

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

AVALIAÇÃO DO EFEITO PROBIÓTICO DE *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 EM UM MODELO MURINO DE ALERGIA ALIMENTAR

VIVIAN CORREIA MIRANDA

Belo Horizonte/MG

2019

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

AVALIAÇÃO DO EFEITO PROBIÓTICO DE *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 EM UM MODELO MURINO DE ALERGIA ALIMENTAR

VIVIAN CORREIA MIRANDA

Dissertação apresentada junto ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins (Departamento de Microbiologia, ICB/UFMG)

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Denise Carmona Cara Machado (Departamento de Morfologia, ICB/UFMG)

Belo Horizonte/MG

2019

Dedico este trabalho à todos aqueles
que de alguma forma torcem para o
meu sucesso.

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, pois sem ELE nada sou.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins, que me recebeu no laboratório de Agentes Bioterapêuticos e desde então vem me orientando. Pela confiança em meu trabalho, por toda a disponibilidade em me ajudar, por todo o conhecimento e paciência.

À minha co-orientadora Prof^a Dr^a Denise Carmona Cara Machado, por toda ajuda, ensinamentos e disponibilidade que foram essenciais para o desenvolvimento do presente trabalho.

Ao Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli, pelas sugestões, correções e disponibilidade em me ajudar.

A toda a minha família, em especial: aos meus pais, Jeane e Vilson; minhas irmãs, Vanessa, Julie e Letícia; meus avós, em especial Antônio e Aurelina; tios e tias, primos e primas; e à Maria Aparecida. Obrigada pelo afeto incondicional, conselhos, companheirismo, momentos e conversas, que foram essenciais para que eu pudesse trilhar o caminho da pós - graduação. Vocês são minha base!

Ao meu namorado, Bruno, por todo afeto, carinho, suporte, conselhos e por estar presente mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos e colegas da UFMG: Mônica, Ramon, Karen, Rodrigo, Johnatan, Gabrielle, Éricka, Melina, Indianara, Joana, Breno, Mariana, Ingrid, Vitor Melo, Gabriel, Luísa, Marcelo, por toda amizade, companheirismo, conselhos, ajuda e todo aprendizado. Vocês foram essenciais para o desenvolvimento deste projeto.

Ao Spencer Santos, por toda a paciência, amizade, disponibilidade, companheirismo e ensinamentos. Sem você eu não teria conseguido.

Ao Helder, por toda ajuda na dosagem das imunoglobulinas.

À Gabriela, por ter me ajudado na coloração de P.A.S

Ao Loui, por ser meu companheiro de todas as horas e alegrar o meu dia.

A todos os amigos que sempre me apoiaram.

Aos órgãos financiadores deste trabalho, em especial a CAPES.

Finalmente, a todos aqueles que não citei mas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Epitélio intestinal	14
1.2 Microbiota intestinal	17
1.3 Alergia alimentar	18
1.4 Probióticos	22
1.5 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFMG A-905	25
2. JUSTIFICATIVA	27
3. OBJETIVO.....	28
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivos específicos	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1 Animais	29
4.2 Micro-organismo	30
4.3 Tratamento.....	30
4.4 Desenho experimental	30
4.5 Sensibilização e desafio alérgico	33
4.5.1 Sensibilização	33
4.5.2 Desafio alérgico	33
4.6 Avaliação clínica dos animais e consumo de alimento	33
4.6.1 Consumo de ração.....	33
4.6.2 Desenvolvimento ponderal	33
4.7 Análises histológicas.....	34
4.7.1 Coloração de HE.....	34
4.7.2 Técnica de PAS	35
4.7.3 Análise das lâminas e fotodocumentação	35
4.7.4 Escore do grau de lesão	35
4.7.5 Avaliação da produção de muco	35
4.8 Avaliação dos parâmetros imunológicos	36
4.8.1 Dosagem da Imunoglobulina IgE anti-OVA	36
4.8.2 Dosagem de IgG1 anti-OVA	37
4.8.3 Avaliação da atividade da MPO	38
4.8.4 Avaliação da atividade da EPO	39
4.8.5 Dosagem de IL-17	39
4.9 Avaliação da composição da microbiota intestinal na alergia alimentar após o tratamento probiótico por método dependente de cultivo.....	40
4.10 Análises estatísticas	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42

5.1 Desenvolvimento ponderal e consumo de ração.....	42
5.2 Avaliação da Imunoglobulina IgE e IgG1 anti-OVA	44
5.3 Análises histológicas.....	46
5.3.1 Análise da produção de muco	48
5.4 Avaliação da atividade de MPO.....	51
5.5 Avaliação da atividade de EPO	52
5.6 Avaliação dos níveis de IL-17	54
5.7 Avaliação da composição da microbiota intestinal na alergia alimentar após o tratamento probiótico por método dependente de cultivo.....	55
5.8 Avaliação do efeito dose-dependente da levedura	58
5.9 Avaliação da viabilidade da levedura e do sobrenadante de cultura na alergia alimentar	59
6. CONCLUSÕES.....	62
7. REFERÊNCIAS	63
8. ANEXOS	76
8.1 Certificado da Comissão de ÉTICA no Uso de Animais (CEUA).....	76
8.2 Viabilidade da levedura durante o período de tratamento	77
8.3 Fotografia da estrutura intacta da levedura <i>S. cerevisiae</i> UFMG A-905 após processo de inativação pelo calor.....	78
8.4 Fotografia de uma placa com meio YPG contendo 0,1mL da levedura <i>S. cerevisiae</i> UFMG A-905 inativada pelo calor na concentração de 10^9 UFC/mL ...	79
8.5 Produção científica durante o período de mestrado	80
8.5.1 Resumos publicados em anais científicos	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C. - Antes de Cristo
ABTS - 2,2'-Azino-bis (3 - etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
AGCC - Ácido Graxo de Cadeia Curta
Al(OH)₃ - Hidróxido de alumínio
ALT - Alanina transaminase
ANOVA - Análises de variância (do inglês *analysis of variance*)
APC - Células apresentadoras de antígeno (do inglês *antigen-presenting cell*)
AS - Ágar sangue
AS-S - Ágar sangue suplementado
AST - Aspartato amino transferase
BAL - Bactérias ácido lácticas
BBE - Ágar Bacteroides Bile Esculina
BHI - Ágar Infuso de Cérebro e Coração (do inglês *brain heart infusion*)
CEBIO - Centro de Bioterismo
Células M - *Microfold*
Células NK - do inglês *natural killer cells*
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
D.O. - Densidade ótica
EDTA - Ácido etilenodiamina
ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês *enzyme immunosorbent assay*)
EPO - Peroxidase eosinofílica (do inglês *eosinophil peroxidase*)
FAIS - Fator anti-inflamatório de *Saccharomyces*
FAO - Organização das Nações Americanas de Alimento e Agricultura (do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*)
FcγRs - Receptor de alta afinidade presente nas células mieloides
FcεRI - Receptor de alta afinidade a imunoglobulina do tipo E
GALT - Tecido linfóide associado ao intestino (do inglês *gut associated lymphoid tissue*)
H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
H₂SO₄ - Ácido sulfúrico
HE - Hematoxilina e Eosina
HTAB - Brometo de hexadeciltrimetilamônio
i.g. - Intragástrica
ICB - Instituto de Ciências Biológicas
IFN_γ - Interferon gama
IgE - Imunoglobulina do tipo E
IgG - Imunoglobulina do tipo G
IL - Interleucina
kDa - kilodalton
LP - Lâmina própria

mg - Miligrama
MHC - Complexo de histocompatibilidade principal (do inglês *Major Histocompatibility Complex*)
mL - Mililitros
MPO - Mieloperoxidase
MRS - Ágar de Mann, Rogosa e Sharp
NaCl - Cloreto de sódio
NaH₂PO₄ - Fosfato monossódico
NaPO₄ - Fosfato de sódio
NB2 - Nível de Biossegurança 2
nm - Nanômetro
OFC - Desafio alimentar oral (do inglês *oral food challenge*)
OPD - ortofenileno-diamino
OVA - Ovalbumina
PAF - Fator de ativação de plaquetas (do inglês *platelet-activating factor*)
PAS - Ácido Periódico de Schiff (do inglês *periodic acid shift*)
PBS - Tampão fosfato-salino (do inglês *phosphate buffered saline*)
pH - Potencial hidrogeniônico
PI - Permeabilidade Intestinal
PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PP - Placas de Peyer
ROS - espécies reativas de oxigênio (do inglês *reactive oxygen species*)
rpm - Rotação por minuto
s.c. - Subcutânea
Sb - Ágar Sabouraud
SI - Sistema imune
slgA - Imunoglobulina secretória do tipo A
SPT - Testes de injeções cutâneas (do inglês *skin prick test*)
TGF-β - do inglês *transforming growth factor β*
TGI - Trato gastrointestinal
Th - Linfócito T helper
TLR - Receptores do tipo Toll (do inglês *Toll-like receptors*)
TMB - Tetrametilbenzidina
TNF- Fator de necrose tumoral
Treg - Linfócito T regulatório
UFC - Unidade formadora de colônia
UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais
WHO - Organização Mundial da Saúde (do inglês *World Health Organization*)
YPG - meio de cultura contendo extrato de levedura, peptona e glicose
ZO-1 - Do inglês *zonula occludens-1*
µg - Microgramas
µL - Microlitros

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. O epitélio intestinal de mamíferos. Adaptado de Elliot et al. (2015).....	14
Figura 2. Estrutura molecular das junções intracelulares do tecido epitelial intestinal. Adaptado de Lee et al. (2015).....	16
Figura 3. Inflamação alérgica tipo 2. Mecanismos básicos, patofisiologia, e consequências clínicas selecionadas. Adaptado de Potaczek et al. (2017).....	20
Figura 4. Linha do tempo de marcos na história dos probióticos. Adaptado de O'Toole, et al. (2017).....	23
Figura 5. Modelo esquemático do período de sensibilização, tratamento e desafio alergênico no modelo murino de alergia alimentar	31
Figura 6. Desenvolvimento ponderal	42
Figura 7. Consumo de ração	44
Figura 8. Avaliação dos níveis de IgE anti-OVA (A) e IgG1 anti-OVA (B).....	45
Figura 9. Fotomicrografias da histologia corada com HE dos 4 grupos com aumento de 10X e escore das lesões histopatológicas	47
Figura 10. Fotomicrografias da histologia corada com PAS dos 4 grupos com aumento de 20X	48
Figura 11. Fotomicrografias da histologia corada com PAS dos 4 grupos com aumento de 10X e contagem das células caliciformes	50
Figura 12. Avaliação dos níveis de MPO.....	52
Figura 13. Avaliação dos níveis da enzima EPO.....	53
Figura 14. Avaliação dos níveis de IL-17.....	54
Figura 15. Composição da microbiota intestinal por método dependente de cultivo.....	56
Figura 16. Dose - resposta em relação aos níveis de MPO	59
Figura 17. Avaliação da mieloperoxidase em camundongos tratados com a levedura <i>S. cerevisiae</i> UFMG A-905 inativada pelo calor e com o sobrenadante (Sobr.) da cultura viável	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Receita padrão para roedores baseada na AING93.....	29
Tabela 2. Desenho experimental com as respectivas designações dos grupos e tratamentos, experimento 1.....	31
Tabela 3. Desenho experimental com as respectivas designações dos grupos e tratamentos, experimento 2.....	31
Tabela 4. Desenho experimental com as respectivas designações dos grupos e tratamentos, experimento 3.....	32
Tabela 5. Escore histopatológico do jejuno proximal.....	36
Tabela 6. Meios e condições de cultivo para a análise qualitativa e quantitativa da composição da microbiota intestinal presente nas fezes dos camundongos coletadas no último dia do desafio.	40

RESUMO

O aumento da prevalência de casos de alergia alimentar se tornou um entrave para a saúde pública culminando em gastos alarmantes para esses setores. A alergia alimentar é desencadeada quando há a ativação exacerbada do sistema imune por antígenos da dieta. Os sintomas podem variar desde dor abdominal até os casos mais graves de anafilaxia. Uma das terapias alternativas que tem sido estudada é o uso de probióticos devido às suas comprovadas propriedades imunomodulatórias. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito probiótico de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 em um modelo murino de alergia alimentar, analisando parâmetros clínicos, histológicos, imunológicos e microbiológicos, além de avaliar a dose-resposta, o efeito da viabilidade da levedura e do sobrenadante da cultura. Para isso, camundongos foram sensibilizados com ovalbumina (OVA) (dia 0). Após 14 dias eles receberam um reforço imunológico. O grupo controle recebeu apenas o adjuvante com salina no dia 0 e apenas salina no 14º dia. No 18º dia, os camundongos receberam o respectivo tratamento de *S. cerevisiae* UFMG A-905 ou seu sobrenadante, até o fim do experimento (dia 28). A partir do 21º dia os animais foram desafiados com uma dieta contendo OVA. No 28º dia, os camundongos foram eutanasiados. A administração oral de *S. cerevisiae* UFMG A-905 viável promoveu a atenuação significativa do grau de lesão tecidual, além de suprimir significativamente os níveis de MPO, e esta redução apresentou um perfil dose-dependente. Ademais, o tratamento apresentou uma tendência à redução de aproximadamente 50% do recrutamento de eosinófilos, atenuando o infiltrado inflamatório. E ainda, o presente estudo demonstrou que o tratamento promoveu uma redução significativa dos níveis da citocina IL-17. Além disso, a administração do sobrenadante da cultura viável da levedura também promoveu uma supressão significativa dos níveis de MPO. Entretanto, em relação aos parâmetros sistêmicos, IgE e IgG anti-OVA, que são essenciais para o desencadeamento do processo alérgico, não houve efeito, sugerindo que a levedura possui um efeito local, mas não sistêmico, no modelo avaliado. Portanto, a administração oral de *S. cerevisiae* UFMG A-905 promove um efeito probiótico local, dose-dependente e que depende da viabilidade da levedura.

Palavras-chave: Alergia alimentar, probiótico, *S. cerevisiae* UFMG A-905, infiltrado inflamatório, IL-17.

ABSTRACT

The increased prevalence of food allergy cases has become an obstacle to public health leading to a relevant economic cost for the health care system. Food allergy is triggered when there is an abnormal activation of the immune system by food allergens. Symptoms of food allergy can range from abdominal pain to the most severe anaphylactic cases. One of the alternative therapies that have been studied is the use of probiotics, given its proven immunomodulatory proprieties. Therefore, the aim of this study was to evaluate the probiotic effect of *S. cerevisiae* UFMG A-905 in an *in vivo* model of food allergy, analyzing clinical, histological, immunological and microbiological parameters. In addition, the dose-response, the effect of the viability of the yeast and the supernatant of the culture were also evaluated. For this purpose, mice were sensitized with ovalbumin (OVA) (day 0). After 14 days they received a booster. The control group received only the adjuvant with saline by day 0 and only saline on 14th day. On 18th day, mice received daily the respective treatment of *S. cerevisiae* UFMG A-905 or its supernatant, until the end of the experiment (28th day). From 21st day until the end the mice were challenged with a diet containing OVA. On 28th day mice were euthanized. Oral administration of viable *S. cerevisiae* UFMG A-905 led to a significant attenuation of the degree of tissue injury, and in addition, it promotes a significant reduction of MPO levels, this reduction presenting a dose-dependent profile. Furthermore, the treatment promoted a tendency to reduce approximately 50% of eosinophil recruitment, attenuating the inflammatory infiltrate. In addition, the present study showed that the treatment promoted a significant decrease of the cytokine IL-17 levels. Furthermore, the administration of the supernatant of the viable culture of the yeast also promoted a significant reduction of the MPO levels. However, considering the systemic parameters IgE e IgG anti-OVA, which are essentials for the triggering of the allergic process, there was no effect, suggesting that the yeast promotes a local but not systemic effect, in the model evaluated. Therefore, oral administration of *S. cerevisiae* UFMG A-905 led to a local, dose-dependent probiotic effect that depends on the viability of the yeast.

Key words: Food allergy, probiotic, *S. cerevisiae* UFMG A-905, inflammatory infiltrate, IL-17.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epitélio intestinal

O intestino é um dos sítios anatômicos que está em contato direto com o ambiente externo (Salvo et al., 2015). Ele consiste de um sistema tubular que apresenta seu lúmen revestido pelo epitélio intestinal, que é composto por uma camada única de células colunares organizadas em criptas e vilosidades. Nas criptas são encontradas células tronco e células de Paneth, enquanto os enterócitos, células Tuft, células enteroendócrinas e as células caliciformes produtoras de muco podem ser encontradas ao longo do eixo cripta-vilosidades, como apresentado na Figura 1 (Elliott et al., 2015; Zhang et al., 2015).

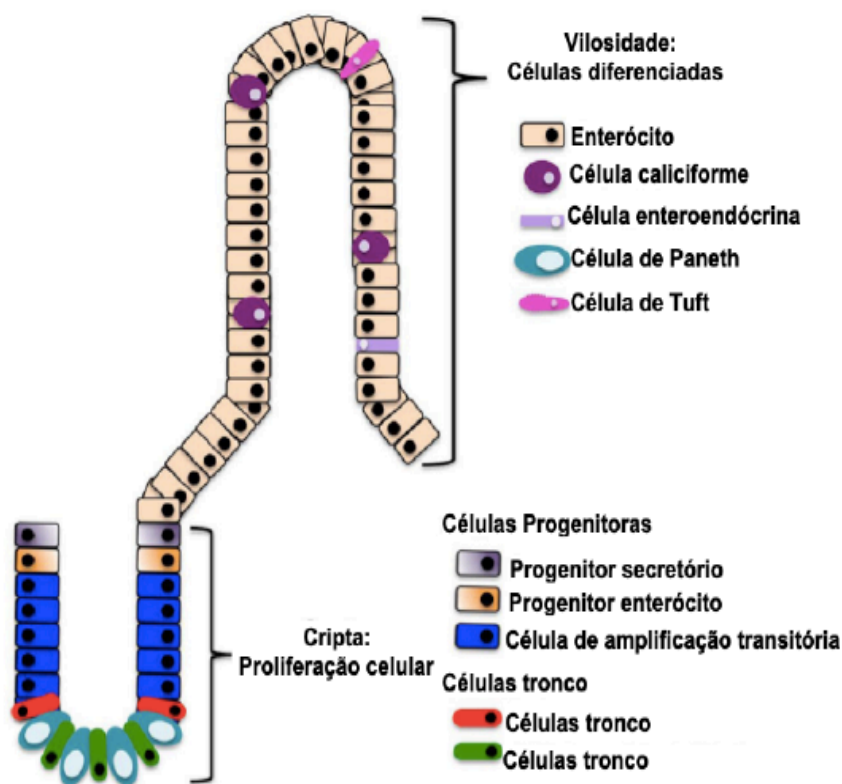


Figura 1. O epitélio intestinal de mamíferos. Adaptado de Elliot et al. (2015).

15

As células tronco presentes nas criptas são responsáveis por manter a taxa de renovação celular e podem ser agrupadas em dois diferentes grupos. O primeiro é caracterizado por ter a capacidade de gerar todos os tipos de células do epitélio intestinal, enquanto o segundo é formado por células quiescentes que podem dar origem ao primeiro grupo e serem capazes de proliferar e reconstruir o epitélio

20

(Elliott et al., 2015). Após a diferenciação, essas células migram, e após 3 a 5 dias são esfoliadas para dentro do lúmen intestinal, sendo eliminadas. Esse processo é essencial para que haja a eliminação de patógenos e consequente manutenção da homeostase e da permeabilidade intestinal (PI) (Zhang et al., 2015).

5 As células de Paneth são capazes de secretar defensinas, lisozimas e outras proteínas que atuam como antimicrobianos (Elliott et al., 2015), sendo essenciais para a manutenção da homeostase entre hospedeiro e microbiota intestinal (Gassler et al., 2017).

10 Os enterócitos são as células mais encontradas nas vilosidades intestinais (cerca de 90%) e são responsáveis pela digestão e absorção de nutrientes, além de formar a barreira intestinal (Elliott et al., 2015; Gassler et al., 2017), sendo, portanto, essenciais para as funções básicas do trato digestivo.

15 As células de Tuft constituem de 0,4 a 2% do epitélio intestinal e possuem capacidade sensorial, atuando em processos de eliminação de patógenos, além de liberar mediadores e promover a interação entre o lúmen intestinal e as células epiteliais e não epiteliais (Cheng et al., 2018).

As células enteroendócrinas constituem menos de 1% do total de células epiteliais intestinais e auxiliam na regulação de secreções gastrointestinais, consumo de alimentos e saciedade (Sternini et al., 2008).

20 Por fim, as células caliciformes auxiliam na apresentação de antígenos para as células dendríticas e são responsáveis pela produção constante de muco. O muco produzido e secretado por essas células entra em contato com as substâncias antimicrobianas secretadas pelas células de Paneth que, juntamente com o movimento peristáltico, auxilia na eliminação de patógenos (Pelaseyed et al., 2014).

25 Todos esses tipos celulares apresentados são conectados por junções que dificultam a passagem de moléculas pró-inflamatórias, além de regular a passagem de eletrólitos, nutrientes e água do lúmen para a mucosa intestinal e sistema circulatório (Pelaseyed et al., 2014; Lee et al., 2015).

30 As junções oclusivas são formadas por proteínas transmembranas, como claudinas, ocludinas e junções de adesão moleculares que, juntas, constituem uma barreira ao transporte paracelular de moléculas, como apresentado na Figura 2 (Lee et al., 2015).

Outro fator que contribui para manutenção da homeostase e integridade do trato gastrointestinal (TGI) é a presença do tecido linfoide associado ao intestino

(GALT, do inglês *gut associated lymphoid tissue*) (Faria et al., 2013). Este é composto por folículos linfoides como as placas de Peyer (PP) e folículos linfoides isolados (Jung et al., 2010). As PP e os folículos linfoides isolados apresentam células M (*Microfold*), células dendríticas e linfócitos T e B. As células M são células epiteliais responsáveis por interagir com antígenos e bactérias, e os direcionar para o GALT, para que haja o desencadeamento da resposta imune e controle de potenciais infecções (Ohno et al., 2015).

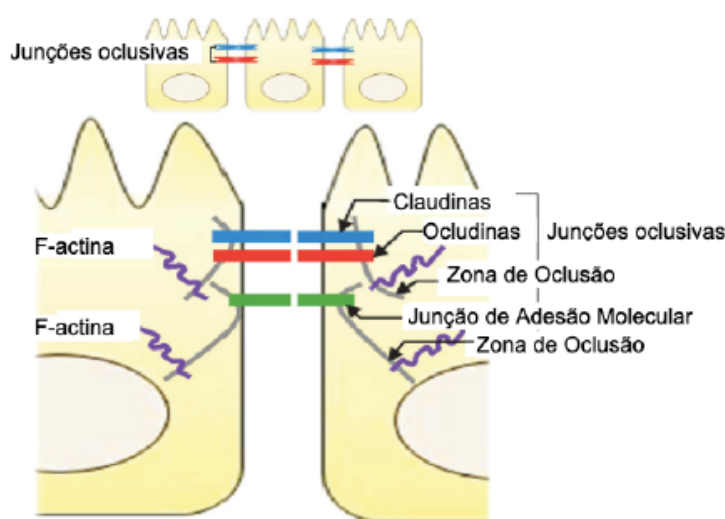


Figura 2. Estrutura molecular das junções intracelulares do tecido epitelial intestinal. Adaptado de Lee et al. (2015).

As células dendríticas pertencem ao sistema imune (SI) inato e são responsáveis por processar proteínas e apresentar os antígenos na presença do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) aos linfócitos T naíve (Collin et al., 2018). Os linfócitos T e B são células essenciais para a resposta imune e defesa do organismo contra patógenos. Esta resposta consiste basicamente de cinco fases: reconhecimento do antígeno; ativação dos linfócitos, eliminação do antígeno, declínio e memória (Abbas et al., 2007). Na fase de reconhecimento ocorre a localização e reconhecimento de antígenos pelos linfócitos T naíve. Em seguida, o processo de ativação e diferenciação é desencadeado, dando início ao processo de expansão clonal. Ao se diferenciarem, os linfócitos T naíve se transformam em linfócitos efetores, como os linfócitos B (responsáveis principalmente pela produção de anticorpos); linfócitos T auxiliares (cujas principais funções são a produção de citocinas, que são proteínas desencadeadoras de diversos processos pró ou anti-inflamatórios); linfócitos T citotóxicos (que promovem a lise de células infectadas por

micro-organismos) e células NK (do inglês, *natural killer*) (que também promovem a eliminação de células infectadas) (Abbas et al., 2007).

Os linfócitos T e B também podem ser encontrados na lâmina própria (LP) juntamente com as células plasmáticas, macrófagos e células dendríticas. Na LP as células apresentadoras de antígenos interagem com os antígenos e os apresentam aos linfócitos T e B, induzindo a produção de sIgA (imunoglobulina do tipo A secretória) (Fagarasan et al., 2003; Faria et al., 2013). Essa imunoglobulina é produzida pelos plasmócitos da mucosa e se distingue da IgA por possuir uma glicoproteína, de aproximadamente 80 kDa, conhecida como componente secretório (Brandtzaeg et al., 2009). A principal função dessa glicoproteína é interagir com antígenos solúveis ou particulados e promover sua eliminação em um processo denominado imuno exclusão (Brandtzaeg et al., 2013).

1.2 Microbiota intestinal

A microbiota intestinal também desempenha um papel protetor na integridade e homeostase do trato digestivo (Sekirov et al., 2010). Essa microbiota corresponde ao conjunto de micro-organismos que habitam o lúmen intestinal e estão em simbiose com o hospedeiro (Aitoro et al., 2017). Durante o nascimento, o neonato entra em contato com a microbiota materna, vaginal ou cutânea, dependendo do tipo de parto, dando origem ao microbioma do neonato (von Mutius et al., 2017). A composição da microbiota intestinal é complexa e envolve bactérias, fungos, vírus e protozoários, sendo que as bactérias são os micro-organismos predominantes (Laforest-Lapointe et al., 2017). Alguns estudos apontam a dominância dos filos Bacteroidetes e Firmicutes, enquanto Proteobacteria, Verrucomicrobia, Actinobacteria, Fusobacteria, Cyanobacteria estão presentes em menor quantidade no adulto (Sekirov et al., 2010; Sommer et al., 2013).

Alguns trabalhos relatam que a microbiota intestinal e seus metabólitos, em associação com a exposição nos primeiros estágios da vida aos antígenos provenientes da dieta, auxiliam na tolerância oral e defesa contra o desencadeamento de processos alérgicos (Aitoro et al., 2017). O processo de tolerância oral pode ser definido como uma resposta reguladora do SI frente a substâncias inócuas, como as proteínas provenientes da dieta. Inúmeros mecanismos têm sido associados à tolerância oral, principalmente a regulação ativa exercida pelas células T regulatórias (Treg) (Pabst et al., 2012). Este processo

baseia-se na amostragem de antígenos, componentes da dieta e da microbiota intestinal, presentes no lúmen, pelos macrófagos. Os macrófagos projetam seus dendritos através da barreira epitelial em direção ao lúmen e, posteriormente, o antígeno é direcionado pelos macrófagos para as células dendríticas que promovem a geração de células Treg antígeno específico, permitindo a regulação da resposta imune tipo Th2. Esta é essencial para o desencadeamento da cascata inflamatória que culmina nos processos alérgicos (Abdel-Gadir et al., 2018; Paul et al., 2010).

Alterações nesses componentes de tolerância oral e de manutenção da homeostase que desencadeiam a passagem exacerbada de substâncias, que normalmente são impedidas de passar pela barreira intestinal, culminam em respostas imunes exageradas, que podem amplificar a disfunção da barreira intestinal e manutenção do quadro de inflamação (Salvo et al., 2015). Esse aumento da permeabilidade intestinal tem sido associado com inúmeras doenças, por exemplo, síndrome do intestino irritável, doença celíaca e até mesmo quadros de alergia alimentar (Groschwitz et al., 2009; Vancamelbeke et al., 2017).

1.3 Alergia alimentar

Estima-se que apenas no sistema de saúde norte americano são gastos cerca de 24,8 bilhões de dólares por ano com os tratamentos de alergia alimentar (Yu et al., 2016). Nas últimas décadas houve um aumento global em relação à prevalência dos casos de alergia alimentar, acarretando na intensificação das preocupações em relação a essa condição patológica (de Azevedo et al., 2013).

A alergia alimentar é desencadeada quando há a ativação exacerbada do SI devido à ingestão de um alérgeno alimentar, por exemplo, algumas proteínas presentes em ovo, leite, amendoim, peixe, trigo e soja. As proteínas desses alimentos em conjunto com os fatores de risco, como por exemplo, etnicidade, fatores genéticos, padrões alimentares característicos de cada região e desequilíbrio da composição da microbiota intestinal (disbiose), intensificam as chances de desencadear as reações alérgicas. A disbiose pode ser proveniente de diversos fatores como o uso prolongado de antibióticos, estilo de vida, dieta e higiene excessiva/teoria da higiene. A teoria da higiene foi elucidada por Strachan e colaboradores (1989) e ela correlaciona a diminuição de infecções, devido ao aumento dos hábitos de higiene, com o aumento da incidência de doenças alérgicas,

não só a alergia alimentar como também a asma (Yu et al., 2016; du Toit et al., 2016; Aitoro et al., 2017; Tham et al., 2018; Sharma et al., 2018; Okada et al., 2018).

As reações que envolvem esse processo de alergia alimentar podem ser classificadas em três tipos: reações mediadas por IgE (imunoglobulina do tipo E), não mediadas por IgE e mistas (envolvem as mediadas e não mediadas por IgE) (Castellazzi et al., 2013). As reações mediadas por IgE ocorrem quando um indivíduo previamente exposto ao alérgeno sofre uma segunda exposição, acarretando na degranulação mediada por IgE de células imunes efectoras (Yu et al., 2016). Ou seja, quando há a ingestão do alérgeno pela primeira vez (sensibilização primária), este é processado e apresentado pelas células apresentadoras de antígeno (APC, do inglês *antigen-presenting cell*) (macrófagos e células dendríticas). Por sua vez, as APC associadas ao MHC de classe II (do inglês *major histocompatibility complex type II*) interagem com receptores específicos das células T naíves. Com a presença da interleucina (IL)-4, haverá a diferenciação das células T naíves para linfócitos Th2 efectoras (do inglês, *helper T cells*). Assim, a célula Th2 efectora além de produzir citocinas (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13), também é responsável por ativar as células B. As células B ativas produzem IgE contra o alérgeno específico. Essas IgE interagem com mastócitos e basófilos por meio dos receptores FcεRI (receptor de alta afinidade a IgE) presentes na superfície dessas células. Em subsequentes contatos com o alérgeno, há uma reação cruzada desses receptores, e subsequente degranulação dessas células, culminando na liberação dos mediadores inflamatórios, levando ao desenvolvimento dos sintomas característicos dos processos de alergia, como podem ser visualizados na Figura 3 (Potaczek et al., 2017; Faria et al., 2013).

Os mecanismos que envolvem as reações não mediadas por IgE são pouco conhecidos. Entretanto, acredita-se que a ativação de células T por alérgenos alimentares pode mediar a inflamação local devido à liberação de citocinas, tal como o fator de necrose tumoral (TNF) e interferon gama (IFN-γ), que favorecem o desencadeamento da inflamação e aumento da PI, evidenciando que as reações não mediadas por IgE afetam principalmente o TGI (Nowak-Węgrzyn et al., 2015; Yu et al., 2016).

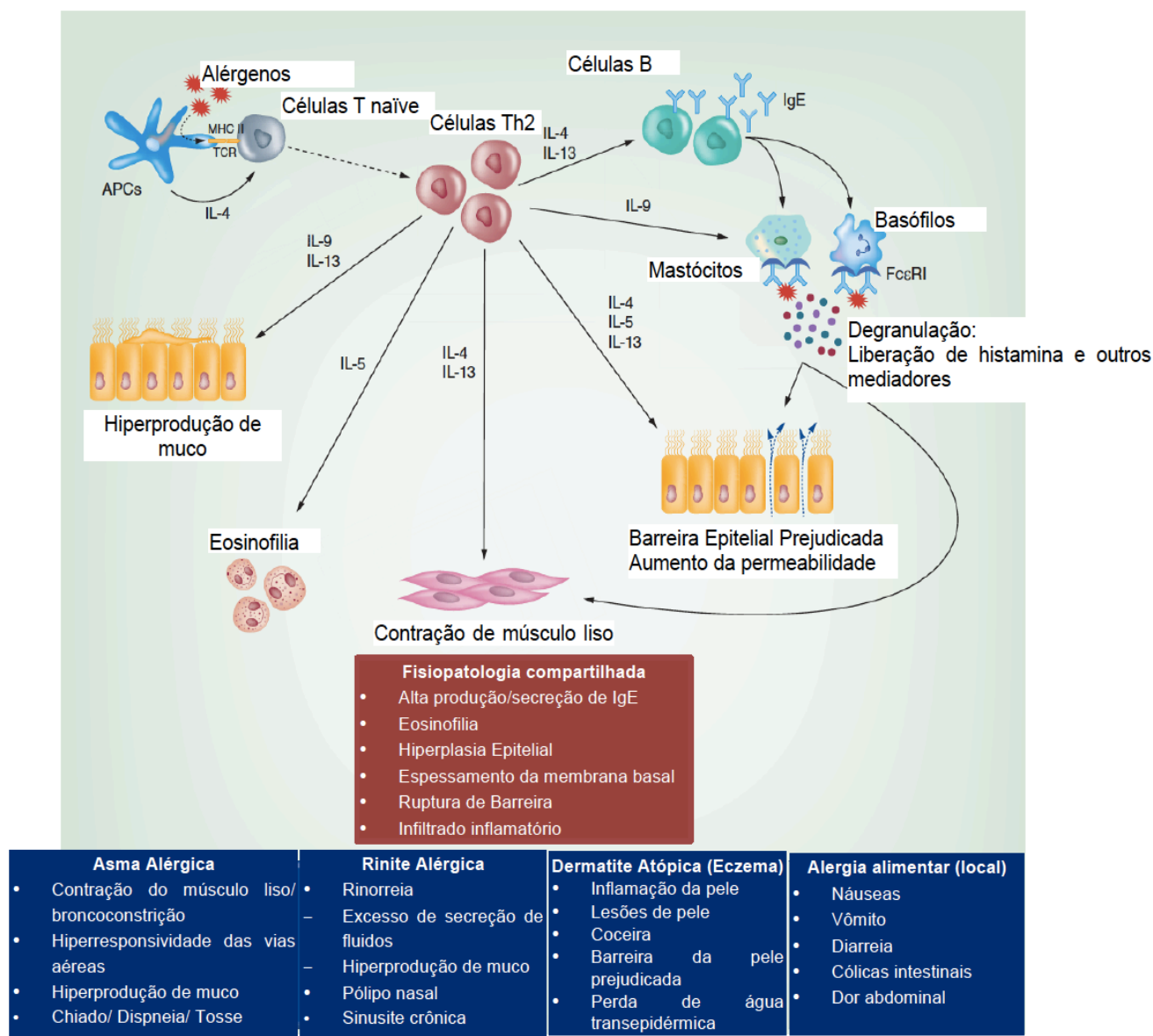


Figura 3. Inflamação alérgica tipo 2. Mecanismos básicos, patofisiologia e consequências clínicas selecionadas. Adaptado de Potaczek et al. (2017).

Existem, ainda, desordens que envolvem a ativação de ambas as reações, tanto as mediadas por IgE, quanto não mediadas por IgE. Essas desordens são classificadas como alergias alimentares mistas. Algumas condições patológicas pertencentes a esse grupo são a dermatite atópica, gastroenterite eosinofílica e esofagite eosinofílica (Castellazzi et al., 2013).

Além da IgE, a imunoglobulina do tipo G (IgG) desempenha um papel primordial nas respostas alérgicas. Em camundongos existem quatro sub-unidades dessa imunoglobulina, sendo que a IgG1 é a subclasse encontrada em maior quantidade frente a alérgenos proteicos. Esta imunoglobulina forma

imunocomplexos com os alérgenos, que são capazes de ativar os receptores FcγRs (receptor de alta afinidade presente nas células mieloides, como neutrófilos e macrófagos), culminando na liberação de fator de ativação de plaquetas (PAF, do inglês, *platelet-activating factor*). Este fator está intimamente relacionado com a indução de anafilaxia nos processos alérgicos (Beutier et al., 2017; Jönsson et al., 2011).

Durante os processos alérgicos, eosinófilos e neutrófilos também são recrutados por quimiocinas e citocinas, como, por exemplo, a eotaxina-1 e a IL-17, respectivamente, para o sítio de inflamação, formando um infiltrado inflamatório (Hogan et al., 2009; Żbikowska-Gotz et al., 2016). Os eosinófilos se originam na medula espinhal e se diferenciam em resposta à IL-5, subsequentemente migram e circulam pela corrente sanguínea por aproximadamente 20 horas, seguindo, então, para os tecidos, onde ficam localizados por até 14 dias (Ahmadi et al., 2016). Em processos alérgicos, ao serem recrutados para os tecidos e ativados, os eosinófilos produzem algumas citocinas e liberam enzimas, como a peroxidase eosinofílica (EPO) (Chu et al., 2014), que é responsável por catalisar a oxidação de algumas substâncias, como nitrito, gerando espécies altamente reativas que oxidam proteínas desencadeando estresse oxidativo e morte celular, promovendo danos teciduais (Hogan et al., 2009).

Muitos estudos têm sido realizados para demonstrar o papel dos neutrófilos nos processos de alergia, principalmente em modelos de asma e alergia alimentar (Hosoki et al., 2016; Żbikowska-Gotz et al., 2016). Dessa maneira, observou-se que, em processos alérgicos, essas células são capazes de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) e promover a liberação de proteases, como a mieloperoxidase (MPO), que podem promover danos teciduais, intensificando o processo inflamatório (Żbikowska-Gotz et al., 2016). Além disso, tem sido reportado que os neutrófilos são capazes de induzir anafilaxia em modelos animais. Essa indução seria por meio da ativação dos receptores FcγRs, presentes em neutrófilos, com consequente liberação de PAF, promovendo, então, o processo de anafilaxia (Beutier et al., 2017).

As reações alérgicas desencadeiam diversos sintomas que provocam uma redução da qualidade de vida dos indivíduos acometidos pela alergia alimentar, culminando até mesmo em anafilaxia (Neau et al., 2016). A anafilaxia é uma reação alérgica hiperaguda, que pode levar à falência cardíaca e pulmonar com

consequente asfixia e morte do indivíduo (Beutier et al., 2017). Em desordens mediadas por IgE, alguns sintomas encontrados são edema, dor abdominal, diarreia e, nos casos mais graves, anafilaxia com colapso cardiovascular (Shik et al., 2017). Nas desordens mistas tem-se refluxo, êmese crônica ou intermitente, disfagia, perda de peso e anemia. E, ainda, na alergia alimentar não mediada por IgE, tem-se a presença de fezes heme-positivas, evidenciando o desconforto que essa condição patológica pode causar nos indivíduos que apresentam esse quadro (Nowak-Węgrzyn et al., 2015; Nowak-Węgrzyn et al., 2017).

O diagnóstico da alergia alimentar é feito considerando o histórico médico do paciente e os sintomas apresentados. Nesse histórico deve-se investigar o possível mecanismo envolvido no processo alérgico, se mediado ou não por IgE, para que haja o direcionamento dos tipos de testes que devem ser executados (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, 2010). Dentre os testes mais utilizados, tem-se o desafio alimentar oral (OFC, do inglês *oral food challenge*), que é padrão ouro para o diagnóstico da alergia alimentar (Calvani et al., 2012), e os testes de injeções cutâneas (SPT, do inglês *skin prick test*) (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, 2010). Os tratamentos para atenuar esse desconforto são investigados e propostos desde tempos antigos. Hipócrates (460-375 a.C.) reportou um caso de alergia alimentar causada por derivados do leite, e foi sugerida a remoção desse alimento da dieta (Wüthrich et al., 2014; Nowak-Węgrzyn et al., 2015).

A remoção do alimento causador da alergia alimentar da dieta continua sendo o tratamento padrão na atualidade, além da administração de adrenalina em casos de reação sistêmica (Yu et al., 2016). Portanto, o desenvolvimento de novas estratégias no combate à alergia alimentar é essencial para que haja a melhora dos quadros patológicos.

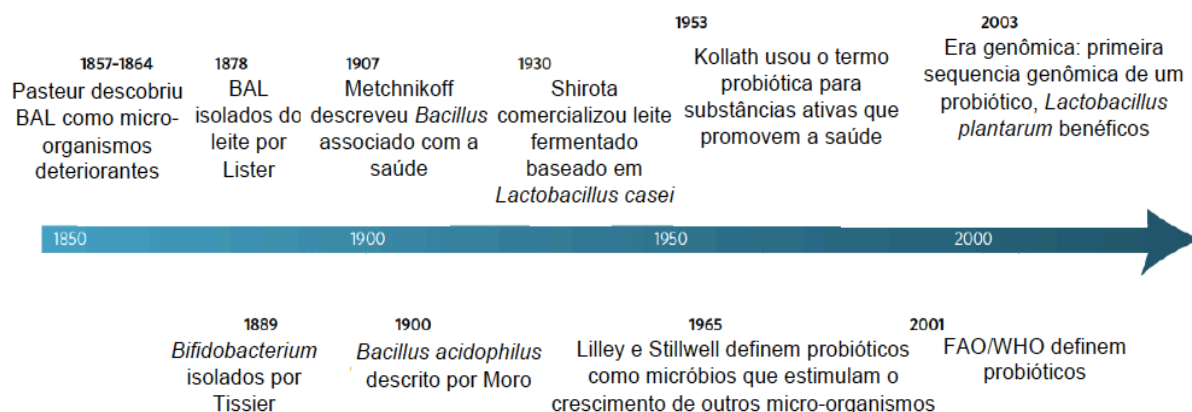
1.4 Probióticos

Uma das estratégias que vem sendo estudadas para o tratamento da alergia alimentar é o uso de probióticos (Kim et al., 2005; Castellazzi et al., 2013; Lee et al., 2013). A história dos probióticos vem sendo delineada desde 1857/1864, período o qual não havia uma definição globalmente reconhecida para o termo probióticos. Desde então, alguns eventos marcaram a história destes micro-organismos até se chegar nos dias atuais em que houve o desenvolvimento de uma definição e um

manual que regulamenta o uso dos probióticos (Figura 4). Por esta definição, probióticos são micro-organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002; Hill et al., 2014; O'Toole et al., 2017).

5

Figura 4. Linha do tempo de marcos na história dos probióticos. Adaptado de O'Toole, et al. (2017). BAL: Bactérias ácido lácticas. FAO: Organização das Nações Americanas de Alimento e Agricultura (do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*;



WHO: Organização Mundial da Saúde (do inglês *World Health Organization*)

10

O papel dos probióticos contra os processos alérgicos tem sido evidenciado devido à sua capacidade de atuar como imunomodulador, além de conferir uma melhora nas funções da barreira intestinal (Sekirov et al., 2010; Lee et al., 2013). Essa melhora na função da barreira intestinal deve-se, principalmente, aos metabólitos produzidos por esses micro-organismos, por exemplo, os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (Aitoro et al., 2017). Esses ácidos estimulam a secreção de IL-10 pelas células dendríticas e macrófagos, além de estimular o desenvolvimento de linfócitos Treg. Estes linfócitos produzem IL-10 e a citocina TGF- β (do inglês, *transforming growth factor*), que são fatores importantes na inibição das respostas alérgicas (Nowak-Węgrzyn et al., 2017).

20

Padrões alterados da composição da microbiota intestinal podem acarretar no desenvolvimento da alergia alimentar (Aitoro et al., 2017). Além disso, Nakayama e colaboradores (2011) mostraram diferenças concisas na composição microbiana entre indivíduos alérgicos e não alérgicos. Nesse estudo, os gêneros *Bacteroides*, *Propionibacterium* e *Klebsiella* estavam mais abundantes no grupo alérgico quando comparados com o grupo não alérgico. E ainda, os grupos *Acinetobacter* e

25

Clostridium estavam menos abundantes no grupo alérgico quando comparados com o apresentado pelo grupo alérgico. Uma microbiota intestinal alterada pode predispor o indivíduo à alergia alimentar por modificar a sinalização dos receptores do tipo *Toll* (TLR, do inglês *Toll-like receptors*) e modificar a integridade das células epiteliais intestinais (Nowak-Węgrzyn et al., 2017).

Portanto, devido à importância da manutenção da composição microbiana normal, vários estudos que visam a sua manipulação têm sido realizados e os micro-organismos comumente empregados nesses estudos são espécies dos gêneros *Lactobacillus* (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus lactis*) e *Bifidobacterium* (*Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve*) (Kim et al., 2005; Castellazzi et al., 2013; Lee et al., 2013).

Além dessas bactérias, a levedura *Saccharomyces boulardii* também tem sido amplamente estudada (Czerucka et al., 2007; Pothoulakis et al., 2009; McFarland et al., 2010; Kelesidis et al., 2012; Moré et al., 2015; Brun et al., 2017). Esta levedura foi primeiramente isolada de uma fruta tropical por Henri Boulard em 1932 (Moré et al., 2015). Atualmente é a única levedura vendida como produto farmacêutico no mercado (Palma et al., 2015).

A vantagem de se administrar uma levedura em vez de uma bactéria como probiótico, principalmente em casos de indivíduos que estão sendo tratados com antibiótico, é a diminuição da possibilidade de trocas gênicas, principalmente de genes de resistência a antibióticos, entre probiótico e patógenos (Palma et al., 2015). Quando administrada, a *S. boulardii* atinge uma concentração estável no colón em aproximadamente três dias e não é detectada nas fezes em até cinco dias após o término da administração (Moré et al., 2015). Porém, para que os efeitos benéficos sejam adquiridos é necessário que se leve em consideração a dose da levedura a ser administrada, uma vez que ela é considerada um fator que afeta a eficácia do probiótico (Justino et al., 2014).

As principais funções probióticas de *S. boulardii* incluem a proteção contra diarreia associada à antibiótico (D'souza et al., 2002), infecção por *Clostridium difficile* (McFarland et al., 1994) e diarreia do viajante (Kelesidis et al., 2012). A capacidade de proteção do organismo contra bactérias entéricas patogênicas ocorre pela ligação de bactérias que expressam fímbria do tipo 1, como a *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, às células da levedura por meio de resíduos de

manose, levando à neutralização da célula bacteriana (Martins et al., 2013). Em relação à imunomodulação, tem-se que *S. boulardii* induz a secreção de slgA, citocinas como o TNF, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-12, que são essenciais na regulação da resposta imune (Kourelis et al., 2010). Em modelos de fibrose hepática foi demonstrado que a levedura atenua os níveis das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina transaminase (ALT), que são enzimas marcadoras de disfunção hepática, e citocinas pro-inflamatórias (TNF- α e IL-6) (Li et al., 2015).

Tendo em vista que as variantes probióticas de *S. boulardii* estão agrupadas dentro das espécies de *Saccharomyces cerevisiae* (Moré et al., 2015), e que ambas as leveduras apresentam similaridades quando geneticamente comparadas (Fietto et al., 2004), torna-se interessante o estudo de diferentes linhagens de *S. cerevisiae* como probióticos.

1.5 *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905

Diferentes características tornam um micro-organismo capaz de ser utilizado como probiótico. Dentre elas, tem-se a capacidade de resistir a enzimas gastrointestinais, sais biliares, ácidos orgânicos, variações de pH e temperatura (Fietto et al., 2004). Muitos estudos têm sido feitos para identificar micro-organismos que atendam esses requisitos. Dentre esses, destaca-se o trabalho realizado por Martins e colaboradores (2005), em que foi demonstrado o potencial da levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905, como possível candidato a probiótico.

Esta levedura foi isolada do processo de produção da cachaça. Dentre as suas propriedades probióticas, tem-se a proteção contra infecções bacterianas causadas por *S. Typhimurium*, em modelo animal (Martins et al., 2005; Martins et al., 2007; Martins et al., 2011) e efeito protetor em modelos murinos de inflamação intestinal, como colite (Tiago et al., 2015), mucosite (Bastos et al., 2016), obstrução intestinal (Generoso et al., 2010), além de efeito imunomodulador em modelo murino de asma (Fonseca et al., 2017) e sua capacidade de absorção de aflatoxinas (Silva et al., 2015).

Os mecanismos envolvidos nesses processos de proteção contra infecções bacterianas envolvem a ligação de bactérias que expressam fímbria do tipo 1 às células da levedura, levando à neutralização da célula bacteriana (Martins et al., 2011; Tiago et al., 2012). Em relação a modelos de patogênese intestinal, por exemplo, a obstrução intestinal, uma das hipóteses consideradas é que o probiótico

pode causar o aumento da expressão de proteínas de junções firmes, como a ZO-1 (zônula de oclusão 1, do inglês *zonula occludens-1*), nas células epiteliais intestinais, auxiliando na manutenção da integridade da barreira intestinal (Generoso et al., 2010). Para os modelos de asma, um dos mecanismos envolvidos é a restauração dos níveis de IL-10, que é sabidamente um fator anti-inflamatório (Iyer et al., 2012; Fonseca et al., 2017). Além disso, até mesmo inativada pelo calor, a levedura se mostrou capaz de desempenhar efeitos protetores impedindo a translocação bacteriana (Generoso et al., 2010).

Até o momento, nenhum estudo foi realizado a fim de avaliar o potencial probiótico de *S. cerevisiae* UFMG A-905 em um modelo murino de alergia alimentar. Além disso, pouco se sabe a respeito dos efeitos da administração dessa levedura inativada em modelos experimentais.

2. JUSTIFICATIVA

A alergia alimentar é uma condição patológica que pode desencadear quadros clínicos graves e até mesmo a morte por anafilaxia nos casos mais graves. Nas últimas décadas, a prevalência de casos dessa condição patológica tem aumentado consideravelmente gerando gastos alarmantes para os setores de saúde pública. Contudo, apesar da gravidade dos quadros clínicos, pouco se tem desenvolvido em termos de novas tecnologias para o tratamento da alergia alimentar. Atualmente, o método de tratamento mais utilizado é a remoção do alimento causador da alergia e a administração de adrenalina em casos de reação sistêmica. A retirada do possível alérgeno da dieta pode causar deficiências nutricionais graves, o que é um entrave para o tratamento dessa condição patológica. Além disso, muitas vezes o estilo de vida e as preferências alimentares do indivíduo fazem com que esse tratamento não seja realizado com o êxito esperado, dificultando ainda mais esse tipo de tratamento. Sendo assim, novas investigações para o desenvolvimento de estratégias que atenuem a ocorrência ou gravidade dos quadros clínicos apresentados e melhorem o estilo de vida das pessoas acometidas pela alergia alimentar é de extrema importância.

A administração de probióticos tem sido uma das vertentes estudadas para essa finalidade, principalmente devido à sua capacidade de regular a resposta imune. A levedura *S. boulardii* tem mostrado efeitos probióticos concisos e é a única levedura atualmente disponível no mercado como formulação farmacêutica, o que estimula a procura de novas leveduras probióticas. Nesse sentido, nosso grupo vem estudando leveduras probióticas desde 2002, e a levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905 vem ganhando destaque devido aos seus efeitos protetores em infecções bacterianas e doenças intestinais, como colite, colite pseudomembranosa, mucosite, salmonelose e obstrução intestinal; além de efeito imunomodulador em um modelo experimental de asma, o que nos leva a avaliar o efeito dessa levedura em outros modelos experimentais, como a alergia alimentar, com o intuito de investigar seu papel protetor e os mecanismos envolvidos.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial probiótico de *S. cerevisiae* UFMG A-905 em um modelo murino de alergia alimentar.

5

3.2 Objetivos específicos

a) Verificar o efeito do tratamento com *S. cerevisiae* UFMG A-905 na alergia induzida, analisando os parâmetros clínicos, histológicos, imunológicos e microbiológicos;

10

b) Avaliar se o efeito é dose dependente;

c) Avaliar se o efeito depende da viabilidade da levedura.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Todos os experimentos propostos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG) (Anexo 7.1).

A manipulação e toda manutenção dos animais foram realizadas de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (Brasil, 2008). Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*), de seis a oito semanas de idade, fêmeas, da linhagem BALB/c, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do ICB/UFMG. Os animais foram mantidos em micro-isoladores ALE.MIL.01.03 (Alesco, Monte Mor, SP, Brasil), no biotério do Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG, nível de biossegurança 2 (NB2). A dieta administrada durante todo o experimento foi baseado no trabalho de Reeves e colaboradores (1993) (Tabela 1). Porém, após 21 dias, a caseína, que é a fonte de proteínas da dieta, foi trocada por ovalbumina (OVA) até o término do experimento. Os animais receberam ração e água filtrada *ad libitum*. Um ciclo diurno/noturno de 12 horas foi mantido no biotério, assim como aeração, umidade (60-80%) e temperatura ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$) também foram controladas. Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, sendo este procedimento precedido por anestesia geral com solução de cetamina/xilazina (0,6 mL de cetamina 100 mg/mL; 0,4 mL de xilazina 20 mg/mL e 4 mL de solução salina NaCl 0,9%) (Wirtz et al., 2007). Para cada experimento foram utilizados cinco animais por grupo.

Tabela 1. Receita padrão para roedores baseada na AING93, adaptada. Fonte: Reeves et al., 1993.

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

4.2 Micro-organismo

Saccharomyces cerevisiae UFMG A-905 pertence à coleção de probióticos do Laboratório de Agentes Bioterapêuticos, do Departamento de Microbiologia, ICB/UFMG. A levedura foi incubada a 37°C, sob agitação constante de 150 rotações por minuto (rpm), em meio YPG (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose), por 24 horas, para que houvesse sua expansão. Posteriormente, a cultura foi concentrada até a obtenção de 10⁹ unidades formadoras de colônia (UFC)/mL, conforme descrito por Martins e colaboradores (2007).

4.3 Tratamento

Nos grupos tratados com *S. cerevisiae* UFMG A-905, os animais foram inoculados, diariamente, a partir do terceiro dia antes do desafio alergênico até o fim do experimento, por via intragástrica (i.g.), com 0,1 mL da respectiva dose da levedura viva ou inativada ou 0,1 mL do sobrenadante coletado da cultura de 1x10⁹ UFC/mL da levedura viva (Tabelas 2, 3 e 4). Para os grupos não tratados foram administrados 0,1 mL de solução salina fisiológica (i.g.), a partir do terceiro dia antes do desafio alergênico até o fim do experimento.

4.4 Desenho experimental

Os animais foram divididos em quatro grupos (N = 5 animais/grupo) no experimento 1, que visou avaliar o efeito de *S. cerevisiae* UFMG A-905 nos parâmetros clínicos, histológicos, imunológicos e microbiológicos. Para tal, os animais receberam os seguintes tratamentos em seus respectivos dias (Tabela 2): (I) Animais controle, não sensibilizados com OVA e que receberam 0,1 mL de salina (CTL), (II) Animais não sensibilizados e tratados com 0,1 mL de *S. cerevisiae* UFMG A-905 contendo 1x10⁹ UFC/mL (905), (III) Animais sensibilizados com OVA e que receberam 0,1 mL de salina (OVA), (IV) Animais sensibilizados com OVA e tratados com 0,1 mL de *S. cerevisiae* UFMG A-905 contendo 1x10⁹ UFC/mL de *S. cerevisiae* UFMG A-905 viva (OVA 905).

Para o experimento 2, que visou avaliar se o efeito da levedura era dose dependente, os animais foram divididos nos seguintes grupos (N = 5 animais/grupo) (Tabela 3): (I) Animais controle, não sensibilizados com OVA e que receberam 0,1 mL de salina (CTL), (II) Animais não sensibilizados e tratados com 0,1 mL de *S. cerevisiae* UFMG A-905 contendo 1x10⁹ UFC/mL (905), (III) Animais sensibilizados

com OVA e que receberam 0,1 mL de salina (OVA), (IV) Animais sensibilizados com OVA e tratados com 0,1 mL de *S. cerevisiae* UFMG A-905 contendo 1×10^9 UFC/mL de *S. cerevisiae* UFMG A-905 viva (OVA 905 10^8), (V) Animais sensibilizados com OVA e tratados com 0,1 mL de *S. cerevisiae* UFMG A-905 contendo 1×10^8 UFC/mL (OVA 905 10^7), (VI) Animais sensibilizados com OVA e tratados com 0,1 mL de *S. cerevisiae* UFMG A-905 contendo 1×10^7 UFC/mL (OVA 905 10^6), (VII) Animais sensibilizados com OVA e tratados com 0,1 mL de *S. cerevisiae* UFMG A-905 contendo 1×10^6 UFC/mL (OVA 905 10^5).

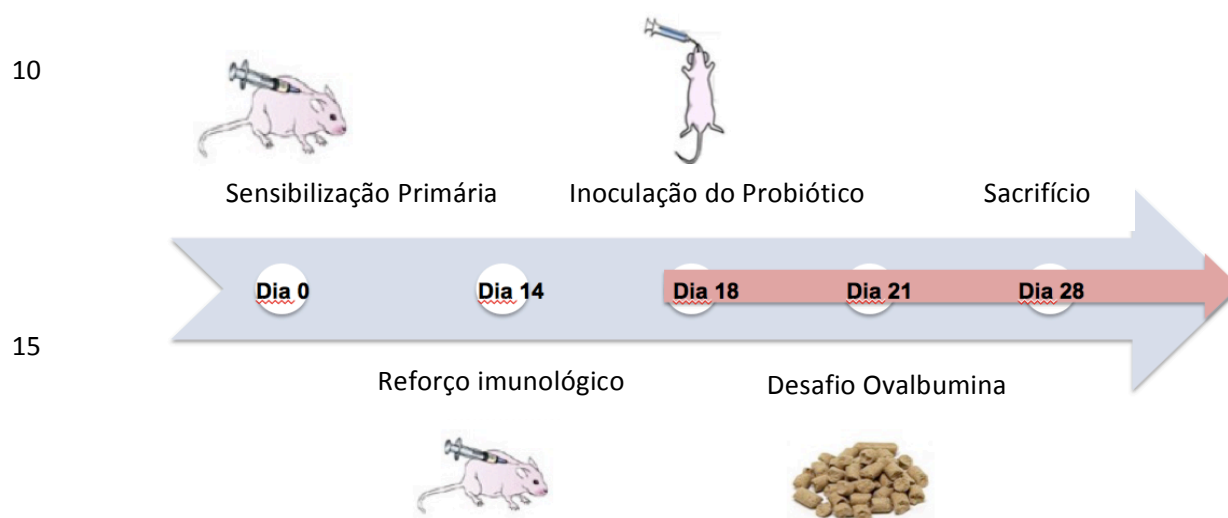


Figura 5. Modelo esquemático do período de sensibilização, tratamento e desafio alergênico no modelo murino de alergia alimentar. Os camundongos foram injetados com OVA na dose de 10 µg, adsorvida em hidróxido de alumínio 1 mg e salina (0,2 mL) por via s.c. (dia 0). Depois de 14 dias (dia 14) receberam um reforço imunológico com 10 µg de OVA em 0,2 mL de solução salina. O grupo controle recebeu apenas o adjuvante, por via s.c., com a solução salina no dia 0 e apenas salina no dia 14. No dia 21 houve a troca da dieta contendo caseína pela de OVA. Para os grupos sensibilizados a ingestão da dieta contendo OVA representa o desafio alergênico que foi realizado no vigésimo primeiro dia. No vigésimo oitavo dia foi feito o sacrifício dos animais.

Tabela 2. Desenho experimental com as respectivas designações dos grupos e tratamentos, experimento 1 (Avaliação do efeito probiótico de *S. cerevisiae* UFMG A-905 nos parâmetros clínicos, histológicos, imunológicos e microbiológicos).

Tempo Tratamento/Grupo	Dia 0 Sensibilização Primária	Dia 14 Reforço Imunológico	Dia 18 Probióticos	Dia 21 Desafio OVA	Dia 28 Sacrifício
CTL	-	-	-	-	+
905	-	-	+	+	+
OVA	+	+	-	+	+
OVA 905	+	+	+	+	+

(905: *S. cerevisiae* UFMG A-905 viva; OVA: Animais sensibilizados com OVA). Sinal positivo (+) e negativo (-) indicam a realização ou ausência de determinado tratamento no respectivo grupo.

Tabela 3. Desenho experimental com as respectivas designações dos grupos e tratamentos, experimento 2 (Avaliação do efeito dose-dependente de *S. cerevisiae* UFMG A-905).

Tempo Tratamento/Grupo	Dia 0 Sensibilização Primária	Dia 14 Reforço Imunológico	Dia 18 Probióticos	Dia 21 Desafio OVA	Dia 28 Sacrifício
CTL	-	-	-	-	+
905	-	-	+	+	+
OVA	+	+	-	+	+
OVA 905 10 ⁸	+	+	+	+	+
OVA 905 10 ⁷	+	+	+	+	+
OVA 905 10 ⁶	+	+	+	+	+
OVA 905 10 ⁵	+	+	+	+	+

(905: *S. cerevisiae* UFMG A-905 viável; OVA: Animais sensibilizados com OVA). Sinal positivo (+) e negativo (-) indicam a realização ou ausência de determinado tratamento no respectivo grupo.

Por fim, para avaliar se o efeito da levedura dependia da sua viabilidade e se estava relacionado a algum composto presente no sobrenadante da cultura (Tabela 4), os animais (N = 5 animais/grupo) foram divididos em: (I) Animais controle, não sensibilizados com OVA e que receberam 0,1 mL de salina (CTL), (II) Animais não sensibilizados e tratados com 0,1 mL de *S. cerevisiae* UFMG A-905 contendo 1x10⁹ UFC/mL (905), (III) Animais sensibilizados com OVA e que receberam 0,1 mL de salina (OVA), (IV) Animais sensibilizados com OVA e tratados com 0,1 mL de *S. cerevisiae* UFMG A-905 contendo 1x10⁹ UFC/mL da levedura viva (OVA 905 10⁸), (V) Animais sensibilizados com OVA e tratados com 0,1 mL de *S. cerevisiae* UFMG A-905 contendo 1x10⁹ UFC/mL da levedura inativada (OVA 905 Inativada), (VI) Animais sensibilizados com OVA e tratados com o sobrenadante coletado da cultura contendo 1x10⁹ UFC/mL da levedura viva (OVA 905 Sobr.).

Tabela 4. Desenho experimental com as respectivas designações dos grupos e tratamentos, experimento 3 (Avaliação da viabilidade da levedura no efeito encontrado no experimento 1).

Tempo Tratamento/Grupo	Dia 0 Sensibilização Primária	Dia 14 Reforço Imunológico	Dia 18 Probióticos	Dia 21 Desafio OVA	Dia 28 Sacrifício
CTL	-	-	-	-	+
905	-	-	+	+	+
OVA	+	+	-	+	+
OVA 905 10 ⁸	+	+	+	+	+
OVA 905 10 ⁸ Inativada	+	+	+	+	+
OVA 905 10 ⁸ Sobr.	+	+	+	+	+

(905: *S. cerevisiae* UFMG A-905; OVA: Animais sensibilizados com OVA; In: inativada; S: Sobrenadante). Sinal positivo (+) e negativo (-) indicam a realização ou ausência de determinado tratamento no respectivo grupo.

5 4.5 Sensibilização e desafio alérgico

4.5.1 Sensibilização

O processo de sensibilização foi executado em conformidade com os experimentos realizados por Dourado e colaboradores (2011). Os camundongos foram injetados com OVA (albumina da clara de ovo, SIGMA Grade V, SIGMA Chemical Co. St. Louis, MO, USA), na dose de 10 µg, adsorvida em hidróxido de alumínio (Al(OH)₃) (1 mg, SIGMA) e salina (0,2 mL) por via subcutânea (s.c.) no dorso (dia 0). Depois de 14 dias (dia 14) receberam um reforço imunológico com 10 µg de OVA em 0,2 mL de solução salina. O grupo controle recebeu apenas o adjuvante, por via s.c., com a solução salina no dia 0 e apenas salina no dia 14 (Figura 5).

4.5.2 Desafio alérgico

Foi administrada no 21º dia, a dieta balanceada de OVA em vez da dieta contendo caseína. Para os grupos sensibilizados a ingestão da dieta contendo OVA representa o desafio alérgico (Figura 5). A determinação do dia para o desafio está em conformidade com o trabalho realizado por Dourado e colaboradores (2011).

4.6 Avaliação clínica dos animais e consumo de alimento

25 4.6.1 Consumo de ração

A ração foi pesada antes de ser administrada para os animais e depois de ter sido depositada nos micro-isoladores, a partir do 21º dia até o 27º dia. O resultado foi expresso em consumo estimado em gramas para cada gaiola por dia.

30 4.6.2 Desenvolvimento ponderal

O desenvolvimento ponderal foi estipulado pesando, individualmente, cada camundongo, diariamente, no início do experimento (dia 0) e no dia do sacrifício (dia 28), sempre no mesmo horário, e o resultado foi expresso em porcentagem em relação ao dia 0.

4.7 Análises histológicas

Para as análises histológicas, após o sacrifício, o intestino delgado foi retirado, e seu comprimento foi dividido em quatro partes: 20%, 30%, 30% e 20%. Considerando a parte próxima para a distal esses fragmentos foram designados duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo, respectivamente. Devido à ausência de características macroscópicas que permitam separar cada porção do intestino adotaram-se estes parâmetros descritos anteriormente tendo como base o que foi proposto por Ferraris e colaboradores (1992). Em seguida, o jejuno proximal foi estendido com a serosa em contato com o papel de filtro e aberto pela borda anti-mesentérica e retirou-se todo o seu conteúdo de forma cautelosa para não danificar a mucosa. Posteriormente, foram transferidos para um recipiente contendo a solução de Bouin com 2% de ácido acético glacial por um período de 10 minutos para pré-fixação (Arantes et al., 1997; Pedroso et al., 2015). Os tecidos, pré-fixados, foram colocados sobre uma superfície plana e enrolados em espiral com a mucosa voltada para dentro de modo a formar rolos (rocamboles), da porção distal em direção à proximal. Os rolos amarrados com linha foram fixados por imersão em solução de formol a 4% por 24 horas. As amostras de cinco animais de cada grupo foram processadas rotineiramente para inclusão em parafina e submetidos à microtomia para obtenção de cortes histológicos de quatro μm de espessura. As lâminas foram coradas por Hematoxilina e Eosina (HE) para interpretação histológica e formulação do escore do grau de lesão. Além disso, cortes adicionais foram feitos para a coloração utilizando a técnica de Ácido Periódico de Schiff (PAS).

4.7.1 Coloração de HE

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

4.7.2 Técnica de PAS

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

4.7.3 Análise das lâminas e fotodocumentação

As lâminas montadas durante todo o processo foram codificadas e posteriormente analisadas pela Prof^a. Dra. Denise Carmona Cara Machado (Departamento de Morfologia, ICB, UFMG), que não teve acesso aos códigos, que foram decodificados somente após a emissão do laudo. Imagens obtidas por meio do microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão) foram transferidas por vídeo-câmera colorida Cool SNAP-Procf Color (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA) para um sistema de vídeo acoplado ao computador por meio do programa Image-Pro Express versão 4.0 para Windows (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA) (Martins et al., 2013), gerando os arquivos para documentação fotográfica.

4.7.4 Escore do grau de lesão

As fotografias do intestino foram realizadas em um aumento de 10X de modo a abranger a maior área possível do órgão. Posteriormente foi feita a elaboração de um escore (Tabela 5) levando em consideração a presença de infiltrado inflamatório, produção de muco, tamanho das vilosidades intestinais, hipertrofia das criptas e atividade das células de Paneth.

4.7.5 Avaliação da produção de muco

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

do programa ImageJ. Os resultados foram expressos em número de células caliciformes/campo.

Tabela 5. Escore histopatológico do jejuno proximal.

Grau	Achados Histopatológicos
0	Dentro dos padrões de normalidade
1	Mucosa com leve edema. Pouco ou nenhum infiltrado inflamatório
2	Mucosa apresentando leve infiltrado inflamatório (linfócito e eosinófilo) e aumento da produção de muco. Diminuição das vilosidades intestinais em 10%. Criptas apresentando leve hipertrofia das células de Paneth. Submucosa sem alterações celulares ou vasculares.
3	Mucosa apresentando infiltrado inflamatório (linfócito e eosinófilo) e aumento da produção de muco de leve a moderado. Diminuição das vilosidades intestinais em 15%. Criptas apresentando hipertrofia das células de Paneth de leve a moderada. Submucosa sem alterações celulares ou vasculares.
4	Mucosa apresentando moderado infiltrado inflamatório (linfócito e eosinófilo) e aumento da produção de muco. Diminuição das vilosidades intestinais em 20%. Criptas apresentando moderada hipertrofia das células de Paneth. Submucosa com leve infiltrado inflamatório e vasos dilatados.
5	Mucosa apresentando infiltrado inflamatório (linfócito e eosinófilo) e aumento da produção de muco de moderado a grave. Diminuição das vilosidades intestinais em 25%. Criptas apresentando hipertrofia das células de Paneth de moderada a grave. Submucosa com leve infiltrado inflamatório e vasos dilatados.
6	Mucosa apresentando intenso infiltrado inflamatório (linfócito e eosinófilo) e aumento da produção de muco. Diminuição das vilosidades intestinais em 30%. Criptas apresentando hipertrofia evidente das células de Paneth. Submucosa com moderado infiltrado inflamatório e vasos dilatados.

5 4.8 Avaliação dos parâmetros imunológicos

4.8.1 Dosagem da Imunoglobulina IgE anti-OVA

O ensaio de absorção imunoenzimático (ELISA), foi realizado com o soro dos camundongos como descrito por Dourado e colaboradores (2011). Para isso, foram utilizadas microplacas de poliestireno (Nunc, Roskilde, Denmark), que foram previamente sensibilizadas com adição de anticorpo de rato anti-IgE de camundongo (Rat anti-mouse IgE, Southern Biotechnology, Birmingham, AL, USA) (50 µL/poço) diluído a uma concentração de 1:250 em tampão carbonato pH 9,6, incubadas a 4°C

overnight. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com solução tampão salina fosfato (PBS)-Tween 20. Em seguida, adicionou-se 200 µL/poço de solução de caseína 0,25% diluída em PBS, para bloqueio à temperatura ambiente por 1 hora. Lavou-se três vezes a placa com PBS-Tween 20 e adicionou-se 50 µL/poço do soro total, incubou-se por 2 horas à temperatura ambiente e lavou-se com PBS-Tween 20 5 vezes. Adicionou-se 1 µL de OVA Biotinilada em 50 µL de PBS-caseína, por poço, e incubou-se por 1 hora à temperatura ambiente. Lavou-se novamente três vezes com PBS-Tween 20. Posteriormente, adicionou-se 50 µL/poço de Streptavidina-Peroxidase (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) na concentração de 1:5000 e incubou-se por 45 minutos à temperatura ambiente. Lavou-se a placa três vezes com salina-Tween 20 e prosseguiu-se para a etapa de revelação. Para essa etapa, foram adicionados 100 µL/poço de uma solução de tampão citrato contendo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e ortofenileno-diamino (OPD) e, em seguida, incubou-se em câmara escura por 15 minutos à temperatura ambiente. Ao fim dos 15 minutos interrompeu-se a reação com a adição de 20 µL/poço de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 2 N. Além da adição das amostras de soro em teste, foram feitos um controle positivo (pool de soros de animais imunes), um controle negativo (pool de soro de animais normais) e um controle de placa. Então, todas essas amostras foram lidas em 405 nm em leitor de ELISA (Expert Plus, Asys Hitech GMBH, Eugendorf, Austria). A computação dos resultados foi realizada por meio da densidade ótica (D.O.) apresentada pelas amostras.

4.8.2 Dosagem de IgG1 anti-OVA

O ELISA foi realizado com o soro dos camundongos como descrito por Saldanha e colaboradores (2004). Para isso, foram utilizadas microplacas de poliestireno (Nunc, Roskilde, Denmark), que foram previamente sensibilizadas com adição de 100 µL/poço, com uma solução de OVA diluída a uma concentração de 400 µg de OVA/mL de tampão carbonato pH 9,6, incubadas a 4°C *overnight*. Posteriormente, as placas foram lavadas cinco vezes com solução PBS-Tween 20. Em seguida, adicionou-se 200 µL/poço de solução de caseína 0,25% diluída em PBS, para bloqueio à temperatura ambiente por 1 hora. Lavou-se duas vezes a placa com PBS-Tween 20 e adicionou-se 200 µL de uma solução de soro (1:20) em PBS-caseína nos primeiros poços (toda linha A) e 100 µL de PBS-caseína nos demais poços. Posteriormente fez-se a diluição seriada transferindo 100 µL dos

primeiros poços para as linhas abaixo, adicionou-se PBS-caseína como branco e como controle positivo fez-se a diluição seriada de uma solução padrão anti-OVA, incubou-se por 1 hora à 37° C e lavou-se com PBS-Tween 20 10 vezes. Prosseguiu-se para a etapa de revelação. Para essa etapa, foi utilizado como substrato 2,2'-Azino-bis (3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) (Sigma), incubou-se em câmara escura por 15 minutos à temperatura ambiente. Ao fim dos 15 minutos interrompeu-se a reação com a adição de 20 µL/poço de H₂SO₄ a 2 N. Então, todas essas amostras foram lidas em 405 nm no leitor de ELISA (Expert Plus, Asys Hitech GMBH, Eugendorf, Austria). A computação dos resultados foi realizada por meio da D.O. apresentada pelas amostras.

4.8.3 Avaliação da atividade da MPO

A enzima MPO encontra-se nos grânulos dos neutrófilos (Nauseef et al., 2007). Por meio da avaliação da atividade dessa enzima pode-se inferir o índice de infiltração de neutrófilos para determinado tecido (Souza et al., 2000). Para isso, analisou-se o jejuno proximal, que previamente foi congelado a -80°C. Após a etapa de descongelamento, o tecido (100 mg de tecido em 1,9 mL de tampão) foi homogeneizado em tampão (0,1 M NaCl, 0,02 M NaPO₄, 0,015 M Na-EDTA, pH 4,7), utilizando-se homogenizador de tecidos (Ultra-Turrax, IKA T10 basic), centrifugado (Centrífuga Heraeus Megafuge 8R, Thermo Scientific) a 10.000 rpm por 15 minutos e o precipitado foi submetido à lise hipotônica (1,5 mL de solução de NaCl 0,2% com posterior adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5%, 30 segundos após) para lise de hemácias. Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuspense em tampão NaH₂PO₄ 0,05 M (pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) 0,5% (Sigma) e re-homogeneizado. Transferiu-se alíquotas de 1 mL da suspensão para microtubos de 1,5 mL e realizaram-se três ciclos de congelamento/descongelamento utilizando-se nitrogênio líquido. As amostras foram mantidas durante 5 segundos no nitrogênio para o congelamento e o descongelamento foi realizado pela submersão dos microtubos em água corrente. Centrifugou-se novamente essas amostras por 15 minutos a 10.000 (Centrífuga Heraeus Megafuge 8R, Thermo Scientific) e recolheu-se o sobrenadante. A atividade da MPO no precipitado ressuspense foi calculada pela alteração da D.O. a 450 nm utilizando tetrametilbenzidina (TMB) (1,6 mM) (Sigma) e H₂O₂ (0,5 mM). A leitura foi

feita em leitor de ELISA (Spectromax M3, Molecular Devices Inc.) e os resultados expressos de acordo com a D.O.

4.8.4 Avaliação da atividade da EPO

5 A EPO é uma enzima expressa especificamente em eosinófilos, portanto, ela permite a verificação indireta da presença de eosinófilos infiltrados em um determinado tecido de interesse. Essa avaliação foi baseada em um trabalho realizado por Strath e colaboradores (1985). Para esse método, pesaram-se 100 mg do tecido, adicionou-se 1,9 mL de PBS (pH 7,2), em seguida homogenizou-se (Ultra-
10 turrax IKA T10 basic) e centrifugou-se (Centrífuga Heraeus Megafuge 8R, Thermo Scientific) o tecido por 10 minutos a 10.000 rpm, 4°C. Desprezou-se o sobrenadante. Utilizou-se o *pellet* para a lise hipotônica com a adição de 1,5 mL de salina 0,2%, seguido da adição de 1,5 mL de salina 1,6% suplementada com glicose 5%. Em seguida, a amostra foi novamente centrifugada (Centrífuga Heraeus Megafuge 8R,
15 Thermo Scientific) a 10.000 rpm durante 10 minutos, e o sobrenadante novamente desprezado. O *pellet* foi ressuspensão em 1,9 mL de PBS (pH 7,4), suplementado com HTAB 0,5%. Essa solução foi novamente homogeneizada, e o homogenato separado em alíquotas de 1 mL por microtubo. Prosseguiu-se com a etapa de congelamento/descongelamento, realizada três vezes em nitrogênio líquido.
20 Centrifugou-se novamente a 10.000 rpm (Centrífuga Heraeus Megafuge 8R, Thermo Scientific) por 15 minutos. Apenas o sobrenadante foi avaliado para a quantificação da enzima. Realizou-se esse ensaio em placas de 96 poços, sendo que em cada poço 75 µL de amostra ou branco (PBS) foram incubados com 75 µL do substrato (1,5 mM de o-fenilenodiamina, OPD (Sigma), em tampão Tris-HCl-0,075 µM, pH 8,
25 suplementado de H₂O₂ 6,6 mM). A placa foi incubada a 20°C, no escuro, por 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de H₂SO₄ 1 M. A leitura foi realizada em leitor de ELISA com filtro de 492 nm. E o resultado expresso de acordo com a D.O.

30 4.8.5 Dosagem de IL-17

Para a dosagem da citocina, utilizou-se 100 mg do jejuno proximal de cada animal, que foram ressuspensos em 1 mL de solução de extração de citocinas [PBS contendo um coquetel de anti-proteases (0,1 mM PMSF, 0,1 mM cloreto de benzetônio, 10 mM EDTA e 20 KI de aprotinina A) e 0,05% de Tween 20].

Posteriormente, centrifugou-se por 10 minutos, a 4°C e 10.000 rpm (Centrifuga Heraeus Megafuge 8R, Thermo Scientific). O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C para posterior dosagem da citocina, realizada por ELISA, conforme trabalho de Martins e colaboradores (2011). O kit para citocina foi adquirido da R&D Systems (DuoSet) (R&D Systems, Minneapolis, USA).

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

No último dia do desafio alérgico amostras de fezes foram coletadas, pesadas e acrescidas de PBS em uma diluição inicial de 10^{-2} . Este procedimento foi realizado de forma estéril em câmara anaeróbica (Forma Scientific Company, Marietta, OH, USA, contendo uma atmosfera de N₂ 85%, H₂ 10% e CO₂ 5%). Posteriormente foram feitas novas diluições seriadas na mesma amostra até 10^{-8} . Alíquotas de 0,1 mL destas diluições foram inoculadas em placas de Petri contendo ágar sangue suplementado (AS-S) com 0,1% de hemina, 0,1% de menadiona e 0,5% de extrato de levedura (Holdman et al., 1977), ágar de Mann, Rogosa e Sharp (MRS) (Merck) suplementado com L-cisteína e ágar Bacteroides Bile Esculina (BBE) (Difco) (Livingston et al., 1978). As placas foram incubadas por até 7 dias a 37°C com leituras intermediárias, em anaerobiose.

Tabela 6. Meios e condições de cultivo para a análise qualitativa e quantitativa da composição da microbiota intestinal presente nas fezes dos camundongos coletadas no último dia do desafio.

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

Foram retiradas das mesmas diluições 0,1 mL para inocular em placas de ágar sangue (AS), ágar Manitol (Difco), ágar BHI (*Brain Heart Infusion*) (Difco) acrescido de 0,02% de azida sódica, ágar MacConkey (Difco) e ágar Sabouraud (Sb) suplementado com cloranfenicol (100 mg/L). As placas foram incubadas 24-48

horas a 37°C em aerobiose. Após a incubação foi feito a contagem das colônias e os dados foram expressos em $\log_{10}$ UFC/g de fezes. A lista dos meios, condições de cultura e finalidades dos meios propostos podem ser visualizados na Tabela 6.

5 **4.10 Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, E.U.A.), utilizando o teste ANOVA, seguido do pós-teste Tukey. Os resultados com $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento ponderal e consumo de ração

O desenvolvimento ponderal é uma variável que está intimamente relacionada com o consumo de alimentos e o gasto energético do organismo. Sendo assim, inúmeros mecanismos bioquímicos estão envolvidos para a manutenção do peso corpóreo (Galgani et al., 2009). Porém, quando determinado organismo é exposto a condições de estresse ou a determinadas condições patológicas, pode haver um desbalanço desse equilíbrio e consequente diminuição do desenvolvimento ponderal.

Com o objetivo de avaliar se o processo alérgico resultaria em perda de peso, bem como se a administração da levedura viável seria capaz de promover a manutenção do desenvolvimento ponderal, os animais foram pesados no dia 0 e no dia 28 e assim foi possível determinar o desenvolvimento ponderal, no dia 28, em porcentagem, em relação ao dia 0. Os resultados podem ser visualizados na Figura 6.

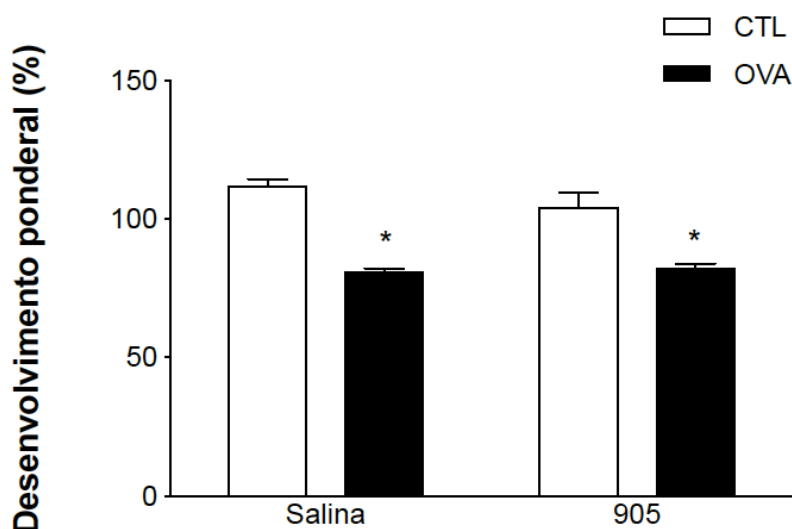


Figura 6. Desenvolvimento ponderal. Os animais foram acompanhados do dia 0 ao dia 28, considerando o peso do dia 0 correspondendo a 100% calculou-se o peso do dia 28 em relação ao peso do dia 0. As barras representam os grupos analisados (CTL: Controle; OVA: sensibilizados e desafiados com OVA; 905: 0,1 mL contendo 1×10^9 UFC/mL de *S. cerevisiae* viva). (N = 5 animais/grupo). (*p < 0,05 em comparação ao grupo controle (CTL salina)).

Os dados apresentados pela Figura 6 confirmam a hipótese de que, em processos de alergia, ocorre uma diminuição acentuada do desenvolvimento ponderal e este dado corrobora os dados encontrados por Dourado e colaboradores (2011). Neste estudo, foi demonstrado que em processos de alergia alimentar

ocorrem mudanças imunológicas, como aumento da citocina IL-6, que tem comprovado papel na perda de peso, além de lipólise aumentada, diminuição do peso do tecido adiposo e diminuição dos adipócitos em si, levando a uma acentuada perda de peso após o contato com o alérgeno.

5 Em termos de manutenção do desenvolvimento ponderal proporcionada por *S. cerevisiae* UFMG A-905, tem-se que a administração diária de 0,1 mL contendo 10^9 UFC/mL da levedura viável não promoveu a manutenção do peso corpóreo desses animais quando comparados ao grupo CTL. A perda de peso nessas condições patológicas pode estar associada a inúmeros mecanismos, sendo um
10 entrave aos potenciais tratamentos. É provável que o aumento da energia requerida para a manutenção dos processos inflamatórios leve ao recrutamento de lipídeos de reserva com consequente diminuição do peso corpóreo (Dourado et al., 2011). Outro fator que pode estar associado à perda de peso é a aversão ao alimento contendo o antígeno e consequente diminuição do seu consumo. Desta forma, para avaliar se
15 houve uma diminuição do consumo de ração que estivesse relacionado com a perda de peso encontrada, pesou-se a ração antes de alocá-la nos micro-isoladores e no dia seguinte repetiu-se a pesagem, calculando-se então a diferença em gramas de ração que foi consumida pelos animais. Este procedimento foi feito para os dias subsequentes ao desafio. Com isso, pode-se observar na Figura 7 que, após o
20 desafio, os animais OVA tiveram seu consumo de ração reduzido, que corroborou os dados da perda de peso.

 O tratamento com *S. cerevisiae* UFMG A-905 não foi capaz de promover a manutenção do consumo de ração desses animais quando comparados com o grupo CTL, como pode ser observado na Figura 7. Um dos mecanismos envolvidos
25 nessa diminuição do consumo de ração pode se dever ao desencadeamento do processo de aversão ao alimento. O desenvolvimento desse processo de aversão já foi comprovado por Cara e colaboradores (1994 e 1997). Este processo pode estar relacionado à memória de um estímulo nocivo que desencadeia aumento da ansiedade e, assim, o animal pára de comer como tentativa de cessar os sintomas
30 desencadeados pela alergia (Costa-Pinto et al., 2005; Costa-Pinto et al., 2007; Faria et al., 2013).

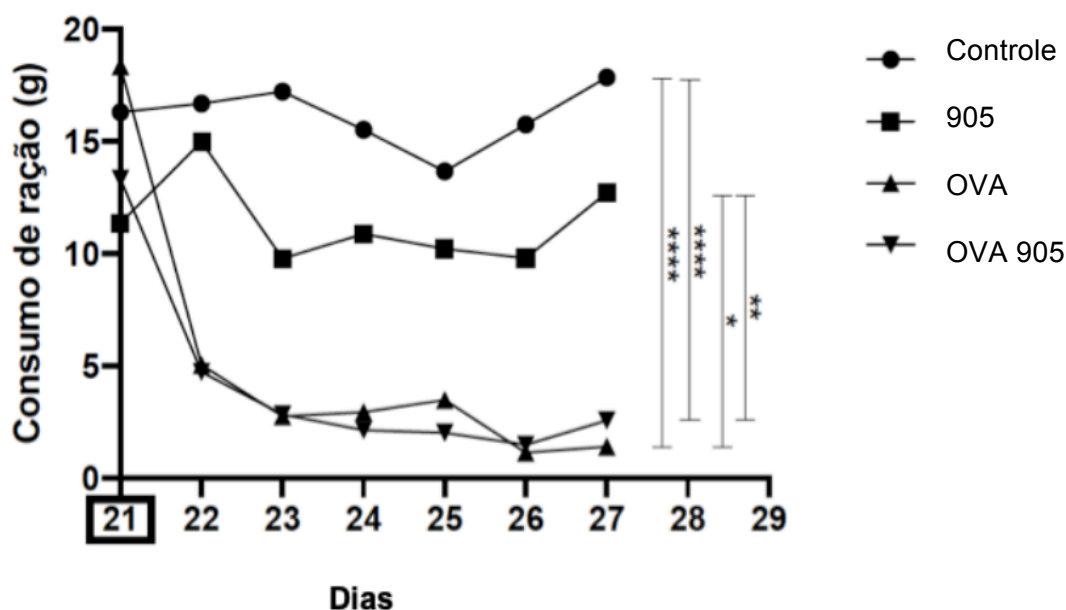


Figura 7. Consumo de ração. Os símbolos representam os grupos analisados (Controle (CTL); OVA: sensibilizados e desafiados com OVA que receberam salina; 905: 0,1 mL contendo 1×10^9 UFC/mL de *S. cerevisiae* viva). Com destaque para o dia 21 que representa o dia do desafio. (N = 5 animais/grupo). (****p < 0,0001; **p < 0,01; *p < 0,05).

5.2 Avaliação da Imunoglobulina IgE e IgG1 anti-OVA

A IgE é uma imunoglobulina que desempenha um papel primordial nas reações alérgicas IgE-dependentes. A partir da interação da IgE específica para o determinado antígeno com mastócitos e basófilos, por meio dos receptores FcεRI, ocorre a degranulação dessas células, culminando na liberação dos mediadores inflamatórios e consequente desencadeamento dos sintomas alérgicos (Potaczek et al., 2017; Chen et al., 2018).

Os processos alérgicos a IgG1 também se destaca por interagir com o alérgeno, formando um imunocomplexo que culmina na ativação dos receptores FcγRs, que é expresso nas células mieloides, como neutrófilos e basófilos, com consequente liberação do fator de ativação de plaquetas (PAF do inglês *platelet-activating factor*), que tem sido relacionado com o desencadeamento de anafilaxia (Beutier et al., 2017).

No presente estudo, os grupos Controle (não sensibilizados e não desafiados) e controle da *S. cerevisiae* UFMG A-905 [não sensibilizados e desafiados (troca da dieta de caseína por dieta contendo OVA)] apresentaram baixos níveis de IgE (D.O. com níveis menores que 0,08 nm) e IgG1 anti-OVA (D.O. com níveis menores que 0,6 nm). Em contrapartida, animais sensibilizados e desafiados com OVA

apresentaram elevados níveis de IgE (D.O. com níveis próximos a 0,75 nm) e IgG1 anti-OVA (apresentando níveis de D.O. próximos de 3 nm). Esses resultados corroboram os dados encontrados por Saldanha e colaboradores (2004) em que eles mostraram que camundongos BALB/c, ao serem sensibilizados no dia zero com uma injeção subcutânea de salina contendo OVA, seguindo de reforço imunológico no dia 14 e desafio no dia 21 com a exposição por via oral à OVA até o final do experimento, apresentaram altos níveis de IgE e de IgG1 anti-OVA no soro. Além disso, animais que não foram sensibilizados, mas que receberam ou não OVA por via oral apresentaram níveis baixos de IgE e IgG1 anti-OVA. Tais resultados comprovam que o modelo proposto está de acordo com a literatura e que as reações alérgicas desencadeadas pelo modelo são mediadas por IgE.

Ao analisarmos a capacidade do tratamento com a levedura de reduzir os níveis de IgE e IgG1 anti-OVA, pode-se observar (Figura 8) que *S. cerevisiae* UFMG A-905 não foi capaz de atenuar os níveis de IgE e IgG1 anti-OVA. Resultados semelhantes foram encontrados por Schouten e colaboradores (2009) e Zuercher e colaboradores (2011), em que os modelos de alergia estudados não apresentaram atenuação dos níveis de IgE e IgG1 específicos promovidos pelos probióticos testados.

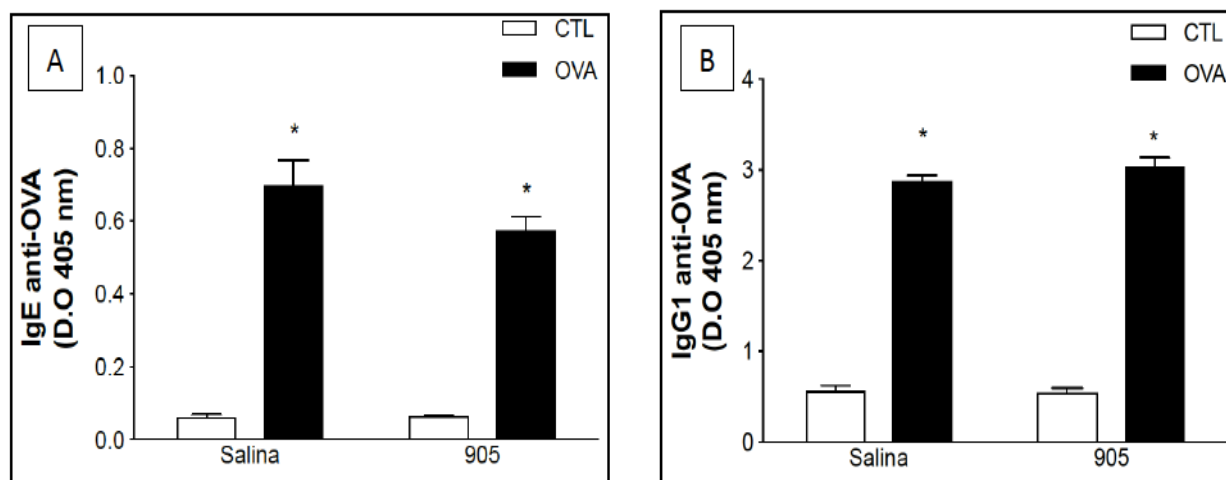


Figura 8. Avaliação dos níveis de IgE anti-OVA (A) e IgG1 anti-OVA (B). As barras representam os grupos analisados (CTL: Controle; OVA: sensibilizados e desafiados com OVA; 905: 0,1 mL contendo 1×10^9 UFC/mL de *S. cerevisiae* viva). (N = 5 animais/grupo). (*p < 0,05 em comparação ao grupo controle).

5.3 Análises histológicas

A partir da observação das lâminas do jejuno proximal coradas por HE e PAS, foi possível a emissão de um laudo, evidenciando que as amostras CTL e 905, apresentaram-se dentro dos padrões de normalidade. A mucosa apresentou-se com vilosidades íntegras, epitélio contínuo, proporção de células caliciformes/enterócitos e linfócitos intraepiteliais/enterócitos normal, LP delgada, sem a presença de espaços que possam caracterizar edema. As criptas apresentaram celularidade e tamanho normais. A muscular da mucosa apresentou um aspecto contínuo e preservado (Figuras 9A e 9C).

Os grupos sensibilizados e desafiados, não tratados (OVA), apresentaram mucosa com infiltrado inflamatório, predominantemente de linfócitos, neutrófilos e eosinófilos, o que é típico de processos alérgicos (Hogan et al., 2009; Żbikowska-Gotz et al., 2016). Foi observado um moderado aumento do número e tamanho de células caliciformes. A submucosa apresentou discreto infiltrado inflamatório e alguns vasos dilatados. A vilosidade apresentou uma redução da altura de leve a moderada (Figuras 9B e 9E).

Por fim, o grupo OVA 905 apresentou redução dos sinais inflamatórios alérgicos (Figura 9D). A mucosa apresentou infiltrado inflamatório leve com discreto aumento de muco. A diminuição do tamanho das vilosidades também foi discreta, assim como a atividade das células de Paneth. Neste grupo, assim como nos controles, não houve alterações celulares ou vasculares na submucosa.

A partir de todos estes dados foi possível a elaboração de um escore, conforme a Tabela 4 (Figura 9F). Um dos aspectos avaliados pelo escore foi a atividade das células de Paneth. As células de Paneth são responsáveis por produzir compostos com propriedades antimicrobianas, como as defensinas, lisozimas do tipo C e inúmeros peptídeos antimicrobianos. Estes auxiliam na manutenção da homeostase e equilíbrio da microbiota intestinal (Bevins et al., 2011; Nakamura et al., 2016). No presente estudo, o grupo sensibilizado e desafiado sem tratamento apresentou hipertrofia das células de Paneth e aumento da intensidade da coloração evidenciada pela técnica de PAS. Sendo assim, pode-se inferir que elas estão produzindo mais compostos que apresentam carboidratos em sua estrutura, com consequente aumento de sua atividade (Figura 10B). Na Figura 10D pode-se observar uma discreta redução da atividade dessas células no grupo OVA 905, evidenciado pela discreta atenuação de sua coloração.

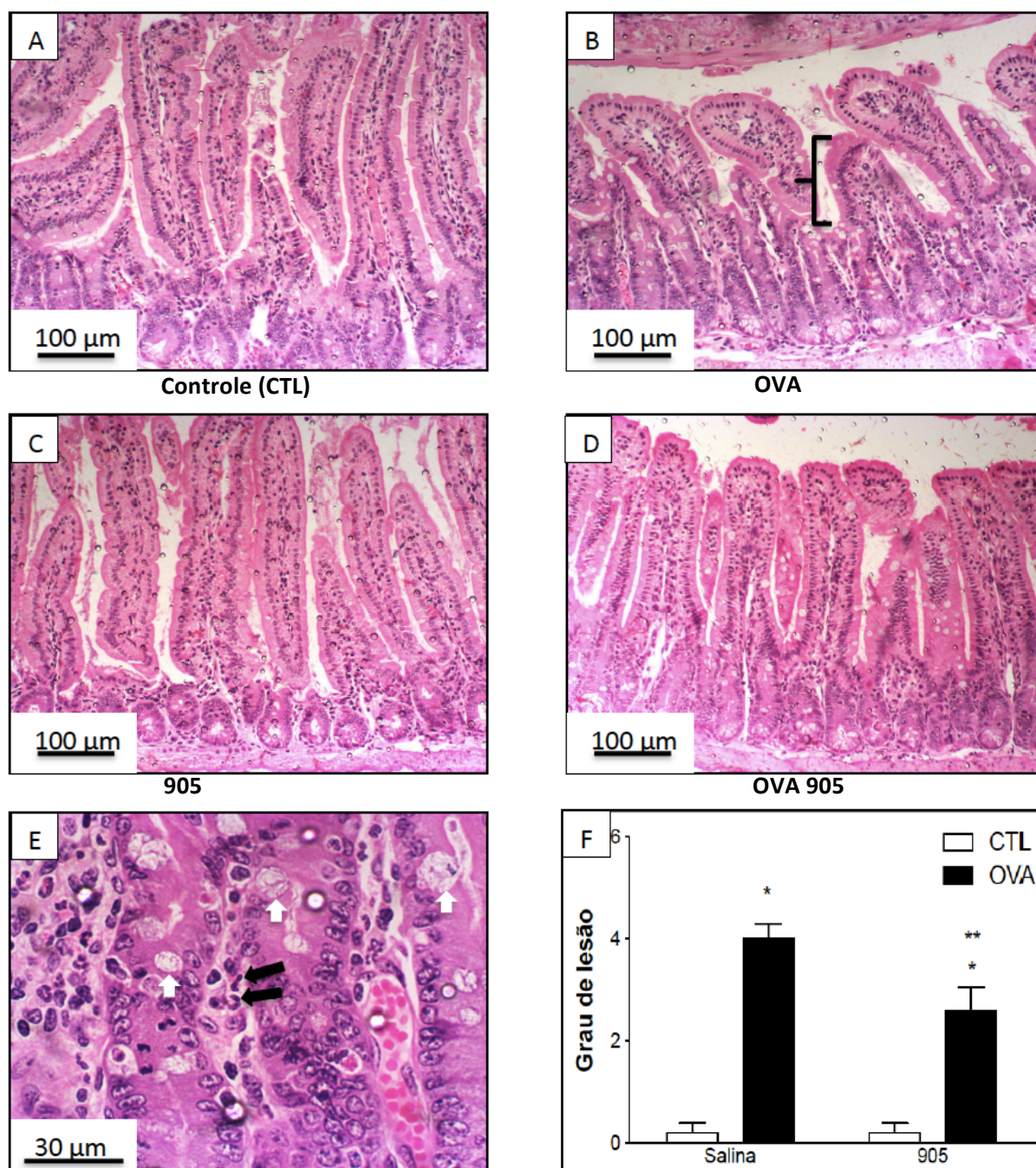


Figura 9. Fotomicrografias da histologia corada com HE dos 4 grupos com aumento de 10X e escore das lesões histopatológicas: Controle (CTL) (A), OVA (B), 905 (C), OVA 905 (D). A chave preta da figura B destaca o tamanho do vilo reduzido no jejuno de camundongos submetidos à alergia alimentar. Nessas fotos, em menor aumento, a barra equivale a 100 µm. Na figura E, há um destaque para a mucosa, evidenciando a hipertrofia das células caliciformes (seta branca), além da presença de eosinófilos (setas pretas) no grupo controle da alergia. Na figura F, a análise do escore histológico. (CTL: Controle; OVA: sensibilizados e desafiados com OVA; 905: 0,1 mL contendo 1×10^9 UFC/mL de *S. cerevisiae*); (N = 5 animais/grupo); (*p < 0,05, em comparação ao grupo controle e **p < 0,05 em comparação com o grupo controle da alergia).

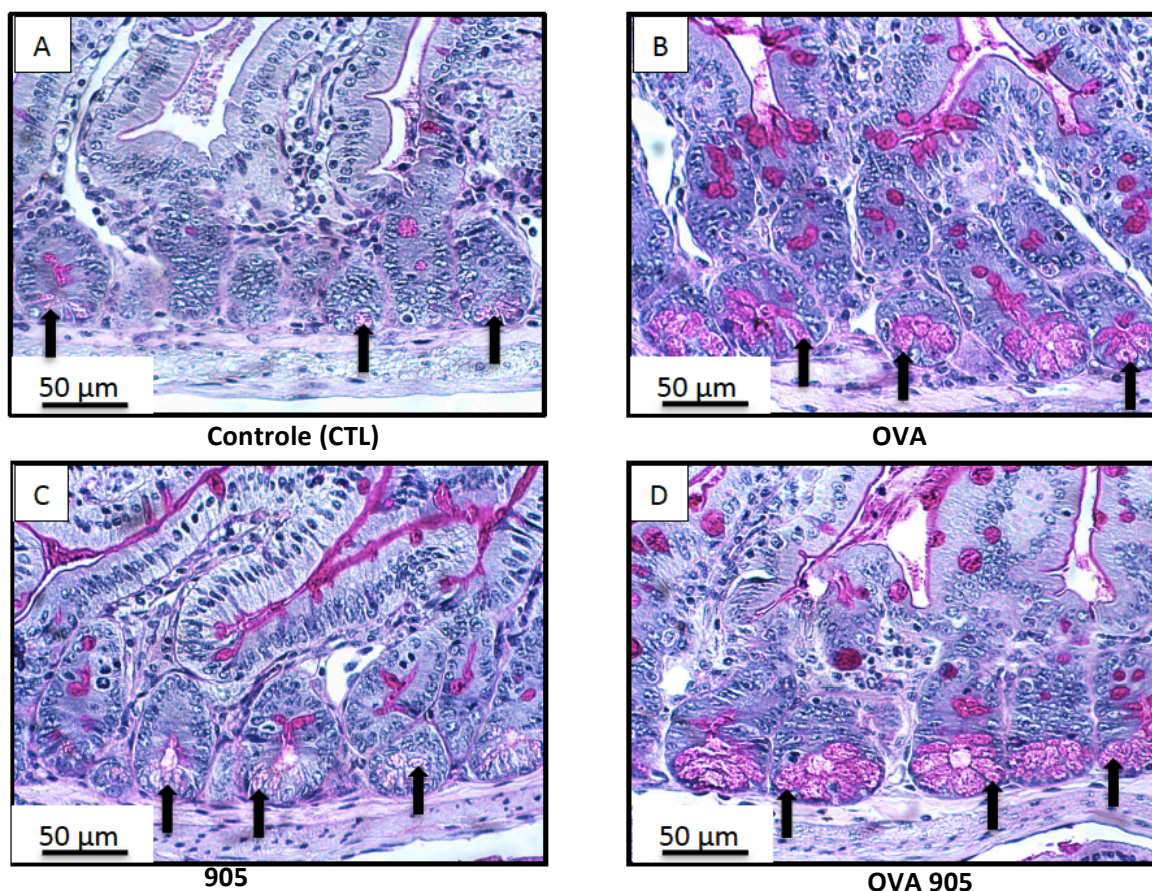


Figura 10. Fotomicrografias da histologia corada com PAS dos 4 grupos com aumento de 20X. Controle (A), OVA (B), 905 (C), OVA 905 (D). Nessas fotos, a barra equivale a 50 µm. As setas pretas das 4 fotomicrografias apontam para as células de Paneth, evidenciando a diferença de tonalidade entre os grupos testados (quanto maior a intensidade da coloração maior a atividade das células de Paneth).

Em processos alérgicos pode haver o aumento da PI (Chen et al., 2014), que pode ser um estímulo para a produção de peptídeos antimicrobianos, pelas células de Paneth, com o intuito de promover um entrave à entrada de potenciais patógenos. O tratamento com a levedura promoveu a atenuação dos sinais inflamatórios no tecido, de maneira similar com os dados obtidos por Liu e colaboradores (2017), onde os autores demonstraram que a administração oral de *Bifidobacterium infantis* CGMCC313-2 promoveu a atenuação dos sinais inflamatórios no intestino em um modelo murino de alergia alimentar.

5.3.1 Análise da produção de muco

A camada de muco que reveste o intestino é essencial para proteção, lubrificação e transporte de substâncias, através do epitélio intestinal. Este muco é

produzido pelas células caliciformes e é constituído principalmente por glicoproteínas neutras denominadas mucinas (Deplancke et al., 2001).

5 No presente estudo houve hiperplasia e aumento do número de células caliciformes pelo grupo sensibilizado e desafiado (OVA) (Figura 11B). Alguns estudos têm demonstrado que em processos alérgicos há o desencadeamento da hiperprodução de muco neutro pelas células caliciformes, e esse processo tem sido relacionado às citocinas IL-4 e IL-13 (Saldanha et al., 2004; Dourado et al., 2010).

10 Na figura 11F pode-se observar que o tratamento com a levedura promoveu a redução significativa do número de células caliciformes/campo, com consequente atenuação da produção de muco. A hiperprodução de muco pode ser considerada uma forma de defesa do epitélio intestinal para tentar atenuar a entrada de alérgenos e consequente aumento da inflamação (Saldanha et al., 2004).

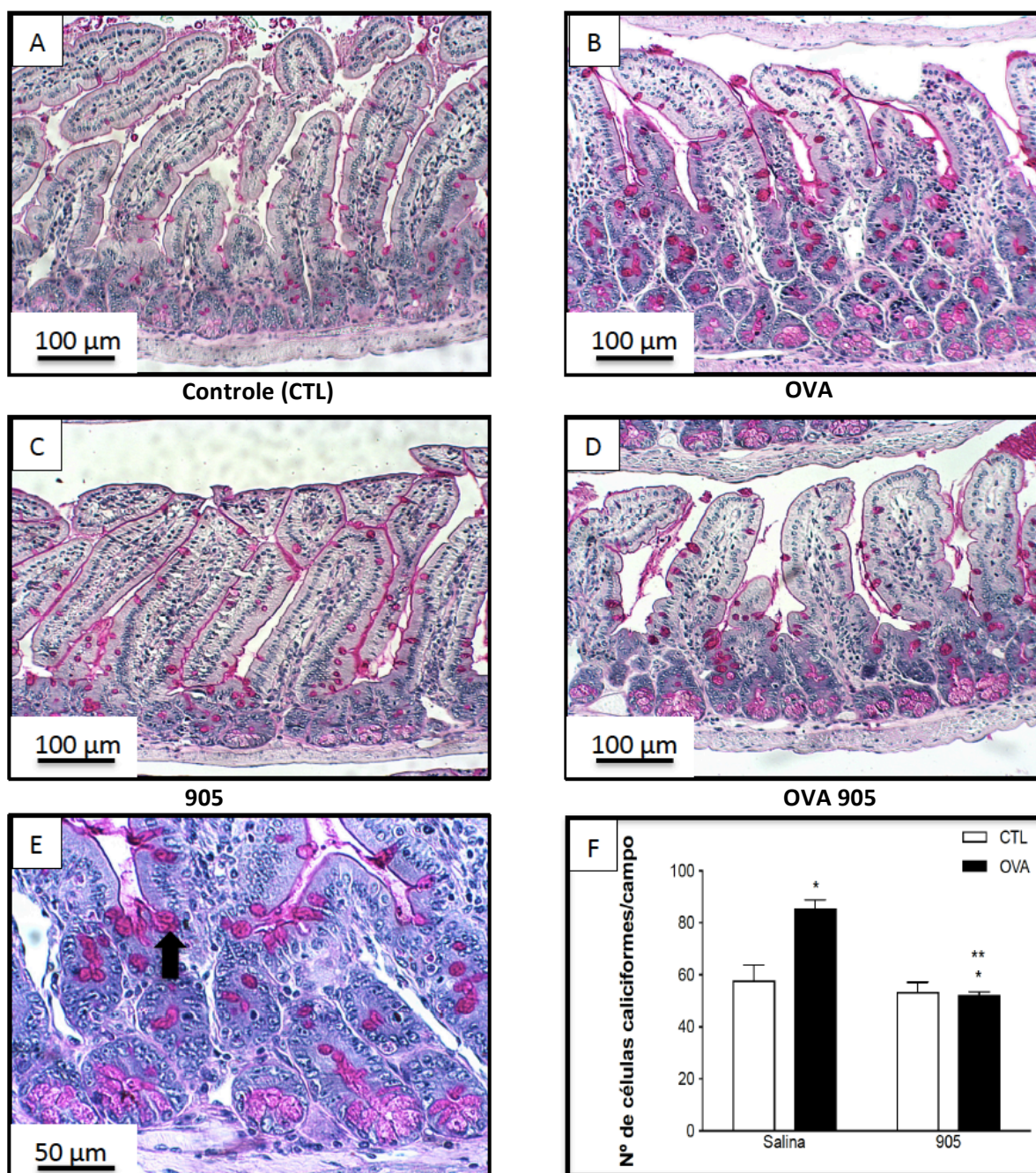


Figura 11. Fotomicrografias da histologia corada com PAS dos 4 grupos com aumento de 10X e contagem das células caliciformes. Controle (A), OVA (B), 905 (C), OVA 905 (D). Nessas fotos, em menor aumento, a barra equivale a 100 µm. Na figura E há um destaque para o aumento e hipertrofia do número das células caliciformes (seta preta) do grupo OVA, nesta foto a barra equivale a 50 µm e foi realizada no aumento de 20X. Na figura F, a análise do número de células caliciformes por campo, realizada a partir de imagens capturadas na objetiva de 10X, de 5 campos aleatórios do jejuno proximal de cada animal (N = 5 animais/grupo). (CTL: Controle; OVA: sensibilizados e desafiados com OVA; 905: 0,1 mL contendo 1×10^9 UFC/mL de *S. cerevisiae*); (*p < 0,05, em comparação ao grupo controle e **p < 0,05 em comparação com o grupo controle da alergia).

5.4 Avaliação da atividade de MPO

A enzima MPO é encontrada principalmente nos grânulos azurofílicos dos neutrófilos. Na presença de peróxido de hidrogênio, a MPO catalisa a formação de ROS que podem promover danos teciduais, intensificando o processo inflamatório (Żbikowska-Gotz et al., 2016; Aratani et al., 2018). Como esta enzima está presente nos grânulos dos neutrófilos, ela pode ser utilizada para a avaliação indireta da presença de neutrófilos nos tecidos (Souza et al., 2000).

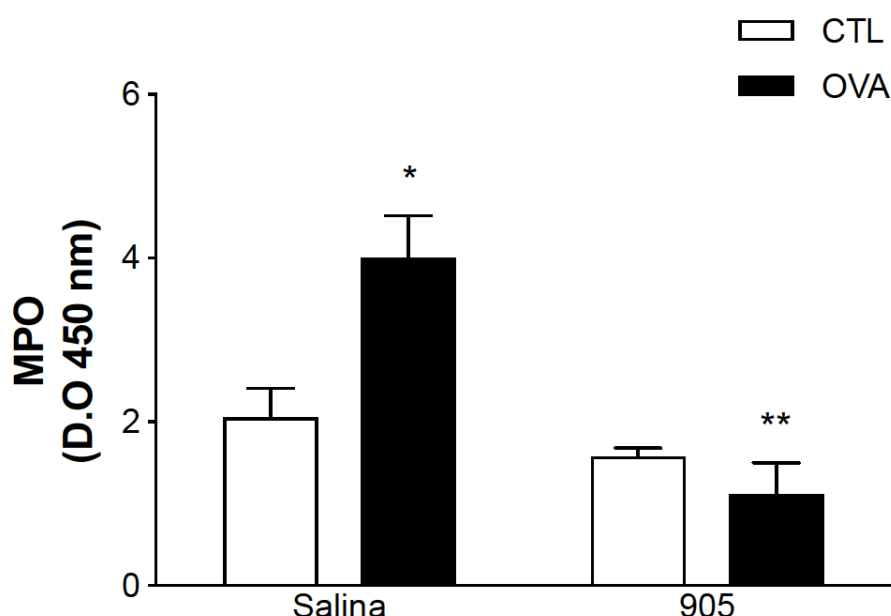
Os neutrófilos são células que auxiliam nos processos de homeostase por serem recrutados para os sítios de inflamação e serem capazes de reconhecer e fagocitar patógenos, além de produzirem espécies reativas de oxigênio, que auxiliam na inativação de patógenos, promovendo então, uma barreira ao desencadeamento de processos inflamatórios (Mayadas et al., 2014). Porém, quando há uma ruptura do equilíbrio dos processos de homeostase, os neutrófilos podem induzir anafilaxia em modelos animais, além de liberarem MPO, que gera radicais livres culminando em destruição tecidual, sendo, portanto, um aspecto importante a ser avaliado nos processos alérgicos (Żbikowska-Gotz et al., 2016; Beutier et al., 2017). Neste sentido, para avaliar se a administração oral de *S. cerevisiae* UFMG A-905 é capaz de atenuar os níveis de neutrófilos no jejuno proximal dos camundongos, realizou-se a dosagem da enzima MPO e os resultados são apresentados na Figura 12.

Neste estudo, a administração oral de *S. cerevisiae* UFMG A-905 promoveu o decréscimo significativo nos níveis da MPO em camundongos alérgicos à OVA, indicando uma redução nos níveis de neutrófilos no jejuno proximal analisado, o que corrobora os dados histológicos apresentados.

Os dados encontrados no presente estudo, revelou um aumento significativo da MPO no grupo sensibilizado e desafiado (OVA), quando comparado com o grupo controle (CTL) (Figura 12). Estudos realizados por Francis e colaboradores (2017) mostraram que durante o choque anafilático em humanos, há uma elevação da MPO comparada com o grupo controle, indicando o envolvimento dos neutrófilos em um dos mais severos casos desencadeados pela alergia alimentar.

Nesta perspectiva, um dos aspectos que podem contribuir para atenuação dos sintomas desencadeados pela alergia alimentar e da gravidade dos processos anafiláticos seria a diminuição dos níveis de neutrófilos, como exposto na Figura 12. *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 foi capaz de promover a diminuição

significativa dessas células, o que poderia contribuir para a atenuação dos processos anafiláticos.



5 **Figura 12. Avaliação dos níveis de MPO.** As barras representam os grupos analisados (CTL: Controle; OVA: sensibilizados e desafiados com OVA; 905: 0,1 mL contendo 1×10^9 UFC/mL de *S. cerevisiae*); (N = 5 animais/grupo); (*p < 0,05, em comparação ao grupo controle e **p < 0,05 em comparação com o grupo controle da alergia).

10 5.5 Avaliação da atividade de EPO

Em processos alérgicos, os eosinófilos são recrutados e são encontrados em maiores níveis nos tecidos inflamados e, uma vez ativados, liberam enzimas, como a EPO, citocinas pró-inflamatórias (IL-4, IL-5, IL-13) e algumas quimiocinas (CCL11/eotaxina), que podem acentuar os processos alérgicos (Hogan et al., 2008; Chu et al., 2014).

A enzima EPO possui cerca de 68% de similaridade de sua sequência com a MPO neutrofílica. A EPO também é responsável por catalisar a oxidação de algumas substâncias desencadeando a formação de ROS, que podem causar estresse oxidativo e morte celular, promovendo danos teciduais (Hogan et al., 2008; Hogan et al., 2009). Esta enzima está presente nos eosinófilos (cerca de 15 pg/célula) (Hogan et al., 2008), sendo, portanto, um importante alvo para avaliação indireta da presença de eosinófilos nos tecidos (Strath et al., 1985).

Deste modo, para avaliar se a administração oral de *S. cerevisiae* UFMG A-905 é capaz de atenuar os níveis de eosinófilos no jejuno proximal dos

camundongos, mensurou-se a atividade da enzima EPO. Os resultados podem ser visualizados na Figura 13.

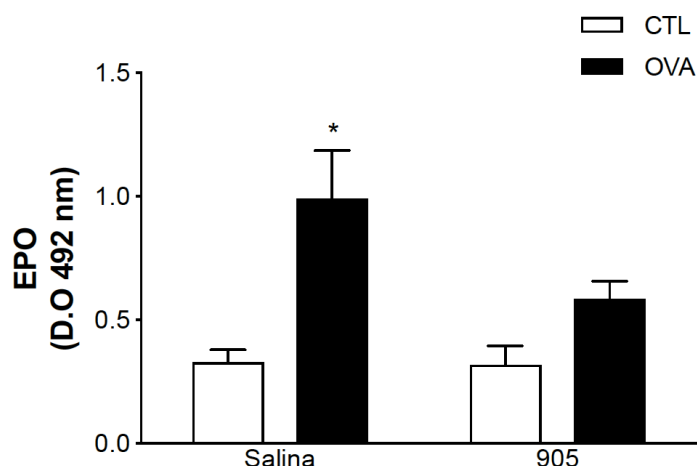


Figura 13. Avaliação dos níveis da enzima EPO. As barras representam os grupos analisados (CTL: Controle; OVA: sensibilizados e desafiados com OVA; 905: 0,1 mL contendo 1×10^9 UFC/mL de *S. cerevisiae* viva); (N = 5 animais/grupo); (*p < 0,05, em comparação ao grupo controle).

Conforme apresentado na Figura 13, o grupo controle (CTL) apresentou baixos níveis de eosinófilos no tecido. Em contrapartida, o grupo sensibilizado e desafiado (OVA) apresentou altos níveis dessas células no intestino. Estes resultados estão em concordância com os estudos realizados por Kim e colaboradores (2008), evidenciando que o modelo de indução da alergia estava de acordo com o esperado.

Em relação à capacidade de suprimir o infiltrado eosinofílico no tecido, em nosso estudo, a administração oral da *S. cerevisiae* UFMG A-905 promoveu uma supressão relevante (aproximadamente 50%) (Figura 13) quando comparado com o grupo sensibilizado e desafiado (OVA). Esta redução também foi observada nos dados histológicos previamente apresentados. No estudo realizado por Kim e colaboradores (2008) observa-se que a administração oral de *B. lactis*, *L. acidophilus* ou a mistura de ambos micro-organismos, foi capaz de atenuar os níveis de eosinófilos no intestino dos camundongos sensibilizados e desafiados, corroborando os nossos dados.

5.6 Avaliação dos níveis de IL-17

No presente estudo, observou-se um aumento da atividade da MPO nos camundongos alérgicos e com o tratamento utilizando a *S. cerevisiae* UFMG A-905 esses níveis foram reduzidos significativamente aos níveis basais (Figura 12). Sabe-se que a citocina IL-17 desempenha um papel relevante no recrutamento de neutrófilos para os tecidos inflamados (Fujie et al., 2012; Matsuzaki et al., 2018; Ricciardolo et al., 2017; Hosoki et al., 2016). A citocina IL-17 é produzida por uma variedade de células, dentre elas os linfócitos Th17. Na alergia alimentar essa citocina está envolvida, principalmente, na ativação e recrutamento dos neutrófilos para os tecidos inflamados, desencadeando produção de radicais livres e liberação de enzimas como a MPO, que culminam em danos teciduais (Żbikowska-Gotz et al., 2016). Portanto, para avaliar se essa supressão está relacionada com os níveis de IL-17, dosou-se os níveis desta citocina, no jejuno proximal dos camundongos e os resultados são apresentados na Figura 14.

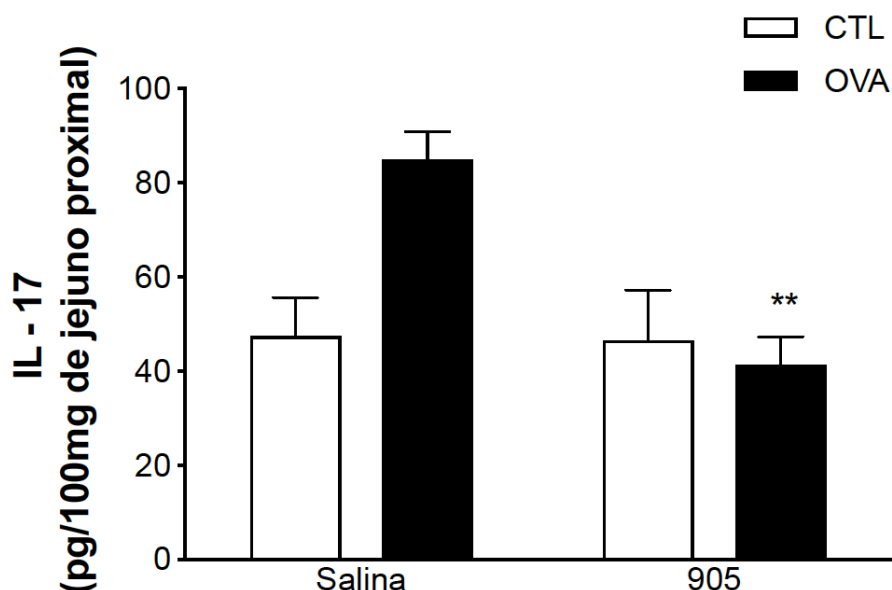


Figura 14. Avaliação dos níveis de IL-17. As barras representam os grupos analisados (CTL: Controle; OVA: sensibilizados e desafiados com OVA; 905: 0,1 mL contendo 1×10^9 UFC/mL de *S. cerevisiae*); (N = 5 animais/grupo); (**p < 0,05 em comparação com o grupo controle da alergia).

Os resultados apresentados na Figura 14 corroboram os resultados encontrados na dosagem da atividade da MPO (Figura 12). Portanto, infere-se que o

mecanismo pelo qual a *S. cerevisiae* UFMG A-905 atenua os níveis de neutrófilos nos tecidos inflamados poderia estar relacionado à supressão da produção de IL-17.

No presente estudo, foi demonstrado que camundongos sensibilizados e desafiados (OVA) apresentaram altos níveis de IL-17 e alta atividade da MPO.

Somado a isso, observou-se que, quando tratados com a levedura, tanto os níveis de IL-17 decresceram significativamente quanto da MPO, dando respaldo à relação existente entre estes parâmetros, consolidando a hipótese de decréscimo dos níveis de neutrófilos no tecido dos animais alérgicos tratados com a levedura e sugerindo uma possível proteção da levedura nos tecidos dos camundongos alérgicos e tratados. Estudos realizados por Żbikowska-Gotz e colaboradores (2016) também evidenciaram uma relação entre a produção de IL-17 com o aumento da ativação dos neutrófilos em pacientes comprovadamente alérgicos.

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

A microbiota intestinal tem sido apontada como um dos aspectos intimamente relacionados com o desenvolvimento das doenças alérgicas, devido, principalmente, à alteração da composição microbiana (disbiose), com consequente modificação dos metabólitos produzidos por estes micro-organismos. Sendo assim, a manipulação da composição microbiana pode ser considerada um alvo para o tratamento das mais diversas doenças alérgicas, incluindo a alergia alimentar (Huang et al., 2017). No presente estudo, avaliou-se a composição da microbiota intestinal por métodos dependentes de cultivo e os resultados podem ser visualizados na Figura 15.

Estudos realizados por Ling e colaboradores (2014) evidenciaram um aumento de 11 gêneros nas fezes de crianças com alergia alimentar, em relação às crianças saudáveis, incluindo *Staphylococcus* e algumas bactérias produtoras de ácido lático, como dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Este aumento corrobora os dados encontrados no presente estudo em que houve um aumento significativo destes micro-organismos nos camundongos do grupo controle da alergia quando comparados ao controle negativo (Figuras 15D e 15E). Do mesmo modo, além do aumento da carga bacteriana de *Staphylococcus*, observa-se um aumento na frequência em que esse gênero foi encontrado (em animais controle a frequência foi de 60% enquanto no grupo OVA foi de 80%).

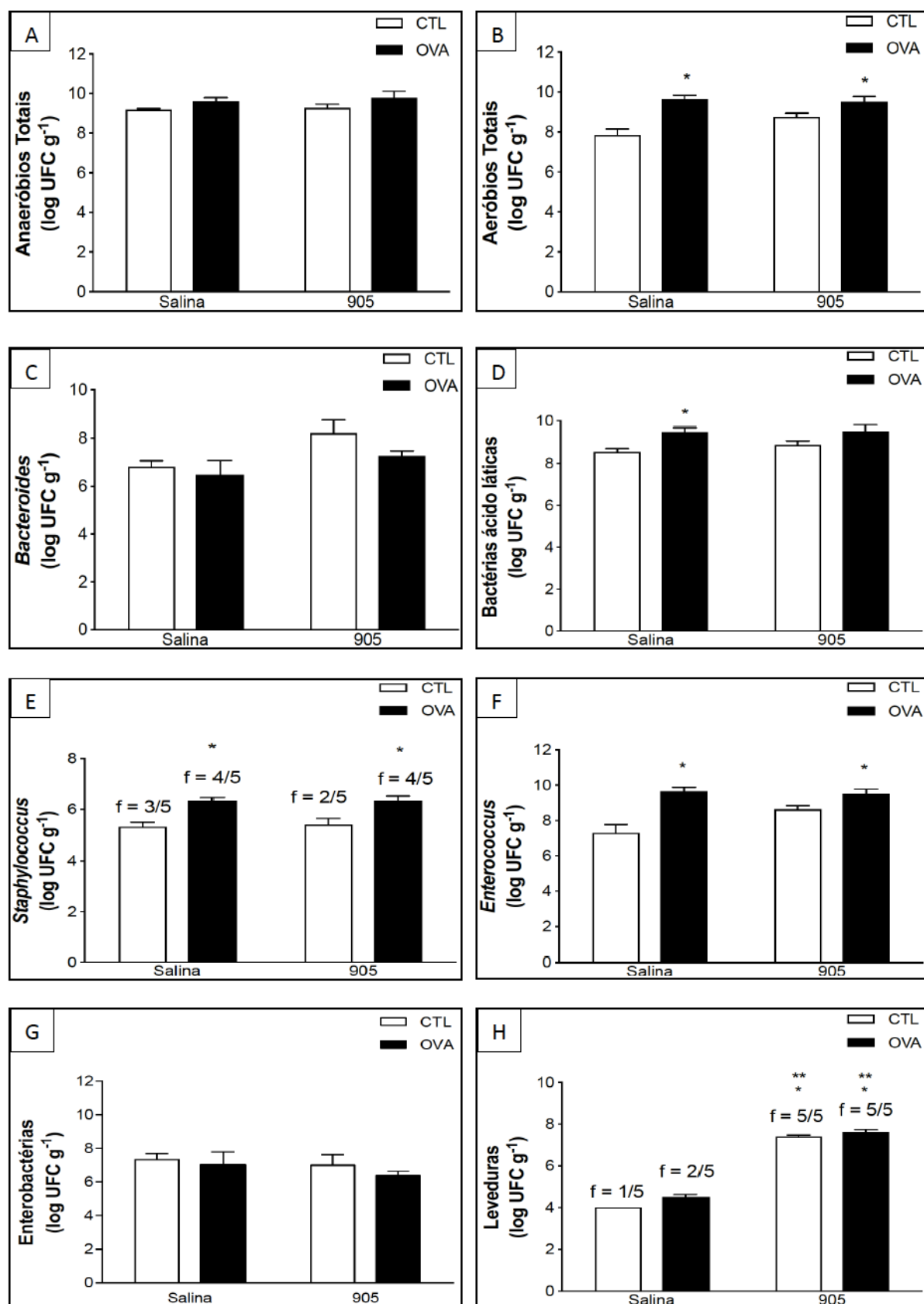


Figura 15. Composição da microbiota intestinal por método dependente de cultivo. As letras representam os micro-organismos analisados. A: Anaeróbios totais; B: Aeróbios totais; C: *Bacteroides*; D: bactérias produtoras de ácido láctico; E: *Staphylococcus*; F: *Enterococcus*; G: Enterobactérias; H: Leveduras. As barras representam os grupos analisados (CTL:

Controle; OVA: sensibilizados e desafiados com OVA; 905: 0,1 mL contendo 1×10^9 UFC/mL de *S. cerevisiae* viva); f = frequência; (N = 5 animais/grupo); (*p < 0,05, em comparação ao grupo controle e **p < 0,05 em comparação com o grupo controle da alergia).

5 A presença de algumas espécies do gênero *Staphylococcus*, como por exemplo, *Staphylococcus aureus*, tem sido associada com o desencadeamento de alergias a diversos alimentos, como amendoim, ovo e leite, principalmente em pacientes que apresentam dermatite atópica. Devido aos fatores de virulência desta bactéria, como proteases, lipases, toxinas e alguns componentes presentes em sua
10 superfície, pode haver o rompimento da barreira epitelial desencadeando um aumento da absorção de alguns alérgenos, culminando nos processos alérgicos (Jones et al., 2016).

Ao analisar a capacidade protetora da levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905 frente ao aumento de *Staphylococcus*, observa-se que essa linhagem não foi capaz
15 de atenuar os níveis de *Staphylococcus* no grupo alérgico tratado. Como indicado na Figura 15E, o número de UFC e a frequência de camundongos que apresentaram *Staphylococcus* permaneceram iguais quando comparados ao controle da alergia.

No que concerne ao aumento significativo das bactérias produtoras de ácido láctico no grupo controle alérgico em relação ao grupo controle, admite-se que este
20 aumento possa estar correlacionado com o fato de que, apesar de algumas bactérias produtoras de ácido láctico como espécies do gênero *Lactobacillus* serem bactérias comumente utilizadas como probióticos devido às suas propriedades probióticas, dentro do mesmo gênero, pode haver algumas espécies que não possuam essa capacidade, podendo até mesmo estarem relacionadas a algumas
25 doenças como a alergia alimentar (Ling et al., 2014; Oh et al., 2018). Por exemplo, estudos realizados por Gore e colaboradores (2008) demonstraram que a *Bifidobacterium pseudocatenulatum* pode estar relacionada a eczema atópica, apesar de inúmeros estudos comprovarem o papel probiótico de várias espécies do gênero *Bifidobacterium* (Kobayashi et al., 2017; Oh et al., 2018; Wei et al., 2018).

30 Avaliando a Figura 15B, observa-se que há um aumento significativo de aeróbios totais no grupo alérgico e no grupo alérgico tratado, respectivamente, em relação ao grupo controle. Tal aumento pode ter sido influenciado pela elevação do número de *Staphylococcus* nos grupos alérgicos tratados ou não.

Por fim, na Figura 15 H, observa-se que em todos os grupos tratados com a levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905 (905 e 905 OVA) detectou-se aproximadamente 10^8 UFC/g de fezes de leveduras totais. Em contrapartida, os grupos aos quais não receberam a levedura (controle e OVA) foram detectados aproximadamente 10^4 UFC/g de fezes. Em concordância, para os grupos que receberam a levedura observou-se uma frequência de 100%, que difere dos grupos que não receberam a levedura (Grupo Controle: 20% e OVA: 40%). Pode-se concluir, portanto, que esses níveis aumentados de leveduras são resultantes da administração de *S. cerevisiae* UFMG A-905.

Esses dados de análise da microbiota cultivável sugerem que o mecanismo pelo qual a levedura exerce um papel protetor local não é devido à modificação de microbiota.

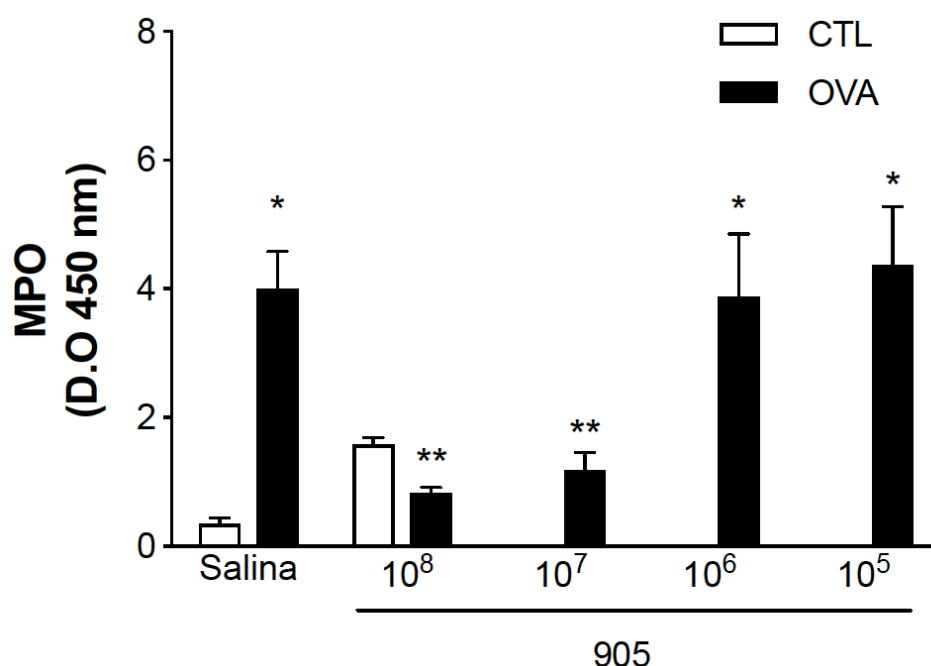
5.8 Avaliação do efeito dose-dependente da levedura

Neste estudo, foi demonstrado que a levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905 foi capaz de suprimir o infiltrado neutrofílico, possivelmente envolvendo a diminuição dos níveis da citocina IL-17 (Figuras 12 e 14). Para investigar se este efeito é dose-dependente, avaliou-se os níveis de MPO no jejuno proximal de camundongos sensibilizados e desafiados que receberam 0,1 mL contendo 10^9 , 10^8 , 10^7 ou 10^6 UFC/mL de *S. cerevisiae* UFMG A-905 (Figura 16).

Por definição os probióticos são micro-organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios a saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002; Hill et al., 2014; O'Toole, et al., 2017). Porém, essa quantidade pode variar dependendo de vários fatores, por exemplo, a linhagem do micro-organismo utilizado, a rota de administração e se o tratamento é preventivo ou curativo (Ouwehand et al., 2017). No presente estudo, observou-se um efeito dose-dependente da *S. cerevisiae* UFMG A-905 em relação à diminuição do infiltrado neutrofílico, em que apenas as maiores doses testadas (10^8 e 10^7 UFC/mL), apresentaram uma redução significativa deste parâmetro (Figura 16).

Estudos realizados por Aktas e colaboradores (2015) mostraram que a administração oral de *L. casei* promove um efeito imunomodulatório dose dependente no SI dos camundongos testados. Estudos realizados por Kollaritsch e colaboradores (1993) mostraram um efeito dependente de dose de *S. boulardii* na

prevenção da diarreia dos viajantes em um estudo duplo-cego. Estes efeitos dose-dependentes corroboram os dados apresentados no presente estudo.



5 **Figura 16. Dose-resposta em relação aos níveis de MPO.** As barras representam os grupos analisados (CTL: Controle; OVA: sensibilizados e desafiados com OVA; 905: 0,1 mL contendo 1×10^9 , 1×10^8 , 1×10^7 ou 1×10^6 UFC/mL de *S. cerevisiae*); N = 5 animais/grupo; *p < 0,05, em comparação ao grupo controle e **p < 0,05 em comparação com o grupo controle da alergia.

10

5.9 Avaliação da viabilidade da levedura e do sobrenadante de cultura na alergia alimentar

Para avaliar se a redução dos níveis de MPO é dependente da viabilidade da levedura e consequentemente do seu metabolismo e se estaria relacionado com a produção/excreção de algum composto ou, ainda, se é dependente de algum componente estrutural da sua parede celular, avaliou-se os níveis de MPO no jejuno proximal dos camundongos testando a administração da levedura inativada pelo calor e do seu sobrenadante. Para isso, os animais receberam 0,1 mL contendo 10^9 células mortas/mL da levedura inativada pelo calor (72°C por 5 minutos) (Anexos 8.3 e 8.4) ou 0,1 mL do sobrenadante da cultura de 10^9 UFC/mL da levedura viável. Os resultados podem ser visualizados na Figura 17, mostrando que o grupo tratado apenas com o sobrenadante da levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905 apresenta um decréscimo significativo nos níveis de MPO. Estes resultados inferem que o

mecanismo de ação envolvido na supressão dos níveis de neutrófilos envolve a excreção de algum metabólito no meio de cultura, que confere uma proteção em relação a esse parâmetro.

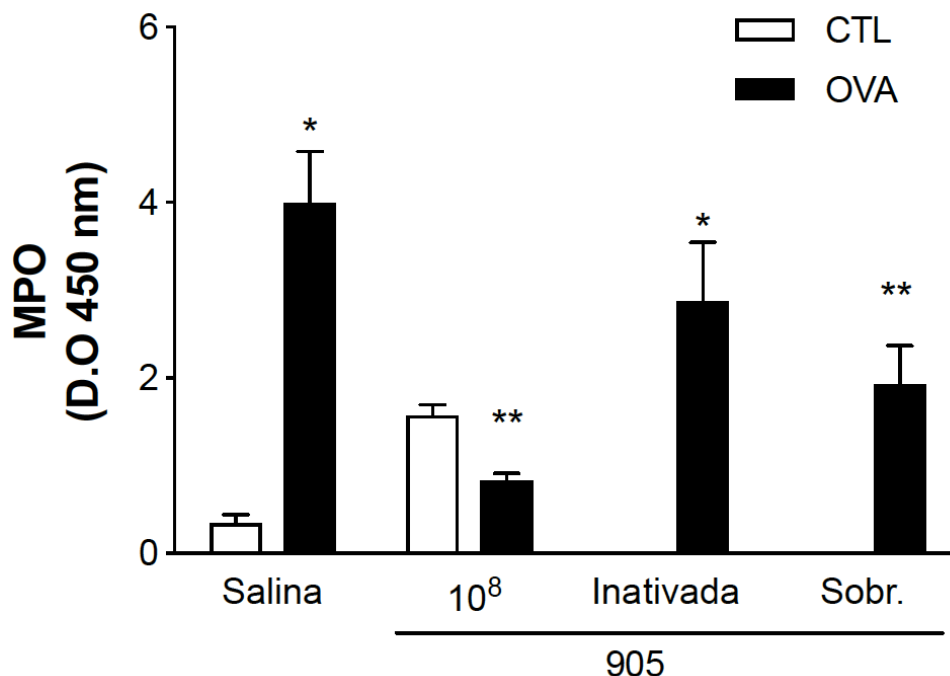


Figura 17. Avaliação da mieloperoxidase em camundongos tratados com a levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905 inativada pelo calor e com o sobrenadante (Sobr.) da cultura viável. As barras representam os grupos analisados (CTL: Controle; OVA: sensibilizados e desafiados com OVA; 905: 0,1 mL contendo 1×10^9 UFC/mL da levedura viável, inativada ou do sobrenadante da cultura de 1×10^9 UFC/mL da levedura viável); N = 5 animais/grupo; *p < 0,05, em comparação ao grupo controle e **p < 0,05 em comparação com o grupo controle da alergia.

Os dados apresentados corroboram os estudos realizados por Buccigrossi e colaboradores (2014), em que houve um efeito protetor do sobrenadante da levedura *S. boulardii* em um modelo de infecção por rotavírus, evidenciando a existência de metabólitos produzidos por esta levedura que foram capazes de promover proteção contra o estresse oxidativo. Estudos realizados por Koon e colaboradores (2016) também evidenciaram um efeito protetor do sobrenadante de *S. boulardii*, porém, em um modelo de infecção por *Clostridium difficile*. Além disso, estudos realizados por nosso grupo de pesquisa também demonstraram que tanto *S. boulardii* quanto *S. cerevisiae* UFMG A-905 são capazes de sintetizar algum metabólito que auxilia na proteção contra infecções bacterianas causadas por *S. Typhimurium* (Martins, 2008). Estes estudos fornecem embasamento para a

existência de algum composto produzido pela levedura que proporciona um efeito protetor. A presença de compostos que apresentam atividade biológica produzidos pelas *Saccharomyces* já foi investigada. Estudos realizados por Sougioultzis e colaboradores (2006), mostraram que *S. boulardii* produz uma molécula pequena, solúvel e estável, denominada Fator anti-inflamatório *Saccharomyces* (FAIS), que como o próprio nome diz, apresenta propriedades anti-inflamatórias.

Além disso, vários estudos tem demonstrado que alguns micro-organismos são capazes de desencadear algum efeito protetor, mesmo quando inativados pelo calor (Sang et al., 2015; Barman et al., 2013). Tendo em vista que alguns probióticos vivos podem translocar e desencadear danos em indivíduos imunossuprimidos, o efeito protetor advindo destes micro-organismos inativados é de extrema importância (Liong et al., 2008). A recomendação pela WHO de não usar probióticos em pacientes imunocomprometidos poderia assim ser contornada com uso de células mortas.

Na Figura 17, nota-se que a levedura inativada pelo calor não apresenta redução nos níveis do infiltrado neutrofílico, assemelhando aos níveis do grupo controle da alergia. Isto indica a necessidade da viabilidade da levedura para desencadear a supressão dos níveis de neutrófilos e exclui a possibilidade de o mecanismo envolvido estar relacionado a algum componente estrutural da levedura. Koon e colaboradores (2016) apresentaram resultados que corroboram o encontrado, em que apenas *S. boulardii* viável foi capaz de promover um efeito protetor em um modelo de infecção por *C. difficile*.

Em resumo, os resultados apresentados indicam que a promoção de um efeito significativo exige que a levedura encontre-se viável e em altos níveis. Além disso, os dados sugerem que a levedura promove um efeito local, mas não sistêmico. Martins e colaboradores (2011) evidenciaram que essa levedura é capaz de se ligar a *S. Typhimurium* no intestino, impedindo sua translocação, em um modelo de infecção, caracterizando um efeito local da levedura. Entretanto, o mesmo grupo (Martins et al., 2007), promoveu evidências de que a levedura também é capaz de exercer efeitos sistêmicos, como o estímulo da proliferação das células de Küpffer e maior ativação do *clearance* bacteriano em modelos de infecção. Efeitos sistêmicos também foram observados em modelos de obstrução intestinal (Generoso et al., 2010) e asma (Fonseca et al., 2017).

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou que a administração oral de *S. cerevisiae* UFMG A-905 promove um efeito probiótico local, dose-dependente e que depende da viabilidade da levedura. Este efeito pode estar associado com redução dos níveis da citocina IL-17 e diminuição do influxo de neutrófilos. Os dados apresentados auxiliarão novas investigações que poderão contribuir para o desenvolvimento de novas formas de tratamento visando promover o bem-estar dos pacientes que são acometidos pela alergia alimentar.

7. REFERÊNCIAS

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. (2007). *Imunologia básica*. Elsevier Brasil. Cap 1, 8-15.
- Abdel-Gadir, A., Massoud, A. H., Chatila, T. A. (2018). Antigen-specific Treg cells in immunological tolerance: implications for allergic diseases. *F1000Research*, 7, 38.
- Ahmadi, Z., Hassanshahi, G., Khorramdelazad, H., Zainodini, N., Koochakzadeh, L. (2016). An overlook to the characteristics and roles played by eotaxin network in the pathophysiology of food allergies: allergic asthma and atopic dermatitis. *Inflammation*, 39(3), 1253-1267.
- Aitoro, R., Paparo, L., Amoroso, A., Di Costanzo, M., Cosenza, L., Granata, V., Scala, C., Nocerino, R., Trinchese, G., Montella, M., Ercolini, D., Canani, B. (2017). Gut microbiota as a target for preventive and therapeutic intervention against food allergy. *Nutrients*, 9(7), 672.
- Aktas, B., De Wolfe, T. J., Tandee, K., Safdar, N., Darien, B. J., Steele, J. L. (2015). The effect of *Lactobacillus casei* 32G on the mouse cecum microbiota and innate immune response is dose and time dependent. *Plos One*, 10(12), 1-19.
- Arantes, R. M. E., Nogueira, A. M. M. F. (1997). Distribution of enteroglucagon-and peptide YY-immunoreactive cells in the intestinal mucosa of germ-free and conventional mice. *Cell and Tissue Research*, 290(1), 61-69.
- Aratani, Y. (2018). Myeloperoxidase: its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 640, 47-52.
- Barman, S., Koley, H., Ramamurthy, T., Chakrabarti, M. K., Shinoda, S., Nair, G. B., Takeda, Y. (2013). Protective immunity by oral immunization with heat-killed *Shigella* strains in a guinea pig colitis model. *Microbiology and Immunology*, 57(11), 762-771.
- Bastos, R. W., Pedroso, S. H. S. P., Vieira, A. T., Moreira, L. M. C., França, C. S., Cartelle, C. T., Arantes, R. M., Generoso, S. V., Cardoso, V. N., Neves, M, J., Nicoli, J. R, Martins, F. S. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 treatment reduces intestinal damage in a murine model of irinotecan-induced mucositis. *Beneficial Microbes*, 7(4), 549-557.
- Beutier, H., Gillis, C. M., Iannascoli, B., Godon, O., England, P., Sibilano, R., Mancardi, D. A. (2017). IgG subclasses determine pathways of anaphylaxis in mice. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 139(1), 269-280.

- Bevins, C. L., Salzman, N. H. (2011). Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nature Reviews Microbiology*, 9(5), 356.
- Brandtzaeg, P. (2009). Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. *Scandinavian Journal of Immunology*, 70(6), 505-515.
- Brandtzaeg, P. (2013). Secretory IgA: designed for anti-microbial defense. *Frontiers in Immunology*, 4.
- Brasil. (2008). Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Estabelecimento de procedimentos para uso científico de animais. *Constituição Federal*. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm>. Acesso em: 22 de novembro de 2018
- Brun, P., Scarpa, M., Marchiori, C., Sarasin, G., Caputi, V., Porzionato, A., Castagliuolo, I. (2017). *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 supplementation reduces gastrointestinal dysfunction in an animal model of IBS. *Plos One*, 12(7).
- Buccigrossi, V., Laudiero, G., Russo, C., Miele, E., Sofia, M., Monini, M., Guarino, A. (2014). Chloride secretion induced by rotavirus is oxidative stress-dependent and inhibited by *Saccharomyces boulardii* in human enterocytes. *Plos One*, 9(6).
- Calvani, M., Berti, I., Fiocchi, A., Galli, E., Giorgio, V., Martelli, A., Sopo, S., Panetta, V. (2012). Oral food challenge: safety, adherence to guidelines and predictive value of skin prick testing. *Pediatric Allergy and Immunology*, 23(8), 754-760.
- Cara, D. C., Conde, A. A., Vaz, N. M. (1994). Immunological induction of flavor aversion in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 27(6), 1331-1341.
- Cara, D. C., Conde, A. A., Vaz, N. M. (1997). Immunological induction of flavour aversion in mice. II. Passive/adoptive transfer and pharmacological inhibition. *Scandinavian Journal of Immunology*, 45(1), 16-20.
- Castellazzi, A., Valsecchi, C., Caimmi, S., Licari, A., Marseglia, A., Leoni, M., Caimmi, D., Giudice, M., Leonardi, S., Rosa, M., Marseglia, G. (2013). Probiotics and food allergy. *Italian Journal of Pediatrics*, 39(1), 47.
- Chen, J. B., Ramadani, F., Pang, M. O., Beavil, R. L., Holdom, M. D., Mitropoulou, A. N., McDonnell, J. M. (2018). Structural basis for selective inhibition of immunoglobulin E-receptor interactions by an anti-IgE antibody. *Scientific Reports*, 8(1), 11548.

- Chen, T., Liu, X., Li, M., He, W., Li, W., Cao, Y., Liu, Z. (2014). Food allergens affect the intestinal tight junction permeability in inducing intestinal food allergy in rats. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, 32(4), 345.
- Cheng, X., Voss, U., Ekblad, E. (2018). Tuft cells: Distribution and connections with nerves and endocrine cells in mouse intestine. *Experimental Cell Research*, 369(1), 105-111.
- Chu, D. K., Jimenez-Saiz, R., Verschoor, C. P., Walker, T. D., Goncharova, S., Llop-Guevara, A., Kong, J. (2014). Indigenous enteric eosinophils control DCs to initiate a primary Th2 immune response in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 211(8), 1657-1672.
- Collin, M., Bigley, V. (2018). Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology*, 154(1), 3-20.
- Costa-Pinto, F. A., Basso, A. S., Britto, L. R. G., Malucelli, B. E., Russo, M. (2005). Avoidance behavior and neural correlates of allergen exposure in a murine model of asthma. *Brain, Behavior, and Immunity*, 19(1), 52-60.
- Costa-Pinto, F. A., Basso, A. S., Russo, M. (2007). Role of mast cell degranulation in the neural correlates of the immediate allergic reaction in a murine model of asthma. *Brain, Behavior, and Immunity*, 21(6), 783-790.
- Czerucka, D., Piche, T., Rampal, P. (2007). Yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 26(6), 767-778.
- D'souza, A. L., Rajkumar, C., Cooke, J., Bulpitt, C. J. (2002). Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. *Bmj*, 324(7350), 1361.
- de Azevedo, M. S. P., Innocentin, S., Dorella, F. A., Rocha, C. S., Mariat, D., Pontes, D. S., Miyoshi, A., Azevedo, V., Langella, P., Chatel, J. M. (2013). Immunotherapy of allergic diseases using probiotics or recombinant probiotics. *Journal of Applied Microbiology*, 115(2), 319–333.
- Deplancke, B., Gaskins, H. R. (2001). Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(6), 1131S-1141S.
- Dourado, L. P. A., da Silva Saldanha, J. C., Gargiulo, D. L., Noviello, M. D. L. M., Brant, C. C., Reis, M. L. C., Cara, D. C. (2010). Role of IL-4 in aversion induced by food allergy in mice. *Cellular Immunology*, 262(1), 62-68.
- Dourado, L. P. A., Noviello, M. D. L. M., Alvarenga, D. M., Menezes, Z., Perez, D. A., Batista, N. V., Menezes, G. B., Ferreira, A. V. M., Souza, D. G., Cara, D. C.

- (2011). Experimental food allergy leads to adipose tissue inflammation, systemic metabolic alterations and weight loss in mice. *Cellular Immunology*, 270(2), 198-206.
- du Toit, G., Tsakok, T., Lack, S., Lack, G. (2016). Prevention of food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 137(4), 998-1010.
- Elliott, E. N., Kaestner, K. H. (2015). Epigenetic regulation of the intestinal epithelium. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(21), 4139-4156.
- Fagarasan, S., Honjo, T. (2003). Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nature Reviews Immunology*, 3(1), 63.
- FAO/WHO Working Group. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. *London: World Health Organization, ON, Canada: Food and Agriculture Organization*.
- Faria, A. M. C., Gomes-Santos, A. C., Gonçalves, J. L., Moreira, T. G., Medeiros, S. R., Dourado, L. P., Cara, D. C. (2013). Food components and the immune system: from tonic agents to allergens. *Frontiers in Immunology*, 4, 102.
- Ferraris, R. P., Villenas, S. A., Diamond, J. A. R. E. D. (1992). Regulation of brush-border enzyme activities and enterocyte migration rates in mouse small intestine. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 262(6), G1047-G1059.
- Fietto, J. L., Araújo, R. S., Valadão, F. N., Fietto, L. G., Brandão, R. L., Neves, M. J., Castro, I. M. (2004). Molecular and physiological comparisons between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*. *Canadian Journal of Microbiology*, 50(8), 615-621.
- Fonseca, V., Milani, T., Prado, R., Bonato, V. L., Ramos, S. G., Martins, F. S., Borges, M. D. C. (2017). Oral administration of *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 prevents allergic asthma in mice. *Respirology*, 22(5), 905-912.
- Francis, A., Bosio, E., Stone, S. F., Fatovich, D. M., Arendts, G., Nagree, Y., Brown, S. G. A. (2017). Neutrophil activation during acute human anaphylaxis: analysis of MPO and sCD 62L. *Clinical & Experimental Allergy*, 47(3), 361-370.
- Fujie, H., Niu, K., Ohba, M., Tomioka, Y., Kitazawa, H., Nagashima, K., Numasaki, M. (2012). A distinct regulatory role of Th17 cytokines IL-17A and IL-17F in chemokine secretion from lung microvascular endothelial cells. *Inflammation*, 35(3), 1119-1131.

- Galgani, J., Ravussin, E. (2009). Energy metabolism, fuel selection and body weight regulation. *International Journal of Obesity*, 32(S7), S109.
- Gassler, N. (2017). Paneth cells in intestinal physiology and pathophysiology. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, 8(4), 150.
- Generoso, S., Viana, M., Santos, R., Martins, F., Machado, J., Arantes, R., Nicoli, J., Correia, M., Cardoso, V. N. (2010). *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 protects against bacterial translocation, preserves gut barrier integrity and stimulates the immune system in a murine intestinal obstruction model. *Archives of Microbiology*, 192(6), 477-484.
- Gore, C., Munro, K., Lay, C., Bibiloni, R., Morris, J., Woodcock, A., Tannock, G. W. (2008). *Bifidobacterium pseudocatenulatum* is associated with atopic eczema: a nested case-control study investigating the fecal microbiota of infants. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(1), 135-140.
- Groschwitz, K. R., Hogan, S. P. (2009). Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124(1), 3-20.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R., Flint, H., Salminen, S., Calder, P., Sanders, M. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506–514.
- Hogan, S. P. (2009). Functional role of eosinophils in gastrointestinal inflammation. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 29(1), 129-140.
- Hogan, S. P., Rosenberg, H. F., Moqbel, R., Phipps, S., Foster, P. S., Lacy, P., Rothenberg, M. E. (2008). Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clinical & Experimental Allergy*, 38(5), 709-750.
- Holdman, L. V., Cato, E. P., Moore, W. E. C. (1977). *Anaerobe Laboratory Manual*. The Virginia Polytechnic Institute and State. University Anaerobe Laboratory, 156.
- Hosoki, K., Boldogh, I., Sur, S. (2016). Neutrophil recruitment by allergens contribute to allergic sensitization and allergic inflammation. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 16(1), 45.
- Huang, Y. J., Marsland, B. J., Bunyavanich, S., O'mahony, L., Leung, D. Y., Muraro, A., Fleisher, T. A. (2017). The microbiome in allergic disease: current

- understanding and future opportunities—2017 PRACTALL document of the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology and the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 139(4), 1099-1110.
- Iyer, S. S., Cheng, G. (2012). Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Critical Reviews™ in Immunology*, 32(1).
- Jones, A. L., Curran-Everett, D., Leung, D. Y. (2016). Food allergy is associated with *Staphylococcus aureus* colonization in children with atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 137(4), 1247-1248.
- Jönsson, F., Mancardi, D. A., Kita, Y., Karasuyama, H., Iannascoli, B., Van Rooijen, N., Bruhns, P. (2011). Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(4), 1484-1496.
- Jung, C., Hugot, J. P., Barreau, F. (2010). Peyer's patches: the immune sensors of the intestine. *International Journal of Inflammation*, 2010.
- Justino, P. F., Melo, L. F., Nogueira, A. F., Costa, J. V., Silva, L. M., Santos, C. M., Mendes, W. O., Costa, M. R., Franco, A. X., Lima, A. A., Ribeiro, R. A., Souza, M. P., Soares, P. M. (2014). Treatment with *Saccharomyces boulardii* reduces the inflammation and dysfunction of the gastrointestinal tract in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. *British Journal of Nutrition*, 111(9), 1611-1621.
- Kelesidis, T., Pothoulakis, C. (2012). Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. *Therapeutic advances in gastroenterology*, 5(2), 111-125.
- Kim, H., Kwack, K., Kim, D., Ji, G. E. (2005). Oral probiotic bacterial administration suppressed allergic responses in an ovalbumin-induced allergy mouse model. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 45(2), 259–267.
- Kim, J. Y., Choi, Y. O., Ji, G. E. (2008). Effect of oral probiotics (*Bifidobacterium lactis* AD011 and *Lactobacillus acidophilus* AD031) administration on ovalbumin-induced food allergy mouse model. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(8), 1393-1400.
- Kobayashi, Y., Sugahara, H., Shimada, K., Mitsuyama, E., Kuhara, T., Yasuoka, A., Xiao, J. Z. (2017). Therapeutic potential of *Bifidobacterium breve* strain A1 for preventing cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Scientific Reports*, 7(1), 13510.

- Kollaritsch, H., Holst, H., Grobara, P., Wiedermann, G. (1993). Prevention of traveler's diarrhea with *Saccharomyces boulardii*. Results of a placebo controlled double-blind study. *Fortschritte der Medizin*, 111(9), 152-156.
- Koon, H. W., Su, B., Xu, C., Mussatto, C. C., Tran, D. H. N., Lee, E. C., Chen, X. (2016). Probiotic *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 prevents outbreak-associated *Clostridium difficile*-associated cecal inflammation in hamsters. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 311(4), G610-G623.
- Kourelis, A., Kotzamanidis, C., Litopoulou-Tzanetaki, E., Papaconstantinou, J., Tzanetakis, N., Yiangou, M. (2010). Immunostimulatory activity of potential probiotic yeast strains in the dorsal air pouch system and the gut mucosa. *Journal of Applied Microbiology*, 109(1), 260-271.
- Laforest-Lapointe, I., Arrieta, M. C. (2017). Patterns of early-life gut microbial colonization during human immune development: An ecological perspective. *Frontiers in Immunology*, 8.
- Lee, J., Bang, J., Woo, H. J. (2013). Effect of orally administered *Lactobacillus brevis* HY7401 in a food allergy mouse model. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(11), 1636–1640.
- Lee, S. H. (2015). Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases. *Intestinal Research*, 13(1), 11-18.
- Li, M., Zhu, L., Xie, A., Yuan, J. (2015). Oral administration of *Saccharomyces boulardii* ameliorates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats via reducing intestinal permeability and modulating gut microbial composition. *Inflammation*, 38(1), 170-179.
- Ling, Z., Li, Z., Liu, X., Cheng, Y., Luo, Y., Tong, X., Xiang, C. (2014). Altered fecal microbiota composition for food allergy in infants. *Applied and Environmental Microbiology*, AEM-00003.
- Liong, M. T. (2008). Safety of probiotics: translocation and infection. *Nutrition Reviews*, 66(4), 192-202.
- Liu, M. Y., Yang, Z. Y., Dai, W. K., Huang, J. Q., Li, Y. H., Zhang, J., Feng, X. (2017). Protective effect of *Bifidobacterium infantis* CGMCC313-2 on ovalbumin-induced airway asthma and β -lactoglobulin-induced intestinal food allergy mouse models. *World Journal of Gastroenterology*, 23(12), 2149.

- Livingston, S. J., Kominos, S. D., Yee, R. B. (1978). New medium for selection and presumptive identification of the *Bacteroides fragilis* group. *Journal of Clinical Microbiology*, 7(5), 448-453.
- Martins, F. (2008). Efeito de dois probióticos, *Saccharomyces boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae* linhagem UFMG 905, na resposta inflamatória induzida por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar. Typhimurium. Tese Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. Disponível em: < <http://livros01.livrosgratis.com.br/cp067559.pdf>>. Acesso em: 02 de janeiro de 2019.
- Martins, F. S., Nardi, R. M., Arantes, R. M., Rosa, C. A., Neves, M. J., Nicoli, J. R. (2005). Screening of yeasts as probiotic based on capacities to colonize the gastrointestinal tract and to protect against enteropathogen challenge in mice. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 51(2), 83-92.
- Martins, F. S., Rodrigues, A. C. P., Tiago, F. C., Penna, F. J., Rosa, C. A., Arantes, R. M., Nardi, M., Neves, M. J., Nicoli, J. R. (2007). *Saccharomyces cerevisiae* strain 905 reduces the translocation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and stimulates the immune system in gnotobiotic and conventional mice. *Journal of Medical Microbiology*, 56(3), 352-359.
- Martins, F. S., Vieira, A. T., Elian, S. D., Arantes, R. M., Tiago, F. C., Sousa, L. P., Araújo, H. R., Pimenta, P. F., Bonjardim, C. C., Nicoli, J. R., Teixeira, M. M. (2013). Inhibition of tissue inflammation and bacterial translocation as one of the protective mechanisms of *Saccharomyces boulardii* against *Salmonella* infection in mice. *Microbes and Infection*, 15(4), 270-279.
- Martins, F., Elian, S., Vieira, A., Tiago, F., Martins, A., Silva, F., Souza, E., Sousa, L., Araújo, H., Pimenta, P., Bonjardim, C., Arantes, R., Teixeira, M., Nicoli, J. (2011). Oral treatment with *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 modulates immune responses and interferes with signal pathways involved in the activation of inflammation in a murine model of typhoid fever. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(4), 359-364.
- Matsuzaki, G., Umemura, M. (2018). Interleukin-17 family cytokines in protective immunity against infections: role of hematopoietic cell-derived and non-hematopoietic cell-derived interleukin-17s. *Microbiology and Immunology*, 62(1), 1-13.

- Mayadas, T. N., Cullere, X., Lowell, C. A. (2014). The multifaceted functions of neutrophils. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 9, 181-218.
- McFarland, L. V. (2010). Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 16(18), 2202.
- McFarland, L. V., Surawicz, C. M., Greenberg, R. N., Fekety, R., Elmer, G. W., Moyer, K. A., Harrington, G. (1994). A randomized placebo-controlled trial of *Saccharomyces boulardii* in combination with standard antibiotics for *Clostridium difficile* disease. *Jama*, 271(24), 1913-1918.
- Moré, M. I., Swidsinski, A. (2015). *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 supports regeneration of the intestinal microbiota after diarrheic dysbiosis—a review. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 8, 237.
- Nakamura, K., Sakuragi, N., Takakuwa, A., Ayabe, T. (2016). Paneth cell α -defensins and enteric microbiota in health and disease. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 35(2), 57-67.
- Nakayama, J., Kobayashi, T., Tanaka, S., Korenori, Y., Tateyama, A., Sakamoto, N., Sonomoto, K. (2011). Aberrant structures of fecal bacterial community in allergic infants profiled by 16S rRNA gene pyrosequencing. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 63(3), 397-406.
- National Institute of Allergy and Infectious Diseases. (2010). Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the NIAID-sponsored expert panel. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126(6), S1-S58.
- Nauseef, W. M. (2007). How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunological Reviews*, 219(1), 88-102.
- Neau, E., Delannoy, J., Marion, C., Cottart, C., Labellie, C., Holowacz, S., Butel, M., Kapel, N., Dupriet, A. (2016). Three novel candidate probiotic strains with prophylactic properties in a murine model of cow's milk allergy. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(6), 1722–1733.
- Nowak-Węgrzyn, A., Chatchatee, P. (2017). Mechanisms of tolerance induction. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 70(2), 7-24.
- Nowak-Węgrzyn, A., Katz, Y., Mehr, S. S., Koletzko, S. (2015). Non-IgE-mediated gastrointestinal food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135(5), 1114–1124.

- Nowak-Węgrzyn, A., Szajewska, H., Lack, G. (2017). Food allergy and the gut. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14(4), 241.
- O'Toole, P. W., Marchesi, J. R., Hill, C. (2017). Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Nature Microbiology*, 2(5), 17057.
- Oh, N. S., Joung, J. Y., Lee, J. Y., Kim, Y. (2018). Probiotic and anti-inflammatory potential of *Lactobacillus rhamnosus* 4B15 and *Lactobacillus gasseri* 4M13 isolated from infant feces. *Plos One*, 13(2), e0192021.
- Ohno, H. (2015). Intestinal M cells. *The Journal of Biochemistry*, 159(2), 151-160.
- Okada, H., Kuhn, C., Feillet, H., Bach, J. F. (2010). The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clinical & Experimental Immunology*, 160(1), 1-9.
- Ouwehand, A. C. (2017). A review of dose-responses of probiotics in human studies. *Beneficial Microbes*, 8(2), 143-151.
- Pabst, O., Mowat, A. M. (2012). Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunology*, 5(3), 232.
- Palma, M. L., Zamith-Miranda, D., Martins, F. S., Bozza, F. A., Nimrichter, L., Montero-Lomeli, M., Douradinha, B. (2015). Probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains as biotherapeutic tools: is there room for improvement?. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(16), 6563-6570.
- Paul, W. E., Zhu, J. (2010). How are TH 2-type immune responses initiated and amplified?. *Nature Reviews Immunology*, 10(4), 225.
- Pedroso, S. H., Vieira, A. T., Bastos, R. W., Oliveira, J. S., Cartelle, C. T., Arantes, R. M., Nicoli, J. R. (2015). Evaluation of mucositis induced by irinotecan after microbial colonization in germ-free mice. *Microbiology*, 161(10), 1950-1960.
- Pelaseyed, T., Bergström, J. H., Gustafsson, J. K., Ermund, A., Birchenough, G. M., Schütte, A., Wising, C. (2014). The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunological Reviews*, 260(1), 8-20.
- Potaczek, D. P., Harb, H., Michel, S., Alhamwe, B. A., Renz, H., Tost, J. (2017). Epigenetics and allergy: from basic mechanisms to clinical applications. *Epigenomics*, 9(4), 539-571.
- Pothoulakis, C. (2009). Anti-inflammatory mechanisms of action of *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 30(8), 826-833.

- Reeves, P., Nielsen, F., Fahey, G. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal of Nutrition*, 123(11), 1939-1951.
- Ricciardolo, F. L., Sorbello, V., Folino, A., Gallo, F., Massaglia, G. M., Favatà, G., Folkerts, G. (2017). Identification of IL-17F/frequent exacerbator endotype in asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 140(2), 395-406.
- Saldanha, J. C. S., Gargiulo, D. L., Silva, S. S., Carmo-Pinto, F. H., Andrade, M. C., Alvarez-Leite, J. I., Cara, D. C. (2004). A model of chronic IgE-mediated food allergy in ovalbumin-sensitized mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37(6), 809-816.
- Salvo, R. E., Alonso, C. C., Pardo, C. C., Casado, B. M., Vicario, M. (2015). The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas: Organo Oficial de la Sociedad Espanola de Patologia Digestiva*, 107(11), 686-696.
- Sang, L. X., Chang, B., Wang, B. Y., Liu, W. X., Jiang, M. (2015). Live and heat-killed probiotic: effects on chronic experimental colitis induced by dextran sulfate sodium (DSS) in rats. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(11), 20072.
- Schouten, B., van Esch, B. C., Hofman, G. A., van Doorn, S. A., Knol, J., Nauta, A. J., Knippels, L. M. (2009). Cow milk allergy symptoms are reduced in mice fed dietary synbiotics during oral sensitization with whey. *The Journal of nutrition*, 139(7), 1398-1403.
- Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. M., Finlay, B. B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiological Reviews*, 90(3), 859-904.
- Shandilya, U. K., Sharma, A., Kapila, R., Kansal, V. K. (2016). Probiotic Dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* modulates immunoglobulin levels and cytokines expression in whey proteins sensitised mice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(9), 3180-3187.
- Sharma, G., Im, S. H. (2018). Probiotics as a Potential Immunomodulating Pharmabiotics in Allergic Diseases: Current Status and Future Prospects. *Allergy, Asthma & Immunology Research*, 10(6), 575-590.

- Shik, D., Tomar, S., Lee, J. B., Chen, C. Y., Smith, A., Wang, Y. H. (2017). IL-9-producing cells in the development of IgE-mediated food allergy. *Seminars in Immunopathology* (1-9).
- Silva, J. F. M. D., Peluzio, J. M., Prado, G., Madeira, J. E. G. C., Silva, M. O., de Moraes, P. B., Rosa, C. A., Pimenta, R. S., Nicoli, J. R. (2015). Use of probiotics to control aflatoxin production in peanut grains. *The Scientific World Journal*.
- Sommer, F., Bäckhed, F. (2013). The gut microbiota—masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology*, 11(4), 227.
- Sougioultzis, S., Simeonidis, S., Bhaskar, K. R., Chen, X., Anton, P. M., Keates, S., Kelly, C. P. (2006). *Saccharomyces boulardii* produces a soluble anti-inflammatory factor that inhibits NF- κ B-mediated IL-8 gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 343(1), 69-76.
- Souza, D., Cara, D., Cassali, G., Coutinho, S., Silveira, M., Andrade, S., Poole, S., Teixeira, M. (2000). Effects of the PAF receptor antagonist UK74505 on local and remote reperfusion injuries following ischaemia of the superior mesenteric artery in the rat. *British Journal of Pharmacology*, 131(8), 1800-1808.
- Sternini, C., Anselmi, L., Rozengurt, E. (2008). Enteroendocrine cells: a site of 'taste' in gastrointestinal chemosensing. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity*, 15(1), 73.
- Strachan, D. P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *British Medical Journal*, 299(6710), 1259.
- Strath, M., Warren, D. J., Sanderson, C. J. (1985). Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. *Journal of Immunological Methods*, 83(2), 209-215.
- Tham, E. H., Leung, D. Y. (2018). How Different Parts of the World Provide New Insights Into Food Allergy. *Allergy, Asthma & Immunology Research*, 10.
- Tiago, F. C. P., Martins, F. D. S., Souza, E. L. S., Pimenta, P. F. P., Araújo, H. R. C., 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. *Journal of Medical Microbiology*, 61(9), 1194-1207.
- Tiago, F. C. P., Porto, B. A. A., Ribeiro, N. S., Moreira, L. M. C., Arantes, R. M. E., Vieira, A. T., Teixeira, M. M., Generoso, S. V., Nascimento, V. N., Martins, F. S., Nicoli, J. R. (2015). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG A-905 in

- experimental model of inflammatory bowel disease. *Beneficial Microbes*, 6(6), 807-815.
- Vancamelbeke, M., Vermeire, S. (2017). The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 1-14.
- von Mutius, E. (2017). The shape of the microbiome in early life. *Nature Medicine*, 23(3), 274-275.
- Wei, Y., Yang, F., Wu, Q., Gao, J., Liu, W., Liu, C., Wang, Y. (2018). Protective effects of bifidobacterial strains against toxigenic *Clostridium difficile*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 888.
- Wirtz, S.; Neufert, C.; Weigmann, B.; Neurath, M. F. (2007). Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nature Protocols*, 2(3), 541-546.
- Wüthrich, B. (2014). History of Food Allergy. *History of Allergy*, 100, 109–119.
- Yu, W., Freeland, D. M. H., Nadeau, K. C. (2016). Food allergy: immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy. *Nature Reviews. Immunology*, 16(12), 751–765.
- Żbikowska-Gotz, M., Pałgan, K., Gawrońska-Ukleja, E., Kuźmiński, A., Przybyszewski, M., Socha, E., Bartuzi, Z. (2016). Expression of IL-17A concentration and effector functions of peripheral blood neutrophils in food allergy hypersensitivity patients. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 29(1), 90-98.
- Zhang, K., Hornef, M. W., Dupont, A. (2015). The intestinal epithelium as guardian of gut barrier integrity. *Cellular Microbiology*, 17(11), 1561-1569.
- Zuercher, A. W., Weiss, M., Holvoet, S., Moser, M., Moussu, H., Van Overtvelt, L., Singh, A. (2011). *Lactococcus lactis* NCC 2287 alleviates food allergic manifestations in sensitized mice by reducing IL-13 expression specifically in the ileum. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, 1-10.

8. ANEXOS

8.1 Certificado da Comissão de ÉTICA no Uso de Animais (CEUA)



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

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

CERTIFICATE

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

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

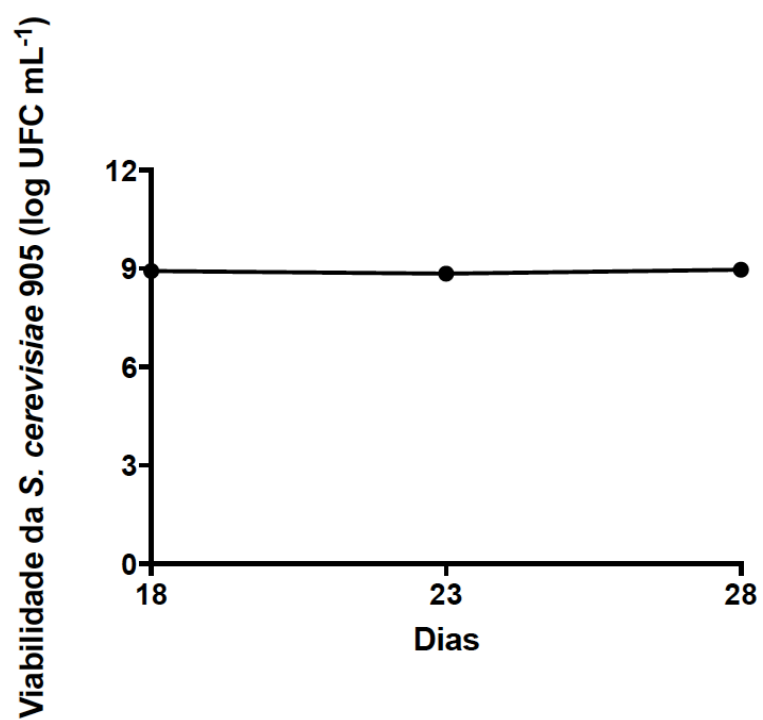
Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

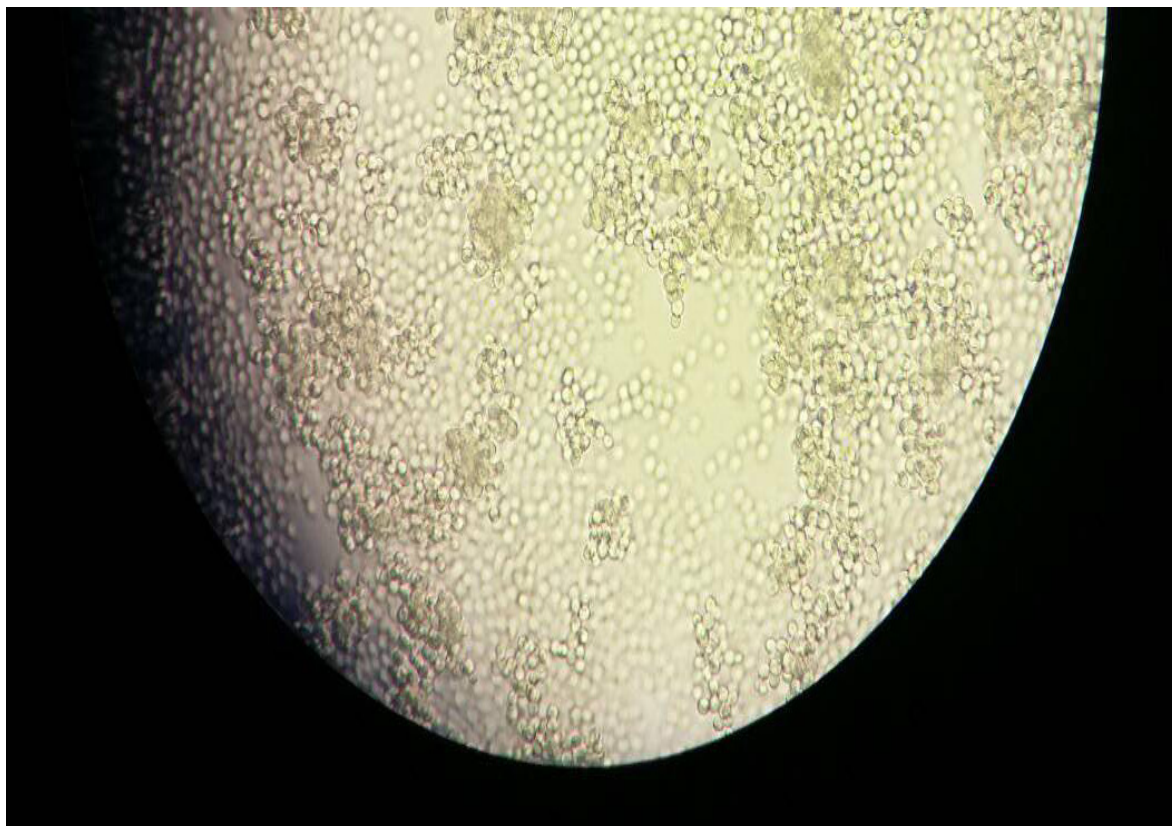
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

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

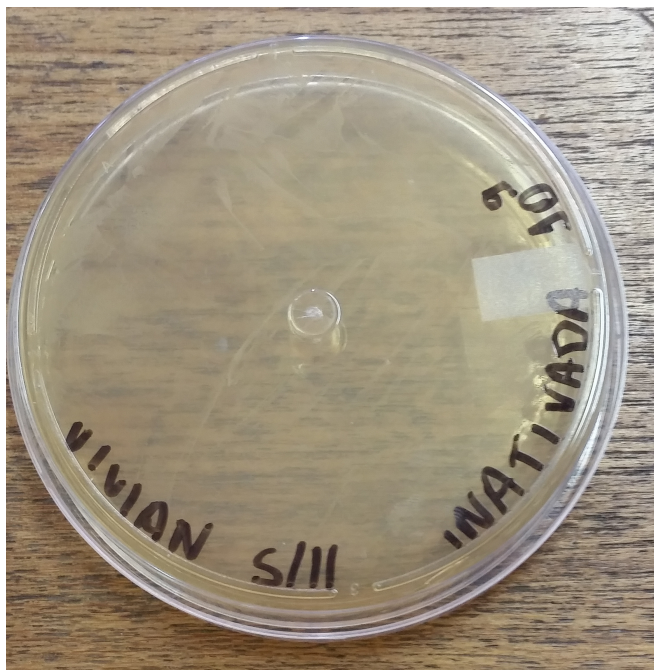
8.2 Viabilidade da levedura durante o período de tratamento



8.3 Fotografia da estrutura intacta da levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905 após processo de inativação pelo calor



8.4 Fotografia de uma placa com meio YPG contendo 0,1mL da levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905 inativada pelo calor na concentração de 10^9 UFC/mL



8.5 Produção científica durante o período de mestrado

8.5.1 Resumos publicados em anais científicos

- **Miranda, V.**, Santos, S.; Quintanilha, M.; Nicoli, J.; Cara, D.; Martins F. Evaluation of the probiotic effect of *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 in a murine model of food allergy. XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología, 2018, Santiago, Chile.
- **Miranda, V.** Immunological effect of *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 in an *in vivo* model of food allergy. IV International Symposium on Inflammatory Diseases 2018, Belo Horizonte, Brazil.
- **Miranda, V.**; Santos, S.; Assis, H.; Quintanilha, M.; Nicoli, J.; Cara, D.; Martins F. Efeito probiótico da levedura *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 em um modelo murino de alergia. V Simpósio de Microbiologia da UFMG, 2018, Belo Horizonte, Brasil
- Dias, B.; Pessoa, R.; Antunes, P.; Takenaka, T.; Vidigal, V.; **Miranda, V.**; Martins, F.; Cardoso, V.; Fernandes, S. Efeitos do extrato da *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlot na permeabilidade intestinal e translocação bacteriana em modelo murino de mucosite induzida por quimioterápicos. III Simpósio Nacional em Ciências Farmacêuticas, 2018, Belo Horizonte, Brasil.
- Morão, R.; **Miranda, V.** ; Souza, R. ; Dias, F. ; Macedo, V. ; Nicoli, J. ; Martins, F. Effect of oral treatment with *Saccharomyces cerevisiae* CNMI-3856 in animals challenged with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos, 2017, Campinas, Brasil.
- Quintanilha, M.; Morão, R.; **Miranda, V.**; Santos, S.; Trindade, L.; Nicoli, J.; Martins, F. Probiotic effect of *Bifidobacterium longum* 51^A on the development and severity of mucositis induced by chemotherapy in a murine model. XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología, 2018, Santiago, Chile.
- Costa, K.; Guimarães, G.; Mendes, I.; Costa, M.; Ribeiro, G.; **Miranda, V.**; Nicoli, J.; Neumann, E. Viability of microorganisms isolated from brazilian kefir grains after freeze drying. XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología, 2018, Santiago, Chile.