of the present study was to investigate the immunomodulatory effects of the BL51A lysate over cutaneous normal skin using a skin explant model at air liquid interface.

MATERIALS AND METHODS

BL51A culture conditions and lysate preparation

Bifidobacterium longum 5^{1A} (BL51A) was isolated in our laboratory from the faeces of a healthy child and identified by Gram stain, growth atmosphere determination, biochemical tests and DNA sequencing, according to Kwon et al. (2005). BL51A was cryopreserved in De Man, Rogosa and Sharp broth (MRS, Difco, Sparks, USA) supplemented with 20% (v/v) glycerol at -80°C. Before use, the bacterium was cultured three times in MRS broth supplemented with 0.1% L-cysteine, 0.1% hemin and 0.1% menadione (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) by incubation during 24 hours at 37°C in an anaerobic chamber (Forma Scientific Company, Marietta, USA) containing an atmosphere of 85% N₂, 10% H₂ and 5% CO₂.

BL51A lysate was prepared according to Sultana et al. (2013) and Prince et al. (2012). Briefly, cultures were spectrophotometrically (OD₆₀₀ nm) adjusted to 10⁸ colony forming units (CFU)/ mL, centrifuged (15,000 x g for 10 minutes), washed three times with phosphate-buffered saline (PBS), and resuspended in 1 mL of Dulbecco's minimal essential medium (DMEM; Sigma Aldrich). Bacterial lysis was done by using a ultrasonic liquid processor (Vibra-Cell, Sonics, Newton, USA). To remove any whole bacteria

remaining the lysate was filter sterilized. A volume of 40 μL of the filtered lysate was used to treat skin explants, as previously described by Guéniche et al. (2010a).

Culture of human skin explants

The *in vitro* experiments with human skin samples were approved by the Ethic Committee of the Conselho Nacional de Saúde (CONEP) with protocol number CAAE 44452015.3.0000.5149. Formal written consent was obtained from all the skin donors.

Five samples of both breast and eyelid skins were obtained from healthy donors submitted to mammoplasty and upper lid blepharoplasty surgeries, respectively. Skin fragments were collected in DMEM culture medium supplemented with 100 U/mL penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin (Gibco, Grand Island, USA) and immediately transported to the tissue culture room for processing within a maximum period of 60 minutes. Skin fragments were washed three times with DMEM supplemented with 100 U/mL penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin (Gibco) and then cut into 1 cm^2 full-thickness pieces. Subcutaneous fat was removed using a surgical scalpel. Skin samples were then placed on culture inserts with 12 μm pore size filter (Millipore, Billerica, USA) and the uppermost epithelium at an air/liquid interface. The inserts were set on 12 well plates (Millipore) containing DMEM (Sigma Aldrich) supplemented with 100 U/mL, penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin (Gibco), epidermal growth factor 10 ng/mL (Sigma Aldrich) and 10% fetal calf serum (Gibco). Cell culture media was added to the wells so that the surface of the medium reached the filter level. Cohesion between skin and insert was obtained with a polysiloxane vinyl seal in such a way that neither skin retraction nor lateral passage of any applied topical product towards the dermis was possible. Skin samples were kept under these survival conditions for 5 hours at 37°C in a humidified incubator with 5% CO_2 before any treatment. For breast and eyelid skins, 40

μM and $10 \mu\text{M}$ of Substance P (SP), a well known inflammation inducer, (Calbiochem, China) were added, respectively, to the culture medium and skin samples were maintained in culture for additional 24 hours (Branchet-Gumila et al., 1999; Guéniche et al., 2010b). As negative control, a similar preparation, but without SP administration was used. Simultaneously, skin cultures, both for breast and eyelid skin, were stimulated or not with BL51A lysate administration over the epithelium, in a volume of $40 \mu\text{L}$. Histological and immunohistochemical analyses were performed to evaluate the number of perivascular immune cells in the superior and lower dermis and to assess the expression levels of IL- 1β , IL-6, IL-18, TNF- α , IFN- γ and IL-10, respectively.

Histological evaluation

To estimate the number of perivascular immune cells around vessels in the superior (SD) and lower dermis (LD), the skin samples explants were removed from the inserts, fixated in 3.7% formaldehyde for at least 24 hours and embedded in paraffin. Sections of $5 \mu\text{m}$ were stained with hematoxylin and eosin and the number of vessels was counted in 10 fields for both SD and LD sections by light microscopy (Olympus BX). On each field, the number of perivascular immune cells around the vessel with major cellularity was counted. Then, by multiplying the number of vessels by the number of immune cells, we have obtained an estimative of the immune cell number in the skin samples by mean. Due to the different thickness of SD and LD of the skin explants, the data were standardized accordingly to the area, considering a 10% area of SD and 80% area of LD (with 10% epithelium, forms 100% skin structure). Double blind assessment of the histological features of all samples was carried out by two investigators through visual scoring.

Immunohistochemical analyses

IL-1 β , IL-10, IL-6, IL-18, TNF- α and IFN- γ immunostaining was performed on 4- μ m sections of formalin-fixed, paraffin-embedded biopsy specimen using the Novolink™ Polymer Detection System (Novocastra, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Deparaffinization with xylene and rehydration through a graded alcohol series was followed by antigen retrieval by heating at 90°C for 10 minutes in EDTA buffer, pH 9.0. After blocking endogenous peroxidases (DakoCytomation, Glostrup, Denmark), the deparaffinized sections were incubated for 1 hour at room temperature with IL-1 β , IL-10, IL-6, IL-18, TNF- α and IFN- γ antibodies [anti-IL-1 β (Cat#SC-130323, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA, 1:200); anti-IL-18 (Cat#SC-7954, Santa Cruz Biotechnology, 1:200), anti-IFN- γ (Cat#Ab9657, Abcam, Cambridge, United Kingdom; 1:200), anti-IL-6 (Cat#Ab9324, Abcam, 1:200), anti-TNF- α (Cat# 9579, Abcam, 1:100), anti-IL-10 (Cat#Ab134742, Abcam, 1:200)]. The sections were then incubated at room temperature for 30 minutes with the Novolink polymer DS and washed twice with Tris-borate saline for 5 minutes. Peroxidase activity was developed using a diaminobenzidine (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) solution for 30 minutes at room temperature, counterstaining was performed using Harris hematoxylin, and then evaluated by light microscopy.

IL-1 β , IL-10, IL-6, IL-18, TNF- α and IFN- γ expression levels in perivascular immune cells around vessels in the superior (SD) and lower dermis (LD) of the skin samples explants were graded as score 0 (no staining), score 1 (weak staining), score 2 (moderate staining) and score 3 (strong staining). Cytokines expression levels were considered as basal for score 0 or 1 and high for score 2 or 3.

Statistical analysis

Histological data from *in vitro* assays with breast and eyelid skins were submitted to Student's T test. To verify the function of perivascular immune cells by correlating the number of perivascular immune cells in the dermis and the immunohistochemical score of IL-1 β , IL-10, IL-6, IL-18, TNF- α and IFN- γ , we used the Pearson Correlation Coefficient. Data were considered significantly different when $p < 0.05$.

RESULTS

Effect of the BL51A lysate on the number of dermal perivascular cells in human skin explants

In both breast and eyelid skin explants, topical administration of the BL51A lysate increased the number of immune cells around the vessels of the dermis. Notably, this increase was higher in the eyelid skin samples, as shown in Figure 1.

Addition of SP to the skin culture medium was not able to increase the number of perivascular immune cells neither in breast nor eyelid skin under the conditions used in the present study.

Interestingly, addition of SP to the eyelid skin culture medium prevented the increase in the number of perivascular immune cells caused by the administration of BL51A, as shown in Figure 2. By using Student's T test to compare both treatments, we verified a tendency to a difference between the eyelid skin samples treated only with BL51A lysate and the eyelid skin samples treated with BL51A lysate and sensitized with SP (SD: $p = 0.09$; LD: $p = 0.06$ and total dermis: $p = 0.07$).

Effect of the BL51 lysate administration on expression of IL-1 β , IL-10, IL-6, IL-18, TNF- α and IFN- γ in human skin explants

To better understand the function of the perivascular immune cell seen in eyelid dermis following BL51A administration, the histological findings were correlated to the immunohistochemical scores of the expression of IL-1 β , IL-10, IL-6, IL-18, TNF- α and IFN- γ , as shown on Table 1 and Figure 3. The percentage of immune cells expressing basal (scores 0 and 1) or high levels (scores 2 and 3) of each of those cytokines after BL51A administration and controls are shown in Table 1. A negative correlation was observed between IL-1 β and TNF- α expression and the number of perivascular cells ($r = -0.531$; $p = 0.001$ and $r = -0.454$; $p = 0.007$, respectively), as shown in Table 1. On the other hand, a positive correlation was observed between IL-10 and IFN- γ production and the number of perivascular immune cells ($r = 0.433$; $p = 0.039$ and $r = 0.388$; $p = 0.016$, respectively). Noteworthy, the immunostaining intensity of each cytokine by epidermal cells was used as internal control, as shown in Figure 3.

DISCUSSION

In the present study, an increase in IL-10 production by perivascular immune cells of human skin treated topically with BL51A lysate was observed, suggesting that these cells might have an immunomodulatory function induced by this probiotic. Indeed, the induction of IL-10 expression exerted by BL51A orally administered in its active form was previously observed in our laboratory using murine models of gout (Vieira et al., 2015a) and pulmonary infection by *Klebsiella pneumonia* (Vieira et al., 2015b), but when orally administered in its active form. Additionally, a cutaneous inflammatory hairless mouse model using oxazolone as inductor of inflammation, showed a decrease of eosinophil peroxidase activity in mice that received orally BL51A on its viable form (unpublished data). A possible explanation for these various beneficial effects of the bacteria administered orally could be the fermentative production of acetate by BL51A

administered orally to the sensitized mice. It is known that acetate binding to GPR43 intestinal receptors has an immunomodulatory effect (Vieira et al., 2013). However, for an immunomodulatory effect induced by the topical application of bacterium lysate, the hypothesis would have to be different (structural component of the bacterial cell, as an example). According to Mohammedsaeed et al. (2015), bacterial lysates are more useful than live bacteria in topical formulations due to logistic requirements, since maintaining viability of live bacteria in topical formulations is a hard task. Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) bind to Toll-like receptors (TLRs) expressed by epidermal keratinocytes located on the cell surface, such TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 and TLR6, leading to the activation of signalling pathways. TLR expression by keratinocytes might be crucial for promoting skin immune responses, as activation of these receptors on human keratinocytes leads to a predominant Th1-type immune response and to the production of type I interferons (Nestle et al., 2009).

In the present study, the administration of BL51A lysate had a positive correlation on IFN- γ levels. Since IFN- γ is the major effector cytokine of T helper 1 (Th1) response, this cytokine is crucial in the resolution of immunopathologies related to allergies, whose origin is mostly associated to an unbalanced Th2 response. In this way, IFN- γ has an inhibitory action against antigens (Abbas et al., 1996; Teixeira et al., 2005), as verified with the administration of *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC in a murine model of atopic dermatitis which led to an increase of IFN- γ production, resulting in a lower pruritus frequency, a reduction of disease symptoms and lower immunoglobulin E levels (Tanaka et al., 2009). Oral treatment with *Lactobacillus salivarius* LS01 DSM 22775 in adult patients diagnosed with atopic dermatitis resulted in increased IFN- γ levels, with reduction of Scoring Atopic Dermatitis (SCORAD) and of bacterial load of *Staphylococcus aureus* on skin (Drago et al., 2012).

Topical administration of lysate of BL51A to skin explants increased the number of perivascular immune cells in the dermis of healthy eyelid and breast skin. Using a lysate of a *Bifidobacterium bifidum* strain, Mouni et al. (2009) also observed a significant increase of CD8 molecules in a dose-dependent manner in peripheral blood mononuclear cells of healthy subjects, increasing cytotoxic activity of peripheral CD8+ cells. The beneficial effects of topical use of a lysate from another *B. longum* strain were also reported by Sultana et al. (2013). These authors observed an enhanced tight-junction barrier function by the increase of transepithelial electrical resistance correlated with elevated expression of tight-junction protein components. In addition, by using *B. longum* lysate administration, Guéniche et al. (2010a) observed a decrease in mast cell degranulation in skin explants. When BL51A lysate was applied with SP, there was no raise in the number of perivascular cells in breast and in eyelid skin, differently then when BL51A was applied without SP. The administration of BL51A increased the number the perivascular immune cells in dermis and this increased number was positively correlated with the production of IL-10, an anti-inflammatory cytokine. Therefore, we believe that SP prevented this immunomodulatory effect triggered by BL51A.

According to Lee et al. (2013), irritant stimuli on skin promotes the loss of epidermal barrier with release of the pro-inflammatory mediators IL-1 and TNF- α , which stimulate leukocyte recruitment and production by keratinocytes, fibroblasts and endothelial cells of other pro-inflammatory cytokines and chemokines, perpetuating a continuous inflammatory response. In the present study, we verified a negative correlation between IL-1 β and TNF- α levels and the number of perivascular cells in eyelid dermis when BL51A was administrated. Noteworthy, TNF- α levels were also decreased by topical administration of a *B. longum* lysate in skin explants sensitized by SP (Guéniche et al., 2010a) as well as by administration of LPST11 in a cell culture also

sensitized by SP (Guéniche et al., 2010b). Administration of *B. breve* in a murine model prevented damage caused by ultraviolet radiation exposure, reducing IL-1 β levels by skin cells (Sugimoto et al., 2012).

Our findings suggest that the probiotic BL51A administered topically as a lysate exerted its immunomodulatory effects over healthy human skin tissue, by increasing IL-10 production and decreasing IL-1 β and TNF- α . We believe that continuous topical administration of BL51A lysate may help to improve cutaneous immunity.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig). The funders had no role in study design, data collection and analyses, decision to publish, or preparation of the manuscript.

The authors thank Dr. Jacqueline Fiúza (Fiocruz Minas), Dr. Rafael Wesley Bastos (USP), Vinícius Paz (CPqRR) and Dr. Leonardo Borges Acurcio (ICB/UFMG) for their scientific advices and support to this study. The authors are also thankful to Dr. Érica A. R. Alves for her critical reading of the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

No conflict of interest declared.

REFERENCES

- Abbas, A. K.; Murphy, K. M.; Sher, A. (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383**, 787-793.
- Baba, H.; Masuyama, A.; Takano, T. (2006) Short Communication: effects of *Lactobacillus helveticus* fermented milk on the differentiation of cultured normal human epidermal keratinocytes. *J Dairy Sci* **89**, 2072-2075.
- Baba, H.; Masuyama, A.; Yoshimura, C.; Aoyama, Y.; Takano, T.; Ohki, K. (2010) Oral intake of *Lactobacillus helveticus* – fermented milk whey decreased trans-epidermal water loss and prevented the onset of sodium dodecylsulfate-induced dermatitis in mice. *Biosc Biotechnol Bioch* **74**, 18-23.
- Branchet-Gumila, M. C.; Boissic, S.; Le Charpentier, Y. ; Nonote, I. ; Montastier, C. ; Breton, L.(1999) Neurogenic modifications induced by substance P in an organ culture of human skin. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* **12**, 211-220.
- Costa, D. J.; Marteau, P.; Amouyal, M.; Poulsen, L. K.; Hamelmann, E.; Cazaubiel, M.; Housez, B.; Leuillet, S.; Stavnsbjerg, M.; Molimard, P; Courau, S.; Bousquet, J. (2014) Efficacy and safety of the probiotic *Lactobacillus paracasei* LP-33 in allergic rhinitis: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial (GA2LEN Study). *Eur J Clin Nutr* **68**, 602-607.
- Drago, L.; Toscano, M.; Vecchi, E.; Piconi, S.; Iemoli, E. (2012) Changing of fecal flora and clinical effect of *L. salivarius* LS01 in adults with atopic dermatitis. *J Clin Gastroenterol* **46**, 56-63.
- Guéniche, A.; Knaudt, B.; Schuck, E.; Volz, T.; Bastien, P.; Martin, R.; Röcken, M.; Breton, L.; Bierdemann, T. (2008a) Effects of non-pathogenic Gram-negative bacterium *Vitreoscilla filiformis* lysate in atopic dermatitis : a prospective,

- randomized, double-blind, placebo controlled clinical study. *Br J Dermatol* **159**, 1357-1363.
- Guéniche, A.; Cathelineau, A. C.; Bastien, P.; Esdaile, J.; Martin, R.; Queille Roussel, C.; Brenton, L. (2008b) *Vitreoscilla filiformis* biomass improves seborrheic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* **22**, 1014-1015.
- Guéniche, A.; Bastien, P.; Ovigne, J. M. (2010a) *Bifidobacterium longum* lysate, a new ingredient for reactive skin. *Exp Dermatol* **19**, e1-e8.
- Guéniche, A.; Benyacoub, J.; Philippe, D.; Bastien, P.; Kusy, N.; Breton, L.; Blum, S.; Castiel-Higounenc I. (2010b) *Lactobacillus paracasei* CNCM I-2116 (ST11) inhibits substance P-induced skin inflammation and accelerates skin barrier function recovery *in vitro*. *Eur J Dermatol* **20**, 731-737.
- Guéniche, A.; Phillippe, D.; Bastien, P.; Reuteler, G.; Blum, S.; Castiel-Higounenc, I.; Brenton, L.; Benyacoub, J. (2014) Randomised double-blind placebo-controlled study of the effect of *Lactobacillus paracasei* NCC2461 on skin reactivity. *Benef Microbes* **5**, 137-145.
- Guerra, P. V. P.; Lima, L. N.; Souza, T. C.; Mazochi, Z.; Penna, F. J.; Silva, A. M.; Nicoli, J. R.; Guimarães, E. V. (2011) Pediatric functional constipation treatment with *Bifidobacterium*-containing yogurt: a crossover, double-blind, controlled trial. *World J Gastroenterol* **17**, 3916-3921.
- Hsiao, E. Y.; McBride, S. W.; Hsien, S.; Sharon, G.; Hyde, E. R.; McCue, T.; Codelli, J. A.; Chow, J.; Reisman, S. E.; Petrosino, J. F.; Patterson, P. H.; Mazmanian, S. K. (2013) Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell* **155**, 1451-1463.

- Källiomaki, M.; Salminen, S.; Arvilommi, H.; Kero, P.; Koskinen, P.; Isolauri, E. (2001) Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* **357**, 1076-1079.
- Källiomaki, M.; Salminen, S.; Poussa, T.; Arvilommi, H.; Isolauri, E. (2003) Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* **361**, 1869-1871.
- Källiomaki, M.; Salminen, S.; Poussa, T.; Isolauri, E. (2007) Probiotics during the first 7 years of life: a cumulative risk reduction of eczema in a randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* **119**, 1019-1021.
- Kim, H. M.; Lee, D. E.; Park, S. D.; Kim, Y. T.; Kim, Y. J.; Jeong, J. W.; Jang, S. S.; Ahn, Y. T.; Sim, J. H.; Huh, C. S.; Chung, D. K.; Lee, J. H. (2014) Oral administration of *Lactobacillus plantarum* HY7714 protects hairless mouse against ultraviolet-B induced photoaging. *J Microbiol Biotechnol* **24**, 1583-1591.
- Kwon, H. S.; Yang, E. H.; Lee, S. H.; Yeon, S. W.; Kang, B. H.; Kim, T. Y. (2005) Rapid identification of potentially probiotic *Bifidobacterium* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S RNA. *FEMS Microbiol Lett* **250**, 55-62.
- Lee, H. Y.; Stieger, M.; Yawalkar, N.; Kakeda, M. (2013) Cytokines and chemokines in irritant contact dermatitis. *Mediators Inflamm* **916497**, 7p.
- Mendes, E.; Aceturi, B.G.; Thomas, A.M.; Martins, F.S.; Crisma, A.R.; Murata, G.; Braga, T.T.; Camâra, N.O.S.; Franco, A.L.S.; Setuba, J.C.; Ribeiro, W.R.; Valduga, C. J.; Curi, R.; Dias-Neto, E.; Lima, W.T.; Ferreira, C.M. (2017) Prophylactic supplementation of *Bifidobacterium longum* 5^{1A} protects mice from ovariectomy-induced exacerbated allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness. *Frontiers Microbiol* **8**, 1732.

- Messaoudi, M.; Lalonde, R.; Violle, N.; Javelot, H.; Desor, D.; Nejd, A.; Bisson, J. F.; Rougeot, C.; Pichelin, M.; Cazaubiel, M.; Cazaubiel, J. M. (2011) Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects. *Br J Nutr* **105**, 755-764.
- Mogna, L.; Deidda, F.; Nicola, S.; Amoroso, A.; Del Piano, M.; Mogna, G. (2016) *In vitro* inhibition of *Klebsiella pneumoniae* by *Lactobacillus delbrueckii* LDD01 (DSM 22106): an innovative strategy to possibly counteract such infections in humans? *J Clin Gastroenterol* **50**, 136-139.
- Mohammedsaeed, W.; McBain, A. J.; Cruickshank, S. M.; O'Neill, C. A. (2014) *Lactobacillus rhamnosus* GG inhibits the toxic effects of *Staphylococcus aureus* on epidermal keratinocytes. *App Environ Microbiol* **80**, 5573-5781.
- Mohammedsaeed, W.; Cruickshank, S.; McBain, A. J.; O'Neill, C. A. (2015) *Lactobacillus rhamnosus* GG lysate increases re-epithelialization of keratinocyte scratch assays by promoting migration. *Sci. Rep* **5**, 16147.
- Mouni F.; Aissi E.; Hernandez J.; Gorocica P.; Bouquelet S.; Zenteno E.; Lascurain R.; Garfias Y. (2009) Effect of *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 cytoplasmic fraction on human immune cells. *Immunol Invest* **38**, 104-115.
- Muizzuddin, N.; Maher, W.; Sullivan, M.; Schnittger; Mammone, T. (2012) Physiological effect of a probiotic on skin. *J Cosmet Sci* **63**, 385-395.
- Nestle, F. O.; Meglio, P. D.; Qin, J.; Nickoloff, B. J. (2009) Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol* **9**, 679-691.
- Niccoli, A. A.; Artesi, A. L.; Candio, F.; Ceccarelli, S.; Cozzali, R.; Ferraro, L.; Fiumana, D.; Mencacci, M.; Morlupo, M.; Pazzelli, P.; Rossi, L.; Toscano, M.; Drago, L.

- (2014). Preliminary results on clinical effects of probiotic *Lactobacillus salivarius* LS01 in children affected by atopic dermatitis. *J Clin Gastroenterol* **48**, 34-36.
- Ornellas, R. M.; Santos, T. T.; Acurcio, L. B.; Sandes, S. H.; Oliveira, M. M.; Dias, C. V.; de Carvalho Silva, S.; Uetanabaro, A. P.; Vinderola, G.; Nicoli, J. R. (2017) Selection of lactic acid bacteria with probiotic potential isolated from the fermentation process of “cupuaçu” (*Theobroma grandiflorum*). *Adv Exp Med Bio* **973**, 1-16.
- Peyri, J. (1912) Topical bacteriotherapy of the skin. *J Cutaneous D* **30**, 688-689.
- Prince, T.; McBain, A. J.; O’Neill, C. A. (2012) *Lactobacillus reuteri* protects epidermal keratinocytes from *Staphylococcus aureus* – induced cell death by competitive exclusion. *Appl Environ Microbiol* **78**, 5119-5126.
- Ra, J.; Lee, D. E.; Kim, S. H.; Jeong, J.W.; Ku, H. K.; Kim, T. Y.; Choi, I. D.; Jeung, W., Sim, J. H.; Ahn, Y. T. (2014) Effect of oral administration of *Lactobacillus plantarum* HY7714 on epidermal hydration in ultraviolet-B irradiated hairless mice. *J Microbiol Biotechnol* **24**, 1736-1743.**
- Shah, M. M.; Saio, M.; Yamashita, H.; Tanaka, H.; Tatami T.; Ezaki, T.; Inagaki, N. (2012) *Lactobacillus acidophilus* strain L-92 induces CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells and supresses allergic contact dermatitis, *Biol Pharm Bull* **35**, 612-616.
- Souza, T. C.; Zacarias, M. F.; Silva, A. M.; Binetti, A.; Reinheimer, J.; Nicoli, J. R.; Vinderola, G. (2012) Cell viability and immunostimulating and protective capacities of *Bifidobacterium longum* 5^{1A} are differentially affected by technological variables in fermented milks. *J Appl Microbiol* **112**, 1184-1192.

- Souza, T. C.; Silva, A. M.; Drews, J. R.; Gomes, D. A.; Vinderola, C. G.; Nicoli, J. R. (2013) *In vitro* evaluation of *Bifidobacterium* strains of human origin for potential use in probiotic functional foods. *Benef Microbes* **4**, 179-186.
- Sugimoto, S.; Ishii, Y.; Izawa, N.; Masuoka, N.; Kano, M.; Sone, T.; Chiba, K.; Miyazaki, K.; Ishikawa, F. (2012) Photoprotective effects of *Bifidobacterium breve* supplementation against skin damage induced by ultraviolet irradiation in hairless mice. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **28**, 312-319.
- Sultana, R.; McBain, A. J.; O'Neill, C. A. (2013) Strain-dependent augmentation of tight-junction barrier function in human primary epidermal keratinocytes by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* lysates. *Appl Environ Microbiol* **79**, 4887-4894.
- Tanaka, A.; Jung, K.; Benyacoub, J.; Prioult, G.; Okamoto, N.; Ohmori, K.; Blum, S.; Mercenier, A.; Matsuda, H. (2009) Oral supplementation with *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724 prevents development of atopic dermatitis in NC/NgaTnd mice possibly by modulating local production of IFN- γ . *Exp Dermatol* **18**, 1022-1027.
- Teixeira, L. K.; Fonseca, B. P. F.; Barboza, B. A.; Viola, J. P. (2005) The role of interferon- γ on immune and allergic responses. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **100**, 137-144.
- Tiago, F. C. P.; Martins, F. S.; Souza, E. L. S.; Pimenta, P. F.; Araujo, H. R.; Castro, I. M.; Brandão, R. L.; Nicoli, J. R. (2012) Adhesion to the yeast cell surface as a mechanism for trapping pathogenic bacteria by *Saccharomyces* probiotics. *J Med Microbiol* **61**, 1194 – 1207.
- Tillisch, K.; Labus, J.; Kilpatrick, L.; Jiang, Z.; Stains, J.; Ebrat, B.; Guyonnet, D.; Legrain-Raspaud, S.; Trotin, B.; Naliboff, B.; Mayer, E. A. (2013) Consumption

- of fermented milk product with probiotic modulates brain activity. *Gastroenterology* **144**, 1394-1401.
- Vieira, A. T.; Teixeira, M. M.; Martins, F. S. (2013) The role of probiotics and prebiotics in inducing gut immunity. *Front Immunol*, **4**, 445
- Vieira, A. T.; Galvão, I.; Amaral, F. A.; Teixeira, M. M.; Nicoli, J. R.; Martins, F. S. (2015a) Oral treatment with *Bifidobacterium longum* 5^{1A} reduced inflammation in a murine experimental model of gout. *Benef Microbes* **6**, 799-806.
- Vieira, A. T.; Rocha, V. M.; Tavares, L.; Garcia, C. C.; Teixeira, M. M.; Oliveira, S. C.; Cassali, G. D.; Gamba, C.; Martins, F. S. (2015b) Control of *Klebsiella pneumonia* pulmonary infection and immunomodulation by oral treatment with the commensal probiotic *Bifidobacterium longum* 5^{1A}. *Microbes Infect* **18**, 180-189.
- Xu, L. Z.; Yang, L. T.; Qiu, S. T.; Yang, G.; Luo, X. Q.; Miao, B. P.; Geng, X. R.; Liu, Z. Q.; Liu, J.; Wen, Z.; Wang, S.; Zhang, H. P.; Li, J.; Liu, Z. G.; Li, H. B.; Yang, P. C. (2016) Combination of specific allergens and probiotics induces specific regulatory B cells and enhances specific immunotherapy effects on allergic rhinitis. *Oncotarget* **7**, 54360-54369.
- Yesilova, Y; Calka, Ö; Akdeniz, N.; Berktas, M. (2012) Effect of probióticos on the treatment of children with atopic dermatitis. *Ann Dermatol* **24**, 189-193.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Simple medium of immune cells in breast and eyelid skin explants. BL51A + SP: administration of BL51A and P Substance. BL51A: administration of BL51A. SP: administration of P Substance.

Figure 2. Light microscopy images of histological analyses of eyelid skin, with zoom in lower right corner, in (A) C: Control, without any administration. (B) BL51A: administration of BL51A. (C) SP: administration of P Substance. (D) BL51A + SP: administration of BL51A and P Substance. Zoom picture on right corner shows perivascular inflammatory infiltrate in the superior dermis (SD).

Figure 3. Light microscopy images of TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-10 and IL-18 immunostaining of skin explants treated with BL51A lysate. The intensity colour of the epidermis was the control for all reactions.

Table 1. Immunostaining levels of perivascular immune cells presenting basal or high levels of IL-1 β , IL-10, IL-6, IL-18, TNF- α and IFN- γ in human skin explants exposed to BL51A lysate and correlation between the number of these dermis perivascular immune cells of breast and eyelid skin and immunohistochemistry levels.

Cytokine	Basal (Score 0 or 1) or High (Score 2 or 3) Level	Number of perivascular immune cells expression on dermis (%)				Number of perivascular immune cells on dermis vs. IHQ expression
		C	BL	SP	BL + SP	
IL-1 β	<i>Basal</i>	25,71	25,71	20	28,57	$r = - 0.531$
	<i>High</i>	37,5	25	25	12,5	$p = 0.001$
IL-10	<i>Basal</i>	33,33	20	26,67	20	$r = 0.433$
	<i>High</i>	20	33,33	20	26,67	$p = 0.039$
IL-6	<i>Basal</i>	33,33	33,33	11,11	22,22	$r = 0.316$
	<i>High</i>	26,47	23,53	26,47	23,53	$p = 0.056$
IL-18	<i>Basal</i>	38,89	27,78	11,11	22,22	$r = 0.043$
	<i>High</i>	23,81	23,81	23,81	28,57	$p = 0.811$
TNF- α	<i>Basal</i>	25	25	25	25	$r = -0.454$
	<i>High</i>	30,43	21,74	26,09	21,74	$p = 0.007$
IFN- γ	<i>Basal</i>	41,67	16,67	16,67	25	$r = 0.388$
	<i>High</i>	22,58	29,03	29,03	19,35	$p = 0.016$

C: control, without any administration; BL: administration of BL51A lysate; SP: administration of Substance P; BL + SP: administration of BL51A and Substance P. Immunostaining basal levels considered as score 0 (no expression) and score 1 (low expression) and high levels considered as score 2 (moderate expression) and score 3 (strong expression). r = Pearson's Coefficient; p = Probability, considered as significant when $p < 0.05$.

Figure 1

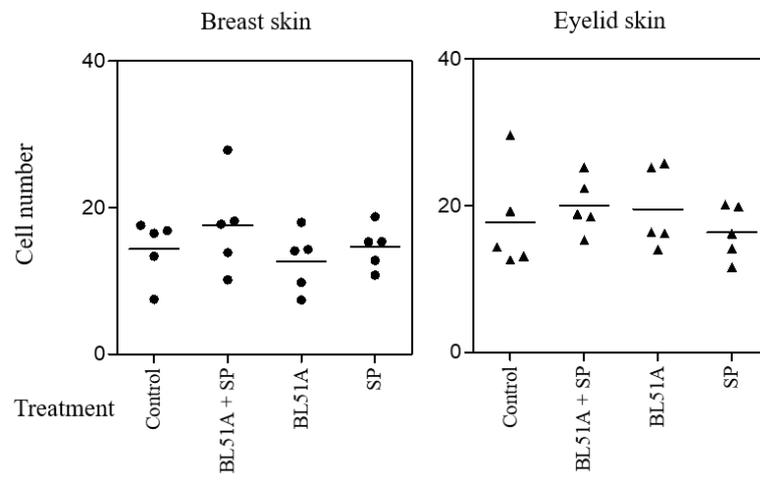


Figure 2

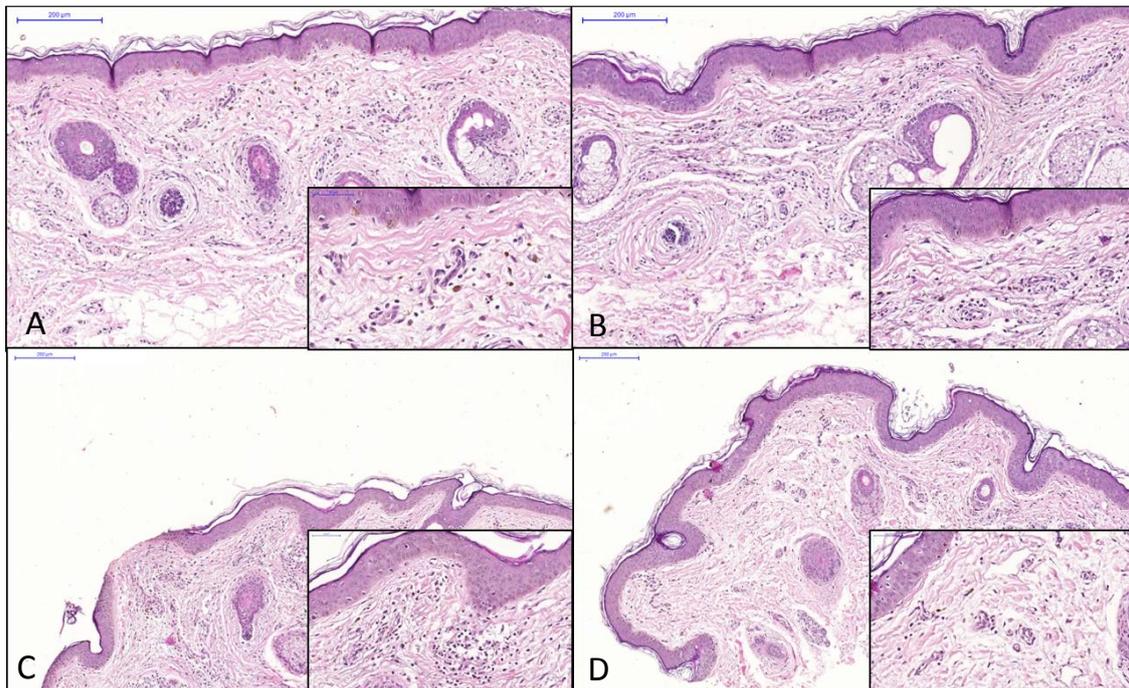


Figure 3