

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**

RAQUEL FRAGOSO PEREIRA CAVALCANTI

**Efeito imunomodulador do *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) e
Lacticaseibacillus paracasei (LPc-G110) em modelo murino da Síndrome da
Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS)**

João Pessoa-PB

2023

RAQUEL FRAGOSO PEREIRA CAVALCANTI

**Efeito imunomodulador do *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) e
Lacticaseibacillus paracasei (LPc-G110) em modelo murino da Síndrome da
Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**. Área de concentração: **farmacologia**

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Regina Piuvezam

João Pessoa-PB

2023

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

C376e Cavalcanti, Raquel Fragoso Pereira.

Efeito imunomodulador do *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) e *Lacticaseibacillus paracasei* (LPc-G110) em modelo murino da Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS) / Raquel Fragoso Pereira Cavalcanti. - João Pessoa, 2023.
130 f. : il.

Orientação: Marcia Regina Piuvezam.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Patologia do sistema respiratório - CARAS. 2. Probióticos. 3. Antialérgico. 4. Imunomodulador. 5. Fator de transcrição. I. Piuvezam, Marcia Regina. II. Título.

UFPB/BC

CDU 616.2(043)

**Efeito imunomodulador do *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) e
Lacticaseibacillus paracasei (LPc-G110) em modelo murino da Síndrome da
Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS)**

Aprovada em 06/11/2023

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **MARCIA REGINA PIUVEZAM**
Data: 07/11/2023 08:31:08-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Profa. Dra. Marcia Regina Piuvezam
(Universidade Federal da Paraíba)
Orientadora**

Documento assinado digitalmente
 **ESTEFANIA FERNANDES GARCIA**
Data: 07/11/2023 12:09:22-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Profa. Dra. Estefânia Fernandes Garcia
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora externa**

Documento assinado digitalmente
 **THAIS FERNANDA DE CAMPOS FRAGA DA SILVA**
Data: 06/11/2023 21:45:36-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Profa. Dra. Thais Fernanda de Campos Fraga da Silva
(Universidade Federal de Alagoas)
Examinadora externa**

Documento assinado digitalmente
 **ROBSON CAVALCANTE VERAS**
Data: 06/11/2023 18:36:37-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador interno**

Documento assinado digitalmente
 **MIRIAN GRACIELA DA SILVA STIEBBE SALVADORI**
Data: 06/11/2023 19:02:52-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Prof. Dra. Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora interna**

Dedicatórias

Aos meus pais, Auxiliadora Fragoso e Edson Pereira, e irmãs, Sinara Fragoso e Sara Fragoso, por serem minha base, fonte de companheirismo e incentivadores em essência.

Ao meu querido esposo, Raphael Cavalcanti, por ser o símbolo de segurança do nosso lar e me conceder diariamente amor do Alto doado. Você é parte essencial desta conquista.

A vocês eu dedico.

Agradecimientos

No livro escrito pelo apóstolo Paulo aos Romanos, capítulo 13, versículo 7b, lê-se: *“a quem honra, honra”*. *Honra* significa “alta consideração, reconhecimento de valor”. Neste sentido, e ciente do esforço conjunto e não unitário empenhado para construção deste trabalho, eu devo honra a algumas pessoas que se fizeram presentes durante esses quase quatro anos:

A princípio, toda honra rendo ao meu Deus. Antes que eu pudesse imaginar a concretização deste trabalho, Ele, em toda sua onisciência, permitiu que toda uma trajetória fosse percorrida para amadurecimento pessoal e reconhecimento de sua infinita bondade. Definitivamente, reconheço que *“nada tenho que do céu não seja dado”* (João 3:27), e tudo que foi descoberto, registrado e proferido neste trabalho ocorreu com a permissão Dele.

Aos meus, sangue do meu sangue, pais, irmãs, esposo e familiares, vocês são o meu maior tesouro, pois me lembro bem que *“onde estiver o seu tesouro, aí também estará o seu coração”* (Mateus 6:21). Sou grata por nossa união com propósitos eternos.

A minha orientadora, Profa. Marcia Regina Piuvezam. Nosso vínculo festeja uma década, desde a graduação, em seguida mestrado, e agora, o doutorado. Como costume dizer, somos privilegiados por tê-la como instrutora científica e mais ainda, pelos ensinamentos com princípios, regados pela ética, humildade e disciplina. Muito obrigada por ter me orientado com tanta maestria e por ter um zelo especial ao que se propõe a fazer, afinal, *“a excelência honra a Deus e abençoa pessoas”*.

Ao doutorando e amigo-irmão científico, Francisco Allysson Gadelha. Quantas experiências vividas desde a iniciação científica, seja na bancada do laboratório em experimentos ou nos corredores da vida. Agradeço a Deus pela sua vida, é bem verdade que *“existe amigo mais chegado que um irmão”* (Provérbios 18:24).

Aos membros da qualificação Profa. Dra. Naiara Naiane Dejani, Profa. Dra. Estefânia Garcia e Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega, pela gentileza em aceitarem o convite e pelas suas valiosas contribuições sugerindo-as para engradecer o trabalho.

Aos membros da defesa de tese a Profa. Dra. Thais Fernanda de Campos Fraga, Profa. Dra. Estefânia Fernandes Garcia, Profa. Dra. Mirian Graciela da Silva Stiebbe e Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras, pela disponibilidade em participar da avaliação deste trabalho e pelas suas pertinentes sugestões.

Aos professores colaboradores, Prof. Dr. Adriano Francisco Alves, Prof. Dr. Fabio Silva e Profa. Leônia Maria Batista, pela disponibilidade e viabilização de metodologias descritas neste trabalho.

Aos membros que estão ou estiveram no Laboratório de Imunofarmacologia (LIMFA/UFPB), alunos e alunas das mais diversas formações, com um rico compilado de conhecimento, obrigado por todo o tempo dedicado em cada sugestão para abrilhantar este trabalho.

A Universidade Federal da Paraíba, além do apoio físico e institucional por fornecer recursos humanos que viabilizam a concretização de tantos sonhos.

Ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB) e ao IPeFarM (Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos) pelo apoio físico e institucional, servidores e colaboradores.

As agências de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por todo apoio financeiro, corporativo e pelo suporte técnico-científico.

A todos que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para minha formação profissional e concretização desta Tese de Doutorado.

Raquel Fragoso Pereira Cavalcanti

Resumo

RESUMO

A Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS) é uma doença inflamatória alérgica das vias aéreas orquestrada pela resposta imune tipo 2. As vias aéreas e o intestino são considerados interfaces em que há estreita interação. O intestino abriga uma extensa comunidade microbiana, conhecida como microbiota que exerce influência não apenas *in situ*, mas também em outros sistemas, como o sistema respiratório. Mecanismos específicos de comunicação entre as interfaces, via eixo intestino-pulmão, têm sido objeto de intensa investigação, no entanto, o efeito de agentes funcionais moduladores do intestino, como os probióticos, nos distúrbios alérgicos das vias aéreas não está totalmente elucidado. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação com o *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) ou com o *Lacticaseibacillus paracasei* (LPc-G110) em animais com CARAS. Camundongos BALB/c (n = 5) foram distribuídos em grupos Basal, *L. fermentum* (LF61), *L. paracasei* (LPc-G110), Alérgico (CARAS), suplementado com LF61 e alérgico (LF61/CARAS), suplementado com LPc-G110 e alérgico (LPc-G110/CARAS) e alérgico tratado com dexametasona (Dexa). Os protocolos experimentais foram aprovados pela CEUA/UFPB (7316150420). Camundongos BALB/c foram sensibilizados e desafiados com ovalbumina (OVA) após serem suplementados com 1×10^9 CFU de LF61 ou de LPc-G110. Os animais com CARAS e previamente suplementados com os probióticos, apresentaram diminuição ($p < 0,05$) da migração de células inflamatórias, principalmente eosinófilos, para os fluidos nasal (NALF) e broncoalveolar (BALF), bem como redução dos sinais clínicos da rinite alérgica, como espirros, fricções nasais, e hiper-reatividade nasal induzida pela histamina em comparação com animais com CARAS. No contexto sistêmico, o LF61 e o LPc-G110 reduziram a eosinofilia e os níveis séricos de IgE OVA-específica. Os aspectos histológicos alterados nos tecidos nasais e pulmonares de animais com CARAS foram significativamente melhorados pelo LF61 e LPc-G110. No BALF, o efeito imunomodulador se revelou pela diminuição das citocinas tipo 2 e 3 (IL-4, IL-13, IL-5 e IL-17A) correlacionado com o aumento das citocinas tipo 1 (IFN- γ) e T_{reg} (IL-10). Em adição, foi evidenciado modulação positiva do fator de transcrição FOXP3 e modulação negativa das MAPKs (p-p38 e p-ERK1/2). Esses efeitos se correlacionam com a amplificação da resposta intestinal, via aumento dos níveis de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), e manutenção da função de barreira do epitélio intestinal pelo aumento das junções de oclusão (ZO-1) corroborando a integridade do tecido do cólon. Portanto, os resultados desse estudo demonstram, de forma inédita, que o LF61 e o LPc-G110, administrados por via oral, modulam negativamente a resposta imune tipo 2 observada na CARAS, ativação de fator de transdução intracelular que induz a produção da molécula reguladora IL-10 e aumento dos ácidos graxos de cadeia curta (butirato, propionato e acetato).

Palavras-chave: CARAS, probióticos, antialérgico, imunomodulador, fator de transcrição.

Abstract

ABSTRACT

Combined allergic asthma and rhinitis syndrome (CARAS) is an allergic inflammatory disease of the airways orchestrated by the type 2 immune response. The airways and the intestine are considered interfaces in which there is close interaction. The intestine houses an extensive microbial community, known as microbiota, which exerts influence not only *in situ*, but also on other systems, such as the respiratory system. Specific mechanisms of communication between interfaces, via the gut-lung axis, have been the subject of intense investigation, however, the effect of gut-modulating functional agents, such as probiotics, on allergic airway disorders has not been fully elucidated. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of supplementation with *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) or *Lacticaseibacillus paracasei* (LPc-G110) in animals with CARAS. BALB/c mice (n = 5) were distributed into Basal, *L. fermentum* (LF61), *L. paracasei* (LPc-G110), Allergic (CARAS), supplemented with LF61 and Allergic (LF61/CARAS), supplemented with LPc groups. -G110 and allergic (LPc-G110/CARAS) and allergic treated with dexamethasone (Dexa). The experimental protocols were approved by CEUA/UFPB (7316150420). BALB/c mice were sensitized and challenged with ovalbumin (OVA) after being supplemented with 1×10^9 CFU of LF61 or LPc-G110. Animals with CARAS and previously supplemented with probiotics showed a decrease ($p < 0.05$) in the migration of inflammatory cells, mainly eosinophils, to the nasal (NALF) and bronchoalveolar (BALF) fluids, as well as a reduction in clinical signs of rhinitis, such as sneezing, nasal rubbing, and histamine-induced nasal hyperreactivity compared to animals with CARAS. In the systemic context, LF61 and LPc-G110 reduced eosinophilia and serum levels of OVA-specific IgE. The altered histological aspects in the nasal and lung tissues of animals with CARAS were significantly improved by LF61 and LPc-G110. In BALF, the immunomodulatory effect was revealed by the decrease in type 2 and 3 cytokines (IL-4, IL-13, IL-5 and IL-17A) correlated with the increase in type 1 (IFN- γ) and T_{reg} (IL -10). In addition, positive modulation of the transduction factor FOXP3 and negative modulation of MAPKs (p-p38 and p-ERK1/2) were evidenced. These effects correlate with the amplification of the intestinal response, via increased levels of short-chain fatty acids (SCFAs), and maintenance of the barrier function of the intestinal epithelium through the increase in occlusion junctions (ZO-1), corroborating the integrity of the intestinal colon tissue. Therefore, the results of this study demonstrate, in an unprecedented way, that LF61 and LPc-G110, administered orally, negatively modulate the type 2 immune response observed in CARAS, activation of intracellular transduction factor that induces the production of the regulatory molecule IL-10 and increased short-chain fatty acids (butyrate, propionate and acetate).

Keywords: CARAS, probiotics, antiallergic, immunomodulator, transcription factor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo fisiopatológico da Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS) mediado pela resposta imune T_H2	29
Figura 2 - Eixo intestino-vias aéreas	39
Figura 3 - Mecanismos de ação dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), acetato, propionato e butirato envolvidos na asma alérgica.....	41
Figura 4 - Esquema representativo do modelo experimental da Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).....	50
Figura 5 - Mapa conceitual dos efeitos da suplementação oral com o LF61 e LPc-G110 em modelo da Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).....	97

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Quantificação de espirros (A) e fricções nasais (B) em camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS) suplementados ou não com <i>Limosilactobacillus fermentum</i> (LF61) ou <i>Lactacaseibacillus paracasei</i> (LPc-G110).....	58
Gráfico 2 - Quantificação de espirros (A) e fricções nasais (B) em camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS) suplementados ou não com <i>Limosilactobacillus fermentum</i> (LF61) ou <i>Lactacaseibacillus paracasei</i> (LPc-G110) após administração de doses crescentes de histamina.....	60
Gráfico 3 - Efeito da suplementação com <i>Limosilactobacillus fermentum</i> (LF61) ou <i>Lactacaseibacillus paracasei</i> (LPc-G110) no número de células totais, eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e macrófagos no Fluido do Lavado Nasal (NALF) de camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).....	62
Gráfico 4 - Efeito da suplementação com <i>Limosilactobacillus fermentum</i> (LF61) ou <i>Lactacaseibacillus paracasei</i> (LPc-G110) no número de células totais, eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e macrófagos no Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) de camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).....	64
Gráfico 5 - Efeito da suplementação com <i>Limosilactobacillus fermentum</i> (LF61) ou <i>Lactacaseibacillus paracasei</i> (LPc-G110) no número de eosinófilos (A) neutrófilos (B) linfócitos (C) e monócitos (D) no sangue periférico de camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).....	65
Gráfico 6 - Efeito da suplementação com <i>Limosilactobacillus fermentum</i> (LF61) ou <i>Lactacaseibacillus paracasei</i> (LPc-G110) no fotomicrografias do tecido nasal (A) , análise morfométrica nasal (B) , fotomicrografias do tecido pulmonar (C) e análise morfométrica pulmonar (D) de camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).....	67
Gráfico 7 - Efeito da suplementação com <i>Limosilactobacillus fermentum</i> (LF61) ou <i>Lactacaseibacillus paracasei</i> (LPc-G110) nos níveis das pró-inflamatórias IL-1 β (A) e TNF- α (B) no BALF de camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).....	70
Gráfico 8 - Efeito da suplementação com <i>Limosilactobacillus fermentum</i> (LF61) ou <i>Lactacaseibacillus paracasei</i> (LPc-G110) nos níveis das alarminas IL-33 (A) e TSLP	

(B) no BALF de camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).....71

Gráfico 9 - Efeito da suplementação com *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) ou *Lactacaseibacillus paracasei* (LPc-G110) nos níveis das citocinas do perfil T_H2 ((IL-4 (A), IL-13 (B) e IL-5 (C)) no BALF e no nível sérico IgE OVA-específica (D) e IL-17 (E) de camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).....73

Gráfico 10 - Efeito da suplementação com *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) ou *Lactacaseibacillus paracasei* (LPc-G110) nos níveis das citocinas TGF- β e IL-17 no BALF de camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).....74

Gráfico 11 - Efeito da suplementação com *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) ou *Lactacaseibacillus paracasei* (LPc-G110) nos níveis das citocinas do perfil T_{reg} ((IL-10 (A)), do perfil T_H1 (IL-12 (B) e IFN- γ (C)) e razão IFN- γ /IL-4 (D) no BALF de camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).....76

Gráfico 12 - Efeito da suplementação com *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) ou *Lactacaseibacillus paracasei* (LPc-G110) na expressão de p-p38 MAPK (A), p-ERK 1/2 MAPK (B) e FOXP3 (C) no BALF de camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).....77

Gráfico 13 - Efeito da suplementação com *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) ou *Lactacaseibacillus paracasei* (LPc-G110) nos níveis de Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCCs). AGCCs fecais totais (A), Frações de AGCCs fecais (B), AGCCs séricos totais (C) e Frações de AGCCs séricos (D) em camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).....79

Gráfico 14 - Efeito da suplementação com *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) ou *Lactacaseibacillus paracasei* (LPc-G110) nos níveis de Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCCs). Fotomicrografias do cólon (A) e análise morfométrica intestinal (B) em camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).....82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos grupos experimentais.....	48
Tabela 2 - Composição da solução anestésica.....	49
Tabela 3 - Composição da solução de PBS.....	49

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AGCCs	ácidos graxos de cadeia curta
AHR	hiper-responsividade das vias aéreas
ANOVA	análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP-1	apoproteína-1
APCs	células apresentadoras de antígenos
BALF	fluido do lavado broncoalveolar
BALT	tecido linfoide associado ao brônquios
CARAS	síndrome da asma e rinite alérgicas combinadas
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CG	cromatografia gasosa
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CysLTs	cisteinil-leucotrienos
Dexa	Dexametasona
ECP	proteína catiônica eosinofílica
ERK	cinase regulada por sinal extracelular
FcεRI	Receptor de alta afinidade para a porção Fc da IgE
FOXP3	fator de transcrição forkhead box protein P3
GALT	tecido linfoide associado ao intestino
GATA-3	fator de transcrição de ação trans específico de células T tipo 3
GM-CSF	fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
GPCRs	receptores acoplados à proteína G
G_q/11	proteína G _q ou proteína G ₁₁

GRAS	geralmente reconhecidas como seguras
H1	receptor H1 de histamina
HA	Histamina
HDACs	histona desacetilase
HE	hematoxilina eosina
IFN-γ	interferon-gama
IgE	imunoglobulina E
IL	interleucina – (1 β , 2, 4, 5, 9, 10, 12, 13, 17, 25, 31,33)
ILCs	células linfoides inatas do tipo 2
IRAK3	cinase associada ao receptor da interleucina-1
ISAAC	<i>International Study of Asthma and Allergies in Childhood</i>
ISAPP	<i>International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>
<i>L. paracasei</i>	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>
LIKA	laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
LPS	Lipopolissacarídeo
LT_{H0}	células T CD4 ⁺ imaturas
M2	macrófago M2
M₃	receptor muscarínico M ₃
MALT	tecido linfóide associado à mucosa
MAMPs	padrões moleculares associados ao micro-organismo
MAPK	proteína cinase ativada por mitógeno
MBP	proteína básica principal
MCTs	transportadores de monocarboxilados
MHC-II	complexo principal de histocompatibilidade classe 2

NALF	fluido do lavado nasal
NALT	tecido linfoide associado ao nariz
NF-κB	fator nuclear-kappa B
NGF	fator de crescimento do nervo
NO	óxido nítrico
OVA	Ovalbumina
PAR-2	receptor 2 ativado por protease
PAS	ácido periódico de shiff
PBS	phosphate buffered saline
PGE₂	prostraglandina E ₂
PGs	Prostraglandinas
PLA₂	fosfolipase A ₂
PLC	fosfolipase C
PRRs	receptores de reconhecimento padrão
RA	rinite alérgica
SOCS	supressor da sinalização de citocinas
TCR	receptores de célula T
TGF-β	fator de crescimento e transformação β
T_H1	linfócito T auxiliar tipo 1
T_H17	linfócito T auxiliar tipo 17
T_H2	linfócito T auxiliar tipo 2
TLR	receptores semelhantes ao toll
TM	tricromo de masson
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
T_{reg}	linfócito T regulatório

TRP	receptores transientes
TSLP	linfopoetina do estroma tímico
UFC	unidades formadoras de colônias
ZO-1	zônula de ocludina-1

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	22
2.1 Rinite	22
2.1.1 Classificação fenotípica e endotipos da rinite	22
2.2 Asma	23
2.2.1 Classificação fenotípica e endotipos da asma	24
2.3 Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS)	24
2.4 Fisiopatologia da Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS)	25
2.5 Mecanismos imunoregulatórios da CARAS	31
2.6 Diagnóstico da rinite e asma	31
2.7 Tratamento CARAS	33
2.7.1 Tratamento não farmacológico	33
2.7.2 Tratamento farmacológico	33
2.8 Microbiota intestinal e probióticos	35
2.9 Eixo microbiota intestinal e vias aéreas	38
2.9.1 <i>Limosilactobacillus fermentum</i> (<i>L. fermentum</i>)	42
2.9.2 <i>Lactobacillus paracasei</i> (<i>L. paracasei</i>)	44
3. OBJETIVOS	45
3.1 Objetivo geral	45
3.2 Objetivos específicos	45
4. MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1 Material	47
4.1.1 Produto-teste	47
4.1.2 Animais	47
4.1.3 Substâncias e reagentes	48
4.1.4 Soluções	48
4.2 Métodos	49
4.2.1 Modelo da Síndrome de Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS)	49
4.2.2 Quantificação dos sinais clínicos	51
4.2.3 Avaliação da hiper-reatividade nasal induzida pela histamina	51
4.2.4 Quantificação celular nos fluidos do lavado nasal (NALF) e broncoalveolar (BALF)	51

4.2.5 Quantificação celular no sangue periférico	52
4.2.6 Quantificação de IgE OVA-específica.....	52
4.2.7 Análises histológicas.....	53
4.2.8 Quantificação de citocinas no BALF	54
4.2.9 Análise da expressão de MAPKs e FOXP3	54
4.2.10 Análise histoquímica.....	55
4.2.11 Análise dos níveis de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs)	55
4.2.12 Análise estatística	56
5. RESULTADOS.....	57
5.1 Efeito da suplementação com <i>Limosilactobacillus fermentum</i> (LF61) ou com <i>Lactacaseibacillus paracasei</i> (LPc-G110) nos sinais clínicos da rinite em camundongos com CARAS.....	57
5.2 Efeito da suplementação com <i>Limosilactobacillus fermentum</i> (LF61) ou com <i>Lactacaseibacillus paracasei</i> (LPc-G110) na hiper-reatividade nasal induzida por histamina em camundongos com CARAS	59
5.3 Efeito da suplementação com <i>Limosilactobacillus fermentum</i> (LF61) ou com <i>Lactacaseibacillus paracasei</i> (LPc-G110) na migração de células inflamatórias para o fluido do lavado nasal (NALF) de camundongos com CARAS.....	61
5.4 Efeito da suplementação com <i>Limosilactobacillus fermentum</i> (LF61) ou com <i>Lactacaseibacillus paracasei</i> (LPc-G110) na migração celular para o fluido do lavado broncoalveolar (BALF) de camundongos com CARAS.....	63
5.5 Efeito da suplementação com <i>Limosilactobacillus fermentum</i> (LF61) ou com <i>Lactacaseibacillus paracasei</i> (LPc-G110) no perfil celular sistêmico de camundongos com CARAS.....	65
5.6 Efeito da suplementação com <i>Limosilactobacillus fermentum</i> (LF61) ou com <i>Lactacaseibacillus paracasei</i> (LPc-G110) no tecido nasal e pulmonar de camundongos com CARAS.....	66
5.7 Efeito da suplementação com <i>Limosilactobacillus fermentum</i> (LF61) ou com <i>Lactacaseibacillus paracasei</i> (LPc-G110) nos níveis das citocinas inflamatórias IL-1 β e TNF- α no BALF de camundongos com CARAS	69
5.8 Efeito da suplementação com <i>Limosilactobacillus fermentum</i> (LF61) ou com <i>Lactacaseibacillus paracasei</i> (LPc-G110) nos níveis das alarminas IL-33 e TSLP no BALF de camundongos com CARAS.....	70
5.9 Efeito da suplementação com <i>Limosilactobacillus fermentum</i> (LF61) ou com <i>Lactacaseibacillus paracasei</i> (LPc-G110) nos níveis das citocinas do perfil T _H 2 (IL-4, IL-13, IL-5) e no nível sérico IgE OVA-específica em camundongos com CARAS	72

5.10 Efeito da suplementação com <i>Limosilactobacillus fermentum</i> (LF61) ou com <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> (LPc-G110) nos níveis das citocinas TGF- β e IL-17 no BALF de camundongos com CARAS	74
5.11 Efeito da suplementação com <i>Limosilactobacillus fermentum</i> (LF61) ou com <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> (LPc-G110) nos níveis das citocinas do perfil T _{reg} (IL-10), do perfil T _H 1 (IL-12 e IFN- γ) e a razão IFN- γ /IL-4 no BALF de camundongos com CARAS.....	75
5.12 Efeito da suplementação com <i>Limosilactobacillus fermentum</i> (LF61) ou com <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> (LPc-G110) na expressão das MAPKs e FOXP3 no BALF de camundongos com CARAS.....	77
5.13 Efeito da suplementação com <i>Limosilactobacillus fermentum</i> (LF61) ou com <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> (LPc-G110) nos níveis fecais e séricos de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) de camundongos com CARAS.....	78
5.14 Efeito da suplementação com <i>Limosilactobacillus fermentum</i> (LF61) ou com <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> (LPc-G110) na integridade de barreira do cólon de camundongos com CARAS.....	81
6. DISCUSSÃO	83
7. CONCLUSÕES	96
REFERÊNCIAS.....	98
Apêndice A	112
Apêndice B	113
Anexo 1	114
Anexo 2	115
Anexo 3	116



Introdução

1. INTRODUÇÃO

A rinite alérgica e a asma são doenças crônicas das vias aéreas que compartilham mecanismos fisiopatológicos semelhantes, como a resposta imune tipo 2 (T_H2), aumento dos níveis séricos de imunoglobulina E alérgeno específica (IgE), com predomínio da infiltração eosinofílica nas vias aéreas, além da hiperplasia e hipertrofia das células caliciformes. Portanto, as duas doenças são, atualmente, classificadas como uma única doença das vias aéreas, denominada Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas - CARAS (*Combined Allergic Rhinitis and Asthma Syndrome*) (Jiang *et al.*, 2023).

A CARAS descreve a condição clínica de indivíduos acometidos de forma concomitante pela rinite alérgica e asma devido à alta frequência de coexistência de ambas as doenças, 70-90% dos pacientes asmáticos sofrem de rinite alérgica e, quase 40% dos pacientes com rinite alérgica apresentam sintomas asmáticos (Pawankar *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2019). A incidência dessas doenças vem aumentando mundialmente, demonstrando interferência na qualidade de vida e gerando impacto financeiro e clínico significativos (WHO, 2018). Portanto, a definição de CARAS foi determinada para indicar sintomas concomitantes de rinite alérgica e asma em pacientes (Taramarcaz; Gibson, 2004).

Como opções farmacoterapêuticas para a CARAS têm-se os anti-histamínicos, anticolinérgicos, corticosteroides, antileucotrienos, estabilizadores de mastócitos além dos imunobiológicos (Carlson, 2019). Os princípios ativos dessas classes farmacológicas podem causar efeitos colaterais e adversos relevantes incluindo sedação, comprometimento da aprendizagem, hiperglicemia, arritmias cardíacas, além do uso crônico, em certas situações, induzir à tolerância. Em adição, a refratariedade dos episódios alérgicos aliada ao crescimento da adesão a suplementos alimentares pela população, contribuem para a busca de novas alternativas para o tratamento da CARAS (Codevilla; Castilhos; Bergold, 2013).

Evidências na literatura sugerem uma conexão entre doenças respiratórias e intestinais (Nascimento *et al.*, 2023). Nesse contexto, o uso emergente de bactérias com potenciais probióticos, representa uma opção promissora no manejo de inflamações crônicas como as advindas das alergias (Garcia-Castillo *et al.*, 2018). As espécies do gênero *Lactobacillus*, têm demonstrado uma variedade de efeitos terapêuticos em virtude da modulação positiva do sistema imune, baseados no reforço

físico da barreira epitelial intestinal, além de restaurar o equilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias, sendo eficaz no tratamento de doenças crônicas, entre elas, a asma alérgica (Anatriello *et al.*, 2019; Kalliomäki *et al.*, 2010; Dongarra *et al.*, 2013).

O efeito anti-inflamatório e a eficácia de bactérias com potencial probiótico resultam de uma combinação de vias de sinalização intracelulares ativadas por ligantes derivados do micro-organismo (MAMPs - Padrões Moleculares Associados ao Micro-organismo) que interagem com os receptores (PRRs - Receptores de Reconhecimento Padrão) presentes nas células hospedeiras (Samuelson; Welsh; Shellito, 2015).

As células dendríticas no GALT (Tecido Linfoide Associado ao Intestino) ativadas pelas bactérias têm a capacidade de migrar para o tecido pulmonar (Guilliams; Lambrecht; Hammad, 2013). Em adição, a comunicação entre o intestino e as vias aéreas acontece também quando a microbiota intestinal libera moléculas sinalizadoras como os ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) que atingem a circulação sanguínea e linfática tornando-os biodisponíveis (Ashique *et al.*, 2022). Uma outra alternativa de comunicação entres esses compartimentos, é por meio da indução de células T regulatórias (T_{reg}) no GALT que migram para as vias aéreas estimulando o BALT (Tecido Linfoide Associado aos Brônquios) em resposta à exposição a alérgenos (Forsythe, 2011). Essa relação de sinais bidirecionais, entre o eixo intestino-vias aéreas, justifica porque a disfunção no sistema intestinal pode induzir o sistema respiratório a sair da homeostase (Mortaz *et al.*, 2013).

Estudos anteriores evidenciaram que as espécies *Limosilactobacillus fermentum* (*L. fermentum*) e *Lactocaseibacillus paracasei* (*L. paracasei*) são eficazes na prevenção de doenças alérgicas. Em um estudo clínico, o *L. fermentum* apresentou efeito antialérgico em quadro de dermatite atópica (Wang; Wang *et al.*, 2015). O *L. paracasei* além do efeito antialérgico observado em estudos clínico e não clínico de quadro de dermatite atópica, também demonstrou efeito antialérgico em modelo experimental de asma alérgica (Wang; Wang *et al.*, 2015; Ohshima-Terada *et al.*, 2015 e Wang *et al.*, 2017).

Nos últimos anos, têm-se intensificado estudos sobre os detalhes das interações entre as células probióticas e as células hospedeiras, ou como essas interações podem ser manipuladas para obter respostas regulatórias mais eficazes. Porém, os mecanismos específicos do eixo intestino-vias aéreas, no contexto dos distúrbios alérgicos, não estão totalmente elucidados (Sharma; IM, 2018).

Diante do exposto, a suplementação com as espécies de *Lactobacillus* emerge como fonte potencial para a modulação negativa da CARAS. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação oral com o *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) ou com o *Lacticaseibacillus paracasei* (LPc-G110) em modelo experimental da Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS) induzida por ovalbmina.



Fundamentação teórica

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Rinite

A Rinite Alérgica (RA) é definida como uma inflamação da mucosa nasal caracterizada pelos sintomas: congestão, rinorreia, prurido, espirros e hiposmia (Mandhane *et al.*, 2011). A RA tem sido reconhecida como uma das principais doenças inflamatórias crônicas das vias aéreas superiores em todo o mundo, afetando aproximadamente 40% da população (Yang *et al.*, 2020). A Organização Mundial de Saúde estima que cerca de 3,2 bilhões de pessoas apresentem a RA (USP, 2019). No Brasil, a prevalência da rinite alérgica foi avaliada a partir do protocolo clínico *Internacional Study of Asthma and Allergies in Childhood* (ISAAC) e foi quantificado cerca de 12,8% de adolescentes (13 - 14 anos) e 18,0% de crianças em fase escolar (6 - 7 anos) (Sakano *et al.*, 2018).

O seu impacto vai desde o ponto de vista financeiro como também afeta individualmente e de forma negativa a qualidade de vida, desempenho escolar, produtividade laboral além de interferir na vida social dos seus portadores (Zuberbier *et al.*, 2014).

2.1.1 Classificação fenotípica e endotipos da rinite

A classificação fenotípica da rinite foi proposta pela Academia Europeia de Alergia e Imunologia baseada na avaliação clínica, padrão temporal, gravidade, duração, resposta terapêutica e, principalmente, no agente etiológico. É constituída por quatro fenótipos: a) rinites infecciosas do tipo aguda, causada por vírus ou bactérias; b) rinite alérgica, a forma mais comum induzida por aeroalérgenos em indivíduos sensibilizados; c) rinite não alérgica não infecciosa ou heterogênea (rinite do idoso, hormonal, idiopática e outro; e d) rinite mista quando há mais de um agente etiológico (Hellings *et al.*, 2017).

A classificação do endotipo visa identificar os mecanismos envolvidos na gênese da doença. Estes endotipos são baseados em complexas respostas celulares e moleculares, além da presença característica de biomarcadores (Muraro *et al.*, 2016). Identificam-se quatro endotipos da rinite: a) com resposta imune tipo Th2

caracterizada por resposta alérgica imediata mediada por IgE específica, com influxo de eosinófilos; b) com resposta imune não tipo T_H2 com presença de um influxo neutrofílico em resposta a um agente infeccioso; c) rinite neurogênica caracterizada pelo aumento da expressão de receptores transientes (TRP) e aumento da concentração de substância P, relacionada à rinite gustativa, do idoso e idiopática; d) disfunção epitelial decorrente de uma inflamação primária (resposta tipo T_H1 ou T_H2) tendo como consequência a disfunção ciliar ou disfunção da barreira oclusional (occludina-1), facilitando assim, a migração subepitelial de moléculas imunoestimulatórias (Hellings *et al.*, 2017).

Atualmente, estudos afirmam que há uma complexidade em se definir os endotipos da doença e o entendimento dos processos celulares e moleculares. A definição do endotipo determina um fenótipo da doença, entretanto há necessidade maior entendimento envolvendo o papel de moduladores, ambiente, microbioma e anatomia nasal para se definir o endotipo correto (Sakano *et al.*, 2018).

2.2 Asma

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas inferiores de natureza complexa, cujos fatores genéticos e ambientais podem contribuir para seu desenvolvimento (Maslan; Mims, 2014). Clinicamente, são observados sintomas respiratórios variáveis como sibilo, falta de ar, aumento da pressão torácica, tosse e limitação do fluxo expiratório (Hammad; Lambrecht, 2021; Gina, 2021).

Na última década, ocorreu um aumento na prevalência da asma, sendo estimado 300 milhões de indivíduos acometidos em todo o mundo, causando cerca de 500 mil mortes. Estima-se que metade da população mundial terá alguma doença alérgica até 2050 (WHO, 2021; Gina, 2021). Nos últimos 25 anos, a taxa de prevalência da asma dobrou mundialmente. Diariamente, só no Brasil, três pessoas morrem em decorrência da doença (Gina, 2017). Segundo o Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), a asma é considerada um grave problema de saúde pública, sendo a quarta maior causa de hospitalização no país, com cerca de 300 mil internações por ano, com um custo anual de cerca de R\$ 537 milhões para os cofres públicos.

Em contraste, em 2020 vários países observaram redução na incidência de quadros asmáticos e outras doenças respiratórias. Ainda não se sabe a razão precisa

que justifique esse cenário mas atrela-se a maior prática das medidas de biossegurança, como a lavagem das mãos, uso de máscaras, ventilação de ambientes e distanciamento físico observados em virtude da pandemia da COVID-19 (Gina, 2021).

Uma revisão sistemática realizada em 2021 sobre epidemiologia da asma no Brasil nos últimos 11 anos, comparou e caracterizou a prevalência desta doença por região e observou-se variação da prevalência entre 10,1% e 31,2% entre as regiões brasileiras, variando entre os anos de 2003 a 2017. A região sul apresentou maiores porcentagens e discrepâncias quando comparada a região nordeste, que apresentou menores números e menor variabilidade entre as cidades (Ramos *et al.*, 2021).

A Organização Mundial de Alergia (*World Allergy Organization-WAO*) preconiza que as doenças alérgicas devem ser reconhecidas como um problema de saúde pública global e maiores esforços devem ser feitos para sua prevenção e tratamento ideal.

2.2.1 Classificação fenotípica e endotipos da asma

Os fenótipos da asma mais frequentemente descritos na literatura compreendem: a) asma tipo 2; e b) asma não tipo 2. Já os endotipos descritos são: a) inflamatório tipo 2 ou T_H2 high (T_H2^{hi}) e b) inflamatório não tipo 2 ou T_H2 low (T_H2^{lo}) (Wenzel, 2016).

A asma tipo 2 é caracterizada por uma inflamação dependente da sensibilização de mastócitos pela IgE alérgeno específica e um influxo eosinofílico no tecido pulmonar. Os níveis de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 bem como a quantidade de eosinófilos no sangue e no tecido pulmonar diferenciam os endótipos da asma. Altos níveis desses biomarcadores caracterizam o T_H2 high, já quando os níveis de linfócitos T_H2 são reduzidos, caracteriza-se o T_H2 low (Cheng *et al.*, 2014).

2.3 Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS)

Estudos comprovam uma íntima ligação da rinite e asma alérgicas no que se refere à gênese patológica e ao desenvolvimento de ambas as doenças. Ambas acometem o sistema respiratório, podem ser desencadeadas pelos mesmos agentes

etiológicos, apresentam o mesmo perfil celular predominante que medeia os processos inflamatórios, e compartilham o mesmo raciocínio farmacoterapêutico (Li *et al.*, 2016).

Em 2019, na Europa, um estudo de revisão sistemática e meta-análise contendo trabalhos de coorte e caso-controle concluiu que há fortes evidências epidemiológicas de que as pessoas com rinite alérgica têm maiores probabilidades de desenvolver a asma do que as pessoas saudáveis. Por outro lado, estudos refletem a alta frequência de hiper-responsividade brônquica entre pacientes com rinite (Tohidinik; Mallah; Takkouche, 2019).

Diante dessa relação, a Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS – *Combined Allergic Rhinitis and Asthma Syndrome*) se caracteriza por ser uma única doença das vias aéreas. Sendo de extrema importância pesquisas experimentais que, ao desenvolver em animais a CARAS, contribuam na construção e atualização do entendimento da patogênese e tragam ao mercado farmacêutico novas opções para o manejo dessa síndrome alérgica (Bousquet *et al.*, 2016).

Uma busca realizada na base de dados *Science direct* constatou a existência de apenas doze artigos (2015-2023) que desenvolveram protocolo da CARAS e analisaram o efeito de substâncias promissoras para o tratamento dessa síndrome. No Brasil, o laboratório de Imunofarmacologia da Universidade Federal da Paraíba /João Pessoa/PB é pioneiro no estudo da CARAS e se empenha na busca de novas opções terapêuticas a partir de produtos bioativos.

2.4 Fisiopatologia da Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS)

A Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS) é caracterizada pela resposta imune tipo II (T_H2) mediada pela imunoglobulina E (IgE) específica para o alérgeno. Essa resposta imunológica ocorre quando os indivíduos atópicos, geneticamente predisponentes, entram em contato com alérgenos encontrados facilmente dispersos no ar e que são provenientes de baratas, fungos, pelos de animais e, principalmente, os ácaros do pó domiciliar sendo o *Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. fariane* e *Blomia tropicalis* os principais agentes etiológicos da CARAS (Rubini *et al.*, 2017).

Em relação à CARAS experimental, o modelo animal induzido por ovalbumina (OVA) tem sido amplamente empregado (Azman *et al.*, 2021). A OVA é um antígeno exógeno, sendo a principal proteína encontrada na clara do ovo, porém, não é intrinsecamente imunogênica e, portanto, deve ser administrada na presença de adjuvantes, substâncias que aumentam a imunogenicidade de um antígeno, como o hidróxido de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$) (Bonam *et al.*, 2017; Azman *et al.*, 2021).

Na fase da sensibilização, o alérgeno entra em contato com o epitélio respiratório sendo reconhecido por receptores de reconhecimento padrão (PRR) como, por exemplo, os receptores semelhantes ao toll (TLR), ativando as células epiteliais que passarão a secretar moléculas sinalizadoras do tipo alarminas (IL-33, IL-25 e TSLP - Linfopoetina do estroma tímico) (Eifan; Durham, 2016). Na região da submucosa, essas moléculas sinalizadoras irão atuar em células linfoides inatas do tipo 2 (ILCs 2) ativando a produção de citocinas clássicas da resposta imune tipo 2 como a IL-13 e a IL-5 (Nasr *et al.*, 2018).

Além disso, as células apresentadoras de antígenos (APCs), principalmente as células dendríticas (CDs), também são ativadas por citocinas e alarminas epiteliais que induzem a expressão do ligante OX40 (OX40L). As CDs reconhecem o alérgeno e se direcionam para o linfonodo de drenagem onde após o processamento do antígeno haverá a apresentação do peptídeo antigênico, via molécula do complexo maior de histocompatibilidade de classe II (MHC II) para o receptor de célula T (TCR) presente na membrana dos linfócitos T CD4^+ virgens. Após a apresentação antigênica ocorre a polarização para o perfil $\text{T}_\text{H}2$, caracterizado pela ativação dos fatores de transcrição GATA-3 e STAT-6. Os linfócitos $\text{T}_\text{H}2$ produzem as citocinas clássicas do perfil de resposta tipo 2 (IL-4, IL-13 e IL-5) (Figura 1), a partir da ativação das MAPKs (proteínas cinases ativadas por mitógeno) como a p38 e a ERK1/2, e da ação de fatores de transcrição como o NF- κ B (fator nuclear-kappaB) que estão diretamente associados ao GATA-3 (Holgate *et al.*, 2011).

As citocinas IL-4 e IL-13 compartilham os receptores celulares e atuam ativando os linfócitos B, os quais se diferenciam em plasmócitos produtores de anticorpos específicos do tipo IgE para o determinado alérgeno. A IgE específica para o alérgeno se ligará aos seus receptores de alta afinidade I ($\text{Fc}\epsilon\text{RI}$) presentes na membrana citoplasmática de mastócitos teciduais, basófilos e eosinófilos circulantes. Esse processo é denominado de sensibilização alérgica (Evans *et al.*, 2015).

No momento da subsequente exposição do indivíduo sensibilizado ao alérgeno, esse se ligará à IgE-FcεRI presente na membrana dos mastócitos, basófilos e eosinófilos. A ligação cruzada irá ativar essas células ocasionando a liberação dos grânulos contendo mediadores pré-estocados, como a histamina e, a formação de outros mediadores como prostaglandinas e leucotrienos (Boulet, 2018). A histamina, nas vias aéreas superiores, possui um papel fundamental nas terminações nervosas sensoriais, na estimulação reflexa parassimpática das secreções glandulares e na vasodilatação e aumento da permeabilidade capilar, sendo responsável por desencadear os sintomas nasais da rinite (prurido nasal, espirros, rinorreia). Nas vias aéreas inferiores, a histamina promove vasodilatação local, aumento da permeabilidade vascular e edema, além da migração de células inflamatórias e broncoconstrição (Xu; Zhang; Wang, 2014).

O processo inflamatório é mantido pela ação de diversos mediadores que formam o microambiente da resposta alérgica. A IL-4 atua em *feedback* positivo na manutenção da resposta tipo 2 (Wynn, 2014) e juntamente com a IL-13 ativam os macrófagos tipo 2 (M2), os quais passam a produzir a citocina TGF-β (fator de crescimento e transformação - β) que ativa os fibroblastos a produzirem fibras colágenas, as quais se depositam nas vias aéreas, levando um quadro de fibrose e remodelamento tecidual. Em células musculares lisas, essas duas citocinas desencadeiam o processo de hipertrofia e hiperplasia muscular, levando a um quadro de hiper-reatividade das vias aéreas (Holgate *et al.*, 2011).

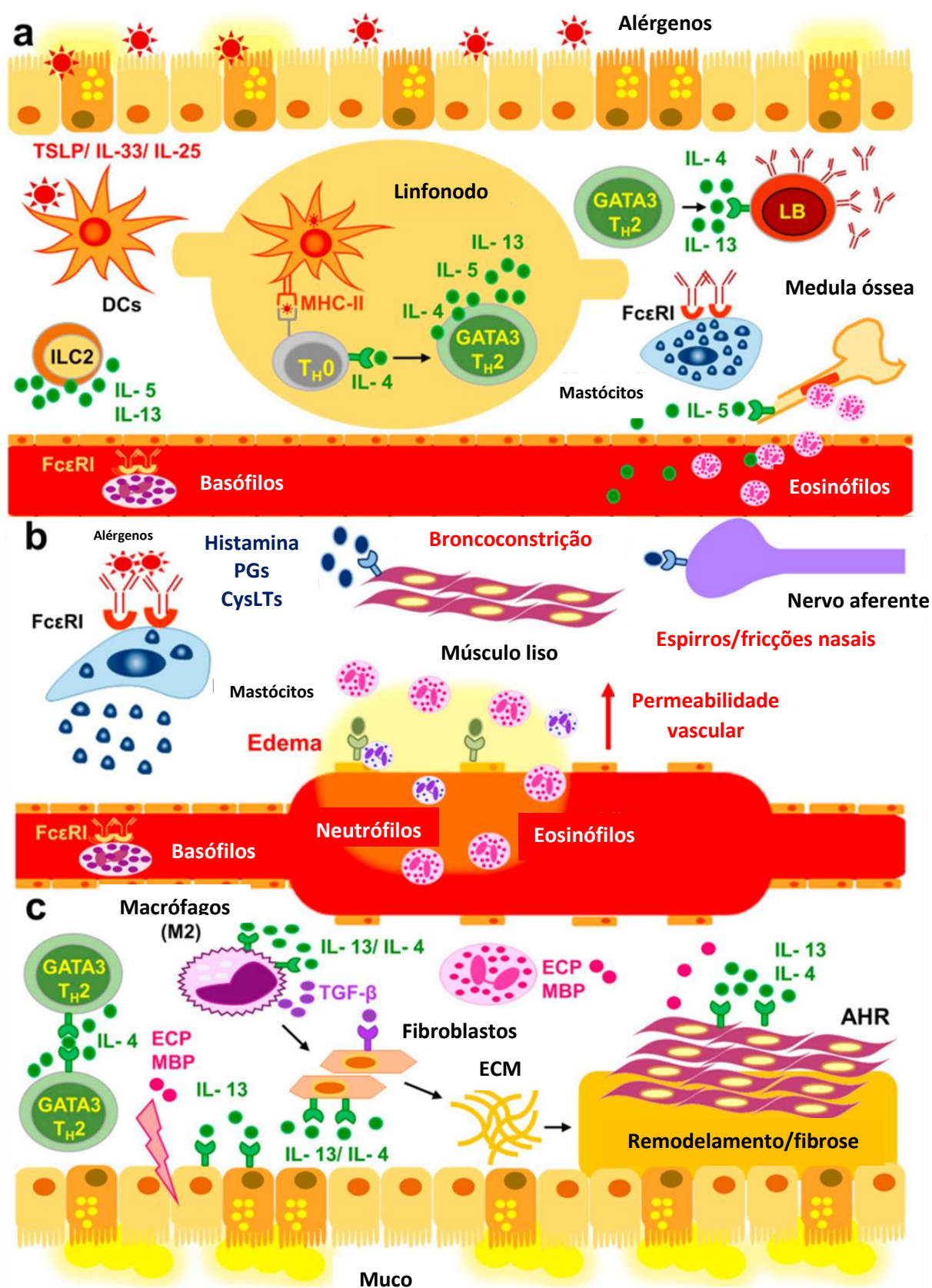
A IL-13 ativa o processo de hiperplasia, hipertrofia e metaplasia de células ciliadas epiteliais que se diferenciam em células produtoras de muco (Gour; Wills-Karp, 2015). Promove ainda a hipersecreção de muco (água, glicoproteínas, enzimas e imunoglobulinas) pelas células caliciformes presentes no epitélio colunar pseudoestratificados ciliado das vias aéreas (Figura 1) (Sakano *et al.*, 2018).

A IL-5 está relacionada ao processo de eosinopoese. O recrutamento de eosinófilos decorre da atuação de quimiocinas, como eotaxina 1, 2 e 3. Além disso, eosinófilos ativados nas vias aéreas geram quimiocinas pró-inflamatórias e enzimas citolíticas, incluindo a proteína catiônica eosinofílica (ECP) e proteína básica principal (MBP) que participam da inflamação persistente das vias aéreas, e têm sido associadas a exacerbações e declínio da função pulmonar. Os eosinófilos ainda são capazes de liberar o TGF-β provocando o espessamento da membrana basal reticular

contribuindo para o remodelamento das vias aéreas presente na CARAS (Figura 1) (Eltboli *et al.*, 2015).

Outras citocinas têm sido relatadas como participantes da resposta inflamatória no quadro alérgico como a IL-1 β e o TNF- α . Estudos tanto em animais como em humanos com a RA, demonstraram aumento dos níveis de IL-1 β e ativação do inflamassoma (NLRP3). Além disso, a deficiência de NLRP3 ou inibição da caspase-1 pode aliviar a progressão da RA, conter a resposta inflamatória e proteger a mucosa nasal (Yang *et al.*, 2020). A ação do TNF- α ocorre de forma adicional à ação do fator de crescimento do nervo (NGF), o qual em animais alérgicos leva a extensão da inervação sensitiva para a derme nasal ocasionando a hiperreatividade nasal (Kuyama *et al.*, 2010). Esses fatores agem sinergicamente para acentuar o dano à barreira epitelial nasal e aumentar a hiper-reatividade nessa região.

Figura 1 - Mecanismo fisiopatológico da Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS) mediado pela resposta imune T_H2



Fases da fisiopatologia da CARAS. **a)** Primeira fase (sensibilização). Os alérgenos estimulam as células epiteliais a liberarem as alarminas como TSLP, IL-33 e IL -25 que estimulam as ILCs2 a produzirem IL-13 e IL-5. As alarminas estimulam as APCs (DCs) a migrarem para o linfonodo de drenagem para ativar T_H0 via MHC-II e polarizar para o perfil T_H2 com a produção de IL-4, IL-5 e IL-13. IL-5 é uma importante indutora de eosinofilia atuando na medula óssea e provocando a produção, maturação e migração de eosinófilos para o local de inflamação. IL-4 e IL-13 estimulam a produção de IgE pelas células B que se ligam aos receptores Fc ϵ RI na membrana dos mastócitos, basófilos e eosinófilos circulantes, conferindo o primeiro estágio de sensibilização a alérgenos. **b)** Segunda fase da reação alérgica (fase de desafio). A reexposição aos alérgenos resulta em ligação cruzada alérgeno-IgE em mastócitos que ativa o processo de degranulação com a liberação de mediadores pré-estocados como aminas vasoativas histamina e mediadores neoformados como prostaglandinas (PGs) e cisteinil-leucotrienos (CysLTs). Esses mediadores serão responsáveis pela reação de fase imediata que atua nos nervos aferentes, causando sinais clínicos de espirros e fricção nasal (rinite), nas células endoteliais, promovendo aumento da permeabilidade vascular com extravasamento de líquidos e formação de edema, nos músculos lisos promovem broncoconstrição (asma). **c)** Terceira fase tardia da reação alérgica (manutenção do perfil T_H2). A polarização do perfil T_H2 é mantida pela produção constante de IL-4 e IL -13. Essas citocinas atuam nas células caliciformes, promovendo a hiperprodução de muco, a hiperplasia das células musculares lisas e a hipertrofia e a hiper-responsividade das vias aéreas (AHR). Além disso, ativam macrófagos (M2), que produzem fator de crescimento e renovação β (TGF- β), associado à hiperprodução de fibroblastos. Os eosinófilos são as células efetoras do processo inflamatório crônico, liberando mediadores como a proteína catiônica eosinofílica (ECP) e a proteína principal básica (MBP), que atuam diretamente na destruição epitelial, na remodelação de tecidos e na hiper-responsividade das vias aéreas. TSLP (linfopoetina do estroma tímico), IL (interleucinas), ILC (célula linfóide inata), APC (célula apresentadora de antígeno), DC (Células Dendríticas), MHC-II (complexo principal de histocompatibilidade da classe 2), IgE (imunoglobulina E), Fc ϵ RI (receptor de Alta afinidade para a porção Fc da IgE).

Fonte: Ferreira *et al.*, 2019.

2.5 Mecanismos imunoregulatórios da CARAS

As células T regulatórias caracterizam o perfil T_{reg} , mediadas pelo fator de transcrição FOXP3, elas produzem a citocina IL-10 cuja ação é supressora sobre outras células T $CD4^+$. A IL-10 se destaca por suas propriedades anti-inflamatórias, oferecendo assim, perspectivas terapêuticas para o manejo da alergia como observado no estudo que utilizou uma molécula murina recombinante IL-10 para o tratamento de camundongos sensibilizados com ovalbumina (Ayakannu *et al.*, 2019).

Estudos recentes sugerem que durante a doença, juntamente com o aumento da resposta T_H2 , desequilíbrios ocorrem nas respostas imunes T_H17 e T_{reg} marcada com altos níveis da IL-17 e diminuição da citocina IL-10 (Shi *et al.*, 2011). Outros estudos corroboram indicando que as células T_H17 , produtores de IL-17, podem recrutar neutrófilos para o pulmão contribuindo para o agravamento da doença (Anatriello *et al.*, 2019).

Outra população de célula T capaz de modular a resposta imune tipo 2 na CARAS é a população celular do tipo T_H1 com a produção das citocinas IL-12, IFN- γ , e TNF- α . O IFN- γ impede a ativação do fator de transcrição GATA 3 responsável pela diferenciação das células T_H2 . Estudos comprovam que o processo alérgico pode ser suprimido pela indução de células T_H1 ou pela administração de IL-12, citocina responsável pela ativação do fator de transcrição T-bet que induz a produção das citocinas do perfil de resposta T_H1 (Lambrecht; Hammad, 2015). Além disso, um tratamento eficaz para a asma pode ser induzindo a resposta imune T_H1 e simultaneamente inibindo a resposta imune T_H2 / T_H17 para restaurar o equilíbrio T_H1 / T_H2 (Anatriello *et al.*, 2019).

2.6 Diagnóstico da rinite e asma

O diagnóstico da rinite alérgica é baseado na história clínica, antecedentes pessoais e familiares de atopia, exames físicos e exames complementares. O diagnóstico é essencialmente clínico, com detecção dos sintomas cardinais: espirros, prurido nasal intenso, coriza clara e abundante e obstrução nasal e da identificação do possível alérgeno desencadeante pelo teste cutâneo de hipersensibilidade imediata ou IgE específica (Okubo *et al.*, 2017).

Para um diagnóstico preciso, os marcadores de endotipos devem idealmente ser complementados por avaliação da função nasal, como a permeabilidade e fluxo nasal, para confirmar a obstrução nasal e provocação nasal com ar frio para determinação da hiper-reatividade nasal. Assim como a medição do óxido nítrico para medir a inflamação nasal e provocação nasal com o alérgeno para confirmar a relevância dos alérgenos, e a avaliação do olfato em pacientes que relatam a redução da capacidade olfativa (Rubini *et al.*, 2017).

A obstrução nasal é a queixa mais frequente, podendo ser intermitente ou persistente, bilateral ou unilateral. Em casos mais graves, a congestão nasal pode interferir com a aeração e com a drenagem dos seios paranasais e da tuba auditiva, resultando em cefaleia ou otalgia, com queixas de diminuição da acuidade auditiva. Podem ocorrer relatos de respiração oral, roncos, voz anasalada e alterações no olfato. Astenia, irritabilidade, diminuição da concentração, anorexia, alteração do sono, náuseas e desconforto abdominal podem ocorrer (Sakano *et al.*, 2018).

Fisicamente características faciais típicas estão presentes em grande número de pacientes com rinite alérgica, tais como: olheiras, dupla linha de Dennie-Morgan e prega nasal horizontal causada pelo frequente hábito de coçar a narina com movimento para cima. O exame das cavidades nasais é essencial, mostrando uma mucosa nasal geralmente pálida, edemaciada e com abundante secreção clara ou mucoide. Em casos crônicos observa-se hipertrofia importante de conchas inferiores (Bousquet *et al.*, 2016).

A intensidade e a frequência dos sintomas, assim como a sua evolução e fatores desencadeantes e agravantes (tabagismo ativo/passivo, natação), uso de medicamentos, presença de comorbidades (sinusites e otites de repetição) e outras doenças alérgicas (asma, conjuntivite alérgica e eczema atópico) devem fazer parte da anamnese (Gina, 2018).

Quanto à asma, o diagnóstico clínico é sugerido por um ou mais sintomas: tosse crônica, desconforto torácico, dispneia e sibilância principalmente à noite ou nas primeiras horas da manhã, considerado os horários de temperaturas amenas responsáveis pela ativação de terminações nervosas sensitivas (Wenzel, 2016). O exame físico é inespecífico uma vez que nem todos os pacientes seguirão uma regra de sintomas apresentados, como por exemplo o sibilho, indicativo de obstrução do fluxo aéreo, pode não ocorrer em todos os pacientes. Considerando os sinais e sintomas

não exclusivos da asma, a confirmação diagnóstica deve ser feita por um método objetivo e padronizado. Os testes diagnósticos disponíveis na clínica são: espirometria, testes de broncoprovocação e medida de pico do fluxo expiratório (Gina, 2018).

2.7 Tratamento CARAS

2.7.1 Tratamento não farmacológico

As proposições de medidas não farmacológicas para o controle das doenças alérgicas se baseiam em consensos de asma e rinite os quais recomendam as medidas de afastamento de alérgenos como uma etapa da estratégia terapêutica (Bousquet *et al.*, 2016).

As principais medidas para o controle do ambiente são: optar por dormir em quarto bem ventilado e ensolarado. Evitar travesseiro e colchão de paina ou pena, do contrário, optar pelos de espuma, fibra ou látex; afastar o indivíduo do ambiente enquanto se faz limpeza, evitar uso de vassouras e espanadores, optar por passar pano úmido ou usar aspiradores de pó com filtros especiais; Dar preferência às pastas e sabões em pó para limpeza de banheiro e cozinha. Evitar talcos, perfumes, desodorantes, principalmente na forma de *sprays*; não fumar e nem deixar que fumem dentro da casa ou do automóvel do paciente. O tabagismo pré-natal, perinatal e pós-natal está associado a problemas respiratórios futuros na prole; evitar banhos extremamente quentes e oscilação brusca de temperatura. A temperatura ideal da água varia em torno 37°C (temperatura corporal); dar preferência à vida ao ar livre. Esportes podem e devem ser praticados, evitando-se dias com alta exposição aos pólenes ou poluentes em determinadas áreas geográficas (Rubini *et al.*, 2017).

2.7.2 Tratamento farmacológico

Os anti-histamínicos (anti-H1) são considerados medicamentos de primeira escolha para o tratamento dos sintomas nasais evidentes na rinite alérgica. Eles atuam sobre receptores de histamina subtipo 1 acoplado às proteínas G_{q/11}, interferindo na ação da histamina sobre as terminações nervosas sensoriais, na

estimulação reflexa parassimpática das secreções glandulares, na vasodilatação e aumento da permeabilidade, aliviando assim, o prurido nasal, espirros, rinorreia e sintomas oculares. Ainda, são capazes de regular o processo inflamatório por meio da redução da expressão de citocinas inflamatórias, de moléculas de adesão, da ativação de células epiteliais, mastócitos, linfócitos T e eosinófilos (Mandahane *et al.*, 2011). Os anti-H1 clássicos ou de primeira geração apresentam alta lipofilicidade e fácil penetração na barreira hematoencefálica, além da baixa seletividade pelo subtipo do receptor, essas características resultam em sedação e potenciais efeitos adversos quando se ligam a outros tipos de receptores, como diminuição da cognição e desempenho psicomotor. Já os anti-H1 não clássicos ou de segunda geração apresentam baixa capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, alta potência, longa duração de ação e alta afinidade para os receptores H1 apresentando pouca ou nenhuma interação com outros receptores (Sakano *et al.*, 2018).

Os descongestionantes pertencem à classe dos simpaticomiméticos cuja ação se baseia na ativação de adrenoceptores α_1 e α_2 em células endoteliais promovendo a vasoconstrição e alívio da obstrução nasal. Os descongestionantes orais como a pseudoefedrina devem ser utilizados com cautela devido a sua ação psicotrópica e efeitos colaterais cardiovasculares. Já os de uso tópico como a nafazolina devem ser usados por no máximo 7 dias, pois seu uso prolongado pode desencadear a rinite medicamentosa de rebote, efeitos centrais e cardiovasculares importantes (Mandahane *et al.*, 2011).

Os corticosteroides são agentes anti-inflamatórios esteroidais de primeira linha para o controle da CARAS. Quando utilizado na forma tópica alivia a congestão, a hiposmia, a coriza, os espirros e o prurido. Sua administração sistêmica é vantajosa por atingir tanto as vias aéreas superiores quanto às inferiores, útil naqueles pacientes com sintomas mais intensos. No entanto, os efeitos adversos sistêmicos dos corticosteroides sempre foram uma preocupação. A inibição do crescimento em crianças, os distúrbios do metabolismo, o glaucoma e a formação de catarata, a imunossupressão e a supressão do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal são exemplos desses efeitos adversos. Seu mecanismo de ação se baseia na inibição da transcrição de proteínas pró-inflamatórias mediada pelo NF- κ B e na ativação da transcrição de proteína anti-inflamatórias (IL-10) (Matera *et al.*, 2019).

Estabilizadores de mastócitos constituem uma importante intervenção terapêutica no tratamento da CARAS. A reexposição a um alérgeno leva a sua ligação aos anticorpos IgE específicas para os alérgenos ligados aos receptores FcεRI nos mastócitos. Isso provoca a ligação cruzada desencadeando a síntese e degradação de mediadores como histamina, triptase, leucotrienos e proteases. Este é o passo mais crucial na cascata alérgica. O cromoglicato dissódico possui ação estabilizadora sobre a membrana de mastócitos e, conseqüentemente, impede a liberação dos mediadores químicos (Taur; Patil, 2011).

Os sintomas pulmonares da CARAS são controlados pelas seguintes classes: agonistas β-adrenérgicos, antagonistas do receptor muscarínico M₃, e inibidores de fosfodiesterase (Matera *et al.*, 2019).

Os antagonistas de receptores de leucotrienos como o montelucaste de sódio têm sido apontados como alternativa eficaz para os pacientes com asma e rinite alérgica concomitante, seus efeitos vão desde inibição da vasodilatação, da exsudação plasmática, da secreção de muco, além de inibir a inflamação eosinofílica. Entretanto, efeitos adversos como dor abdominal, cefaleia e agitação podem ser observados (Adcock *et al.*, 2008).

A introdução de anticorpos monoclonais no tratamento da CARAS surge como alternativa de uma terapia mais específica, já que agentes biológicos são sintetizados por organismos vivos e direcionados a um mediador específico como citocina ou receptor. Atualmente, já foram desenvolvidos imunobiológicos contra os seguintes alvos: IgE, citocinas da resposta T_H2 como IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-31 e TSLP, receptor para quimiocinas CCR4 e moléculas de adesão CD2, CD25, CD52 e ligante OX40. Embora raramente, podem ocorrer reações adversas à terapia imunobiológica como infecções do trato respiratório inferior e do trato urinário, faringite, dor de cabeça, congestão nasal, dor abdominal, eczema, dor nas costas e reações no local da injeção (Busse, 2019).

2.8 Microbiota intestinal e probióticos

O intestino contém uma grande e diversa população de micro-organismos, quantificada em cerca $3,8 \times 10^{13}$ células bacterianas, denominada de microbiota intestinal (Li *et al.*, 2014). A microbiota intestinal é descrita como o maior órgão

endócrino sendo composta por cerca de dez vezes mais células do que no corpo humano e cento e cinquenta vezes mais genes do que o genoma humano (Alou; Lagier; Raouh, 2016). O conjunto de genes desses micro-organismos autóctones é definido como microbioma (Kang *et al.*, 2017).

Há décadas imunologistas apontam que o intestino abriga o maior conjunto de células imunológicas em atividade contínua (Noce *et al.*, 2019). Somado a isso, há evidências crescentes de como a dieta e a nutrição influenciam no microbioma intestinal e interagem com o sistema imunológico para culminar na melhoria da saúde do indivíduo. Isso sugere que a composição do microbioma tem um papel importante na saúde intestinal e que a restauração de um "microbioma saudável" pode promover a remissão da doença (Mortaz *et al.*, 2013).

A microbiota intestinal inclui bactérias ácido lácticas integrantes dos principais gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*, caracterizadas como cocos ou bacilos não formadores de esporos, gram positivas, catalase negativa e tolerantes ao ácido, multiplicando em condições ótimas de pH entre 5.5 a 6.5. A contenção desses micro-organismos pelo sistema imune envolve um contexto flexível entre resposta imune inata e adaptativa que garante a simbiose entre o micro-organismos e o hospedeiro (Burgain *et al.*, 2014).

Essas bactérias comensais interagem mutualisticamente com o sistema imune do hospedeiro induzindo a produção de anticorpos por linfócitos B (Chen *et al.*, 2020), exerce efeito inibitório na proliferação de bactérias patogênicas; estimulam a síntese de bacteriocinas; produção de vitaminas e absorção de minerais (Woraprayote *et al.*, 2016) e atuam na síntese de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) como o acético, propiônico e butírico (Pieniz *et al.*, 2014). Alguma alteração nessa relação eubiótica entre microbiota comensal e hospedeiro interrompe a homeostase e ocasiona a disbiose.

Bactérias intestinais comensais podem ser isoladas, caracterizadas e exercerem efeitos benéficos, podendo assim, ser denominadas de probióticos. Em 2014, um consenso da Associação Científica Internacional para Probióticos e Prebióticos (*International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics-ISAPP*) redefiniram o conceito de probióticos para micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do indivíduo (Hill *et al.*, 2014); Eles estão sendo estudados para tratamento ou prevenção

de uma ampla gama de condições e síndromes como inflamação neuronal e dor, diabetes, obesidade, hipercolesterolemia, câncer e principalmente nas doenças gastrointestinais, incluindo diarreia associada a antibióticos e doença inflamatória intestinal (Mortaz *et al.*, 2013).

Nos últimos anos, observa-se um aumento da adesão às prescrições de suplementos alimentares, atrelado a uma busca pela saudabilidade, relacionada à mudança de hábitos alimentares que visam, um melhor funcionamento do organismo e, principalmente, uma melhor qualidade de vida, contribuindo assim, para despertar o interesse do consumidor pelo uso de probióticos. O mercado global de probióticos, incluindo seu uso como suplementos e incorporação em produtos alimentícios, foi avaliado em cerca de mais de 31,1 bilhões de euros em 2015 e se estima que atinja cerca de 43 bilhões de euros até 2022 (Behera; Panda, 2020). Esse cenário despertou a atenção de pesquisadores para estudarem características específicas dos probióticos e seus efeitos sobre a saúde humana.

Os probióticos podem ser consumidos como suplementos na forma de nutracêuticos (em cápsulas, líquidos, sachês), ou podem ser encontrados em alimentos como parte de um processo de fermentação (iogurtes, queijos e leite fermentado).

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) N° 241 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), emitida em 2018, objetiva respaldar legalmente o uso de probióticos, dispondo sobre os requisitos para comprovação da sua segurança e benefícios à saúde para uso em alimentos. Dentre os requisitos elencados na RDC N° 241/2018, encontra-se a ausência de registros de eventos adversos relevantes, obtidos a partir de estudos clínicos ou vigilância pós-uso, a ausência de fatores de virulência e patogenicidade relevantes para a saúde humana, a ausência de resistência potencialmente transferível a antibióticos relevantes para a saúde humana, a ausência de produção de substâncias ou metabólitos que representem risco à saúde humana e a susceptibilidade a, pelo menos, dois antibióticos (Brasil, 2018).

As bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são as mais utilizadas como probióticos, uma vez que têm sido isoladas de todas as porções do trato gastrointestinal de um humano saudável, além de possuírem efeitos benéficos na microbiota intestinal humana como efeitos antagônicos, competição e efeitos imunológicos, promovendo uma melhora na resistência contra patógenos,

evidenciando que o uso de micro-organismos benéficos favorece os mecanismos de defesa naturais do hospedeiro (Puupponen-Pimia *et al.*, 2002).

Recentemente, o gênero *Lactobacillus* foi reclassificado devido à vasta diversidade genômica entre as mais de 260 espécies. Um total de 25 gêneros, incluindo o gênero alterado *Lactobacillus*, foram definidos com base em características fenotípicas, genotípicas e ecológicas (Salvetti *et al.*, 2018; Zheng *et al.*, 2020).

As principais justificativas para realização de estudos com micro-organismos numa perspectiva terapêutica preventiva se baseiam: na facilidade de obtenção das cepas pela população para uso clínico após indicação profissional; na segurança do uso devido à ausência de patogenicidade das cepas e reconhecidas pelo FDA como GRAS (geralmente reconhecidas como seguras); tolerância ao suco gástrico que faz com que persistam no trato gastrointestinal e atuem contra patógenos; além de sua viabilidade e estabilidade após processos tecnológicos.

2.9 Eixo microbiota intestinal e vias aéreas

Há mais de 2 mil anos, Hipócrates afirmou que “toda doença começa no intestino”; essa relação entre o intestino e outros sistemas, como as vias aéreas, é mais complexa do que inicialmente se postulava. Há uma estreita interação entre essas interfaces, o intestino abriga uma vasta comunidade microbiana, conhecida como microbiota, que desencadeia uma série de processos metabólicos e imunológicos cruciais para o hospedeiro. Esta microbiota exerce influência não apenas localmente, no trato gastrointestinal, mas também em sistemas distantes, como o sistema respiratório. Mecanismos específicos de comunicação entre o intestino e as vias aéreas, como a via do eixo intestino-pulmão, têm sido objeto de intensa investigação. Entender essa relação é fundamental para desvendar os complexos mecanismos subjacentes a várias condições patológicas, incluindo doenças respiratórias e distúrbios gastrointestinais (Dang; Marsland, 2019).

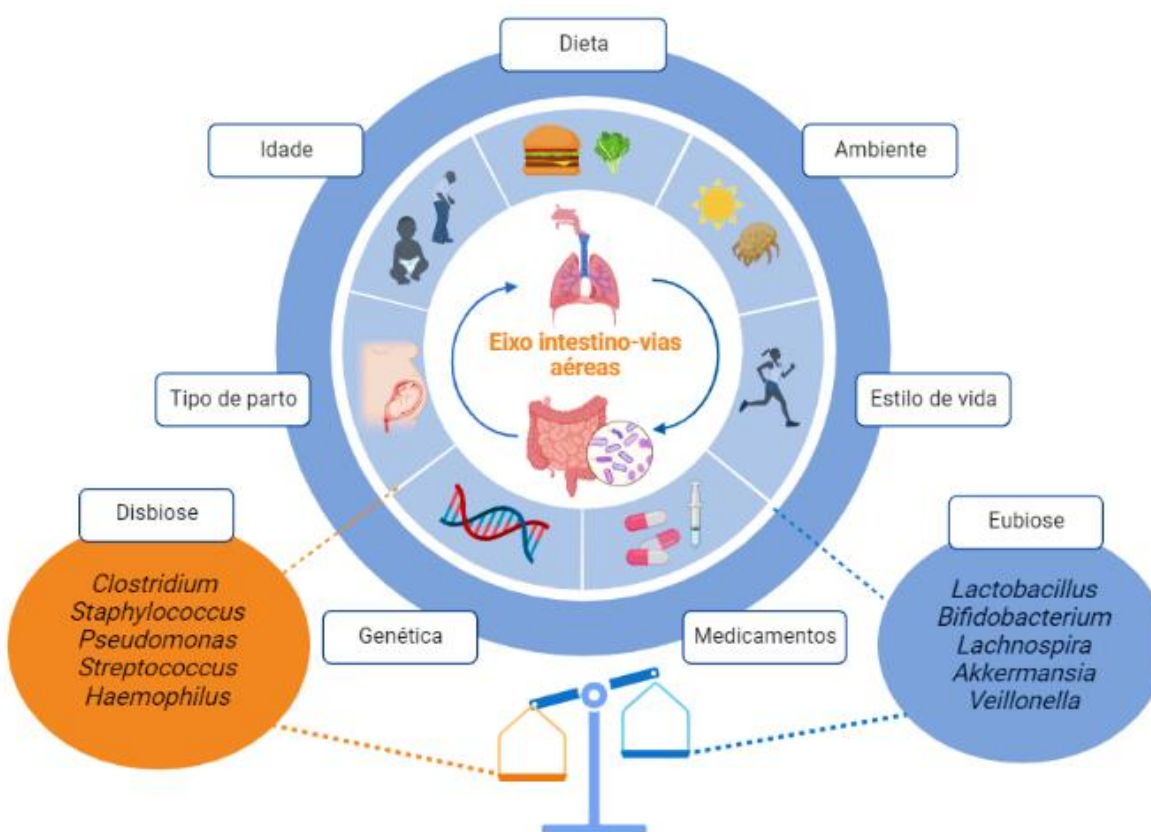
A fisiologia e a patologia dos sistemas respiratório e gastrointestinal são intimamente relacionadas. A similaridade entre esses dois sistemas pode justificar porque a disfunção em um pode induzir doença no outro (Mortaz *et al.*, 2013). O intestino é o maior órgão com função imune que abriga a maioria das células

produtoras de anticorpos (Tang, 2015). Essa rica diversidade intestinal atua regulando a resposta imune inata e adaptativa.

A composição da microbiota intestinal depende de vários fatores, sendo a dieta um dos mais importantes. As escolhas dietéticas de curto e longo prazo demonstram influenciar a microbiota intestinal (David; Maurice; Carmody, 2014). Outros fatores são relacionados às influências ambientais como o estilo de vida ocidental, incluindo dietas ricas em gorduras saturadas com poucas fibras, além de alimentos processados, edulcorantes artificiais, uso indiscriminado de antimicrobianos, epigenética e o sedentarismo (Figura 2) (Xu; Knigh, 2015).

Paralelamente, o mecanismo responsável pelo desenvolvimento de doenças alérgicas ainda não é totalmente esclarecido. Entretanto, estudos têm demonstrado que o uso de antimicrobianos, uma dieta rica em gorduras, um estilo de vida sedentário e uma higiene excessiva podem contribuir para o aumento da incidência dessas doenças (Schaub; Lauener; Von mutius, 2006).

Figura 2- Eixo intestino-vias aéreas



A composição da microbiota intestinal depende de vários fatores como dieta, idade e estilo de vida. As bactérias benéficas ocasionam a eubiose e suprimem às doenças alérgicas,

enquanto as bactérias patogênicas induzem a disbiose e o desenvolvimento de doenças alérgicas. A disbiose pode ser causada por muitos fatores, como uso de antimicrobianos, cesariana, dieta pobre em fibras e alimentação com fórmula. A disbiose influencia a diferenciação das células T, resultando no desenvolvimento de doenças alérgicas.

Fonte: Cavalcanti, 2023.

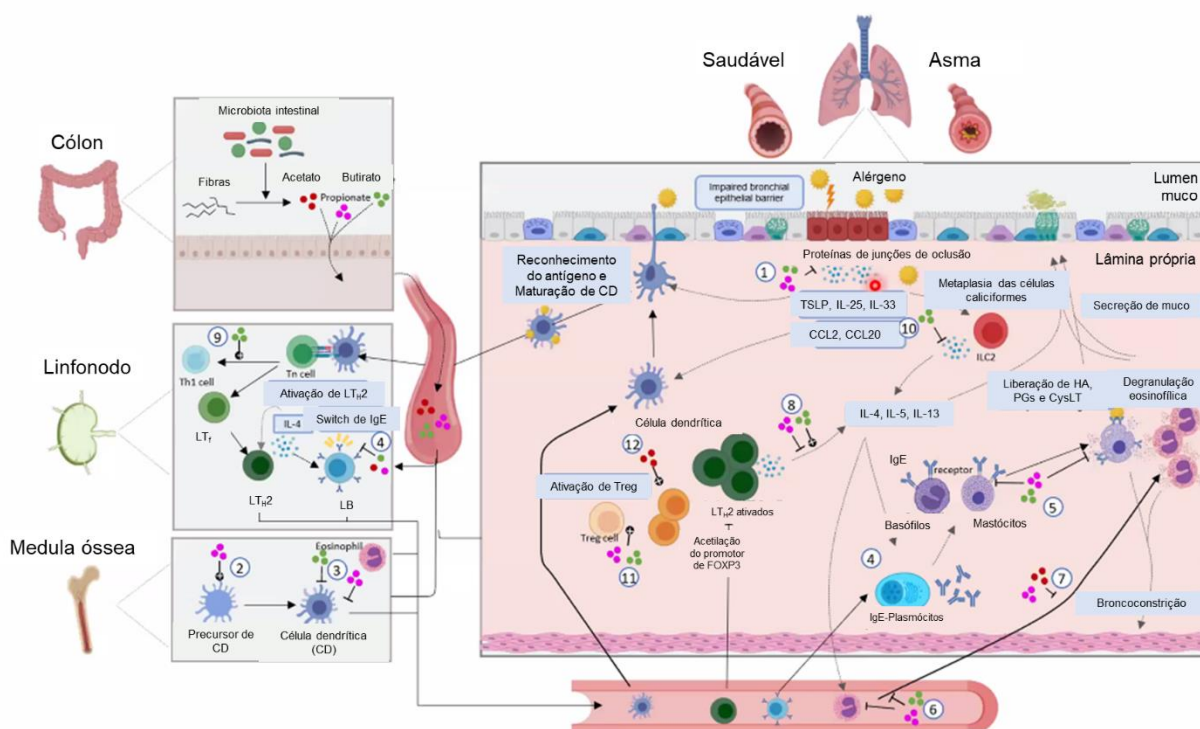
Nesse contexto, há o aumento da evidência de que micro-organismos viáveis administrados via oral agem regulando a resposta imune do sistema respiratório, sendo elencados como benéficos na prevenção e tratamento de várias doenças crônicas (Guarner *et al.*, 2008). Eles exercem efeitos pleiotrópicos, como efeito antimicrobiano ao competir com micro-organismos patogênicos aumentando a função de proteção da barreira intestinal (Noce *et al.*, 2019); modulação local e sistêmica via aumento da IL-10 do tecido linfóide associado à mucosa (MALT), subdividido em GALT (tecido linfóide associado ao intestino), BALT (tecido linfóide associado aos brônquios) e NALT (tecido linfóide associado ao nariz); ativação de células T_{reg} (CD4⁺FOXP3⁺) conferindo uma resposta anti-inflamatória e um padrão tolerogênico na mucosa (So *et al.*, 2008).

A fermentação de carboidratos não digeríveis por bactérias da microbiota produz os ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) que possuem efeitos locais (nutrição celular, regulação da permeabilidade intestinal) e efeitos sistêmicos via receptores (Figura 3). Após serem produzidos no cólon, os AGCCs são absorvidos pelos colonócitos através do transporte ativo mediado pelos transportadores de monocarboxilados (*Monocarboxylate Transports* – MCTs), sendo utilizados como principal fonte de energia por essas células. Além disso, os AGCCs contribuem para a manutenção da barreira intestinal e redução da síntese de mediadores inflamatórios. Os principais AGCCs encontrados no organismo são o acetato, o propionato e o butirato. O butirato demonstrou ser capaz de reduzir a permeabilidade intestinal aumentando a expressão de junções de oclusão (*tight junctions*), proteínas de adesão que conectam as células epiteliais. O acetato e o butirato também parecem estimular a secreção de muco no trato digestivo (Ashique *et al.*, 2022).

Os AGCCs não metabolizados nos colonócitos são transportados pela circulação portal para o fígado, onde também são utilizados como fonte de energia pelos hepatócitos. Dessa forma, uma taxa menor de AGCCs chegam na circulação sistêmica e tecidos periféricos. Alguns efeitos fisiológicos dos AGCCs já foram

observados: atuam como ligantes endógenos de receptores acoplados à proteína G (GPCRs), sendo os principais estudados, o GPR43 (ou FFA2, *Free Fatty Acid 2*), GPR41 (ou FFA3), GPR109a (ou HCAR2, *hydroxycarboxylic acid receptor*) e GPR164. Esses receptores, quando ativados, culminam em diferentes vias de sinalização intracelular (proteína $G_{q/11}$, fosfolipase A_2 (PLA₂) e proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK)); inibição da histona desacetilase (HDACs), promovendo hiperacetilação de histonas e regulação da expressão gênica/ transcrição proteica; aumento da expressão das junções de oclusão (zônula de ocludina-1), fortalecendo a barreira intestinal, sendo importante para prevenir a entrada de agentes inflamatórios; através da inibição da HDACs e modulação dos receptores, os AGCCs regulam diferenciação, recrutamento e ativação de neutrófilos, células dendríticas, macrófagos, monócitos e células T, exercendo um papel imunomodulador sistêmico (Dahiya *et al.*, 2017; Draper; Parsonnet, 2017).

Figura 3 - Mecanismos de ação dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), acetato, propionato e butirato envolvidos na asma alérgica.



Os AGCCs agem como uma ponte entre a microbiota intestinal e o sistema imune com intuito de manter a homeostase. Na região do cólon, a fermentação de carboidratos não digeríveis por bactérias da microbiota produz os AGCCs (acetato, propionato e butirato). Os AGCCs não metabolizados nos colonócitos chegam na circulação sistêmica e tecidos periféricos. Alguns efeitos já foram observados em diferentes órgãos: **1.** No epitélio pulmonar, o propionato e o

butirato reduziram os níveis das alarminas (TSLP- linfopoetina estromal tímica, IL-25 e IL-33) liberadas por ILC2 (células linfoides inatas do tipo 2); **2 e 3.** Na medula óssea, o propionato e o butirato reduziu a maturação de células dendríticas (CDs) e seu recrutamento para o tecido pulmonar; **4.** Nos linfonodos, o acetato, o propionato e o butirato reduziram o *switch* de IgE comum em quadros alérgicos, somado a isso, **5.** O propionato e o butirato reduziram a degranulação de mastócitos e liberação de histamina (HA), prostraglandinas (PGs) e cistenil-leucotrienos (CysLT); **6.** O recrutamento e a degranulação eosinofílica foram reduzidos pelo propionato e o butirato; **7.** No músculo liso bronquiolar, o acetato e o propionato reduziram a broncoconstrição; **8.** No parênquima pulmonar, o propionato e o butirato diminuíram os níveis de IL-4, IL-5 e IL-13 liberadas por linfócitos T_H2; **9.** Nos linfonodos, o butirato aumentou a diferenciação de linfócitos virgens (LT_H0) para linfócitos T_H1; **10.** O butirato, reduziu os níveis de quimiocinas CCL2 e CCL20; **11.** O propionato e o butirato aumentaram a diferenciação de LT_{reg} atrelado ao **12.** Efeito do acetato em aumentar a acetilação do fator promotor do FOXP3 (LT_{reg}).

Fonte: adaptado Ashique *et al.*, 2022.

Estudos complementares demonstram que doenças alérgicas podem ser prevenidas com uso de micro-organismos benéficos. Modelos animais têm tido um papel central na identificação dos mecanismos imunomoduladores de probióticos. Em modelo murino de asma, a administração do *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium breve* e *Lactobacillus rhamnous* diminuiu a hiper-responsividade, o número de células inflamatórias no lavado broncoalveolar e no tecido pulmonar (Hougee *et al.*, 2010; Feleszko *et al.*, 2007). Outras espécies induziram aumento dos níveis de IL-2, citocina essencial para expansão clonal de células T ativadas por antígenos além de induzir a homeostase via células T_{reg} (Donkor *et al.*, 2012).

2.9.1 *Limosilactobacillus fermentum* (*L. fermentum*)

O *L. fermentum* é uma bactéria gram positiva, heterofermentativa, encontrada em produtos lácteos, estrume, vegetais fermentados, boca e fezes de humanos descritos pela primeira vez no Manual de *Bergey* de Bacteriologia Sistemática em 1901 (Pederson, 1938). Desde a sua descoberta sofreu reclassificações com base em diferenças moleculares, mas com o desenvolvimento da tecnologia de biologia molecular, o *L. fermentum* pode ser identificado com precisão pelo sequenciamento de DNA 16S e genes de manutenção específicos. Recentemente foi novamente renomeado devido ao aumento da diversidade do gênero *Lactobacillus* e a

necessidade de separá-lo em grupos com características de fato fisiológicas e propriedades metabólicas semelhantes.

O *L. fermentum* é considerado como uma cepa probiótica segura na china, sendo consumido em uma variedade de alimentos fermentados. Em 2009, foi incluído na Lista *Qualified Presumption of Safety (QPS)* da *European Food Safety Authority (EFSA)* (Leuschner *et al.*, 2010). Em 2013, nos Estados Unidos, foi listado como “*Generally Recognized As Safe*” (*GRAS*) pela *Food and Drug Administration (FDA)*. Ele tem sido usado na indústria em processos fermentativos por seu potencial em produzir uma variedade de enzimas industriais como X-prolil dipeptidil aminopeptidase, L-arabinose isomerase e glutamato descarboxilase (Lin; Li; Qin, 2017).

O *L. fermentum* apresenta origem humana, é um micro-organismo não patogênico, tem alta resistência ao trato gastrointestinal, reforça fisicamente a barreira gastrointestinal e tem ação bacteriostática pela produção de ácidos orgânicos, principalmente, ácidos láctico e acético, peptídios antimicrobianos (Melo *et al.*, 2017; Rao; Sreenivasa, 2016) além de propriedades imunomoduladoras e mecanismos reguladores identificados em estudos não clínicos (*in vitro* e *in vivo*) e em estudos clínicos.

Outros estudos demonstraram que o *L. fermentum* interage com macrófagos, células dendríticas e hepatócitos, e participa da regulação de uma série de citocinas inflamatórias (Barone *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2017). O *L. fermentum* associado à ingestão de fibra dietética demonstrou atividade moduladora a partir da liberação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), incluindo ácidos propiônico, butírico, acético e láctico, no intestino. O propionato demonstrou aumento da abundância de células T invariantes associadas à mucosa (MAITs) e T_{reg}. Esses ácidos graxos podem se ligar a receptores acoplados à proteína G (GPCRs) em linfócitos para modular a resposta imune (Cani, 2018).

Essa espécie já foi estudada no contexto metabólico, sendo eficaz na melhora do perfil lipídico em ratos expostos à dislipidemia materna (Oliveira *et al.*, 2020). Em modelo experimental de obesidade, o *L. fermentum* atenuou distúrbios cardiometabólicos em ratos tratados com dieta hiperlipídica (Cavalcante *et al.*, 2019). Em outro estudo, a suplementação oral com o *L. fermentum* modulou o metabolismo da glicose e regulou a proliferação, a migração e a função de células imunes inatas e

adaptativas no hospedeiro (Meenakshi; Malhotra, 2015; Westfall; Lomis; Prakash, 2018). Em modelo de colite, o *L. fermentum* demonstrou atenuar o processo inflamatório pelo efeito imunomodulador na produção de alguns mediadores como PGE₂, IL-4, IL6, IL-10, IL-17, TNF- α , IFN- γ , NO (Rodriguez-Nogales *et al.*, 2017). Em um estudo clínico, o *L. fermentum* apresentou efeito antialérgico em quadro de dermatite atópica (Wang; Wang, 2015).

2.9.2 *Lacticaseibacillus paracasei* (*L. paracasei*)

O *L. paracasei* é encontrado em queijos frescos bem como no intestino humano. É classificado como uma bactéria com alta tolerância em ambientes com baixo pH, incluindo o trato gastrointestinal, com seus ácidos e a bile, sendo utilizado em suplementos alimentares e dietéticos desde 1995. Seu uso é associado a benefícios já observados em vários sistemas, incluindo, sistema imune, respiratório e função intestinal (Sun *et al.*, 2017).

Em um estudo *in vitro* com células estimuladas com o LPS para mimetizar a interação de bactérias gram negativas e macrófagos no ambiente da mucosa intestinal, o *L. paracasei* inibiu a produção de TNF- α e IL-1 β pela indução de genes reguladores, como SOCS1 e SOCS3 e IRAK3 e inibição do NF- κ B mediada pela ativação do receptor TLR2 (Sun *et al.*, 2017).

O *L. paracasei* apresentou efeito antialérgico em quadro de dermatite atópica em estudos clínico e não clínico. Além disso, em modelo experimental de asma alérgica exacerbada por PM_{2.5} o *L. paracasei* também demonstrou efeito antialérgico (Wang; Wang, 2015; Ohshima-Terada *et al.*, 2015 e Wang *et al.*, 2017). Outra linhagem de *L. paracasei* KW3110 administrado oralmente em camundongos alérgicos à ovalbumina (OVA) demonstrou efeitos antialérgicos por modular as citocinas T_H1 e T_H2, via indução de IL-12 e inibição de IL-4 (Fujiwara *et al.*, 2004).

Considerando as atividades bioativas já apresentadas pelo *L. fermentum* e o *L. paracasei*, o presente trabalho deteve-se a investigar os seus efeitos em modelo de CARAS.



Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da suplementação oral com *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) ou com *Lacticaseibacillus paracasei* (LPc-G110) em camundongos no modelo experimental da CARAS induzido por ovalbumina (OVA).

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do LF61 e LPc-G110 nos sinais clínicos relacionados à rinite experimental tais como espirros e fricções nasais e na hiper-reatividade nasal induzida por histamina;
- Investigar o efeito do LF61 e LPc-G110 na migração de células inflamatórias para as cavidades nasal e pulmonar a partir do fluido do lavado nasal (NALF) e do fluido do lavado broncoalveolar (BALF);
- Avaliar o efeito sistêmico das cepas a partir do nível sérico de IgE OVA-específica e percentual de celularidade periférica;
- Investigar o efeito do LF61 e LPc-G110 no tecido nasal e pulmonar quanto à migração de células inflamatórias, células caliciformes e muco e depósito de matrix extracelular;
- Investigar o potencial imunomodulador do LF61 e LPc-G110 a partir da produção das citocinas no BALF
 - IL-1 β e TNF- α ;
 - ILC2 (TSLP e IL-33);
 - T_H2 (IL-4, IL-5 e IL-13);
 - T_H17 (IL-17) e TGF- β ;
 - T_H1 (IFN- γ e IL-12);
 - T_{reg} (IL-10).
- Investigar o efeito do LF61 e LPc-G110 na expressão de vias de sinalização intracelulares:
 - MAPKs (ERK 1/2 e p-P38)
 - FOXP3

- Investigar o efeito do LF61 e LPc-G110 nos níveis de ácidos graxos cadeia curta (AGCCs) fecais e séricos;
- Investigar o efeito do LF61 e LPc-G110 na integridade de barreira do tecido intestinal.



Material e métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Produto-teste

As cepas dos micro-organismos, *Limosilactobacillus fermentum* LF61 e *Lactocaseibacillus paracasei* LPc-G110, utilizadas no estudo foram obtidas de uma farmácia magistral (João Pessoa, PB, Brasil) acompanhadas de seu certificado de análise (Anexos A e B) e previamente identificadas por análise da sequência gênica 16S rRNA. Os camundongos receberam a dose de LF61 ou LPc-G110 (1×10^9 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) / 0,2 mL PBS / animal), via oral, três vezes por semana com início uma semana antes da primeira sensibilização até o último desafio (dia 42) (Figura 3) (Anatriello *et al.*, 2019).

4.1.2 Animais

Para o desenvolvimento do protocolo experimental de CARAS, foram utilizados camundongos isogênicos fêmeas BALB/c (*Mus musculus*) com idade 6 a 8 semanas, pesando entre 20 e 25 g, obtidos do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da UFPE/Recife, PE. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (41x34x16 cm) à temperatura de 22 ± 2 °C e submetidos a ciclo de claro e escuro de 12 horas (6:00 as 18:00 claro e das 18:00 às 6:00 escuro) com livre acesso a água e uma dieta livre a base de ração do tipo *pellets* (Nuvilab®) durante todo o período de experimentação. A manipulação dos animais foi realizada de acordo com o guia de cuidado animal (Sherwin *et al.*, 2003) e os protocolos experimentais foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA Nº 7316150420) da UFPB (Anexo C). A eutanásia dos animais foi realizada por overdose de solução anestésica (xilazina 30 mg/kg + quetamina 300 mg/kg) diluída em solução salina (NaCl 0,9%), conforme a Resolução Normativa Nº 13, de 20.09.2013 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

Para avaliar o efeito do LF61 e do LPc-G110, os animais foram distribuídos em sete grupos experimentais (n=5) (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição dos animais quanto aos grupos experimentais

Grupos	Descrição
Basal	Animais saudáveis, não sensibilizados e não desafiados com OVA.
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> (LF61)	Animais saudáveis e suplementados com 1×10^9 UFC de LF61 (via oral).
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> (LPc-G110)	Animais saudáveis e suplementados com 1×10^9 UFC de LPc-G110 (via oral).
CARAS	Animais doentes, sensibilizados e desafiados com OVA e não tratados.
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> (LF61) / CARAS	Animais doentes e tratados, sensibilizados e desafiados com OVA e suplementados com 1×10^9 UFC de LF61 (via oral).
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> (LPc-G110) / CARAS	Animais doentes e tratados, sensibilizados e desafiados com OVA e suplementados com 1×10^9 UFC de LPc-G110 (via oral).
Dexametasona (Dexa)	Animais doentes e tratados, sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com 2 mg/kg de dexametasona (via oral).

Fonte: Cavalcanti, 2023.

4.1.3 Substâncias e reagentes

O hidróxido de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$), o cloreto de sódio (NaCl), o fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), o fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), a OVA grade II, a OVA grade V e a histamina foram provenientes da Sigma-Aldrich®. Os dois tipos de OVA foram conservados sob refrigeração e diluídos em solução salina. O cloridrato de ketamina foi obtido da Vetbrands® (Brasil). Os *Kits* para dosagem de citocinas murinas assim como os *Kits* para citometria de fluxo foram obtidos da eBioscience®.

4.1.4 Soluções

Em um recipiente estéril, as substâncias que compõem a solução anestésica foram diluídas em salina obtendo a solução esperada após homogeneização conforme mostra a tabela 2.

Tabela 2 - Composição da solução anestésica

Substância	Quantidade (mL)
Xilasina	1
Quetamina	3
Salina	8

Fonte: Cavalcanti, 2023.

A solução de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) foi preparada a partir do fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), do fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) e do cloreto de sódio (NaCl) diluídos em água destilada nas devidas proporções como mostra a Tabela 3.

Tabela 3 - Composição da solução de PBS

Substância	Quantidade
Fosfato de sódio monobásico	0,22 g
Fosfato de sódio dibásico	1,19 g
Cloreto de sódio	8,76 g
Água destilada q.s.p	1000 mL

Fonte: Cavalcanti, 2023.

4.2 Métodos

4.2.1 Modelo da Síndrome de Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS)

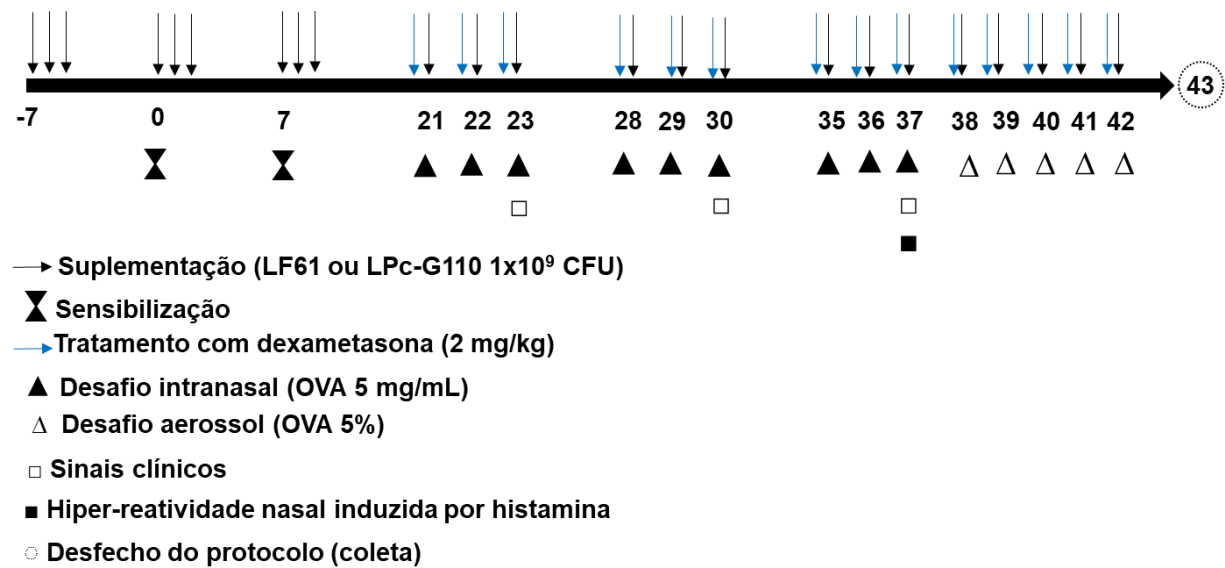
Os camundongos BALB/c fêmeas foram sensibilizadas, no primeiro e no sétimo dia do protocolo experimental, com uma suspensão de 50 µg/mL de ovalbmina (OVA-grade V) e 10 mg/mL de hidróxido de alumínio em solução salina. Essa suspensão foi administrada via intraperitoneal na dose de 100 µL/10 g do animal. Após a sensibilização, os animais foram desafiados com solução de 5 mg/mL de OVA (grade V) via intranasal por três dias consecutivos e durante três semanas (dia 21 a 35). Em seguida, foi realizado o desafio via aerossol de OVA (grade II) a 5% em solução salina com intervalos de 24h por 5 dias consecutivos (dia 38 a 42). Os desafios aerossóis foram realizados durante 30 minutos diários em uma câmara fechada, sob um fluxo

contínuo de aerossol, com o auxílio de um nebulizador ultrassônico (Paiva Ferreira et al., 2021). O tratamento com a dexametasona (2 mg/kg, por via oral) ocorreu 1 h antes de cada desafio com ovalbumina.

Os camundongos foram distribuídos em sete grupos (n=5) (Tabela 1): o grupo basal representou os animais controles; os grupos LF61 e LPc-G110 representaram os animais suplementados com *L. fermentum* ou *L. paracasei* (1x10⁹ UFC, por via oral); o grupo CARAS representou os animais sensibilizados e desafiados com ovalbumina; os grupos LF61/CARAS e LPc-G110/CARAS representaram os animias sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com *L. fermentum* ou *L. paracasei* (1x10⁹ UFC, por via oral); o grupo Dexa representou os animias sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com dexametasona (2 mg/kg, por via oral).

Após 24 horas do último desafio com OVA (dia 43) os animais foram eutanasiados com solução anestésica de quetamina e xilasina para coleta das amostras de interesse: o fluido do lavado nasal (NALF), o fluido do lavado broncoalveolar (BALF), sangue periférico, o soro e tecidos (Figura 3).

Figura 4 - Esquema representativo do modelo experimental da Síndrome de Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS)



Fonte: Cavalcanti, 2023.

4.2.2 Quantificação dos sinais clínicos

Os sinais clínicos, espirros e fricções nasais, foram quantificados em cada camundongo por 10 minutos nos dias 23º, 30º e 37º imediatamente após o desafio com OVA. A contagem foi realizada após filmagem dos camundongos previamente isolados em cubas de vidro espelhadas para melhor observação (Kuyama *et al.*, 2010).

4.2.3 Avaliação da hiper-reatividade nasal induzida pela histamina

A hiper-reatividade nasal à histamina foi determinada pela quantificação dos sinais clínicos: espirro e fricção nasal, durante 10 minutos, após a administração de doses crescentes de histamina diluída em solução salina, via intranasal. No dia 37º, uma hora após o desafio com o alérgeno, quatro microlitros de doses crescentes de histamina (0,1, 1, 10, 100 e 1000 nmol/ camundongo) foram instilados na cavidade nasal de forma consecutiva em intervalos de 60 minutos (Kuyama *et al.*, 2010).

4.2.4 Quantificação celular nos fluidos do lavado nasal (NALF) e broncoalveolar (BALF)

Para a coleta dos fluidos, primeiramente, os animais foram eutanasiados com solução anestésica e em seguida foi feita a assepsia do tórax e pescoço do animal com álcool 70º. A traqueia foi isolada com auxílio de instrumental cirúrgico (pinça e tesoura). Uma cânula de poliestireno foi introduzida na traqueia do animal no sentido traqueia-cavidade nasal para coleta do NALF e posteriormente traqueia-pulmão para a coleta do BALF. Para obter cada lavado foi administrado, por uma cânula, 1,0 mL de PBS na cavidade. O líquido após lavar a cavidade foi coletado em tubo tipo cônico. Os fluidos foram mantidos em baixa temperatura (6ºC) para conservação da viabilidade celular (Wang *et al.*, 2013) e posteriormente foram utilizados para contagem total e diferencial das células.

A contagem do número total de células nos lavados foi realizada em câmara de *Neubauer*, utilizando uma alíquota da amostra previamente homogeneizada e diluída em Solução de *Turk* na proporção 1:2 para o NALF e 1:4 para o BALF. A leitura foi feita no microscópio óptico em objetiva de 40x. Após contagem foi realizado o cálculo do número de células = $n \times d \times 10^4$, no qual n: média do número de células contadas

nos quatro quadrantes, d: diluição da amostra e 10^4 : diluição padrão da câmara de *Neubauer*.

Para contagem diferencial das células, 150-200 μL de cada lavado foram distribuídos igualmente por lâmina nos dois poços de uma cito centrífuga (*cytospin*® FANEN, São Paulo, SP, Brasil Mod 2400). O material foi centrifugado a 1500 RPM por 10 min. Após a cito centrifugação, as lâminas foram coradas por Panótico (*Panoptic methods* / Auto-Hemacolor®) com auxílio de uma cuba de coplin. Terminada a etapa de coloração, as lâminas foram lavadas em água destilada e secadas a temperatura ambiente. A contagem diferencial de leucócitos (linfócitos, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos) foi realizada por microscopia óptica. Cada lâmina foi observada até a contagem de 100 células, utilizando para isso a objetiva de imersão (100x).

4.2.5 Quantificação celular no sangue periférico

Para contagem de leucócitos no sangue periférico foi realizada a técnica do esfregaço sanguíneo ou lâmina de extensão sanguínea. Uma gota de sangue obtida da veia caudal foi posta na lâmina de microscopia e distendida, formando assim, uma camada fina de sangue. As lâminas obtidas foram reservadas para secagem. Após essa etapa, as lâminas foram coradas com o *kit* rápido panótico® e submetidas a uma nova secagem. A leitura foi realizada com auxílio de microscopia óptica de forma a permitir que as diferentes células do sangue fossem quantificadas (Dória *et al.*, 2016).

4.2.6 Quantificação de IgE OVA-específica

No 43º dia do protocolo foram coletadas amostras de sangue do plexo braquial dos camundongos dos cinco grupos experimentais (Basal, CARAS, LF61/CARAS, LPc-G110/CARAS e Dexa). As amostras de sangue foram submetidas à centrifugação (300 g, a 4°C por 10 min) para obtenção do soro. Em seguida, as amostras foram submetidas à técnica do Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para quantificação dos níveis séricos de IgE OVA específica de acordo com o protocolo especificado no *Kit* do fabricante (eBioscience®, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA).

4.2.7 Análises histológicas

Os órgãos, cabeça, pulmão e cólon, dos animais foram coletados e fixados em formalina tamponada por 48 horas. Posteriormente à fixação, o excesso de pele das cabeças foi retirado, a mandíbula e os olhos foram removidos e o crânio seccionado na região posterior, entre o terceiro dente superior e a abertura posterior do ducto faríngeo (nasofaringe) (Guibas *et al.*, 2014). Em seguida, os narizes foram submetidos à descalcificação química pelo auxílio de um agente quelante, o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), durante uma média de 15 dias.

As próximas etapas do processamento histológico foram semelhantes para os três órgãos em análise. O material histológico foi inicialmente desidratado por imersões de 1 hora numa série crescente de álcool etílico a 70, 80, 90 e 100%. A desidratação evita a retração do tecido e, conseqüentemente, as lesões estruturais da célula de caráter irreversível (Molinaro *et al.*, 2010). Em seguida, foi feita a diafanização, na qual o material foi imerso duas vezes em xilol com duração de 1 h, cada imersão. O xilol funciona nesta etapa como desalcolizante. Em sequência à diafanização, a impregnação do material foi realizada em parafina. Na impregnação, as amostras foram submetidas a dois banhos sucessivos em parafina, cada banho com duração de 1 h. Após impregnação, o material histológico foi emblocado em formas de parafina. Quando o material foi totalmente imerso, cada bloco foi deixado ao ar livre para solidificação da parafina. Os blocos solidificados foram retirados das formas e, em seguida, foram realizados os cortes histológicos no micrótomo.

Os cortes histológicos foram realizados com espessura de 5 µm. Após a microtomia, as fitas de parafina obtidas foram colocadas em banho-maria (38-40 °C). Com auxílio das lâminas, os cortes foram “pescados” do banho-maria. Em seguida, as lâminas foram reservadas para secagem. Com os cortes aderidos às lâminas, foram realizadas diferentes colorações.

Os tecidos nasais e pulmonares foram corados com hematoxilina-eosina (HE) para visualização do arcabouço tecidual e análise do infiltrado celular; ácido periódico de Schiff (PAS) para quantificação do índice de muco produzido pelas células caliciformes; e tricrômico de Masson (TM) para quantificação da deposição da matriz extracelular (MEC). Os tecidos do cólon foram corados com hematoxilina-eosina (HE) e ácido periódico de Schiff (PAS) de acordo com protocolos padrão. Em seguida, foi

realizada a montagem das lâminas com inserção de lamínulas. Como meio de montagem (selante) foi utilizado o bálsamo do Canadá (Vieira, 2008).

As fotomicrografias foram capturadas pela câmera Nikon DS-Ri2 acoplada ao microscópio óptico (Nikon Eclipse Ci®) e pelo software NIS-Element D. Quinze imagens de cada lâmina foram capturadas com ampliação de 400x e calibradas no programa ks300. As análises morfométricas dos parâmetros teciduais foram realizadas para quantificação da infiltração celular tecidual, do índice de muco e da deposição de matriz extracelular (MEC). O método de imagem, segmentação de imagens e definição de parâmetros morfométricos já foram descritos anteriormente (Pereira *et al.*, 2022).

4.2.8 Quantificação de citocinas no BALF

O BALF de cada grupo experimental foi congelado a -20°C para posterior quantificação das seguintes citocinas: IL-33, TSLP, IL-4, IL-13, IL-5, IL-17, IL-10, IFN- γ , IL-12, IL-1 β , TNF- α e TGF- β . Essa quantificação foi realizada pelo ensaio imunoenzimático, de acordo com a técnica ELISA sanduíche especificado no *Kit* do fabricante (eBioscience®, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA).

4.2.9 Análise da expressão de MAPKs e FOXP3

Para avaliação da expressão de proteínas envolvidas em vias de sinalização intracelulares, a população celular heterogênea do BALF foi analisada pela técnica de citometria de fluxo usando medidas de luz espalhada para frente (FSC) e luz espalhada lateralmente (SSC) que permitiram distinguir a população celular por tamanho (difração de luz) e granulosidade (difusão de luz), respectivamente. O BALF foi então centrifugado, retirou-se o sobrenadante e o ressuspendeu em um volume pré-calculado para se obter 2x10⁵ células/mL de PBS. Para analisar a ativação das MAPKs e do FOXP3, as células foram fixadas (*BD Cytofix*™) e permeabilizadas (*Perm Buffer BD Phosflow*™) por 30 min cada. Após isso, as células foram marcadas com anticorpo anti-p-p38 (PerCP-Cy5), anti-p-ERK1/2 (PE) ou anti-FOXP3 (PE) de acordo com as instruções do fabricante. Cerca de 10.000 eventos foram analisados em citômetro de fluxo FACS CANTO II (*Becton & Dickinson*) e os dados obtidos a partir do *software BD FACSDiva*™ foram analisados utilizando o *software FlowJo*.

4.2.10 Análise histoquímica

Para detecção da zônula de ocludina-1 (ZO-1), secções do intestino (5 µm) foram obtidas com micrótomo e transferidas para lâminas silanizadas (Dako, Glostrup Denmark). As lâminas contendo secções de parafina com fragmentos dos tecidos do cólon foram desparafinadas em banhos de xilol durante 15 min cada, em seguida, foram hidratadas em soluções decrescentes de álcoois e lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,2, 0,01 M) a 10%. Subsequente, foi realizado o método indireto simples de bloqueio com o anti peroxidase peroxidase (APP), o anticorpo primário é direcionado contra o antígeno (proteína) a ser detectado e o anticorpo secundário serve como uma ponte para ligação ao complexo APP. O anticorpo primário correspondente foi utilizado o suficiente para cobrir os fragmentos de tecido do cólon e as lâminas foram incubadas durante a noite numa câmara úmida a 4°C. Em seguida, foi adicionado o anticorpo secundário biotinilado e as lâminas foram novamente incubadas à temperatura ambiente por 60 min. A reação foi desenvolvida utilizando solução cromógena de 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Biocare Medical, CA, EUA) 0,024% em PBS mais solução de peróxido de hidrogênio a 0,16% volume em PBS por 5 min. As amostras foram contrastadas com hematoxilina.

As lâminas foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool (70%, álcool absoluto), diafanizadas em xilol e montadas em Entellan®. As amostras foram visualizadas em microscópio óptico (Nikon Eclipse Ci®) acoplado a uma câmera (Nikon DS-Ri2). Foi realizada análise morfométrica da imunomarcação. Quinze imagens de cada lâmina foram capturadas com ampliação de 400x. O método de imagem, segmentação das imagens e definição dos parâmetros morfométricos foram descritos anteriormente (Pereira *et al.*, 2022).

4.2.11 Análise dos níveis de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs)

A extração dos AGCCs foi realizada utilizando um método adaptado de Teixeira *et al.* (Teixeira *et al.*, 2013). No último dia do protocolo experimental, cem miligramas (100 mg) de fezes ou cem microlitros (100 µL) de soro de cada animal foram homogeneizados com 900 µL de solução de ácido o-fosfórico (25%) e incubados em temperatura ambiente por 30 min. Após esse período, as amostras foram centrifugadas (microcentrífuga refrigerada, HERMLE Z 216MK; Hermle Labortechnik)

a 17.319 g por 30 min a 4°C, e os sobrenadantes foram transferidos para um novo tubo. Este procedimento foi realizado três vezes. Antes da análise, as amostras foram filtradas (filtro 13 mm x 0,45µm). Os ácidos butírico, propiônico e acético foram quantificados por Cromatografia Gasosa (CG) (modelo CG-17A; Shimadzu®) equipado com detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar DB-WAX (30 m x 0,25 mm; Supelco®). O gás nitrogênio (N₂) foi utilizado como gás de arraste e o fluxo na coluna foi de 1,0 mL/min. As temperaturas do injetor e do detector foram ajustadas em 220 e 250°C, respectivamente. A temperatura inicial da coluna foi de 100°C sustentada por 5 min, aumentando a 10°C/min até atingir 185°C. Em seguida, as amostras foram injetadas (1 µL) através de uma seringa Hamilton® (10 µL) em sistema split 5. O tempo total da corrida foi de 30 min.

4.2.12 Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média ± erro padrão da média (e.p.m.) e analisados estatisticamente utilizando análise de variância (ANOVA *one-way*), seguido de pós-teste de *Tukey* para comparação múltipla entre os grupos experimentais. Os valores foram considerados significativos quando os valores de *p* < 0,05. Todos os dados foram analisados pelo software *GraphPad Prism*® versão 9.0 (*GraphPad Software Inc., San Diego, CA, E.U.A.*).



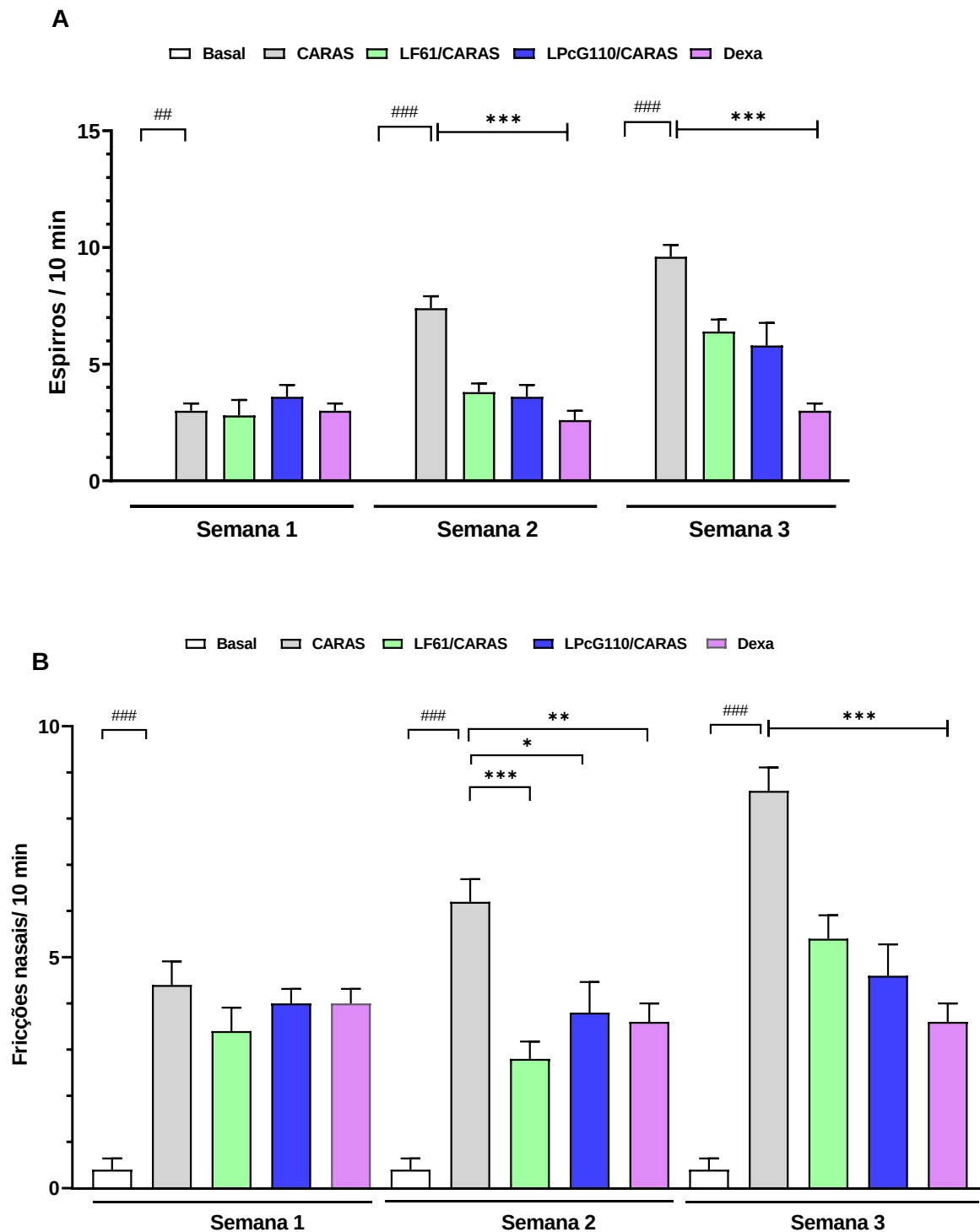
Resultados

5. RESULTADOS

5.1 Efeito da suplementação com *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) ou com *Lacticaseibacillus paracasei* (LPc-G110) nos sinais clínicos da rinite em camundongos com CARAS

Os animais com CARAS e suplementados com o LF61 (grupo LF61/CARAS) ou com o LPc-G110 (grupo LPc-G110/CARAS) apresentaram redução significativa dos sinais clínicos da rinite, número de espirros e fricções nasais. No grupo CARAS, o número de espirros e de fricções nasais ($9,6 \pm 0,5$; $8,6 \pm 0,5$; $p < 0,001$, respectivamente) (Gráfico 1A, B) aumentou quando comparado com os animais do grupo basal ($0,04 \pm 0,02$; $0,4 \pm 0,2$; respectivamente). A suplementação com o LF61 ou com o LPc-G110 dos animais com CARAS diminuiu o número de espirros (LF61- $6,4 \pm 0,5$ e LPc-G110- $5,8 \pm 0,9$, $p < 0,001$, respectivamente) quando comparado ao grupo CARAS ($9,6 \pm 0,5$) (Gráfico 1A), bem como o número de fricções nasais (LF61- $5,4 \pm 0,5$, $p < 0,001$ e LPc-G110 - $4,6 \pm 0,6$, $p < 0,01$) em comparação ao grupo CARAS ($8,6 \pm 0,5$) (Gráfico 1B). No grupo Dexa observou-se diminuição significativa no número de espirros e fricções nasais, como esperado. Não houve diferenças estatísticas nos números de espirros e fricções nasais entre os grupos LF61 e LPc-G110.

Gráfico 1 - Quantificação de espirros (A) e fricções nasais (B) em camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS) suplementados ou não com *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) ou *Lacticaseibacillus paracasei* (LPc-G110).



As colunas e barras verticais representam a média e o erro padrão da média (e.p.m.) respectivamente. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada pelo ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey* (grupos vs. número de espirros (A) ou fricções nasais (B)). Os camundongos BALB/c (n= 5) foram distribuídos em grupos: Basal (animal no estado fisiológico); CARAS (animais doentes por ovalbumina); LF61/CARAS (animais doentes e suplementados com *Limosilactobacillus fermentum* 1×10^9 UFC); LPc-G110/CARAS (animais

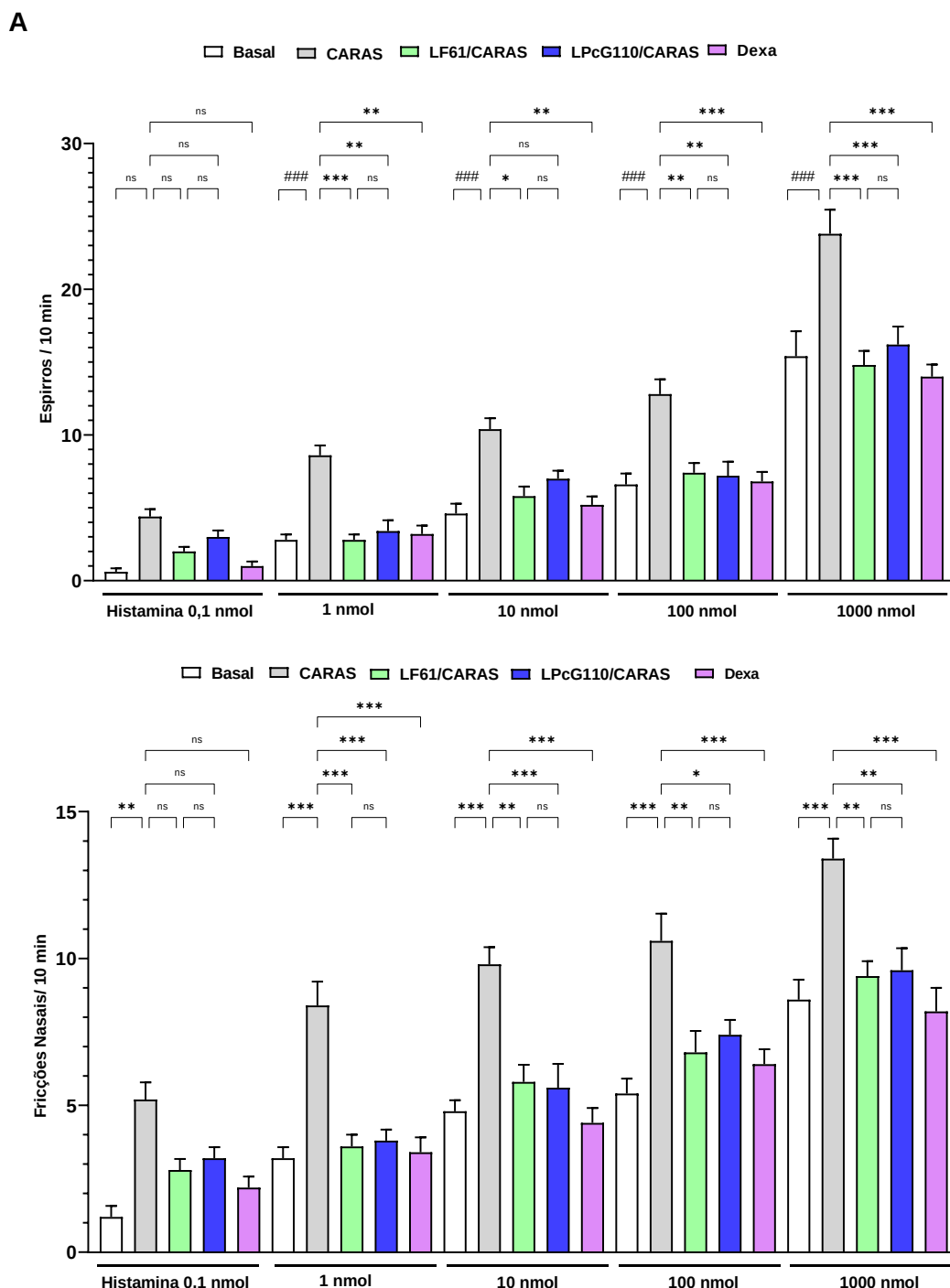
doentes e suplementados com *Lacticaseibacillus paracasei* 1×10^9 UFC) e Dexa (droga padrão, dexametasona 2 mg/kg). $###p < 0,001$ (CARAS vs. basal); $***p < 0,001$ (CARAS vs. Dexa, LF61/CARAS e LPc-G110/CARAS), $**p < 0,01$ (CARAS vs. Dexa), $*p < 0,05$ (CARAS vs. LPc-G110/CARAS).

Fonte: Cavalcanti, 2023.

5.2 Efeito da suplementação com *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) ou com *Lacticaseibacillus paracasei* (LPc-G110) na hiper-reatividade nasal induzida por histamina em camundongos com CARAS

A suplementação com o LF61 nos animais com CARAS (grupo LF61/CARAS) reduziu o número de espirros logo após a administração da histamina nas doses de 1 nmol ($2,8 \pm 0,3$; $p < 0,001$), 10 nmol ($5,8 \pm 0,6$; $p < 0,05$), 100 nmol ($7,4 \pm 0,6$; $p < 0,01$) e 1000 nmol ($14,8 \pm 0,9$; $p < 0,001$) quando comparado ao grupo CARAS ($8,6 \pm 0,6$; $10,4 \pm 0,7$; $12,8 \pm 1,0$; $15,4 \pm 1,7$, respectivamente) (Gráfico 2A). Resultados semelhantes foram observados após a suplementação com o LPc-G110 (grupo LPc-G110/CARAS) reduzindo o número de espirros após a administração das doses de histamina: 1 nmol ($3,4 \pm 0,7$; $p < 0,01$), 100 nmol ($7,2 \pm 0,9$; $p < 0,01$) e 1000 nmol ($16,2 \pm 1,2$; $p < 0,001$) em comparação ao grupo CARAS. O grupo Dexa apresentou resultados semelhantes aos das cepas bacterianas em análise (Gráfico 2A). Quanto ao número de fricções nasais, o LF61 reduziu esse parâmetro após a administração da histamina: 1 nmol ($3,6 \pm 0,4$; $p < 0,001$), 10 nmol ($5,8 \pm 0,5$; $p < 0,01$), 100 nmol ($6,8 \pm 0,7$; $p < 0,01$) e 1000 nmol ($9,4 \pm 0,5$; $p < 0,01$) em comparação aos animais do grupo CARAS nas respectivas doses ($8,4 \pm 0,8$; $9,8 \pm 0,5$; $10,6 \pm 0,9$; $13,4 \pm 0,6$) (Gráfico 2B). O LPc-G110 reduziu o número de fricções nasais após a administração de histamina: 1 nmol ($3,8 \pm 0,3$; $p < 0,001$), 10 nmol ($5,6 \pm 0,8$; $p < 0,001$), 100 nmol ($7,4 \pm 0,5$; $p < 0,05$) e 1000 nmol ($9,6 \pm 0,7$; $p < 0,01$) em relação ao grupo CARAS. A dexametasona reduziu o número de fricções nasais a partir da dose de 1nmol de histamina (Gráfico 2B).

Gráfico 2 - Quantificação de espirros (A) e fricções nasais (B) em camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS) suplementados ou não com *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) ou *Lacticaseibacillus paracasei* (LPc-G110) após administração de doses crescentes de histamina.



As colunas e barras verticais representam a média e o erro padrão da média (e.p.m.) respectivamente. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada pelo ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey* (dose da histamina vs. número de espirros (A) ou fricções nasais (B)). Os camundongos BALB/c (n= 5) foram distribuídos em grupos: Basal (animais no estado fisiológico); CARAS (animais doentes por ovalbumina); LF61/CARAS (animais doentes suplementados com *Limosilactobacillus fermentum* 1×10^9 UFC); LPc-G110/CARAS (animais

doentes e suplementados com *Lacticaseibacillus paracasei* 1×10^9 UFC) e Dexa (droga padrão, dexametasona 2 mg/kg). $^{###}p < 0,001$ (CARAS vs. basal); $^{***}p < 0,001$ (CARAS vs. LF61/CARAS, LPc-G110/CARAS e Dexa), $^{**}p < 0,01$ (CARAS vs. LF61/CARAS, LPc-G110/CARAS e Dexa), $^{*}p < 0,05$ (CARAS vs. LF61/CARAS, LPc-G110/CARAS).

Fonte: Cavalcanti, 2023.

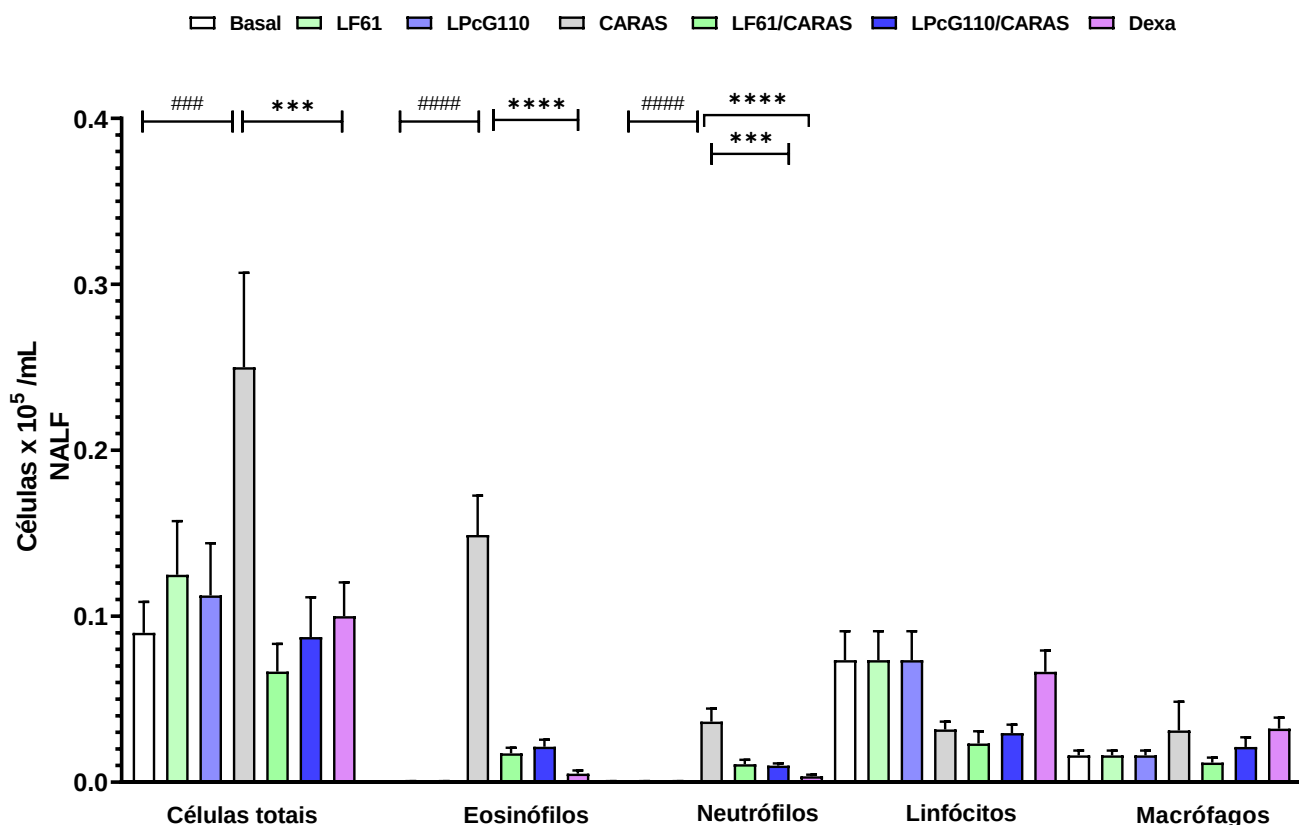
5.3 Efeito da suplementação com *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) ou com *Lacticaseibacillus paracasei* (LPc-G110) na migração de células inflamatórias para o fluido do lavado nasal (NALF) de camundongos com CARAS

A suplementação dos animais doentes com o LF61 (LF61/CARAS) ou com o LPc-G110 (LPc-G110/CARAS) reduziu a migração de células totais para o NALF ($0,06 \pm 0,01$; $0,08 \pm 0,02$; $p < 0,001$) quando comparados ao grupo CARAS ($0,25 \pm 0,05$), de forma semelhante ao resultado observado no grupo Dexa ($0,10 \pm 0,02$; $p < 0,001$) (Gráfico 3). Em adição, o LF61/CARAS reduziu a migração de eosinófilos ($0,01 \pm 0,003$; $p < 0,0001$) e neutrófilos ($0,01 \pm 0,002$; $p < 0,001$) no NALF, quando comparado ao grupo CARAS ($0,14 \pm 0,02$; $0,07 \pm 0,00$; $0,03 \pm 0,007$, respectivamente) (Gráfico 3). O número de linfócitos ($0,02 \pm 0,007$) e macrófagos ($0,01 \pm 0,002$) no grupo LF61/CARAS não alterou quando comparado ao grupo CARAS ($0,03 \pm 0,004$; $0,03 \pm 0,01$, respectivamente) (Gráfico 3). O grupo Dexa apresentou resultados semelhantes ao grupo LF61/CARAS no perfil de migração celular para o NALF.

A suplementação dos animais doentes com o LPc-G110 (LPc-G110/CARAS) não alterou o número de linfócitos ($0,02 \pm 0,005$) e macrófagos ($0,02 \pm 0,005$) quando comparado ao grupo CARAS ($0,03 \pm 0,004$; $0,03 \pm 0,01$, respectivamente) (Gráfico 3). O número de neutrófilos ($0,01 \pm 0,001$; $p < 0,01$) e eosinófilos ($0,02 \pm 0,004$; $p < 0,001$) foram reduzidos pelo LPc-G110/CARAS em relação ao grupo CARAS ($0,03 \pm 0,007$; $0,14 \pm 0,002$, respectivamente) (Gráfico 3).

Os animais do grupo Basal suplementados *per sin* com o LF61 ou com LPc-G110 não apresentaram infiltração de células inflamatórias comparado ao grupo Basal (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Efeito da suplementação com *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) ou com *Lactocaseibacillus paracasei* (LPc-G110) no número de células totais, eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e macrófagos no fluido do lavado nasal (NALF) de camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).



As colunas e barras verticais representam a média e o erro padrão da média (e.p.m.) respectivamente. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada pelo ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey* (número de células totais, eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e macrófagos vs. grupo experimental). BALB/c (n= 5) foram distribuídos em grupos: Basal (animais no estado fisiológico); LF61 (animais suplementados com *Limosilactobacillus fermentum* 1×10^9 UFC); LPc-G110 (animais suplementados com *Lactocaseibacillus paracasei* 1×10^9 UFC); CARAS (animais doentes por ovalbumina); LF61/CARAS (animais doentes suplementados com *Limosilactobacillus fermentum* 1×10^9 UFC); LPc-G110/CARAS (animais doentes e suplementados com *Lactocaseibacillus paracasei* 1×10^9 UFC) e Dexa (droga padrão, dexametasona 2 mg/kg). #### $p < 0,0001$ (CARAS vs. Basal); ### $p < 0,001$ (CARAS vs. basal); **** $p < 0,0001$ (CARAS vs. LF61/CARAS, LPc-G110/CARAS e Dexa); *** $p < 0,001$ (CARAS vs. LF61/CARAS, LPc-G110/CARAS e Dexa).

Fonte: Cavalcanti, 2023.

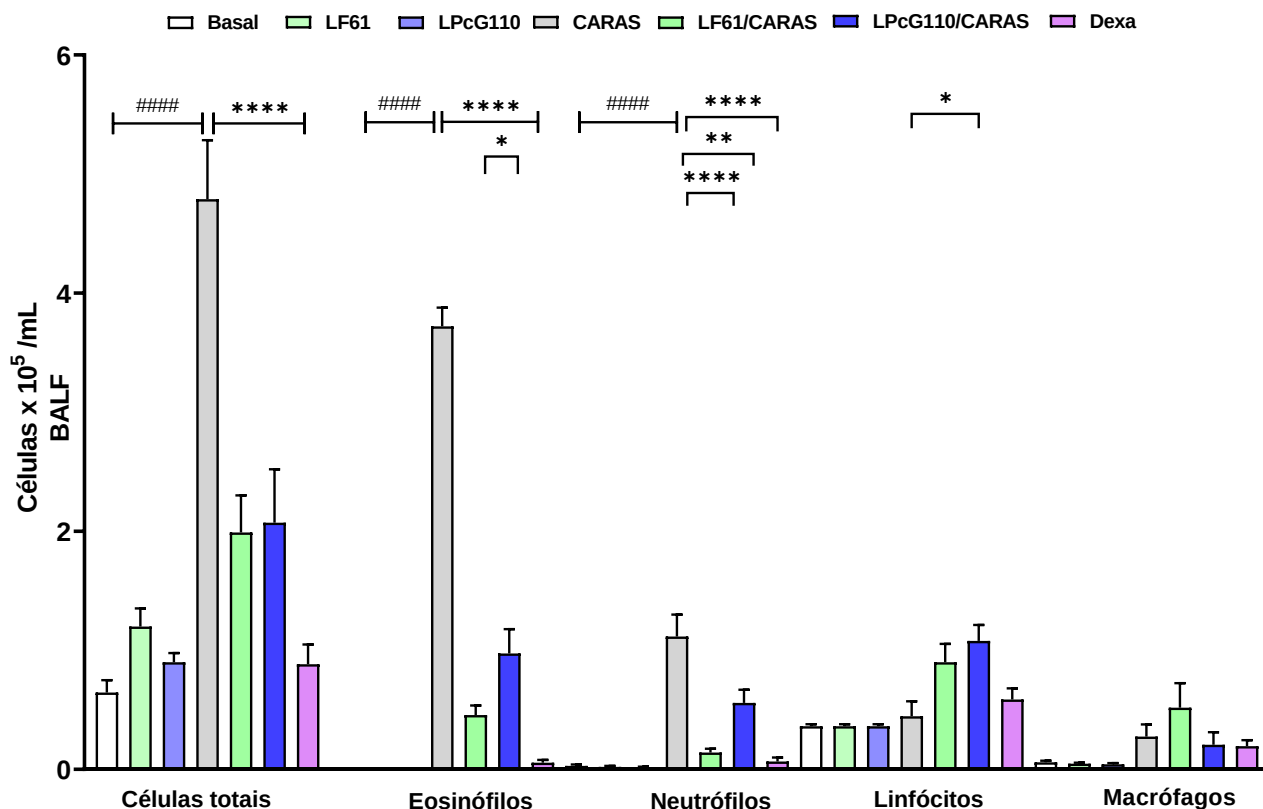
5.4 Efeito da suplementação com *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) ou com *Lacticaseibacillus paracasei* (LPc-G110) na migração celular para o fluido do lavado broncoalveolar (BALF) de camundongos com CARAS.

O número de células inflamatórias totais no BALF foi reduzido pela suplementação com LF61 (LF61/CARAS) ou com LPc-G110 (LPc-G110/CARAS) ($1,98 \pm 0,31$; $2,07 \pm 0,44$; $p < 0,0001$, respectivamente) quando comparado aos animais do grupo CARAS ($4,78 \pm 0,49$) (Gráfico 4). O LF61/CARAS reduziu o número de eosinófilos e neutrófilos ($0,45 \pm 0,08$; $0,14 \pm 0,03$; $p < 0,0001$, respectivamente) no BALF em comparação ao grupo CARAS ($3,72 \pm 0,15$; $1,11 \pm 0,18$, respectivamente). O número de linfócitos não foi alterado pela suplementação com o LF61/CARAS ($0,89 \pm 0,15$) em relação ao grupo CARAS ($0,44 \pm 0,12$) (Gráfico 4). Em relação ao número de macrófagos não foi observado diferenças entre os grupos estudados (Gráfico 4). O grupo Dexametasona apresentou redução no número de eosinófilos e neutrófilos ($0,06 \pm 0,02$; $0,06 \pm 0,03$; $p < 0,0001$, respectivamente) em relação ao grupo CARAS ($3,72 \pm 0,15$; $1,11 \pm 0,18$, respectivamente).

A suplementação com o LPc-G110 (LPc-G110/CARAS) reduziu a população de eosinófilos e neutrófilos ($0,97 \pm 0,20$; $0,55 \pm 0,10$; $p < 0,0001$, respectivamente) em comparação ao grupo CARAS ($3,72 \pm 0,15$; $1,11 \pm 0,18$, respectivamente). Na população de eosinófilos, observou-se diferença ($p < 0,05$) entre os grupos LF61/CARAS ($0,45 \pm 0,08$) e LPc-G110/CARAS ($0,97 \pm 0,20$). No que tange a população de linfócitos, o LPc-G110/CARAS acentuou a migração dessas células para o BALF ($1,07 \pm 0,13$; $p < 0,05$) quando comparado ao grupo CARAS ($0,44 \pm 0,12$). Entretanto, o número de macrófagos não alterou entre os grupos estudados (Gráfico 4).

Os grupos Basal suplementados *per se* com o LF61 ou com LPc-G110 não apresentaram diferença no número de células inflamatórias comparado ao grupo Basal (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Efeito da suplementação com *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) ou *Lacticaseibacillus paracasei* (LPc-G110) no número de células totais, eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e macrófagos no fluido do lavado broncoalveolar (BALF) de camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).



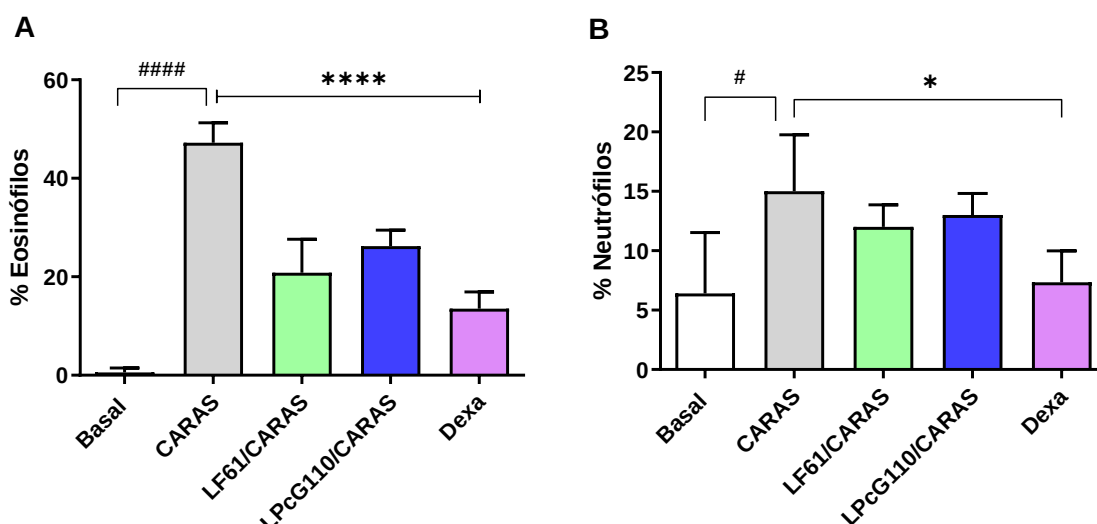
As colunas e barras verticais representam a média e o erro padrão da média (e.p.m.) respectivamente. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada pelo ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey* (número de células totais, eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e macrófagos vs. grupo experimental). Os camundongos BALB/c ($n = 5$) foram distribuídos em grupos: Basal (animais no estado fisiológico); LF61 (animais suplementados com *Limosilactobacillus fermentum* 1×10^9 UFC); LPc-G110 (animais suplementados com *Lacticaseibacillus paracasei* 1×10^9 UFC); CARAS (animais doentes por ovalbumina); LF61/CARAS (animais doentes suplementados com *Limosilactobacillus fermentum* 1×10^9 UFC); LPc-G110/CARAS (animais doentes e suplementados com *Lacticaseibacillus paracasei* 1×10^9 UFC) e Dexa (droga padrão, dexametasona 2 mg/kg). ##### $p < 0,0001$ (CARAS vs. Basal); **** $p < 0,0001$ (CARAS vs. LF61/CARAS, LPc-G110/CARAS e Dexa); ** $p < 0,01$ (CARAS vs. LPc-G110/CARAS); * $p < 0,05$ (LF61/CARAS vs. LPc-G110/CARAS); ** $p < 0,01$ (LF61/CARAS vs. LPc-G110/CARAS); * $p < 0,05$ (CARAS vs. LPc-G110/CARAS);

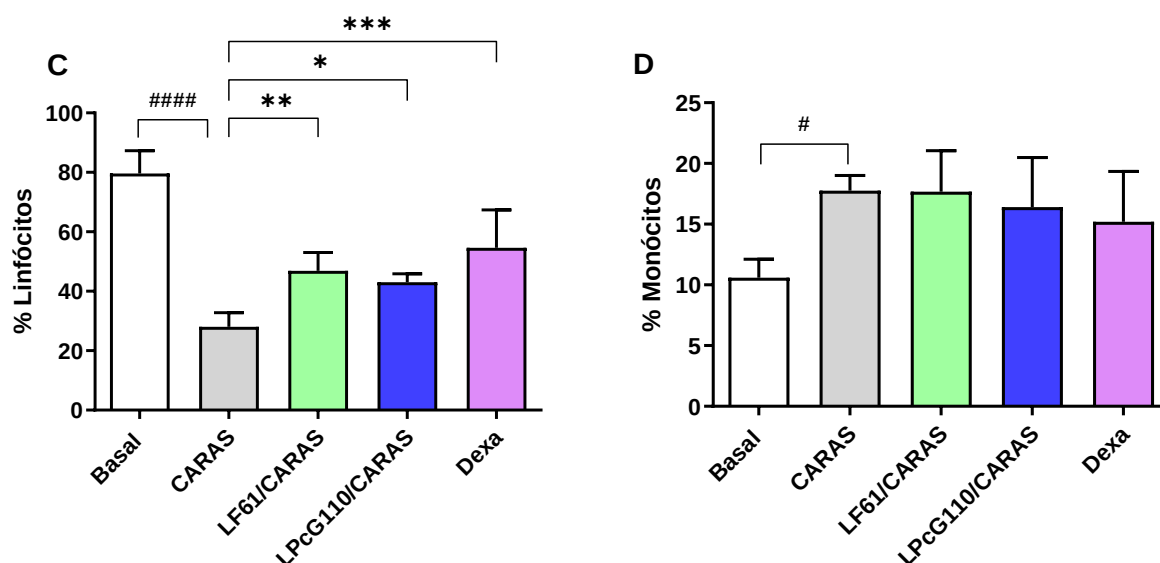
Fonte: Cavalcanti, 2023.

5.5 Efeito da suplementação com *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) ou com *Lactacaseibacillus paracasei* (LPc-G110) no perfil celular sistêmico de camundongos com CARAS

A suplementação com o LF61 ou com LPc-G110 foi capaz de reduzir o percentual de eosinófilos na corrente sanguínea ($20,83 \pm 2,77$; $26,20 \pm 1,46$; $p < 0,0001$, respectivamente) quando comparado ao grupo CARAS ($47,20 \pm 1,82$) (Gráfico 5A). Em contraste, no grupo LF61/CARAS e LPc-G110/CARAS ($46,83 \pm 2,53$; $43,00 \pm 1,18$; $p < 0,05$) houve aumento no número de linfócitos em relação ao grupo CARAS ($28,00 \pm 2,41$) (Gráfico 5C). Não foram observadas diferenças na porcentagem de neutrófilos (Gráfico 5B) e monócitos (Gráfico 5D) no sangue periférico de camundongos com CARAS e suplementados com o LF61 ou LPc-G110.

Gráfico 5 - Efeito da suplementação com *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) ou *Lactacaseibacillus paracasei* (LPc-G110) no número de eosinófilos (A) neutrófilos (B) linfócitos (C) e monócitos (D) no sangue periférico de camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).





As colunas e barras verticais representam a média e o erro padrão da média (e.p.m.) respectivamente. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada pelo ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey* (% de eosinófilos (A) % de neutrófilos (B) % de linfócitos (C) % de monócitos (D) vs. grupo experimental). Os camundongos BALB/c (n= 5) foram distribuídos em grupos: Basal (animais no estado fisiológico); CARAS (animais doentes por ovalbumina); LF61/CARAS (animais doentes suplementados com *Limosilactobacillus fermentum* 1 x 10⁹ UFC); LPc-G110/CARAS (animais doentes e suplementados com *Lacticaseibacillus paracasei* 1 x 10⁹ UFC) e Dexa (droga padrão, dexametasona 2 mg/kg). #####*p* < 0,0001 (CARAS vs. Basal); #*p* < 0,05 (CARAS vs. Basal); *****p* < 0,0001 (CARAS vs. LF61/CARAS, LPc-G110/CARAS e Dexa); ****p* < 0,001 (CARAS vs. Dexa); ***p* < 0,01 (CARAS vs. LF61/CARAS); **p* < 0,05 (CARAS vs. LPc-G110/CARAS e Dexa).

Fonte: Cavalcanti, 2023.

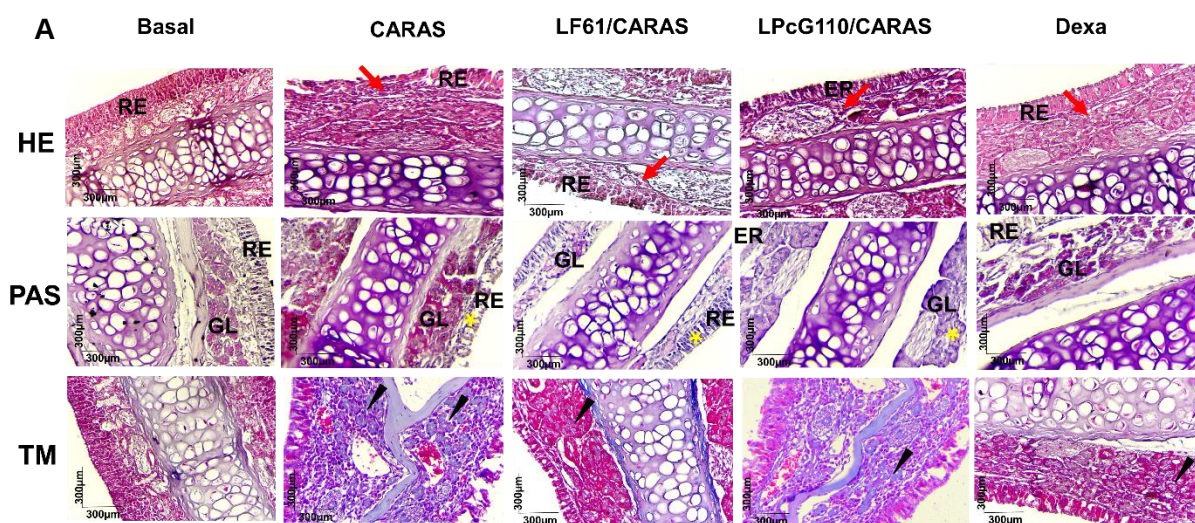
5.6 Efeito da suplementação com *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) ou com *Lacticaseibacillus paracasei* (LPc-G110) no tecido nasal e pulmonar de camundongos com CARAS

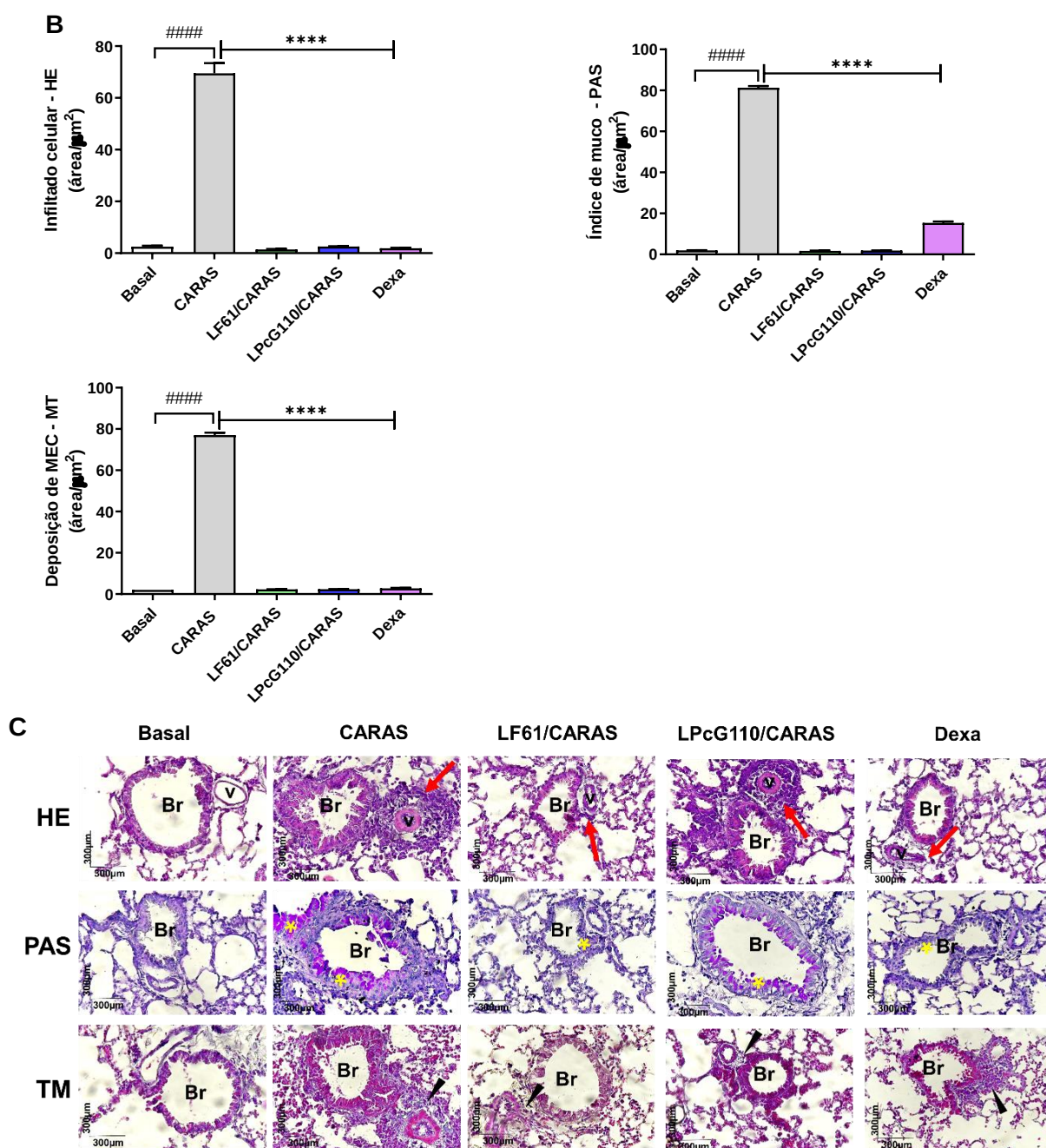
No tecido nasal dos animais do grupo CARAS, observou-se infiltração de células inflamatórias nas regiões perivascular e subepitelial (Gráfico 6A - seta vermelha), hipertrofia e hiperplasia de células calciformes na camada epitelial e parênquima, produção de muco na região epitelial (Gráfico 6A - asterisco amarelo) e deposição matriz extracelular (Gráfico 6A - ponta de seta preta). A suplementação com o LF61 (LF61/CARAS) ou LPc-G110 (LPc-G110/CARAS) e o tratamento com dexametasona (grupo Dexa) reduziu significativamente (*p* < 0,0001) esses parâmetros inflamatórios (Gráfico 6B).

Resultados semelhantes foram observados no tecido pulmonar. Os animais do grupo CARAS apresentaram alterações morfológicas como aumento da infiltração de

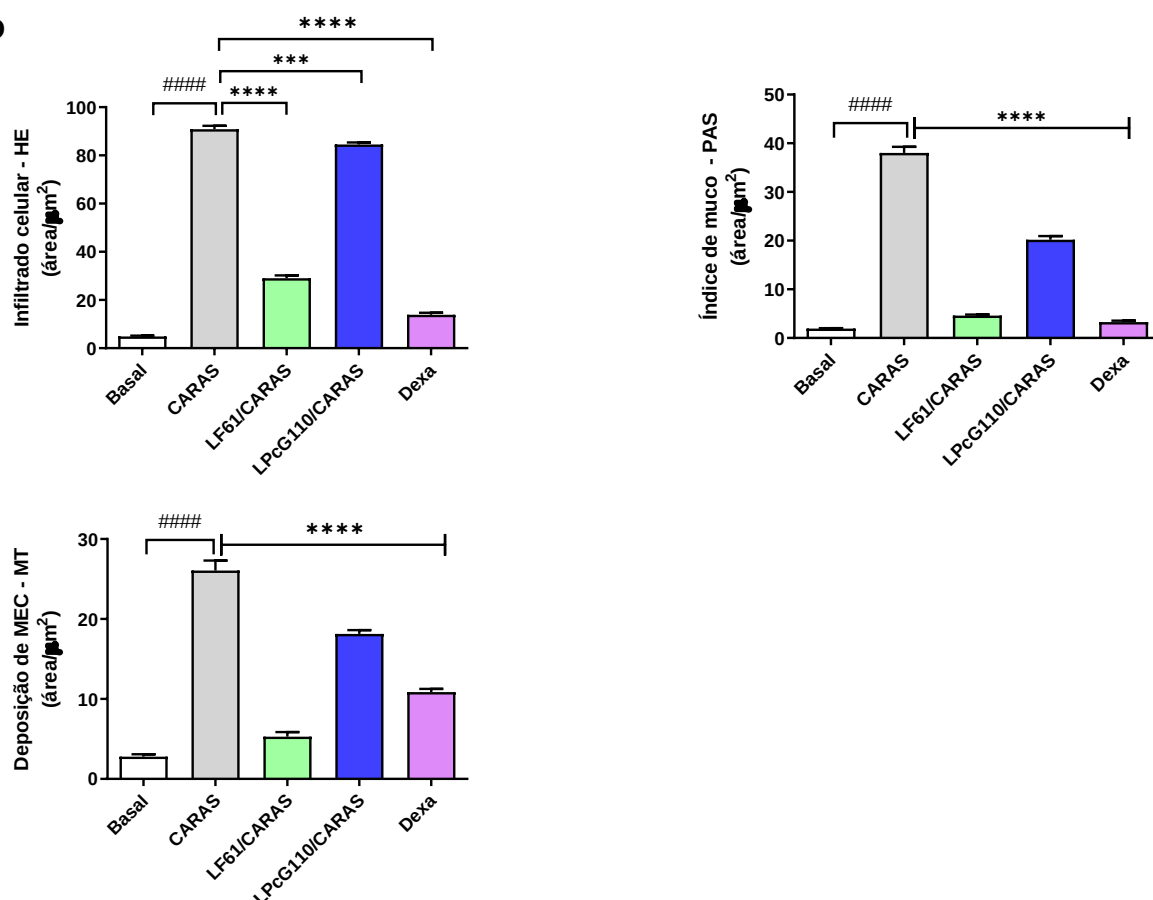
células inflamatórias nas regiões peribronquiolares e perivasculares (Gráfico 6C - seta vermelha) e produção de muco pelas células caliciformes nos bronquíolos (Gráfico 6C - asterisco amarelo). A suplementação com o LF61 (LF61/CARAS) ou LPc-G110 (LPc-G110/CARAS) melhorou significativamente esses parâmetros (Gráfico 6D). A hiperresponsividade e remodelação dos tecidos pulmonares dos animais do grupo CARAS foram demonstradas como deposição de matriz extracelular nas regiões peribronquiolares e perivasculares independentemente dos alvéolos (ponta de seta preta) e a suplementação com LF61 (LF61/CARAS) ou com LPc-G110 (LPc-G110/CARAS) diminuiu a deposição de matriz extracelular nessas regiões pulmonares (Gráfico 6D - ponta de seta preta).

Gráfico 6 - Efeito da suplementação com *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) ou com *Lactaseibacillus paracasei* (LPc-G110) no tecido nasal (A), análise morfométrica nasal (B), no tecido pulmonar (C) e análise morfométrica pulmonar (D) de camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).





D



As colunas e barras verticais representam a média e o erro padrão da média (e.p.m.) respectivamente. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada pelo ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey* (análise morfométrica vs. grupo experimental). Os camundongos BALB/c ($n = 5$) foram distribuídos em grupos: Basal (animais no estado fisiológico); CARAS (animais doentes por ovalbumina); LF61/CARAS (animais doentes suplementados com *Limosilactobacillus fermentum* 1×10^9 UFC); LPc-G110/CARAS (animais doentes e suplementados com *Lactocaseibacillus paracasei* 1×10^9 UFC) e Dexa (droga padrão, dexametasona 2 mg/kg). Aumento total 400x. **RE** (Epitélio Respiratório); **GL** (Glândulas); **Br** (Bronquíolo); **V** (Vaso). #### $p < 0,0001$ (CARAS vs. Basal); **** $p < 0,0001$ (CARAS vs. LF61/CARAS e Dexa); *** $p < 0,001$ (CARAS vs. LPc-G110/CARAS).

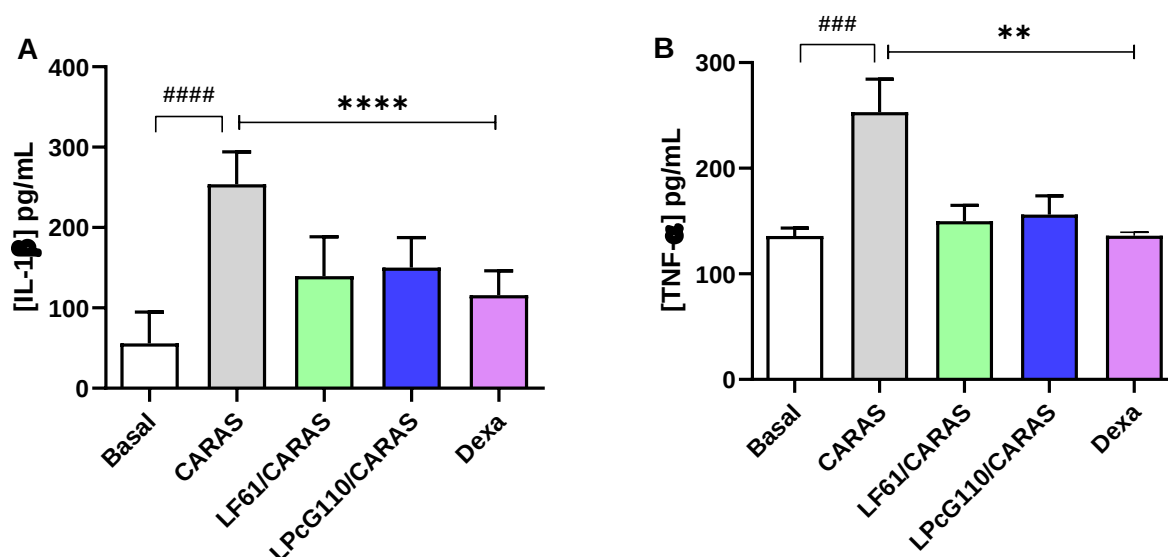
Fonte: Cavalcanti, 2023.

5.7 Efeito da suplementação com *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) ou com *Lactocaseibacillus paracasei* (LPc-G110) nos níveis das citocinas inflamatórias IL-1 β e TNF- α no BALF de camundongos com CARAS

A suplementação com o LF61 (LF61/CARAS) reduziu os níveis das citocinas inflamatórias IL-1 β ($139,5 \pm 17,32$; $p < 0,0001$ - Gráfico 7A) e TNF- α ($149,9 \pm 14,96$; $p < 0,01$ - Gráfico 7B) quando comparado ao grupo CARAS ($253,8 \pm 14,30$ - Gráfico 7A; $253,2 \pm 31,08$ - Gráfico 7B, respectivamente). Os níveis de IL-1 β ($150,1 \pm 13,29$; $p <$

0,0001 - Gráfico 7A) e TNF- α ($156,0 \pm 17,92$; $p < 0,01$ - Gráfico 7B) foram reduzidos nos animais do grupo LPc-G110/CARAS em comparação ao grupo CARAS ($253,8 \pm 14,30$ - Gráfico 7A; $253,2 \pm 31,08$ - Gráfico 7B, respectivamente). A dexametasona (grupo Dexa) reduziu os níveis de IL-1 β ($115,9 \pm 13,29$; $p < 0,0001$ - Gráfico 7A) assim como do TNF- α ($136,0 \pm 3,22$; $p < 0,01$ - Gráfico 7B) em relação ao grupo CARAS.

Gráfico 7 - Efeito da suplementação com *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) ou com *Lacticaseibacillus paracasei* (LPc-G110) nos níveis das citocinas IL-1 β (A) e TNF- α (B) no BALF de camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).



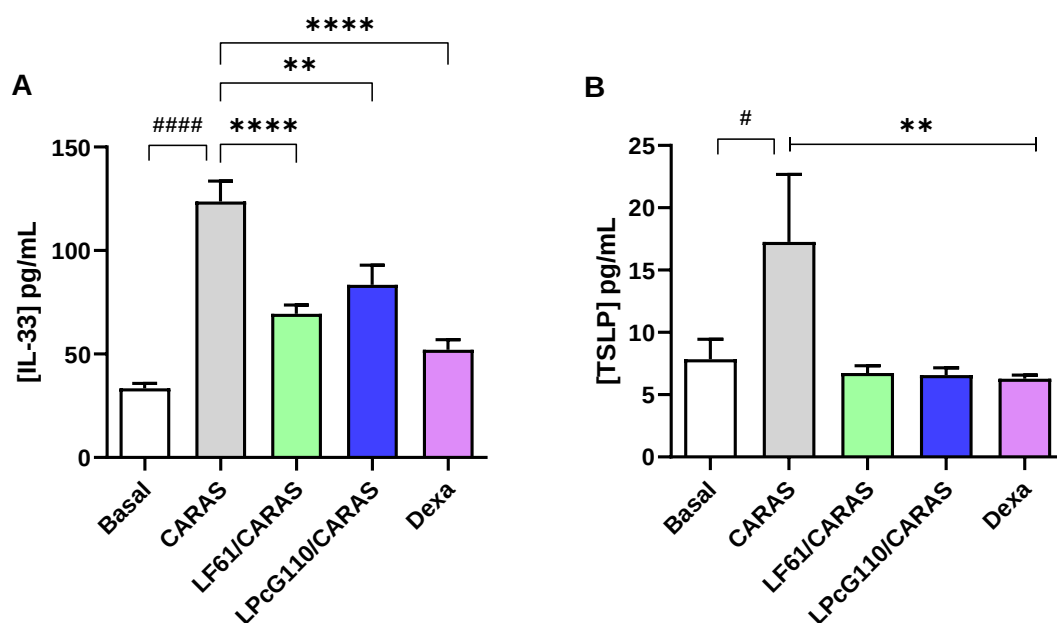
As colunas e barras verticais representam a média e o erro padrão da média (e.p.m.) respectivamente. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada pelo ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey* (IL-1 β (A) TNF- α (B) vs. grupo experimental). Os camundongos BALB/c ($n = 5$) foram distribuídos em grupos: Basal (animais no estado fisiológico); CARAS (animais doentes por ovalbumina); LF61/CARAS (animais doentes suplementados com *Limosilactobacillus fermentum* 1×10^9 UFC); LPc-G110/CARAS (animais doentes e suplementados com *Lacticaseibacillus paracasei* 1×10^9 UFC) e Dexa (droga padrão, dexametasona 2 mg/kg). ##### $p < 0,0001$ (CARAS vs. Basal); ### $p < 0,001$ (CARAS vs. Basal); **** $p < 0,0001$ (CARAS vs. LF61/CARAS, LPc-G110/CARAS e Dexa); ** $p < 0,01$ (CARAS vs. LF61/CARAS, LPc-G110/CARAS e Dexa).

Fonte: Cavalcanti, 2023.

5.8 Efeito da suplementação com *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) ou com *Lacticaseibacillus paracasei* (LPc-G110) nos níveis das alarminas IL-33 e TSLP no BALF de camundongos com CARAS

A suplementação com o LF61 (LF61/CARAS) reduziu os níveis das alarminas IL-33 ($69,38 \pm 4,26$; $p < 0,0001$ - Gráfico 8A) e TSLP ($6,74 \pm 0,58$; $p < 0,01$ - Gráfico 8B) quando comparado ao grupo CARAS ($123,7 \pm 9,83$ - Gráfico 8A; $17,26 \pm 5,42$ - Gráfico 8B, respectivamente). Adicionalmente, os animais suplementados com o LPc-G110 (LPc-G110/CARAS) apresentaram redução de IL-33 ($83,45 \pm 9,46$; $p < 0,01$ - Gráfico 8A) e TSLP ($6,56 \pm 0,59$; $p < 0,01$ - Gráfico 8B) quando comparados ao grupo CARAS ($123,7 \pm 9,83$ - Gráfico 8A; $17,26 \pm 5,42$ - Gráfico 8B, respectivamente). O tratamento com a dexametasona (grupo Dexa) reduziu os níveis das citocinas IL-33 ($52,07 \pm 4,81$; $p < 0,0001$ - Gráfico 8A) e TSLP ($6,27 \pm 0,29$; $p < 0,01$ - Gráfico 8B) dos camundongos com CARAS.

Gráfico 8 - Efeito da suplementação com *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) ou com *Lactacaseibacillus paracasei* (LPc-G110) nos níveis das alarminas IL-33 (A) e TSLP (B) no BALF de camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).



As colunas e barras verticais representam a média e o erro padrão da média (e.p.m.) respectivamente. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada pelo ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey* (IL-33 (A) TSLP (B) vs. grupo experimental). Os camundongos BALB/c ($n = 5$) foram distribuídos em grupos: Basal (animais no estado fisiológico); CARAS (animais doentes por ovalbumina); LF61/CARAS (animais doentes suplementados com *Limosilactobacillus fermentum* 1×10^9 UFC); LPc-G110/CARAS (animais doentes e suplementados com *Lactacaseibacillus paracasei* 1×10^9 UFC) e Dexa (droga padrão, dexametasona 2 mg/kg). ##### $p < 0,0001$ (CARAS vs. Basal); # $p < 0,05$ (CARAS vs. Basal); **** $p < 0,0001$ (CARAS vs. LF61/CARAS e Dexa); ** $p < 0,01$ (CARAS vs. LF61/CARAS, LPc-G110/CARAS e Dexa).

Fonte: Cavalcanti, 2023.

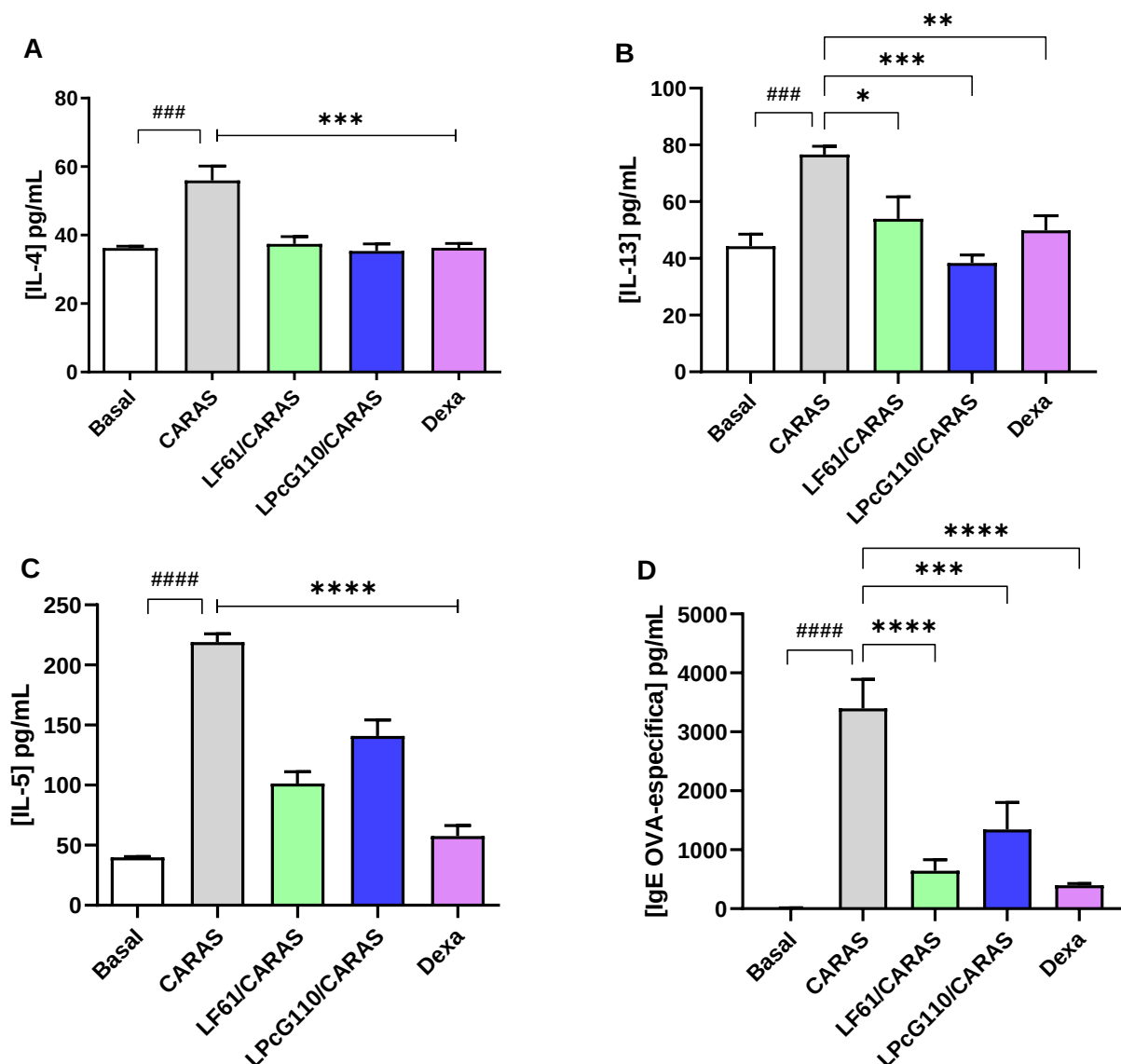
5.9 Efeito da suplementação com *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) ou com *Lacticaseibacillus paracasei* (LPc-G110) nos níveis das citocinas do perfil Th2 (IL-4, IL-13, IL-5) e no nível sérico IgE OVA-específica em camundongos com CARAS

As citocinas IL-4 ($37,41 \pm 2,18$; $p < 0,001$ - Gráfico 9A), IL-13 ($53,96 \pm 7,77$; $p < 0,05$ - Gráfico 9B) e IL-5 ($101,3 \pm 9,75$; $p < 0,001$ - Gráfico 9C) foram reduzidas após a suplementação com o LF61 (LF61/CARAS) quando comparados ao grupo CARAS ($55,99 \pm 4,19$; $76,63 \pm 2,89$; $219,0 \pm 6,90$ - Gráfico 9A, B, C, respectivamente).

A suplementação com o LPc-G110 (LPc-G110/CARAS) reduziu os níveis das citocinas IL-4 ($35,36 \pm 2,04$; $p < 0,001$ - Gráfico 9A), IL-13 ($38,39 \pm 2,85$; $p < 0,001$ - Gráfico 9B) e IL-5 ($141 \pm 13,30$; $p < 0,0001$ - Gráfico 9C) quando comparado ao grupo CARAS ($55,99 \pm 4,19$; $76,63 \pm 2,89$; $219,0 \pm 6,90$ - Gráfico 9A, B, C, respectivamente).

O grupo CARAS apresentou aumento no nível sérico de IgE OVA-específica ($3398 \pm 490,9$; $p < 0,0001$) em relação ao grupo Basal ($9,2 \pm 5,40$; Gráfico 9D). Os grupos suplementados com o LF61 ($642,5 \pm 189,4$; $p < 0,0001$) ou com LPc-G110 ($1346 \pm 457,6$; $p < 0,001$) apresentaram redução no nível IgE de OVA-específica quando comparados ao grupo CARAS ($3398 \pm 490,9$, Gráfico 9D). Este parâmetro também foi reduzido no grupo Dexa ($398,1 \pm 28,72$; $p < 0,0001$) em comparação ao grupo CARAS ($3398 \pm 490,9$).

Gráfico 9 - Efeito da suplementação com *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) ou com *Lacticaseibacillus paracasei* (LPc-G110) nas citocinas do perfil T_H2 ((IL-4 (A), IL-13 (B) e IL-5 (C)) no BALF e no nível sérico IgE OVA-específica (D) de camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).



As colunas e barras verticais representam a média e o erro padrão da média (e.p.m.) respectivamente. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada pelo ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey* ([IL-4 (A) IL-13 (B) IL-5 (C) concentração de IgE OVA-específica (D) vs. grupo experimental). Os camundongos BALB/c (n= 5) foram distribuídos em grupos: Basal (animais no estado fisiológico); CARAS (animais doentes por ovalbumina); LF61/CARAS (animais doentes suplementados com *Limosilactobacillus fermentum* 1 x 10⁹ UFC); LPc-G110/CARAS (animais doentes e suplementados com *Lacticaseibacillus paracasei* 1 x 10⁹ UFC) e Dexa (droga padrão, dexametasona 2 mg/kg). #####*p* < 0,0001 (CARAS vs. Basal); ###*p* < 0,001 (CARAS vs. Basal); ##*p* < 0,01 (CARAS vs. Basal); #*p* < 0,05 (CARAS vs. Basal); *****p* < 0,0001 (CARAS vs. LF61/CARAS, LPc-G110/CARAS e Dexa); ****p* < 0,001 (CARAS vs. LF61/CARAS, LPc-G110/CARAS e Dexa); ***p* < 0,01 (CARAS vs. LF61/CARAS e Dexa); **p* < 0,05 (CARAS vs. LF61/CARAS e LPc-G110/CARAS).

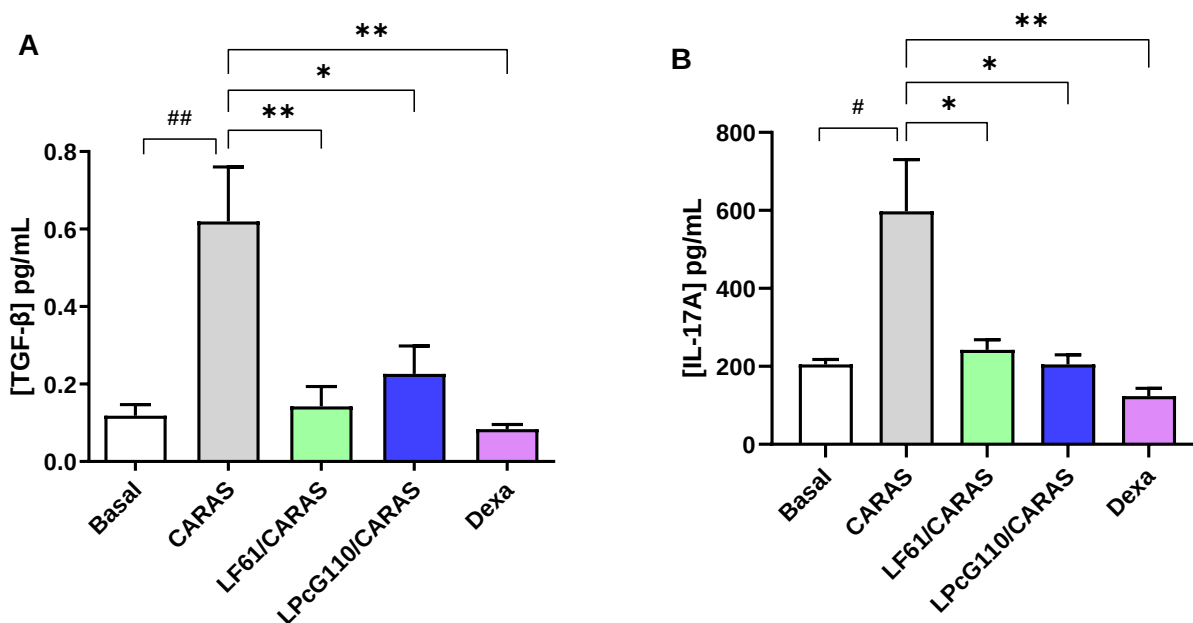
Fonte: Cavalcanti, 2023.

5.10 Efeito da suplementação com *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) ou com *Lacticaseibacillus paracasei* (LPc-G110) nos níveis das citocinas TGF- β e IL-17 no BALF de camundongos com CARAS

A suplementação com LF61 (LF61/CARAS) reduziu os níveis de TGF- β ($0,14 \pm 0,05$; $p < 0,01$) e IL-17 ($242,6 \pm 25,82$; $p < 0,05$) quando comparado ao grupo CARAS ($0,61 \pm 0,14$; $597,4 \pm 133,1$ - Gráfico 10A, B, respectivamente).

Os níveis de TGF- β e IL-17 ($0,22 \pm 0,07$; $205,3 \pm 24,44$; $p < 0,05$) foram reduzidos nos animais do grupo LPc-G110/CARAS em comparação ao grupo CARAS ($0,61 \pm 0,14$; $597,4 \pm 133,1$ - Gráfico 10A, B, respectivamente).

Gráfico 10 - Efeito da suplementação com *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) ou com *Lacticaseibacillus paracasei* (LPc-G110) nos níveis das citocinas TGF- β e IL-17 no BALF de camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).



As colunas e barras verticais representam a média e o erro padrão da média (e.p.m.) respectivamente. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada pelo ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey* TGF- β (**A**) IL-17A (**B**) vs. grupo experimental). Os camundongos BALB/c ($n = 5$) foram distribuídos em grupos: Basal (animais no estado fisiológico); CARAS (animais doentes por ovalbumina); LF61/CARAS (animais doentes suplementados com *Limosilactobacillus fermentum* 1×10^9 UFC); LPc-G110/CARAS (animais doentes e suplementados com *Lacticaseibacillus paracasei* 1×10^9 UFC) e Dexa (droga padrão, dexametasona 2 mg/kg).^{##} $p < 0,01$ (CARAS vs. Basal); [#] $p < 0,05$ (CARAS vs. Basal); ^{**} $p < 0,01$ (CARAS vs. LF61/CARAS e Dexa); ^{*} $p < 0,05$ (CARAS vs. LF61/CARAS e LPc-G110/CARAS).

Fonte: Cavalcanti, 2023.

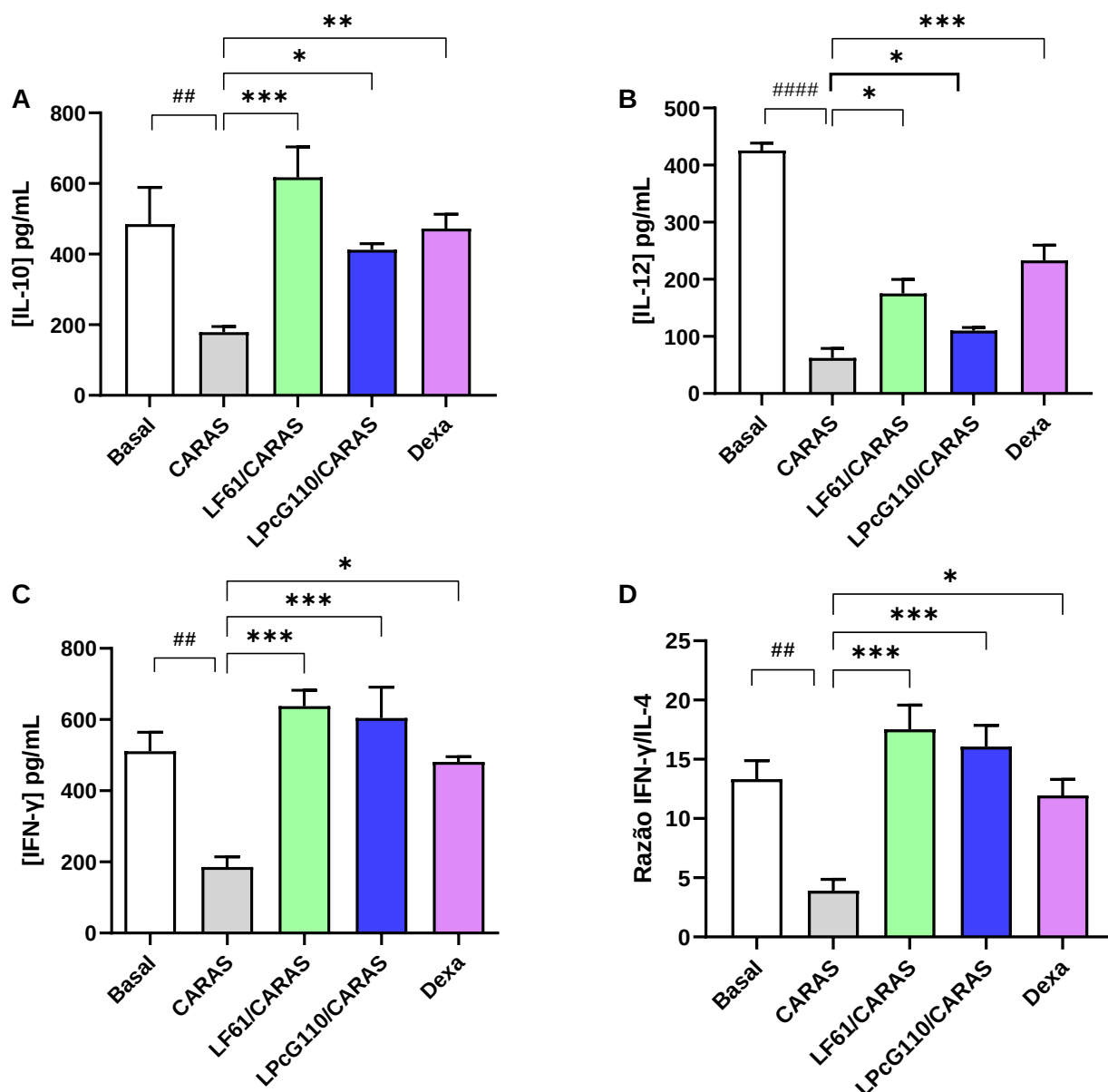
5.11 Efeito da suplementação com *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) ou com *Lacticaseibacillus paracasei* (LPc-G110) nos níveis das citocinas do perfil T_{reg} (IL-10), do perfil T_H1 (IL-12 e IFN- γ) e a razão IFN- γ /IL-4 no BALF de camundongos com CARAS

Observou-se aumento nos níveis de IL-10 no grupo LF61/CARAS ($617,4 \pm 86,47$; $p < 0,001$) e LPc-G110/CARAS ($412,2 \pm 17,43$; $p < 0,05$) quando comparado ao grupo CARAS ($179,1 \pm 16,08$). O grupo Dexa apresentou aumento nos níveis de IL-10 ($472,4 \pm 40,41$; $p < 0,01$) quando comparado ao grupo CARAS ($179,1 \pm 16,08$). (Gráfico 11^a)

Os níveis das citocinas do perfil T_H1 estão demonstrados no gráfico 11B (IL-12) e 11C (IFN- γ). A suplementação com o LF61 aumentou os níveis de IL-12 ($175,3 \pm 24,69$; $p < 0,05$) e IFN- γ ($637,9 \pm 44,47$; $p < 0,001$), quando comparado ao grupo CARAS ($62,26 \pm 16,67$; $185,4 \pm 29,21$ - Gráfico 11B, C). Os níveis de IFN- γ aumentaram nos animais do grupo LPc-G110/CARAS ($604,4 \pm 86,57$; $p < 0,001$) em comparação ao grupo CARAS ($185,4 \pm 29,21$; Gráfico 11C). A suplementação com o LPc-G110 aumentou os níveis de IL-12 ($155,4 \pm 9,82$; $p < 0,05$) quando comparado ao grupo CARAS ($62,26 \pm 16,67$; Gráfico 11B). O tratamento com a dexametasona aumentou os níveis de IL-12 ($233,2 \pm 26,46$; $p < 0,001$) e IFN- γ ($480,7 \pm 15,19$; $p < 0,05$) quando comparado ao grupo CARAS ($62,26 \pm 16,67$; $185,4 \pm 29,21$; Gráfico 11B, C).

Quanto à razão IFN- γ /IL-4, os grupos LF61/CARAS ($17,53 \pm 2,03$; $p < 0,001$) e LPc-G110/CARAS ($16,07 \pm 1,78$; $p < 0,001$) apresentaram aumento dessa razão quando comparados ao grupo CARAS ($3,89 \pm 0,96$ - Gráfico 11D). O grupo Dexa ($11,94 \pm 1,36$; $p < 0,001$) também apresentou aumento da razão IFN- γ /IL-4 quando comparado ao grupo CARAS ($3,89 \pm 0,96$; Gráfico 11D).

Gráfico 11 - Efeito da suplementação com *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) ou com *Lacticaseibacillus paracasei* (LPc-G110) nos níveis das citocinas do perfil T_{reg} ((IL-10 (A)), do perfil T_{H1} (IL-12 (B) e IFN- γ (C)) e a razão IFN- γ /IL-4 (D) no BALF de camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).



As colunas e barras verticais representam a média e o erro padrão da média (e.p.m.) respectivamente. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada pelo ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey* ((IL-10 (A) IL-12 (B) IFN- γ (C) razão IFN- γ /IL-4 (D) vs. grupo experimental). Os camundongos BALB/c (n= 5) foram distribuídos em grupos: Basal (animais no estado fisiológico); CARAS (animais doentes por ovalbumina); LF61/CARAS (animais doentes suplementados com *Limosilactobacillus fermentum* 1×10^9 UFC); LPc-G110/CARAS (animais doentes e suplementados com *Lacticaseibacillus paracasei* 1×10^9 UFC) e Dexa (droga padrão, dexametasona 2 mg/kg). ##### $p < 0,0001$ (CARAS vs. Basal); ## $p < 0,01$ (CARAS vs. Basal); *** $p < 0,001$ (CARAS vs. LF61/CARAS, LPc-G110/CARAS e Dexa); * $p < 0,05$ (CARAS vs. LF61/CARAS, LPc-G110/CARAS e Dexa).

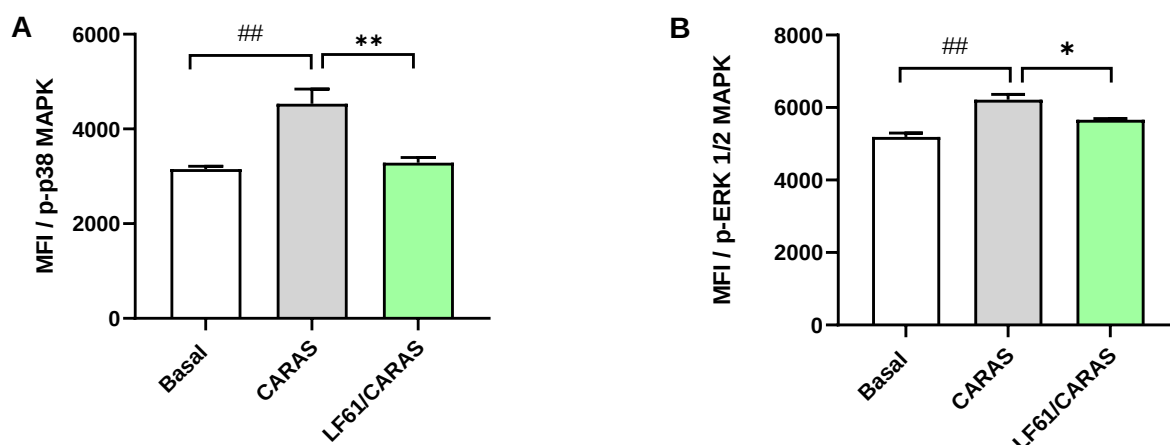
Fonte: Cavalcanti, 2023.

5.12 Efeito da suplementação com *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) ou com *Lacticaseibacillus paracasei* (LPc-G110) na expressão das MAPKs e FOXP3 no BALF de camundongos com CARAS

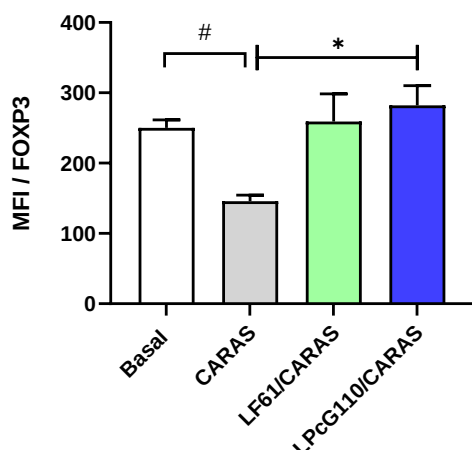
A frequência de ativação/média de intensidade de fluorescência (MFI) da p-p38 MAPK ($4.535 \pm 305,9$) e p-ERK1/2 MAPK ($6.216 \pm 146,5$) em animais do grupo CARAS foi significativamente maior quando comparada com a dos animais do grupo Basal (3.154 ± 60 ; 5.188 ± 109 , $p < 0,01$; Gráfico 12A, B, respectivamente). No grupo LF61/CARAS a frequência de ativação de ambas as moléculas foi significativamente e diminuída (p-p38 - $3.286 \pm 114,1$, $p < 0,01$; p-ERK1/2 - $5662 \pm 37,55$; $p < 0,05$ - Gráfico 12A, B).

Adicionalmente, o fator de transcrição FOXP3 está relacionado com a produção de IL-10, uma citocina anti-inflamatória. Foi observado que a suplementação com LF61 (LF61/CARAS) ($2.59,30 \pm 39,31$) e com o LPc-G110 (LPc-G110/CARAS) ($282 \pm 28,16$) aumentou a frequência de ativação de FOXP3 comparados ao grupo CARAS ($145,80 \pm 8,61$, $p < 0,05$) (Gráfico 12C).

Gráfico 12 - Efeito da suplementação com *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) ou com *Lacticaseibacillus paracasei* (LPc-G110) na expressão de p-p38 MAPK (A), p-ERK 1/2 MAPK (B) e FOXP3 (C) no BALF de camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).



C



As colunas e barras verticais representam a média e o erro padrão da média (e.p.m.) respectivamente. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada pelo ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey* (p-p38 MAPK (A), p-ERK 1/2 MAPK (B) e FOXP3 (C) vs. grupo experimental). Os camundongos BALB/c (n= 5) foram distribuídos em grupos: Basal (animais no estado fisiológico); CARAS (animais doentes por ovalbumina); LF61/CARAS (animais doentes suplementados com *Limosilactobacillus fermentum* 1 x 10⁹ UFC) e LPc-G110/CARAS (animais doentes e suplementados com *Lacticaseibacillus paracasei* 1 x 10⁹ UFC). #*p* < 0,05 (CARAS vs. Basal); ##*p* < 0,01 (CARAS vs. Basal); ***p* < 0,01 (CARAS vs. LF61/CARAS). **p* < 0,05 (CARAS vs. LF61/CARAS, LPc-G110/CARAS);

Fonte: Cavalcanti, 2023.

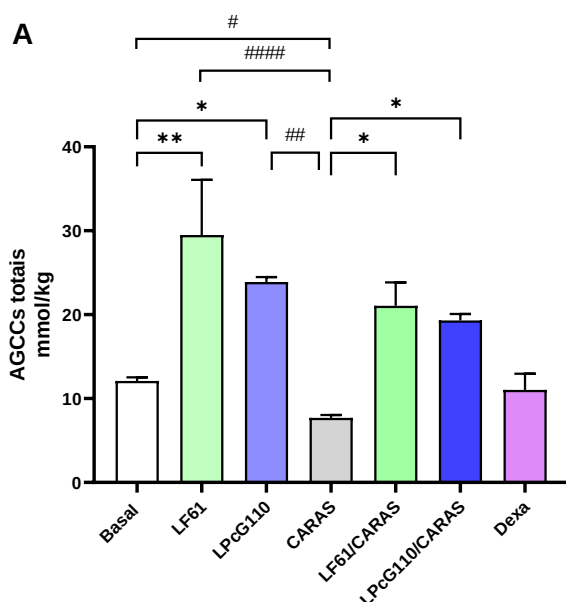
5.13 Efeito da suplementação com *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) ou com *Lacticaseibacillus paracasei* (LPc-G110) nos níveis fecais e séricos de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) de camundongos com CARAS

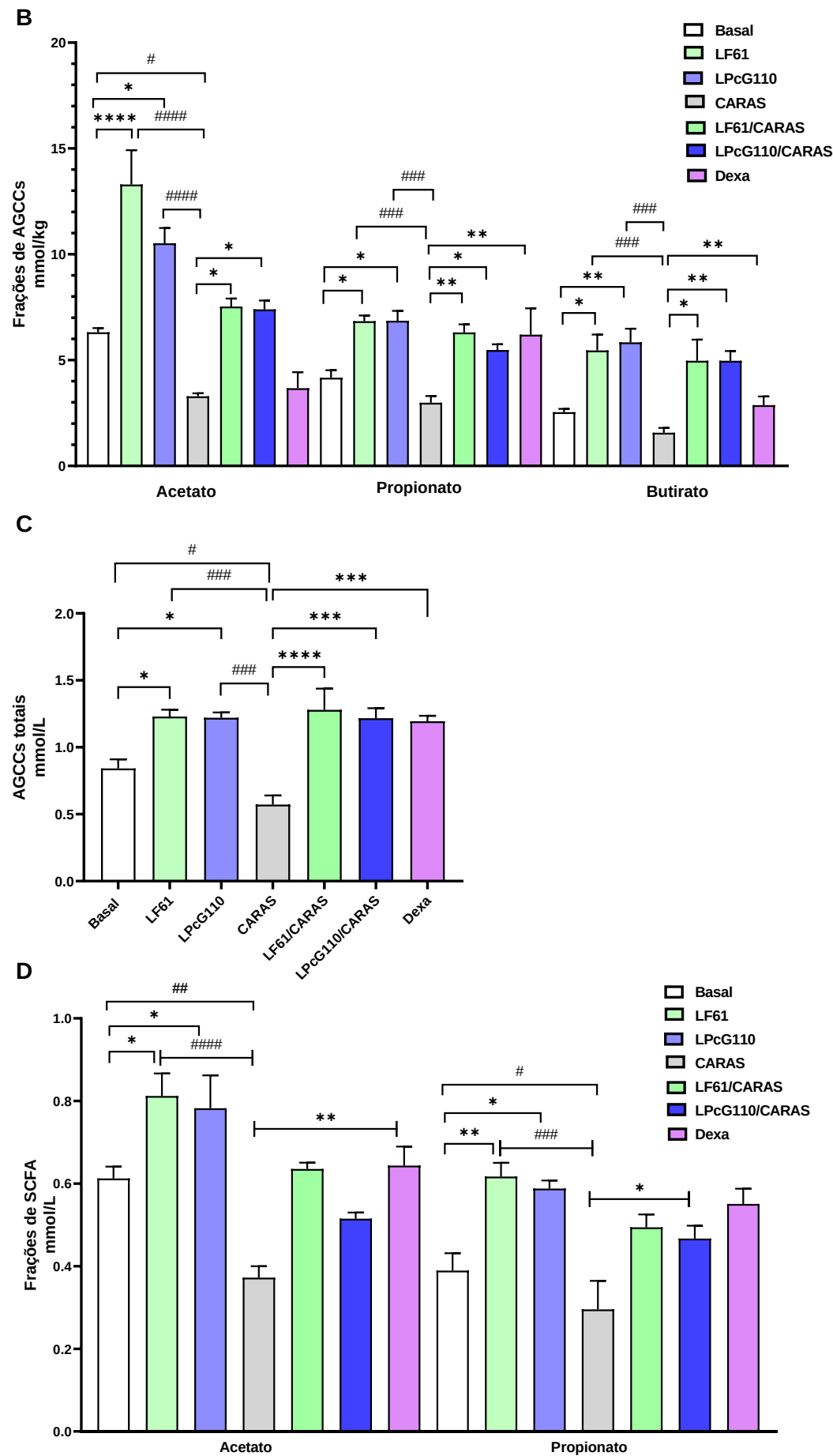
Os níveis de AGCCs totais fecais e séricos aumentaram no grupo LF61 (29,48 ± 6,59; *p* < 0,01; 1,22 ± 0,05; *p* < 0,05; respectivamente) e no grupo LPc-G110 (23,88 ± 0,58; *p* < 0,05; 1,22 ± 0,03; *p* < 0,01; respectivamente) em comparação com o grupo Basal (12,10 ± 0,41; 0,84 ± 0,06, respectivamente) e diminuíram no grupo CARAS (7,69 ± 0,34; *p* < 0,0001; 0,57 ± 0,06; *p* < 0,001; respectivamente) (Gráfico 13 A ,C).

Nos grupos LF61/CARAS (21,06 ± 2,78; *p* < 0,05 - Gráfico 13A; 1,28 ± 0,15; *p* < 0,001 - Gráfico 13C, respectivamente) e LPc-G110/CARAS (19,31 ± 0,77; *p* < 0,0001 - Gráfico 13A; 1,21 ± 0,07; *p* < 0,0001 - Gráfico 13C, respectivamente) foi observado aumento dos AGCCs tanto nas fezes quanto no soro em comparação ao grupo CARAS (7,69 ± 0,34; *p* < 0,0001 - Gráfico 13A; 0,57 ± 0,06; *p* < 0,0001; Gráfico 13C, respectivamente).

Resultados semelhantes foram observados para as frações de AGCCs, acetato, propionato e butirato. Animais dos grupos LF61 ou do LPc-G110 aumentaram os níveis fecais e séricos de acetato (LF61/CARAS - $7,53 \pm 0,37$; $p < 0,05$ - Gráfico 13B; $0,63 \pm 0,01$; $p < 0,01$ - Gráfico 13D, respectivamente) (LPc-G110/CARAS - $7,40 \pm 0,41$; $p < 0,05$ - Gráfico 13B; $0,51 \pm 0,01$; $p < 0,01$; Figura 13D, respectivamente), propionato (LF61/CARAS - $6,31 \pm 0,37$; $p < 0,01$ - Gráfico 13B; $0,49 \pm 0,03$; $p < 0,01$ - Gráfico 13D, respectivamente) (LPc-G110/CARAS - $5,48 \pm 0,26$; $p < 0,05$ - Gráfico 13B; $0,46 \pm 0,03$; $p < 0,05$ - Gráfico 13D, respectivamente) e butirato (LF61/CARAS - $4,96 \pm 0,99$; $p < 0,05$ - Gráfico 13B) (LPc-G110/CARAS - $4,96 \pm 0,46$; $p < 0,01$ - Gráfico 13B) em comparação com animais do grupo CARAS, (acetato - $3,29 \pm 0,14$, Gráfico 13B; $0,37 \pm 0,02$, Gráfico 13D, respectivamente), (propionato - $2,98 \pm 0,31$, Gráfico 13B; $0,29 \pm 0,06$, Gráfico 13D, respectivamente) e (butirato - $1,56 \pm 0,22$, Gráfico 13B).

Gráfico 13 - Efeito da suplementação com *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) ou com *Lactisacibacillus paracasei* (LPc-G110) nos níveis de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs). AGCCs fecais totais (A), Frações de AGCCs fecais (B), AGCCs séricos totais (C) e Frações de AGCCs séricos (D) em camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).





As colunas e barras verticais representam a média e o erro padrão da média (e.p.m.) respectivamente. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada pelo ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey* (AGCCs fecais totais (**A**), Frações de AGCCs fecais (**B**), AGCCs séricos totais (**C**) e frações de AGCCs séricos (**D**) vs. grupo experimental). Os camundongos BALB/c (n= 5) foram distribuídos em grupos: Basal (animais no estado fisiológico); LF61 (animais suplementados com *Limosilactobacillus fermentum* 1×10^9 UFC); LPc-G110 (animais suplementados com *Lacticaseibacillus paracasei* 1×10^9 UFC); CARAS (animais doentes por ovalbumina); LF61/CARAS (animais doentes suplementados com *Limosilactobacillus fermentum* 1×10^9 UFC); LPc-G110/CARAS (animais doentes e suplementados com *Lacticaseibacillus paracasei* 1×10^9 UFC) e Dexa (droga padrão, dexametasona 2 mg/kg). # $p < 0,05$ (CARAS vs. Basal); ## $p < 0,01$ (CARAS vs. Basal); ### $p < 0,001$ (CARAS vs. LF61, LPc-G110); #### $p < 0,001$ (CARAS vs. LF61, LPc-G110); **** $p < 0,0001$ (CARAS vs. LF61/CARAS; LPc-G110/CARAS); *** $p < 0,001$ (CARAS vs. LF61/CARAS; LPc-G110/CARAS); ** $p < 0,01$ (CARAS vs. LF61/CARAS; LPc-G110/CARAS e Dexa); * $p < 0,05$ (CARAS vs. LF61/CARAS; LPc-G110/CARAS).

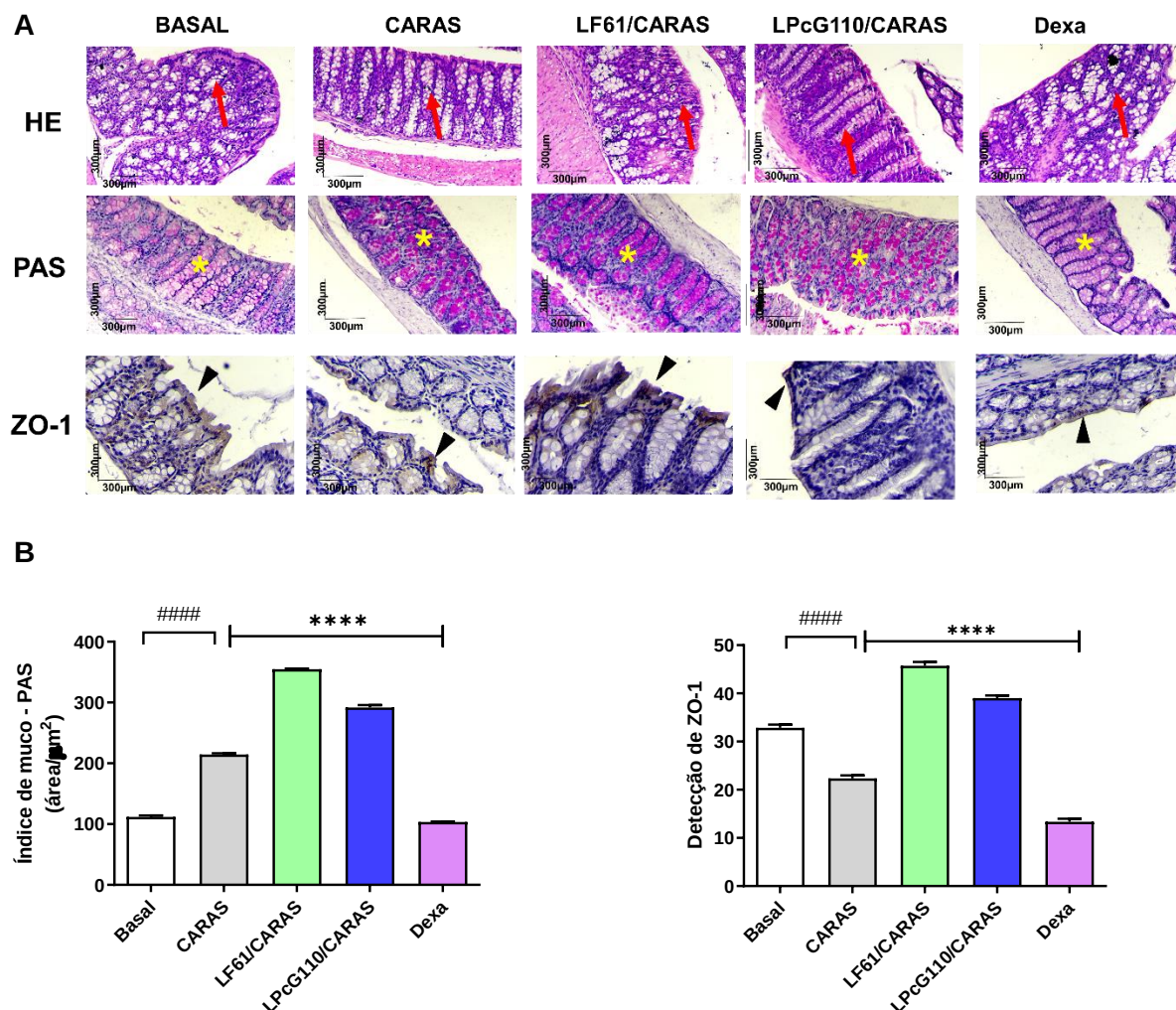
Fonte: Cavalcanti, 2023.

5.14 Efeito da suplementação com *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) ou com *Lacticaseibacillus paracasei* (LPc-G110) na integridade de barreira do cólon de camundongos com CARAS

Os animais do grupo CARAS apresentaram diminuição na altura da cripta, somado a alterações epiteliais na permeabilidade dos enterócitos (seta vermelha, HE - Gráfico 14A), além do espessamento da camada de muco na região epitelial (asterisco amarelo, PAS - Gráfico 14 A e B). A zônula de ocludina-1 (ZO-1) (ponta de seta preta) reduziu no grupo CARAS em comparação com o grupo Basal (Gráfico 14A e B).

Em contraste, nos grupos LF61/CARAS ou LPc-G110 observamos aumento ($p < 0,0001$) na camada mucosa e na integridade epitelial via aumento na detecção de ZO-1 (Gráfico 14 A e B).

Gráfico 14 - Efeito da suplementação com *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) ou com *Lacticaseibacillus paracasei* (LPc-G110) nos níveis de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs). Fotomicrografias do cólon (**A**) e análise morfométrica intestinal (**B**) em camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).



As colunas e barras verticais representam a média e o erro padrão da média (e.p.m.) respectivamente. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada pelo ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey*. Fotomicrografias do cólon (**A**) e Análise morfométrica intestinal (**B**) vs. grupo experimental). Os camundongos BALB/c (n= 5) foram distribuídos em grupos: Basal (animais no estado fisiológico); CARAS (animais doentes por ovalbumina); LF61/CARAS (animais doentes suplementados com *Limosilactobacillus fermentum* 1×10^9 UFC) e LPc-G110/CARAS (animais doentes e suplementados com *Lacticaseibacillus paracasei* 1×10^9 UFC). ##### $p < 0,0001$ (CARAS vs. Basal); **** $p < 0,05$ (CARAS vs. LF61/CARAS, LPc-G110/CARAS e Dexa);

Fonte: Cavalcanti, 2023.



Discussão

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, as suplementações orais com o *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) e com o *Lactocaseibacillus paracasei* (LPc-G110) induziram efeito imunomodulador no processo inflamatório alérgico nos camundongos da linhagem BALB/c submetidos ao modelo da Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS) induzida por ovalbumina (OVA).

No processo inflamatório alérgico desencadeado, por ovalbumina, nas vias aéreas superiores dos animais, os probióticos reduziram os sinais clínicos tais como espirros e fricções nasais além da hiper-reatividade nasal desencadeada com histamina. Em adição, ambos inibiram a migração de eosinófilos nos lavados nasal (NALF) e broncoalveolar (BALF), e os números de eosinófilos sistêmicos. Os aspectos histológicos alterados nos tecidos nasais e pulmonares dos animais com CARAS foram efetivamente atenuados pelos LF61 e LPc-G110.

A suplementação com as cepas reduziu as citocinas pro-inflamatórias IL-1 β e TNF- α , imunomodulou negativamente a produção das alarminas (TSLP e IL-33), das citocinas dos perfis T_H2 (IL-4, IL-13, IL5), T_H17 (IL-17) e TGF- β . Em contrapartida, houve modulação positiva para as citocinas do perfil T_H1 (IFN- γ e IL-12) e, observamos redução na concentração sérica de IgE ovalbumina-específica. Tais efeitos imunomoduladores estão correlacionados com a estimulação da resposta regulatória via aumento da frequência de expressão do fator de transcrição FOXP3 e aumento dos níveis de IL-10. No contexto do eixo intestino-vias aéreas, esses efeitos se correlacionam com a amplificação da resposta intestinal pelo aumento dos níveis de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) totais e frações, acetato, propionato e butirato, manutenção da barreira do epitélio intestinal (ZO-1) e integridade do tecido do cólon.

As doenças alérgicas respiratórias são consideradas problemas de saúde mundial resultante de interações complexas entre fatores genéticos e ambientais (Brožek *et al.*, 2017). Essas doenças são desordens inflamatórias crônicas caracterizadas por alterações fisiológicas das vias aéreas, tais como produção de muco, inflamação eosinofílica, hiper-responsividade brônquica, fibrose e remodelamento de tecidos (Lee *et al.*, 2017; Tronde; Bosquillon; Forbes *et al.*, 2007). Pesquisadores alergologistas ressaltam a inter-relação entre doenças alérgicas como

a asma, rinite, eczema e urticária e o potencial risco de cronicidade em casos de tratamentos inadequados. A Sociedade Portuguesa de Alergologia estima que em 2025, a asma será a doença crônica mais prevalente na infância e uma das maiores causa de gastos em saúde (Spaic, 2017).

A inflamação nas vias aéreas superiores caracteriza a rinite e, nas vias aéreas inferiores, a asma. Ambas as doenças apresentam correlação na sua gênese e no seu desenvolvimento com o mesmo perfil celular inflamatório, compartilhando as mesmas opções terapêuticas. Considerando esse contexto, a Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS), surge como um conceito de uma “doença unificada das vias aéreas”, trazendo uma proposta inovadora tanto do ponto de vista clínico-diagnóstico, quanto terapêutico (Ferreira *et al.*, 2019).

Atualmente, não há uma única terapia disponível para minimizar os sintomas da CARAS, entretanto, os corticoides são a principal escolha terapêutica para os pacientes que apresentam a síndrome. Embora os corticosteroides demonstrem eficácia farmacológica, os efeitos colaterais acentuados, quando administrados em altas doses ou por longos períodos de tempo, limita seu uso. Além disso, alguns pacientes têm resistência aos efeitos terapêuticos e em altas doses resultam em aumento do risco de efeitos colaterais sistêmicos, tais como osteopenia e distúrbios metabólicos (Williams, 2018). Este cenário ressalta a necessidade de estudos e desenvolvimento de novas opções terapêuticas com efeitos imunomoduladores no controle da CARAS.

Nos últimos anos, os probióticos atraíram a atenção dos pesquisadores transformando a percepção da sociedade sobre o papel desses micro-organismos, devido aos seus benefícios para saúde humana (Balta *et al.*, 2021).

Diversos trabalhos têm mostrado que os probióticos apresentam uma variedade de efeitos terapêuticos, podendo estimular o sistema imunológico pela liberação de compostos, como os ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) ou ativação de células na barreira epitelial (Anatriello *et al.*, 2019; Penders *et al.*, 2007). Por isso, são considerados adjuvantes inespecíficos da resposta imune inata e adaptativa a nível intestinal, auxiliando nas defesas do organismo a promover uma resposta dependendo da condição patológica e restaurar o equilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias, além de anticorpos secretados por células imunes (Kalliomäki *et al.*, 2010). Por esta razão, os probióticos apresentam efeitos benéficos para o tratamento

de uma variedade de doenças crônicas, entre elas, a asma alérgica (Dongarrà *et al.*, 2013; Anatriello *et al.*, 2019). Portanto, os probióticos podem ser usados para controlar doenças crônicas porque são capazes de orquestrar a resposta imune do hospedeiro (Forsythe, 2011; Samuelson *et al.*, 2015).

Neste estudo, avaliamos os efeitos da suplementação por via oral do LF61 e do LPc-G110 em modelo de CARAS desenvolvido em camundongos BALB/c sensibilizados e desafiados com OVA.

Como verificado na literatura até o presente momento, poucos artigos utilizaram o modelo experimental da CARAS, configurando um cenário favorável para entender a fisiopatologia dessa síndrome, além de servir como estímulo para ensaios farmacológicos de novas alternativas terapêuticas no manejo da CARAS. Somado a isso, no Brasil, o laboratório de Imunofarmacologia (LIMFA) da UFPB/João Pessoa/PB é pioneiro na implantação do modelo experimental para o estudo dessa síndrome (Ferreira *et al.*, 2019).

Estudos revelam que 70-90% dos pacientes asmáticos sofrem de rinite alérgica e, quase 40% dos pacientes com rinite alérgica apresentam sintomas asmáticos, sugerindo uma estreita relação entre ambas as desordens (Pawankar *et al.*, 2009). Portanto, a CARAS foi definida para indicar sintomas concomitantes de rinite alérgica e asma em pacientes (Taramarcaz; Gibson, 2004). Apesar da CARAS estar sendo cada vez mais reconhecida por pesquisadores clínicos e não clínicos, o tratamento dessa síndrome necessita de atenção considerável (Wang *et al.*, 2016).

Na fisiopatologia da CARAS os sinais clínicos característicos da fase inicial como espirros, prurido, secreção e obstrução nasal são mediados por histamina, liberada principalmente por mastócitos teciduais (Djukanovic *et al.*, 2016). Para averiguar a hipótese de que os *Lactobacillus* LF61 e LPc-G110 poderiam estar atuando na fase inicial da CARAS, os sinais clínicos, espirros e fricções nasais, foram quantificados após desafio alergênico (OVA). A suplementação com LF61 ou com LPc-G110 reduziu o sinais clínicos da rinite, demonstrando assim, suas atuações nessa fase inicial da síndrome. Kawase e colaboradores (2016) demonstraram que o *Lactobacillus gasseri* TMC0356 e o *Lactobacillus* GG melhoraram o quadro alérgico de animais com rinite alérgica experimental e, Miraglia e colaboradores (2017) demonstraram que crianças suplementadas com mistura probiótica das espécies do gênero *Bifidobacterium*, obtiveram melhora significativa dos sintomas nasais da rinite (Kawase *et al.*, 2006;

Miraglia *et al.*, 2017). Esses trabalhos claramente demonstram a eficácia da suplementação com probióticos quanto aos sinais e sintomas clínicos nas alergias, entretanto, carecem de demonstrar seus mecanismos de ação.

Uma vez que a histamina está envolvida na fase inicial da rinite, verificamos a hiper-reatividade nasal dos camundongos com CARAS após a administração de doses crescentes de histamina para então avaliar o efeito da suplementação com o LF61 ou LPc-G110. Ambos os *Lactobacillus* foram capazes de diminuir a hiper-reatividade nasal à histamina diminuindo o número de espirros e fricção nasal.

A histamina desempenha papel central na reação alérgica na CARAS pois promove a vasodilatação local, o aumento da permeabilidade vascular, formação do edema, a migração de células inflamatórias para as vias aéreas e a broncoconstrição. Nas vias aéreas superiores atua nas terminações nervosas sensoriais, via estimulação parassimpática com secreções glandulares, na vasodilatação e no aumento da permeabilidade capilar, promovendo os sintomas da rinite (Eifan; Durham, 2016).

Os resultados descritos acima demonstram que a suplementação com o LF61 ou com o LPc-G110 reduziu o efeito da histamina agindo na manutenção da morfologia do tecido nasal promovendo melhora nos sinais clínicos e provavelmente no tecido das vias aéreas.

A manutenção continuada do processo inflamatório observada na CARAS é devido à intensa ação de células inflamatórias que migram para as vias aéreas e uma vez ativadas, liberam mediadores responsáveis por configurar o quadro alérgico. Neste trabalho, a análise do NALF e do BALF dos animais com CARAS mostrou aumento, majoritariamente, de eosinófilos. Essa migração de eosinófilos ocorre em função da resposta imune tipo 2 desencadeada nos processos alérgicos que promove ativação de células teciduais produtoras de fatores quimiotáticos para eosinófilos a exemplo da IL-5 (Bisset; Schmid, 2005). Em adição, o quadro inflamatório alérgico nas vias aéreas induz a ativação e degranulação dos eosinófilos (Zhang *et al.*, 2007). Os eosinófilos ativados sintetizam quimiocinas pró-inflamatórias e enzimas catalíticas como a proteína catiônica eosinofílica (PCE) e a proteína básica principal (MBP) que promovem a ruptura da integridade epitelial acentuando a hiper-reatividade das vias aéreas (Barnes, 2016; Ferreira *et al.*, 2019). Esse evento leva a destruição tecidual

com diminuição da capacidade funcional dos tecidos das vias aéreas e decréscimo da capacidade respiratória.

Nos fluidos das vias aéreas, outras células são encontradas, como os linfócitos e neutrófilos. Os linfócitos compreendem cerca de 70 a 80% de leucócitos totais no sangue periférico de camundongos, podendo apresentar contagens acima de 80% em animais jovens (Hedrich, 2004; Weiss, 2010). Essas células auxiliam na resposta imune inata do organismo, entretanto, a maioria é responsável por mediar a imunidade adaptativa como os linfócitos T e B (Husáková *et al.*, 2015; Turgeon, 2005). Os neutrófilos são encontrados em menor percentual quando comparados aos linfócitos, nos camundongos, e representam a primeira linha de defesa contra sinais inflamatórios (Souza *et al.*, 2006). Essas duas populações celulares também migram para o tecido inflamado acentuando a inflamação alérgica (Kikuchi *et al.*, 2006).

Nesse contexto, observamos que tanto o LF61 como o LPc-G110 foram capazes de reduzir a migração de eosinófilos no NALF e no BALF com aumento de linfócitos. Anatriello e colaboradores (2019) demonstraram resultados semelhantes com a suplementação com *Lactobacillus bulgaricus* ao ser administrado por via oral, isto é, houve redução no número de eosinófilos no BALF de camundongos asmáticos embora sem alteração em linfócitos (Anatriello *et al.*, 2019).

Postulamos ainda, a hipótese de que os *Lactobacillus* em estudo, estariam modulando a resposta celular alérgica de forma sistêmica. De fato, observamos redução no percentual de eosinófilos no sangue periférico por ambas as cepas. O aumento sistêmico de eosinófilos é característico nas alergias devido ao processo de eosinopoese (Barnes, 2016; Ferreira *et al.*, 2019). Portanto, a redução no percentual de eosinófilos no sangue periférico corrobora à redução da hiper-reatividade discutida anteriormente e, provavelmente, se deve à redução do processo de eosinopoese a nível de medula óssea, hipótese a ser testada.

O aumento no número de células inflamatórias na CARAS também é observado no tecido nasal e pulmonar (Ferreira *et al.*, 2019). Estudos realizados anteriormente relataram que nas alergias respiratórias, o infiltrado celular, principalmente eosinofílico, é característico, e se correlaciona com a hiper-responsividade e danos teciduais nasais e pulmonares (Mandhane *et al.*, 2011).

Neste estudo, demonstramos que o LF61 e o LPc-G110 reduziram o infiltrado eosinofílico nos tecidos nasal e pulmonar. No modelo de asma alérgica descrito por

Forsythe e col. (2007), Jang e col. (2012), Anatriello e col. (2019), Carvalho e col. (2020), os autores demonstram resultados semelhantes, entretanto com os *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactobacillus rhamnosus* sobre os quais foram observados redução do infiltrado inflamatório nos tecidos pulmonares de animais com asma (Carvalho *et al.*, 2020; Forsythe; Inman; Bienenstock, 2007; Jang *et al.*, 2012).

No epitélio das vias aéreas, o papel das células caliciformes, em doenças alérgicas, vem sendo cada vez mais estudado devido à produção exacerbada de muco que promove a obstrução das vias aéreas. O epitélio desses pacientes se apresenta com número aumentado de células (hiperplasia de células caliciformes), com depósito excessivo de muco caracterizando a hipertrofia em decorrência da metaplasia epitelial. Ainda no epitélio desses pacientes, está presente uma membrana basal mais espessa contendo vários fatores de matriz extracelular como o nidogênio, condronectina, osteonectina e a tenascina, em comparação com epitélios de indivíduos normais (Wadsworth; Dorscheid, 2011).

Gadelha e colaboradores mostraram aumento do número de células caliciformes bem como o aumento da quantidade de muco nos animais doentes com CARAS (Gadelha *et al.*, 2021). A hipersecreção de muco no contexto das síndromes alérgicas é um processo complexo. A metaplasia das células produtoras de muco, envolve a indução de genes de mucina como o MUC5AC, armazenamento e liberação de mucina nos grânulos pré-formados para o interior do lúmen das vias aéreas e, alterações na viscosidade do muco (Gour; Wills-Karp, 2015).

Dessa forma, as células de clara sofrem transição fenotípica para células caliciformes por ação de vários fatores de transcrição incluindo Spdef (ETS) e Foxa2 (Park *et al.*, 2007). O fator Spdef, cuja ativação é mediada por STAT6, por sua vez, inibe a transcrição de Foxa2, que é necessário para a manutenção da diferenciação do epitélio das vias aéreas (Chen *et al.*, 2009). A inibição de Foxa2 acarreta a metaplasia de células caliciformes e a produção de mucinas e outros fatores necessários para função (Alevy *et al.*, 2012). Todo o processo de metaplasia de células da clara são passíveis de controle, entretanto, até o momento, os estudos com probióticos não esclarecem essa questão.

Os resultados do presente estudo demonstram que o LF61 e o LPc-G110 reduziram o índice de muco no tecido nasal e pulmonar, entretanto sem esclarecimentos sobre os mecanismos envolvidos.

Outro parâmetro tecidual avaliado neste trabalho, foi a deposição da matriz extracelular (MEC) que leva ao remodelamento tecidual. A deposição de matriz extracelular caracteriza a cronicidade do processo, e é mediado pela ação de células epiteliais, fibroblastos e macrófagos do tipo M2, os quais, quando ativados, ocasionam o aumento da deposição de MEC via produção de arginase I, poliaminas e prolina, culminando na fibrose subepitelial e enrijecimento da parede das vias aéreas (Hammad; Lambrecht, 2021).

Neste trabalho demonstramos que o LF61 e o LPc-G110 reduziram a deposição de MEC no tecido nasal e pulmonar, corroborando ao nosso estudo, os trabalhos de Anatriello e col. (2019) e Carvalho e col. (2020) também demonstram que a suplementação com as cepas de *Lactobacillus bulgaricus* e de *Lactobacillus rhamnosus* reduziram a deposição da MEC no tecido pulmonar de animais com asma (Anatriello *et al.*, 2019; Carvalho *et al.*, 2020).

Considerando que o processo inflamatório crônico relatado nas alergias é regenciado por citocinas, avaliamos o possível efeito imunomodulador das duas cepas de *Lactobacillus*, verificando a regulação (positiva e/ou negativa) das citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β e o TNF- α , as alarminas, IL-33 e TSLP, quatro diferentes perfis de respostas imunes, T_H2 (IL-4, IL-5, IL-13), T_H17 (IL-17), T_H1 (IL-12, IFN- γ), e T_{reg} (IL-10), e os níveis séricos de IgE-OVA específica.

A IL-1 β e o TNF- α estão relacionados com a fase aguda da resposta alérgica. A ativação do inflamassoma (NLRP3) em células teciduais induz a produção aumentada de IL-1 β que é observado em animais e em humanos alérgicos e juntamente com o TNF- α induzem fibrose (Yang *et al.*, 2020). Adicionalmente, a produção aumentada de TNF- α , por células como os mastócitos, se deve pelos altos níveis do fator de crescimento do nervo (NGF) levando à extensão da inervação sensitiva para a derme nasal ocasionando a hiper-reatividade nasal (Kuyama *et al.*, 2010). No presente estudo, LF61 e o LPc-G110 reduziram os níveis de IL-1 β e TNF- α no BALF de camundongos com CARAS. Esse resultado corrobora ao efeito do LF61 e LPc-G110 na redução da hiper-reatividade nasal, discutida anteriormente. Carvalho e colaboradores (2020) também observaram redução dessas duas citocinas no BALF

de camundongos asmáticos suplementados com o *Lactobacillus rhamnosus* (Carvalho *et al.*, 2020).

As alarminas IL-33 e a TSLP (linfopoetina do estroma tímico), produzidas no epitélio respiratório, pelas células endoteliais e epiteliais ativadas após a exposição ao alérgeno, são responsáveis por diferenciar células linfoides inatas no tipo 2 (ILCs2), que uma vez ativadas, resultam na produção das citocinas do perfil T_H2 (IL-5 e IL-13) via fatores de transcrição NF- κ B e AP-1 e via MAPKs (Kubo, 2017).

Estudos demonstraram que as proteases de alérgenos induzem o aumento de TSLP e IL-33 a partir do receptor PAR-2 (Receptor 2 Ativado por Protease) acoplado a proteína G nas células epiteliais (Goh *et al.*, 2008). A ativação do PAR-2 leva ao recrutamento da proteína G_{q/11}, ativação da fosfolipase C (PKC) e aumento dos níveis de Ca²⁺ intracelular, ativação das vias das MAPKs e, por sua vez, a produção das alarminas TSLP e IL33 (Kato *et al.*, 2007). O presente estudo demonstrou que o LF61 e o LPc-G110 reduziram os níveis dessas duas alarminas indicando efeito nas etapas iniciais do processo alérgico que envolvem as células epiteliais (Liew *et al.*, 2010).

Estudos recentes demonstram que durante a síndrome da asma e rinite alérgica combinada há aumento da resposta T_H2 e/ou T_H17, com desequilíbrio da reposta imune regulatória T_{reg} (diminuição de IL-10) e da resposta T_H1 (diminuição de IFN- γ). O desequilíbrio da resposta T_H1/T_H2 e T_H17/T_{reg} foi caracterizado em pacientes com asma alérgica (Gomez *et al.*, 2015). Em adição, tratamentos efetivos para respostas alérgicas visam aumentar a resposta imune T_H1 e simultaneamente inibir as respostas T_H2 e T_H17 para reestabelecer o balanço T_H1/T_H2 (Anatriello *et al.*, 2019). Nosso estudo demonstrou que as duas cepas de *Lactobacillus*, LF61 e LPc-G110, diminuíram a resposta T_H2 (IL-4, IL-5, IL-13) e T_H17 (IL-17) com aumento da resposta T_H1 (IFN- γ e IL-12). O processo imunoregulatório na asma e/ou rinite alérgica ocorre com aumento na produção de IFN- γ e / ou IL-10, provenientes majoritariamente de células T_H1 e células T_{reg}, respectivamente (Hammad; Lambrecht, 2021).

A ação da IL-4 e IL-13 na resposta alérgica é intensa, elas compartilham o mesmo receptor celular e atuam na amplificação da resposta inflamatória na CARAS. A IL-13 induz a expressão do Spdef (ETS), mediado por STAT6 (Park *et al.*, 2007). O fator Spdef, por sua vez, inibe a transcrição de Foxa2, que é necessário para a manutenção da diferenciação do epitélio das vias aéreas (Chen *et al.*, 2009). Em adição, a produção da IL-13 por células do epitélio das vias aéreas bem como por

células T_H2 exerce importância fundamental na hiper-responsividade com aumento de muco no tecido das vias aéreas (Gour; Wills-Karp, 2015).

Os resultados do presente estudo demonstram que o LF61 e o LPc-G110 reduziram os níveis da IL-13 no BALF dos animais com CARAS. Esse resultado se correlaciona com a redução do índice de muco no tecido nasal e pulmonar. Somado à diminuição de IL-13, também houve diminuição de IL-4 e redução do nível sérico de IgE-OVA específica, indicando claramente a modulação negativa da resposta imune do tipo 2 (T_H2) pelos *Lactobacillus*. Efeito semelhante foi observado para os probióticos *Bifidobacterium lactis* e *Lactobacillus rhamnosus* GG em modelo de asma (Feleszko *et al.*, 2007)

As citocinas IL-4 e IL-13 podem ainda agir amplificando a resposta alérgica para uma situação de cronicidade. Ambas ativam macrófagos do tipo 2 (M2) que passam a produzir TGF- β , ativando fibroblastos e aumentando a quantidade de MEC, cujo depósito nas vias aéreas configura o remodelamento tecidual (Varrichi *et al.*, 2016). A inibição dos níveis de IL-4 e IL-13 pelas duas cepas de *Lactobacillus* correlacionou com a redução da MEC e os níveis de TGF- β sugerindo ação na ativação de macrófagos do tipo M2. Hipótese a ser confirmada com estudos futuros.

Outra citocina do perfil de resposta imune tipo 2 é a IL-5, cuja produção é majoritariamente de ILC2 e está diretamente envolvida no desenvolvimento da eosinofilia (Wilson *et al.*, 2011). Os glicocorticoides inibem a produção de IL-5 e do fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), que por consequência diminui a meia-vida de eosinófilos. A administração de glicocorticoides em animais asmáticos e humanos com rinite alérgica reduz a eosinofilia observada nos fluidos nasais (Bisset; Schmid, 2005). Nesse estudo demonstramos que a suplementação com as cepas de LF61 ou LPc-G110 reduziu a produção de IL-5, corroborando à diminuição de eosinófilos nos fluidos nasal e pulmonar e sangue periférico.

O perfil de resposta imune induzido por células T_H17 , em alergias, caracteriza um perfil de resistência a corticosteroides. Estudos recentes demonstraram que o aumento na produção de IL-17A na asma, induz a a produção de mediadores inflamatórios, bem como o recrutamento de células preferencialmente os neutrófilos (Manise *et al.*, 2013). A IL-17 induz neutrofilia e eosinofilia das vias aéreas via indução de quimiocinas e fatores de crescimento (Ayakannu *et al.*, 2019). Em adição, essa

citocina contribui para o remodelamento das vias aéreas na asma, e, portanto, sua inibição auxilia no controle da fibrose. A IL-17A, mas não a IL-17F ou a IL-22, contribui para o agravamento da asma por exacerbar as respostas contráteis das células musculares lisas das vias aéreas via o fator de transcrição NF- κ B, induzindo a expressão de RhoA e ROCK2 (Miyake *et al.*, 2016).

Nossos resultados mostraram que a suplementação com ambas as cepas de *Lactobacillus* reduziu a produção de IL-17 colaborando com o resultado anterior no qual ocorreu diminuição na migração de eosinófilos para os tecidos das vias aéreas.

A polarização para diferentes perfis de respostas imunes é caracterizada por diferentes fatores de transcrição. A expressão de T-bet está associada à diferenciação de células T_{H1}; a expressão de GATA-3 e o STAT-6 estão associados à diferenciação de células T_{H2}; a expressão de ROR γ t está associado à diferenciação de células T_{H17}; e a expressão de FOXP3 está associado à diferenciação de células T_{reg} (Robinson, 2010). Thorburn e colaboradores (2015) demonstraram a capacidade de uma dieta rica em fibras ou a suplementação com acetato, em manter a integridade da barreira intestinal e regular a resposta imune do hospedeiro via modulação na expressão de genes específicos como: aumento da acetilação do FOXP3 promotor e inibição do fator de transcrição RelB para promover a diferenciação de células T_{reg}. Neste trabalho, demonstramos que o LF61 ou LPc-G110 modularam positivamente o fator de transcrição FOXP3 de células do BALF com aumento dos níveis da IL-10 indicando efeito a nível intracelular.

Outras vias de sinalizações intracelulares envolvidas na resposta alérgica são as das MAPKs, p-p38 e p-ERK1/2. Uma vez ativas induzem a produção de fatores de crescimento de eosinófilos; IL-5 e eotaxina promovendo, portanto, a eosinofilia (Mandahane *et al.*, 2011). A diferenciação de eosinófilos na medula óssea em resposta a IL-5 decorre da ativação majoritária da p38 e, em adição, as duas vias (p-p38 e p-ERK1/2) estimulam a produção de citocinas do perfil T_{H2} e da IgE alérgeno-específica (Khorasanizadeh *et al.*, 2017).

A suplementação com o LF61 reduziu a frequência de ativação da p-p38 e da ERK1/2 nas células do BALF de camundongos com CARAS corroborando à redução da migração de eosinófilos para o tecido das vias aéreas, bem como com a redução dos níveis das alarminas, além da modulação negativa das citocinas do perfil T_{H2}. Nosso grupo de pesquisa demonstrou, previamente, que animais com CARAS

apresentaram aumento da frequência de expressão de p-p38 e p-ERK 1/2 nas células do BALF (Paiva Ferreira *et al.*, 2021). Portanto, a redução de ativação nas MAPKs, pelo probiótico analisado, induz melhora do quadro inflamatório e alérgico na CARAS.

Para estudo dos efeitos do LF61 e do LPc-G110 no eixo intestino-vias aéreas, analisamos parâmetros intestinais como a produção de AGCCs e suas frações e os aspectos morfológicos do tecido intestinal (Rooks; Garret, 2016). Em humanos, fatores ambientais, como dieta, antibioticoterapia e o estresse podem alterar a microbiota intestinal induzindo diminuição de espécies bacterianas benéficas com o crescimento de agentes patogênicos (Hakansson; Molin, 2011). Esta perturbação na microbiota é conhecida como disbiose e está associada a diversas doenças inflamatórias dentro e fora do trato gastrointestinal (Shreiner; Kao; Young, 2015). Por exemplo, alterações na comunicação do eixo intestino-pulmão estão relacionadas com o aumento de suscetibilidade a doenças das vias aéreas, incluindo alergias (Keely; Talley; Hansbro, 2012). A importância do eixo intestino-vias aéreas é exemplificada em pacientes com doenças gastrointestinais crônicas, como a síndrome do intestino irritável (SII) e doenças inflamatórias intestinais (DII), que apresentam maior prevalência de doenças respiratórias (Wang *et al.*, 2013).

Um dos principais produtos do metabolismo do microbioma são os AGCCs com suas frações, acetato, propionato e butirato, cujas funções imunomoduladoras alteram diversos aspectos da fisiologia do hospedeiro. Os AGCCs atuam como ligantes endógenos de receptores acoplados à proteína G (GPCRs), sendo, o GPR43 (ou FFAR2, *Free Fatty Acid Receptor 2*), GPR41 (ou FFAR3), GPR109a (ou HCAR2, *hydroxycarboxylic acid receptor*) e GPR164 os principais receptores estudados. Os AGCCs, ao se ligarem a esses receptores celulares, induzem diversas respostas, incluindo modificações epigenéticas (Thorburn *et al.*, 2015). O acetato, propionato e butirato ao interagirem com o GPR41 (conhecido como FFAR3) e com o GPR43 (FFAR2) modulam as funções das células imunes tais como células dendríticas suprimindo a inflamação e promovendo tolerância via a produção de IL-10 e IFN- γ dependente de FOXP3 (Ashique *et al.*, 2022). Em adição, via ativação do receptor GPR43, os AGCCs podem regular a inflamação intestinal pela indução do FOXP3 e diferenciação de células T_{reg}. Outro mecanismo de ação, é sua atividade inibitória na enzima histona desacetilase (HDAC), os AGCCs aumentam a acetilação de histonas

H3 no locus FOXP3, aumentando assim, a acessibilidade do gene para transcrição (Furusawa *et al.*, 2013).

Neste sentido, o presente estudo demonstrou, de forma pioneira, que as suplementações com o LF61 ou com o LPc-G110 aumentaram os níveis totais de AGCCs e suas frações, nas fezes e no soro de camundongos com CARAS associado ao aumento da frequência de FOXP3 e aumento dos níveis de IL-10.

Portanto, a relação do eixo intestino-pulmão se dá, basicamente, em virtude de citocinas e AGCCs transportados pela circulação sanguínea e linfática (Koh *et al.*, 2016). Verstegen e colaboradores (2021) demonstraram que níveis séricos reduzidos de AGCCs estão correlacionados com o desenvolvimento do perfil T_H2 no pulmão de indivíduos alérgicos, aumento de IgE alérgeno-específica e ativação de mastócitos, basófilos e eosinófilos (Verstegen *et al.*, 2021). Em adição, estudos conduzidos por Chang e col (2014) e Halnes e col. (2017) demonstraram que a administração de dieta rica em fibras ou acetato em fêmeas grávidas reduziu a alergia das vias aéreas dos filhotes, promovendo a acetilação do locus FOXP3 em células T_{reg}, e redução da expressão de GATA3 em células ILC2 e diminuição das citocinas do perfil de resposta imune tipo 2 (Chang *et al.*, 2014; Halnes *et al.*, 2017).

Os AGCCs também são substratos para a manutenção do epitélio colônico sendo, o butirato o principal combustível oxidativo dos colonócitos. A barreira epitelial intestinal depende de proteínas transmembranas, junções de oclusão, junções de adesão e desmossomos. Os AGCCs melhoram a integridade da barreira epitelial intestinal, regulando principalmente as junções de oclusão (Wang *et al.*, 2016). Neste estudo, observamos que animais com CARAS suplementados com LF61 ou com LPc-G110 apresentaram aumento da ZO-1 (zônula de ocludina-1, também conhecida como proteína de junção estreita-1) e manutenção da barreira tecidual intestinal.

Previamente foi demonstrado por Hung e col. (2018) que a suplementação com fibras em animais com doença renal crônica aumentou a expressão de ZO-1 e claudina-7 nas células do epitélio intestinal, melhorando a expressão de junções de oclusão associadas à produção de AGCCs (Hung; Suzuki, 2018).

O respaldo científico da utilização de micro-organismos viáveis para o manejo das afecções do trato respiratório apresentado nesse trabalho, tem grande importância para a sociedade e é um retorno do investimento, pois as desordens respiratórias estão ressaltadas no *ranking* das principais causas da procura pela

atenção primária e, principalmente, no acometimento diário da qualidade de vida de quem as possui.

Portanto, os resultados apresentados nesse trabalho quanto à suplementação oral de animais com CARAS com os *Lactobacillus*, *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) e o *Lacticaseibacillus paracasei* (LPc-G110) nos fornecem subsídios comprobatórios do efeito antialérgico e imunomodulador de ambas as cepas de *Lactobacillus*. Em adição, nos incentivam a dar continuidade aos estudos na perspectiva de elucidar outros mecanismos de ação envolvidos no sentido de contribuir com regulamentação clínica de probióticos como práticas integrativas e complementares em saúde no controle do processo inflamatório das vias aéreas de indivíduos com asma e/ou rinite alérgicas.



Conclusões

7. CONCLUSÕES

As suplementações orais com o *Limosilactobacillus fermentum* (LF61) e com o *Lactocaseibacillus paracasei* (LPc-G110) em modelo experimental da Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS) apresentaram os seguintes efeitos:

❖ **Anti-inflamatório diminuindo:**

- Os sinais clínicos da rinite alérgica como espirro e fricção nasal;
- A hiper-reatividade nasal induzida por histamina;
- A migração de células inflamatórias, principalmente os eosinófilos, para as cavidades nasal e pulmonar e a nível sistêmico;
- Os parâmetros histopatológicos dos tecidos nasal e pulmonar tais como infiltração celular, índice de muco e deposição de matriz extracelular.

❖ **Imunomodulador com ação negativa na produção de:**

- Citocinas inflamatórias IL-1 β e TNF- α .
- Alarminas das ILC2 (IL-33 e TSLP);
- Citocinas do perfil T_H2 (IL-4, IL-13, IL-5);
- IgE OVA-específica;
- Citocinas do perfil T_H17 (IL-17) e TGF- β ;

❖ **Imunomodulador com ação positiva na produção de:**

- Citocinas do perfil T_H1 (IFN- γ e IL-12);
- Citocina do perfil T_{reg} (IL-10) com modulação positiva para o fator de transcrição FOXP3;

❖ **Modulador com ação negativa para:**

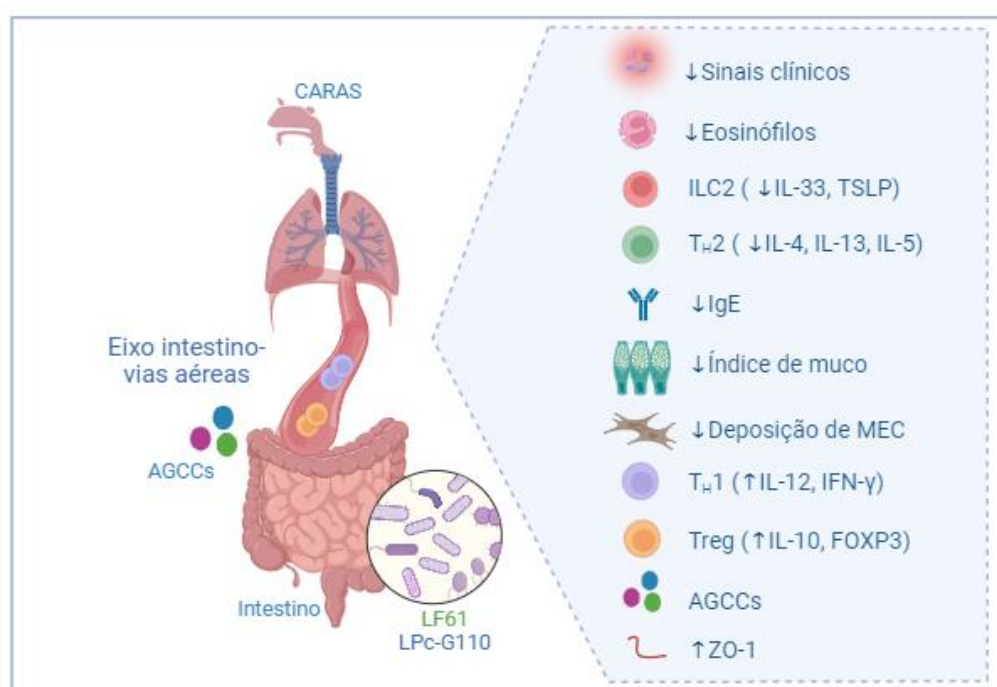
- Mediadores intracelulares relacionados com as MAPKs (p-p38 e p-ERK 1/2);

❖ **No eixo intestino-vias aéreas:**

- Mantenedor da integridade da barreira do tecido intestinal via ZO-1;

- Modulador positivo dos níveis totais de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) e suas frações (acetato, propionato e butirato) nas fezes e no sangue.

Figura 5 – Mapa conceitual dos efeitos da suplementação oral com o LF61 com o LPC-G110 em modelo da Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).



Created in BioRender.com bio

A suplementação oral com os *Lactobacillus* LF61 e LPC-G110 reduziu os sinais clínicos e a hiper-reatividade nasal em virtude da redução dos níveis de TNF- α . Os *Lactobacillus* reduziram os eosinófilos nos lavados nasal (NALF) e pulmonar (BALF), diminuíram a produção de citocinas do perfil TH2 (IL-4, IL-13 e IL-5), contribuindo para a diminuição dos níveis de IgE-alérgeno específica. Modulou negativamente a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α , TGF- β e IL-17. A suplementação aumentou a produção de IFN- γ e IL-12 do perfil TH1, além de modular positivamente o perfil Treg com aumento de IL-10 via ativação de FOXP3. Na resposta amplificada do eixo intestino-vias aéreas, aumentou os níveis de AGCCs fecais e séricos, preservando a integridade da barreira epitelial intestinal via ZO-1. LF61- *Limosilactobacillus fermentum*; LPC-G110- *Lacticaseibacillus paracasei*; ILC 2- célula linfóide inata tipo 2; TSLP- linfopoetina do estroma tímico; LT α 0- Linfócito T virgem; LT α 1/2- Linfócito T helper 1/2; MEC- matriz extracelular; IFN- γ - interferon gama; AGCCs- ácidos graxos de cadeia curta; ZO-1- zônula de ocludina-1; TNF- α - fator de necrose tumoral alfa; TGF- β - fator de crescimento e renovação beta.

Fonte: Cavalcanti, 2023



Referências

REFERÊNCIAS

ADCOCK, I. M.; CARAMORI, G.; CHUNG, K. F. New targets for drug development in asthma. **The Lancet**, v. 372, p. 1073-1087, 2008.

ALEVY, Y. G.; PATEL, A. C.; ROMERO, A. G.; PATEL, D. A. IL-13-induced airway mucus production is attenuated by MAPK13 inhibition. **Journal Clinical Investigation**, v.122, p. 4555-4568, 2012.

ALOU, M. T.; LAGIER, J. C.; & RAOULT, D. Diet influence on the gut microbiota and dysbiosis related to nutritional disorders. **Human Microbiome Journal**, v. 1, p. 3-11, 2016.

ANATRIELLO, E.; CUNHA, M.; NOGUEIRA, J.; CARVALHO, J. L.; SÁ, A. K.; MIRANDA, M.; AIMBIRE, F. Oral feeding of *Lactobacillus bulgaricus* N45. 10 inhibits the lung inflammation and airway remodeling in murine allergic asthma: Relevance to the Th1/Th2 cytokines and STAT6/T-bet. **Cellular immunology**, v. 341, p. 103-128, 2019.

ASHIQUE, S.; DE RUBIS, G.; SIROHI, E.; MISHRA, N.; RIHAN, M.; GARG, A.; REYES, R. J.; MANANDHAR, B.; BHATT, S.; JHA, N. K.; SINGH, T. G.; GUPTA, G.; SINGH, S. K.; CHELLAPPAN, D. K.; PAUDEL, K. R.; HANSBRO, P. M.; OLIVER, B. G.; DUA, K. Short Chain Fatty Acids: Fundamental mediators of the gut-lung axis and their involvement in pulmonary diseases. **Chemico-Biological Interaction**, v. 368, p. 110-131, 2022.

AYAKANNU, R.; ABDULLAH, N. A.; RADHAKRISHNAN, A. K.; RAJ, V. L.; LIAM, C. K. Relationship between various cytokines implicated in asthma. **Human immunology**, v. 80, p. 755-763, 2019.

AZMAN, S.; SEKAR, M.; BONAM, S. R.; GAN, S. H.; WAHIDIN, S.; LUM, P. T.; DHADDE, S. B. Traditional Medicinal Plants Conferring Protection Against Ovalbumin-Induced Asthma in Experimental Animals: A Review. **Journal of Asthma and Allergy**, v. 14, p. 641-662, 2021.

BALTA, I.; BUTUCEL, E.; MOHYLYUK, V.; CRISTE, A.; DEZMIREAN, D. S.; STEF, L.; PET, I.; CORCIONIVOSCHI, N. Novel Insights into the Role of Probiotics in Respiratory Infections, Allergies, Cancer, and Neurological Abnormalities. **Diseases**, v.9, p. 150-160, 2021.

BARNES, P. J. Kinases as novel therapeutic targets in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Pharmacological Reviews**, v. 68, p. 788-815, 2016.

BARONE, R.; RAPPA, F.; MACALUSO, F.; CARUSO BAVISOTTO, C.; SANGIORGI, C.; DI PAOLA, G.; MARINO GAMMAZZA, A. Alcoholic liver disease: A mouse model reveals protection by *Lactobacillus fermentum*. **Clinical and Translational Gastroenterology**, v. 7, p.138, 2016.

BEHERA, S. S.; PANDA, S. K. Ethnic and industrial probiotic foods and beverages: efficacy and acceptance. **Current Opinion in Food Science**, v. 32, p. 29-36, 2020.

BISSET, L. R.; SCHMID-GRENDELMEIER, P. Chemokines and their receptors in the pathogenesis of allergic asthma: progress and perspective. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 11, p. 35-42, 2005.

BONAM, S. R.; PARTIDOS, C. D.; HALMUTHUR, S. K. M.; MULLER, S. An overview of novel adjuvants designed for improving vaccine efficacy. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 38, p. 771-793, 2017.

BOULET, L. P. Airway remodeling in asthma: update on mechanisms and therapeutic approaches. **Current opinion in pulmonary medicine**, v. 24, p. 56-62, 2018.

BOUSQUET, J.; SCHÜNEMANN, H. J.; HELLINGS, P. W.; ARNAVIELHE, S.; BACHERT, C.; BEDBROOK, A.; CANONICA, G. W. MACVIA clinical decision algorithm in adolescents and adults with allergic rhinitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 138, p. 367-374, 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 241, de 26 de julho de 2018**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/>> Acesso em: 10 de janeiro de 2022.

BROŽEK, J. L.; BOUSQUET, J.; AGACHE, I.; AGARWAL, A.; BACHERT, C.; BOSNIC-ANTICEVICH, S.; DE SOUSA, J. C. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines-2016 revision. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 140, p. 950-958, 2017.

BURGAIN, J.; SCHER, J.; FRANCIUS, G.; BORGES, F.; CORGNEAUA, M.; REVOLJUNELLES, A.M.; CAILLIEZ-GRIMAL, C.; GAIANI, C. Lactic acid bacteria in dairy food: Surface characterization and interactions with food matrix components. **Advances in Colloid and Interface Science**, Netherlands, v. 213, p. 21–35, 2014.

BUSSE, W. W. Biological treatments for severe asthma: A major advance in asthma care. **Allergology International**, v. 68, p. 158-166, 2019.

CANI, P. D. Human gut microbiome: Hopes, threats and promises. **Gut**, v. 67, p. 1716-1725, 2018.

CARLSON, B. M. The Respiratory System. **The Human Body**, p. 303-319, 2019.

CARVALHO, J. L.; MIRANDA, M.; FIALHO, A. K.; CASTRO-FARIA-NETO, H.; ANATRIELLO, E.; KELLER, A. C.; AIMBIRE, F. Oral feeding with probiotic *Lactobacillus rhamnosus* attenuates cigarette smoke-induced COPD in C57Bl/6 mice: Relevance to inflammatory markers in human bronchial epithelial cells. **PLoS One**, v. 15, p. 1-18, 2020.

CAVALCANTE, R. G. S.; DE ALBUQUERQUE, T. M. R.; DE LUNA FREIRE, M. O.; FERREIRA, G. A. H.; CARNEIRO DOS SANTOS, L. A.; MAGNANI, M.; CRUZ, J. C.; BRAGA, V. A.; DE SOUZA, E. L.; DE BRITO ALVES, J. L. The probiotic *Lactobacillus fermentum* 296 attenuates cardiometabolic disorders in high fat diet-treated rats. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 29, p. 1408-1417, 2019.

CHANG, P.V.; HAO, L.; OFFERMANN, S.; MEDZHITOV, R. The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.111, p. 2247-2252, 2014.

CHEN, G.; KORFHAGEN, T. R.; XU, Y.; KITZMILLER, J.; WERT, S. E.; GREGORIEFF, A.; CLEVERS, H. SPDEF is required for mouse pulmonary goblet cell differentiation and regulates a network of genes associated with mucus production. **Journal Clinical Investigation**, v.119, p. 2914-2924, 2009.

CHEN, X.; ZHAO, X.; WANG, H.; YANG, Z.; LI, J.; SUO, H. Prevent effects of *Lactobacillus fermentum* HY01 on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. **Nutrients**, v. 9, p.62-72, 2017.

CHEN, K.; MAGRI, G.; GRASSET, E. K. Rethinking mucosal antibody responses: IgM, IgG and IgD join IgA. **Nature Review Immunology**, v. 20, p. 427-441, 2020.

CHENG, D.; XUE, Z.; YI, L.; SHI, H.; ZHANG, K.; HUO, X.; ZHEN, G. Epithelial interleukin-25 is a key mediator in Th2-high, corticosteroid-responsive asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 190, p. 639-648, 2014.

CODEVILLA, C. F.; CASTILHOS, T. D. S.; BERGOLD, A. M. A review of analytical methods for the determination of four new phosphodiesterase type 5 inhibitors in biological samples and pharmaceutical preparations. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, p. 1-11, 2013.

DAHIYA, D. K.; RENUKA PUNIYA, M.; SHANDILYA, U. K.; DHEWA, T.; KUMAR, N.; KUMAR, S.; PUNIYA, A. K.; SHUKLA, P. Gut Microbiota Modulation and Its Relationship with Obesity Using Prebiotic Fibers and Probiotics: A Review. **Frontiers in Microbiology**, v.8, p. 563, 2017.

DANG, A. T.; MARSLAND, B. J. Microbes, metabolites, and the gut-lung axis. **Mucosal Immunology**, v.4, p. 843-850, 2019.

DAVID, L.; MAURICE, C.; CARMODY, R. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. **Nature**, v. 505, p. 559–563, 2014.

DJUKANOVIC, R.; HANANIA, N.; BUSSE, W.; PRICE, D. IgE-mediated asthma: new revelations and future insights. **Respiratory Medicine**, v. 112, p. 128-129, 2016.

DONGARRÀ, M. L.; RIZZELLO, V.; MUCCIO, L.; FRIES, W.; CASCIO, A.; BONACCORSI, I.; FERLAZZO, G. Mucosal immunology and probiotics. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 12, p.19–26, 2013.

DONKOR, O. N.; RAVIKUMAR, M.; PROUDFOOT, O.; DAY, S. L.; APOSTOLOPOULOS, V.; PAUKOVICS, G.; GILL, H. Cytokine profile and induction of T helper type 17 and regulatory T cells by human peripheral mononuclear cells after microbial exposure. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 167, p. 282-295, 2012.

DÓRIA, R. G.; PASSARELLI, D.; CHEQUER, T. N.; REGINATO, G. M.; HAYASAKA, Y. B.; FANTINATO NETO, P.; FREITAS, S. H. Investigação clínica e comparação do esfregaço sanguíneo e PCR para diagnóstico de hemoparasitas em equinos de

esporte e tração (carroceiros). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 36, p. 724-730, 2016.

DRAPER K.; LEY C.; PARSONNET J. Probiotic guidelines and physician practice: a cross-sectional survey and overview of the literature. **Beneficial Microbes**, v. 24, p. 507-519, 2017.

EIFAN, A. O.; DURHAM, S. R. Pathogenesis of rhinitis. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 46, p. 1139-1151, 2016.

ELTBOLI, O.; MISTRY, V.; BARKER, B.; BRIGHTLING, C. E. Relationship between blood and bronchial submucosal eosinophilia and reticular basement membrane thickening in chronic obstructive pulmonary disease. **Respirology**, v. 20, p. 667-670, 2015.

EVANS, C. M.; RACLAWSKA, D. S.; TTOFALI, F.; LIPTZIN, D. R.; FLETCHER, A. The polymeric mucin MUC5AC is required for allergic airway hyperreactivity. **Nature Communication**, v. 6, p. 6281-6287, 2015.

FELESZKO, W.; JAWORSKA, J.; RHA, R. D.; STEINHAUSEN, S.; AVAGYAN, A.; JAUDSZUS, A.; HAMELMANN, E. Probiotic-induced suppression of allergic sensitization and airway inflammation is associated with an increase of T regulatory-dependent mechanisms in a murine model of asthma. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 37, p. 498-505, 2007.

FERREIRA, L. K. P.; FERREIRA, L. A. P.; MONTEIRO, T. M.; BEZERRA, G. C.; BERNARDO, L. R.; PIUVEZAM, M. R. Combined allergic rhinitis and asthma syndrome (CARAS). **International Immunopharmacology**, v. 74, p. 105718, 2019.

FORSYTHE, P.; INMAN, M. D.; BIENENSTOCK, J. Oral treatment with live *Lactobacillus reuteri* inhibits the allergic airway response in mice. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 175, p. 561-569, 2007.

FORSYTHE, P. Probiotics and lung diseases. **Chest**, v. 171, p. 901-908, 2011.

FUJIWARA, D.; INOUE, S.; WAKABAYASHI, H.; FUJII, T. The anti-allergic effects of lactic acid bacteria are strain dependent and mediated by effects on both Th1/Th2 cytokine expression and balance. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 135, p. 205-215, 2004.

FURUSAWA, Y.; OBATA, Y.; FUKUDA, S.; ENDO, T. A.; NAKATO, G.; TAKAHASHI, D.; OHNO, H. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. **Nature**, v. 504, p. 446-450, 2013.

GADELHA, F. A.; CAVALCANTI, R. F.; VIEIRA, G. C.; FERREIRA, L. K.; DE SOUSA, G. R.; FILHO, J. M.; BARBOSA, M. A.; DOS SANTOS, S. G.; PIUVEZAM, M. R. Immunomodulatory properties of *Musa paradisiaca* L. inflorescence in Combined Allergic Rhinitis and Asthma Syndrome (CARAS) model towards NFκB pathway inhibition. **Journal of Functional Foods**, v. 83, p. 1045-40, 2021.

GARCIA-CASTILLO, V.; ZELAYA, H.; ILABACA, A.; ESPINOZA-MONJE, M.; KOMATSU, R.; ALBARRACÍN, L.; KITAZAWA, H.; GARCIA-CANCINO, A.; VILLENA, J. *Lactobacillus fermentum* UCO-979C beneficially modulates the innate immune response triggered by *Helicobacter pylori* infection *in vitro*. **Beneficial Microbes**, v. 18, p. 829-841, 2018.

GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA (GINA). 2017 Global Strategy For Asthma Management and Prevention. Disponível em: <http://ginasthma.org/2017-gina-report-global-strat>, 2017.

GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA (GINA). 2018 Global Strategy For Asthma Management and Prevention, update 2018. Disponível em: <http://ginasthma.org/>

GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA (GINA). 2021. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Disponível em: www.ginasthma.org. Acesso em 20 de dezembro de 2021

GOMEZ, E.; FERNANDEZ, T. D.; DONA, I.; RONDON, C.; CAMPO, P.; GOMEZ, F.; BLANCA, M. Initial immunological changes as predictors for house dust mite immunotherapy response. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 45, p. 1542-1553, 2015.

GOH, F. G.; SLOSS, C. M.; CUNNINGHAM, M. R.; NILSSON, M.; CADALBERT, L.; PLEVIN, R. G-protein-dependent and-independent pathways regulate proteinase-activated receptor-2 mediated p65 NF- κ B serine 536 phosphorylation in human keratinocytes. **Cellular signalling**, v. 20, p. 1267-1274, 2008.

GOUR, N.; KARP, W. M. IL-4 and IL-13 signaling in allergic airway disease. **Cytokine**, v. 75, p. 68-78, 2015.

GUARNER, F.; KHAN, A. G.; GARISCH, J.; ELIAKIM, R.; GANGL, A.; THOMSON, A.; FEDORAK, R. World Gastroenterology Organisation Practice Guideline: Probiotics and Prebiotics-May 2008: guideline. **South African Gastroenterology Review**, v. 6, p. 14-25, 2008.

GUIBAS, G. V.; LAKIS, S.; GKIMPAS, C.; MANDA, M.; KAPOUKRANIDOU, D.; SPANDOU, E. Efficiency of different decalcification protocols for nasal osseous structures in a rat experimental model of allergic rhinitis, and their effects on epithelial histology: An attempt at standardization. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 66, p. 469-475, 2014.

GUILLIAMS, M.; LAMBRECHT, B. N.; HAMMAD, H. Division of labor between lung dendritic cells and macrophages in the defense against pulmonary infections. **Mucosal immunology**, v. 6, p. 464-473, 2013.

HALNES, I.; BAINES, K.; BERTHON, B.; MACDONALD-WICKS, L.; GIBSON, P.; WOOD, L. Soluble Fibre Meal Challenge Reduces Airway Inflammation and Expression of GPR43 and GPR41 in Asthma. **Nutrients**, v. 9, 50-57, 2017.

HAMMAD, H.; LAMBRECHT, B. N. The basic immunology of asthma. **Cell**, v.18, p. 1469-1485, 2021.

HAKANSSON, A.; MOLIN, G. Gut microbiota and inflammation. **Nutrients**, v. 3, p. 637-682, 2011.

HEDRICH, H. J. The Laboratory Mouse. London: Academic Press, 2004.

HELLINGS, P. W.; KLIMEK, L.; CINGI, C.; AGACHE, I.; AKDIS, C.; BACHERT, C.; HUPIN, C. Non-allergic rhinitis: position paper of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. **Allergy**, v. 72, p. 1657-1665, 2017.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, p. 506-14, 2014.

HOLGATE, S. T. The sentinel role of the airway epithelium in asthma pathogenesis. **Immunological Reviews**, v. 242, p. 205-219, 2011.

HOUGEE, S.; VRIESEMA, A. J. M.; WIJERING, S. C.; KNIPPELS, L. M. J.; FOLKERTS, G.; NIJKAMP, F. P.; GARSSSEN, J. Oral treatment with probiotics reduces allergic symptoms in ovalbumin-sensitized mice: a bacterial strain comparative study. **International archives of allergy and immunology**, v. 151, p.107-117, 2010.

HUNG, T. V.; SUZUKI, T. Dietary Fermentable Fibers Attenuate Chronic Kidney Disease in Mice by Protecting the Intestinal Barrier. **Journal of Nutrition**, v. 148, p. 552-561, 2018.

HUSÁKOVÁ, E.; DOMINIKA, S.; BOBÍKOVÁ, K.; KARAFFOVÁ, V.; LEVKUTOVÁ, M.; LEVKUT M. Expression of cytokines in chicken peripheral blood mononuclear cells after stimulation by probiotic bacteria and *Campylobacter jejuni* *in vitro*. **Food and Agricultural Immunology**, v. 26, p. 813-820, 2015.

JANG, S. O.; KIM, H. J.; KIM, Y. J.; KANG, M. J.; KWON, J. W.; SEO, J. H.; HONG, S. J. Asthma prevention by *Lactobacillus rhamnosus* in a mouse model is associated with CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T cells. **Allergy, asthma & immunology research**, v. 4, p. 150-156, 2012.

JIANG, Y.; NGUYEN, T. V.; JIN, J.; YU, Z. N.; SONG, C. H.; CHAI, O. H. Bergapten ameliorates combined allergic rhinitis and asthma syndrome after PM2.5 exposure by balancing Treg/Th17 expression and suppressing STAT3 and MAPK activation in a mouse model. **Biomedicine Pharmacotherapy**, v. 164, p. 495-512, 2023.

KALLIOMÄKI, J. M.; ANTOINE, U.; HERZ, G.T.; RIJKERS, J.M.; WELLS, A. M. Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: prevention and management of allergic diseases by probiotics. **Journal of Nutrition**, v. 140, p. 713-721, 2010.

KANG, Y. B.; CAI, Y.; ZHANG, H. Gut microbiota and allergy/asthma: From pathogenesis to new therapeutic strategies. **Allergologia et Immunopathologia**, v. 45, p. 305-309, 2017.

KATO, A.; FAVORETO, S.; AVILA, P. C.; SCHLEIMER, R. P. TLR3- and Th2 Cytokine-Dependent Production of Thymic Stromal Lymphopoietin in Human Airway Epithelial Cells. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 2, p. 1080-1087, 2007.

KAWASE, M.; HE, F.; KUBOTA, A.; HATA, J. Y.; KOBAYAKAWA, S. I.; HIRAMATSU, M. Inhibitory effect of *Lactobacillus gasseri* TMC0356 and *Lactobacillus* GG on enhanced vascular permeability of nasal mucosa in experimental allergic rhinitis of rats. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 70, p. 3025-30, 2006.

KEELY, S.; TALLEY, N. J.; HANSBRO, P. M. Pulmonary-intestinal cross-talk in mucosal inflammatory disease. **Mucosal Immunology**, v. 5, p. 7-18, 2012.

KIKUCHI, Y.; TAKAI, T.; KUHARA, T.; OTA, M.; KATO, T.; HATANAKA, H. Crucial commitment of proteolytic activity of a purified recombinant major house dust mite allergen Der p1 to sensitization toward IgE and IgG responses. **Journal of Immunology**, v. 177, p. 1609-1617, 2006.

KOH, A.; DE VADDER, F.; KOVATCHEVA-DATCHARY, P.; B ACKHED, F. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. **Cell**, v. 165, p. 1332-1345, 2016.

KHORASANIZADEH, M.; ESKIAN, M.; GELFAND, E. W.; REZAEI N. Mitogen-activated protein kinases as therapeutic targets for asthma. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 174, p. 112-126, 2017.

KUBO, M. Innate and adaptive type 2 immunity in lung allergic inflammation Immunological. **Immunological reviews**, v. 278, p. 162-172, 2017.

KUYAMA, S.; YAMAMOTO, A.; SUGIYAMA, M.; KAKUTA, H.; SUGIMOTO, Y. Effect of 5-aminosalicylate on allergic rhinitis model in mice. **International Immunopharmacology**, v. 10, p. 713-716, 2010.

LAMBRECHT, B. N.; HAMMAD, H. The immunology of asthma. **Nature Immunology**, v. 16, p. 45-56, 2015.

LEE, Y. Z.; SHAARIB, K.; CHEEMAA, M. S.; THAMA, C. L.; SULAIMANA, M. R.; ISRAFA, D. A. An orally active geranyl acetophenone attenuates airway remodeling in a murine model of chronic asthma. **European Journal of Pharmacology**, v. 797, p. 53-64, 2017.

LEUSCHNER, R. G. K.; ROBINSON, T. P.; HUGAS, M.; COCCONCELLI, P. S.; RICHARD-FORGET, F.; KLEIN, G.; RICHARDSON, M. Qualified presumption of safety (QPS): A generic risk assessment approach for biological agents notified to the European Food Safety Authority (EFSA). **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, p. 425-435, 2010.

LI, H. T.; CHEN, Z. G.; LIU, H.; YE, J.; ZOU, X. L.; WANG, Y. H.; ZHANG, T. T. Treatment of allergic rhinitis with CpG oligodeoxynucleotides alleviates the lower airway outcomes of combined allergic rhinitis and asthma syndrome via a mechanism that possibly involves in TSLP. **Experimental Lung Research**, v. 42, p. 322-333, 2016.

LI, X.; CHEN, Q.; CHU, C.; YOU, H.; JIN, M.; ZHAO, X.; JI, W. OVAAlbumin-induced experimental allergic asthma is Toll-like receptor 2 dependent. **Allergy & Asthma Proceedings**, v. 35, p. 693-699, 2014.

LIEW, F. Y.; PITMAN, N. I.; MCINNES, I. B. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, p. 103-114, 2010.

MANDHANE, S. N.; SHAH, J. H.; THENNATI, R. Allergic rhinitis: an update on disease, present treatments and future prospects. **International immunopharmacology**, v. 11, p. 1646-1662, 2011.

MANISE, M. G.; HOLTAPPELS, K.; VAN CROMBRUGGEN, F.; SCHLEICH, C.; BACHERT, R. IgE and cytokines in asthma: relationship with sputum cellular profile. **Plosone**, v.8, p. 583-588, 2013.

MASLAN, J.; MIMS, J. W. What is asthma? Pathophysiology, demographics, and health care costs. **Otolaryngologic Clinics of North America**, v. 47, p. 13-22. 2014.

MATERA, M. G.; RINALDI, B.; CALZETTA, L.; ROGLIANI, P.; CAZZOLA, M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled corticosteroids for asthma treatment. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 101, p. 101-128, 2019.

MEENAKSHI.; MALHOTRA, I. K. Identification of *Lactobacillus fermentum* strains with potential against colorectal cancer by characterizing short chain fatty acids production, anti-proliferative activity and survival in an intestinal fluid: *In vitro* analysis. **Journal of Bioanalysis & Biomedicine**, v. 07, p. 104-125, 2015.

MELO, T. A.; DOS SANTOS, T. F.; PEREIRA, L. R.; PASSOS, H. M.; REZENDE, R. P.; ROMANO, C. C. Functional profile evaluation of *Lactobacillus fermentum* TCUESC01: A new potential probiotic strain isolated during Cocoa Fermentation. **BioMed Research International**, v. 51, p. 659-666, 2017.

MIRAGLIA D. G. M.; INDOLFI, C.; CAPASSO, M.; MAIELLO, N.; DECIMO, F.; CIPRANDI, G. *Bifidobacterium* mixture (B longum BB536, B infantis M-63, B breve M-16V) treatment in children with seasonal allergic rhinitis and intermittent asthma. **Italian journal of pediatrics**, v. 43, 805-825, 2017.

MIYAKE, T.; MIYAKE, T.; HAMADA, H.; MORISHITA, R. Prevention of Airway Inflammation by Simultaneous Inhibition of NFkB and STST6 Using Chimeric Decoy Oligonucleotides in a Mouse Model of Asthma. **Molecular Therapy**, v. 24, p. 231, 2016.

MOLINARO, E. M.; GONÇALVES, L. F.; AMENDOEIRA, M. R. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde, Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fundação Oswaldo Cruz. 290 p. v. 2 - Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2010.

MORTAZ, E.; ADCOCK, I. M.; FOLKERTS, G.; BARNES, P. J.; PAUL VOS, A.; GARSEN, J. Probiotics in the management of lung diseases. **Mediators of inflammation**, v. 10, p. 7510-68, 2013.

MURARO, A.; LEMANSKE JR, R. F.; HELLINGS, P. W.; AKDIS, C. A.; BIEBER, T.; CASALE, T. B.; SIMON, H. U. Precision medicine in patients with allergic diseases: airway diseases and atopic dermatitis-PRACTALL document of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology and the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 137, p. 1347-1358, 2016.

NASR, W. F.; SOROUR, S. S.; EL BAHRAWY, A. T.; BOGHDADI, G. S.; EL SHAHAWAY, A. A. The role of the level of interleukin-33 in the therapeutic outcomes of immunotherapy in patients with allergic rhinitis. **International Archives of Otorhinolaryngology**, v. 22, p. 152-156, 2018.

NASCIMENTO, C. M.; CASARO, M. C.; PEREZ, E. R.; RIBEIRO, W. R.; MAYER, M. P. A.; ISHIKAWA, K. H.; LINO-DOS-SANTOS-FRANCO, A.; PEREIRA, J. N. B.; FERREIRA, C. M. Experimental allergic airway inflammation impacts gut homeostasis in mice. **Heliyon**, v. 9, p. 164-79, 2023.

NOCE, A.; MARRONE, G.; DANIELE, F.; OTTAVIANI, E.; WILSON JONES, G.; BERNINI, R.; ROMANI, A.; ROVELLA V. Impact of Gut Microbiota Composition on Onset and Progression of Chronic Non-Communicable Diseases. **Nutrients**, v. 1073, p.120-132, 2019.

OHSHIMA-TERADA, Y.; HIGUCHI, Y.; KUMAGAI, T.; HAGIHARA, A.; NAGATA M. Complementary effect of oral administration of *Lactobacillus paracasei* K71 on canine atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 26 p. 350-363, 2015.

OKUBO, K.; KURONO, Y.; ICHIMURA, K.; ENOMOTO, T.; OKAMOTO, Y.; KAWAUCHI, H. Japanese Society of Allergology. Japanese guidelines for allergic rhinitis 2017. **Allergology International**, v. 66, p. 205-221, 2017.

OLIVEIRA, Y.; CAVALCANTE, R. G. S.; CAVALCANTI, M. P.; MAGNANI, M.; BRAGA, V. A.; DE SOUZA, E. L.; DE BRITO ALVES, J. L. Oral administration of *Lactobacillus fermentum* post-weaning improves the lipid profile and autonomic dysfunction in rat offspring exposed to maternal dyslipidemia. **Food Function**, v. 11, p. 5581-5594, 2020.

PAIVA FERREIRA, L. K. D.; PAIVA FERREIRA, L. A. M.; BEZERRA BARROS, G. C.; MOZZINI MONTEIRO, T.; DE ARAÚJO SILVA, L. A.; PEREIRA, R. A.; FIGUEIREDO, P. T. R.; ALVES, A. F.; RODRIGUES, L. C.; PIUVEZAM, M. R. MHTP, a synthetic alkaloid, attenuates combined allergic rhinitis and asthma syndrome through downregulation of the p38/ERK1/2 MAPK signaling pathway in mice. **International Immunopharmacology**, v. 96, p.107-120, 2021.

PARK, K. S.; KORFHAGEN, T. R.; BRUNO, M. D.; JOSEPH, A.; WERT, E.; HERSHEY.; KHURANA, G. K.; CHEN, G.; WHITSETT, J. A. SPDEF regulates goblet cell hyperplasia in the airway epithelium. **Journal Clinical Investigation**, v.117, p. 978-988, 2007.

PAWANKAR, R.; BUNNAG, C.; CHEN, Y.; FUKUDA, T.; YOU-YOUNG, K.; LE, L.; T. T., ZHONG, N. Allergic rhinitis and its impact on asthma update (ARIA 2008)-western

and Asian-Pacific perspective. **Asian Pacific journal of allergy and immunology**, v.27, p. 237-243, 2009.

PEDERSON, C. S. The gas-producing species of the genus *Lactobacillus*. **Journal of Bacteriology**, v.2, p. 95, 1938.

PENDERS, C.; THIJS, P. A.; VAN, D. B. I.; KUMMELING, B.; SNIJDERS, F.; STELMA, H.; ADAMS, R.; VAN R. E. E. Gut microbiota composition and development of atopic manifestations in infancy: the KOALA Birth Cohort Study, **Obesity**, v. 56 p. 661-667, 2007.

PEREIRA, R. A.; ALVES, A. F.; DE AMORIM, I.G.; FONTES, I.C.; SANTOS, G.A.; CAMPOS, L.S.; NUNES, R. V.; ANDRADE, H.M.; DE ALVARENGA, E.R.; TAFURI, W.L. Characterization of macrophage polarization in lesions of dogs inoculated with *Leishmania (Leishmania) infantum* (BH401) strain. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.15, p.11-19. 2022.

PIENIZ, S.; ANDREAZZA, R.; ANGHINONI, T.; CAMARGO, F.; BRANDELLI, A. Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB 18s. **Food Control**, v. 37, p. 251-256, 2014.

PUUPPONEN-PIMIA, R.; AURA, A. M.; OKSMANCALENTEY, K. M.; MYLLARIEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANHOLM. Development of functional ingredients of gut health. **Trends in Food Science and Technology**, v. 13, p. 3-11, 2002.

RAMOS, B. G.; MARTINS, T. B. D.; DE CASTRO, M. E. P. C. Prevalência da asma nas regiões do Brasil: uma revisão sistemática. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, p. 11341-11359, 2021.

RAO, P. K.; SREENIVASA, M. Y. Probiotic *Lactobacillus* strains and their antimicrobial peptides to counteract biofilm- associated infections- A promising biological approach. **Journal of Bioinformatics and Proteomics**, v. 2, p. 100-109, 2016.

ROBINSON, D. S. The role of the T cell in asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 126, p. 1081-1091, 2010.

RODRIGUEZ-NOGALES, A.; ALGIERI, F.; GARRIDO-MESA, J.; VEZZA, T.; UTRILLA, M. P.; CHUECA, N.; GALVEZ, J. Differential intestinal anti-inflammatory effects of *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus salivarius* in DSS mouse colitis: Impact on microRNAs expression and microbiota composition. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 61, p. 1700144, 2017.

ROOKS, M. G.; GARRETT, W. S. Gut microbiota, metabolites and host immunity. **Nature Review Immunology**, v.16, p. 341-352, 2016.

RUBINI, N. P. M.; WANDALSEN, G. F.; RIZZO, M. C. V.; AUN, M. V.; CHONG NETO, H. J.; SOLE, D. Guia prático sobre controle ambiental para pacientes com rinite alérgica. **Arquivos de Asma Alergia e Imunologia**, v. 1, p. 7-22, 2017.

SAKANO, E.; SARINHO, E. S.; CRUZ, A. A.; PASTORINO, A. C.; TAMASHIRO, E.; KUSCHNIR, F.; MELLO JR, J. F. D. IV Brazilian Consensus on Rhinitis-an update on

allergic rhinitis. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 84, p. 3-14, 2018.

SAMUELSON, D. R.; WELSH, D. A.; SHELLITO, J.E. Regulation of lung immunity and host defense by the intestinal microbiota. **Frontiers in Microbiology**, v. 6 p. 1085-1097, 2015.

SCHAUB, B.; R. LAUENER.; VON MUTIUS E. The many faces of the hygiene hypothesis. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 117, p. 969-977, 2006.

SHARMA, G.; IM, S. H. Probiotics as a potential immunomodulating pharmabiotics in allergic diseases: current status and future prospects. **Allergy, asthma & immunology research**, v. 10, p. 575-590, 2018.

SHREINER, A. B.; KAO, J. Y.; YOUNG, V. B. The gut microbiome in health and in disease. **Current Opinion Gastroenterology**, v. 31, p. 69-75, 2015.

SHERWIN, J.; AWAD, I. T.; SADLER, P. J.; LIDDLE, A. M.; ROWBOTHAM, D. J. Analgesia during radial artery cannulation: comparison of the effects of lidocaine applied by local injection or iontophoresis. **Anaesthesia**, v. 58, p. 474-476, 2003.

SHI, Y. H.; SHI, G. C; WAN, H. Y.; JIANG, L. H.; AI, X. Y.; ZHU, H. X.; ZHANG, B. Y. Coexistence of Th1/Th2 and Th17/Treg imbalances in patients with allergic asthma. **Chinese Medical Journal**, v.124, p. 1951-1956, 2011.

SO, J. S.; LEE, C. G.; KWON, H. K.; YI, H. J.; CHAE, C. S.; PARK, J. A.; IM, S. H. *Lactobacillus casei* potentiates induction of oral tolerance in experimental arthritis. **Molecular immunology**, v. 46, p. 172-180, 2008.

SOLÉ, D.; ROSÁRIO FILHO, N. A.; SARINHO, E. S.; CAMELO-NUNES, I. C.; BARRETO, B. A. P.; MEDEIROS, M. L.; ANDRADE, D. M. D. Prevalence of asthma and allergic diseases in adolescents: nine-year follow-up study (2003-2012). **Jornal de Pediatria**, v. 91, p. 30-35, 2015.

SOUZA, C.; LOPES, A.; BATINA, P.; CECIM, M.; CUNHA, M.; CONRADO, C. Estresse parasitário em cabras saanen: Avaliação hematológica e da atividade oxidativa dos neutrófilos. **Veterinária Notícias**, v. 12, p. 17-23, 2006.

Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica - SPAIC. **Alergia e Asma duplo Problema**, 2017. Disponível em: < <http://www.spaic.pt/noticias/alergia-e-asma>>. Acesso em: 02 de Abril de 2021.

SUN, K.Y.; XU, D. H.; XIE C, PLUMMER, S.; TANG, J.; YANG, X. F.; JI, X. H. *Lactobacillus paracasei* modulates LPS-induced inflammatory cytokine release by monocyte-macrophages via the up-regulation of negative regulators of NF-kappaB signaling in a TLR2-dependent manner. **Cytokine**, v. 92, p. 1-11, 2017.

TANG, H.; LI, T.; HAN, X.; SUN, J. TLR4 antagonist ameliorates combined allergic rhinitis and asthma syndrome (CARAS) by reducing inflammatory monocytes infiltration in mice model. **International immunopharmacology**, v. 73, p. 254-260, 2019.

TANG, R. B.; CHANG, J. K.; CHEN, H. L. Can probiotics be used to treat allergic diseases? **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 78, p. 154-157, 2015.

TARAMARCAZ, P.; GIBSON, P.G. The effectiveness of intranasal corticosteroids in combined allergic rhinitis and asthma syndrome. **Clinical and Experimental Allergy**, 34, p.1883-1889, 2004.

TAUR, D. J.; PATIL, R. Y. Mast cell stabilizing, antianaphylactic and antihistaminic activity of *Coccinia grandis* fruits in asthma. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 9, p. 359-362, 2011.

TEIXEIRA, T. F. S.; GRZEŚKOWIAK, L.; FRANCESCHINI, S. C. C.; BRESSAN, J.; FERREIRA, C. L. L. F.; PELUZIO, M. C. G. Higher level of faecal SCFA in women correlates with metabolic syndrome risk factors. *British Journal of Nutrition*, v. 109, 914-919, 2013.

THORBURN, A. N.; MCKENZIE, C. I.; SHEN, S. J.; STANLEY, D.; MACIA, L.; MASON, L. J.; MACKAY, C. R. Evidence that asthma is a developmental origin disease influenced by maternal diet and bacterial metabolites. **Nature Communication**, v. 6, p. 7320, 2015.

TOHIDINIK, H. R.; MALLAH, N.; TAKKOUICHE, B. History of allergic rhinitis and risk of asthma; a systematic review and meta-analysis. **World Allergy Organization Journal**, v. 12, p.100-129, 2019.

TRONDE, A.; BOSQUILLON, C.; FORBES, B. The isolated perfused lung for drug absorption studies. **Drug Absorption Studies**, v. 7, p. 135-163, 2007.

TURGEON, M. L. Clinical hematology: theory and procedures. Hagerstown: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

Universidade de São Paulo (USP). Rinite alérgica afeta cerca de 40% da população mundial. Jornal, USP. Disponível em: <http://rbp.fmrp.usp.br/>. Acesso em: 16 de setembro de 2023.

VARRICCHI, G.; BAGNASCO, D.; BORRIELLO, F.; HEFFLER, E.; CANONICA, G. W. Interleukin-5 pathway inhibition in the treatment of eosinophilic respiratory disorders: evidence and unmet needs. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 16, p. 186-194, 2016.

VERSTEGEN, R. E. M.; KOSTADINOVA, A. I.; MERENCIANA, Z.; GARSEN, J.; FOLKERTS, G.; HENDRIKS, R. W.; WILLEMSSEN, L. E. M. Dietary fibers: Effects, underlying mechanisms and possible role in allergic asthma management. **Nutrients** v. 13, p. 1-32, 2021.

VIEIRA, G. C. Efeito do tratamento por nebulização com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl. (menispermaceae) em camundongos BALB / c sensibilizados com Ovalbumina. 2008. 149 f. **Dissertação** (Mestrado Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal de Paraíba, João Pessoa.

WADSWORTH, D. S.; DORSCHIED, D. R. Clinical update on the use of biomarkers of

airway inflammation in the management of asthma. **Journal of Asthma and Allergy**, v. 4, p.101-112, 2011.

WANG, I. J.; WANG, J. Y. Children with atopic dermatitis show clinical improvement after *Lactobacillus* exposure. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 45, p. 779-787, 2015.

WANG, H.; LIU, J. S.; PENG, S. H.; DENG, X. Y.; ZHU, D. M.; JAVIDIPARSIJANI, S.; LUO, J. M. Gut–lung crosstalk in pulmonary involvement with inflammatory bowel diseases. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, p. 6794-6804, 2013.

WANG, H., SHI, P., ZUO, L., DONG, J., ZHAO, J., LIU, Q., ZHU, W., Dietary Nondigestible Polysaccharides Ameliorate Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction in IL10 Knockout Mice. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 10, p.1076-1086, 2016.

WANG, M.; ZHANG, W.; SHANG, J. Immunomodulatory effects of IL-23 and IL-17 in a mouse model of allergic rhinitis. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 34, p.110-116, 2013.

WANG, X.; HUI, Y.; ZHAO, L.; HAO, Y.; GUO, H.; REN F. Oral administration of *Lactobacillus paracasei* L9 attenuates PM2.5-induced enhancement of airway hyperresponsiveness and allergic airway response in murine model of asthma. **PLoS One**, v. 15, p. 0171721, 2017.

WANG, X.; LIU, C.; WU, L.; ZHU, S. Potent ameliorating effect of Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) antagonist YC-1 on combined allergic rhinitis and asthma syndrome (CARAS) in Rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 788, p. 343-350, 2016.

WENZEL, S. E. Emergence of biomolecular pathways to define novel asthma phenotypes. Type-2 immunity and beyond. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 55, p. 1-4, 2016.

WESTFALL, S.; LOMIS, N.; PRAKASH, S. Longevity extension in *Drosophila* through gut-brain communication. **Scientific Reports**, v. 8, p. 836-842, 2018.

WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report, 2002.

WHO, Asthma, World Health Organization, 2018, <http://www.who.int/respiratory/asthma/en/>, Accessed date: 10 February 2020.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Asthma. 2021. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/asthma>>. Acesso em 20 de dezembro de 2021.

WILLIAMS, D. M. Clinical pharmacology of corticosteroids. **Respiratory Care**, v. 63 p. 655-670, 2018.

WILSON, T. M.; MARIC, I.; SHUKLA, J.; M. BROWN, C.; SANTOS, O.; SIMAKOVA, I. IL-5 receptor α levels in patients with marked eosinophilia or mastocytosis. **Journal of**

Allergy Clinical Immunology, v. 128, p. 1086-1092, 2011.

WORAPRAYOTE, W.; MALILA, Y.; SORAPUKDEE, S.; SWETWIWATHANA, A.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. **Meat Science**, v.120, p. 118-132, 2016.

WYNN, T. A. Type 2 cytokines: mechanisms and therapeutic strategies versus leukotriene receptor antagonist for seasonal allergic rhinitis: a meta-analysis. **Plosone**, v. 9, p. 112-125, 2014.

XU, Y.; ZHANG, J.; WANG, J. The efficacy and safety of selective H1-antihistamine versus leukotriene receptor antagonist for seasonal allergic rhinitis: a meta-analysis. **Plosone**, v. 9, p.112-125, 2014.

XU, Z.; KNIGHT, R. Dietary effects on human gut microbiome diversity. **British Journal of Nutrition**, v. 113, p. S1-S5, 2015.

YANG, Z.; LIANG, C.; WANG, T.; ZOU, Q.; ZHOU, M.; CHENG, Y.; PENG, H.; JI, Z.; DENG, Y.; LIAO, J.; LIU, H. NLRP3 inflammasome activation promotes the development of allergic rhinitis via epithelium pyroptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 522, p. 61-67, 2020.

ZHANG, P. L.; JARED R. P.; JEFFERY W. P.; THOMAS M. B.; ADAM M. B.; SANTOSH P. CD52 Antigen May Be a Therapeutic Target for Eosinophilic Rhinosinusitis. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v. 37, p.148-151, 2007.

ZHENG, J.; S. WITTOUCK.; E. SALVETTI.; C. FRANZ, H.; HARRIS, P.; MATTARELLI, P. W. O'TOOLE, B. POT, P. VANDAMME, J. WALTER. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, p. 2782-858, 2020.

ZUBERBIER, T.; LÖTVALL, J.; SIMOENS, S.; SUBRAMANIAN, S. V.; CHURCH, M. K. Economic burden of inadequate management of allergic diseases in the European Union: a GA2LEN review. **Allergy**, v. 69, p. 1275-1279, 2014.



Apêndice

Apêndice A – Artigo publicado na *Immunobiology* (FI 3.152 e qualis A2 para farmácia) referente à parte dos resultados da tese.



Immunobiology
Volume 228, Issue 5, September 2023, 152721



Limosilactobacillus fermentum modulates the gut-airway axis by improving the immune response through FOXP3 activation on combined allergic rhinitis and asthma syndrome (CARAS)

Raquel F.P. Cavalcanti^{a b}, Francisco A.A.F. Gadelha^a, Laércia K.D. Paiva Ferreira^a,
Larissa A.M. Paiva Ferreira^a, José V. Chaves Júnior^{b c}, Rayanne S. de Araújo Batista^b,
Taynara B.L. Melo^b, Fábio S. de Souza^b, Adriano F. Alves^{a d}, Leônia Maria Batista^{b e},
Marcia R. Piuvezam^{a d}  

[Show more](#) 

 Add to Mendeley  Share  Cite

<https://doi.org/10.1016/j.imbio.2023.152721> 

[Get rights and content](#) 

Apêndice B – Artigo submetido na revista *Journal of Functional Food* (FI 5.6 e qualis A1 para farmácia) referente à parte dos resultados da tese.

Journal of Functional Foods
Oral administration of *Lactobacillus paracasei* attenuates combined allergic rhinitis and asthma syndrome (CARAS) model: relevance of short-chain fatty acids on gut-airway axis
 --Manuscript Draft--



Manuscript Number:	
Article Type:	Full Length Article
Keywords:	Lactobacillus paracasei (LPc-G110); SCFAs; gut airway axis; allergy; CARAS.
Corresponding Author:	Raquel Cavalcanti Paraíba Federal University Health Sciences Center BRAZIL
First Author:	Raquel Cavalcanti
Order of Authors:	Raquel Cavalcanti Francisco A. A. F. Gadelha Laercia K. D. Paiva Ferreira Larissa A. M. Paiva Ferreira José Venâncio C. Júnior Rayanne S. de Araújo Batista Taynara B. Lins Fábio S. de Souza Adriano F. Alves Leônia Maria Batista Naiara N. Dejana Marcia R. Piuvezam
Abstract:	Probiotics have been shown to have a beneficial effect in allergic diseases. Antiallergic effect of <i>Lactobacillus paracasei</i> was demonstrated in asthma, however its effect in combined allergic rhinitis and asthma syndrome (CARAS) is still unclear. This study evaluated the <i>Lactobacillus paracasei</i> (LPc-G110) supplementation in CARAS model. Mice were ovalbumin sensitized and challenged after being supplemented with LPc-G110. Supplemented animals showed reduced allergic rhinitis signs and decreased eosinophilic infiltration into airway tissues. Hyperplasia/hypertrophy of nasal and lung goblet cells, extracellular matrix deposition and hypertrophy of the lung smooth muscle layer were also reduced in supplemented mice. Still, LPc-G110 reduced eosinophilia, serum levels of IgE, IL-4, IL-13 and IL-5, and favored the production of IFN- γ , IL-10 and short chain fatty acids. LPc-G110 supplementation preserved the gut tissue integrity and epithelial barrier by increasing the tight junction protein ZO-1. Therefore LPc-G110 improves gut-airway health and is a promising candidate for allergic airway diseases.



Anexo A – Certificado de análise



Active Pharmaceutica
IMPORTADORA E DISTRIBUIDORA DE INQUISOS FARMACÊUTICOS

CERTIFICADO DE ANÁLISES 290/18

INSUMO: **LACTOBACILLUS FERMENTUM (LF61) ≥ 100 BLH UFC/g**

LOTE FABRICANTE: WK20181008001

LOTE PRODUÇÃO: 0034/1218

ORIGEM: China

FABRICANTE: Jiangsu Wecare Biotechnology

FABRICAÇÃO: 08/10/2018

VALIDADE: 07/10/2020

ANÁLISE	MÉTODO	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADOS	REFERÊNCIA
Descrição	Fabricante	Pó liofilizado amarelo claro	Conforme ^{*/**}	Fabricante
Contagem de células viáveis <i>Lactobacillus fermentum</i>	ISO 7889:2003	≥ 1,0x10 ¹¹ UFC/g	1,3x10 ¹¹ UFC/g ^{**}	Fabricante
Contagem de células viáveis (Pasteur Laboratórios)	ISO 7889:2003	≥ 1,0x10 ¹¹ UFC/g	Conforme ^{***}	Fabricante
Impurezas	Fabricante	Sem impurezas visíveis	Conforme ^{**}	Fabricante
Umidade	Fabricante	≤ 5,0 %	2,18 % ^{**}	Fabricante
Atividade de água	Fabricante	< 0,12	0,030 ^{**}	Fabricante
Coliformes	n=5,c=2,m=10	≤ 100 UFC/g	<10, <10, <10, <10, <10 UFC/g ^{**}	Fabricante
Fungos	Fabricante	≤ 50 UFC/g	< 10 UFC/g ^{**}	Fabricante

*Resultado obtido no Laboratório de Controle de Qualidade Active Pharmaceutica.

**Resultado transcrito conforme laudo original do fabricante.

***Resultado obtido em análise tercelrizada no Pasteur Laboratório de Pesquisa e Controle Microbiológico, acreditado pelo INMETRO segundo requisitos estabelecidos na ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005.

Conclusão

(X) Aprovado

() Reprovado

Armazenamento: Conservar em temperatura ≤-18°C. A qualidade do produto não é alterada durante o processo de transporte quando este é feito em embalagem apropriada (isopor e gelo).

Luis G. Ferreira
Diretor Técnico
CRF/SC 5378

Aline Buttchevitz
CRF/SC 13616

Marina A. Sperandio
CRF/SC 9644

Camila F. Konell
CRF/SC 11435

Palhoça, 26 de Novembro de 2018.

Anexo B – Certificado de análise

	Importação /Distribuição: LEMMA SUPPLY SOLUTIONS LTDA Gestão da Qualidade
---	--

CERTIFICADO DE ANÁLISE			
Nome do Produto	<i>Lactobacillus paracasei</i> 100 bilhões UFC/g		
Nº Lote	IJ1504	Identificação:	LPC-G110
Data da Fabricação	10/2019	Validade	10/2021
Origem	China		

Testes/Análise	Especificação /Método	Resultado
Aparência	Pó liofilizado de cor branca pálida a marrom	Conforme
Umidade %	≤ 5.0	3.0
PH (10%)	4.0~6.0	4.21
Densidade, g/ml	0.35~0.75	0.69
Contagem de viabilidade- UFC/g	≥ 80 bilhões de UFC/g	100 bilhões de UFC/g
Bactéria não-acido lácteo-UFC/g	≤ 500	<10
Testes de patógenos para:		
1. Coliformes - UFC/g	≤ 10	<10
2. Bacillus spp, UFC/g	-	<10
3. Enterococcus spp, MPN/g	-	<3
4. Fungos e leveduras -UFC/g	≤ 10	<10
3.Bactéria patogênica (Shigella sonnei, Salmonella Sp Staphylococcus aureus)	Negativa	Ausente
Chumbo (Pb) mg/kg	≤ 1.0	<1.0
Total Arsênico mg/kg	≤ 0.5	<0.5
Conteúdo líquido/g	Conforme	Conforme
Observação:	Identificação da cultura é confirmada de acordo com o nível de gênero/espécie baseado na sequência 16s r-RNA *Atenção: A cor das cepas pode variar a cada lote de produção de acordo com o processo de fermentação e a potência	

Armazenar em recipiente fechado, em local seco e fresco.

Proteger de aquecimento - (Durante a armazenagem recomenda-se manter em temperatura ambiente abaixo de 20°C). Matéria prima higroscópica, requer cuidados com a umidade.

Observações: **APROVADO** - Produto de acordo com padrão do fabricante


Letícia Rita Rezende
 Responsável Técnico – CRP¹ 16.114/SP

24/01/2020

Rua Círiro Correa, 1200 - JD Morumbi
 Jardimópolis / SP - CEP 14.680-000
 Escritório: 11 5044 7234 - São Paulo / SP
www.lemma.com.br - lemma@lemma.com.br

Anexo C – Certificado de aprovação do projeto na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPB)

Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais

Reitoria

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo dos efeitos e mecanismos de ação de produtos naturais e sintéticos bioativos em modelos experimentais de edema inflamatório, lesão pulmonar aguda (LPA) e síndrome da asma e rinite alérgicas combinadas (CARAS).", protocolada sob o CEUA nº 7316150420 (ID 001064), sob a responsabilidade de **Marcia Regina Piuvezam e equipe; LARISSA ADILIS MARIA PAIVA FERREIRA; Larissa Rodrigues Bernardo; Grasiela Costa Bezerra; Raquel Fragoso Pereira; Francisco Allysson Assis Ferreira Gadelha ; LAÉRCIA KARLA DIEGA PAIVA FERREIRA** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 15/05/2020.

We certify that the proposal "Study of effects and mechanisms of action of natural and synthetic bioactive products in experimental models of inflammatory edema, acute lung injury (ALI) and combined allergic asthma and rhinitis syndrome (CARAS).", utilizing 676 Isogenics mice (325 males and 351 females), 312 Heterogenics mice (312 females), protocol number CEUA 7316150420 (ID 001064), under the responsibility of **Marcia Regina Piuvezam and team; LARISSA ADILIS MARIA PAIVA FERREIRA; Larissa Rodrigues Bernardo; Grasiela Costa Bezerra; Raquel Fragoso Pereira; Francisco Allysson Assis Ferreira Gadelha ; LAÉRCIA KARLA DIEGA PAIVA FERREIRA** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 05/15/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **05/2020** a **12/2025**

Área: **Ciências Farmacêuticas**

Origem:	Unidade de Produção Animal IPeFarM		
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Fêmeas
Linhagem:	Mus musculus - Balb/C	idade:	6 a 8 semanas
		Peso:	20 a 25 g
N:	351		
Origem:	Unidade de Produção Animal IPeFarM		
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Machos
Linhagem:	Mus musculus - Balb/C	idade:	6 a 8 semanas
		Peso:	20 a 25 g
N:	325		
Origem:	Unidade de Produção Animal IPeFarM		
Espécie:	Camundongos heterogênicos	sexo:	Fêmeas
Linhagem:	Mus musculus - Swiss	idade:	6 a 8 semanas
		Peso:	20 a 30 g
N:	312		

Local do experimento: Serão realizados no Laboratório de Imunofarmacologia da Universidade Federal da Paraíba

João Pessoa, 03 de março de 2021

Prof. Dra. Jailane de Souza Aquino
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Carlos Augusto Alanis Clemente
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba