

Cláudia Caldeira Brant Hameau

**Efeito de dois probióticos, *Saccharomyces
boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae* linhagem
UFMG 905, na alergia alimentar experimental em
camundongos**

**Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Cláudia Caldeira Brant Hameau

**Efeito de dois probióticos, *Saccharomyces
boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae* linhagem
UFMG 905, na alergia alimentar experimental em
camundongos**

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Biologia Celular do
Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais
como requisito para obtenção do título de
Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Denise Carmona Cara Machado
Departamento de Patologia Geral - ICB – UFMG
Co-orientador:
Prof Dr Jacques Robert Nicoli
Colaborador: Dr Flaviano Martins
Departamento de Microbiologia - ICB – UFMG
Belo Horizonte
2008

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Neuro Imuno Patologia Experimental (NIPE) do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Contamos com apoio financeiro da CAPES, FAPEMIG e CNPq.

“A confiança é a forma mais elevada de motivação humana. Ela traz à tona o que há de melhor nos seres humanos. Mas exige tempo e paciência, e não elimina a necessidade de treinar e aprimorar as pessoas, de forma que sua competência possa fazer jus à confiança depositada”. Stephen R. Covey.

Dedico este trabalho à minha mãe Maria Lúcia por ter me apoiado e me incentivado, possibilitando que eu chegasse até aqui. Ao Fred e à Julia pelo amor, companheirismo, paciência, carinho e apoio constante.
Amo muito vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre esteve ao meu lado me guiando, iluminando meu caminho e principalmente, mostrando que é preciso ter muita fé para chegar até aqui.

Aos meus pais, Antônio Cosme (*in memoriam*) e Maria Lúcia que me amam, acreditam em mim e me abençoam com o melhor amor do mundo o amor dos pais. Tudo o que sou hoje devo a vocês.

Ao Fred meu amor, marido, companheiro e amigo, por ser esta pessoa maravilhosa e paciente e que sempre me incentivou a estudar e lutar pelos meus ideais.

À minha filhinha Juju, que desde a graduação já fazia parte dessa vida maluca de estudos, obrigada meu amorzinho por ser assim tão pequenina e tão esperta. Você é a pessoinha mais importante que tenho na vida.

Ao meu irmão Gustavo pela paciência e preocupação em saber se estou bem e feliz. A minha irmã Dulcinéia que mesmo estando longe sempre me colocou em suas orações e me ensinou muito sobre o amor de família e amizade.

A minha madrinha Diva e Dindinha pelas orações e carinho.

Aos meus amigos, Felipe, Manu, Alysson, Zanatta que sempre estiveram por perto, nas horas difíceis e alegres, obrigada por tudo.

A Luciana minha irmãzinha de coração pela grande amizade de vários anos, pela sinceridade, e por ser assim louquinha, mas muito especial.

Ao meu grande amigo Breno e irmãozinho que desde que nasci o conheço e sempre me acompanhou, uma amizade pra vida toda.

À minha orientadora Denise, que me recebeu em seu laboratório e, desde 2002, vem me orientando, sempre mostrando o melhor caminho a seguir, pela confiança depositada no meu trabalho e pelos ensinamentos.

Ao professor Jacques Robert Nicoli, pelo apoio e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa, por ter-nos cedido a levedura *S. cerevisiae* linhagem UFMG 905.

Ao Laboratório MERCK, Rio de Janeiro, RJ, Brasil (Floratil®) por ter-nos cedido a levedura *S. boulardii*.

Ao Flaviano Martins que me ensinou muito sobre o meu trabalho, pela disponibilidade constante, pela educação, pela simplicidade e sabedoria.

A minha amiga e irmã Luana que sempre me ajudou e esteve do meu lado em todos os momentos sendo eles difíceis ou não. Pela amizade sincera, pela paciência, pelo ombro amigo nas horas em que precisei chorar, pelas risadas nas horas alegres, pelos “puxões de orelha”, pelas confidências e por ser assim especial maravilhosa e pura de coração.

A Mary, minha mãezinha do NIPE, pelos ensinamentos, pelas horas me ajudando no trabalho, a escrever e a decidir, por me aconselhar no que dizer e como dizer, pela amizade e pelo amor de mãe.

A Sandroca, minha amiga, minha imagem no espelho, que sabe muito bem o que se passa no meu coração e na minha mente. Agradeço muito pela amizade sincera.

À Mirna, pela amizade, pelo apoio técnico, pela ajuda nos experimentos, pelos ensinamentos, enfim, por tudo.

À Martinha, por todos os momentos de alegria e distração, pelos ensinamentos.

À Maria Letícia, Luiza, Vinícius, Thales, Olívia pela amizade e pelo companheirismo.

Aos colegas do laboratório que estão presentes e pelos que já se foram, pela convivência, pelos sorrisos e pela disponibilidade em ajudar: Ferdinan, Vanessa, Wanderson, Belinha, Carol, Sílvia Cangussu, Camila, Ana Luiza, Isabel. E principalmente Eliane que sempre me ajudou e me aconselhou em vários momentos de minha vida.

Ao professor Wagner e à professora Rosa, pelo ótimo convívio.

À Olinda, Vânia e Jaqueline pela disposição em ajudar sempre.

À Regina pela amizade e carinho.

A todos os meus colegas da graduação que estão presentes, cada um à sua maneira. Em especial a Ariadna e Aninha pela amizade.

Em especial, agradeço ao meu amigo e irmão Renan, meu braço direito, companheiro de estudos e decisões importantes e principalmente pelo carinho e dedicação.

A todos os colegas da Biologia Celular: em especial a Flavinha e Solange.

A Iraídes pela amizade, pelas ajudas com tudo o que precisei, pelo carinho.

Aos órgãos financiadores desse projeto: CAPES, CNPq, FAPEMIG.

À Universidade Federal de Minas Gerais por ter me tornado uma pessoa mais completa.

SUMÁRIO

	Pág
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
1.1 Mucosa intestinal	3
1.2 Absorção de antígenos da dieta pela mucosa	7
1.3 Alergia alimentar	8
1.4 Mecanismo envolvido na alergia alimentar	9
1.5 Probióticos	13
1.6 A levedura <i>Saccharomyces boulardii</i>	17
1.7 A levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> linhagem UFMG 905	20
2. OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Animais	23
3.2 Leveduras	24
3.3 Sensibilização, Tratamento e Desafio Alergênico	25
3.3.1 Sensibilização	25
3.3.2 Tratamento	25
3.3.3 Desafio alergênico	26
3.4 Desenho experimental	26
3.5 Avaliação do peso corpóreo	26
3.6 Obtenção do Soro e Dosagem sérica dos anticorpos IgE anti-ovalbumina	27

3.6.1 Obtenção do soro	27
3.6.2 Dosagem sérica dos anticorpos IgE anti-ovalbumina	27
3.7 Histologia	28
3.7.1 Avaliação da presença de muco intestinal	28
3.7.2 Avaliação do número de eosinófilos	28
3.7.3 Avaliação do número de mastócitos	29
3.8 Análises Estatística	29
4. RESULTADOS	30
4.1 Avaliação da perda de peso corpóreo	30
4.2 Avaliação dos níveis séricos de anticorpos anti-OVA após o desafio antigênico	36
4.3 Produção de muco pelas células caliciformes do intestino delgado	41
4.4 Infiltrado de eosinófilos na mucosa intestinal	47
4.5 Avaliação do número de mastócitos	53
5. DISCUSSÃO	59
6. CONCLUSÕES	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1 - Anatomia da mucosa GI.	4
Figura 2 - Avaliação do peso corpóreo de camundongos não tratados.	31
Figura 3 - Avaliação do peso corpóreo de camundongos tratados com <i>S. cerevisiae</i> 905 2×10^3 , 2×10^5 UFC/mL.	32
Figura 4 - Avaliação do peso corpóreo de camundongos tratados com <i>S. cerevisiae</i> 905 2×10^7 , 2×10^8 UFC/mL.	33
Figura 5 - Avaliação o peso corpóreo de camundongos tratados com <i>S. boulardi</i> 2×10^7 , 2×10^8 UFC/mL.	34
Figura 6 - Avaliação histológica (coloração HE) de jejuno proximal de camundongos BALB/c.	35
Figura 7 - Avaliação dos anticorpos IgE anti-OVA após o desafio com ração contendo OVA (não tratados).	37
Figura 8 – Avaliação dos anticorpos IgE anti-OVA após o desafio com ração contendo OVA tratados com <i>S. cerevisiae</i> 905 2×10^3 , 2×10^5 UFC/mL.	38
Figura 9 – Avaliação dos anticorpos IgE anti-OVA após o desafio com ração contendo OVA tratados com <i>S. cerevisiae</i> 905 2×10^7 , 2×10^9 UFC/mL.	39
Figura 10 – Avaliação dos anticorpos IgE anti-OVA após o desafio com ração contendo OVA tratados com <i>S. boulardii</i> 905 2×10^7 , 2×10^8 UFC/mL.	40
Figura 11 - Avaliação do muco produzido pelas células caliciformes do jejuno proximal (não tratados).	42
Figura 12- Avaliação do muco produzido pelas células caliciformes do jejuno proximal tratados com <i>S. cerevisiae</i> 905 2×10^7 , 2×10^8 UFC/mL.	43
Figura 13 - Avaliação do muco produzido pelas células caliciformes do jejuno proximal tratados com <i>S. cerevisiae</i> 905 2×10^3 , 2×10^5 UFC/mL.	44
Figura 14 - Avaliação do muco produzido pelas células caliciformes do jejuno proximal tratados com <i>S. boulardii</i> 2×10^7 , 2×10^8 UFC/mL.	45
Figura 15 - Avaliação histológica do muco produzido no jejuno proximal de camundongos BALB/c.	46
Figura 16 - Infiltrado de eosinófilos na mucosa intestinal (não tratados).	48
Figura 17 - Infiltrado de eosinófilos na mucosa intestinal tratados com <i>S. cerevisiae</i> 905 2×10^3 , 2×10^5 UFC/mL]).	49

Figura 18 – Infiltrado de eosinófilos na mucosa intestinal tratados com <i>S. cerevisiae</i> 905 2×10^7 , 2×10^8 UFC/mL.	50
Figura 19 - Infiltrado de eosinófilos na mucosa intestinal tratados com <i>S. boulardii</i> 2×10^7 , 2×10^8 UFC/mL]).	51
Figura 20 - Avaliação histológica do infiltrado de eosinófilos no jejuno proximal de camundongos BALB/c.	52
Figura 21 - Infiltrado de mastócitos na mucosa intestinal (não tratados).	54
Figura 22 – Infiltrado de mastócitos na mucosa intestinal tratados com (<i>S. cerevisiae</i> 905 2×10^7 , 2×10^8 UFC/mL]).	55
Figura 23 - Infiltrado de mastócitos na mucosa intestinal tratados com <i>S. cerevisiae</i> 905 2×10^3 , 2×10^5 UFC/mL.	56
Figura 24 - Infiltrado de mastócitos na mucosa intestinal tratados com <i>S. boulardii</i> 2×10^7 , 2×10^8 UFC/mL.	57
Figura 25 – Avaliação histológica do infiltrado de mastócitos no jejuno proximal de camundongos BALB/c.	58

LISTA DE TABELAS

	Pág
Quadro 1: <i>Receita Padrão para Roedores Baseada na AING93</i>	24
Quadro 2: Desenho experimental	26

LISTAS DE ABREVIATURAS

GI = gastrointestinal

GALT = *Gut associated lymphoid tissue*

M cell = células M

DC = células dendríticas

SED = cúpula subepitelial

Th = células T *helper*

Tr = célula T reguladora

IEL = linfócitos intraepiteliais

MC = mastócitos

EOS = eosinófilos

FAE = epitélio associado ao folículo

MadCam = *Mucosal vascular addressin cell adhesion molecule*

Ig = imunoglobulina

TGF- β = *tumor growth factor- β*

IL = interleucina

MHC = complexo de histocompatibilidade principal

TCR = receptor clonal de linfócitos T

APC = célula apresentadora de antígeno

Fc ϵ RI = receptor de alta afinidade

PAF = fator ativador de plaquetas

TNF = fator de necrose tumoral

MIP = *macrophage inflammatory protein*

GM-CSF = *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*

FAO/WHO = Food and Agricultural Organization / World Health Organization

UFC = unidade formadora de colônia

BAL = bactérias do ácido láctico

SCID = *immunoincompetent syngenic severe combined immunodeficiency*

FDA = Food and Drug Administration

SC= subcutânea

IG= intra-gástrica

OVA = ovalbumina

SCO = Solução de clara de ovo a 20%

Al(OH)₃ = Hidróxido de alumínio

ELISA = *Enzyme linked immunosorbent assay*

PBS = Salina tamponada com fosfato

H_2O_2 = Peróxido de hidrogênio

OPD = Ortofenileno-diamino

H_2SO_4 = Ácido sulfúrico

UA = unidades arbitrárias

PAS = *Periodic acid Schiff*

HE = Hematoxilina-eosina

RESUMO

A incidência de doenças alérgicas tem emergido como um importante problema de saúde no mundo ocidental devido à gravidade das reações e a um aumento dramático através das décadas. A alergia alimentar é uma reação de hipersensibilidade imediata mediada por IgE que ocorre após a ingestão de determinados alimentos por indivíduos previamente sensibilizados. As citocinas produzidas pelas células Th2 (IL-4, IL-13, IL-10 e IL-5) têm participação importante no desencadeamento da reação alérgica, enquanto as citocinas de perfil Th1 inibem as repostas alérgicas. Nosso grupo de pesquisa desenvolveu um modelo animal para o estudo da alergia alimentar à ovalbumina. Nesse modelo, camundongos são sensibilizados com ovalbumina (OVA) e desafiados com uma solução de clara de ovo a 20% (SCO). Um dos sintomas apresentados pelos animais é a perda de peso corpóreo após o desafio oral que persiste até o fim do experimento. A privação do consumo do alimento causador dos sintomas da alergia alimentar é um dos principais tratamentos correntes e mais baratos. Atualmente, grupos de pesquisa vêm desenvolvendo estudos experimentais utilizando probióticos, que são definidos como microorganismos viáveis que exibem um efeito benéfico na saúde do hospedeiro, visando propor o uso de probióticos como alternativa no tratamento da alergia alimentar. No presente trabalho foi demonstrado que os animais sensibilizados com OVA perderam peso corpóreo após ingestão de dieta contendo OVA na primeira semana de desafio oral. A partir da segunda semana de desafio, camundongos sensibilizados e tratados com *S. cerevisiae* 905 dose de 2×10^3 UFC/mL recuperaram o peso corpóreo em torno de 97%. Ao final da sexta semana, camundongos sensibilizados e desafiados com OVA apresentaram: aumento nos níveis séricos de IgE anti-OVA, aumento da produção de muco pelas células intestinais, aumento do infiltrado de eosinófilos na mucosa intestinal e aumento do número de mastócitos na submucosa. Os níveis séricos de IgE foram menores quando camundongos foram tratados com *S. cerevisiae* 905 dose de 2×10^5 e 2×10^8 UFC/mL. Os tratamentos com *S. boulardii* ou com *S. cerevisiae* 905, ambos na dose de 2×10^8 UFC/mL foram capazes de reduzir a produção de muco. Também, nas doses de 2×10^3 UFC/mL de *S. cerevisiae* 905 e de 2×10^8 UFC/mL de *S. boulardii* observou-se redução do número de eosinófilos infiltrados na mucosa intestinal. Esses resultados demonstram que o tratamento com os probióticos apresentam efeitos positivos na alergia alimentar experimental. Os mecanismos pelos quais eles agem devem ser investigados.

ABSTRACT

Allergic disease has become an important health problem due to severe reactions and a dramatic incidence increase over the past decades. Food allergy is an adverse immunological IgE-mediated reaction that occurs after ingestion of specific antigens by previously sensitized individuals. Typically, Th2 cells produce a cytokine cocktail including IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13 that, among other actions, are responsible for the allergic reaction, while the cytokines produced by Th1 cells inhibit this reaction. Our laboratory has developed an ovalbumin (OVA)-induced allergy mice model. Mice are sensitized with OVA and challenged with an egg white solution (20%). A common symptom presented in this model is body weight loss reaching up to 20% that persists while the egg white solution is administered. Restriction of the food that may be responsible to generate allergy is currently widely used and probably the cheapest treatment. In this study, OVA-sensitized mice ingested diet containing OVA as a source of protein, and were treated or not with different doses of *S. cerevisiae* UFMG 905 and *S. boulardii* in order to evaluate whether these probiotics were able to modulate allergic response. After one week of oral challenge, mice lost weight. After the second week, animals treated with *S. cerevisiae* 905 2×10^3 UFC/mL recovered 97% of their weight. After six weeks of OVA ingestion, OVA-sensitized mice showed high levels of anti-OVA IgE, increased production of mucus in the epithelial intestine mucosa, increased number of eosinophils in the mucosa and mast cells in the submucosa. There was reduction of IgE production in *S. cerevisiae* 905 treated mice 2×10^5 and 10^8 UFC/mL. Furthermore, mucus production was reduced in mice treated with *S. boulardii* or *S. cerevisiae* 2×10^8 UFC/mL and eosinophil infiltrate was reduced when *S. cerevisiae* 905 2×10^3 UFC/mL or *S. boulardii* 2×10^8 UFC/mL were administered. These results suggest that probiotics can be a good treatment for food allergy. The mechanisms involved in these responses remain to be studied.

1. Introdução

1.1. Mucosa intestinal

A superfície mucosa do trato gastrointestinal (GI) é a maior superfície corporal em contato com o meio externo (200 a 300 m²) do ser humano. A mucosa intestinal representa um ecossistema complexo que combina epitélio GI, células do sistema imune e microbiota residente (MCCRACKEN & LORENZ, 2001).

O trato GI está constantemente exposto a uma carga antigênica dominante caracterizada por bactérias comensais e antígenos da dieta, sendo necessária uma barreira para evitar que haja lesão ou estimulação constante. É criada então pelo epitélio intestinal uma barreira física e química (WERSHIL *et al.*, 2008; LIEVIN-LE MOAL & SERVIN, 2006).

Uma das principais funções do epitélio intestinal é a absorção de nutrientes. As células do epitélio podem agir também como células apresentadoras de antígenos, que reconhecem e respondem a antígenos bacterianos e virais produzindo citocinas e quimiocinas influenciando as respostas imunes (DAHAN *et al.*, 2007). Além disso, podem induzir a expansão de células T no intestino (ALLEZ *et al.*, 2002).

A superfície do intestino é delineada por um epitélio simples colunar que forma diversas invaginações ou criptas, que são embebidas no tecido conectivo. As células epiteliais intestinais formam uma barreira física que protege o hospedeiro contra uma infecção patogênica (LOUVARD *et al.*, 1992; KEDINGER *et al.*, 1998; MONTGOMERY *et al.*, 1999). Além disso, secretam diversas substâncias como muco, defensinas e substâncias antimicrobianas, que inibem o crescimento bacteriano e protegem o epitélio de agressões por esses patógenos (MAGNUSSON & STJERNSTROM, 1982; OUELLETTE, 1999). Somado a isso, a mucosa intestinal possui estruturas linfóides que, em conjunto, formam o “Gut associated lymphoid tissue” (GALT). Os componentes celulares do GALT estão localizados em microambientes, como as placas de Peyer e os linfonodos mesentéricos. As células imunes do GALT consistem de linfócitos T e B e células dendríticas com características fenotípicas diferentes. Também possui tipos únicos de células incluindo as células M, as células de Paneth e linfócitos intraepiteliais (MOWAT *et al.*, 2003) (Figura 1).

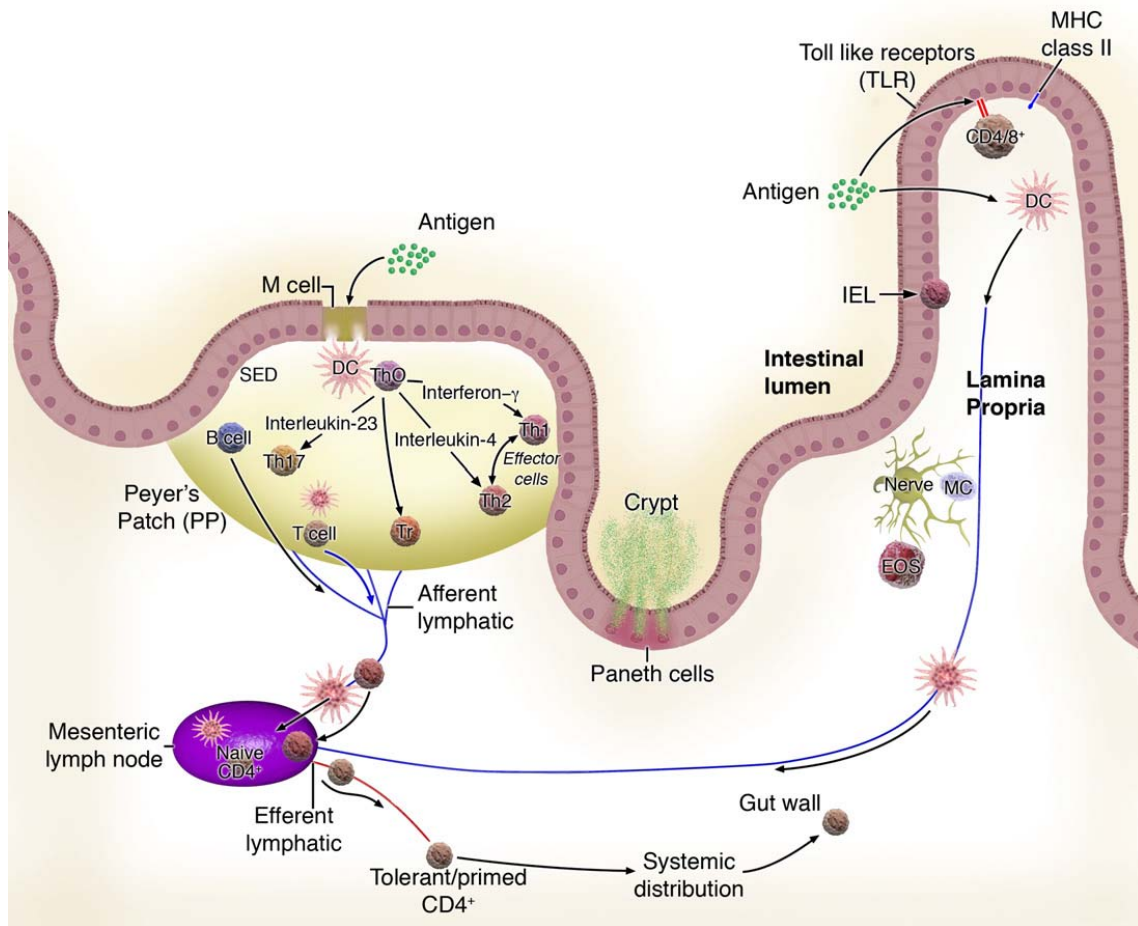


Figura 1: Anatomia da mucosa GI. Os antígenos podem atravessar o epitélio através das células M (M cell) ou células dendríticas (DC). A cúpula subepitelial (SED) é ocupada por linfócitos incluindo células T helper 0 (Th0) que sob ação de citocinas diferenciam-se em células Th1, Th2, T reguladora (Tr) ou Th17. Populações adicionais de linfócitos incluem os linfócitos intraepiteliais (IEL) que residem de forma justaposta às células do epitélio intestinal. Outras células residentes na lâmina própria que participam da resposta imune são os mastócitos (MC) e os eosinófilos (EOS) (WERSHIL *et al.*, 2008).

As placas de Peyer são estruturas agregadas linfóides compostas por um vasto folículo de células B, uma região interfolicular constituída de células T, numerosos macrófagos e células dendríticas. Essa área linfóide é recoberta por uma camada de células colunares chamadas de epitélio associado ao folículo (FAE) (FU *et al.*, 1999). Atravessando esse epitélio, estão as células M derivadas de enterócitos (DEBARD *et al.*, 2001). Essas células se diferem das células absortivas do epitélio pela ausência de microvilos e enzimas hidrolíticas associadas à membrana e por apresentarem um glicocálice reduzido (MILLER *et al.*, 2007). A principal função das células M é o transporte transepitelial vesicular, diretamente do lúmen para os tecidos linfóides subepiteliais, de partículas protéicas, bactérias, vírus e partículas não infecciosas (MILLER *et al.*, 2007; NEUTRA *et al.*, 2001). Vários organismos patogênicos utilizam as células M como via de entrada para infecção, mas as células M também transportam bactérias comensais. Esse parece ser um mecanismo de equilibrar respostas imunes à microbiota endógena. Além desse tecido linfóide organizado, logo abaixo das células M e do epitélio associado ao folículo está situada a cúpula subepitelial, uma área que é rica em linfócitos T e B e células dendríticas (NEUTRA *et al.*, 2001).

Os linfócitos T e B ativados migram das placas de Peyer para os linfonodos mesentéricos e desses trafegam para o ducto torácico, chegando à circulação sangüínea. Da circulação, os linfócitos ativados retornam à mucosa intestinal pelas vênulas de endotélio alto e passam a residir na lâmina própria. Esses vasos da mucosa intestinal e de outras mucosas (respiratória, reprodutiva e mama em lactação) expressam a adressina de mucosa (MadCAM-1) que se liga à integrina $\alpha 4\beta 7$ presente na superfície dos linfócitos. Essa ligação possibilita o retorno dos linfócitos às mucosas. Dessa forma, uma resposta imune iniciada por contato com antígenos em um número limitado de placas de Peyer pode ser disseminada sistemicamente (SAMPSON, 1999; EIGENMANN, 2002).

As células dendríticas dentro da cúpula subepitelial são capazes de migrarem dentro das placas de Peyer, adquirirem o antígeno na superfície lateral das células M e então mover-se para a área interfolicular de células T presumivelmente para a apresentação de antígenos. Migram para sítios distantes como os linfonodos mesentéricos e mesmo para a lâmina própria do intestino, atuando na resposta imune (BILSBOROUGH & VINEY, 2004).

As placas de Peyer são também o maior sítio de desenvolvimento de células B produtoras de imunoglobulina A (IgA). Isso ocorre devido à influência de sinais provenientes

de células dendríticas, células T e da produção local de citocinas incluindo tumor growth factor- β (TGF- β) e interleucina-10 (IL-10) (FAGARASAN & HONJO, 2003). Nos seres humanos, pelo menos 80% dos plasmócitos estão localizados na lâmina própria do intestino e juntos produzem 40-60 mg/kg/dia de IgA. Esse número excede várias vezes o número de células secretando imunoglobulinas de todos os outros órgãos linfóides juntos (van der HEIJDEN *et al.*, 1987). A IgA produzida no intestino é polimérica existindo como dímeros ligados por um polipeptídeo chamado cadeia J. A IgA dimérica é secretada na lâmina própria podendo se ligar ou formar um complexo covalente com um receptor de imunoglobulina polimérico expresso na célula epitelial intestinal no lado basolateral. Esse complexo é então transportado ativamente através da célula epitelial até a superfície apical. Por ação de clivagem proteolítica, a IgA dimérica é desligada do receptor de imunoglobulina polimérico gerando o componente secretório que permanece ligado à IgA dimérica que ao entrar no lúmen, o protege da degradação (WERSHIL *et al.*, 2008). A IgA secretória atua prevenindo a penetração de antígenos luminiais, microorganismos e outras proteínas estranhas presentes na superfície intestinal, neutralizando toxinas e organismos infecciosos (MESTECKY *et al.*, 1999). Em recém nascidos, as enzimas digestivas não são completamente ativas e a formação de IgA secretória não é ainda estabelecida até os quatro anos de idade. Isso leva a uma maior absorção de proteínas não digeridas causando o desencadeamento de uma resposta imune aos componentes da dieta (MAYER, 2003).

Outras células presentes na lâmina própria são os mastócitos e os eosinófilos. Os mastócitos são abundantes no trato gastrointestinal dos seres humanos e embora importantes na resposta do hospedeiro a infecções por parasitas, eles também podem participar da resposta imune inata a bactérias que rompem a barreira epitelial (MARSHALL, 2004). Os eosinófilos residem na lâmina própria do estômago, intestino delgado e grosso, em parte devido à expressão constitutiva de eotaxina-1 nesses locais, auxiliando em funções efetoras importantes como, por exemplo, infecções por parasitas e respostas alérgicas. São também essenciais para uma homeostase normal no intestino (ROTHENBERG *et al.*, 2006).

Os linfócitos intraepiteliais são notáveis tipos de linfócitos na mucosa. Esses linfócitos residem no epitélio intestinal sobre a membrana basal e entre células epiteliais adjacentes. O desenvolvimento desses linfócitos é independente de apresentação de antígenos pelo complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I e II e tem um

repertório do receptor clonal de linfócitos T (TCR) predominantemente oligoclonal (CHEROUTRE, 2004). Exercem um papel na manutenção da homeostase normal do epitélio intestinal e estão envolvidos em respostas protetoras contra patógenos (CHEN *et al.*, 2002).

As células de Paneth representam um tipo único de célula encontrada no trato intestinal que participa da imunidade inata. Estão localizadas na base das criptas de Lieberkuhn no intestino delgado, contêm uma variedade de peptídeos antimicrobianos predominantemente α -defensinas, mas também lisozimas e fosfolipase A₂. A importância dessas células na imunidade inata foi demonstrada em camundongos deficientes em células de Paneth, ocasionando a incapacidade de produzir α -defensinas maduras. Como resultado, esses camundongos eram mais sensíveis à administração oral de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sovarar Typhimurium do que os camundongos selvagens (WERSHIL *et al.*, 2008).

1.2 Absorção de antígenos da dieta pela mucosa

O trato gastrointestinal é exposto diariamente a uma enorme quantidade de antígenos do ambiente, incluindo proteínas da dieta, materiais transportados pelo ar e micróbios comensais. Os organismos invasivos e antígenos inofensivos devem ser discriminados e pode ser iniciada uma resposta imune ativa, evitando a disseminação de infecções. Concomitantemente ocorre uma resposta imunológica tolerante local e sistêmica. Além disso, o trato GI tem que simultaneamente identificar componentes da alimentação (proteínas, lipídios, carboidratos e micronutrientes como minerais e vitaminas), promover a digestão, a modificação e absorção de nutrientes e dessa forma, exercer um papel na regulação homeostática e manutenção dessas funções (MOWAT *et al.*, 2003; van WIJK *et al.*, 2007).

O tecido linfóide associado ao trato GI possui todas as células e moléculas responsáveis pelo desenvolvimento de uma resposta imune, seja ela ativa ou tolerante (MOWAT *et al.*, 2003; van WIJK *et al.*, 2007).

Na maioria dos indivíduos, a ingestão de antígenos da dieta leva ao desenvolvimento de uma supressão da reatividade imunológica sistêmica, denominada tolerância oral. A tolerância oral é definida como uma supressão das respostas imunes

humoral e ou celular a um determinado antígeno que tenha sido administrado previamente por via oral. O contato com a maior parte de antígenos estranhos ao corpo ocorre via superfícies mucosas, como por exemplo, a mucosa intestinal, onde a indução da tolerância a bactérias comensais e proteínas da dieta representa o principal evento imunológico em condições fisiológicas (FARIA & WEINER, 2006).

Uma das conseqüências da ausência do estado de tolerância oral ou falha na indução da tolerância oral pode resultar no desenvolvimento da alergia alimentar.

1.3 Alergia alimentar

Apesar da extensa variedade de antígenos da dieta a que somos expostos diariamente, somente uma pequena percentagem da população tem reações imunológicas adversas aos alimentos. A alergia alimentar tem emergido como o principal problema de saúde no mundo ocidental devido à gravidade das reações e a um aumento dramático através das décadas (BOCK, 1987; YAZDANBAKHSI *et al.*, 2002).

A alergia alimentar, em particular, é uma condição patológica que afeta 6-8% das crianças menores de três anos e aproximadamente 2% da população adulta no mundo industrializado (SCHÖLL *et al.*, 2005).

A alergia alimentar pode ser dividida em reações mediadas por imunoglobulina E (IgE) ou não mediadas por IgE. As alergias alimentares mediadas por IgE (também referidas como alergia alimentar do tipo 1) representam a maioria das reações alérgicas. São caracterizadas pela presença de anticorpos IgE antígeno-específicos no soro (WIJK & KNIPPELS, 2007).

Os antígenos que provocam as reações alérgicas, também chamados de alérgenos, são em geral proteínas ambientais comuns (HELM & BURKS, 2000). A maioria dos indivíduos em contato com esses antígenos não produz IgE específica nem desenvolve reações potencialmente lesivas. No entanto, essas reações podem se desenvolver em pessoas geneticamente susceptíveis quando as barreiras fisiológicas são rompidas (SAMPSON, 1999).

Relativamente, poucos alimentos são responsáveis pela grande maioria das reações alérgicas. Esses alimentos incluem leite, ovo, amendoim, castanhas, peixes e frutos do mar. Alergias a ovos e leite de vaca são observadas com maior frequência em crianças,

enquanto frutos do mar e amendoim são as causas mais comuns de alergia em adultos (SEIBOLD, 2005). Os alimentos que causam reações imunológicas têm macromoléculas com propriedades comuns: baixo peso molecular, glicosilação e alta solubilidade em fluidos corporais. Essas características estruturais provavelmente protegem os antígenos da desnaturação, da degradação no trato gastrointestinal e permitem sua absorção intacta. Entretanto, não se sabe por que alguns alimentos são mais alergênicos que outros (HELM *et al.*, 2002; BRADLEY, 1997).

A alergia alimentar é a manifestação de uma resposta imune anormal aos antígenos introduzidos no organismo por via oral (MAYER, 2003). Em indivíduos com sensibilidade a essas substâncias, um grupo de distúrbios é desencadeado após a ingestão de determinados alimentos. Nesses indivíduos atópicos, a alergia está relacionada com a presença no soro de anticorpos específicos para antígenos alimentares (SICHERER, 2002).

As reações alérgicas alimentares dependentes de IgE podem afetar um ou mais órgãos: a pele (urticária), o trato respiratório (rinite e asma), o trato gastrointestinal (dor e diarreia) e o sistema cardiovascular (choque anafilático). Essas reações podem ser desencadeadas por exposição direta do órgão envolvido ou por distribuição sistêmica das proteínas após ingestão. Exemplos de reações por exposição direta são as reações gastrointestinais isoladas após alimentação, asma e rinite após inalação e urticária após contato local. Já a reação sistêmica mediada por IgE é denominada anafilaxia e é constituída por reações alérgicas graves e potencialmente fatais (SICHERER, 2002).

1.4 Mecanismo envolvido na alergia alimentar

Nos casos em que há diminuição das barreiras imunológicas e não imunológicas da mucosa digestiva, ocorre uma absorção exacerbada de moléculas da dieta que interagem com células apresentadoras de antígeno. Uma vez processadas por essas células, ocorre a apresentação dos antígenos provenientes dessas moléculas para linfócitos T helper (Th). Essa fase inicial leva à proliferação dos linfócitos T e à síntese de citocinas. Essa síntese leva à promoção de uma resposta característica de linfócitos Th2 (SAMPSON, 1999).

A apresentação de antígenos alergênicos da dieta pelas células dendríticas leva ao desenvolvimento de células efectoras T CD4⁺ do tipo Th2. Sob estímulo, as células efectoras T CD4⁺ liberam citocinas do tipo Th2 que são as interleucinas (IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13),

levando a uma formação de IgE antígeno-específica, maturação e ativação de mastócitos e eosinófilos, tornando o intestino propenso a uma resposta inflamatória alérgica (CHEHADE & MAYER, 2005).

Depois da ingestão, as proteínas dos alimentos atravessam a barreira do intestino e entram em contato com o sistema imune. Os fragmentos protéicos são processados pelas APCs e expõem moléculas em sua superfície associadas ao complexo de MHC de classe II que podem ser reconhecidas pelos receptores específicos das células T. Na presença da IL-4, a sensibilização é iniciada pela diferenciação de células T helper virgens antígeno-específico na célula efetora Th2. Tipicamente, as células Th2 produzem citocinas, incluindo IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, que através de outras ações estimulam linfócitos B a sofrerem a troca de isotipo da cadeia pesada, desenvolvendo plasmócitos produtores de IgE (WILLIAMS & BOCK, 1999; BACHARIER & GEHA, 2000). Essa imunoglobulina circula como um anticorpo bivalente e está presente normalmente no plasma, em concentrações abaixo de 1µg/mL. Em condições de atopia grave, esse nível pode aumentar para mais de 1.000µg/mL (SAMPSON, 1999).

Anticorpos IgE antígeno-específicos secretados são distribuídos sistematicamente e ligam-se ao receptor de alta afinidade FcεRI nos mastócitos e basófilos. Em uma segunda exposição, o antígeno realiza uma ligação cruzada (crosslinking) com anticorpos IgE da superfície dos mastócitos, provocando a sua degranulação e liberação de mediadores (como histamina, citocinas e proteases), o que leva a uma variedade de reações características da alergia. As reações anafiláticas ocorrem dentro de minutos até horas depois da ingestão do alimento (WILLIAMS & BOCK, 1999).

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

A ocorrência de diferentes sintomas após a reação alérgica alimentar é determinada por diferenças na quantidade de mediadores inflamatórios liberados no intestino, na taxa de absorção dos antígenos ingeridos e na distribuição de mastócitos ligados à IgE específica ao antígeno. Além disso, esses sintomas refletem as quantidades de anticorpos IgA e IgG capazes de neutralizar o antígeno antes que esse possa se ligar nas moléculas de IgE na

superfície dos mastócitos (FINKELMAN *et al.*, 2005).

As reações alérgicas são descritas como reações de hipersensibilidade imediata porque têm início rápido, em alguns minutos a partir do estímulo do antígeno (imediato) e trazem consequências patológicas significativas (FINKELMAN *et al.*, 2005). Em um indivíduo alérgico a um antígeno em particular, uma grande proporção da IgE ligada aos mastócitos é específica para esse antígeno. Portanto, a exposição ao antígeno permitirá ligação cruzada suficiente de moléculas de IgE para desencadear a ativação dos mastócitos (ABBAS, 2005). Essa ativação resultará na liberação de histamina, prostaglandina D_2 , fator ativador de plaquetas e outros mediadores que irão gerar muitas modificações locais responsáveis pelos sintomas imediatos da alergia alimentar (BINGHAM & AUSTEN, 2000).

A ligação da histamina ao endotélio provoca a contração celular, levando ao extravasamento do plasma para os tecidos. A histamina estimula as células endoteliais a sintetizarem relaxantes vasculares para as células dos músculos lisos, como a prostaciclina e o óxido nítrico, que provocam a vasodilatação. Além disso, a histamina também provoca constrição da musculatura lisa intestinal, podendo contribuir para o aumento da peristalse associado aos alérgenos ingeridos (AKDIS & BLASER, 2003).

A prostaglandina D_2 é um mediador lipídico derivado do ácido araquidônico e uma vez liberada, adere-se aos receptores nas células da musculatura lisa e atua como vasodilatador. Esse mediador também promove a quimiotaxia e o acúmulo de neutrófilos em sítios inflamatórios (BINGHAM & AUSTEN, 2000).

Outro tipo de mediador lipídico produzido pelos mastócitos é o fator ativador de plaquetas (PAF) que provoca retração das células endoteliais, além de ser capaz de relaxar a musculatura lisa vascular. O PAF também pode ser importante em reações tardias, pois pode ativar leucócitos. Entretanto, nessa situação, a principal fonte desse mediador pode ser representada pelos basófilos ou pelas células endoteliais vasculares (CHOI *et al.*, 2003).

Tanto no trato respiratório como no digestivo, ocorre a produção de muco, sendo esse evento mediado principalmente pela IL-4 e IL-13 (BLANCHARD *et al.*, 2004). No trato gastrointestinal, há um desequilíbrio eletrolítico com perda de íons e água, levando a um estado de diarreia e aumento da permeabilidade a macromoléculas (WASSERMAN, 1983; PLAUT, 1993).

A reação alérgica imediata é seguida por uma resposta de fase tardia que é causada pela liberação de leucotrienos, citocinas e quimiocinas pelos mastócitos ativados. Esses mediadores recrutam outros leucócitos, incluindo eosinófilos e linfócitos Th2 para o local de inflamação (LUKACS, 2001).

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

Os eosinófilos são granulócitos derivados da medula óssea que, em condições saudáveis, estão espalhados na lâmina própria da mucosa gástrica e intestinal. Entretanto, em pacientes com alergia alimentar, a distribuição, o número, a morfologia e também o comportamento funcional dessas células estão alterados (MISHRA *et al.*, 1999; SCHWAB *et al.*, 2003).

Em geral, os eosinófilos exercem funções de proteção no trato GI ou de danos ao epitélio. Como protetoras essas células estão envolvidas na resposta do hospedeiro a infecções por parasitas. Como malfeitoras, realizam respostas alérgeno-específicas mediadas por IL-5 e IL-13, pela liberação de grânulos que são tóxicos a uma variedade de tecidos, incluindo o epitélio intestinal (GLEICH *et al.*, 1979).

Os eosinófilos existem em abundância nos infiltrados inflamatórios de reações alérgicas tardias e contribuem para muitos dos processos patológicos envolvidos neste quadro (LUKACS, 2001). Sua maturação a partir de precursores mielóides é promovida pelo GM-CSF e pelas interleucinas IL-3 e IL-5 (ROTHENBERG *et al.*, 2001).

Os eosinófilos são recrutados para o tecido principalmente em resposta à produção local de eotaxina (FOSTER *et al.*, 2002). Camundongos deficientes em IL-5 ou eotaxina demonstram uma reação alérgica significativamente reduzida, apontando para um papel essencial destas citocinas na fase efetora da alergia alimentar (HOGAN *et al.*, 2000).

No local da lesão, sob o estímulo de citocinas e quimiocinas, os eosinófilos podem liberar citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e mediadores lipídicos. Essas moléculas podem induzir a produção de moléculas de adesão, o aumento da permeabilidade vascular

e a produção de muco (ROTHENBERG & HOGAN, 2006). Além disso, os eosinófilos agem como células apresentadoras de antígeno, promovendo a expansão de células Th2 em tecidos inflamados e amplificando diretamente a resposta imune dessas células (SHI, 2004).

Os eosinófilos podem ser facilmente ativados através dos receptores de IgE presentes em sua superfície. Portanto, pode-se especular que essas células contribuem para a reação alérgica pela ligação das moléculas alergênicas aos receptores de IgE (SCHWAB *et al.*, 2003; UNTERSMAYR & JENSEN-JAROLIM, 2006).

Nosso grupo desenvolveu um modelo de alergia alimentar onde a ingestão de clara de ovo por camundongos sensibilizados foi capaz de aumentar a produção de IgE e IgG1 anti-ovalbumina, gerar edema intestinal nas primeiras 24 horas e infiltrado de eosinófilos de 48 horas a 14 dias na mucosa intestinal. Esse quadro fundamentou esse modelo por reproduzir vários parâmetros encontrados na doença espontânea (SALDANHA *et al.*, 2004).

A privação do consumo do alimento causador dos sintomas da alergia alimentar é um dos principais tratamentos correntes e mais baratos. Atualmente, como alternativa grupos de pesquisa vêm desenvolvendo estudos experimentais com animais e em humanos utilizando probióticos para tratamento. Nesses estudos, os probióticos são administrados oralmente e são definidos como um suplemento alimentar composto de microorganismos vivos que afetam de forma benéfica o hospedeiro, melhorando o balanço da microbiota e aliviando a inflamação intestinal (FULLER, 1989).

1.5 Probióticos

A microbiota normal possui microorganismos com efeitos benéficos (*Bifidobacterium*, *Eubacterium* e *Lactobacillus*) e microorganismos com efeitos deletérios (*Clostridium* e *Veillonella*) para o hospedeiro (ROBERFROID, 2001). Nos últimos anos, vem aumentando o interesse no uso de microorganismos que exercem os efeitos benéficos com o propósito de beneficiar a saúde do hospedeiro e de prevenir ou tratar doenças. Esses organismos recebem o nome genérico de probióticos e vêm sendo propostos como medicamentos para prevenção e tratamento de um grande número de desordens gastrointestinais.

Relatos dos efeitos benéficos das bactérias na alimentação datam desde a versão Persa do Velho Testamento (Gênesis 18:8), que relata que “Abraão atribuiu sua

longevidade ao consumo de leite azedo”. Plínio, um historiador romano, em 76 a.C., recomendou o uso de leite fermentado para o tratamento de gastroenterites (TEITELBAUM & WALKER, 2002). O termo probiótico foi criado como um antônimo ao termo antibiótico e, originalmente, foi proposto por LILLEY & STILLWELL (1965), significando aquele que favorece o crescimento de microorganismos. Mais de 20 anos depois, FULLER (1989) definiu probiótico como “um suplemento microbiano vivo que afeta benéficamente o animal hospedeiro graças à melhoria no balanço microbiano intestinal”, embora, hoje, os probióticos já tenham, também, aplicações em outros ecossistemas (BENGMARK, 1998; REID, 2000). Essa definição pode ser estendida ao hospedeiro humano como “microorganismos não-patogênicos que, quando ingeridos, exercem uma influência positiva na saúde ou fisiologia do hospedeiro” (MARTEAU *et al.*, 2001) ou, como “uma preparação ou produto contendo microorganismos viáveis, em número suficiente, para alterar a microbiota em um compartimento do hospedeiro ou para exercer efeitos benéficos no hospedeiro” (SCHREZENMEIR & DE VRESE, 2001). Essa definição enfatiza que outros compartimentos do corpo podem ser alvos dos probióticos, além do intestino, onde uma alteração da microbiota pode exercer um efeito benéfico. Existem alguns trabalhos mostrando a eficácia dos probióticos nas infecções do trato urogenital (HALLEN *et al.*, 1992; HILTON *et al.*, 1992; REID & BRUCE, 1995; PARENT *et al.*, 1996; ASAHARA *et al.*, 2001; REID, 2001; REID *et al.*, 2001), nas infecções causadas pelo *Helicobacter pylori* (KABIR *et al.*, 1997), infecções na boca e dentes (BAYONA GONZALES *et al.*, 1990; BUSSCHER *et al.*, 1999), infecções do trato respiratório (CANGEMI DE GUTIERREZ *et al.*, 2000; GRANGETTE *et al.*, 2001). No trato gastrointestinal melhoram as barreiras imunológicas, diminuem as respostas inflamatórias e reduzem a produção de citocinas pro-inflamatórias características da inflamação local e sistêmica ocasionados por processos alérgicos (ISOLAURI *et al.*, 2002). Atualmente, a definição mais aceita para probióticos é aquela estipulada pela “Food and Agricultural Organization / World Health Organization” (FAO/WHO), que diz que probiótico é “um microorganismo vivo que, quando ingerido em quantidades suficientes, confere um benefício à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002).

Apesar de a definição de probióticos focar a importância de sua viabilidade, alguns trabalhos sugerem que microrganismos probióticos não-viáveis podem exercer algum efeito benéfico (OUWEHAND & SALMINEN, 1998). KAILA *et al.* (1995) utilizando microrganismos não-viáveis observaram uma diminuição na duração de diarreia por rotavírus e, VESA *et al.*

(2000) observaram uma melhor tolerância à lactose.

Metchnikoff (1845-1916) foi o primeiro microbiologista a sugerir que o uso de bactérias poderia influenciar positivamente a microbiota do trato intestinal e prolongar a vida (METCHNIKOFF, 1907). Ele observou que a população da Bulgária tinha uma média de vida superior à do restante da Europa e correlacionou essa observação com a grande ingestão de coalhada pelos búlgaros. A partir desse dado, ele supôs que os lactobacilos eram importantes para a saúde humana e passou a defender o uso de iogurtes e alimentos fermentados.

O conceito de probiótico implica que o microorganismo empregado esteja viável, ou tenha condições de ser reativado, para que possa exercer seu efeito benéfico. Essa exigência reduz o número de microorganismos que podem atuar como medicamento, já que o intestino humano apresenta uma microbiota extremamente competitiva, que funciona como uma barreira física e química, conhecida como “barreira intestinal”, possuindo mecanismos poderosos de combate a microorganismos não autóctones (SAAVEDRA, 1995; CHANDAN, 1999). Embora não sejam mencionados números específicos na definição de probióticos, considera-se que, pelo menos, 10^9 unidades formadoras de colônias (UFCs)/dia de microorganismos devam ser ingeridos para chegar ao intestino em níveis iguais aos da microbiota dominante (OUWEHAND *et al.*, 2002).

Os probióticos têm sido referidos, também, como agentes bioterapêuticos e alimentos funcionais (“functional foods”); porém, alguns autores preferem se referir a eles com termos distintos, definindo probióticos como “um suplemento microbiano vivo, que afeta benéficamente o animal hospedeiro graças à melhoria no balanço microbiano intestinal”, alimentos funcionais como “agentes (vivos ou não) que possuem outras funções além de seu papel nutricional” e reservam o termo “agentes bioterapêuticos” para “microorganismos vivos que possuem eficácia comprovada na prevenção ou tratamento de alguma doença pela interação com a microecologia natural do hospedeiro”. Nesse último caso, vários autores consideram a levedura *Saccharomyces boulardii* e a bactéria *Lactobacillus rhamnosus* GG como os principais agentes bioterapêuticos atualmente estudados e comercializados, conforme revisado por ELMER *et al.* (1996), MCFARLAND (2000) e ELMER & MCFARLAND (2001).

Entre os probióticos mais estudados, tanto experimentalmente quanto clinicamente, estão as bactérias e as leveduras. Alguns já são comercializados sob a forma de

suplemento alimentar ou preparações farmacêuticas, contendo um ou vários microorganismos. Entre os principais probióticos estão as bactérias do ácido láctico (BAL), que incluem os lactobacilos (*Lactobacillus lactis*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. jensenii*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. helveticus*, *L. gasseri*), *Enterococcus faecium* SF68 e *E. faecalis*, *Streptococcus salivarius* e *S. thermophilus*, *Pediococcus acidilactici* e espécies de *Leuconostoc* e *Lactococcus*.

Além das BAL, temos também as bifidobactérias (*Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. animalis*, *B. adolescentis*), *Escherichia coli* EMO e *E. coli* Nissle, *Bacillus subtilis* e *B. toyoi*, e as leveduras *S. boulardii* e *S. cerevisiae*. Essa última, geralmente, é utilizada apenas na medicina veterinária.

Entre os possíveis efeitos benéficos dos probióticos estão a produção de peptídeos bioativos anti-hipertensivos (MINERVINI *et al.*, 2003), a modulação da resposta imune (SCHIFFRIN *et al.*, 1997; NEUMANN *et al.*, 1998; TEJADA-SIMON *et al.*, 1999; ISOLAURI *et al.*, 2001; HE *et al.*, 2002), o balanço da microbiota normal (PERDIGON *et al.*, 1998), a redução de enzimas fecais responsáveis pelo início do desenvolvimento de alguns tipos de cânceres (HIRAYAMA & RAFTER, 2000), prevenção de doenças atópicas (ISOLAURI *et al.*, 2000; KALLIOMAKI *et al.*, 2001; KALLIOMAKI *et al.*, 2003; KIRJAVAINEN *et al.*, 2003; ARVOLA *et al.*, 2004) e alérgicas (HOPPU *et al.*, 2001; ISOLAURI, 2001; KIRJAVAINEN *et al.*, 2001; LAIHO *et al.*, 2002; RAUTAVA & ISOLAURI, 2002; KALLIOMAKI & ISOLAURI, 2003), tratamento da diarreia do viajante (SCARPIGNATO & RAMPAL, 1995), tratamento da diarreia associada ao uso de antibióticos (BARTLETT, 1992) e da diarreia infecciosa (KAILA *et al.*, 1992; FIGUEIREDO *et al.*, 2001), o controle da infecção por rotavírus e *Clostridium difficile* (MCFARLAND *et al.*, 1994), proteção contra a ação de patógenos (SILVA *et al.*, 1999), o papel de coadjuvante no tratamento com antibióticos no combate às úlceras causadas pelo *H. pylori* (AIBA *et al.*, 1998), a redução do colesterol do soro (EYSEN, 1973; LIN *et al.*, 1989; FUKUSHIMA & NAKANO, 1996; BEENA & PRASAD, 1997), o antagonismo *in vitro* e *in vivo* contra enteropatógenos (NICOLI & RAIBAUD, 1990; VANDENBERG, 1993; LIMA FILHO *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2001), alívio da constipação intestinal (GOLDIN, 1998) e o auxílio na absorção da lactose em pessoas com intolerância a esse açúcar (SANDERS *et al.*, 1996; VESA *et al.*, 2000). Devemos observar que esses efeitos, além dos possíveis mecanismos de ação, são os mesmos propostos para os

componentes da microbiota intestinal.

Para que um microrganismo utilizado como probiótico exerça o seu efeito benéfico desejado, além de permanecer viável durante sua passagem pelo sistema gastrointestinal, o seu nível populacional deve ser igual ou maior que 10 milhões de células por grama de conteúdo fecal (NICOLI & VIEIRA, 2000). Para isso, ele deve ser ingerido diariamente para manter seus níveis artificialmente elevados no ecossistema digestivo. À exceção dos *L. rhamnosus* GG e Lcr35, não se conhecem probióticos capazes de persistir por um longo período no trato digestivo do adulto (ALANDER *et al.*, 1999; DE CHAMPS *et al.*, 2003).

Existem vários mecanismos propostos para explicar os efeitos benéficos dos probióticos. Entre eles está a produção de substâncias inibidoras produzidas pelos microorganismos dos probióticos que atuam na inibição do crescimento de vários patógenos (SILVA *et al.*, 1987; VANDENBERG, 1993). A competição desses microorganismos por sítios de adesão e por nutrientes inibe também, a fixação e a sobrevivência de patógenos (BERNET *et al.*, 1994; COCONNIER *et al.*, 1998). Um exemplo disso é o patógeno intestinal *Vibrio cholerae*, que precisa aderir à parede intestinal para colonizá-la e produzir a doença. Conseqüentemente, alguns probióticos são escolhidos devido à capacidade de adesão ao epitélio e competição pelos receptores, conforme demonstrado por TANNOCK (1986). Outros mecanismos de ação desses probióticos incluem a inibição da produção ou da ação de toxinas. Como exemplo disso animais tratados com *S. boulardii* são protegidos de infecção por *C. difficile* (CASTAGLIUOLO *et al.*, 1999). Evidências sugerem que a modulação da resposta imune específica e não-específica pode envolver outros mecanismos pelos quais os probióticos protegem o hospedeiro contra as desordens gastrointestinais (KAILA *et al.*, 1992; PERDIGON *et al.*, 1995; MATSUZAKI & CHIN, 2000). Um exemplo é a administração de *Lactobacillus* GG durante a diarreia aguda causada por rotavírus e administração de bifidobactéria que suprime respostas do tipo Th2 (KAILA *et al.*, 1995; IWABUCHI *et al.*, 2007).

1.6 A levedura *Saccharomyces boulardii*

Em meados de 1920, na Indochina, um microbiologista francês, Henri Boulard, estava à procura de uma linhagem de levedura que fosse capaz de suportar altas temperaturas, a fim de produzir um bom vinho. Durante essa época houve uma epidemia

de cólera em uma das vilas e o pesquisador foi informado que a população local preparava um chá da casca de uma fruta local (lichia) para aliviar e até mesmo curar a diarreia. Posteriormente, verificou-se que a fruta, na verdade, estava recoberta por uma levedura, e a eficácia contra a diarreia se devia a essa levedura, que foi chamada de *Saccharomyces boulardii* (FLORASTOR, 2003). *Saccharomyces boulardii* é uma levedura não patogênica, termotolerante (cresce na temperatura de 37°C) e de uso muito difundido na medicina humana (MCFARLAND & BERNASCONI, 1993).

A partir de 1960 iniciou-se a comercialização da levedura liofilizada, pelo “Laboratoires Biocodex” (Paris, França). Assim, seu uso como medicamento para combate às diarreias foi difundido em toda Europa e está disponível no mercado sob diversos nomes comerciais, tais como: Ultra-Levure® (França), Florastor® (Estados Unidos), Precosa® (Dinamarca), Levucell® (Lallemand, Canadá), Perenterol® (Alemanha), Perenteryl® (Chile), Codex® (Itália), Floratil® (Brasil). Atualmente, a levedura é amplamente comercializada na Europa, Américas do Sul e do Norte, Ásia e África (MCFARLAND & BERNASCONI, 1993) e recentemente seu uso foi liberado pela Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos (FLORASTOR, 2007). Os direitos de comercialização para a América do Sul foram adquiridos pelas Indústrias Químicas da MERCK S.A. Além disso, outras preparações contendo *S. boulardii* estão disponíveis no Brasil (MARTINS *et al.*, 2005b).

Saccharomyces boulardii foi, inicialmente, identificada como uma espécie distinta do gênero hemiascomiceto *Saccharomyces* (MCFARLAND, 1996). Atualmente, a taxonomia do gênero *Saccharomyces* é baseada em métodos genotípicos. Vários pesquisadores afirmam que a *S. boulardii* é uma linhagem de *S. cerevisiae*, uma vez que os métodos convencionais não podem ser utilizados para separar linhagens de *S. cerevisiae*. Devido ao seu valor terapêutico, à sua deficiência em utilizar galactose e produzir ascósporos, MCFARLAND (1996) sugeriu que esta levedura deveria ser considerada como uma espécie à parte. Entretanto, apesar da semelhança genética entre *S. boulardii* e *S. cerevisiae*, elas apresentam algumas diferenças genéticas e fisiológicas. FIETTO *et al.* (2004) observaram que *S. boulardii* é geneticamente muito semelhante a *S. cerevisiae*, entretanto, metabolicamente e fisiologicamente diferente, particularmente no que se refere ao crescimento e à resistência à temperatura de 37°C e estresse ácido, que são importantes características de um microorganismo usado como probiótico.

Na medicina humana esse probiótico é usado no combate a vários tipos de distúrbios gastrointestinais, como diarreia associada ao uso de antibióticos (SURAWICZ *et al.*, 1989; BARTLETT, 1992; MCFARLAND *et al.*, 1995; SURAWICZ, 2003), no tratamento da diarreia causada pelo *C. difficile* (ELMER & MCFARLAND, 2001; SURAWICZ, 2003), na prevenção e tratamento da diarreia do viajante (SCARPIGNATO & RAMPAL, 1995) e da diarreia em pacientes infectados pelo HIV (SAINT-MARC *et al.*, 1991; BORN *et al.*, 1993). O uso de *S. boulardii* tem sido sugerido na manutenção do tratamento da doença de Crohn (GUSLANDI *et al.*, 2000) e na prevenção de diarreia em pacientes recebendo alimentação por sonda (BLEICHNER *et al.*, 1997). Além desses, existem ensaios clínicos mostrando o seu efeito na microbiota de prematuros (COSTALOS *et al.*, 2003) e na diminuição da diarreia em pacientes com amebíase aguda (MANSOUR-GHANAEL *et al.*, 2003). Apesar de todos esses trabalhos mostrando os efeitos benéficos de *S. boulardii*, poucos trabalhos se referem a uma relação entre a dose e o efeito de sua ingestão (PERET FILHO *et al.*, 1998; GIRARD *et al.*, 2003).

A ingestão ocorre por via oral e, nessas condições, a levedura é insensível à ação dos sucos digestivos e de antibacterianos (BLÉHAUT *et al.*, 1989; BODDY *et al.*, 1991). A administração da levedura deve ser realizada de maneira repetida e regular, pois ela não se implanta no tubo digestivo, embora seja capaz de atingir, rapidamente, altas concentrações no cólon (FULLER, 1992). Dois a cinco dias após a descontinuação do seu uso, ela não é mais encontrada nas fezes (BLÉHAUT *et al.*, 1989). Como efeito na mucosa intestinal de camundongos, ratos e seres humanos, a administração dessa levedura mesmo em doses elevadas, não provoca alterações morfológicas e/ou morfométricas, tanto no nível das vilosidades quanto nas criptas, assim como não são observadas alterações na lâmina própria (BUTS *et al.*, 1986; CORTHIER *et al.*, 1992; JAHN *et al.*, 1996). Entretanto, a levedura promove um aumento da atividade de diversas dissacaridases na mucosa intestinal, tais como lactase, sacarase e maltase (BUTS *et al.*, 1986; JAHN *et al.*, 1996). Também já foi descrito o efeito da levedura na liberação de aminopeptidases na mucosa e no fluido endoluminal de camundongos (BUTS *et al.*, 2002). Existem diversos trabalhos mostrando o efeito da levedura no sistema imune (CAETANO *et al.*, 1986; BUTS *et al.*, 1990; RODRIGUES *et al.*, 2000). Estudos em ratos e camundongos permitiram demonstrar que a levedura induz um aumento significativo nos níveis de IgA secretados (BUTS *et al.*, 1990; QAMAR *et al.*, 2001). Como efeito antiinflamatório, foi demonstrado que essa

levedura regula a inflamação no epitélio intestinal, através da inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e também, da produção de óxido nítrico (LEE *et al.*, 2005; GIRARD *et al.*, 2003; GIRARD *et al.*, 2005). Utilizando animais SCID ("*immunoincompetent syngenic severe combined immunodeficiency*"), DALMASSO *et al.* (2006) demonstraram que *S. boulardii* interfere no processo inflamatório, devido à uma alteração específica no comportamento de migração de células T que se acumulam nos linfonodos mesentéricos. Esses autores também demonstraram que o tratamento com essa levedura limita a infiltração de células Th1 no cólon inflamado e a amplificação da inflamação induzida pela produção de citocinas pró-inflamatórias.

A maior parte dos probióticos comercializados é representada por bactérias. Apenas duas leveduras são usadas, a *S. boulardii* na medicina humana e a *S. cerevisiae* na medicina veterinária. A vantagem de se trabalhar com levedura é que ela pode ser liofilizada, é rapidamente eliminada após interrupção da terapia e não é afetada pelo uso de antibacterianos (BLÉHAUT *et al.*, 1989; BODDY *et al.*, 1991). Essa última propriedade é importante, pois algumas terapias associam a administração de probióticos com antibacterianos durante infecções gastrointestinais como, por exemplo, no caso de pacientes infectados por *H. pylori*, cuja terapia é uma combinação de drogas (ARMUZZI *et al.*, 2001).

O uso da levedura não acarreta mudanças nas populações normais da microbiota do cólon após exposição por 4-5 dias. Porém, após este tempo, nota-se um aumento nas populações de aeróbios ($1,4 \times 10^6$ /g para $2,1 \times 10^8$ /g de conteúdo intestinal) e de coliformes totais ($1,8 \times 10^6$ /g para $1,9 \times 10^7$ /g de conteúdo intestinal) (MCFARLAND & BERNASCONI, 1993).

1.7 A levedura *Saccharomyces cerevisiae* linhagem UFMG 905

A levedura *S. cerevisiae* linhagem UFMG 905 foi isolada da destilaria de cachaça de Germana, na cidade de Nova União, em Minas Gerais, na região da zona metalúrgica (VIANNA, 2003). A linhagem foi identificada e classificada como *S. cerevisiae*, segundo métodos descritos em KURTZMAN & FELL (1998) e YARROW *et al.* (1998). A identidade da levedura foi confirmada utilizando o programa YEASTCOMPARE (CIRIELLO & LACHANCE, 2001).

MARTINS (2004) mostrou que a *S. cerevisiae* UFMG 905 foi capaz de reduzir a ação de alguns enteropatógenos em camundongos. Os resultados mostraram que a levedura foi capaz de diminuir a mortalidade (15% de sobrevivência no grupo controle contra 55% no grupo tratado com a levedura) de animais desafiados com *Salm. Typhimurium* durante 28 dias e os dados histopatológicos mostraram que a levedura apresentou proteção contra o desafio oral com *C. difficile*, em camundongos gnotobióticos e preservação do fígado de animais convencionais tratados com a levedura e desafiados com *Salm. Typhimurium*. O menor número de focos inflamatórios no fígado de animais previamente tratados com a *S. cerevisiae* UFMG 905 sugere que a levedura diminui, *in vivo*, a translocação da *Salm. Typhimurium* (MARTINS *et al.*, 2005a).

Em resumo probióticos tem demonstrado capacidade em prevenir a indução de sintomas alérgico. KIM e colaboradores (2005), utilizando probióticos bacterianos (*B. bifidum*, *L. casei* e *E. coli*) como tratamento para o modelo de alergia induzida por sensibilização com OVA e toxina colérica em camundongos C3H/HeJ apresentaram níveis de IgE reduzidos, número de mastócitos degranulados infiltrados reduzidos quando comparados com os controles. Em outro trabalho, TAKAHASHI e colaboradores (2006) observaram que camundongos imunizados com OVA e injetados com uma sequência oligodeoxinucleotídica de uma linhagem do probiótico *B. longum*, nas doses de 0,1µg, 1µg e 10µg/camundongo apresentaram inibição da produção de IgE. Isso ocorre provavelmente devido à interferência por eles no transporte do antígeno através do epitélio, reestabelecendo com isto a tolerância oral e removendo o estímulo alérgico. Neste estudo avaliaremos várias doses de probióticos no modelo de alergia alimentar à ovalbumina induzida em camundongo (FURRIE, 2005; SALDANHA, 2004).

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito dos probióticos *Saccharomyces boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae* 905 na alergia alimentar.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar alterações sistêmicas e no trato gastrointestinal de camundongos submetidos ao protocolo de alergia alimentar tratados com o probiótico *Saccharomyces boulardii*.
2. Avaliar alterações sistêmicas e no trato gastrointestinal de camundongos submetidos ao protocolo de alergia alimentar tratados com o probiótico *Saccharomyces cerevisiae* 905.

3. Materiais e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos de seis a oito semanas de idade, fêmeas, da linhagem BALB/c. Os animais foram provenientes do CEBIO – Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Patologia Geral, em gaiolas de plástico, contendo o máximo de 6 animais/gaiola. Quando chegaram ao biotério, os animais foram vermifugados (ivermectin 1%) e, após uma semana, as gaiolas foram transferidas para as estantes ventiladas (ALESCO - Edital apoio a pequenos Biotérios CNPq/2003).

Os animais receberam uma dieta balanceada, segundo Reeves e colaboradores (1993) (Tabela 1) contendo caseína como fonte protéica durante 21 dias e posteriormente, até o fim do experimento, uma dieta contendo ovalbumina. Foi fornecido aos animais água “*ad libitum*” durante todo o experimento.

Os procedimentos experimentais realizados nessa dissertação de mestrado foram executados de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal – CETEA/UFMG (Protocolo 31/2007).

Quadro 1: Receita Padrão para Roedores Baseada na AING93 (REEVES et al., 1993).

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

3.2 Leveduras

A levedura *S. cerevisiae* linhagem UFMG 905, isolada da fermentação artesanal de cachaça, foi gentilmente cedida pelo Prof^o. Dr^o. Carlos Augusto Rosa, do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil. A linhagem foi identificada e classificada como *S. cerevisiae*, segundo métodos descritos em KURTZMAN & FELL (1998) e YARROW et al. (1998). A identidade da levedura foi confirmada utilizando o programa YEASTCOMPARE (CIRIELLO & LACHANCE, 2001).

O probiótico *S. boulardii* foi gentilmente cedido por Laboratório MERCK, Rio de Janeiro, RJ, Brasil (Floratil®).

As linhagens foram mantidas em meio contendo 1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 25% de glicerol e conservadas a -86°C, em tubos criogênicos de 2mL.

Para todos os experimentos, as leveduras foram crescidas em meio YPG (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose), a 37°C, por 24h, sob

agitação constante (150rpm) e concentrada para obter uma quantidade de 10^9 UFC/mL ou diluídas para obtenção das concentrações de 10^6 UFC/mL e 10^4 UFC/mL. Para a concentração de 10^8 UFC/mL as leveduras não foram concentradas nem diluídas (MARTINS, 2008).

3.3 Sensibilização, Tratamento e Desafio Alergênico

3.3.1 Sensibilização

Os camundongos foram injetados com OVA (albumina da clara de ovo, SIGMA Grade V, SIGMA Chemical Co. St. Louis, MO, USA), na dose de 10µg, adsorvida em hidróxido de alumínio (1mg) e salina (0,2mL) por via subcutânea (s.c.) no dorso (dia 0). Receberam uma segunda sensibilização 14 dias depois (dia 14) apenas com o antígeno (10µg) diluído em salina.

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

3.3.2 Tratamento

Nos grupos tratados com a levedura, foram testadas as doses de 2×10^8 e 10^7 UFC/mL para o probiótico *S. boulardii* e para o probiótico *S. cerevisiae* 905 as doses testadas foram as de 2×10^8 , 10^7 , 10^5 e 10^4 UFC/mL. As doses iniciais de 2×10^8 e de 10^7 UFC/mL, para ambos os probióticos, foram baseadas nos resultados obtidos por MARTINS (2008). Nesse, com aquelas doses, tanto *S. boulardii* quanto *S. cerevisiae* UFMG 905 foram capazes de reduzir os efeitos patogênicos de *Salmonella* Typhimurium, durante infecções experimentais em camundongos.

Os camundongos receberam um inóculo diário com um volume de 200µL contendo uma das concentrações acima citadas, por via intragástrica (i.g.) três dias antes do desafio alergênico até o fim do experimento.

Nos grupos não tratados, os camundongos receberam inóculos com um volume de 200µL de solução salina fisiológica (i.g.), três dias antes do desafio até o fim do experimento.

3.3.3 Desafio alergênico

No dia 21, todos os camundongos receberam dieta balanceada de ovalbumina no lugar de dieta contendo caseína.

Para os grupos sensibilizados, a ingestão contínua de dieta contendo ovalbumina caracterizou o desafio alergênico a partir do dia 21.

3.4 Desenho experimental

O protocolo experimental seguiu de acordo com o esquema abaixo apresentado.

Quadro 2: Desenho experimental.

Desenho Experimental alergia e probióticos					
tempo	Dia 0	Dia 14	Dia 18	Dia 21	Dia 42
trata- mento grupos	sensibilização primária	sensibilização secundária	probióticos	desafio dieta OVA	Sacrifício
controle	-	-	-	+	+
sensibilizado	+	+	-	+	+
Controle tratado	-	-	+	+	+
Sensibilizado tratado	+	+	+	+	+

3.5 Avaliação do peso corpóreo

O peso corpóreo foi avaliado uma vez por semana, desde o início do experimento (dia 0) até o fim. Através da média dos pesos individuais expressos em gramas obteve-se o peso corpóreo de cada grupo.

3.6 Obtenção do Soro e Dosagem sérica dos anticorpos IgE anti-ovalbumina

3.6.1 Obtenção do soro

Os animais foram anestesiados com xilazina (10mg/kg) e cloridrato de ketamina (100mg/kg) no fim de cada experimento e as sangrias feitas através dos vasos axilares. Após coagulação, o sangue foi centrifugado (3000 rpm) por 10 minutos. O soro foi então retirado, colocado em tubos individuais e congelado (-20°C) para posterior análise da presença de anticorpos.

3.6.2 Dosagem sérica dos anticorpos IgE anti-ovalbumina

Os anticorpos IgE anti-ovalbumina foram dosados por ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Placas de poliestireno (Nunc, Roskilde, Denmark) foram sensibilizadas com anticorpo de rato anti-IgE de camundongo diluído 1:250 (Rat anti-mouse IgE, Southern Biotechnology, Birmingham, Inc), 50µL/poço, por no mínimo 18 horas a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas e bloqueadas (1 hora à temperatura ambiente) com 200µL/poço de PBS/caseína. Foram adicionados 50µL/poço de soro total das amostras de camundongos. Após incubação por 2 horas, as placas foram lavadas com salina-Tween por seis vezes. Foram adicionados 50µL de OVA-biotinilada (1mg/mL) por 1 hora à temperatura ambiente. A placa foi novamente lavada com salina-Tween e incubada, agora, com estreptavidina conjugada com a peroxidase (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) em uma diluição de 1:5000 (50µL/poço) por 45 minutos. Em seguida, foi realizada a etapa de revelação com OPD mais H₂O₂ em tampão citrato (100µL/poço) e as amostras foram lidas em 492nm em leitor de ELISA (EL800, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

Os resultados foram computados através das densidades ópticas e expressos como unidades arbitrárias (UA), sendo atribuído um valor de 1000 unidades ao controle positivo (pool de soro de animais sensibilizados) e as amostras comparadas a esse valor.

3.7 Histologia

Foi retirada a porção correspondente ao jejuno proximal do intestino delgado para avaliação da resposta inflamatória desencadeada pela alergia alimentar. Por não haver separação macroscópica nítida entre as porções do intestino delgado em camundongos, o critério para distinção foi baseado segundo FERRARIS e colaboradores (1992), sendo o intestino lavado com salina fisiológica, para retirada das fezes, e então dividido em quatro partes, sendo da parte proximal para a distal, seu tamanho dividido em 20%, 30%, 30% e 20%. Essas porções foram designadas como: duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo, respectivamente. O jejuno proximal foi fixado em formol tamponado a 10%, desidratado em soluções decrescentes de álcoois, clarificado em xilol e incluído em parafina. Cortes de 5 μ m foram obtidos para posterior avaliação da produção do muco intestinal, do infiltrado de eosinófilos e do infiltrado de mastócitos.

3.7.1 Avaliação da presença de muco intestinal

A avaliação da presença de muco intestinal foi feita através do método de coloração por PAS (Periodic Acid Schiff). Nesse método, os cortes foram desparafinados, hidratados, banhados na solução de ácido periódico durante 5 minutos e então mergulhados no Reativo de Schiff durante 10 minutos ou mais, até atingirem uma tonalidade rosa pálida. As células caliciformes ficaram evidenciadas em um tom rosa escuro.

As lâminas foram montadas e foram capturadas imagens de três campos de cada porção do jejuno proximal a partir de uma microcâmera JVC TK-1270/RGB. As imagens foram analisadas com a utilização do software KS300 instalado em um analisador de imagens Kontron Eletronik/Carl Zeiss. Para a determinação do volume das células caliciformes, todos os pixels verdes foram selecionados para a criação de uma imagem binarizada e subsequente cálculo da área total. O resultado foi expresso em μm^2 PAS/campo.

3.7.2 Avaliação do número de eosinófilos

Para a identificação e contagem dos eosinófilos, os cortes das porções de jejuno proximal foram corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE) e as

lâminas foram examinadas em microscópio óptico (Olympus B201). Dez campos foram escolhidos ao acaso, em um aumento de 40X ($53.333\mu\text{m}^2/\text{campo}$) para a contagem do número de eosinófilos. O resultado foi expresso como a média do número de eosinófilos/campo.

3.7.3 Avaliação do número de mastócitos

Para a identificação e contagem de mastócitos, os cortes das porções de jejuno proximal foram corados pela técnica de Dominici. Nesse método, os cortes já desparafinados foram lavados rapidamente em água destilada. Posteriormente, receberam um banho em Fucsina-laranja G (20 segundos), passagem pelo álcool 60%, banho em azul de Toluidina (20 segundos), álcool 60%, álcool 95%, desidratadas, diafanizadas e montadas.

As lâminas foram examinadas em microscópio óptico (Olympus B201). Dez campos foram escolhidos ao acaso, em um aumento de 40X ($53.333\mu\text{m}^2/\text{campo}$) para a contagem do número de mastócitos. O resultado foi expresso como a média do número de mastócitos/campo.

3.8 Análise Estatística

Foi realizada análise de variância (ANOVA-TUKEY) para as diferenças na resposta entre grupos diferentes. As análises das diferenças na resposta entre grupos relacionados foram feitas utilizando-se TESTE T DE STUDENT. O nível de significância foi considerado quando $P < 0.05$.

4. Resultados

4.1 Avaliação da perda de peso corpóreo

A Figura 2 mostra que os animais sensibilizados não tratados e que receberam inóculos de solução salina tiveram uma perda de aproximadamente 15% do peso corpóreo após o contato com o antígeno (desafio alergênico), pela ingestão de ração contendo OVA até o final do experimento.

O tratamento com *S. cerevisiae* 905, nas 3 doses testadas, não interferiu no peso de camundongos dos grupos controle. No entanto, o tratamento com a dose de 2×10^3 UFC/mL (Figura 3A) levou à recuperação do peso corpóreo pelos animais sensibilizados. Quando tratados com as doses de 2×10^5 UFC/mL (Figura 3B) ou 2×10^7 UFC/mL (Figura 4A), os animais sensibilizados continuaram apresentando perda de peso corpóreo.

Já os camundongos sensibilizados e controles que receberam os inóculos de 2×10^8 UFC/mL da levedura *S. cerevisiae* 905 perderam peso ao longo de todo o experimento (Figura 4B). Como mostra a Figura 6, o intestino de camundongos sensibilizados mostra um discreto edema da mucosa, sem erosão de epitélio. O tratamento com *S. cerevisiae* 905, na dose de 2×10^8 UFC/mL, não interfere no edema e não induz a mais alterações como diminuição do tamanho do vilo intestinal, ulceração ou alterações vasculares. Portanto, nota-se que a perda de peso apresentada por esses animais não tem correlação com lesões no intestino.

O tratamento com a levedura *S. boulardii* nas duas doses testadas de 2×10^8 UFC/mL não alterou a perda de peso ocasionada pela ingestão da ração nos camundongos sensibilizados (Figuras 5A e 5B).

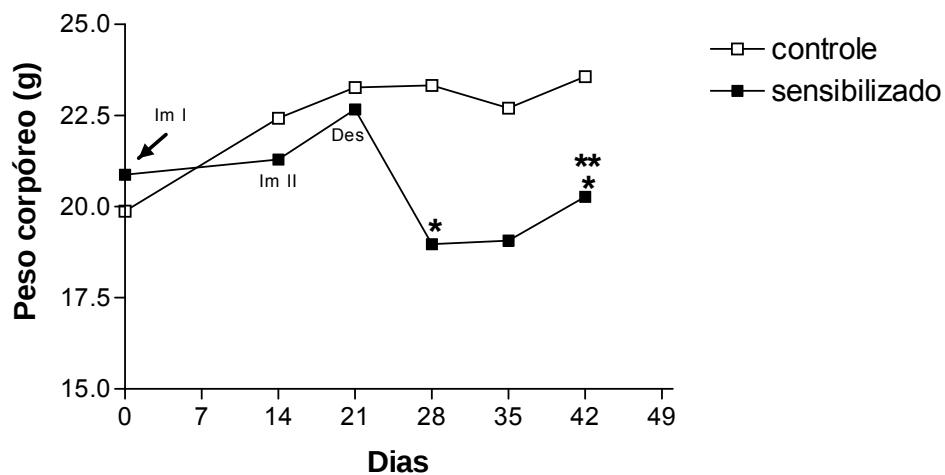


Figura 2: Avaliação do peso corpóreo de camundongos (não tratados). O resultado é a média de 6 animais/grupo. * $P < 0.05$ em relação ao peso do mesmo grupo no dia 21. ** $P < 0.05$ em relação ao seu grupo controle não sensibilizado no dia 42. Imunização primária dia 0 (Im I), imunização secundária (Im II) e desafio alérgico (Des).

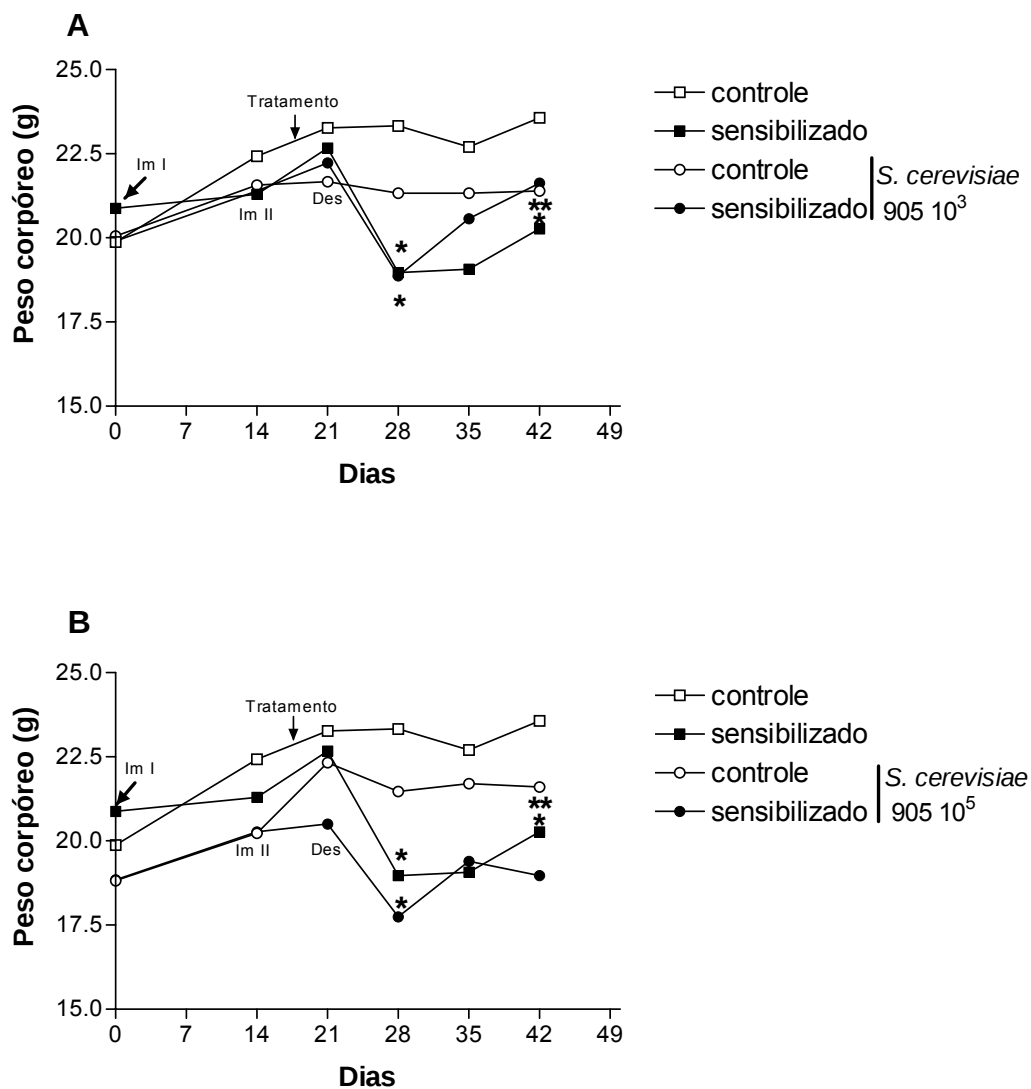


Figura 3: Avaliação do peso corpóreo de camundongos tratados com *S. cerevisiae* 905 2×10^3 , 2×10^5 UFC/mL. Os resultados expressam a média de 6 animais/grupo. * $P < 0.05$ em relação ao peso do mesmo grupo no dia 21. ** $P < 0.05$ em relação ao seu grupo controle não sensibilizado no dia 42. Imunização primária dia 0 (Im I), imunização secundária (Im II) e desafio alérgico (Des).

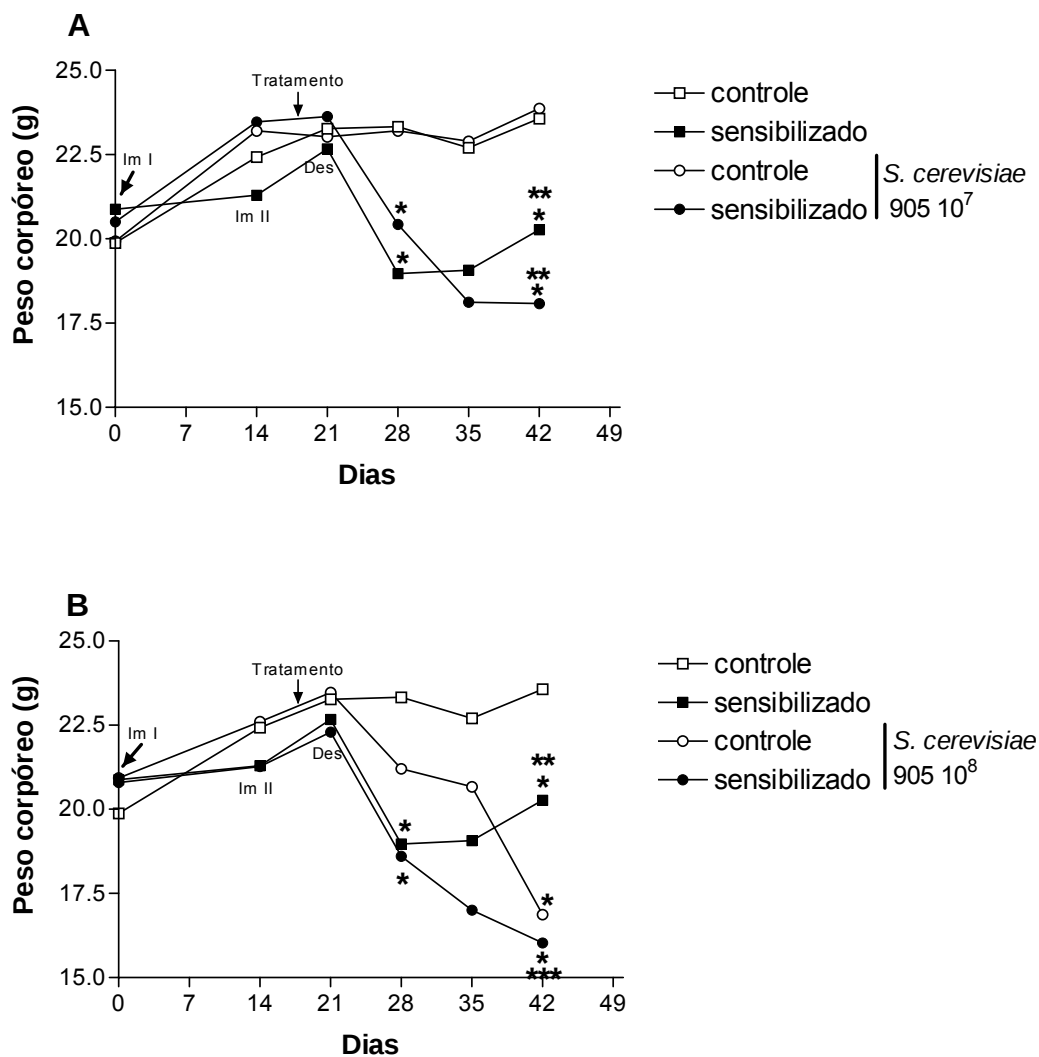


Figura 4: Avaliação do peso corpóreo de camundongos tratados com *S. cerevisiae* 905 2×10^7 , 2×10^8 UFC/mL. Os resultados expressam a média de 6 animais/grupo. * $P < 0.05$ em relação ao peso do mesmo grupo no dia 21. ** $P < 0.05$ em relação ao seu grupo controle não sensibilizado no dia 42. *** $P < 0.05$ em relação ao grupo sensibilizado não tratado no dia 42. Imunização primária dia 0 (Im I), imunização secundária (Im II) e desafio alérgico (Des).

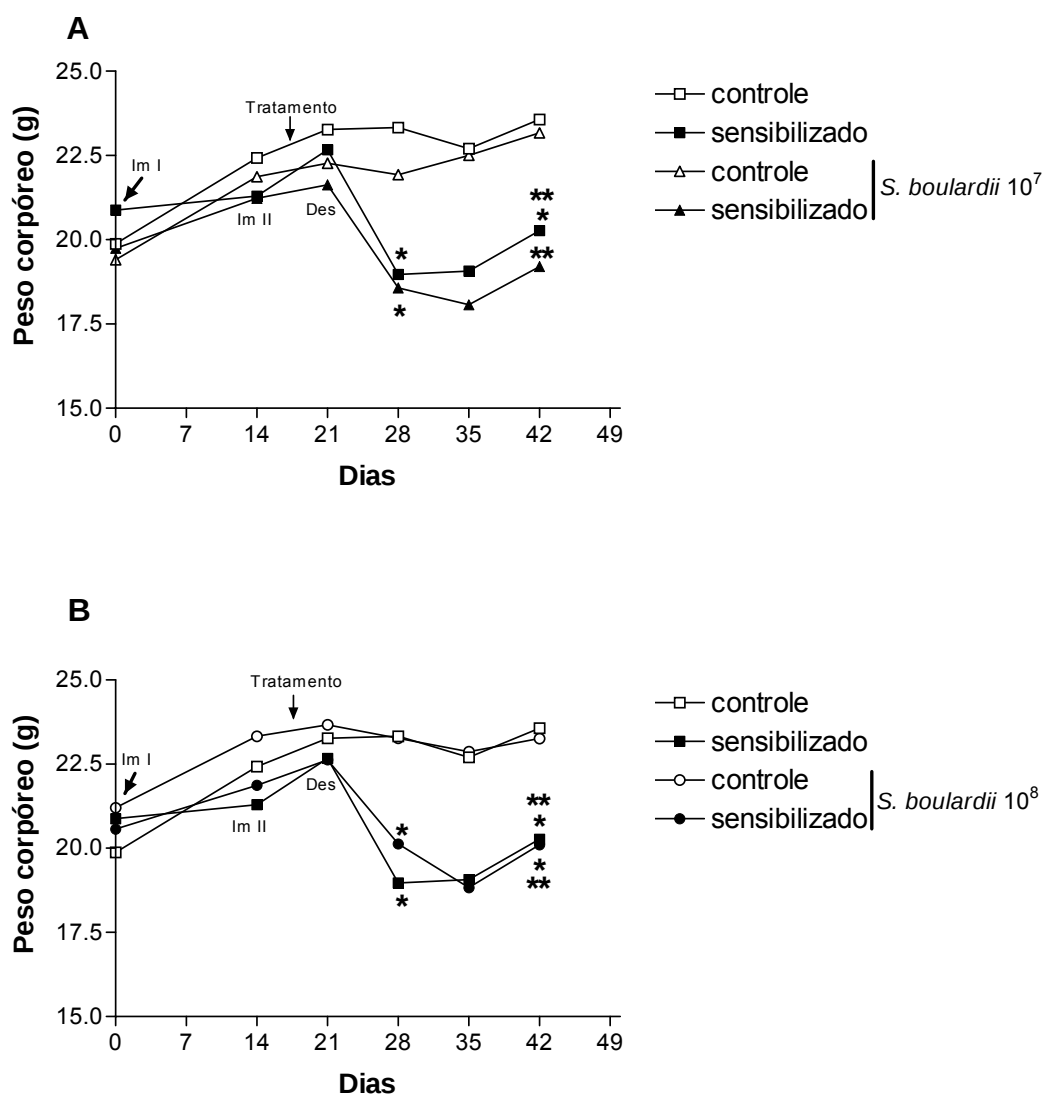
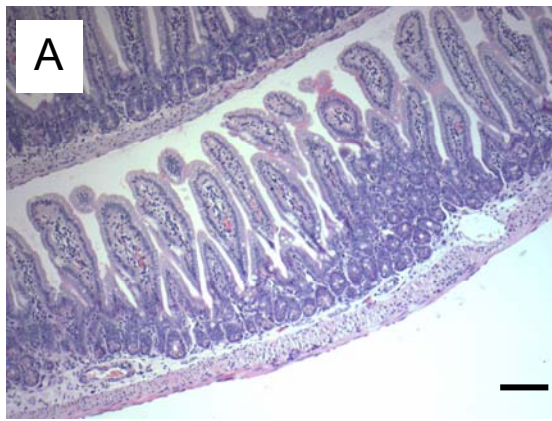
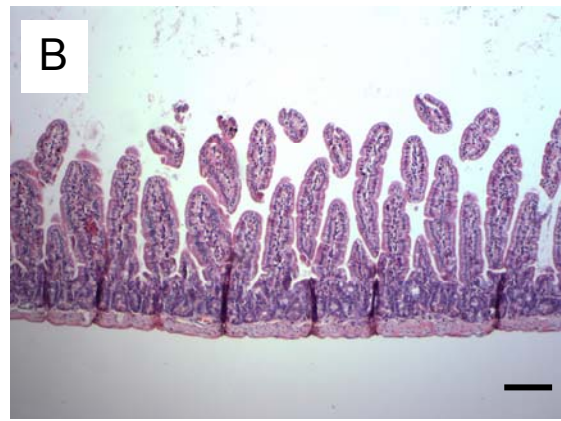


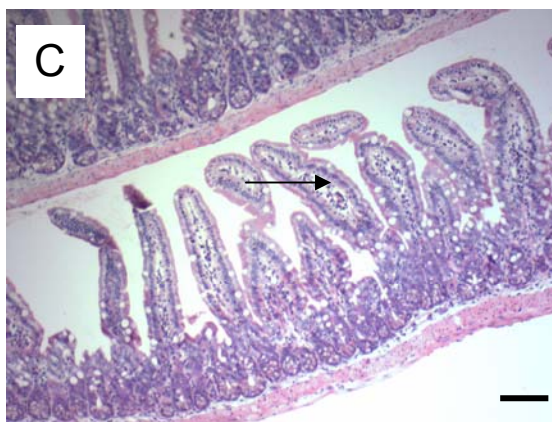
Figura 5: Avaliação do peso corpóreo de camundongos tratados com *S. boulardii* 2×10^7 , 2×10^8 UFC/mL. Os resultados expressam a média de 6 animais/grupo. * $P < 0.05$ em relação ao peso do mesmo grupo no dia 21. ** $P < 0.05$ em relação ao seu grupo controle não sensibilizado no dia 42. Imunização primária dia 0 (Im I), imunização secundária (Im II) e desafio alérgico (Des).



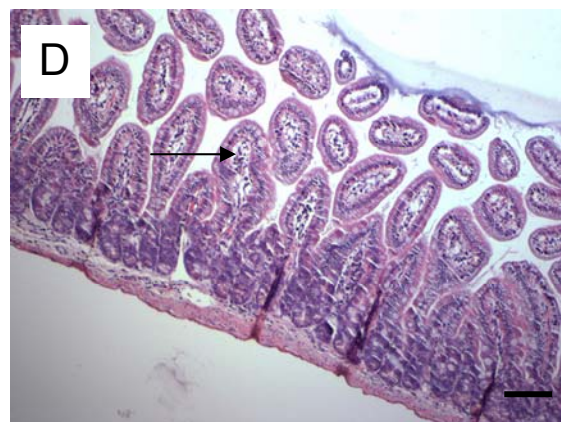
Controle não tratado



Controle tratado *S. cerevisiae* 905



Controle tratado *S. cerevisiae* 905



Sensibilizado tratado *S. cerevisiae* 905

Figura 6: Avaliação histológica de jejuno proximal de camundongos BALB/c. Não sensibilizados (A, B) ou sensibilizados com ovalbumina (C, D) não tratados (A, C) ou tratados (B, D) com levedura *S. cerevisiae* 905 na dose de 2×10^8 UFC/mL. Notar discreto edema (seta) nos vilos jejunais do grupo sensibilizado tratado ou não. Barra representa $100\mu\text{m}$.

4.2 Avaliação dos níveis séricos de anticorpos anti-OVA após o desafio antigênico

Camundongos sensibilizados com OVA apresentaram níveis de IgE maiores estatisticamente significativos ($p= 0,0001$) quando comparados com animais do grupo controle (Figura 7).

Os grupos sensibilizados que receberam tratamento nas doses de 2×10^5 e 2×10^8 UFC/mL de *S. cerevisiae* 905 apresentaram níveis significativamente menores de IgE, quando comparados aos grupos sensibilizados não tratados. (Figuras 8B e 9B).

Os camundongos tratados com *S. boulardii* nas doses de 2×10^7 e 2×10^8 UFC/mL não interferiram na produção de IgE nos camundongos sensibilizados.

Os tratamentos nas outras doses não interferiram na produção de IgE em camundongos sensibilizados.

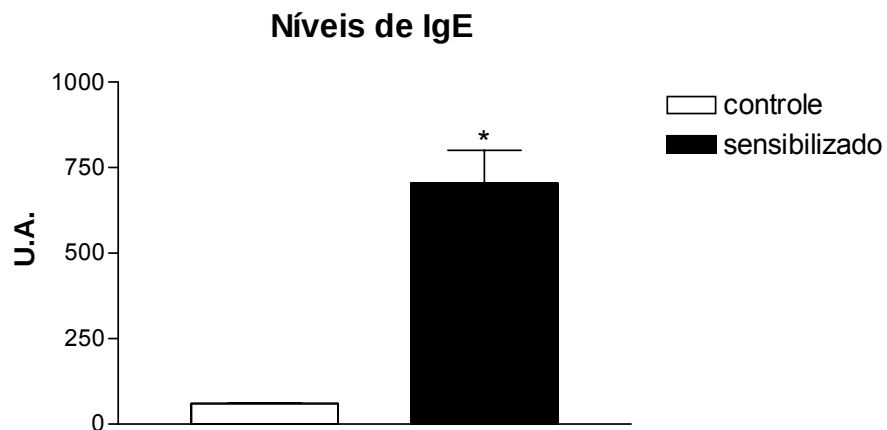


Figura 7: Avaliação dos anticorpos IgE anti-OVA após o desafio com ração contendo OVA (não tratados). As barras representam a média dos valores de cada grupo (6 animais/grupo) obtidos em amostras de soro total para IgE comparados ao soro positivo que foi considerado como 1000 unidades arbitrárias (U.A.). *P<0.05 em relação ao grupo controle.

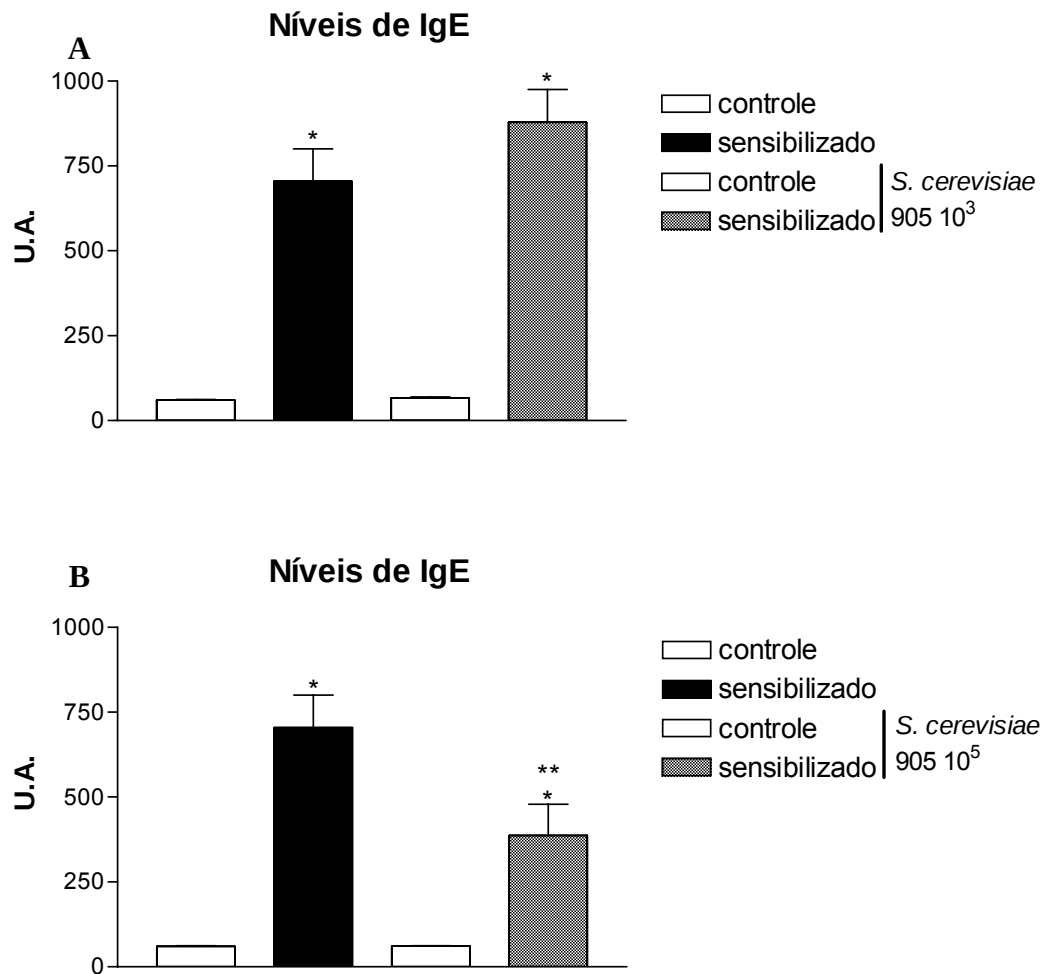


Figura 8: Avaliação dos anticorpos IgE anti-OVA após o desafio com ração contendo OVA tratados com *S. cerevisiae* 905 2×10^3 , 2×10^5 UFC/mL. As barras representam a média dos valores de cada grupo (6 animais/grupo) obtidos em amostras de soro total para IgE comparados ao soro positivo que foi considerado como 1000 unidades arbitrárias (U.A.). * $P < 0.05$ em relação ao seu grupo controle. ** $P < 0.05$ em relação ao sensibilizado sem tratamento.

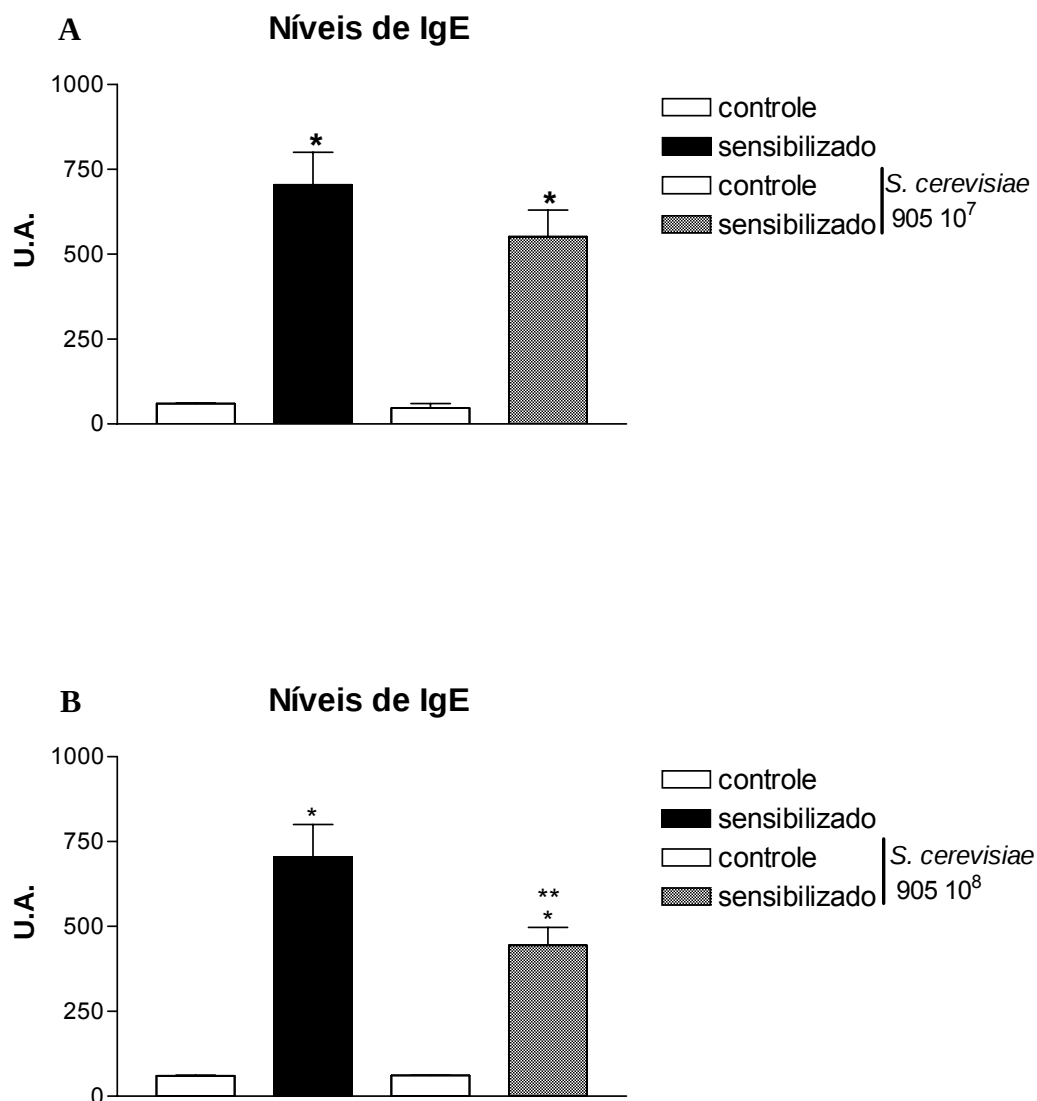


Figura 9: Avaliação dos anticorpos IgE anti-OVA após o desafio com ração contendo OVA tratados com *S. cerevisiae* 905 2×10^7 , 2×10^8 UFC/mL. As barras representam a média dos valores de cada grupo (6 animais/grupo) obtidos em amostras de soro total para IgE comparados ao soro positivo que foi considerado como 1000 unidades arbitrárias (U.A.). * $P < 0.05$ em relação ao seu grupo controle. ** $P < 0.05$ em relação ao sensibilizado sem tratamento.

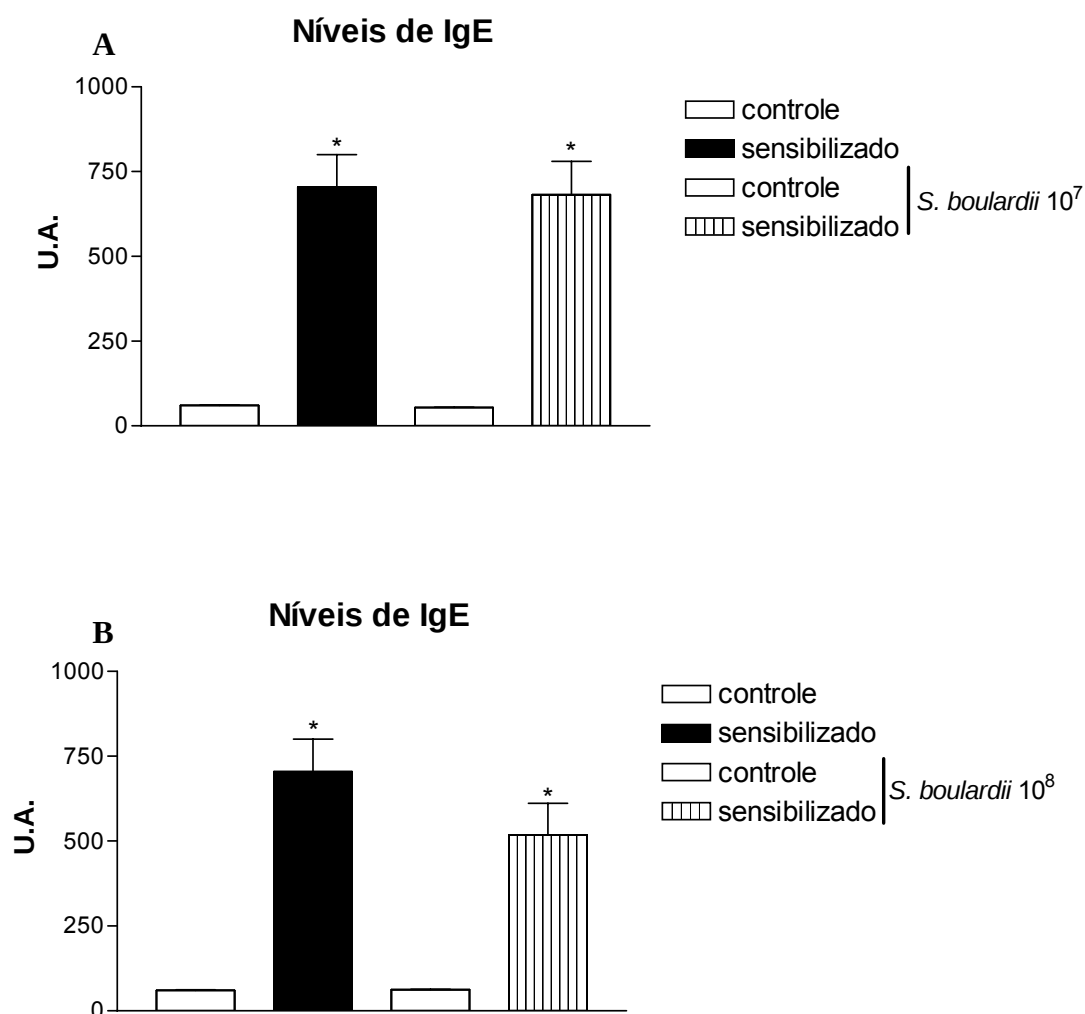


Figura 10: Avaliação dos anticorpos IgE anti-OVA após o desafio com ração contendo OVA tratados com *S. boulardii* 2×10^7 , 2×10^8 UFC/mL. As barras representam a média dos valores de cada grupo (6 animais/grupo) obtidos em amostras de soro total para IgE comparados ao soro positivo que foi considerado como 1000 unidades arbitrárias (U.A.). * $P < 0.05$ em relação ao seu grupo controle.

4.3 Produção de muco pelas células caliciformes do intestino delgado

A ingestão crônica da ração contendo OVA levou a um aumento significativo na produção de muco pelas células caliciformes do jejuno proximal nos camundongos sensibilizados não tratados (Figura 11).

Os tratamentos com *S. cerevisiae* 905 ou *S. boulardii*, ambos na dose de 2×10^8 UFC/mL, reduziram a produção de muco quando comparados aos animais sensibilizados não tratados (Figuras 13B, 14B). Essa redução pode ser visualizada também na Figura 15B.

O tratamento com as demais doses dos mesmos probióticos não interferiu no aumento da produção de muco desencadeado pela ingestão do antígeno no intestino de camundongos sensibilizados.

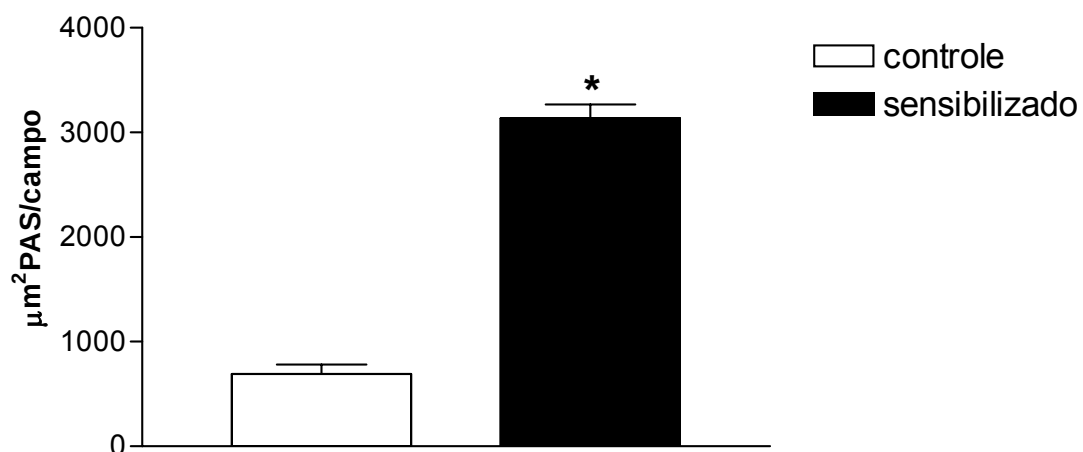


Figura 11: Avaliação do muco produzido pelas células caliciformes do jejuno proximal (não tratados). O muco produzido pelas células caliciformes foi quantificado em 3 campos do jejuno proximal. As barras representam a média dos valores de cada grupo (6 animais/grupo). * $P < 0,05$ em relação ao seu grupo controle.

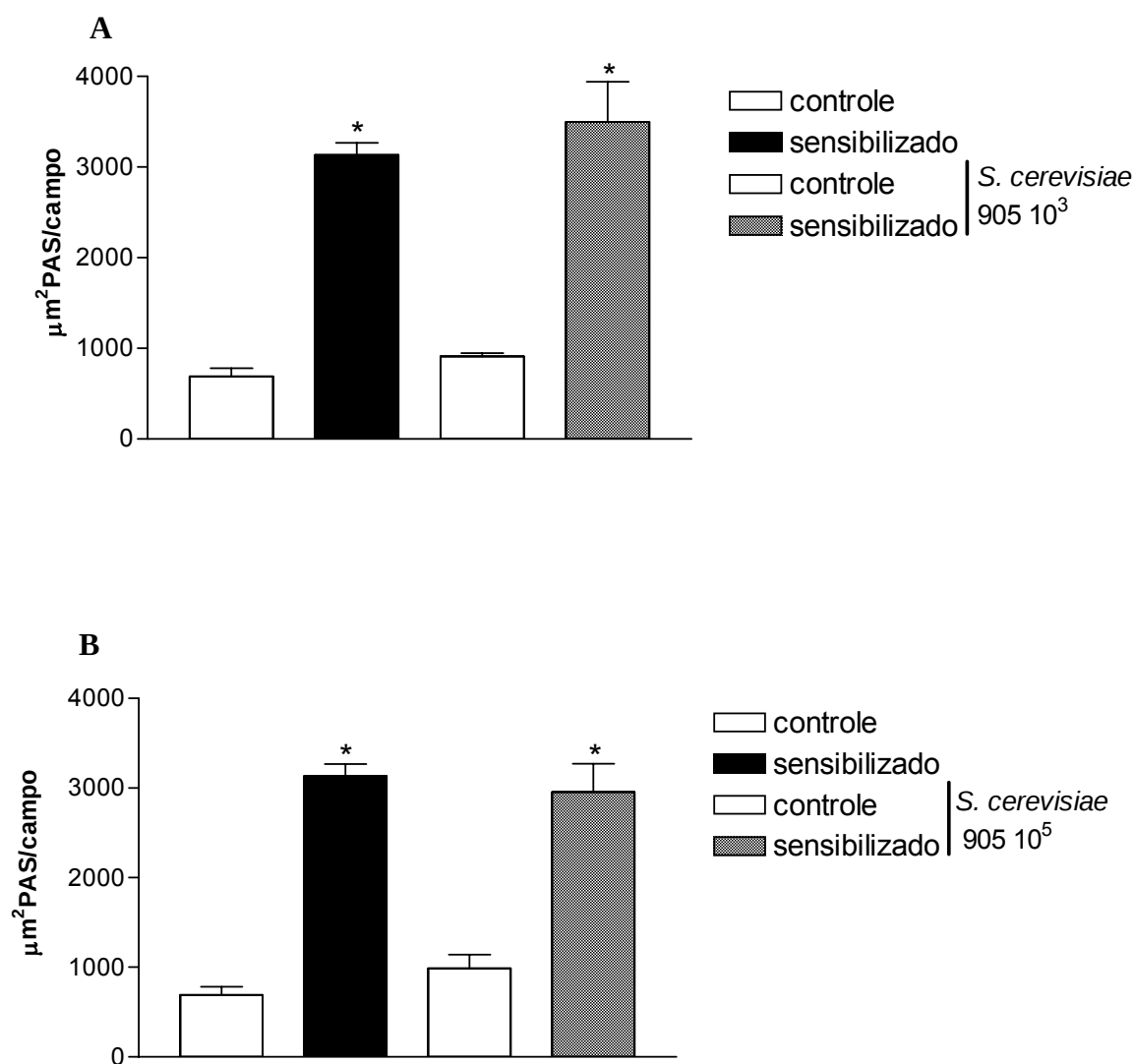


Figura 12: Avaliação do muco produzido pelas células caliciformes do jejuno proximal tratados com *S. cerevisiae* 905 2×10^3 , 2×10^5 UFC/mL. O muco produzido pelas células caliciformes foi quantificado em 3 campos do jejuno proximal. As barras representam a média dos valores de cada grupo (6 animais/grupo). * $P < 0,05$ em relação ao seu grupo controle.

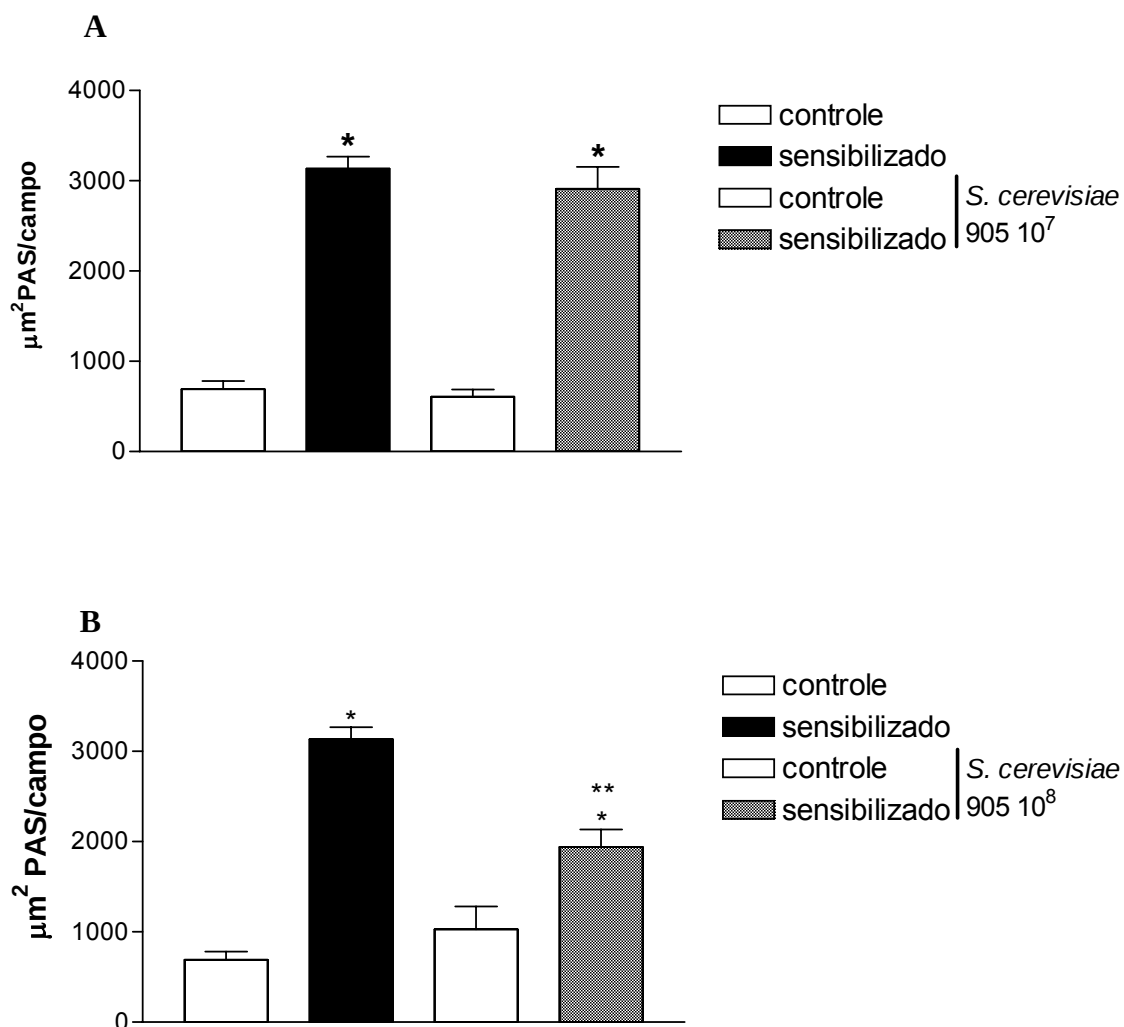


Figura 13: Avaliação do muco produzido pelas células caliciformes do jejuno proximal tratados com *S. cerevisiae* 905 2×10^7 , 2×10^8 UFC/mL. O muco produzido pelas células caliciformes foi quantificado em 3 campos do jejuno proximal. As barras representam a média dos valores de cada grupo (6 animais/grupo). * $P < 0,05$ em relação ao seu grupo controle. ** $P < 0,05$ em relação ao grupo sensibilizado não tratado.

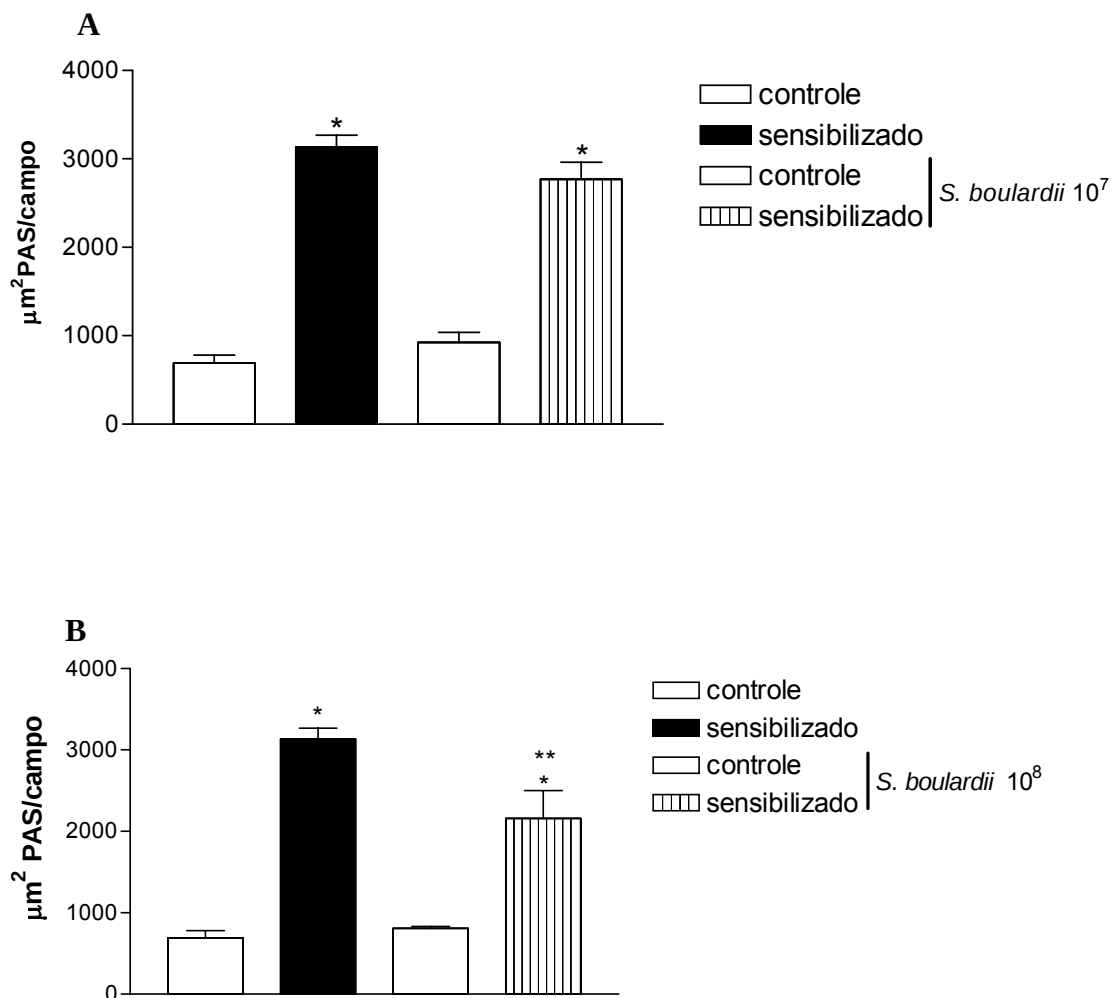


Figura 14: Avaliação do muco produzido pelas células caliciformes do jejuno proximal tratados com *S. boulardii* 2×10^7 , 2×10^8 UFC/mL. O muco produzido pelas células caliciformes foi quantificado em 3 campos do jejuno proximal. As barras representam a média dos valores de cada grupo (6 animais/grupo). * $P < 0,05$ em relação ao grupo seu grupo controle. ** $P < 0,05$ em relação ao grupo sensibilizado não tratado.

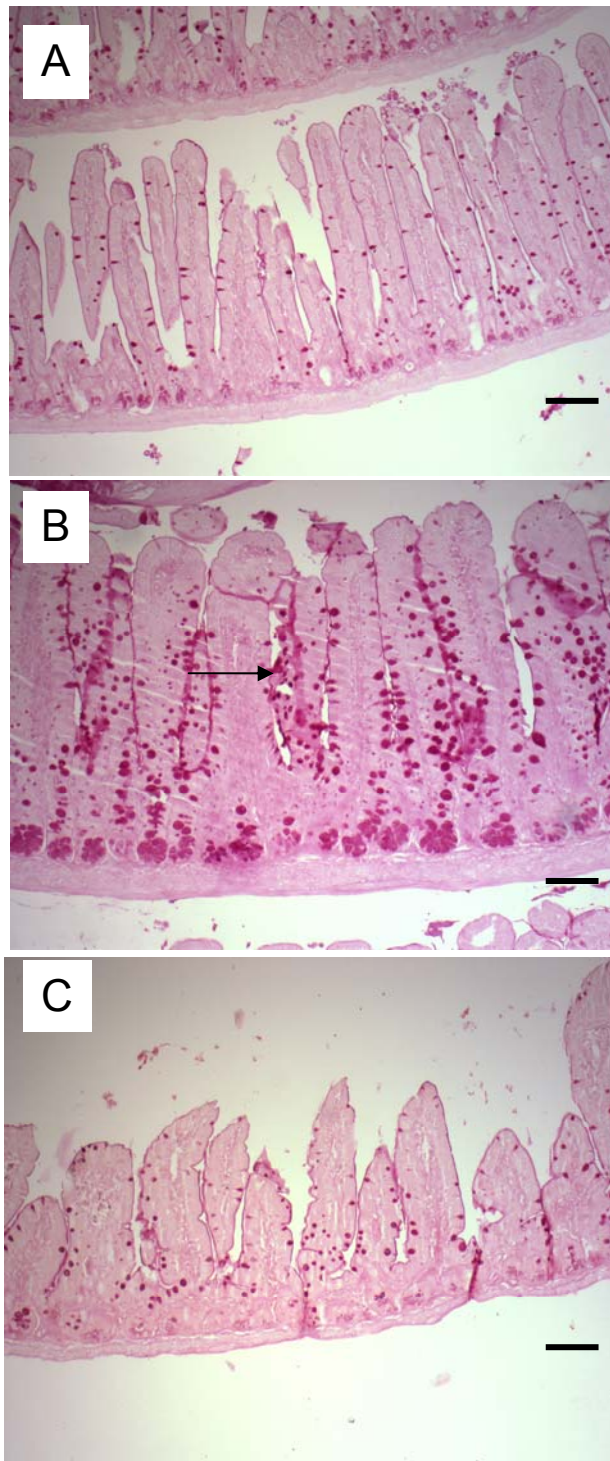


Figura 15: Avaliação histológica do muco produzido no jejuno proximal de camundongos BALB/c. Não sensibilizados (A) ou sensibilizados com ovalbumina (B, C) não tratados (B) ou tratados (C) com levedura *S.boulardii* na dose de 2×10^8 UFC/mL. Todos os camundongos receberam dieta contendo ovalbumina. Notar células caliciformes com muco (seta) no epitélio jejunal do grupo sensibilizado. Barra representa 100 μ m.

4.4 Infiltrado de eosinófilos na mucosa intestinal

A ingestão prolongada da ração contendo OVA induziu um infiltrado de eosinófilos no jejuno proximal de camundongos sensibilizados, sendo esse valor estatisticamente significativo quando comparados aos seus controles (Figura 16 e 20).

Camundongos sensibilizados e tratados com *S. cerevisiae* 905 na dose de 2×10^3 UFC/mL ou com *S. boulardii* na dose de 2×10^8 UFC/mL apresentaram o número de eosinófilos infiltrados aproximadamente 41% menor em relação ao grupo sensibilizado não tratado (Figuras 17A e 19B).

As demais doses dos mesmos probióticos não reduziram o número de eosinófilos infiltrados em relação aos seus grupos controles.

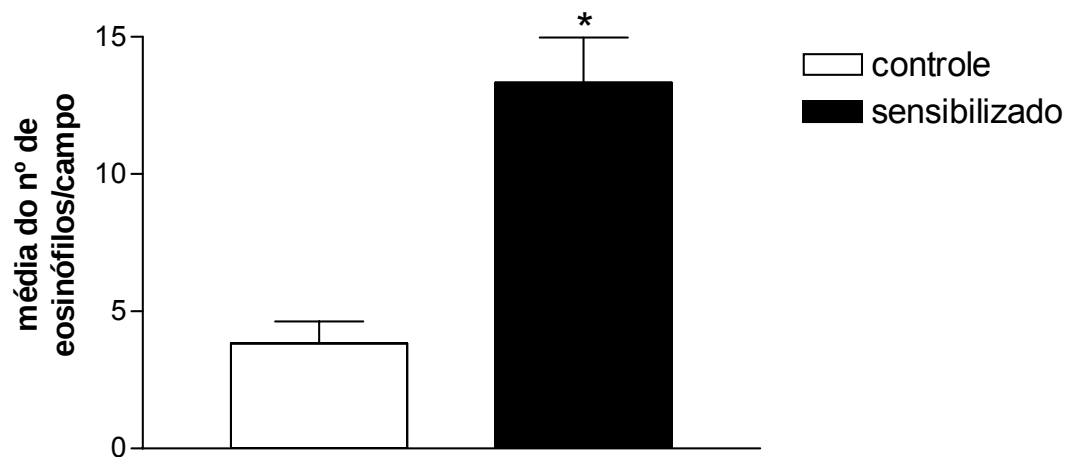


Figura 16: Infiltrado de eosinófilos na mucosa intestinal (não tratados). Os eosinófilos infiltrados na mucosa foram contados em 10 campos. As barras representam a média dos valores de cada grupo (6 animais/grupo). * $P < 0,05$ em relação ao seu grupo controle.

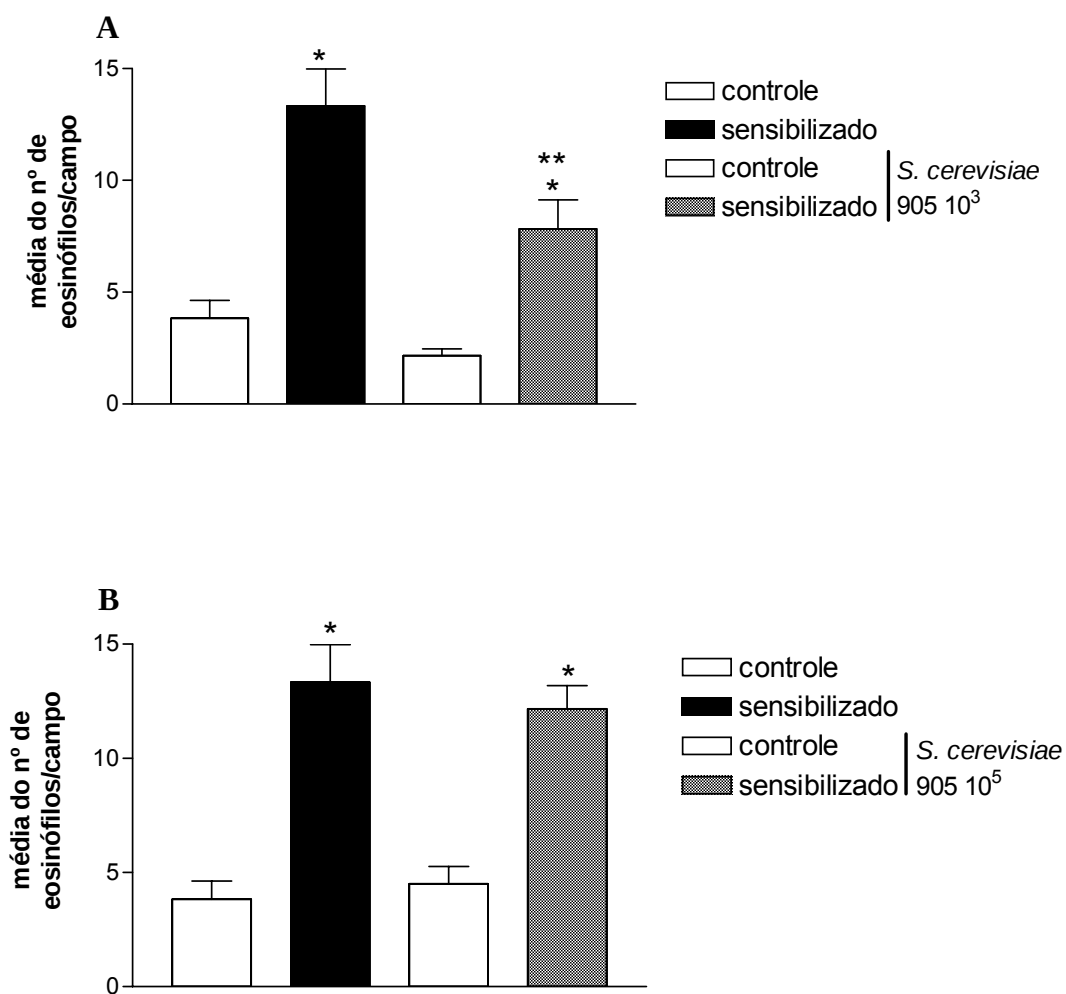


Figura 17: Infiltrado de eosinófilos na mucosa intestinal tratados com *S. cerevisiae* 905 2×10^3 , 2×10^5 UFC/mL. Os eosinófilos infiltrados na mucosa foram contados em 10 campos. As barras representam a média dos valores de cada grupo (6 animais/grupo). * $P < 0,05$ em relação ao seu grupo controle. ** $P < 0,05$ em relação ao grupo sensibilizado não tratado.

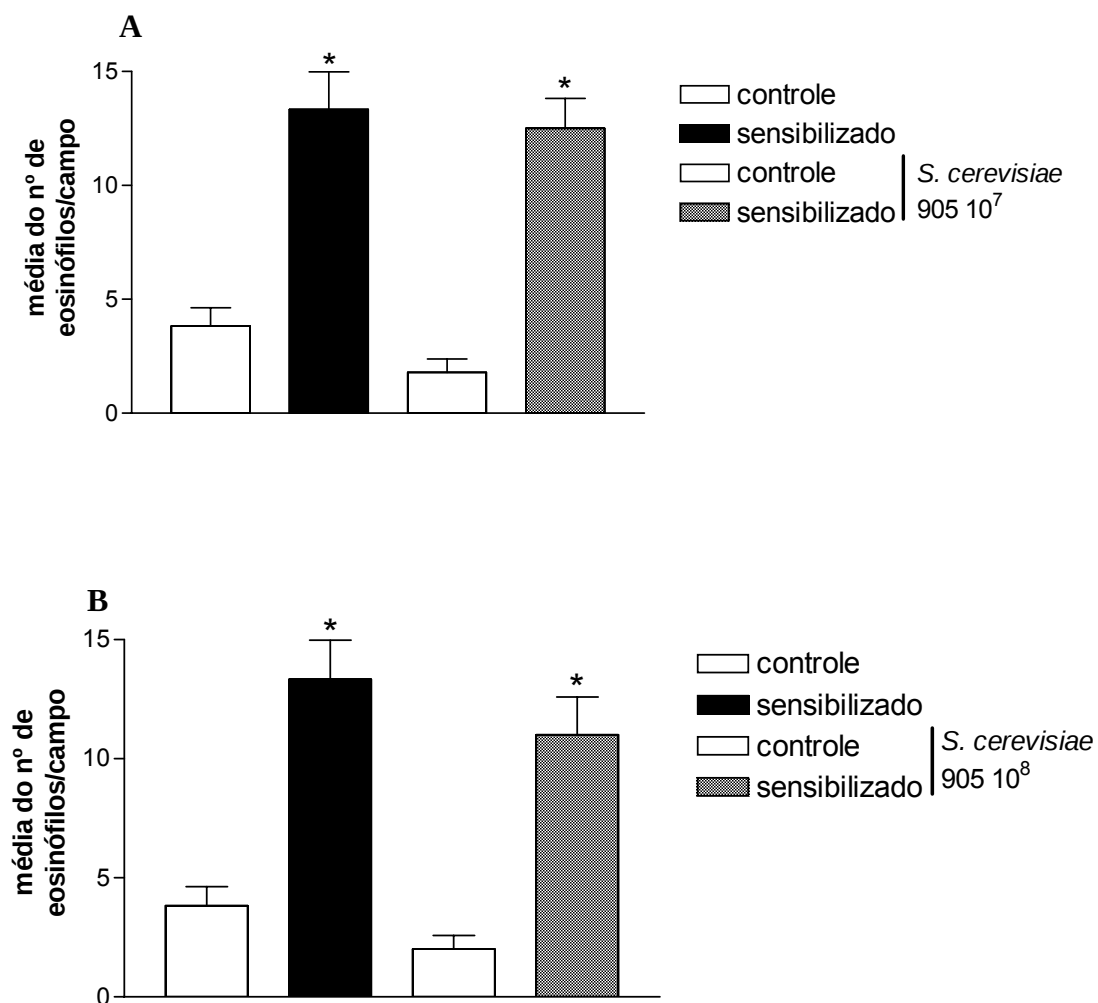


Figura 18: Infiltrado de eosinófilos na mucosa intestinal tratados com *S. cerevisiae* 905 2×10^7 , 2×10^8 UFC/mL. Os eosinófilos infiltrados na mucosa foram contados em 10 campos. As barras representam a média dos valores de cada grupo (6 animais/grupo). * $P < 0,05$ em relação ao seu grupo controle.

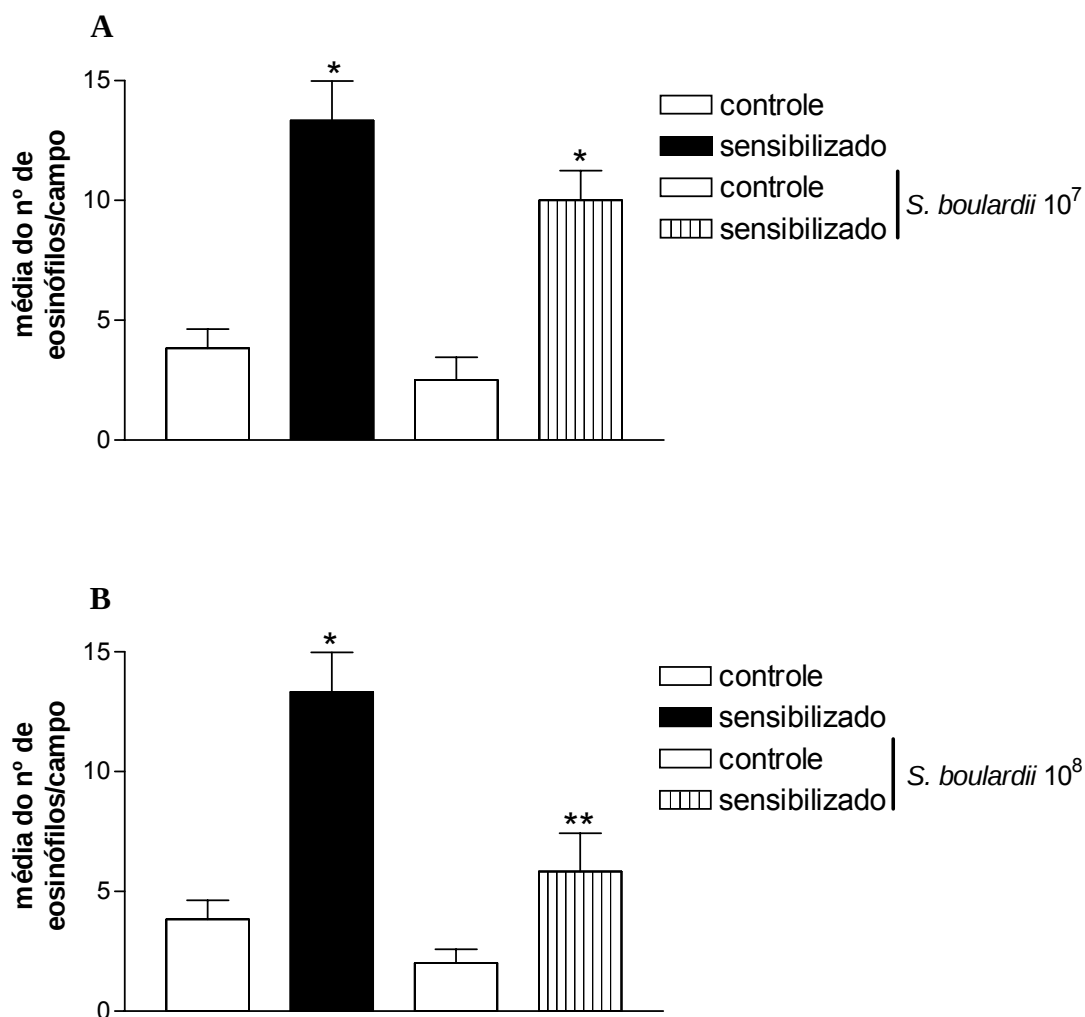


Figura 19: Infiltrado de eosinófilos na mucosa intestinal tratados com *S. boulardii* 2x10⁷, 2x10⁸ UFC/mL. Os eosinófilos infiltrados na mucosa foram contados em 10 campos. As barras representam a média dos valores de cada grupo. Foram utilizados 6 animais/grupo. *P<0,05 em relação ao seu grupo controle. **P<0,05 em relação ao grupo sensibilizado não tratado.

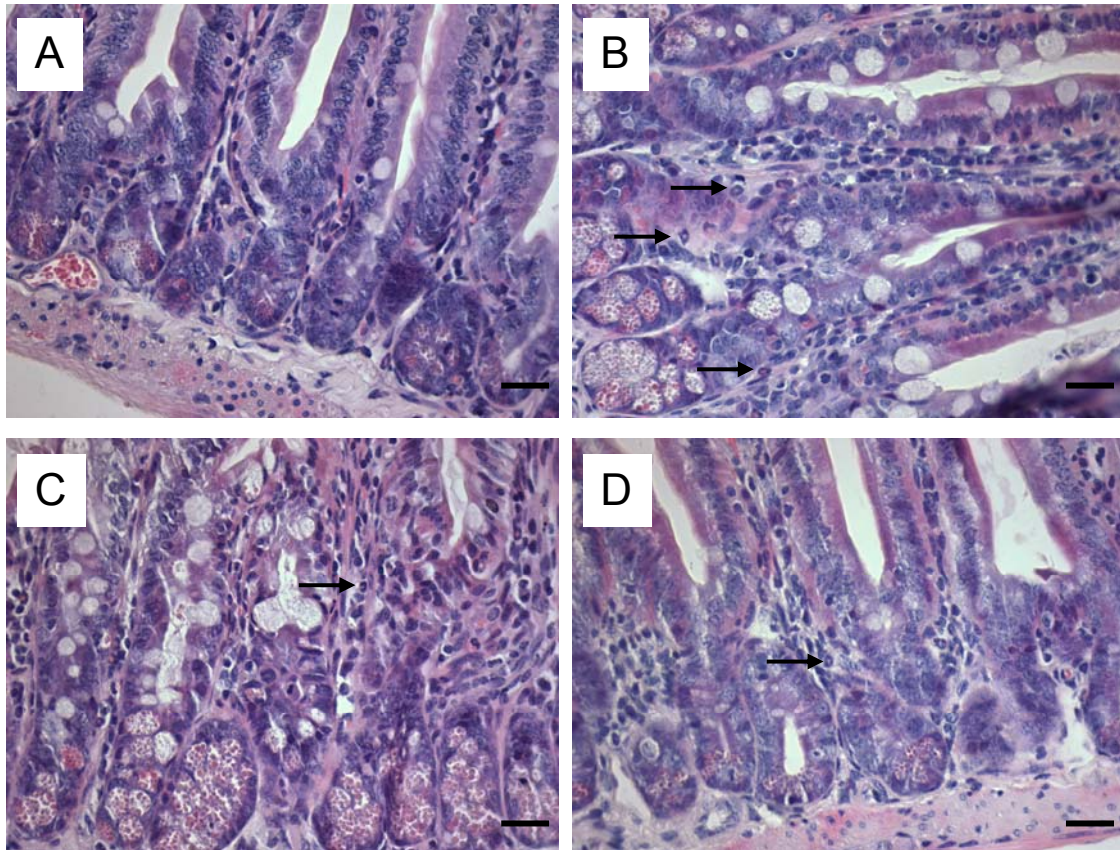


Figura 20: Avaliação histológica do infiltrado de eosinófilos no jejuno proximal de camundongos BALB/c. Não sensibilizados (A) ou sensibilizados com ovalbumina (B, C, D) não tratados (B) ou tratados (C, D) com levedura *S.boulardii* na dose de 2×10^8 UFC/mL (C) ou *S. cerevisiae* na dose de 2×10^3 UFC/mL (D). Todos os camundongos receberam dieta contendo ovalbumina. Notar a presença de eosinófilos na mucosa jejunal (seta). Barra representa 25 μ m.

4.5 Avaliação do número de mastócitos

O grupo de animais sensibilizados com OVA apresentou um número elevado de mastócitos no jejuno proximal estatisticamente significativo ($p= 0,0025$) quando comparado ao seu grupo controle.

Camundongos sensibilizados tratados com *S. cerevisiae* 905 nas doses de 2×10^3 ou 2×10^5 UFC/mL ou tratados com *S. boulardii* nas doses de 2×10^7 ou 2×10^8 UFC/mL (Figuras 18, 19A e 19B e 21A e 21B).

Entretanto, camundongos quando sensibilizados e tratados com *S. cerevisiae* 905 nas doses de 2×10^7 ou 2×10^8 UFC/mL não apresentaram diferenças significativas no número de mastócitos quando comparados ao grupo sensibilizado não tratado ou ao seu grupo controle (Figuras 20A e 20B).

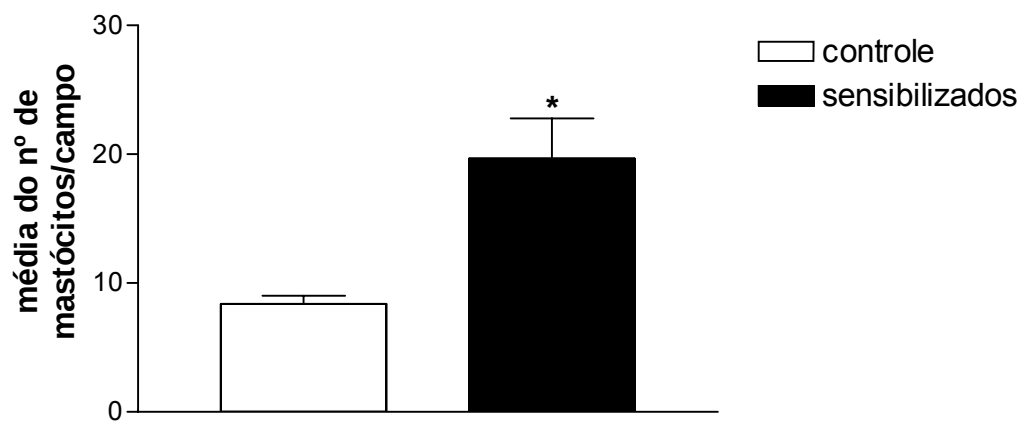


Figura 21: Infiltrado de mastócitos na mucosa intestinal (não tratados). Os mastócitos infiltrados na mucosa foram contados em 10 campos. As barras representam a média dos valores de cada grupo (6 animais/grupo). * $P < 0,05$ em relação ao seu grupo controle.

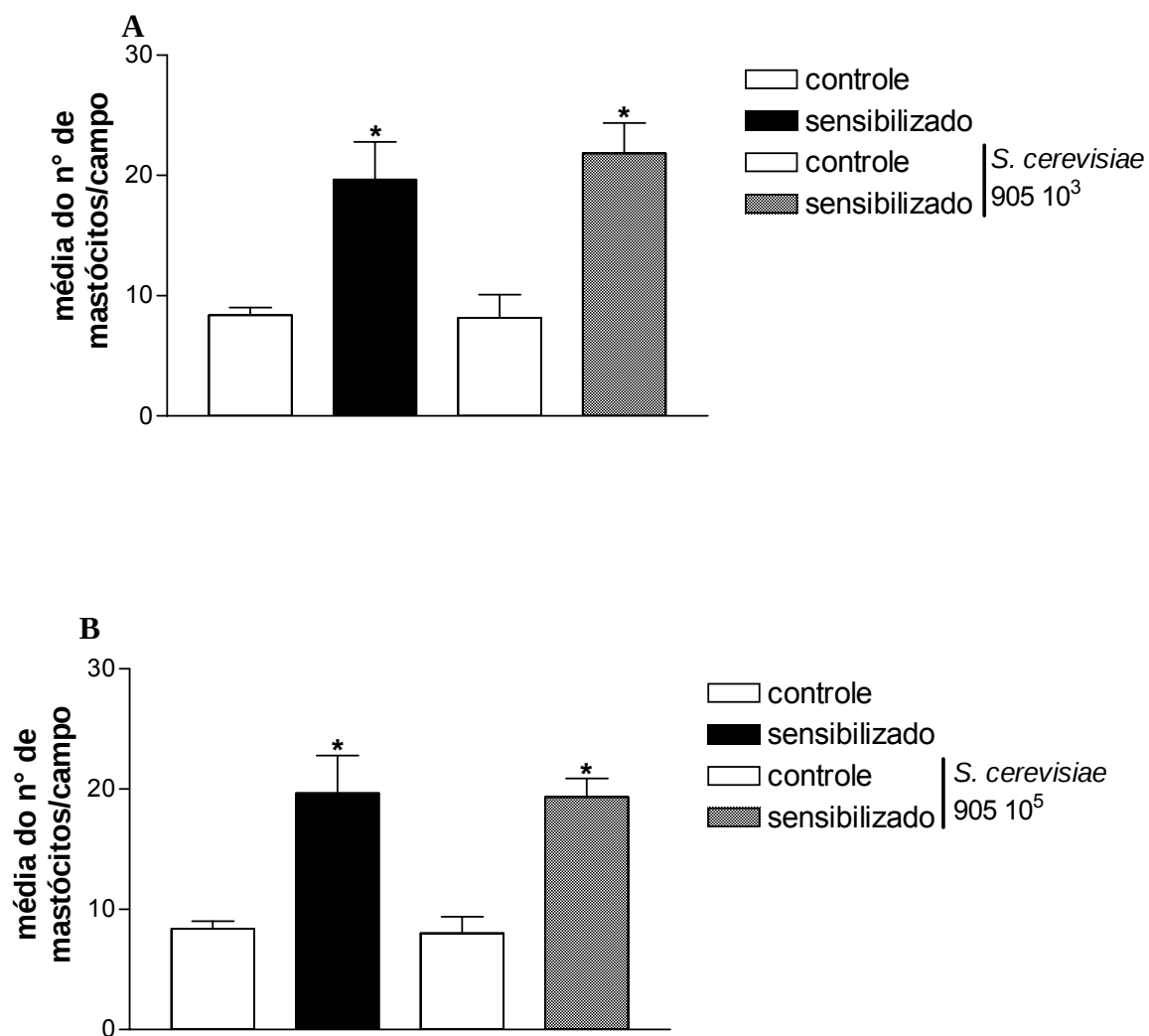


Figura 22: Infiltrado de mastócitos na mucosa intestinal tratados com *S. cerevisiae* 905 2×10^3 , 2×10^5 UFC/mL. Os mastócitos infiltrados na mucosa foram contados em 10 campos. As barras representam a média dos valores de cada grupo (6 animais/grupo). * $P < 0,05$ em relação ao seu grupo controle.

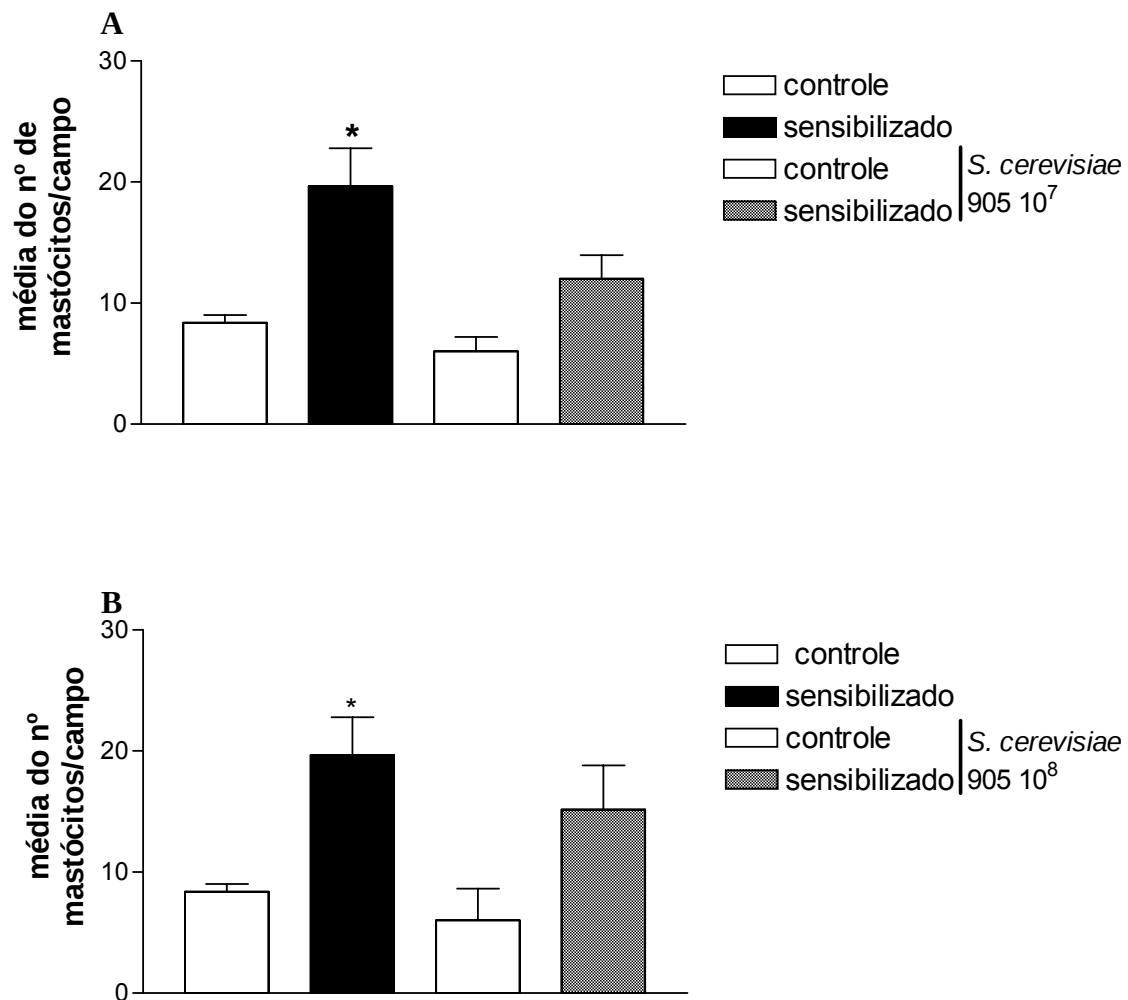


Figura 23: Infiltrado de mastócitos na mucosa intestinal tratados com *S. cerevisiae* 905 2×10^7 , 2×10^8 UFC/mL. Os mastócitos infiltrados na mucosa foram contados em 10 campos. As barras representam a média dos valores de cada grupo (6 animais/grupo). * $P < 0,05$ em relação ao seu grupo controle.

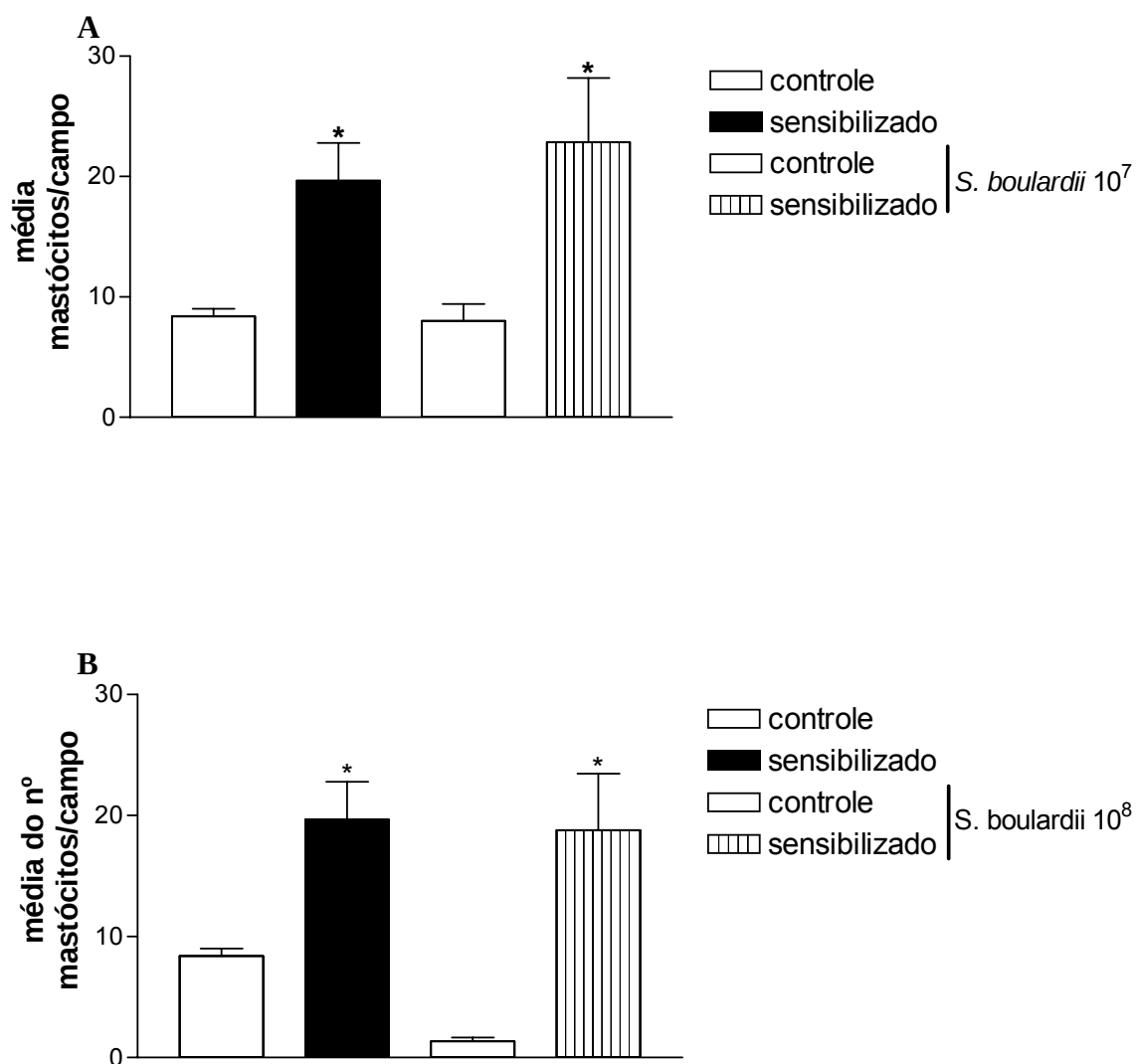


Figura 24: Infiltrado de mastócitos na mucosa intestinal tratados com *S. boulardii* 905 2×10^7 , 2×10^8 UFC/mL. Os mastócitos infiltrados na mucosa foram contados em 10 campos. As barras representam a média dos valores de cada grupo (6 animais/grupo). * $P < 0,05$ em relação ao seu grupo controle.

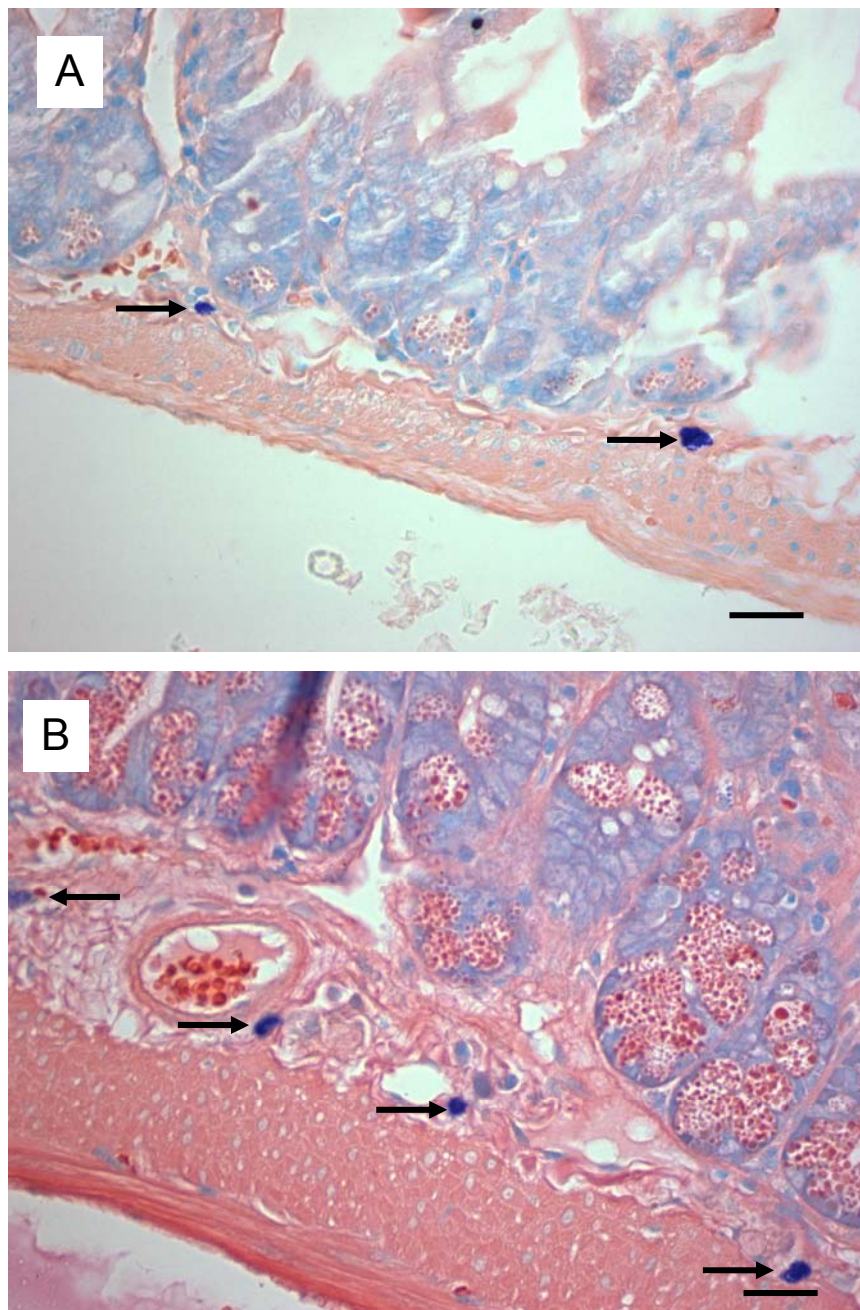


Figura 25: Avaliação histológica do infiltrado de mastócitos no jejuno proximal de camundongos BALB/c. Não sensibilizados (A) ou sensibilizados com ovalbumina (B). Todos os camundongos receberam dieta contendo ovalbumina. Notar mastócitos (seta) na submucosa jejunal do grupo sensibilizado. Barra representa 25 μ m.

5. DISCUSSÃO

Em nossos experimentos, uma semana após o desafio oral todos os camundongos sensibilizados perderam peso, corroborando com os resultados de SALDANHA (2006) e MOREIRA (2006).

Alternativas têm sido desenvolvidas como terapêutica na alergia alimentar, como por exemplo, o uso de probióticos.

Ao iniciarmos os tratamentos nas diversas doses dos probióticos, foi possível observar que apenas o grupo sensibilizado que recebeu a dose de 2×10^3 UFC/mL de *S. cerevisiae* 905 recuperou o peso corpóreo em aproximadamente 97% ao longo do desafio antigênico. Portanto, possivelmente essa dose tem um efeito benéfico para esse sintoma desencadeado pela indução da alergia alimentar.

Nos outros tratamentos, as doses utilizadas não proporcionaram qualquer efeito de recuperação do peso corpóreo nos animais sensibilizados. Além disso, os animais do grupo não sensibilizado tratados com *S. cerevisiae* 905 na dose de 2×10^8 UFC/mL perderam peso corpóreo.

Um exemplo de dose e efeito foi observado por ELMER e CORTIER (1991) em um trabalho onde foi aumentada a dose de 3×10^8 /mL para $3,3 \times 10^8$ /mL de *S. boulardii* na água para beber dos camundongos. Com esse tratamento, a sobrevivência cresceu linearmente de 0 para 85% quando infectados com *C. difficile*. Um patógeno causador freqüente de diarreia nosocomial em humanos adultos.

Os níveis de IgE aumentam em processos alérgicos e por isso tem sido propostos tratamentos que utilizam anticorpos anti-IgE. Um exemplo é o uso de omalizumab que é um anticorpo recombinante monoclonal anti-IgE aprovado para tratamentos de moderadas a alergias asmáticas graves (D'AMATO *et al.*, 2007). Além disso, em ensaios clínicos e testes *in vitro* o uso de anti-IgE é capaz de diminuir os níveis plasmáticos do anticorpo IgE a zero e ocasionar uma inibição dos receptores de alta afinidade para IgE em mastócitos e basófilos (MACGLASHAN *et al.*, 1997; MACGLASHAN *et al.*, 1998).

A produção de IgE é um importante parâmetro para avaliar a alergia. No nosso trabalho o aumento da produção de IgE anti-OVA nos animais sensibilizados tratados ou não com os probióticos sugere que a resposta alérgica foi induzida pela exposição ao antígeno. Os camundongos sensibilizados dos grupos tratados com a levedura *S. cerevisiae* 905 nas doses de 2×10^5 e 2×10^8 UFC/mL tiveram

níveis de IgE reduzidos em aproximadamente 45% quando comparado aos níveis de IgE do grupo sensibilizado não tratado. Possivelmente, esses tratamentos que começaram três dias antes do desafio e terminaram no fim do experimento podem ter reduzido a síntese desta imunoglobulina gradativamente. Essa redução pode ter sido benéfica, pois a IgE é de fundamental importância para a indução de sintomas clássicos de alergia alimentar (SALDANHA, 2004). KIM e colaboradores (2005), utilizando probióticos bacterianos (*B. bifidum*, *L. casei* e *E. coli*) como tratamento para o modelo de alergia em camundongos C3H/HeJ induzida por ovalbumina, obtiveram resultados semelhantes aos nossos na produção de IgE. Em outro trabalho, camundongos BALB/c imunizados com OVA e tratados com o probiótico *L. acidophilus* linhagem L-55 apresentaram níveis de IgE reduzidos quando comparados com os controles (SUNADA *et al.*, 2007). TAKAHASHI e colaboradores (2006) observaram que camundongos imunizados com OVA e injetados com uma sequência oligodeoxinucleotídica de uma linhagem do probiótico *B. longum*, nas doses de 0,1µg, 1µg e 10µg/camundongo apresentaram inibição da produção de IgE, sendo que os menores níveis desse anticorpo foram alcançados quando se utilizou a dose de 10µg.

Em contrapartida à produção de anticorpos IgE, há fatores envolvidos no controle da inflamação da mucosa intestinal desencadeada pela absorção exacerbada de antígenos da dieta. Entre esses fatores, há a produção de muco que funciona como barreira à transcitose de antígenos alimentares através do epitélio intestinal. Partículas, bactérias e vírus são aprisionados ao muco e eliminados pelos movimentos peristálticos do intestino. Essa barreira previne que patógenos e antígenos tenham acesso ao epitélio, processo chamado de exclusão não imune (MAYER, 2003).

No nosso modelo de alergia alimentar também houve alteração na produção de muco pelas células caliciformes do intestino delgado (SALDANHA *et al.*, 2004). Nos camundongos sensibilizados, tratados ou não com probióticos, houve aumento na produção de muco pelas células caliciformes, quando comparamos com seus respectivos controles.

A produção de muco foi menor nos animais sensibilizados tratados com as doses de 2×10^8 UFC/mL de *S. cerevisiae* 905 ou *S. boulardii* quando comparados com os grupos sensibilizados não tratados. Sabe-se que *S. cerevisiae* 905 é capaz de sobreviver no trato gastrointestinal de camundongos, protegendo esses animais contra o desafio oral com *Salmonella* Typhimurium ou *C. difficile*, pela modulação

da imunidade sistêmica e local (MARTINS, 2004). Neste caso, a levedura induz, por exemplo, a produção de IgA secretória no intestino (MARTINS *et al.*, 2005). Do mesmo modo, a administração da levedura *S. boulardii* ocasiona uma melhora da resposta imune intestinal em ratos e camundongos pelo aumento da produção de IgA secretória (BUTS *et al.*, 1990; RODRIGUES *et al.*, 2000). É provável que o tratamento com esses probióticos, aumentando as barreiras de entrada do antígeno no intestino, leve à diminuição da produção de muco pelas células caliciformes como um reflexo indireto, uma vez que a levedura é capaz de aumentar outras barreiras à entrada de antígeno no intestino, não sendo mais necessário o aumento de muco com essa função.

Outra alteração da mucosa intestinal de camundongos BALB/c decorrente da alergia alimentar é o aumento do infiltrado de eosinófilos durante todo o período de ingestão do antígeno (SALDANHA *et al.*, 2004). Eosinófilos são células que possuem a habilidade de realizar várias funções imunes, incluindo a apresentação de antígenos (SHI *et al.*, 2000; MACKENZIE *et al.*, 2001) e exacerbação das respostas inflamatórias pela capacidade de liberar citocinas e mediadores lipídicos (GLEICH & ADOLPHSON, 1986; WELLER, 1994). Eosinófilos não são residentes normais nos tecidos, mas requerem o recrutamento da circulação para o sítio do desafio alergênico (LAMPINEN *et al.*, 2004). Em doenças alérgicas crônicas, os eosinófilos são ativados pela IL-5 e atraídos por quimiocinas para o local da inflamação. Essas células são responsáveis pela fase tardia da reação alérgica imediata, produzindo proteína básica que é tóxica ao epitélio (CARA *et al.*, 2000).

Apenas nos grupos sensibilizados tratados com a dose de 2×10^3 UFC/mL de *S. cerevisiae* 905 ou com 2×10^8 UFC/mL de *S. boulardii* houve diminuição no infiltrado de eosinófilos na mucosa intestinal quando comparados aos animais sensibilizados não tratados. Possivelmente, esses probióticos nessas doses possuem algum efeito antiinflamatório que reduz o recrutamento dos eosinófilos da circulação para o intestino ou tenham um efeito que controla a homeostasia intestinal, mesmo na presença do antígeno. ANGULO e colaboradores (2006) observaram que ratos com colite experimental induzida e tratados com *L. casei* apresentaram redução na expressão de ICAM-1 e número de leucócitos infiltrados. FORSYTHE e colaboradores (2007) observaram que camundongos BALB/c sensibilizados com ovalbumina e tratados com o probiótico *L. reuteri* obtiveram redução no número de eosinófilos no lavado bronco alveolar.

O aumento do número de mastócitos também é decorrente de um quadro de alergia alimentar. Mastócitos estão presentes nas camadas do trato gastrointestinal, mas são localizados preferencialmente na lâmina própria da mucosa e na camada submucosa. Os mastócitos respondem à estimulação de IgE e liberam mediadores bioativos dentro dos tecidos adjacentes onde exercem respostas fisiológicas diretamente ou indiretamente via ativação de outras células efectoras (YU & PERDUE, 2001). Essas células exercem um papel importante iniciando a inflamação alérgica pela liberação de seus mediadores e citocinas.

No nosso estudo, o aumento no infiltrado de mastócitos no jejuno proximal observado no grupo de camundongos sensibilizados, quando comparados com camundongos controle dos seus respectivos grupos, está de acordo com o relatado por BRANDT e colaboradores (2003) no qual camundongos BALB/c sensibilizados e desafiados com ovalbumina continham número elevado de mastócitos no jejuno proximal, quando comparados ao grupo controle que foi desafiado com salina.

KIM e colaboradores (2005) observaram que a administração de probióticos bacterianos (*B. bifidum*, *L. casei* e *E. coli*) diminuiu os níveis de degranulação de mastócitos, reduzindo a resposta alérgica induzida por OVA em camundongos C3H/HeJ. MARGEL e colaborados (2008) observaram que altas doses de *E. coli* não patogênica inibe a degranulação de mastócitos peritoniais *in vitro*. Esses resultados sugerem um possível papel de probióticos na profilaxia ou tratamento de alergias. Em nosso estudo, diferente do observado no grupo de animais sensibilizados não tratados, os animais sensibilizados tratados com *S. cerevisiae* 905 (dose 200µL de 10^8 ou 10^9 UFC/mL) não apresentaram aumento do número de mastócitos infiltrados em relação ao seu grupo controle. Esses resultados sugerem um possível papel do probiótico *S. cerevisiae* 905 no tratamento do nosso modelo de alergia.

A variação nos efeitos das doses de probióticos utilizadas em nossos experimentos pode ser explicada por uma possível competição nutricional entre a microbiota residente no intestino e a levedura, levando a um desequilíbrio do ambiente gastrointestinal (FOOKS, 2002). Essa alteração poderia mascarar algum benefício no sistema imunológico do animal causado pelo tratamento com os probióticos.

Ambos probióticos nas diferentes doses utilizados nesse trabalho atuaram de maneira adversa nos parâmetros aqui estudados. É importante enfatizar que o

nosso estudo é pioneiro na utilização de probióticos eucariotos em modelos experimentais de alergia alimentar em camundongos. Portanto, novos estudos fazem-se necessários para avaliação do efeito desses probióticos no tratamento da alergia alimentar experimental em camundongos.

6: CONCLUSÕES

1. Camundongos submetidos ao protocolo de alergia alimentar tratados ou não com os probióticos apresentaram perda de peso na primeira semana após o desafio oral, com altos níveis de IgE, aumento na produção de muco, infiltrado de eosinófilos e mastócitos na mucosa intestinal.
2. O tratamento com *S. cerevisiae* 905 na dose de 2×10^3 UFC/mL foi eficaz em reverter a diminuição de peso, o infiltrado de eosinófilos na mucosa intestinal encontrados em camundongos BALB/c com alergia alimentar.
3. O tratamento com *S. boulardii* na dose de 2×10^8 UFC/mL foi eficaz em diminuir o aumento na produção de muco e o infiltrado de eosinófilos na mucosa intestinal, encontrados em camundongos BALB/c com alergia alimentar.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Aiba, Y., N. Suzuki, et al. (1998). "Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model." Am J Gastroenterol 93(11): 2097-101.

Akdis, C. A. and K. Blaser (2003). "Histamine in the immune regulation of allergic inflammation." J Allergy Clin Immunol 112(1): 15-22.

Alander, M., R. Satokari, et al. (1999). "Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption." Appl Environ Microbiol 65(1): 351-4.

Allez, M., J. Brimnes, et al. (2002). "Expansion of CD8⁺ T cells with regulatory function after interaction with intestinal epithelial cells." Gastroenterology 123(5): 1516-26.

Angulo, S., M. Llopis, et al. (2006). "Lactobacillus casei prevents the upregulation of ICAM-1 expression and leukocyte recruitment in experimental colitis." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 291(6): G1155-62.

Armuzzi, A., F. Cremonini, et al. (2001). "Effect of *Lactobacillus* GG supplementation on antibiotic-associated gastrointestinal side effects during *Helicobacter pylori* eradication therapy: a pilot study." Digestion 63(1): 1-7.

Arvola, T., E. Moilanen, et al. (2004). "Weaning to hypoallergenic formula improves gut barrier function in breast-fed infants with atopic eczema." J Pediatr Gastroenterol Nutr 38(1): 92-6.

Asahara, T., K. Nomoto, et al. (2001). "Antimicrobial activity of intraurethrally administered probiotic *Lactobacillus casei* in a murine model of *Escherichia coli* urinary tract infection." Antimicrob Agents Chemother 45(6): 1751-60.

Bacharier, L. B. and R. S. Geha (2000). "Molecular mechanisms of IgE regulation." J Allergy Clin Immunol 105(2 Pt 2): S547-58.

Bartlett, J. G. (1992). "Antibiotic-associated diarrhea." Clin Infect Dis 15(4): 573-81.

Bayona Gonzales, A.; Lopez Camara, V.; Gomez Castellanos, A. (1990). "Prevención de caries por lactobacilos (resultados finales de un ensayo clínico sobre caries dental con lactobacilos muertos [estreptococos y lactobacilos] por via oral). (Prevention of caries with lactobacillus (final results of a clinical trial on dental caries with killed lactobacillus [streptococcus and lactobacillus] given orally)". Pract. Odontol., v. 11, p. 37-39,.

Beena, A. and V. Prasad (1997). "Effect of yogurt and bifidus yogurt fortified with skim milk powder, condensed whey and lactose-hydrolysed condensed whey on serum cholesterol and triacylglycerol levels in rats." J Dairy Res 64(3): 453-7.

Bengmark, S. (1998). "Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora." Gut 42(1): 2-7.

Bernet, M. F., D. Brassart, et al. (1994). "Lactobacillus acidophilus LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria." Gut 35(4): 483-9.

Bilsborough, J. and J. L. Viney (2004). "Gastrointestinal dendritic cells play a role in immunity, tolerance, and disease." Gastroenterology 127(1): 300-9.

Bingham, C. O., 3rd and K. F. Austen (2000). "Mast-cell responses in the development of asthma." J Allergy Clin Immunol 105(2 Pt 2): S527-34.

Blanchard, C., S. Durual, et al. (2004). "IL-4 and IL-13 up-regulate intestinal trefoil factor expression: requirement for STAT6 and de novo protein synthesis." J Immunol 172(6): 3775-83.

Bléhaut, H., Massot, J. et al. (1989). "Disposition kinetics of *Saccharomyces boulardii* in man and rat". Biopharm. Drug. Disp., v. 10, p. 353-364.

Bleichner, G., H. Blehaut, et al. (1997). "Saccharomyces boulardii prevents diarrhea in critically ill tube-fed patients. A multicenter, randomized, double-blind placebo-controlled trial." Intensive Care Med 23(5): 517-23.

Bock, S. A. (1987). "Prospective appraisal of complaints of adverse reactions to foods in children during the first 3 years of life." Pediatrics 79(5): 683-8.

Boddy, A. V., G. W. Elmer, et al. (1991). "Influence of antibiotics on the recovery and kinetics of Saccharomyces boulardii in rats." Pharm Res 8(6): 796-800.

Born, P., C. Lersch, et al. (1993). "[The Saccharomyces boulardii therapy of HIV-associated diarrhea]." Dtsch Med Wochenschr 118(20): 765.

Bradley, D. (1997). "Linking isocyanates and asthma." Anal Chem 69(11): 339A.

Brandt, E. B., R. T. Strait, et al. (2003). "Mast cells are required for experimental oral allergen-induced diarrhea." J Clin Invest 112(11): 1666-77.

Bressler, R. B., J. Lesko, et al. (1997). "Production of IL-5 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by naive human mast cells activated by high-affinity IgE receptor ligation." J Allergy Clin Immunol 99(4): 508-14.

Burd, P. R., W. C. Thompson, et al. (1995). "Activated mast cells produce interleukin 13." J Exp Med 181(4): 1373-80.

Busscher, H. J., A. F. Mulder, et al. (1999). "In vitro adhesion to enamel and in vivo colonization of tooth surfaces by Lactobacilli from a bio-yoghurt." Caries Res 33(5): 403-4.

Buts, J. P., P. Bernasconi, et al. (1990). "Stimulation of secretory IgA and secretory component of immunoglobulins in small intestine of rats treated with Saccharomyces boulardii." Dig Dis Sci 35(2): 251-6.

Buts, J. P., P. Bernasconi, et al. (1986). "Response of human and rat small intestinal mucosa to oral administration of *Saccharomyces boulardii*." Pediatr Res 20(2): 192-6.

Buts, J. P., N. De Keyser, et al. (2002). "Saccharomyces boulardii enhances N-terminal peptide hydrolysis in suckling rat small intestine by endoluminal release of a zinc-binding metalloprotease." Pediatr Res 51(4): 528-34.

Caetano, J. A., M. T. Paramez, et al. (1986). "Immunopharmacological effects of *Saccharomyces boulardii* in healthy human volunteers." Int J Immunopharmacol 8(3): 245-59.

Cangemi de Gutierrez, R. C., V. S. Santos de Araoz, et al. (2000). "Effect of intranasal administration of *Lactobacillus fermentum* on the respiratory tract of mice." Biol Pharm Bull 23(8): 973-8.

Cara, D. C., D. Negrao-Correa, et al. (2000). "Mechanisms underlying eosinophil trafficking and their relevance in vivo." Histol Histopathol 15(3): 899-920.

Castagliuolo, I., J. T. LaMont, et al. (1996). "Saccharomyces boulardii protease inhibits *Clostridium difficile* toxin A effects in the rat ileum." Infect Immun 64(12): 5225-32.

Chandan, R. C. (1999). "Enhancing market value of milk by adding cultures." J Dairy Sci 82(10): 2245-56.

Chehade, M. and L. Mayer (2005). "Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities." J Allergy Clin Immunol 115(1): 3-12; quiz 13.

Chen, Y., K. Chou, et al. (2002). "Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells." Proc Natl Acad Sci U S A 99(22): 14338-43.

Cheroutre, H. (2004). "Starting at the beginning: new perspectives on the biology of mucosal T cells." Annu Rev Immunol 22: 217-46.

Choi, I. W., Y. S. Kim, et al. (2003). "Platelet-activating factor-mediated NF-kappaB dependency of a late anaphylactic reaction." J Exp Med 198(1): 145-51.

Ciriello, C.J.; Lachance, M.A. YEASTCOMPARE. University of Western Ontario, London, ON, Canada, (2001).

Coconnier, M. H., V. Lievin, et al. (1998). "Antagonistic activity against Helicobacter infection in vitro and in vivo by the human Lactobacillus acidophilus strain LB." Appl Environ Microbiol 64(11): 4573-80.

Corthier, G., F. Lucas, et al. (1992). "Effect of oral Saccharomyces boulardii treatment on the activity of Clostridium difficile toxins in mouse digestive tract." Toxicon 30(12): 1583-9.

Costalos, C., V. Skouteri, et al. (2003). "Enteral feeding of premature infants with Saccharomyces boulardii." Early Hum Dev 74(2): 89-96.

Dahan, S., F. Roth-Walter, et al. (2007). "Epithelia: lymphocyte interactions in the gut." Immunol Rev 215: 243-53.

Dalmaso, G., F. Cottrez, et al. (2006). "Saccharomyces boulardii inhibits inflammatory bowel disease by trapping T cells in mesenteric lymph nodes." Gastroenterology 131(6): 1812-25.

D'Amato, G., A. Salzillo, et al. (2007). "A review of anti-IgE monoclonal antibody (omalizumab) as add on therapy for severe allergic (IgE-mediated) asthma." Ther Clin Risk Manag 3(4): 613-9.

de Champs, C., N. Maroncle, et al. (2003). "Persistence of colonization of intestinal mucosa by a probiotic strain, Lactobacillus casei subsp. rhamnosus Lcr35, after oral consumption." J Clin Microbiol 41(3): 1270-3.

Debard, N., F. Sierro, et al. (2001). "Effect of mature lymphocytes and lymphotoxin on the development of the follicle-associated epithelium and M cells in mouse Peyer's patches." Gastroenterology 120(5): 1173-82.

Eigenmann, P. A. (2002). "T lymphocytes in food allergy: overview of an intricate network of circulating and organ-resident cells." Pediatr Allergy Immunol 13(3): 162-71.

Elmer, G. W. and G. Corthier (1991). "Modulation of *Clostridium difficile* induced mortality as a function of the dose and the viability of the *Saccharomyces boulardii* used as a preventative agent in gnotobiotic mice." Can J Microbiol 37(4): 315-7.

Elmer, G. W. and L. V. McFarland (2001). "Biotherapeutic agents in the treatment of infectious diarrhea." Gastroenterol Clin North Am 30(3): 837-54.

Elmer, G. W., C. M. Surawicz, et al. (1996). "Biotherapeutic agents. A neglected modality for the treatment and prevention of selected intestinal and vaginal infections." Jama 275(11): 870-6.

Eyssen, H. (1973). "Role of the gut microflora in metabolism of lipids and sterols." Proc Nutr Soc 32(2): 59-63.

Fagarasan, S. and T. Honjo (2003). "Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences." Nat Rev Immunol 3(1): 63-72.

FAO/WHO. "Food and Agriculture Organization / World Health Organization". Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada. 11p. April 30 and May 1 2002.

Faria, A. M. and H. L. Weiner (2006). "Oral tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases." Clin Dev Immunol 13(2-4): 143-57.

Ferraris, R. P., S. A. Villenas, et al. (1992). "Regulation of brush-border enzyme activities and enterocyte migration rates in mouse small intestine." Am J Physiol 262(6 Pt 1): G1047-59.

Fietto, J. L., R. S. Araujo, et al. (2004). "Molecular and physiological comparisons between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*." Can J Microbiol 50(8): 615-21.

Figueiredo, P. P., E. C. Vieira, et al. (2001). "Influence of oral inoculation with plasmid-free human Escherichia coli on the frequency of diarrhea during the first year of life in human newborns." J Pediatr Gastroenterol Nutr 33(1): 70-4.

Finkelman, F. D., M. E. Rothenberg, et al. (2005). "Molecular mechanisms of anaphylaxis: lessons from studies with murine models." J Allergy Clin Immunol 115(3): 449-57; quiz 458.

Florastor, (2003). Disponível em <http://www.florastor.com>. Acessado em 06 de outubro de 2003.

Florastor, (2007). Disponível em <http://www.florastor.com>. Acessado em 01 de julho de 2007.

Fooks, L. J. and G. R. Gibson (2002). "Probiotics as modulators of the gut flora." Br J Nutr 88 Suppl 1: S39-49.

Forsythe, P., M. D. Inman, et al. (2007). "Oral treatment with live Lactobacillus reuteri inhibits the allergic airway response in mice." Am J Respir Crit Care Med 175(6): 561-9.

Foster, P. S., M. Yang, et al. (2002). "CD4(+) T-lymphocytes regulate airway remodeling and hyper-reactivity in a mouse model of chronic asthma." Lab Invest 82(4): 455-62.

Fu, Y. X. and D. D. Chaplin (1999). "Development and maturation of secondary lymphoid tissues." Annu Rev Immunol 17: 399-433.

Fujiwara, D., S. Inoue, et al. (2004). "The anti-allergic effects of lactic acid bacteria are strain dependent and mediated by effects on both Th1/Th2 cytokine expression and balance." Int Arch Allergy Immunol 135(3): 205-15.

Fukushima, M. and M. Nakano (1996). "Effects of a mixture of organisms, *Lactobacillus acidophilus* or *Streptococcus faecalis* on cholesterol metabolism in rats fed on a fat- and cholesterol-enriched diet." Br J Nutr 76(6): 857-67.

Fuller, R. (1989). "Probiotics in man and animals." J Appl Bacteriol 66(5): 365-78.

Fuller, R. Probiotics - The Scientific Basis. Chapter 1 Edited by R. Fuller, Chapman & Hall, Reading UK, p. 1-8 (1992).

Furrie, E. (2005). "Probiotics and allergy." Proc Nutr Soc 64(4): 465-9.

Girard, P., Y. Pansart, et al. (2005). "Inducible nitric oxide synthase involvement in the mechanism of action of *Saccharomyces boulardii* in castor oil-induced diarrhoea in rats." Nitric Oxide 13(3): 163-9.

Girard, P., Y. Pansart, et al. (2003). "Dose-response relationship and mechanism of action of *Saccharomyces boulardii* in castor oil-induced diarrhea in rats." Dig Dis Sci 48(4): 770-4.

Gleich, G. J. and C. R. Adolphson (1986). "The eosinophilic leukocyte: structure and function." Adv Immunol 39: 177-253.

Gleich, G. J., E. Frigas, et al. (1979). "Cytotoxic properties of the eosinophil major basic protein." J Immunol 123(6): 2925-7.

Goldin, B. R. (1998). "Health benefits of probiotics." Br J Nutr 80(4): S203-7.

Granette, C., H. Muller-Alouf, et al. (2001). "Mucosal immune responses and protection against tetanus toxin after intranasal immunization with recombinant *Lactobacillus plantarum*." Infect Immun 69(3): 1547-53.

Guslandi, M., G. Mezzi, et al. (2000). "*Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease." Dig Dis Sci 45(7): 1462-4.

Hallen, A., C. Jarstrand, et al. (1992). "Treatment of bacterial vaginosis with lactobacilli." Sex Transm Dis 19(3): 146-8.

He, F., H. Morita, et al. (2002). "Stimulation of the secretion of pro-inflammatory cytokines by Bifidobacterium strains." Microbiol Immunol 46(11): 781-5.

Helm, R. M. and A. W. Burks (2000). "Mechanisms of food allergy." Curr Opin Immunol 12(6): 647-53.

Helm, R. M., G. T. Furuta, et al. (2002). "A neonatal swine model for peanut allergy." J Allergy Clin Immunol 109(1): 136-42.

Hilton, E., H. D. Isenberg, et al. (1992). "Ingestion of yogurt containing Lactobacillus acidophilus as prophylaxis for candidal vaginitis." Ann Intern Med 116(5): 353-7.

Hirayama, K. and J. Rafter (2000). "The role of probiotic bacteria in cancer prevention." Microbes Infect 2(6): 681-6.

Hogan, S. P., A. Mishra, et al. (2000). "A critical role for eotaxin in experimental oral antigen-induced eosinophilic gastrointestinal allergy." Proc Natl Acad Sci U S A 97(12): 6681-6.

Hoppu, U., M. Kalliomaki, et al. (2001). "Breast milk--immunomodulatory signals against allergic diseases." Allergy 56 Suppl 67: 23-6.

Isolauri, E. (2001). "Probiotics in the prevention and treatment of allergic disease." Pediatr Allergy Immunol 12 Suppl 14: 56-9.

Isolauri, E., T. Arvola, et al. (2000). "Probiotics in the management of atopic eczema." Clin Exp Allergy 30(11): 1604-10.

Isolauri, E., S. Rautava, et al. (2002). "Role of probiotics in food hypersensitivity." Curr Opin Allergy Clin Immunol 2(3): 263-71.

Iwabuchi, N., N. Takahashi, et al. (2007). "In vitro Th1 cytokine-independent Th2 suppressive effects of bifidobacteria." Microbiol Immunol 51(7): 649-60.

Jahn, H. U., R. Ullrich, et al. (1996). "Immunological and trophical effects of *Saccharomyces boulardii* on the small intestine in healthy human volunteers." Digestion 57(2): 95-104.

Kabir, A. M., Y. Aiba, et al. (1997). "Prevention of *Helicobacter pylori* infection by lactobacilli in a gnotobiotic murine model." Gut 41(1): 49-55.

Kaila, M., E. Isolauri, et al. (1995). "Viable versus inactivated lactobacillus strain GG in acute rotavirus diarrhoea." Arch Dis Child 72(1): 51-3.

Kaila, M., E. Isolauri, et al. (1992). "Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain." Pediatr Res 32(2): 141-4.

Kalliomaki, M. and E. Isolauri (2003). "Role of intestinal flora in the development of allergy." Curr Opin Allergy Clin Immunol 3(1): 15-20.

Kalliomaki, M., S. Salminen, et al. (2001). "Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial." Lancet 357(9262): 1076-9.

Kalliomaki, M., S. Salminen, et al. (2003). "Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial." Lancet 361(9372): 1869-71.

Kedinger, M., I. Duluc, et al. (1998). "Intestinal epithelial-mesenchymal cell interactions." Ann N Y Acad Sci 859: 1-17.

Kemp, S. F. and R. F. Lockey (2002). "Anaphylaxis: a review of causes and mechanisms." J Allergy Clin Immunol 110(3): 341-8.

Kim, H., K. Kwack, et al. (2005). "Oral probiotic bacterial administration suppressed allergic responses in an ovalbumin-induced allergy mouse model." FEMS Immunol Med Microbiol 45(2): 259-67.

Kirjavainen, P. V., E. Apostolou, et al. (2001). "Characterizing the composition of intestinal microflora as a prospective treatment target in infant allergic disease." FEMS Immunol Med Microbiol 32(1): 1-7.

Kirjavainen, P. V., S. J. Salminen, et al. (2003). "Probiotic bacteria in the management of atopic disease: underscoring the importance of viability." J Pediatr Gastroenterol Nutr 36(2): 223-7.

Kotowicz, K. and R. E. Callard (1993). "Human immunoglobulin class and IgG subclass regulation: dual action of interleukin-4." Eur J Immunol 23(9): 2250-6.

Kurtzman, C.P.; Fell, J.W. The Yeasts: a Taxonomic Study. 4th ed. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, (1998).

Laiho, K., A. Ouwehand, et al. (2002). "Inventing probiotic functional foods for patients with allergic disease." Ann Allergy Asthma Immunol 89(6 Suppl 1): 75-82.

Lampinen, M., M. Carlson, et al. (2004). "Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease." Allergy 59(8): 793-805.

Lee, S. K., H. J. Kim, et al. (2005). "[Saccharomyces boulardii activates expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in HT-29 cells]." Korean J Gastroenterol 45(5): 328-34.

Lievin-Le Moal, V. and A. L. Servin (2006). "The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota." Clin Microbiol Rev 19(2): 315-37.

Lilly, D. M. and R. H. Stillwell (1965). "Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms." Science 147: 747-8.

Lima-Filho, J. V., L. Q. Vieira, et al. (2004). "Effect of the Escherichia coli EMO strain on experimental infection by Salmonella enterica serovar Typhimurium in gnotobiotic mice." Braz J Med Biol Res 37(7): 1005-13.

Lin, S. Y., J. W. Ayres, et al. (1989). "Lactobacillus effects on cholesterol: in vitro and in vivo results." J Dairy Sci 72(11): 2885-99.

Louvard, D., M. Kedinger, et al. (1992). "The differentiating intestinal epithelial cell: establishment and maintenance of functions through interactions between cellular structures." Annu Rev Cell Biol 8: 157-95.

Lukacs, N. W. (2001). "Role of chemokines in the pathogenesis of asthma." Nat Rev Immunol 1(2): 108-16.

MacGlashan, D., Jr., J. McKenzie-White, et al. (1998). "In vitro regulation of FcepsilonRIalpha expression on human basophils by IgE antibody." Blood 91(5): 1633-43.

MacGlashan, D. W., Jr., B. S. Bochner, et al. (1997). "Down-regulation of Fc(epsilon)RI expression on human basophils during in vivo treatment of atopic patients with anti-IgE antibody." J Immunol 158(3): 1438-45.

MacKenzie, J. R., J. Mattes, et al. (2001). "Eosinophils promote allergic disease of the lung by regulating CD4(+) Th2 lymphocyte function." J Immunol 167(6): 3146-55.

Magnusson, K. E. and I. Stjernstrom (1982). "Mucosal barrier mechanisms. Interplay between secretory IgA (SIgA), IgG and mucins on the surface properties and association of salmonellae with intestine and granulocytes." Immunology 45(2): 239-48.

Mansour-Ghanaei, F., N. Dehbashi, et al. (2003). "Efficacy of saccharomyces boulardii with antibiotics in acute amoebiasis." World J Gastroenterol 9(8): 1832-3.

Marshall, J. S. (2004). "Mast-cell responses to pathogens." Nat Rev Immunol 4(10): 787-99.

Marteau, P. R., M. de Vrese, et al. (2001). "Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics." Am J Clin Nutr 73(2 Suppl): 430S-436S.

Martins, F.S. Capacidade de colonização do trato gastrointestinal de camundongos NIH isentos de germes e convencionais e de proteção contra bactérias enteropatogênicas como critérios de seleção de leveduras de origem ambiental como probióticos. (Dissertação, Mestrado). Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. (2004). 127p.

Martins, F. S. Efeito de dois probióticos, *Saccharomyces boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae* linhagem UFMG 905, na resposta inflamatória induzida por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar. Typhimurium. Belo Horizonte, (Doutorado). Departamento de Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (2008). 220p.

Martins, F. S., R. M. Nardi, et al. (2005a). "Screening of yeasts as probiotic based on capacities to colonize the gastrointestinal tract and to protect against enteropathogen challenge in mice." J Gen Appl Microbiol 51(2): 83-92.

Martins, F. S., Neves, M. J., et al. (2005b). "Comparação de seis produtos probióticos contendo *Saccharomyces boulardii*". Revista Brasileira de Medicina, v. 62, p. 151-155,

Matsuzaki, T. and J. Chin (2000). "Modulating immune responses with probiotic bacteria." Immunol Cell Biol 78(1): 67-73.

Mayer, L. (2003). "Mucosal immunity." Pediatrics 111(6 Pt 3): 1595-600.

McCracken, V. J. and R. G. Lorenz (2001). "The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota." Cell Microbiol 3(1): 1-11.

McFarland, L. V. (1996). "Saccharomyces boulardii is not Saccharomyces cerevisiae." Clin Infect Dis 22(1): 200-1.

McFarland, L. V. (2000). "Beneficial microbes: health or hazard?" Eur J Gastroenterol Hepatol 12(10): 1069-71.

McFarland, L. V, Bernasconi, P. (1993). "Saccharomyces boulardii: A review of an innovative biotherapeutic agent". Microb. Ecol. Health Dis., v. 6, p. 157-171.

McFarland, L. V., C. M. Surawicz, et al. (1995). "Prevention of beta-lactam-associated diarrhea by Saccharomyces boulardii compared with placebo." Am J Gastroenterol 90(3): 439-48.

McFarland, L. V., C. M. Surawicz, et al. (1994). "A randomized placebo-controlled trial of Saccharomyces boulardii in combination with standard antibiotics for Clostridium difficile disease." Jama 271(24): 1913-8.

Mestecky, J., M. W. Russell, et al. (1999). "Intestinal IgA: novel views on its function in the defence of the largest mucosal surface." Gut 44(1): 2-5.

Metchnikoff, E. The Prolongation of Life. Heinemann, London, UK (1907).

Miller, H., J. Zhang, et al. (2007). "Intestinal M cells: the fallible sentinels?" World J Gastroenterol 13(10): 1477-86.

Minervini, F., F. Algaron, et al. (2003). "Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from Lactobacillus helveticus PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species." Appl Environ Microbiol 69(9): 5297-305.

Mishra, A., S. P. Hogan, et al. (1999). "Fundamental signals that regulate eosinophil homing to the gastrointestinal tract." J Clin Invest 103(12): 1719-27.

Montgomery, R. K., A. E. Mulberg, et al. (1999). "Development of the human gastrointestinal tract: twenty years of progress." Gastroenterology 116(3): 702-31.

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

Mowat, A. M. (2003). "Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens." Nat Rev Immunol 3(4): 331-41.

Neumann, E., M. A. Oliveira, et al. (1998). "Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice." Braz J Med Biol Res 31(12): 1565-73.

Neutra, M. R., N. J. Mantis, et al. (2001). "Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues." Nat Immunol 2(11): 1004-9.

Nicoli, J. R., Raibaud, P. (1990). "*In vivo* and *in vitro* antagonistic effect against *Clostridium perfringens* of a diffusible compound produced by a *Peptostreptococcus* sp. from human intestinal flora in mice". Microecol. Ther., v. 20, p. 141-146,.

Nicoli, J. R., Vieira, L. Q. (2000). "Probióticos, prebióticos e simbióticos: moduladores do ecossistema digestivo". Ciência Hoje, v. 28, p. 34-38.

Ouellette, A. J. (1999). "IV. Paneth cell antimicrobial peptides and the biology of the mucosal barrier." Am J Physiol 277(2 Pt 1): G257-61.

Ouwehand, A. C., S. Salminen. "The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria" (1998). Int. Dairy J., v. 8, p. 749-758.

Ouwehand, A. C., S. Salminen, et al. (2002). "Probiotics: an overview of beneficial effects." Antonie Van Leeuwenhoek 82(1-4): 279-89.

Parent, D., M. Bossens, et al. (1996). "Therapy of bacterial vaginosis using exogenously-applied *Lactobacilli acidophili* and a low dose of estriol: a placebo-controlled multicentric clinical trial." Arzneimittelforschung 46(1): 68-73.

Perdigon, G., S. Alvarez, et al. (1995). "Immune system stimulation by probiotics." J Dairy Sci 78(7): 1597-606.

Perdigon, G., J. C. Valdez, et al. (1998). "Antitumour activity of yogurt: study of possible immune mechanisms." J Dairy Res 65(1): 129-38.

Peret Filho, L. A., F. J. Penna, et al. (1998). "Dose effect of oral *Saccharomyces boulardii* treatments on morbidity and mortality in immunosuppressed mice." J Med Microbiol 47(2): 111-6.

Plaut, M. (1993). "Cytokines and modulation of diseases of immediate hypersensitivity." Ann N Y Acad Sci 685: 512-20.

Qamar, A., S. Aboudola, et al. (2001). "*Saccharomyces boulardii* stimulates intestinal immunoglobulin A immune response to *Clostridium difficile* toxin A in mice." Infect Immun 69(4): 2762-5.

Rautava, S. and E. Isolauri (2002). "The development of gut immune responses and gut microbiota: effects of probiotics in prevention and treatment of allergic disease." Curr Issues Intest Microbiol 3(1): 15-22.

Reeves, P. G., F. H. Nielsen, et al. (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." J Nutr 123(11): 1939-51.

Reid, G. (2000). "Probiotic Therapy and Functional Foods for Prevention of Urinary Tract Infections: State of the Art and Science." Curr Infect Dis Rep 2(6): 518-522.

Reid, G. and A. W. Bruce (1995). "Low vaginal pH and urinary-tract infection." Lancet 346(8991-8992): 1704.

Reid, G., A. W. Bruce, et al. (2001). "Oral probiotics can resolve urogenital infections." FEMS Immunol Med Microbiol 30(1): 49-52.

Roberfroid, M. B. (2001). "Prebiotics: preferential substrates for specific germs?" Am J Clin Nutr 73(2 Suppl): 406S-409S.

Rodrigues, A. C., D. C. Cara, et al. (2000). "Saccharomyces boulardii stimulates sIgA production and the phagocytic system of gnotobiotic mice." J Appl Microbiol 89(3): 404-14.

Rothenberg, M. E. (2001). "Gastrointestinal eosinophils." Allergy 56 Suppl 67: 21-2.

Rothenberg, M. E. and S. P. Hogan (2006). "The eosinophil." Annu Rev Immunol 24: 147-74.

Saavedra, J. M. (1995). "Microbes to fight microbes: a not so novel approach to controlling diarrheal disease." J Pediatr Gastroenterol Nutr 21(2): 125-9.

Saint-Marc, T., L. Rossello-Prats, et al. (1991). "[Efficacy of Saccharomyces boulardii in the treatment of diarrhea in AIDS]." Ann Med Interne (Paris) 142(1): 64-5.

Saldanha, J. C. D. S. Estudo dos mecanismos envolvidos na mudança de condição de susceptibilidade à Leishmania (Leishmania) major em camundongos com alergia alimentar. (Doutorado). Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006. 91 p.

Saldanha, J. C., D. L. Gargiulo, et al. (2004). "A model of chronic IgE-mediated food allergy in ovalbumin-sensitized mice." Braz J Med Biol Res 37(6): 809-16.

Sampson, H. A. (1999). "Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders." J Allergy Clin Immunol 103(5 Pt 1): 717-28.

Sanders, M. E., D. C. Walker, et al. (1996). "Performance of commercial cultures in fluid milk applications." J Dairy Sci 79(6): 943-55.

Scarpignato, C. and P. Rampal (1995). "Prevention and treatment of traveler's diarrhea: a clinical pharmacological approach." Chemotherapy 41 Suppl 1: 48-81.

Schiffrin, E. J., D. Brassart, et al. (1997). "Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection." Am J Clin Nutr 66(2): 515S-520S.

Scholl, I., E. Untersmayr, et al. (2005). "Antiulcer drugs promote oral sensitization and hypersensitivity to hazelnut allergens in BALB/c mice and humans." Am J Clin Nutr 81(1): 154-60.

Schrezenmeir, J. and M. de Vrese (2001). "Probiotics, prebiotics, and synbiotics--approaching a definition." Am J Clin Nutr 73(2 Suppl): 361S-364S.

Schwab, D., S. Muller, et al. (2003). "Functional and morphologic characterization of eosinophils in the lower intestinal mucosa of patients with food allergy." Am J Gastroenterol 98(7): 1525-34.

Seibold, F. (2005). "Food-induced immune responses as origin of bowel disease?" Digestion 71(4): 251-60.

Shi, H. Z. (2004). "Eosinophils function as antigen-presenting cells." J Leukoc Biol 76(3): 520-7.

Shi, H. Z., A. Humbles, et al. (2000). "Lymph node trafficking and antigen presentation by endobronchial eosinophils." J Clin Invest 105(7): 945-53.

Sicherer, S. H. (2002). "Food allergy." Lancet 360(9334): 701-10.

Silva, A. M., E. A. Bamber, et al. (1999). "Protective effect of bifidus milk on the experimental infection with *Salmonella enteritidis* subsp. typhimurium in conventional and gnotobiotic mice." J Appl Microbiol 86(2): 331-6.

Silva, M., N. V. Jacobus, et al. (1987). "Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain." Antimicrob Agents Chemother 31(8): 1231-3.

Silva, S. H., E. C. Vieira, et al. (2001). "Antagonism against *Vibrio cholerae* by diffusible substances produced by bacterial components of the human faecal microbiota." J Med Microbiol 50(2): 161-4.

Sunada, Y., S. Nakamura, et al. (2007). "Effects of *Lactobacillus acidophilus* strain L-55 on experimental allergic rhinitis in BALB/c mice." Biol Pharm Bull 30(11): 2163-6.

Surawicz, C. M. (2003). "Probiotics, antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* diarrhoea in humans." Best Pract Res Clin Gastroenterol 17(5): 775-83.

Surawicz, C. M., G. W. Elmer, et al. (1989). "Prevention of antibiotic-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii*: a prospective study." Gastroenterology 96(4): 981-8.

Takahashi, N., H. Kitazawa, et al. (2006). "Immunostimulatory oligodeoxynucleotide from *Bifidobacterium longum* suppresses Th2 immune responses in a murine model." Clin Exp Immunol 145(1): 130-8.

Tannock, G. W. (1986). "Microbial interactions and influences in gastrointestinal tract. *Lactobacilli* and the gastrointestinal tract". Proc. IV ISME, p. 526-532.

Teitelbaum, J. E. and W. A. Walker (2002). "Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms." Annu Rev Nutr 22: 107-38.

Tejada-Simon, M. V., J. H. Lee, et al. (1999). "Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* to potentiate immunoglobulin A responses to cholera toxin in mice." J Dairy Sci 82(4): 649-60.

Untersmayr, E. and E. Jensen-Jarolim (2006). "Mechanisms of type I food allergy." Pharmacol Ther 112(3): 787-98.

Vandenberg, P.A. (1993). Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. FEMS Microbiol. Rev., v. 12, p. 221-238.

van der Heijden, P. J., W. Stok, et al. (1987). "Contribution of immunoglobulin-secreting cells in the murine small intestine to the total 'background' immunoglobulin production." Immunology 62(4): 551-5.

van Wijk, F. and L. Knippels (2007). "Initiating mechanisms of food allergy: Oral tolerance versus allergic sensitization." Biomed Pharmacother 61(1): 8-20.

Vesa, T. H., P. Marteau, et al. (2000). "Lactose intolerance." J Am Coll Nutr 19(2 Suppl): 165S-175S.

Vianna, Cristina Roscoe "Efeito do estresse térmico e alcoólico no metabolismo da trealose e expressão das proteínas de choque térmico em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas durante a produção da cachaça mineira". Belo Horizonte, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Brasil, (Dissertação, Mestrado) (2003).

Wasserman, S. I. (1983). "Mediators of immediate hypersensitivity." J Allergy Clin Immunol 72(2): 101-19.

Weller, P. F. (1994). "Eosinophils: structure and functions." Curr Opin Immunol 6(1): 85-90.

Wershil, B. K. and G. T. Furuta (2008). "4. Gastrointestinal mucosal immunity." J Allergy Clin Immunol 121(2 Suppl): S380-3; quiz S415.

Williams, L. W. and S. A. Bock (1999). "Skin testing and food challenges in allergy and immunology practice." Clin Rev Allergy Immunol 17(3): 323-38.

Yarrow, D. "Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts". In KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. The Yeasts: a Taxonomic Study. 4th ed. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, p. 77-100, (1998).

Yazdanbakhsh, M., P. G. Kremsner, et al. (2002). "Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis." Science 296(5567): 490-4.

Yu, L. C. and M. H. Perdue (2001). "Role of mast cells in intestinal mucosal function: studies in models of hypersensitivity and stress." Immunol Rev 179: 61-73.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)