



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO**

LARISSA ARAÚJO MAIA

Efeitos da administração de probióticos sobre biomarcadores inflamatórios e suas associações com a função autonômica cardíaca de mulheres com hipertensão arterial sistêmica: análise secundária de um ensaio randomizado, triplo-cego e controlado por placebo

João Pessoa

2024

LARISSA ARAÚJO MAIA

Efeitos da administração de probióticos sobre biomarcadores inflamatórios e suas associações com a função autonômica cardíaca de mulheres com hipertensão arterial sistêmica: análise secundária de um ensaio randomizado, triplo-cego e controlado por placebo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves.

João Pessoa

2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

M217e Maia, Larissa Araujo.

Efeitos da administração de probióticos sobre biomarcadores inflamatórios e suas associações com a função autonômica cardíaca de mulheres com hipertensão arterial sistêmica : análise secundária de um ensaio randomizado, triplo-cego e controlado por placebo / Larissa Araujo Maia. - João Pessoa, 2024.

58 f. : il.

Orientação: José Luiz de Brito Alves.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Nutrição. 2. Probióticos. 3. Hipertensão. 4. Inflamação. 5. Disfunção autonômica. I. Alves, José Luiz de Brito. II. Título.

UFPB/BC

CDU 612.39(043)



Universidade Federal da Paraíba

Centro de Ciências da Saúde



Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição

Ata da 266ª (duo centésima sexagésima sexta) Sessão Pública de Defesa de Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Nutrição, da discente Larissa Araújo Maia.

Aos vinte e seis dias do mês de fevereiro de dois mil e vinte e quatro (26/02/2024), às 08:00 horas, reuniram-se em cerimônia pública, na sala virtual através do link: <https://meet.google.com/pww-deqp-nqe> os membros da Banca Examinadora e a mestrande Larissa Araújo Maia, candidata ao grau de Mestre em Ciências da Nutrição. A Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes Professores: Dr. José Luiz de Brito Alves (Presidente / Orientador), Drª Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves (Examinadora Interna), Drª Caroline Severo de Assis (Examinadora Interna Suplente), Drª Eliane Lopes Rosado (Examinadora Externa) e Drª Lavoisiana Lacerda de Lucena (Examinadora Externa Suplente). Dando início à sessão pública, o Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves, convidou a mim, Carlos Fernando da Silva para secretariá-los comunicando o fim específico da reunião. A seguir, foi cedida a palavra à examinada para que no prazo estabelecido por Regimento fizesse sua exposição de motivos e objetivos de sua dissertação, metodologia adotada, resultados encontrados, discussão e conclusão, trabalho esse sob o título “Efeitos da administração de probióticos sobre biomarcadores inflamatórios e suas associações com a função autonômica cardíaca de mulheres com hipertensão arterial sistêmica: análise secundária de um ensaio randomizado, triplo-cego e controlado por placebo”. Concluída a exposição, a candidata em seguida foi arguida sucessivamente por cada membro da banca examinadora. Dando continuidade, os senhores membros foram inquiridos pelo Sr Presidente se estavam aptos a proferir o julgamento e, recebendo respostas afirmativas, procederam com a deliberação da avaliação. Após certo espaço de tempo, o Sr Presidente proclamou como “APROVADA” a dissertação intitulada “Efeitos da administração de probióticos sobre biomarcadores inflamatórios e suas associações com a função autonômica cardíaca de mulheres com hipertensão arterial sistêmica: análise secundária de um ensaio randomizado, triplo-cego e controlado por placebo”. A seguir, preenchendo devidamente os mapas concernentes aos valores e conceitos, declarou que sua autora estava em condições de receber o grau de Mestre em Ciências da Nutrição, devendo a Universidade Federal da Paraíba, providenciar na forma da lei a expedição do respectivo Diploma. Nada mais havendo a ser tratado, eu, Carlos Fernando da Silva Secretário do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, lavrei a presente Ata que vai datada e assinada pelos membros da Banca Examinadora. João Pessoa, 26 de fevereiro de 2024.

José Luiz de Brito Alves

Eliane Lopes Rosado

Mª da Conceição R. Gonçalves

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao meu orientador, professor Dr. José Luiz de Brito Alves, por me ensinar e conduzir durante todo este caminho com tanta maestria, competência, paciência e humanidade. Ele é um exemplo notável de pessoa, docente, servidor público, coordenador e orientador.

A todos os discentes e colegas de turma e do laboratório de pesquisa pelos auxílios, trocas, companheirismo e cumplicidade.

Aos professores do Programa da Pós-graduação em Ciências da Nutrição (PPGCN) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) por tantos ensinamentos e contribuições teóricas e práticas ao meu processo de formação.

À professora Joelma Rodrigues, por todo ensinamento repassado na condução das análises laboratoriais.

Aos funcionários do departamento que contribuíram com este trabalho, direta ou indiretamente.

Aos membros da banca, pelo aceite e contribuições.

Às pacientes que se dispuseram a participar do estudo, pelo comprometimento e dedicação, sem as quais esse trabalho não poderia ser realizado.

Ao hemocentro da Paraíba, pelo auxílio no armazenamento das amostras.

À minha família, minha base, por sempre me apoiar, fortalecer e ajudar em tudo que podem. Sem todo esse amor e amparo com certeza eu não teria chegado até aqui.

Por fim, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

“Os sonhos trazem saúde para a emoção, equipam o frágil para ser autor da sua história,
renovam as forças do ansioso, animam os deprimidos.”

Augusto Cury

RESUMO

O papel da inflamação na patogênese da hipertensão arterial sistêmica (HAS) tem sido descrito. O comprometimento da integridade de barreira intestinal conduz à exposição sistêmica a patógenos, antígenos e endotoxinas luminiais, podendo desencadear um processo inflamatório crônico de baixo grau que pode contribuir para disfunção autonômica cardíaca e o desenvolvimento e manutenção da HAS. O objetivo deste estudo foi investigar se a terapia adjuvante com probióticos é capaz de reduzir a inflamação em mulheres com HAS e analisar a correlação de biomarcadores inflamatórios com parâmetros de função autonômica cardíaca nessa população. Esta é uma análise secundária de um estudo triplo-cego, em que um total de 36 mulheres foram randomizadas em dois grupos: probiótico (n=19) ou placebo (n=17). O grupo probiótico recebeu 10^9 UFC/dia de cada cepa de *Lactobacillus paracasei* LPC-37, *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lactobacillus acidophilus* NCFM e *Bifidobacterium lactis* HN019. O grupo placebo recebeu um sachê idêntico de polidextrose (1g/dia). Dados clínicos, bioquímicos (concentrações séricas de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ e TNF- α) e análise da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) foram obtidos no início e após 8 semanas de intervenção. As mulheres que receberam probióticos apresentaram um aumento nas concentrações séricas de IL-17A ($p=0,02$) e diminuição do IFN- γ ($p=0,01$) em comparação a sua linha de base, e um aumento de IL-10 ($p=0,03$), em comparação ao grupo placebo. A administração de probióticos ou placebo não alteraram as concentrações séricas de TNF- α e IL-6 ($p>0,05$). As concentrações séricas de IL-2 e IL-4 foram reduzidos em mulheres que receberam placebo ou probióticos ($p<0,001$). Correlações entre VFC e variáveis inflamatórias mostraram que o IFN- γ foi positivamente correlacionado com FC (frequência cardíaca), LF (baixa frequência), LF/HF, e relação SD2/SD1 (eixos longitudinais/eixos transversais), e negativamente correlacionado com HF (alta frequência). A IL-10 foi correlacionada negativamente com FC, LF, LF/HF e SD2/SD1 e positivamente correlacionada com HF. A IL-6 correlacionou-se negativamente com RMSSD (raiz quadrada da média da soma dos quadrados das diferenças sucessivas entre batimentos adjacentes normais a normais) e SD1 e positivamente com a relação SD2/SD1. Por fim, a IL-4 apresentou correlação negativa com SDRR (desvio padrão entre a duração de intervalos RR), RMSSD, pRR50 (número de pares de intervalos de batimento normal a normal sucessivos que diferiram em 50 ms), SD1 e SD2. Em geral, a suplementação de probióticos pareceu exibir um efeito anti-

inflamatório, observado pela elevação de IL-10 em mulheres com HAS. Biomarcadores pró-inflamatórios correlacionaram-se positivamente com maior atividade do tônus simpático na análise da VFC.

Palavras-chave: probióticos; hipertensão; inflamação; disfunção autonômica.

ABSTRACT

The role of inflammation in the pathogenesis of systemic arterial hypertension (SAH) has been described. Compromised intestinal barrier integrity leads to systemic exposure to pathogens, antigens, and luminal endotoxins, which may trigger a low-grade chronic inflammatory process that may contribute to cardiac autonomic dysfunction and the development and maintenance of SAH. The aim of this study was to investigate whether adjuvant probiotic therapy is able to reduce inflammation in women with SAH and to analyze the correlation of inflammatory biomarkers with parameters of cardiac autonomic function in this population. This is a secondary analysis of a triple-blind study in which a total of 36 women were randomized into two groups: probiotic (n=19) or placebo (n=17). The probiotic group received 10^9 CFU/day of each strain of *Lactobacillus paracasei* LPC-37, *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lactobacillus acidophilus* NCFM, and *Bifidobacterium lactis* HN019. The placebo group received an identical bag of polydextrose (1 g/day). Clinical, biochemical (serum concentrations of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ and TNF- α) and heart rate variability (HRV) data were collected at baseline and after 8 weeks of intervention. Women who received probiotics showed an increase in serum concentrations of IL-17A ($p=0.02$) and a decrease in IFN- γ ($p=0.01$) and an increase in IL-10 ($p=0.03$) compared to the placebo group. The administration of probiotics or placebo did not change serum concentrations of TNF- α and IL-6 ($p>0.05$). Serum concentrations of IL-2 and IL-4 were reduced in women receiving placebo or probiotics ($p<0.001$). Correlations between HRV and inflammatory variables showed that IFN- γ was positively correlated with HR (heart rate), LF (low frequency), LF/HF and SD2/SD1 ratio and negatively correlated with HF (high frequency). IL-10 was negatively correlated with HR, LF, LF/HF and SD2/SD1 and positively correlated with HF. IL-6 correlated negatively with RMSSD (root mean square of the sum of the squares of the successive differences between adjacent normal beats) and SD1 and positively with SD2/SD1 ratio. Finally, IL-4 showed a negative correlation with SDRR (standard deviation between the duration of RR intervals), RMSSD, pRR50 (number of pairs of consecutive normal-to-normal intervals that differed by 50 ms), SD1 and SD2. In general, probiotic supplementation appeared to have an anti-inflammatory effect, as observed by the elevation of IL-10 in women with SAH. Pro-inflammatory biomarkers were positively correlated with greater sympathetic tone activity in HRV analysis.

Keywords: probiotics; hypertension; inflammation; autonomic dysfunction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Teoria do Mosaico original (A) e atualizada (B)	14
Figura 2: LPS nas regiões cardiorreguladoras do Sistema Nervoso Central.....	17
Figura 3: Diagrama de mecanismo proposto	18
Figura 4: Fluxograma do desenho do estudo	25
Figura 5: Probiótico utilizado no grupo intervenção	26
Figura 6: Ecocardiograma utilizado na análise de VFC.....	26

LISTA DE TABELAS

TABELAS DA DISSERTAÇÃO

Tabela 1: Classificação da pressão arterial	13
Tabela 2: Efeitos colaterais de alguns medicamentos anti-hipertensivos comuns	15

TABELAS DO ARTIGO

Tabela 1: Características clínicas da linha de base	48
Tabela 2: Avaliação de citocinas em mulheres com hipertensão arterial recebendo probiótico ou placebo por 8 semanas	49
Tabela 3: Coeficientes de correlação linear entre medidas de variabilidade da frequência cardíaca e variáveis inflamatórias	50

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

- DI:** Disbiose intestinal
- FC:** Frequência cardíaca
- HAS:** Hipertensão arterial sistêmica
- HF:** Alta frequência
- IFN- γ :** Interferon gama
- IMC:** Índice de massa corporal
- IL-1 β :** Interleucina-1 beta
- IL-2:** Interleucina-2
- IL-4:** Interleucina-4
- IL-6:** Interleucina-6
- IL-10:** Interleucina-10
- IL-17A:** Interleucina-17A
- LF:** Baixa frequência
- LPS:** Lipopolissacarídeos
- MI:** Microbiota intestinal
- PA:** Pressão Arterial
- PAS:** Pressão arterial sistólica
- PAD:** Pressão arterial diastólica
- PRR50:** Número de pares de intervalos de batimento normal a normal sucessivos que diferiram em 50 ms
- RMSSD:** Raiz quadrada da média da soma dos quadrados das diferenças sucessivas entre batimentos adjacentes normais a normais
- SDRR:** Desvio padrão entre a duração de intervalos RR
- SD1:** Eixos transversais
- SD2:** Eixos longitudinais
- TLR:** Receptores toll-like
- TNF- α :** Fator de Necrose Tumoral alfa
- UFC:** Unidades formadoras de colônia
- UN:** Unidades normalizadas
- VFC:** Variabilidade da frequência cardíaca

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 Hipertensão Arterial Sistêmica	13
2.2 Microbiota, eubiose e disbiose intestinal	15
2.3 Disbiose intestinal e hipertensão arterial	16
2.4 Administração de probióticos na hipertensão arterial.....	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Aspectos éticos	24
3.2 Local de realização e recrutamento	24
3.3 Desenho do estudo	24
3.4 Amostras de sangue e medições bioquímicas	25
3.5 Associação com dados de variabilidade da frequência cardíaca	26
3.6 Análise estatística	27
4. RESULTADOS	28
REFERÊNCIAS	29
APÊNDICE	34
Apêndice A – Dissertação em modelo de artigo científico	34
Apêndice B – Parecer de aprovação do CEP	55

1. INTRODUÇÃO

A Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) é uma enfermidade crônica, não transmissível e multicausal, caracterizada pela elevação sustentada da pressão arterial (PA), a valores ≥ 140 mmHg de pressão arterial sistólica (PAS) e/ou ≥ 90 mmHg de pressão arterial diastólica (PAD) em adultos. A predisposição genética, idade, sexo, a ingestão elevada de sódio, excesso de peso e sedentarismo são exemplos de fatores de risco implicados no desenvolvimento da HAS (Mamdouh *et al.*, 2022; Barroso *et al.*, 2021).

A HAS acomete, globalmente, uma média de 1,2 bilhão de adultos, com idades entre 30-79 anos (Mamdouh *et al.*, 2022; WHO, 2021). Pode ser classificada em dois tipos: primária ou essencial, que compreende em torno de 90% dos casos, e ocorre quando não se tem conhecimento sobre a etiologia envolvida; e secundária, quando a causa é conhecida (Shah *et al.*, 2022). Existe uma variedade de opções medicamentosas para o tratamento da HAS, porém, menos da metade dos pacientes conseguem alcançar as metas pressóricas (Shoulders; Powell, 2019).

O aumento da atividade nervosa simpática e redução da atividade nervosa parassimpática tem sido descritos como mecanismos relevantes implicados no desenvolvimento e manutenção da HAS. Evidências sugerem que, juntamente com o distúrbio autonômico, a HAS é associada com um estado inflamatório crônico de baixo grau que favorece o dano aos órgãos-alvo e a manutenção do estado hipertensivo (Yang *et al.*, 2015).

A disbiose intestinal (DI), condição resultante de distúrbios na composição, diversidade e função da microbiota intestinal (MI), também tem sido demonstrada como fator de risco para o desenvolvimento e manutenção da HAS (Yang *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017; Santisteban *et al.*, 2017). Estudos demonstram que a DI contribui para a inflamação sistêmica de baixo grau através do aumento da permeabilidade da barreira da mucosa intestinal e da translocação de lipopolissacarídeos (LPS) (Silveira-Nunes *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2018).

No sistema nervoso central, a ligação de LPSs aos receptores toll-like (TLR) ativam uma cascata inflamatória com recrutamento de macrófagos e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e IL-1 β , conduzindo à neuroinflamação, hiperatividade simpática, disfunção autonômica e aumento da PA (Richards *et al.*, 2022; Haspula *et al.*, 2018). Em roedores, o LPS tem sido empregado para incitar inflamação vascular e disfunção endotelial. Em ensaios com humanos, a concentração sérica desse metabólito tem sido correlacionado positivamente com a HAS (Canale *et al.*, 2021).

Descobertas acumuladas apontam que a inflamação é componente essencial não apenas na gênese, mas também na progressão da HAS, estando relacionada a complicações hipertensivas, como infarto do miocárdio, lesão renal e acidente vascular cerebral hemorrágico (Zhang *et al.*, 2023). Nesse cenário de inter-relação entre HAS e DI, tem sido investigado a eficácia da terapia adjuvante com probióticos (Zarezadeh *et al.*, 2023). Probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando ingeridos em quantitativos apropriados, alteram a função metabólica e nutricional da microbiota comensal, conferindo efeitos benéficos à saúde do hospedeiro (Khalesi *et al.*, 2018; Hill, 2014).

Evidências pré-clínicas sugerem que a administração de probióticos pode exercer efeito anti-inflamatório, modulando o sistema imunológico e diminuindo a disfunção autonômica e a PA

(De Luna Freire *et al.*, 2021; De Luna Freire *et al.*, 2023; Robles-Vera *et al.*, 2020). A análise da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) é um método para avaliar a regulação autonômica do coração, e a disfunção autonômica está associada a alterações na função e estrutura de órgãos-alvo, como coração, cérebro, rins e vasos sanguíneos, resultando em aumento do risco cardiovascular (Yugar *et al.*, 2023). Uma maior atividade do sistema nervoso parassimpático tem sido associada à redução da produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-alfa e IL-6, e menores concentrações circulantes de proteína C reativa e IL-6 (Tell *et al.*, 2021).

Anteriormente, demonstramos que a suplementação de 4 bilhões de Unidades formadoras de colônia (UFC) de um coquetel composto por diferentes probióticos, por 8 semanas, melhorou a função autonômica cardíaca em mulheres com HAS (Romão da Silva *et al.*, 2020). Pré-tratamento com Slp, uma proteína da camada superficial de *Lactobacillus acidophilus* NCFM, inibiu respostas inflamatórias induzidas por LPS em macrófagos *in vitro*, incluindo a produção de IL-1 β e TNF- α (Wang *et al.*, 2018). Reduções significativas de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-6) foram obtidas após 45 dias do consumo de 80 ml/dia de leite fermentado com *Bifidobacterium lactis* HN019 ($2,72 \times 10^{10}$ UFC/dia) por pacientes com síndrome metabólica (Bernini *et al.*, 2016).

Semelhantemente, a administração de *Bifidobacterium lactis* HN019 ($1,5 \times 10^8$ UFC/dia) e *Lactobacillus rhamnosus* HN001 ($7,5 \times 10^7$ UFC/dia), em uma preparação simbiótica, reduziu IFN- γ e regulou positivamente IL-10 em adultos saudáveis (Li *et al.*, 2023). Tratamentos envolvendo formulações combinadas de probióticos e com duração superior a 8 semanas parecem ser mais promissores no manejo da inflamação (Liang *et al.*, 2020). Todavia, os efeitos da suplementação de probióticos sobre os biomarcadores inflamatórios em indivíduos com HAS ainda não foram elucidados.

Esta análise secundária de um ensaio clínico randomizado teve como objetivo geral avaliar o efeito da suplementação de probióticos sobre marcadores inflamatórios em mulheres com HAS e analisar se há correlação entre citocinas inflamatórias e variáveis de função autonômica cardíaca. Como objetivos específicos, visa investigar os efeitos da administração de um probiótico com multicepas de *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Bifidobacterium lactis* HN019, *Lactobacillus rhamnosus* HN001 e *Lactobacillus para casei* LPC-37, sobre as concentrações séricas de citocinas pró e anti-inflamatórias em mulheres adultas com HAS e avaliar posteriormente a associação dessas com parâmetros de VFC.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA

A HAS é a principal causa evitável de doença cardiovascular. Suas complicações compreendem o desenvolvimento de doença renal, insuficiência cardíaca, lesão arterial coronariana e derrame vascular, acarretando altos índices de morbimortalidade. A HAS é um distúrbio complexo, poligênico e multicausal, resultante da instabilidade de variados sistemas orgânicos e influenciado por fatores genéticos, demográficos e dietéticos. No Brasil, dados fornecidos pelo departamento de informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) relativos ao ano de 2017, revelaram o incidente de 1.312.663 óbitos totais, sendo 27,3% para doenças cardiovasculares onde, dessas, 45% estavam associadas a HAS (Simão et al., 2022; Da Silva et al., 2022; Del Pinto et al., 2022).

Reconhecido como um desafio para a saúde pública (Frey; Menon; Elgendi, 2022), a prevalência global de HAS abrange cerca de 30 a 45% da população adulta, com prevalência global, estratificada por idade, de 20 e 24% em mulheres e homens, respectivamente, independentemente da variável renda, isto é, independentemente dos indicadores socioeconômicos dos países. A HAS é progressivamente mais incidente em faixas etárias mais elevadas, com prevalência > 60% em pessoas > 60 anos (Bryan et al., 2018). As razões envolvidas nesse aumento compreendem o envelhecimento populacional e uma maior exposição a outros fatores de risco (Da Silva et al., 2022).

Clinicamente, a HAS pode ser classificada em dois grandes grupos: HAS primária e HAS secundária. A HAS primária (ou essencial) abrange entre 85 e 95% dos casos e não apresenta etiologia definida. Em oposição, a HAS secundária é fruto de condições subjacentes detectáveis, incluindo mutações genéticas, adenoma adrenal e estenose da artéria renal (Harrison; Coffman; Wilcox, 2021). Em relação a gravidade, a HAS pode ser classificada em 4 tipos: grau 1, grau 2, grau 3 e HAS isolada, com níveis correspondentes de PAS e PAD de 140-159 e/ou 90-99, de 160-179 e/ou 100-109, ≥180 e/ou ≥110 e ≥140 e <90, respectivamente (Da Silva et al., 2022) (Quadro 1).

Tabela 1: Classificação da pressão arterial em indivíduos a partir de 18 anos de idade

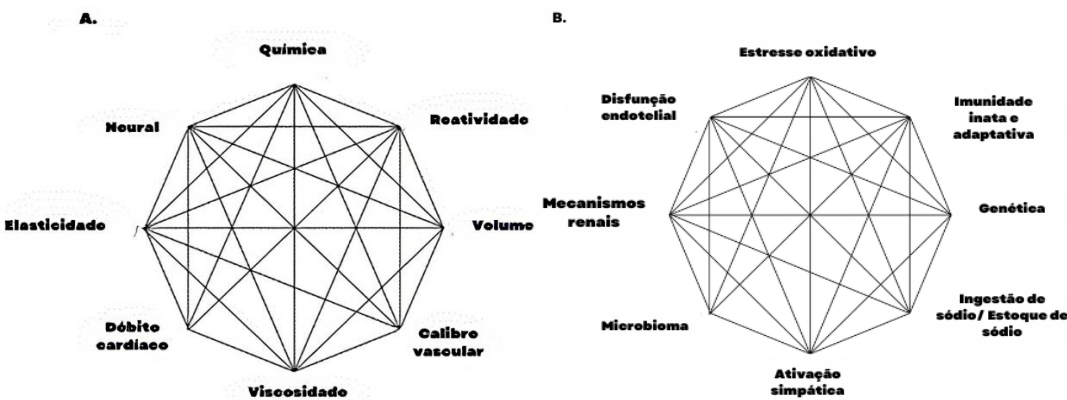
Classificação	PAS (mmHg)		PAD (mmHg)
PA ótima	< 120	E	< 80
PA normal	120-129	e/ou	80-84
Pré-hipertensão	130-139	e/ou	85-89
Grau 1	140-159	e/ou	90-99
Grau 2	160-179	e/ou	100-109
Grau 3	≥ 180	e/ou	≥ 110
HAS isolada	≥ 140	E	<90

Fonte: adaptado de Barroso et al., (2021).
Abreviações: PA, pressão arterial; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; HAS, hipertensão arterial sistêmica.

Os mecanismos complexos que compõem a fisiopatologia da HAS foram propostos em 1949, por Irvine Page, um pesquisador pioneiro dessa temática, pela chamada teoria do mosaico, representada em um diagrama octogonal, que engloba os componentes multifatoriais da HAS

(figura 1 A.). Posteriormente, foi sugerido um diagrama atualizado, que inclui fatores adicionais, dentro de um processo interativo, envolvendo, dentre outros agentes, o microbioma e a imunidade inata e adaptativa (figura 1 B) (Da Silva et al., 2022; Harrison; Coffman; Wilcox, 2021).

Figura 1: Teoria do Mosaico original (A) e atualizada (B).



Adaptado de Harrison; Coffman e Wilcox (2021).

Classicamente, o tratamento da HAS envolve o uso de medicamentos anti-hipertensivos que, adjunto ou não a outros esquemas terapêuticos, como mudanças de estilo de vida, pode reduzir eficazmente a morbimortalidade (Da Silva et al., 2022). Pacientes com HAS resistente, no entanto, costumam apresentar prevalência aumentada de lesão de órgãos (p. ex. acometimento retiniano avançado, hipertrofia ventricular, elevação da excreção de albumina urinária, espessamento médio-intimal da carótida e placas na carótida), quando comparados com pacientes com HAS controlada. Um controle deficiente da PA foi observado em uma população de pacientes com HAS tratados. Surpreendentemente, apenas 1 em cada 3 indivíduos mantinham a PA em níveis <140/90 mmHg (Hering; Trzebski; Narkiewicz, 2017).

Um enfoque protetor cardiovascular é o objetivo basilar do tratamento anti-hipertensivo. A atenuação da PA constitui-se a primeira meta, objetivando a redução de repercussões cardiovasculares e mortalidade associados à HAS. A maior parte dos indivíduos com HAS necessitam de fármacos em acréscimo às modificações do estilo de vida. São cinco as classes elementares de fármacos anti-hipertensivos: inibidores da enzima conversora de angiotensina, diuréticos, bloqueadores dos receptores da angiotensina II, bloqueadores dos canais de cálcio, e betabloqueadores. A terapêutica pode incluir 1 fármaco (monoterapia), ou uma combinação desses (terapia combinada), como tática preferencial para a maioria dos pacientes com HAS (SBC, 2020; Al-Makki, 2021).

Entretanto, algumas drogas anti-hipertensivas não podem ser utilizadas como terapia para alguns pacientes em função da ocorrência de efeitos colaterais (Quadro 2) ou devido a aspectos de custo-efetividade. Os tratamentos não medicamentosos para HAS integram o padrão alimentar (dieta DASH, mediterrânea e semelhantes), perda de peso, restrição de sal, cessação do tabagismo, restrição de álcool, prática de exercícios físicos e controle do estresse, apesar desses métodos serem difíceis de se lograr e conservar. Recentemente, também têm sido exploradas algumas modalidades de terapia complementares não convencionais, envolvendo a musicoterapia, a espiritualidade e a respiração lenta guiada (SBC, 2020; Yu et al., 2021).

À vista do exposto, um quantitativo significativo de pacientes com HAS se beneficiaria de tratamentos mais eficazes e individualizados (SBC, 2020). Na população com HAS resistente, o controle efetivo da PA é uma problemática. Também, medicamentos anti-hipertensivos podem causar efeitos adversos. Assim, considerando as altas taxas de falha no controle pressórico, as possíveis reações adversas à terapia medicamentosa e a gravidade da doença e de suas comorbidades, considera-se de grande importância a obtenção de esforços em direção à descoberta de novas alternativas terapêuticas adjuvantes (Aldred, 2022).

Tabela 2: Efeitos colaterais de alguns medicamentos anti-hipertensivos comuns.

Anti-hipertensivos	Efeitos colaterais
Inibidores de enzima conversora de angiotensina	Tosse, edema angioneurótico, disfunção gastrointestinal, disfunção hepática.
Diurético	Distúrbio eletrolítico, elevação de colesterol, glicerídeos e ácido úrico sanguíneos, indução de diabetes mellitus.
Bloqueador de receptor β	Metabolismo lipídico anormal, mascaramento de sintomas de hipoglicemia, indução de asma brônquica, indução de depressão e piora da insuficiência cardíaca.
Bloqueador de íons de cálcio	Reação alérgica, dor de cabeça, erupção cutânea, edema, taquicardia.
Inibidor do receptor de Angiotensina II	Tonturas, hipercalemia, hipotensão, disfunção gastrointestinal e disfunção renal

Fonte: Chi *et al.*, 2023.
Abreviações: ECA, enzima conversora de angiotensina.

2.2 MICROBIOTA, EUBIOSE E DISBIOSE INTESTINAL

O termo "microbioma" diz respeito à imensidade de microrganismos que habitam em e dentro de um indivíduo (Aldred, 2022). Uma comunidade de microrganismos vivos (isto é, bactérias, vírus, fungos, leveduras e parasitas) no intestino humano é conhecida como MI, e corresponde a um quantitativo superior a 500 espécies bacterianas vivendo no sistema gastrointestinal humano. Majoritariamente, os filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* são responsáveis por aproximadamente 90% da população microbiana em condições de eubiose (Mahdavi-Roshan *et al.*, 2022).

Ao menos três "recintos" podem ser considerados na dinâmica de colonização da MI: luz intestinal, superfície epitelial e camada de muco. As bactérias anaeróbias, gênero predominante, habitam na mucosa intestinal. A formação e a manutenção da MI se dá por um processo complexo que pode ser afetado por vários fatores, como: presença de determinados genes e receptores, microbiota materna, via de parto, ambiente, idade, uso de antibióticos, utilização de prebióticos e probióticos, interações micróbio-micróbio e interações micróbio-hospedeiro (Barbosa *et al.*, 2010).

A MI pode interagir com moléculas advindas da alimentação, metabolizando-as para derivados que podem ser absorvidos pelo hospedeiro (Aldred, 2022) e com capacidade bioativa (p.ex., vitaminas, ácidos graxos de cadeia curta [AGCC], derivados de indol), que desempenham inúmeras

atividades, exercendo um papel crucial em diferentes aspectos fisiológicos, tais como na nutrição, no metabolismo e na função imune (Cicero *et al.*, 2021; Xiao; Harrison, 2020; Li; Liang; Qiao, 2022).

Por outro lado, um cenário de desequilíbrio, caracterizado por uma relação microbiana parasitária (ou não comensal), gera efeitos nocivos à saúde do hospedeiro a partir do envolvimento de vias de inflamação e de estresse oxidativo. A DI, definição clínica dada a esse desequilíbrio microbiano, ocorre quando há modificações qualitativas e quantitativas nos microrganismos intestinais, alterações em sua distribuição local e/ou em suas atividades metabólicas (Yoo *et al.*, 2020).

A DI favorece o crescimento demasiado de patógenos intestinais, desestabilizando a mucosa e suscitando uma potente cascata inflamatória. Determinados metabólitos podem comprometer a integridade da parede intestinal, permitindo a translocação de bactérias e de seus metabólitos para tecidos extra-intestinais (Bhatia *et al.*, 2022). Avanços recentes em tecnologias computacionais e métodos de sequenciamento genético (sequenciamento de última geração) vem aperfeiçoando os estudos e a análise da estrutura e função do ecossistema microbiano (Matijasic *et al.*, 2020). Um marcador comum descrito para a DI é a difusão da família *Enterobacteriaceae* anaeróbica facultativa, e a homeostase intestinal é designada pela proeminência de membros anaeróbios de *Bifidobacteriaceae* e *Firmicutes* (Yoo *et al.*, 2020).

Uma importante inter-relação entre a DI e o sistema imune no desenvolvimento de diversas doenças têm sido demonstrado. A DI incita a desregulação imunológica que, a posteriori, eleva o risco do desenvolvimento de doenças, incluindo a HAS, obesidade, diabetes mellitus, doenças cardiovasculares, doenças autoimunes, doenças infecciosas e doença inflamatória intestinal. Compreender o papel da DI humana como um denominador comum entre várias desordens clínicas é tido atualmente como um importante enfoque de pesquisa (Yoo *et al.*, 2020; Guo *et al.*, 2021).

2.3 DISBIOSE INTESTINAL E HIPERTENSÃO ARTERIAL

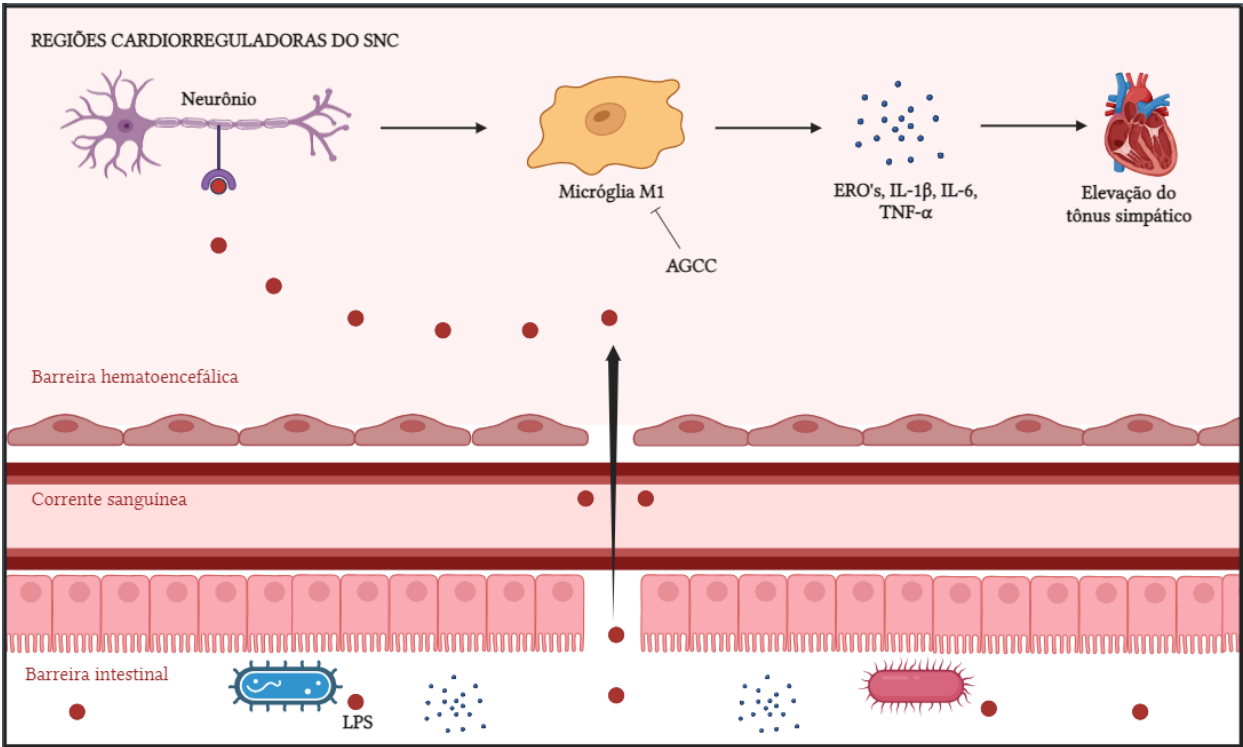
Evidências emergentes defendem que perfis bacterianos intestinais podem se tornar preditores de doenças, e que a modulação da MI pode ser uma estratégia promissora na prevenção e no tratamento de doenças cardiovasculares e metabólicas (Cicero *et al.*, 2021). O papel exercido pela MI no sistema imune e na progressão das doenças cardiometabólicas tem sido demonstrado em ensaios com camundongos *germ-free*. A ausência da MI pode conduzir ao desenvolvimento inadequado de tecidos linfóides associados ao intestino (do inglês, GALTs) e a anormalidades imunológicas centrais e sistêmicas (Sun *et al.*, 2022).

Animais *germ-free* são acompanhados por uma redução significativa na abundância de células B e células TH17, desequilíbrio das atividades TH1 e TH2 e ação prejudicada das células Treg (Sun *et al.*, 2022). A colonização com microrganismos oriundos da MI de roedores ou humanos acometidos por distúrbios cardiometabólicos conduziu ao desenvolvimento de complicações metabólicas em camundongos receptores, que incluiu ganho ponderal, HAS e resposta glicêmica disforme (Ratiner *et al.*, 2022).

Mecanismos diversos podem elucidar a relação existente entre a MI e a HAS. A translocação crônica de componentes da microbiota patogênica, em especial LPS, para a circulação sistêmica

conduzem a endotoxemia metabólica que, mesmo quando subclínica, associa-se a prejuízos cardiovasculares (Mahmoodpoor *et al.*, 2017). A elevação do tônus simpático no intestino na HAS pode desencadear disbiose microbiana, aumento da permeabilidade intestinal e elevação das reações inflamatórias, modificando uma variedade de bactérias intestinais sintetizadoras de AGCC e as concentrações plasmáticas de LPS. Em conjunto, esse quadro metabólico estimula a atividade simpática através da interação microbiota-micrógliia (Figura 2). O desfecho produzido é um aumento da inflamação central e periférica (Dai *et al.*, 2023).

Figura 2. Ilustração da ação do LPS nas regiões cardiorreguladoras do Sistema Nervoso Central. Linhas contínuas indicam promoção e linhas descontínuas indicam inibição.



Fonte: adaptado (Leow-Dyke *et al.*, 2012; Haspula; Clark, 2018; Sun *et al.*, 2022; Richards *et al.*, 2022).
Abreviações: LPS, lipopolissacarídeos; M1, micrógliia clássica; AGCC, ácidos graxos de cadeia curta; ERO, espécies reativas de oxigênio; IL-1β, interleucina- β; IL-6, interleucina-6; TNF-α, fator de necrose tumoral alfa.

O LPS ativa o receptor toll-like 4 (TLR4), principiando uma cascata de vias de sinalização inter-relacionadas, abrangendo: 1) Proteína Quinase Ativada por Mitógeno (MAPK) e fator nuclear kappa B (NF-κB), vias que conduzem à inflamação vascular e 2) Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase/Espécie reativa oxigenativa (ROS)/Caminho de óxido nítrico endotelial (eNOS), que conduz a disfunção endotelial (Grylls, Seidler, Neil; 2021) (Figura 3).

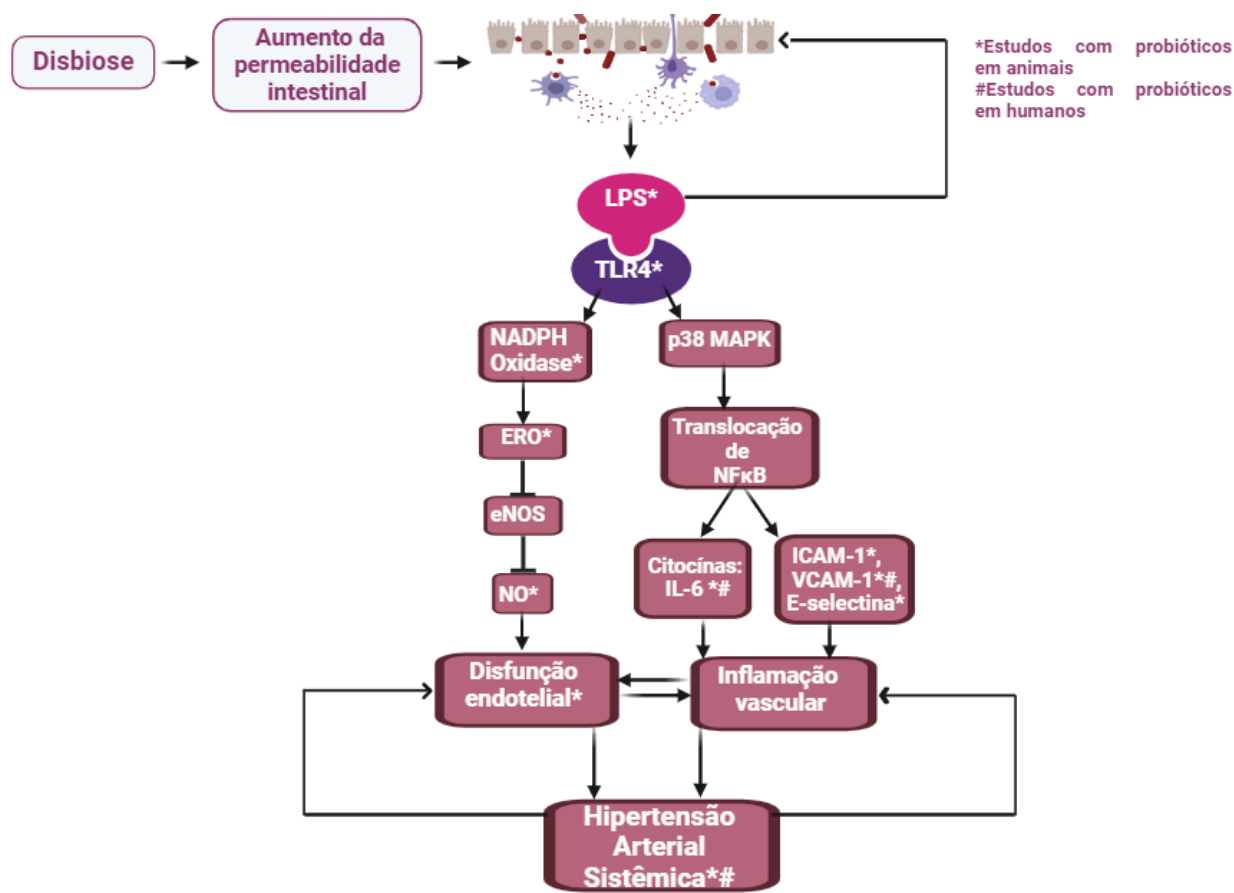
Os LPS's correspondem à classe de padrão molecular associado ao patógeno (do inglês Pathogen-associated molecular pattern ou PAMPs) mais bem estudada (Grylls; Seidler; Neil, 2021). São glicoproteínas procedentes da membrana da parede celular externa de bactérias gram-negativas, compostas por porções hidrofílicas e hidrofóbicas, capazes de suscitar respostas pró-inflamatórias no organismo hospedeiro (Bhatia *et al.*, 2022).

A administração venosa de LPS em ratos elevou a atividade de nervos esplênicos simpáticos para suscitar uma potente resposta inflamatória sistêmica (Carnagarin *et al.*, 2018). Vale destacar que a resposta inflamatória induzida por LPS, proveniente de diferentes bactérias, varia de acordo com alguns fatores, como a dieta, composição da MI, permeabilidade intestinal e

inflamação preexistente. Um exemplo é a diferença entre o LPS da *Escherichia Coli*, demasiadamente tóxico, e do *Bacteroides*, que é inofensivo (Candelli *et al.*, 2021).

As evidências do papel coadjuvante da inflamação na patogênese da HAS têm sido descritas há um pouco mais de meio século. Inicialmente, foi observado a presença de células imunes no endotélio vascular e nos rins de humanos com HAS. Marcadores biológicos de inflamação, como a proteína C-reativa de alta sensibilidade, elementos da via complementar e outras diversas citocinas são aumentadas em humanos com HAS, e as quimiocinas e seus receptores exibem papéis relevantes no tráfico de leucócitos na inflamação (Xiao; Harrison, 2020). Foi constatado que a ausência de MI em camundongos desempenha efeito protetor sobre a disfunção vascular e HAS induzida por angiotensina II, ao menos em parte, pela inibição da aglomeração vascular de células inflamatórias (Robles-Vera, Toral, Duarte; 2020).

Figura 3. Diagrama de mecanismo proposto. Linhas contínuas indicam promoção e linhas descontínuas indicam inibição.



Fonte: adaptado (Grylls; Seidler; Neil, 2021).
Abreviações: LPS, lipopolissacarídeos; TLR4, receptor toll-like; NADPH, Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida adenina; ERO, espécies reativas de oxigênio; eNOS, Óxido Nítrico Sintase Endotelial; NO, óxido nítrico; MAPK, Proteína Quinase Ativada por Mitógeno; NF-Kb, fator nuclear kappa B; IL-6, interleucina-6; ICAM-1, molécula de adesão intercelular 1; VCAM-1, molécula de adesão celular vascular 1.

Um meta-análise revelou que a PA e a inflamação foram significativamente atenuadas através de suplementação probiótica em indivíduos com diabetes mellitus do tipo 2, especialmente naqueles com idade ≤ 55 anos, índice de massa corporal (IMC) basal $<30 \text{ kg/m}^2$ e que receberam intervenção com multicepas probióticas em período de tratamento superior a 8 semanas (Liang *et al.*, 2020). Após intervenção com simbiótico contendo um total de 6×10^9 UFC de *Lactobacillus plantarum* PBS067, *Lactobacillus acidophilus* PBS066, *Lactobacillus reuteri* PBS072, frutooligossacarídeos e inulina, durante 8 semanas, as concentrações séricas de PCRus e TNF-alfa em idosos com síndrome metabólica reduziram-se significativamente (Cicero *et al.*, 2021).

Em outro estudo, foi observado redução das concentrações circulantes das citocinas pró-inflamatórias IL-8 e IL-12 com a administração durante 6 semanas de uma bebida adicionada de 20 bilhões de UFC de *Lactobacillus plantarum* 299v, em uma amostra de homens com doença arterial coronariana (Malik *et al.*, 2018). Um fenótipo inflamatório foi encontrado em uma população de brasileiros com HAS, onde uma relação TNF- α /IFN- γ estava aumentada, em comparação com o grupo controle normotenso. Além disso, mais de 50% dos indivíduos com HAS foram considerados como “altos produtores das citocinas” para IL-6 e TNF- α . No grupo com HAS, a diversidade alfa da MI estava diminuída, enquanto a relação *Firmicutes-Bacteroidetes* estava aumentada (Silveira-Nunes *et al.*, 2020).

As citocinas são pequenas proteínas de sinalização celular secretadas por variados tipos celulares. Essas exercem funções cruciais na regulação do sistema imune inato e adaptativo e no processo de inflamação. As citocinas agem nas células que as secretam (autócrinas) ou em células adjacentes (parácrinas), interagindo com receptores alvos na superfície celular e ativando cascatas de sinalização intracelulares que abrangem eventos de fosforilação e transcrição gênica. Podem ser agrupadas didaticamente em relação às suas principais ações como pró ou anti-inflamatórias. Em função do seu papel na regulação das respostas imunoinflamatórias, as citocinas são consideradas como potenciais alvos terapêuticos (Daroff; Aminoff *et al.*, 2014; Vitorino *et al.*, 2023).

Em ratos hipertensos, a abundância relativa do gênero *Bifidobacterium* foi significativamente associada com TNF- α , IL-6, IL-8 e Angiotensina II. Além disso, análise do mapa de calor de correlação demonstrou que a espécie *Bifidobacterium animalis* subsp. teve associação significativa com TNF- α , IL-6, IL-8 e Angiotensina II. Também, *Mycoplasma_sualvi* apresentou associação com IL-8 e *Brachybacterium paraconglomeratum* com Ang II (Zheng *et al.*, 2023). Em um estudo, adultos acometidos com síndrome metabólica apresentaram maior proporção do filo *Verrucomicrobia* após suplementação de *Lactobacillus reuteri* v3401 (5×10^9 UFC/dia). Contudo, não foi encontrado correlação significativa entre as proporções delta desse filo com os biomarcadores inflamatórios investigados (Tenorio-Jiménez *et al.*, 2019).

A HAS está também estreitamente relacionada com modificações no endotélio vascular. Pacientes com HAS manifestam comprometimento da vasodilatação associada ao endotélio, com prejuízo das funções normais. Essas alterações mitigam a sensibilidade do tecido endotelial a estímulos autócrinos e parácrinos conduzindo, a princípio, a uma resposta adaptativa que, com o tempo, predispõe a um aumento no risco ou na instalação da doença. Assim, o olhar em prol do manejo da disfunção endotelial é essencial na terapêutica de indivíduos com HAS (Maiuonolo *et al.*, 2022).

A disfunção endotelial ocorre em decorrência ao aumento da agregação plaquetária, à formação de citocinas e à adesão de leucócitos à camada subendotelial. Tal adesão é mediada pela molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) (Haghighat *et al.*, 2019), que podem ser avaliadas também pela presença de um fenótipo inflamatório endotelial e sistêmico (Malik *et al.*, 2018). Presentes naturalmente nas células do endotélio vascular, essas moléculas possuem sua expressão aumentada por citocinas inflamatórias, que induzem à agregação de leucócitos nos vasos sanguíneos que, por sua vez, estão envolvidos no processo de formação de placas ateroscleróticas (Lawson; Wolf, 2009; Carr, 2021).

Outro mecanismo relativo à interação entre a MI e a HAS é o maior potencial de propensão ao desenvolvimento de HAS pelo impacto de modificações na composição da MI advindos de uma ingestão aumentada de sal dietético, o qual tem sido associado ao acúmulo de células TH₁₇ pró-inflamatórias. Além do sódio, outros constituintes dietéticos são descritos com potencial para repercutir na PA, em parte por meio de efeitos no microbioma, como os padrões dietéticos ricos em legumes, frutas e fibras (Harrison; Coffman; Wilcox, 2021).

A fibra dietética possui a capacidade de induzir um aumento na massa bacteriana intestinal responsável pela síntese de AGCC através da fermentação. Foi observado que os AGCC, da circulação sanguínea, são oriundos quase que puramente de origem microbiana, demonstrando a importância de uma adequada produção desses via bactérias simbióticas intestinais (Harrison; Coffman; Wilcox, 2021). A DI relacionada à HAS é caracterizada também por uma redução na microbiota produtora de butirato e acetato e um aumento nas bactérias que sintetizam lactato. A elevação da produção bacteriana de AGCC tem sido correlacionada a um quantitativo menor de células imunes CD4⁺ circulantes e seus efeitos anti-hipertensivos foram inerentes a Treg (Robles Vera *et al.*, 2020).

2.4 ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICOS NA HIPERTENSÃO ARTERIAL

Os estudos em modelos animais e humanos que avaliaram a suplementação de probióticos na HAS investigaram sua ação em diferentes desfechos, como nos níveis de PA (Gómez-Gúzman *et al.*, 2015), na composição corporal (Sharafedtinov *et al.*, 2013), na glicemia e no perfil lipídico (Romão da Silva *et al.*, 2020) e na atividade simpática (Silva-Cutini *et al.*, 2019). Entretanto, em relação a análise específica da inflamação na HAS, apenas estudos *in vivo* em animais foram realizados (Lin *et al.*, 2012; Total *et al.*, 2018; de Almeida Silva *et al.*, 2020; Robles-Vera *et al.*, 2020; Yuan *et al.*, 2022). Além disso, observa-se que alguns estudos publicados na literatura sobre o tema não identificaram e/ou relataram a cepa empregada, dificultando ainda mais a análise dos efeitos e da eficácia da administração de probióticos nessa população (Lin *et al.*, 2012; de Almeida Silva *et al.*, 2020).

Dentre os ensaios que avaliaram a inflamação em animais com HAS submetidos a suplementação com probióticos, Robles-Vera *et al.*, (2020) encontraram melhora na relação Th17/Treg e no vasorelaxamento da veia aorta torácica de ratos após suplementação com 10⁹ UFC de *Bifidobacterium breve* CECT7263, diariamente durante cinco semanas, além de efeito inibidor no aumento da PAS, melhora da morfologia do cólon, elevação da massa bacteriana produtora de acetato e normalização da endotoxemia por trimetilamina. Em outra pesquisa, a administração de *Lactobacillus fermentum* CECT5716 (10⁹ UFC/dia) demonstrou prevenir a DI, a inflamação e o estado oxidativo vascular, reduzir a razão Th17/Treg e melhorar brandamente a disfunção endotelial após tratamento de 4 semanas em ratos induzidos à HAS (Robles-Vera *et al.*, 2018).

Uma amplificação do olhar científico ao estudo do endotélio dá-se pelo fato que alterações celulares endoteliais, que conduz a disfunção endotelial, encontram-se estreitamente relacionadas à acentuação do risco de doenças cardiovasculares. As modificações associadas à desordem funcional endotelial são agentes do remodelamento vascular e incitação de eventos inflamatórios e trombóticos, que se constituem indícios clínicos precoces do desenvolvimento de aterosclerose,

condição clínica atrelada a fisiopatologia das doenças cardiovasculares na HAS, inferindo-se, assim, a importância do desenvolvimento de terapêuticas cardioprotetoras nesta população de pacientes (Szulińska *et al.*, 2018; Bondjers *et al.*, 1991).

Nesse sentido, Klippel *et al.*, (2016) avaliaram os efeitos da administração de leite integral fermentado com grãos de kefir contendo bactérias benéficas (como *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Acetobacter aceti*, etc) e leveduras, com uma contagem microbiana total de $7,5 \times 10^7$ UFC/mL, durante 60 dias, em ratos com HAS. Foi observado melhora estrutural endotelial e da disfunção do endotélio via análise da resposta de vasorelaxamento da fração aórtica torácica e do equilíbrio adquirido entre espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico. Em consonância, Gómez-Gúzman *et al.*, (2015) observaram efeitos cardioprotetores por meio de mecanismos anti-inflamatórios e antioxidantes, além de redução da PAS, em roedores com HAS suplementados por 5 semanas com *Lactobacillus fermentum* ou *L. coryniformis* associado ao *L. gasseri* (3.3×10^{10} UFC/dia).

Em pacientes com síndrome metabólica, o consumo de kefir por 12 semanas diminuiu as concentrações séricas de homocisteína e de IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α em comparação ao valor de base, mas não com o grupo controle. A complexa regulação das citocinas e a estimulação da síntese de IL-10 com TNF- α poderia explicar a redução também da IL-10, uma citocina anti-inflamatória (Bellikci-Koyu *et al.*, 2022). Uma pesquisa encontrou evidências de efeito anti-inflamatório central em núcleos cardioreguladores, com redução da densidade das citocinas TNF- α e IL-6 nestes sítios, redução do aumento da PA, reversão parcial de alterações fisiopatológicas de integridade de barreira intestinal e normalização das concentrações séricas de LPS após tratamento com leite fermentado com grãos de kefir durante 8 semanas em ratos espontaneamente hipertensos (de Almeida Silva *et al.*, 2020).

O comprometimento de barreira intestinal é uma condição observada em pacientes com HAS, que pode conduzir a exposição sistêmica a patógenos, antígenos e endotoxinas luminiais, desencadeando um quadro de inflamação crônica. Essa inflamação é acompanhada por concentrações aumentadas de citocinas imuno-inflamatórias, abarcando variados tipos celulares e fatores secretados em complexos processos fisiológicos e patológicos, comportando-se como fator de risco e complicador da hipertensão e de danos a órgãos-alvo (Wu *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2023). Os LPSs são exemplos dessas endotoxinas microbianas, advindas da parede celular de bactérias, que podem incitar receptores sistêmicos semelhantes à *toll*, levando à inflamação crônica de baixo grau e agravando a HAS (Robles-Vera *et al.*, 2020).

Ainda com estudos realizados em modelo animal, Chen *et al.*, (2014) encontraram reduções significativas na PA de roedores com HAS, mas não em normotensos, após a ingestão durante 7 semanas de leite fermentado com uma cepa de *L. helveticus* (IMAU60208). Os possíveis mecanismos apontados pelos autores para esse efeito foi a inibição da enzima conversora de angiotensina, observada previamente *in-vitro*, e a presença de peptídeos bioativos anti-hipertensivos, nomeadamente isoleucina-prolina-prolina e valina-prolina-prolina.

Em outro ensaio, a administração de leite fermentado com kefir (180 ml/dia) normalizou a frequência cardíaca, reduziu a PA, melhorou a hipertrofia cardíaca (relação de peso do ventrículo esquerdo/peso corpóreo), função cardíaca (redução da PA sistólica do ventrículo esquerdo), contratilidade cardíaca (redução de proteínas contráteis) e da atividade simpática via redução de

estímulo de áreas cardiorreguladoras do sistema nervoso central (Silva-Cutini *et al.*, 2019). A redução da PA, da dislipidemia e da atividade simpática (avaliação da variabilidade cardíaca) foi observada com a suplementação de *L. fermentum* 296 (10^9 UFC/mL), durante 4 semanas, em ratos machos expostos à dieta hiperlipídica (Cavalcante *et al.*, 2019).

O sistema nervoso simpático assume importante função no controle da PA, e uma elevação na atuação desse sistema tem sido envolvida como precursora primária do desenvolvimento da HAS (Delalio; Sved; Stocker, 2020). Um aumento na atividade nervosa simpática para o intestino pode levar a prejuízos na permeabilidade por alteração de proteínas de junção intestinal. Robles-vera *et al.*, (2021) observaram uma regulação negativa na expressão gênica de ocludina, zônula ocludina e mucina no cólon de ratos hipertensos, quando comparado a ratos saudáveis. Havia também um aumento significativo na endotoxemia plasmática e do RNA mensageiro de IL-6, TNF- α e tiroxina hidroxilase em ratos hipertensos *versus* ratos saudáveis. A tirosina hidroxilase é uma enzima essencial na geração de noradrenalina, e sua maior expressão colônica sugere aumento do tônus simpático para o intestino.

Também objetivando avaliar desfechos cardiovasculares, um estudo administrou iogurte fermentado com cepas de *L. acidophilus*, *L. delbrueckii subsp. lactis* e *L. gasseri*, sabidamente rico em γ -aminobutírico, durante 8 semanas, em ratos com HAS. Foi observado inibição da hipertrofia cardíaca associado à redução dos níveis de fatores hipertróficos, quando comparado ao grupo controle normotenso. A hipertrofia cardíaca é uma condição comum em pacientes com HAS e é considerada um fator de risco importante para eventos cardíacos (Lin *et al.*, 2012).

Um ensaio que aplicou intervenção com iogurte probiótico, contendo *Streptococcus thermophiles* (6.1×10^8 UFC/ml) e *Lactobacillus bulgaricus* ($4,8 \times 10^8$ UFC/ml), durante 7 semanas, encontrou atenuação no aumento da PA, da fibrose e da frequência cardíaca em ratos com HAS. A intervenção também normalizou a DI, danos a estrutura colônica e elevou a massa bacteriana produtora de AGCC, como *Roseburie* e *Streptococcus* (Kong *et al.*, 2021).

Similarmente, um estudo descritivo em humanos com HAS mostrou que bactérias produtoras de AGCC, como *Faecalibacterium prausnitzii* e *Roseburia* estavam menos abundantes nesta população, enquanto que táxons patogênicos oportunistas, como *Klebsiella* e *Parabacteroides merdae* estavam mais amplamente distribuídos (Takagi *et al.*, 2020).

A literatura disponível de estudos *in vivo*, abordando os efeitos da administração de probióticos especificamente em humanos com HAS é, até o momento, bastante limitada. Quando comparado com o grupo controle, uma redução significativa no IMC, mas não na PA, foi observada após intervenção composta por dieta hipocalórica associada a 50 g de queijo probiótico com *L. plantarum*. O grupo controle foi submetido a dieta hipocalórica associada a queijo padrão. Nesse estudo, também não houve diferenças na massa adiposa e muscular (Sharafedtinov *et al.*, 2013). Por outro lado, uma redução na PA, mas não na antropometria, com a administração de leite fermentado contendo *S. cerevisiae* e *L. helveticus* (2.5×10^9 e 7.0×10^{11} /L, respectivamente), foi observada em uma amostra de idosos com HAS (Hata *et al.*, 1996).

Em um estudo de coorte com seguimento de 5 anos, também realizado com idosos, foi visto que um consumo igual ou superior a 3 porções de produtos lácteos fermentados por semana atuou como um fator de proteção para o desenvolvimento de HAS, quando comparado a um consumo inferior a 3 porções (6,1 vs 14,2%, $P < 0,05$) (Aoyagi *et al.*, 2017). Por fim, uma melhora

significativa em marcadores de glicemia, dislipidemia e de regulação autonômica foi obtida após suplementação por 8 semanas com coquetel probiótico composto por *L. para casei* LPC-37, *L. rhamnosus* HN001, *L. acidophilus* NCFM e *B. Lactis* HN019 (10^9 UFC/cepa) em mulheres adultas com HAS. Todavia, não houve diferença significativa na redução da PA (Romão da Silva *et al.*, 2020).

Ao explorar a literatura publicada até o presente momento acerca da intervenção com probióticos na HAS, observa-se que existem limitações relativas à elevada heterogeneidade entre os estudos, fruto de diferenças a nível metodológico, de tamanhos amostrais, dos probióticos utilizados e do período de tratamento aplicado. Dentre essas limitações, pode-se destacar a dessemelhança entre os tipos de probióticos empregados nos estudos (Chi *et al.*, 2020). Uma vez que é reconhecido que os modos de ação e eficácia são singulares a cada tipo de cepa probiótica, as evidências científicas sobre o tema devem ser julgadas para cada tipo de probiótico, individualmente (Mcfarland, 2014).

Considerando o exposto, infere-se a necessidade da realização de mais ensaios clínicos randomizados para ratificar ou refutar os efeitos benéficos dos probióticos sobre aspectos clínicos em pacientes com HAS.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba (HULW/UFPB), João Pessoa, Brasil (Protocolo número 58276916.2.0000.5183). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os padrões éticos da instituição, conduzidos de acordo com Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde e Declaração Internacional de Helsinque. Depois que os pacientes forneceram o consentimento informado por escrito, foram submetidos à triagem para realização dos procedimentos. O ensaio clínico foi registrado no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBEC) com identificação RBR-9mj2dt.

3.2 Local de realização e recrutamento

Este ensaio utilizou para análise as amostras sanguíneas coletadas em um outro estudo realizado pelo mesmo grupo de pesquisa (Romão da Silva *et al.*, 2020), vinculado ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição (UFPB), com o objetivo de avaliar parâmetros bioquímicos e associações previamente não analisadas. Mulheres diagnosticadas previamente com HAS, encaminhadas ao Ambulatório de Cardiologia e Nutrição do HULW, entre março de 2018 e março de 2019, foram incluídas na triagem. Os critérios de inclusão foram os seguintes: mulheres adultas com diagnóstico médico de HAS há mais de 1 ano. Não foram elegíveis: gestantes e lactantes, distúrbios metabólicos (com exceção de diabetes mellitus do tipo 2), tabagismo, história de insuficiência renal/diálise, doenças cardíacas, acidente vascular cerebral, doenças autoimunes, uso de medicamentos durante todo o período do estudo (com a exceção de farmacoterapia para hipertensão arterial ou diabetes mellitus), ingestão de antibióticos dentro de um mês antes do estudo e a presença de outras condições médicas que comprometeriam o cumprimento do protocolo. Quarenta mulheres foram randomizadas e incluídas no estudo.

3.3 Desenho do estudo

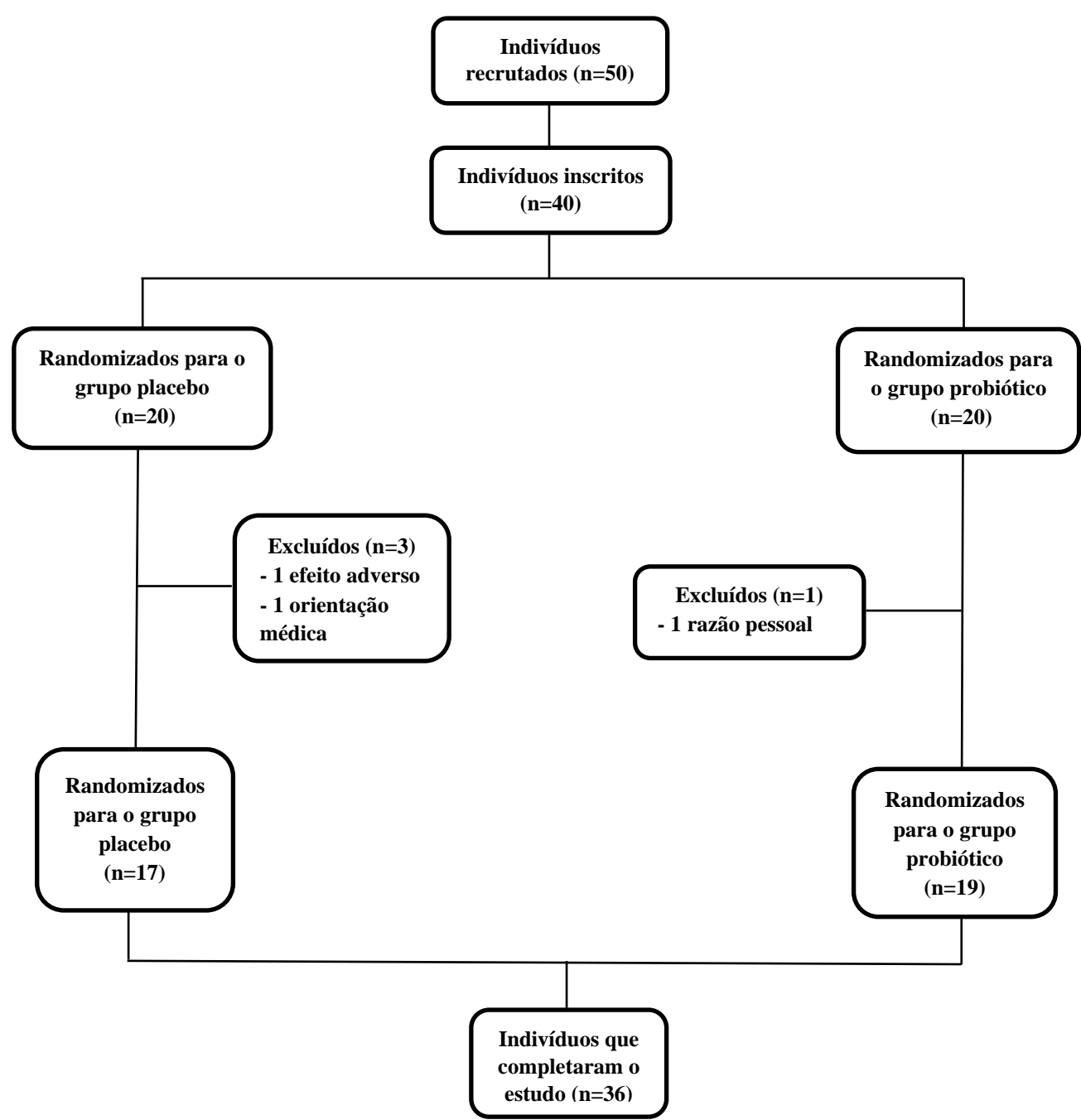
Este estudo foi desenhado como um estudo triplo-cego, randomizado e controlado por placebo. Foi utilizado as amostras sanguíneas de soro de um estudo publicado previamente (Romão da Silva *et al.*, 2020) para realizar novas análises bioquímicas e associações estatísticas.

Um total de 40 mulheres (amostragem por conveniência via demanda espontânea) foram randomizadas de modo triplo-cego em 2 grupos: probiótico (n=20) ou placebo (n=20). 19 mulheres no grupo probiótico e 17 mulheres no grupo placebo completaram o estudo e foram consideradas para análise estatística (Figura 3). No grupo probiótico, as participantes foram instruídas a ingerir diariamente, durante 8 semanas, um sachê de Probiatop® (lotes 70086 / 1608221 - figura 4), um coquetel probiótico composto por *Lactobacillus para casei* LPC-37, *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lactobacillus acidophilus* NCFM e *Bifidobacterium lactis* HN019 na dosagem de 10^9 UFC de cada linhagem (1 g/dia), que foram fornecidos pela FarmaQuímica (Barra da Tijuca, Rio de

Janeiro, Brasil). O grupo placebo recebeu sachê idêntico com povidexose (1g/d), durante o mesmo período de intervenção.

Todas as participantes foram orientadas a consumir o sachê antes de dormir, dissolvendo o conteúdo em um copo (200 mL) de água em temperatura ambiente. As participantes foram orientadas a não alterarem a sua rotina de atividade física e dietas habituais, bem como de relatarem quaisquer efeitos colaterais, além de continuarem fazendo uso de seus medicamentos anti-hipertensivos. A adesão ao tratamento foi monitorada pela contagem de sachês distribuídos e, por ventura, devolvidos, em relação a consulta anterior.

Figura 4: Fluxograma do desenho do estudo



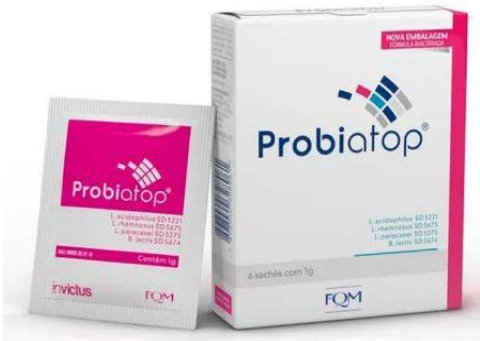
Fonte: Autoria própria (2024)

3.4 Amostras de sangue e medições bioquímicas

As amostras de sangue foram coletadas com os indivíduos em jejum de 12 horas e sem terem ingerido bebidas alcoólicas nas 72 horas prévias ao exame. As amostras (cegas) foram imediatamente armazenadas em -80 °C até o momento de serem analisadas. Neste estudo, foi

avaliado as concentrações séricas das citocinas inflamatórias: Interleucina 2 (IL-2), Interleucina 4 (IL-4), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 10 (IL-10), Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF), Interferon gama (IFN- γ) e Interleucina 17 (IL-17A). Os biomarcadores foram analisados por citometria de fluxo (Kit BD™ cytometric bead array (CBA) human Th1/Th2/Th17 cytokine kit (Biosciences, San Jose, CA 95131), de acordo com as instruções do fabricante.

Figura 5: Probiótico utilizado no grupo intervenção (formato comercial).

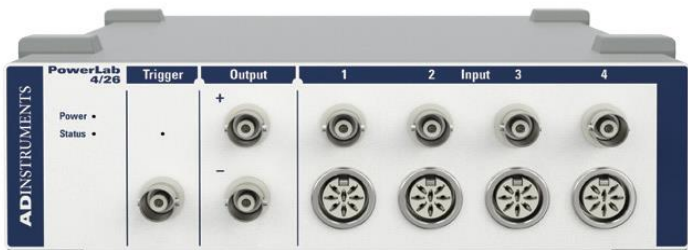


Fonte: Google Imagens (2024).

3.5 Associação com dados de variabilidade da frequência cardíaca

Conforme realizado previamente com a amostra do presente estudo (Romão da Silva *et al.*, 2020), as medições de ECG foram registradas durante 10 minutos. O ECG modelo 26T-LTS (ADinstruments®, Bella Vista, NSW, Austrália) foi utilizado e os registros foram feitos com a configuração de 5 eletrodos através do LabChart®, software de aquisição de dados (ADinstruments®, Bella Vista, NSW, Austrália – Figura 6). ECG foi definido a uma taxa de amostragem de 1 KHz, faixa de 2 milivolts usando um filtro digital de 50 Hz. Todos os dados foram exportados e analisados às cegas por um pesquisador treinado independente usando o software LabChart 8. As gravações de ECG foram processadas por software de computador (módulo de análise de ECG para LabChart Pro; ADInstruments) para detecção automática das ondas R e cálculo batimento a batimento do intervalo RR. Para detecção de ECG, 80 ms (milissegundos) foi usado para determinar a largura típica do QRS e para ondas R com pelo menos 300 ms de intervalo. A frequência cardíaca (FC) e as seguintes medidas de análise de VFC foram determinadas.

Figura 6: Modelo de ecocardiograma utilizado na avaliação da VFC.



Fonte: Google Imagens (2024).

1) Parâmetros do domínio de tempo: intervalo R-R médio, desvio padrão entre a duração de intervalos RR (SDRR), a raiz quadrada da média da soma dos quadrados das diferenças sucessivas

entre batimentos adjacentes normais a normais (RMSSD) e o número de pares de intervalos de batimentos normal a normal sucessivos que diferiram em 50 ms (pRR50);

2) Parâmetros de domínio de frequência: banda de baixa frequência (LF) (de 0,04 a 0,15Hz) e banda de alta frequência (HF) (de 0,15 a 0,40 Hz) e a relação LF/HF. A potência de 240 de cada componente espectral foi calculada em unidades normalizadas (un);

3) Parâmetros não lineares (SD1 e SD2). Gráficos de dispersão de Poincaré foram construídos e investigados como uma ferramenta não linear, incluindo os eixos transversais (SD1, um indicador de atividade parassimpática) e os eixos longitudinais (SD2, uma função de atividade simpática e vagal).

3.6 Análise estatística

Os valores foram descritos como média (intervalo de confiança de 95%) para dados paramétricos ou mediana (máximo-mínimo) para dados não paramétricos. A normalidade dos dados foi avaliada por meio do teste Shapiro-Wilk. As comparações entre os grupos probióticos e placebo no início do estudo foram testadas usando o teste t não pareado para dados paramétricos e o teste de Mann-Whitney para dados não paramétricos. O teste t pareado, para os dados paramétricos, ou o teste Wilcoxon, para dados não paramétricos, foram utilizados para analisar diferenças entre os valores iniciais e finais. As relações entre citocinas e variáveis de VFC foram analisadas pelo teste de correlação de Spearman. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi $<0,05$. A análise estatística foi realizada utilizando o Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

4. RESULTADOS

Os resultados e discussões desta dissertação estão descritos sob a forma de artigo científico, em apêndice A. Este estudo objetivou investigar se a terapia adjuvante com probióticos é capaz de reduzir a inflamação em mulheres com HAS e analisar se há correlação de biomarcadores inflamatórios com parâmetros de função autonômica cardíaca nessa população. O artigo fruto dessa dissertação, intitulado “Effects of probiotic administration on inflammatory biomarkers and its associations with cardiac autonomic function in women with arterial hypertension: A secondary analysis of a randomized, triple-blind, placebo-controlled trial” foi submetido na revista *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, que possui fator de impacto de 5.2 e avaliação qualis A4, onde se encontra nesse momento em processo de avaliação por pares.

Resumidamente, o presente estudo revelou que a administração de um mix composto por 4 cepas de bactérias probióticas (10^9 por cepa), nomeadamente: *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus para casei* LPC-37, *Lactobacillus rhamnosus* HN001 e *Bifidobacterium lactis* HN019, durante 8 semanas, em mulheres adultas diagnosticadas com HAS reduziu de modo significativo as concentrações séricas de IFN- γ e aumentou as concentrações séricas de IL-17A, quando comparado aos valores basais. As concentrações séricas de IL-10 elevaram-se significativamente após a ingestão de probióticos ou placebo, sendo esse aumento mais proeminente no grupo probiótico *versus* grupo placebo ($p < 0.05$). A administração de intervenção ou placebo reduziram os valores séricos de IL-2 e IL-4 após 8 semanas. Não houve diferenças significativas intragrupos ou intergrupos nas concentrações de IL-6 e TNF- α .

Nesse trabalho também analisamos a existência de correlação entre os valores de citocinas séricas e medidas da VFC, obtendo-se associações discretas a moderadas entre alguns dos parâmetros avaliados. IL-6 apresentou correlação positiva com SD2/SD1 (razão entre os eixos longitudinais e eixos transversais) e correlação negativa com RMSSD (Raiz quadrada da média da soma dos quadrados das diferenças sucessivas entre batimentos adjacentes normais a normais) e SD1. Uma associação linear foi encontrada entre IFN- γ com FC (frequência cardíaca), LF (low frequency) em un (unidades normalizadas), LF/HF (razão entre a banda de baixa frequência e de alta frequência) e SD2/SD1, e uma correlação inversa com HF (un). Contrariamente, IL-10 expressou uma correlação positiva com HF (un) e negativa com FC, LF (un), LF/HF e SD2/SD1. Ainda, IL-4 mostrou uma correlação negativa com SDRR (desvio padrão entre a duração de intervalos RR), RMSSD, pRR50 (número de pares de intervalos de batimento normal a normal sucessivos que diferiram em 50 ms), SD1 e SD2.

Pode-se concluir que a suplementação de um mix de coquetel probióticos em mulheres com HAS pode reduzir biomarcadores circulantes pró-inflamatórios de inflamação sistêmica e aumentar biomarcadores anti-inflamatórios. Além disso, foi observado uma correlação linear entre inflamação e função autonômica na amostra total de mulheres diagnosticadas com HAS. Assim, essa terapia adjuvante pode ser benéfica na prevenção de complicações da HAS que envolvem o componente inflamação.

REFERÊNCIAS

- ALDRED, M. A. Food for Thought: The emerging role of intestinal microbiota in pulmonary arterial hypertension. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 66, n. 4, p. 361–362, 1 abr. 2022.
- AL-MAKKI, A. et al. Hypertension pharmacological treatment in adults: A World Health Organization guideline executive summary. **Hypertension**, v. 79, n. 1, 15 nov. 2021.
- AOYAGI, Y. *et al.* Habitual intake of fermented milk products containing *Lactobacillus casei* strain Shirota and a reduced risk of hypertension in older people. **Beneficial Microbes**, v. 8, n. 1, p. 23–29, 7 fev. 2017.
- BARBOSA, F. H. F. et al. Microbiota indígena do trato gastrointestinal. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 10, n. 1, p. 78–93, 2010.
- BARROSO, W. K. S. et al. Diretrizes brasileiras de hipertensão arterial – 2020. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 116, n. 3, p. 516–658, 25 mar. 2021.
- BELLIKCI-KOYU, E. *et al.* Probiotic kefir consumption improves serum apolipoprotein A1 levels in metabolic syndrome patients: a randomized controlled clinical trial. **Nutrition Research**, v. 102, p. 59–70, 1 jun. 2022.
- BERNINI, L. J. *et al.* Beneficial effects of *Bifidobacterium lactis* on lipid profile and cytokines in patients with metabolic syndrome: A randomized trial. Effects of probiotics on metabolic syndrome. **Nutrition**, v. 32, n. 6, p. 716–719, jun. 2016.
- BHATIA, R. *et al.* Lactic acid bacterial supplementation ameliorated the lipopolysaccharide-induced gut inflammation and dysbiosis in mice. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 13 jun. 2022.
- BONDJERS, G. *et al.* Hypertension and atherosclerosis. Cause and effect, or two effects with one unknown cause? **Circulation**, v. 84, n. 6 Suppl, p. VI2-16, 1 dez. 1991.
- BRYAN, W. et al. ESC/ESH 2018. Guidelines for the management of high blood pressure: Task Force on the management of high blood pressure of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Hypertension (ESH). **European Heart Journal**, v. 39, Ed.33, 01, Pág 3021-3104, 2018.
- CANALE, M. P. et al. Gut dysbiosis and western diet in the pathogenesis of essential arterial hypertension: a narrative review. **Nutrients**, v. 13, n. 4, p. 1162, 1 abr. 2021.
- CANDELLI, M. *et al.* Interaction between Lipopolysaccharide and Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 12, p. 6242, 10 jun. 2021.
- CARNAGARIN, R. *et al.* The bidirectional interaction between the sympathetic nervous system and immune mechanisms in the pathogenesis of hypertension. **British Journal of Pharmacology**, v. 176, n. 12, p. 1839–1852, 25 set. 2018.
- CARR, R. M. VCAM-1: closing the gap between lipotoxicity and endothelial dysfunction in nonalcoholic steatohepatitis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 131, n. 6, 15 mar. 2021.
- CAVALCANTE, R. G. S. *et al.* The probiotic *Lactobacillus fermentum* 296 attenuates cardiometabolic disorders in high fat diet-treated rats. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 29, n. 12, p. 1408–1417, dez. 2019.
- CHEN, Y. *et al.* Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of *Lactobacillus helveticus* strains from traditional fermented dairy foods and antihypertensive effect of fermented milk of strain H9. **Journal of dairy science**, 97(11), 6680–6692. 2014.
- CHEN, Z. *et al.* Probiotics: functional food ingredients with the potential to reduce hypertension. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, 3 jul. 2023.
- CHI, C. *et al.* Effects of probiotics on patients with hypertension: a systematic review and meta-analysis. **Current Hypertension Reports**, v. 22, n. 5, p. 34, 21 mar. 2020.
- CICERO, A. F. G. *et al.* Impact of a short-term synbiotic supplementation on metabolic syndrome and systemic inflammation in elderly patients: a randomized placebo-controlled clinical trial. **European Journal of Nutrition**, v. 60, n. 2, p. 655–663, 1 mar. 2021.
- DAI, Y. *et al.* Unraveling mechanistic insights into the role of microbiome in neurogenic hypertension: A comprehensive review. **Pathology - Research and Practice**, v. 249, p. 154740, 1 set. 2023.
- DAROFF, R. B, AMINOFF, M. J. Encyclopedia of the neurological sciences. **Academic press**. 2014.

DA SILVA, M. G. et al. Bioactive natural products against systemic arterial hypertension: A past 20-year systematic and prospective review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, v. 2022, p. 8499625, 2022.

DE ALMEIDA SILVA, M. et al. Kefir ameliorates hypertension via gut-brain mechanisms in spontaneously hypertensive rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 77, p. 108318, 1 mar. 2020.

DELALIO, L. J.; SVED, A. F.; STOCKER, S. D. Sympathetic Nervous System Contributions to Hypertension: Updates and Therapeutic Relevance. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 36, n. 5, p. 712–720, maio 2020.

DEL PINTO, R. et al. Arterial hypertension and the hidden disease of the eye: Diagnostic tools and therapeutic strategies. **Nutrients**, v. 14, n. 11, p. 2200, 25 maio 2022.

DE LUNA FREIRE, M. O. et al. effects of a mixed *Limosilactobacillus fermentum* formulation with claimed probiotic properties on cardiometabolic variables, biomarkers of inflammation and oxidative stress in male rats fed a high-fat diet. **Foods**, v. 10, n. 9, p. 2202, 17 set. 2021.

DE LUNA FREIRE, M. O. et al. *Limosilactobacillus fermentum* strains with claimed probiotic properties exert anti-oxidant and anti-inflammatory properties and prevent cardiometabolic disorder in female rats fed a high-fat diet. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 15, n. 3, p. 601–613, 1 jun. 2023.

FREY, L.; MENON, C.; ELGENDI, M. Blood pressure measurement using only a smartphone. **Digital Medicine**, v. 5, n. 1, 6 jul. 2022.

GÓMEZ-GUZMÁN, M. et al. Antihypertensive effects of probiotics *Lactobacillus* strains in spontaneously hypertensive rats. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 59, n. 11, p. 2326–2336, 1 nov. 2015.

GRYLLS, A.; SEIDLER, K.; NEIL, J. Link between microbiota and hypertension: Focus on LPS/TLR4 pathway in endothelial dysfunction and vascular inflammation, and therapeutic implication of probiotics. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 137, p. 111334, maio 2021.

GUO, Y. et al. Gut microbiota dysbiosis in human hypertension: a systematic review of observational studies. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 8, 14 maio 2021.

HAGHIGHAT, N. et al. Effect of synbiotic and probiotic supplementation on serum levels of endothelial cell adhesion molecules in hemodialysis patients: a randomized control study. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 11, n. 4, p. 1210–1218, 6 out. 2018.

HARRISON, D. G.; COFFMAN, T. M.; WILCOX, C. S. Pathophysiology of hypertension. **Circulation Research**, v. 128, n. 7, p. 847–863, 2 abr. 2021.

HASPULA, D.; CLARK, M. A. Neuroinflammation and sympathetic overactivity: Mechanisms and implications in hypertension. **Autonomic Neuroscience**, v. 210, p. 10–17, mar. 2018.

HATA, Y. et al. A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 64, n. 5, p. 767–771, 1 nov. 1996.

HERING, D.; TRZEBSKI, A.; NARKIEWICZ, K. Recent advances in the pathophysiology of arterial hypertension - potential implications for clinical practice. **Polish Archives of Internal Medicine**, 1 mar. 2017.

HILL, C. et al. 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, n. 8, p. 506–14, 2014.

KHALESI, S. et al. A review of probiotic supplementation in healthy adults: helpful or hype? **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 1, p. 24–37, 26 mar. 2018.

KIM, H.-N. et al. Correlation between gut microbiota and personality in adults: A cross-sectional study. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 69, p. 374–385, mar. 2018.

KLIPPEL, B. F. et al. effects of kefir on the cardiac autonomic tones and baroreflex sensitivity in spontaneously hypertensive rats. **Frontiers in Physiology**, v. 7, p. 211, 2016.

KONG, C.Y. et al. Probiotic yogurt blunts the increase of blood pressure in spontaneously hypertensive rats via remodeling of the gut microbiota. **Food Funct.** 19;12(20):9773-9783, 2021.

LAWSON, C.; WOLF, S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. **Pharmacological Reports**. 61(1):22-32, 2009.

LEOW-DYKE, S. et al. Neuronal toll-like receptor 4 signaling induces brain endothelial activation and neutrophil transmigration in vitro. **Journal of Neuroinflammation**, v. 9, n. 1, 3 out. 2012.

LIANG, T. et al. Probiotics supplementation improves hyperglycemia, hypercholesterolemia, and hypertension in type 2 diabetes mellitus: An update of meta-analysis. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 61, n. 10, p. 1670–1688, 21 maio 2020.

LI, C.; LIANG, Y.; QIAO, Y. Messengers from the gut: Gut microbiota-derived metabolites on host regulation. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 22 abr. 2022.

LI, J. et al. Gut microbiota dysbiosis contributes to the development of hypertension. **Microbiome**, v. 5, n. 1, 1 fev. 2017.

LIN, P.P. et al. Inhibition of cardiac hypertrophy by probiotic-fermented purple sweet potato yogurt in spontaneously hypertensive rat hearts. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 30, n. 6, p. 1365–1375, 1 dez. 2012.

LI, X. et al. Effect of synbiotic supplementation on immune parameters and gut microbiota in healthy adults: a double-blind randomized controlled trial. **Gut microbes**, v. 15, n. 2, 23 ago. 2023.

MAHDAVI-ROSHAN, M. et al. The effects of probiotics on inflammation, endothelial dysfunction, and atherosclerosis progression: a mechanistic overview. **Heart, Lung and Circulation**, fev. 2022.

MAHMOODPOOR, F. et al. The impact of gut microbiota on kidney function and pathogenesis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 93, p. 412–419, set. 2017.

MAIUOLO, J. et al. The contribution of gut microbiota and endothelial dysfunction in the development of arterial hypertension in animal models and in humans. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 7, p. 3698, 1 jan. 2022.

MALIK, M. et al. Lactobacillus plantarum 299v supplementation improves vascular endothelial function and reduces inflammatory biomarkers in men with stable coronary artery disease. **Circulation Research**, v. 123, n. 9, p. 1091–1102, 12 out. 2018.

MAMDOUH, H. et al. Prevalence and associated risk factors of hypertension and pre-hypertension among the adult population: findings from the Dubai Household Survey, 2019. **BMC Cardiovascular Disorders**, v. 22, n. 1, 28 jan. 2022.

MATIJAŠIĆ, M. *et al.* Gut microbiota beyond bacteria—mycobiome, virome, archaeome, and eukaryotic parasites in IBD. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 8, p. 2668, 11 abr. 2020.

MCFARLAND, L. V. Use of probiotics to correct dysbiosis of normal microbiota following disease or disruptive events: a systematic review. **BMJ Open**, v. 4, n. 8, p. e005047–e005047, 25 ago. 2014.

PIZZORNO, J. E.; MURRAY, M.T. Textbook of Natural Medicine-E-Book. **Elsevier Health Sciences**, 2020.

QUEIROZ, L. et al. The gut microbiota-brain axis: a new frontier on neuropsychiatric disorders. **Frontiers in Psychiatry**, v. 13, 1 jun. 2022.

QI, D.; NIE, X.-L.; ZHANG, J.-J. The effect of probiotics supplementation on blood pressure: a systemic review and meta-analysis. **Lipids in Health and Disease**, v. 19, 25 abr. 2020.

RATINER, K. *et al.* Time-limited diets and the gut microbiota in cardiometabolic disease. **Journal Diabetes**. 2022.

RICHARDS, E. M. *et al.* Gut microbiome and neuroinflammation in hypertension. **Circulation Research**, v. 130, n. 3, p. 401–417, 4 fev. 2022.

ROBLES-VERA, I. et al. Mycophenolate mediated remodeling of gut microbiota and improvement of gut-brain axis in spontaneously hypertensive rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 135, p. 111189, mar. 2021.

ROBLES-VERA, I.; TORAL, M.; DUARTE, J. Microbiota and hypertension: role of the sympathetic nervous system and the immune system. **American Journal of Hypertension**, v. 33, n. 10, p. 890–901, 21 out. 2020.

ROBLES-VERA, I. et al. Probiotic Bifidobacterium breve prevents DOCA-salt hypertension. **The FASEB Journal**, v. 34, n. 10, p. 13626–13640, 11 ago. 2020.

ROBLES-VERA, I. *et al.* The probiotic *Lactobacillus fermentum* prevents dysbiosis and vascular oxidative stress in rats with hypertension induced by chronic nitric oxide blockade. **Molecular nutrition & food research**. v. 62, n. 19, p. 1800298–1800298, 1 out. 2018.

ROBLES-VERA, I. *et al.* Probiotics prevent dysbiosis and the rise in blood pressure in genetic hypertension: role of short-chain fatty acids. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 64, n. 6, p. 1900616, 6 fev. 2020.

ROMÃO DA SILVA, L. DE F. R. DA *et al.* Effects of probiotic therapy on cardio-metabolic parameters and autonomic modulation in hypertensive women: a randomized, triple-blind, placebo-controlled trial. **Food & Function**, v. 11, n. 8, p. 7152–7163, 19 ago. 2020.

SANTISTEBAN, M. M. *et al.* Hypertension-linked pathophysiological alterations in the gut. **Circulation Research**, v. 120, n. 2, p. 312–323, 20 jan. 2017.

SBC. Departamento de hipertensão arterial da Sociedade Brasileira de Cardiologia e Sociedade Brasileira de Nefrologia. Diretrizes brasileiras de hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**. 2020.

SHAH, S. M. *et al.* Hypertension prevalence, awareness, and control among parents of school-aged children in the United Arab Emirates. **Patient Preference and Adherence**, v. Volume 16, p. 1381–1393, maio 2022.

SHARAFEDTINOV, K. K. *et al.* Hypocaloric diet supplemented with probiotic cheese improves body mass index and blood pressure indices of obese hypertensive patients - a randomized double-blind placebo-controlled pilot study. **Nutrition Journal**, v. 12, n. 1, 12 out. 2013.

SHOULDERS, B.; POWELL, L. Reaching for goal: incorporating the latest hypertension guidelines into practice. **The journal for nurse practitioners: JNP**, v. 15, n. 1, p. 102–109, 2019.

SIMÃO, V. A. *et al.* Epigenetic mechanisms involved in inflammaging-associated hypertension. **Current Hypertension Reports**, 7 jul. 2022.

SILVA-CUTINI, M. A. *et al.* Long-term treatment with kefir probiotics ameliorates cardiac function in spontaneously hypertensive rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 66, p. 79–85, 1 abr. 2019.

SILVEIRA-NUNES, G. *et al.* hypertension is associated with intestinal microbiota dysbiosis and inflammation in a brazilian population. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 12 mar. 2020.

SUN, D. *et al.* Intestinal microbiota: a promising therapeutic target for hypertension. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 9, p. 970036, 2022.

SZULIŃSKA, M. *et al.* Multispecies probiotic supplementation favorably affects vascular function and reduces arterial stiffness in obese postmenopausal women—a 12-week placebo-controlled and randomized clinical study. **Nutrients**, v. 10, n. 11, p. 1672, 5 nov. 2018.

TAKAGI, T. *et al.* Changes in the gut microbiota are associated with hypertension, hyperlipidemia, and type 2 diabetes mellitus in japanese subjects. **Nutrients**, v. 12, n. 10, p. 2996, 30 set. 2020.

TELL, D. *et al.* Heart rate variability and inflammatory stress response in young african american men: implications for cardiovascular risk. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 8, 13 out. 2021.

TENORIO-JIMÉNEZ, C. *et al.* Lactobacillus reuteri V3401 reduces inflammatory biomarkers and modifies the gastrointestinal microbiome in adults with metabolic syndrome: the prosir study. **Nutrients**, v. 11, n. 8, p. E1761, 31 jul. 2019.

TORAL, M. *et al.* Lactobacillus fermentum improves tacrolimus-induced hypertension by restoring vascular redox state and improving eNOS coupling. **Molecular nutrition & food research**, v. 62, n. 14, 28 jun. 2018.

VITORINO, T. *et al.* MMP-2 and its implications on cardiac function and structure: Interplay with inflammation in hypertension. **Biochemical Pharmacology**, v. 215, p. 115684, 1 set. 2023.

WANG, H. *et al.* Surface-layer protein from *Lactobacillus acidophilus* NCFM inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation through MAPK and NF- κ B signaling pathways in raw264.7 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 29, p. 7655–7662, 5 jul. 2018.

WILLIAMS, B.; MANCIA, G.; SPIERING, W. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. **European Heart Journal**, v. 39, n. 33, p. 3021–3104, 25 ago. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. More than 700 million people with untreated hypertension. [More than 700 million people with untreated hypertension ([who.int](https://www.who.int))], 2021.

WU, D. *et al.* Baicalin protects against hypertension-associated intestinal barrier impairment in part through enhanced microbial production of short-chain fatty acids. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, 28 out. 2019.

YANG, T. *et al.* Gut dysbiosis is linked to hypertension. **Hypertension**, v. 65, n. 6, p. 1331–40, 2015.

YOO, J. *et al.* Gut microbiota and immune system interactions. **Microorganisms**, v. 8, n. 10, p. 1587, 15 out. 2020.

YUAN, L. *et al.* Antihypertensive activity of milk fermented by *Lactiplantibacillus plantarum* SR37-3 and SR61-2 in L-NAME-Induced Hypertensive Rats. **Foods (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 15, p. 2332, 4 ago. 2022.

YUGAR, L. B. T. *et al.* The role of heart rate variability (HRV) in different hypertensive syndromes. **Diagnostics**, v. 13, n. 4, p. 785, 1 jan. 2023.

YU, J. et al. Effect of acupuncture on essential hypertension. **Medicine**, v. 100, n. 15, p. e25572, 16 abr. 2021.

XIAO, L.; HARRISON, D. G. Inflammation in hypertension. Canadian **Journal of Cardiology**, v. 36, n. 5, p. 635–647, maio 2020.

ZHANG, Z. *et al.* Role of inflammation, immunity, and oxidative stress in hypertension: new insights and potential therapeutic targets. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 10 jan. 2023.

ZHENG, T. *et al.* The process of hypertension induced by high-salt diet: Association with interactions between intestinal mucosal microbiota, and chronic low-grade inflammation, end-organ damage. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1123843, 2023.

ZAREZADEH. M. Effects of probiotics supplementation on blood pressure: An umbrella meta-analysis of randomized controlled trials. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 33, n. 2, p. 275–286, 1 fev. 2023.

APÊNDICE

APÊNDICE A – DISSERTAÇÃO EM MODELO DE ARTIGO CIENTÍFICO

Manuscrito submetido na revista Probiotics and Antimicrobial Proteins (FI: 5.2, Qualis: A4)

Effects of probiotic administration on inflammatory biomarkers and its associations with cardiac autonomic function in women with arterial hypertension: A secondary analysis of a randomized, triple-blind, placebo-controlled trial

Abstract

We evaluated the effects of probiotic therapy on inflammatory biomarkers and characterized the correlations between inflammation and heart rate variability (HRV) variables in women with arterial hypertension. This is a secondary analysis of a triple-blind study conducted in 36 women randomized into two groups: probiotic (n=19) or placebo (n=17). The probiotic group received 10^9 CFU/day of *Lactobacillus (L.) paracasei* LPC-37, *L. rhamnosus* HN001, *L. acidophilus* NCFM, and *Bifidobacterium lactis* HN019, and the placebo group received polydextrose. Clinical, electrocardiogram, and cytokine levels were assessed at baseline and after 8 weeks. Women who received probiotics for 8 weeks had increased serum levels of IL-17A ($p=0.02$) and decreased INF- γ ($p=0.02$) compared to baseline. In addition, probiotic supplementation increased serum levels of IL-10 compared to the placebo group ($p=0.03$). The administration of probiotics or placebo did not change serum levels of TNF α and IL-6 ($p>0.05$). Serum levels of IL-2 and IL-4 were reduced in women receiving placebo or probiotics ($p<0.001$). Correlations between HRV and inflammatory variables showed that INF- γ was positively correlated with HR, LF, LF/HF and SD2/SD1 ratio and negatively correlated with HF. IL-10 was negatively correlated with HR, LF, LF/HF, and SD2/SD1 and positively correlated with HF. IL-6 was negatively correlated with RMSSD and SD1 and positively correlated with SD2/SD1 ratio. IL-4 was negatively correlated with SDRR, RMSSD, pRR50, SD1 and SD2. Probiotic therapy seems to have a discreet anti-inflammatory effect in hypertensive women, and pro-inflammatory cytokines were negatively correlated with vagal modulation and positively correlated with sympathetic modulation of HRV.

Keywords: probiotics; arterial hypertension; Inflammation; autonomic dysfunction.

Introduction

Arterial hypertension is a chronic, nontransmissible, and multicausal disorder characterized by sustained elevation of blood pressure (BP) in adults with systolic BP (SBP) ≥ 140 mmHg and/or diastolic BP (DBP) ≥ 90 mmHg, measured at least two different times ¹. Genetic predisposition, age, gender, high sodium intake, obesity, and sedentary lifestyle are risk factors for arterial hypertension development ^{1,2}.

Gut dysbiosis (ID), a condition resulting from derangements in the composition, diversity, and function of the gut microbiota, has also been shown as a risk factor for developing and maintaining arterial hypertension ³⁻⁵. Mechanistically, gut dysbiosis contributes to systemic low-grade inflammation through increased intestinal mucosal barrier permeability and lipopolysaccharide (LPS)-translocation ^{6,7}.

In the central nervous system, the binding of LPS to toll-like receptors (TLR) activates an inflammatory cascade with macrophage activation and release of pro-inflammatory cytokines, such as interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and IL-1 β , leading to neuroinflammation, sympathetic overactivity, autonomic dysfunction, and increased blood pressure ^{8,9}.

Interventions with probiotics targeting the gut microbiota have been proposed as a promising strategy to lower blood pressure in arterial hypertension ^{10,11}. Preclinical evidence has suggested that probiotics administration may exert an anti-inflammatory effect by modulating the immune system and decreasing the autonomic dysfunction and blood pressure ¹²⁻¹⁴.

Pretreatment with Slp, a surface layer protein from *Lactobacillus acidophilus* NCFM, inhibited LPS-induced inflammatory responses in macrophages in vitro, including the production of IL-1 β and TNF- α ¹⁵. Significant reductions in inflammatory cytokines (TNF- α and IL-6) were obtained after 45 days of consumption of 80 ml/day of milk fermented with *Bifidobacterium lactis* HN019 (2.72×10^{10} CFU/day) by patients with metabolic syndrome¹⁶.

Similarly, administration of *Bifidobacterium lactis* HN019 (1.5×10^8 CFU/day) and *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (7.5×10^7 CFU/day) in a symbiotic preparation reduced IFN- γ and upregulated IL-10 in healthy adults¹⁷. However, the effects of probiotic therapy on inflammatory biomarkers in individuals with hypertension have not been elucidated. However, the effects of probiotic therapy on inflammatory biomarkers in subjects with arterial hypertension remain to be elucidated.

Previously we demonstrated that probiotic supplementation for 8 weeks improved cardiac autonomic function in women with arterial hypertension¹⁸. Heart rate variability (HRV) analysis is a method of assessing the autonomic regulation of the heart, and autonomic dysfunction is associated with changes in the function and structure of target organs, such as the heart, brain, kidneys, and blood vessels, resulting in increased cardiovascular risk¹⁹. Greater parasympathetic nervous system activity has been associated with reduced production of pro-inflammatory cytokines, such as TNF-alpha and IL-6, and lower circulating levels of C-reactive protein and IL-6¹⁹.

This secondary analysis of a randomized clinical trial aimed to evaluate the effects of adjuvant probiotic therapy on inflammatory biomarkers and to characterize the correlations between serum inflammatory cytokine levels and variables related to HRV in women with arterial hypertension. The hypotheses tested are that (i) probiotic therapy reduces low-grade inflammation and (ii) there is a negative correlation between pro-inflammatory cytokines and HRV variables.

Methods

Ethical aspects

This study was approved by the Human Research Ethics Committee of the Lauro Wanderley University Hospital of the Federal University of Paraíba (HULW/UFPB), João Pessoa, PB, Brazil (protocol number 58276916.2.0000.5183). All procedures were performed following the ethical standards of the institution in accordance with Resolution 466/2012 of the National Health Council and International Declaration of Helsinki. Individuals were screened for procedures after giving written informed consent. The clinical trial was registered in the Brazilian Registry of Clinical Trials (ReBEC) with the identification RBR-9mj2dt.

Subjects and study design

This study used blood samples from a previously published study¹⁸. Exclusion criteria were: Pregnant and lactating women, the existence of metabolic disorders (except type 2 diabetes mellitus), smoking, history of renal failure/dialysis, heart disease, stroke, autoimmune diseases, use of medication during the entire study period (except pharmacotherapy for AH or diabetes mellitus), use of antibiotics within one month prior to the study, and the presence of other medical conditions that would compromise compliance with the protocol.

The study was designed as a triple-blind, randomized, placebo-controlled trial. A total of 40 women (spontaneous sampling) were randomized in a triple-blinded into two groups: Probiotic (n=20) or placebo (n=20). As previously reported, 19 women in the probiotic group and 17 women in the placebo group completed the study¹⁸. For 8 weeks, participants were instructed to take a daily sachet of Probiatop® (lot 70086/1608221), a probiotic cocktail consisting of *Lactocaseibacillus paracasei* LPC-37, *Lactocaseibacillus rhamnosus* HN001, *Lactobacillus acidophilus* NCFM, and *Bifidobacterium lactis* HN019 (probiotic group), at a dose of 10⁹ CFU of each strain (1 g/day) (FarmaQuímica, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) or an identical sachet of polydextrose (1g/d – placebo group).

Participants were instructed not to change their physical activity routine and usual diet (monitored by 24-hour recall records)¹⁸, to report any side effects, and to continue taking their antihypertensive medication. The study was monitored weekly by telephone contact with the participants. After 8 weeks of intervention, all participants were asked to return for the reassessment of clinical variables, blood pressure, electrocardiogram (ECG), and biochemical tests.

In addition, detailed methods and results of anthropometry and food consumption are described in the previous study¹⁸.

Blood samples and cytokines measurements

Blood samples from the clinical trial previously published¹⁸ stored at -80 °C were used for cytokine analysis. Serum samples were used for the measurement of cytokines through the Cytometric Bead Array (CBA) technique. Th1/Th2/Th17 CBA kits from Becton Dickinson Biosciences were used to quantify the cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ , and TNF- α . The Becton Dickinson (BD)TM CBA uses a series of particles (microspheres or beads) with different fluorescence intensities to simultaneously detect soluble cytokines through a capture surface. Each bead is conjugated to a specific antibody and cytokines are detected by the fluorochrome phycoerythrin. The fluorescence intensity of each complex reveals the cytokine concentration (pg/mL). An Accuri C6 BD[®] flow cytometer was used and analysis of CBA data was performed using FCAP 1.0.1 software.

Correlation with heart rate variability data

Electrocardiogram (ECG) measurements were recorded for 10 minutes. The ECG model 26T-LTS (ADInstruments®, Bella Vista, NSW, Australia) was used and recordings were made with a 5-electrode configuration using LabChart® data acquisition software (ADInstruments®, Bella Vista, NSW, Australia). Heart rate variability data in the time (SDRR, RMSSD and pRR50) and frequency (LF, HF and LF/HF ratio) domains and non-linear variables (SD1, SD2, and SD2/SD1 ratio) obtained in a previous study¹⁸ were used to assess the association between inflammatory biomarkers and cardiac autonomic function.

Statistical analysis

The results were expressed as average \pm standard deviation or median (minimum-maximum) according to normality data. Normality of data was assessed using the Shapiro-Wilk test. Comparisons between probiotic and placebo groups at baseline were tested using unpaired t-test for parametric data and Mann-Whitney test for non-parametric data. Paired t-test or Wilcoxon matched pair signed rank test was used to analyze differences between baseline and endpoint values. Relationships between cytokines and HRV variables were analyzed using Spearman's

correlation test. Differences were considered significant when the p-value was <0.05 . Statistical analysis was performed using Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Results

Baseline characteristics from women with arterial hypertension are shown in **Table 1**. At baseline condition, the serum levels of INF- γ , IL-17A, TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4 and IL-2 did not differ between placebo and probiotic groups ($p>0.05$, **Table 2**).

Administration of probiotics or placebo for 8 weeks did not change serum levels of TNF α and IL-6 ($p>0.05$, **Table 2**). Serum levels of IL-2 were reduced in women receiving placebo, ($p=0.00$, **Table 2**) or probiotics ($p=0.00$, **Table 2**). Similarly, serum levels of IL-4 were decreased in women receiving placebo ($p=0.00$, **Table 2**) and probiotics ($p=0.00$, **Table 2**). The changes in serum levels of IL-4 and IL-2 did not differ between groups ($p>0.05$, **Table 2**).

Administration of probiotics increased serum levels of IL-10 [0 (0-1.01 vs. 3.9 (0-15.0 pg/mL, $p=0.00$, **Table 2**]. Likewise, placebo administration increased IL-10 serum levels after for 8 weeks [0 (0-5.7) vs. 2.0 (0-9.7) pg/mL, $p=0.02$, **Table 2**). Women receiving probiotics had a greater change in serum levels of IL-10 compared to placebo group ($p=0.03$, **Table 2**).

Administration of probiotics for 8 weeks increased serum levels of IL-17A (14.0 ± 33.6 vs. 39.4 ± 30.9 pg/mL, $p=0.02$, **Table 2**) and reduced INF- γ [30.3 (0-94.4) vs. 6.1 (2.4-14.7) pg/mL, $p=0.01$, **Table 2**), in the baseline conditions. Placebo administration did not change the serum levels of IL-17A ($p=0.07$, **Table 2**) and INF- γ ($p=0.17$, **Table 2**).

Correlations between HRV and inflammatory variables are shown in **Table 3**. Weak to moderate correlations were found between some HRV variables and circulating concentrations of cytokines. However, IL-17A, IL-2, and TNF- α did not correlate with HRV parameters. INF- γ had a positive correlation with HR, LF (nu), LF/HF, and SD2/SD1 ratio and a negative correlation with HF (nu). On the other hand, IL-10 had a negative correlation with HR, LF(nu), LF/HF, and SD2/SD1 and a positive correlation with HF (nu). IL-6 had a negatively correlation with RMSSD and SD1 and a positive correlation with SD2/SD1 ratio. IL-4 had a negative correlation with SDRR, RMSSD, pRR50, SD1, and SD2.

Compliance was satisfactory, with 90% of patients (probiotic and placebo) consuming more than 80% of the sachets. Dietary fiber intake was similar between the intervention and placebo groups at baseline and decreased in the probiotic group at the end of the intervention period. However, at these two points in time, the median consumption in grams of dietary fiber per day was below the recommendations of dietary guidelines in both groups¹⁸ (data not tabulated).

In terms of daily sodium intake, the placebo group showed a reduction in intake compared to baseline. After the intervention, the probiotic group had a higher sodium intake ($p < 0.05$). Both groups had an average sodium intake within the dietary recommendations for this population. There were no differences in anthropometric measurements between the placebo and intervention groups at baseline. There were no differences in anthropometric measurements between the placebo and intervention groups at baseline. More details on the analysis of dietary intake and anthropometry can be found in the primary article of this study¹⁸.

Discussion

Administration of a probiotic formulation containing *L. paracasei* LPC-37, *L. rhamnosus* HN001, *L. acidophilus* NFCM, and *B. lactis* HN019 for 8 weeks increased the serum levels of IL-17A and IL-10 levels and decreased INF- γ level in women with arterial hypertension, but did not affect the serum levels of TNF- α , IL-6, IL-4, and IL-2. In addition, the present study found for first time a negative correlation between pro-inflammatory cytokines and HRV indices in hypertensive conditions.

Chronic low-grade inflammation has been associated with several chronic diseases, such as arterial hypertension. Biological markers, such as CRP, complement pathway products, and cytokines are elevated in arterial hypertension and are recognized as risk factors for cardiovascular outcomes, such as stroke and myocardial infarction²¹. Therefore, therapies that reduce low-grade inflammation may represent a new approach in the adjuvant treatment of arterial hypertension.

Recent studies have investigated the effects of probiotics on biomarkers of inflammation in chronic diseases. For example, administration of 10^9 CFU of *Bifidobacterium breve* for 5 weeks prevented endotoxemia by reducing serum LPS and trimethylamine and restored Th17/Treg balance in mesenteric lymph nodes and aorta of hypertensive rats²². An 8-week treatment with *Lactobacillus fermentum* CECT5716 (10^9 CFU) or *Bifidobacterium breve* CECT7263 (10^9 CFU) reduced the percentage of Th-17 cells and IL-6 in mesenteric lymph nodes and the level of TNF- α mRNA in the colon of mice with lupus²³.

The cytokine IL-17 is partly produced by Th17 lymphocytes and is known to promote endothelial dysfunction via reactive oxygen species, while Tregs reduce the activity of NADPH oxidase by releasing IL-10, a crucial process for improving endothelial function in arterial hypertension²⁴. Interestingly, in this study, IL-17A levels increased in the probiotic group after 8 weeks. Although probiotic administration increased serum levels of IL-17A in hypertensive women compared to baseline ($p=0.02$), it had no effect on serum levels of IL-17A compared to the placebo group ($p=0.98$). In addition, probiotic administration increased serum levels of IL-10 compared to the placebo group ($p=0.03$).

Although IL-17A is widely described as a pro-inflammatory interleukin^{24,27}, an alternative protective action of this cytokine is recognized, depending on the reciprocal regulation between cells of the immune system and other cytokines that determine the plasticity of TH17 cells. In the presence of IL-6 and Transforming Growth Factor beta (TGF- β), naive CD4 T cells differentiate

into more regulated classical TH17 cells characterized by the synthesis of IL-9, IL-10 and IL-21. In the absence of TGF- β , but in the presence of IL-1b, IL-6 and IL-23, more pathogenic alternative TH17 cells are generated that produce high levels of IFN- γ and IL-22. Both subsets produce IL-17A. In this study, we observed a downregulation of IFN- γ and an upregulation of IL-10 in the probiotic group. This scenario could explain the increase in IL-17A in the same group, changing the interpretation of this cytokine to a possible more regulatory action rather than a more pathogenic one²⁵.

It has been shown that administration of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 (at a dose of 5×10^8 CFU for 7 days) attenuated inflammation by decreasing systemic IL-17 and increasing IL-10 serum levels in hypertensive rodents, as well as downregulating NF- κ B, IL-6 and TNF- α in aortic tissue²⁶. In addition, administration of *Clostridium butyricum* for 6 weeks (3×10^8 CFU) increased serum levels of IL-10 and decreased serum levels of TNF- α , IL-6, IL-17, and LPS in spontaneously hypertensive rats²⁷.

In humans, administration of 900 billion CFU of 3 strains of *Bifidobacterium*, 4 strains of *Lactobacillus*, and *Streptococcus salivarius* sp. *thermophilus* twice a day for 2 months did not alter serum levels of IL-10, IL-6, and IL-8 in patients with cirrhosis²⁸. As an anti-inflammatory cytokine, IL-10 can suppress excessive inflammation by continuously inhibiting the production of pro-inflammatory cytokines through negative feedback²⁹. IL-10 production is affected by cytokines such as IFN- γ , IL-4, IL-13 and also for its own self-regulation. The lower levels of IFN- γ in the probiotic group in this study, together with the higher levels of IL-10, may indicate the influence of this regulatory pathway³⁰. The protective role of IL-10 in cardiac and vascular disease has been linked to its effects on blood pressure, cardiac function, and modulation of atherosclerotic lesions³¹.

Administration of probiotics reduced serum levels of IFN- γ in hypertensive women compared with baseline period. In a clinical trial evaluating daily consumption of probiotic kefir for 12 weeks in patients with metabolic syndrome there was a reduction in IFN- γ serum levels compared to baseline³². IFN- γ could play a role in the migration of CD8⁺ T cells into renal tissue, affecting sodium retention and contributing to the worsening of hypertension. It has also been implicated in renal tissue and other organ damage through the combined action of innate and adaptive immunity³³.

Large amounts of bacterial DNA and its derivative substances induce the synthesis of IL-2, IL-6, IL-12, and TNF- α ³⁴. In the present study, administration of probiotic for 8 weeks did not

change serum levels of IL-2, IL-4, IL-6, and TNF- α cytokines. An early study showed that serum levels of IL-2 and IL-4 did not differ between healthy subjects and patients with arterial hypertension⁶, indicating that these cytokines may not be altered in patients with HAS. A non-randomized study with 21 men with stable coronary artery disease showed a reduction in plasma levels of the inflammatory cytokines IL-8 and IL-12, but not TNF- α , IFN- γ , and IL-1 β after 6 weeks of *L. plantarum* 299v supplementation³⁵.

In agreement with our results, a double-blind, randomized, placebo-controlled trial showed that consumption of fermented milk containing *L. acidophilus* La-05 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (10^9 CFU/d) for 6 weeks did not alter serum levels of IL-6, TNF- α , and IL-10 in 50 individuals with type 2 diabetes mellitus³⁶. However, administration of probiotic *Lactobacillus reuteri* v3401 (5×10^9 CFU) for 12 weeks reduced some biochemical parameters of inflammation and endothelial dysfunction (IL-6 and VCAM-1) in a n of 53 patients with metabolic syndrome³⁷.

IL-6 is a pro-inflammatory cytokine synthesized by macrophages, vascular smooth muscle cells and endothelial cells that regulates early inflammation and plays a critical role in the progression of chronic inflammation. Serum levels of IL-6 is typically elevated in hypertensive subjects³⁸ and predispose healthy subjects to a higher risk of myocardial infarction³⁹. Our results are consistent with a pilot study in patients with metabolic syndrome in which intervention with a milk drink containing 10^8 cells/ml of *Lactobacillus casei* Shirota, three times/day for 3 months, did not affect inflammatory markers (TNF - α , IL-6, and IL-10)⁴⁰.

We investigated the possibility of a correlation between inflammatory variables and HRV in the total sample of hypertensive women. Changes in HRV patterns are recognized as a sensitive and early indicator of health effects^{41,42}, while a high HRV expresses adequate adaptation and characterizes an effective autonomic mechanism, and a low HRV reflects an impaired adaptation of the ANS⁴³. The positive correlations between HVR indices in the time, frequency, and non-linear domains with biomarkers of inflammation are consistent with available evidence regarding a positive association between sympathetic modulation of HRV and pro-inflammatory cytokines^{44,45,46}.

INF- γ , IL-6, IL-10, and IL-4 serum levels showed correlations with HRV indices. INF- γ serum level was positively correlated with HR, LF (nu), LF/HF, and SD2/SD1 and negatively correlated with HF (nu), suggesting that higher levels of this pro-inflammatory cytokine may be

associated with greater autonomic dysfunction due to the predominance of sympathetic nervous system activity^{47,48}. In healthy and obese children, IFN- γ was positively correlated with LF, HF, SDNN, RMMSSD, NN50, SD1, and SD2⁴⁵.

In the present study, the inflammatory cytokine IL-6 positively correlated with SD2/SD1 ratio and negatively correlated with RMSSD and SD1. A study with individuals with coronary artery disease reported no association between RMSSD and IL-6, CRP, and fibrinogen, but a negative correlation between these markers and mean NN, SDNN, and SDANN⁴⁹. On the other hand, an American cohort reported a negative correlation between IL-6, fibrinogen, CRP, and LF band⁵⁰. In patients with untreated depressive disorder, strong negative correlations were found between HRV and IL-6⁵¹.

Lastly, IL-4 serum levels showed a negative correlation with SDRR, RMSSD, pRR50, SD1, and SD2, while IL-10 serum levels showed a negative correlation with HR, LF(nu), LF/HF, and SD2/SD1 and a positive correlation with HF(nu). In patients with type 1 diabetes mellitus, IL-4 and TNF α were inversely associated with both sympathetic (LF band) and parasympathetic (RMSSD and HF band) HRV measures⁵². Measurement of IL-6 in cerebrospinal fluid samples from individuals with rheumatoid arthritis showed a strong negative correlation with SDNN, whereas no correlation was found between HRV and serum or central IL-4⁵³.

This study adds important contributions to the literature, as it is the first clinical trial to investigate the effects of probiotic therapy on serum inflammatory cytokines, as well as the first to investigate the existence of an association between these and variables analyzing autonomic function, serving as a basis for future investigations. However, it also showed some limitations.

First, although there are previous studies that support the execution of this study design over a period of 8 weeks^{35,54,55}, there are studies that have been carried out in higher (12 weeks)^{32,37}, in populations affected by similar cardiovascular diseases. Second, the sample size may have affected the representativeness of the population, compromising precision and statistical power. Thus, it is possible that non-statistically significant results occurred due to low sampling power (false negatives or type 2 errors)⁵⁶.

In conclusion, the results of the present study showed for the first time that administration of probiotics for 8 weeks improved IL-10 serum levels in women with arterial hypertension. Pro-inflammatory cytokines were negatively correlated with vagal modulation of HRV and positively correlated with sympathetic modulation of HRV, while anti-inflammatory cytokines were

positively correlated with vagal modulation of HRV and negatively correlated with sympathetic modulation of HRV.

Acknowledgements

The authors thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES, Brazil) for a scholarship awarded to L. F. Romão da Silva and L. A. Maia (Finacial code 001).

Financial supports

This secondary data analysis was supported by grants from CAPES (Programa de Desenvolvimento da Pós-Graduação - Estratégico de Consolidação dos Programas de Pós-Graduação stricto sensu acadêmicos, process #88887.707766/2022-00).

Author Contributions

J.L. de Brito Alves designed and coordinated the study. L.A. Maia and J. R. de Souza performed the experiments. L.A. Maia and J.L. de Brito Alves analyzed the data and drafted the manuscript. M. Magnani and E.L. de Souza reviewed critically the manuscript.

Conflicts of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Table 1. Assessment of clinical characteristics at baseline condition of woman included in the triple-blind controlled trial.

Variables	Probiotic	Placebo	<i>p</i> -value
Age (years)	43.3 (34 - 50)	43.7 (28 - 50)	0.856
Physical activity - % (n)	26.3 (5)	47.1 (8)	0.299
Dyslipidemia - % (n)	5.2 (1)	5.9 (1)	1.000
T2DM - % (n)	10.5 (2)	11.7 (2)	1.000
Antihypertensive medications			
ARBII - % (n)	57.9 (11)	58.8 (10)	1.000
ACE I inhbitorys - % (n)	15.7 (3)	23.5 (4)	0.684
βBlocker - % (n)	47.3 (9)	11.7 (2)	0.031
Calcium blockers - % (n)	10.5 (2)	17.6 (3)	0.650
Diuretics - % (n)	26.3 (5)	35.3 (6)	0.720
Without antihypertensive- % (n)	10.5 (2)	5.9 (1)	1.000
Single antihypertensive drug - % (n)	42.1 (8)	41.2 (7)	1.000
Antihypertensive drug combination - % (n)	57.9 (11)	52.8 (9)	1.000

Values are expressed as n (%). BMI: Body mass index; ACE I inhibitor: Angiotensin-converting enzyme inhibitor; ARBII- Angiotensin II receptor blocker; T2DM: Type 2 Diabetes Mellitus.

1 **Table 2.** Assessment of cytokines in women with arterial hypertension receiving probiotic or placebo for 8 weeks

Cytokines (pg/mL)	Placebo				Probiotic				<i>p</i> - value [#]
	Pre	Post	<i>p</i> - value	Change (Post-Pre)	Pre	Post	<i>p</i> - value	Change (Post-Pre)	
IL-17A	19.4±32.1	45.0±40.3	0.07	25.6±49.6	14.0±33.6	39.4±30.9	0.02	25.4±37.8	0.98
INF-γ [†]	7.2 (0 - 77.2)	5.6 (0 - 13.4)	0.17	-11.1 (-70.1 - 13.4)	30.3 (0 - 94.4)	6.1 (2.4-14.7)	0.01	-22.9 (-88.2 - 14.7)	0.38
TNFα [†]	0 (0 - 4.8)	1.0 (0 - 10.8)	0.15	1.0 (-4.76 - 10.7)	0 (0 - 19.9)	2.4 (0 - 11.3)	0.09	2.09 (-17.0 - 7.65)	0.12
IL-10 [†]	0 (0-5.7)	2.0 (0 - 9.7)	0.00	2.0 (0 - 5.14)	0 (0 - 1.01)	3.9 (0 - 15.0)	0.00	3.4 (0 - 14.0)	0.03
IL-6 [†]	11.7 (1.9 - 43.9)	10.5 (0 - 46.9)	0.99	1.8 (-12.2 - 42.9)	12.0 (0 - 46.8)	6.1 (0 - 32.9)	0.69	5.1 (-40.7 - 17.1)	0.62
IL-4	20.2±10.5	2.7±4.2	0.00	-17.5±10.5	18.5±8.2	4.2±4.3	0.00	-14.3±8.8	0.33
IL-2	16.0±7.4	4.8±9.9	0.00	-11.2±6.6	16.9±9.5	5.3±4.4	0.00	-11.6±7.8	0.88

2 Interleukin 17A (IL17A), interferon gamma (INF-γ), tumoral necrosis factor alpha (TNF-α), interleukin 10 (IL-10), interleukin-
3 4 (IL-4) and interleukin-2 (IL-2). According to normality data distribution, values are expressed as mean (standard deviation) or median (min-max).
4 Shapiro-Wilk test was used to assess data normality. Comparisons between probiotic and placebo groups at baseline were tested using unpaired t-
5 test or Mann-Whitney test. Paired t-test or Wilcoxon matched pairs signed rank test was used to analyze differences between baseline and end-
6 point values.

7 [†] non-parametric data

8 p-value[#]: un-paired t-test or Mann-Whitney test comparing the changes in post-pre intervention.

Tables 3. Linear correlation coefficients between heart rate variability measures and inflammatory variables.

	INF-γ	TNFα	IL-17A	IL-10	IL-6	IL-4	IL-2
SBP (mmHg)	-0.246	-0.072	0.031	0.184	-0.156	-0.045	-0.058
DPB (mmHg)	-0.329	-0.150	-0.253	.0198	-0.038	-0.088	-0.061
HR (bpm)	0.271	-0.059	-0.091	-0.394	0.083	0.414	0.132
SDRR (ms)	0.004	0.123	-0.174	-0.061	-0.183	-0.480	-0.038
SDHR (ms)	0.245	0.078	-0.275	-0.382	-0.089	-0.093	0.047
RMSSD (ms)	-0.197	0.075	-0.035	0.182	-0.315	-0.484	-0.204
pRR50 (ms)	-0.084	0.140	-0.033	0.143	-0.246	-0.400	-0.151
LF(nu)	0.369	0.029	-0.127	-0.334	0.099	0.309	0.112
HF(nu)	-0.374	-0.056	0.137	0.357	-0.109	-0.294	-0.112
LF/HF	0.418	0.058	-0.131	-0.351	0.095	0.317	0.124
SD1 (ms)	-0.185	0.075	-0.01	0.182	-0.328	-0.494	-0.203
SD2 (ms)	0.059	0.152	-0.215	-0.098	-0.108	-0.434	0.004
SD2/SD1	0.328	0.136	-0.087	-0.302	0.321	0.289	0.141

The values in **bold** have a significant correlation ($p < 0.05$).

SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; HR: heart rate; BPM: beats per minute; SDRR, standard deviation between RR intervals; RMSSD, square root of the mean of the square of the differences between consecutive RR intervals; pRR50, adjacent RR with differences in duration greater than 50; LF, low frequency; HF, high frequency; SD1, standard deviation of the instantaneous variability of continuous RR intervals in the Poincare graph; SD2, standard deviation of long-term continuous RR intervals; ms: milliseconds; nu: normalized units.

References

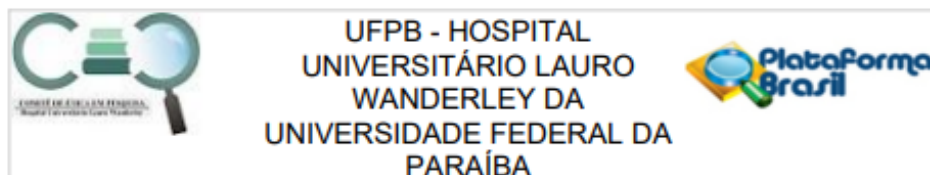
1. F. L. J. Visseren, F. Mach, Y. M. Smulders, D. Carballo, K. C. Koskinas, M. Back, A. Benetos, A. Biffi, J. M. Boavida, D. Capodanno, B. Cosyns, C. Crawford, C. H. Davos, I. Desormais, E. Di Angelantonio, O. H. Franco, S. Halvorsen, F. D. R. Hobbs, M. Hollander, E. A. Jankowska, M. Michal, S. Sacco, N. Sattar, L. Tokgozoglu, S. Tonstad, K. P. Tsoufis, I. van Dis, I. C. van Gelder, C. Wanner, B. Williams and E. S. C. S. D. Group, 2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice, *Eur J Prev Cardiol*, 2022, **29**, 5-115.
2. W. K. S. Barroso, C. I. S. Rodrigues, L. A. Bortolotto, M. A. Mota-Gomes, A. A. Brandao, A. D. M. Feitosa, C. A. Machado, C. E. Poli-de-Figueiredo, C. Amodeo, D. Mion Junior, E. C. D. Barbosa, F. Nobre, I. C. B. Guimaraes, J. F. Vilela-Martin, J. C. Yugar-Toledo, M. E. C. Magalhaes, M. F. T. Neves, P. Jardim, R. D. Miranda, R. Povoia, S. C. Fuchs, A. Alessi, A. J. G. Lucena, A. Avezum, A. L. L. Sousa, A. Pio-Abreu, A. C. Sposito, A. M. G. Pierin, A. M. G. Paiva, A. C. S. Spinelli, A. D. R. Nogueira, N. Dinamarco, B. Eibel, C. L. M. Forjaz, C. R. O. Zanini, C. B. Souza, D. Souza, E. A. F. Nilson, E. F. A. Costa, E. V. Freitas, E. D. R. Duarte, E. S. Muxfeldt, E. Lima Junior, E. M. G. Campana, E. J. Cesarino, F. Marques, F. Argenta, F. M. Consolim-Colombo, F. S. Baptista, F. A. Almeida, F. A. O. Borelli, F. D. Fuchs, F. L. Plavnik, G. F. Salles, G. S. Feitosa, G. V. D. Silva, G. M. Guerra, H. Moreno Junior, H. C. Finimundi, I. C. Back, J. B. Oliveira Filho, J. R. Gemelli, J. G. Mill, J. M. Ribeiro, L. A. D. Lotaf, L. S. D. Costa, L. Magalhaes, L. F. Drager, L. C. Martin, L. C. N. Scala, M. Q. Almeida, M. M. G. Gowdak, M. Klein, M. V. B. Malachias, M. C. C. Kuschnir, M. E. Pinheiro, M. H. E. Borba, O. Moreira Filho, O. Passarelli Junior, O. R. Coelho, P. V. O. Vitorino, R. M. Ribeiro Junior, R. Esporcatte, R. Franco, R. Pedrosa, R. A. Mulinari, R. B. Paula, R. T. P. Okawa, R. F. Rosa, S. L. D. Amaral, S. R. Ferreira-Filho, S. E. Kaiser, T. S. V. Jardim, V. Guimaraes, V. H. Koch, W. Oigman and W. Nadruz, Brazilian Guidelines of Hypertension - 2020, *Arq Bras Cardiol*, 2021, **116**, 516-658.
3. M. M. Santisteban, Y. Qi, J. Zubcevic, S. Kim, T. Yang, V. Shenoy, C. T. Cole-Jeffrey, G. O. Lobaton, D. C. Stewart, A. Rubiano, C. S. Simmons, F. Garcia-Pereira, R. D. Johnson, C. J. Pepine and M. K. Raizada, Hypertension-Linked Pathophysiological Alterations in the Gut, *Circ Res*, 2017, **120**, 312-323.
4. T. Yang, M. M. Santisteban, V. Rodriguez, E. Li, N. Ahmari, J. M. Carvajal, M. Zadeh, M. Gong, Y. Qi, J. Zubcevic, B. Sahay, C. J. Pepine, M. K. Raizada and M. Mohamadzadeh, Gut dysbiosis is linked to hypertension, *Hypertension*, 2015, **65**, 1331-1340.
5. J. Li, F. Zhao, Y. Wang, J. Chen, J. Tao, G. Tian, S. Wu, W. Liu, Q. Cui, B. Geng, W. Zhang, R. Weldon, K. Auguste, L. Yang, X. Liu, L. Chen, X. Yang, B. Zhu and J. Cai, Gut microbiota dysbiosis contributes to the development of hypertension, *Microbiome*, 2017, **5**, 14.
6. G. Silveira-Nunes, D. F. Durso, L. Jr, E. H. M. Cunha, T. U. Maioli, A. T. Vieira, E. Speziali, R. Correa-Oliveira, O. A. Martins-Filho, A. Teixeira-Carvalho, C. Franceschi, S. Rampelli, S. Turroni, P. Brigidi and A. M. C. Faria, Hypertension Is Associated With Intestinal Microbiota Dysbiosis and Inflammation in a Brazilian Population, *Front Pharmacol*, 2020, **11**, 258.
7. S. Kim, R. Goel, A. Kumar, Y. Qi, G. Lobaton, K. Hosaka, M. Mohammed, E. M. Handberg, E. M. Richards, C. J. Pepine and M. K. Raizada, Imbalance of gut microbiome and intestinal epithelial barrier dysfunction in patients with high blood pressure, *Clin Sci (Lond)*, 2018, **132**, 701-718.
8. E. M. Richards, J. Li, B. R. Stevens, C. J. Pepine and M. K. Raizada, Gut Microbiome and Neuroinflammation in Hypertension, *Circ Res*, 2022, **130**, 401-417.
9. D. Haspula and M. A. Clark, Neuroinflammation and sympathetic overactivity: Mechanisms and implications in hypertension, *Auton Neurosci*, 2018, **210**, 10-17.
10. J. L. D. Alves, J. M. A. Brasil, L. A. Maia, M. D. Lima, K. B. Sampaio and E. L. de Souza, Phenolic compounds in hypertension: Targeting gut-brain interactions and endothelial dysfunction, *Journal of Functional Foods*, 2023, **104**.
11. D. D. de Assis Gadelha, J. L. de Brito Alves, P. C. T. da Costa, M. S. da Luz, C. de Oliveira Cavalcanti, F. F. Bezerril, J. F. Almeida, J. de Campos Cruz, M. Magnani, C. M. Balarini, S. Rodrigues Mascarenhas, V. de Andrade Braga and M. D. S. de Franca-Falcao, Lactobacillus group and arterial hypertension: A broad review on effects and proposed mechanisms, *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2022, DOI: 10.1080/10408398.2022.2136618, 1-22.
12. M. O. de Luna Freire, L. C. P. do Nascimento, K. A. R. de Oliveira, A. M. de Oliveira, T. H. Napoleao, M. D. S. Lima, C. J. Lagranha, E. L. de Souza and J. L. de Brito Alves, Effects of a Mixed *Limosilactobacillus fermentum* Formulation with Claimed Probiotic Properties on Cardiometabolic Variables, Biomarkers of Inflammation and Oxidative Stress in Male Rats Fed a High-Fat Diet, *Foods*, 2021, **10**.

13. M. O. de Luna Freire, L. C. P. do Nascimento, K. A. R. de Oliveira, A. M. de Oliveira, M. Dos Santos Lima, T. H. Napoleao, J. H. da Costa Silva, C. J. Lagranha, E. L. de Souza and J. L. de Brito Alves, *Limosilactobacillus fermentum* Strains with Claimed Probiotic Properties Exert Anti-oxidant and Anti-inflammatory Properties and Prevent Cardiometabolic Disorder in Female Rats Fed a High-Fat Diet, *Probiotics Antimicrob Proteins*, 2023, **15**, 601-613.
14. I. Robles-Vera, M. Toral, N. de la Visitacion, M. Sanchez, M. Gomez-Guzman, M. Romero, T. Yang, J. L. Izquierdo-Garcia, R. Jimenez, J. Ruiz-Cabello, E. Guerra-Hernandez, M. K. Raizada, F. Perez-Vizcaino and J. Duarte, Probiotics Prevent Dysbiosis and the Rise in Blood Pressure in Genetic Hypertension: Role of Short-Chain Fatty Acids, *Mol Nutr Food Res*, 2020, **64**, e1900616.
15. H. Wang, L. Zhang, S. Xu, J. Pan, Q. Zhang, R. Lu. Surface-Layer Protein from *Lactobacillus acidophilus* NCFM Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammation through MAPK and NF- κ B Signaling Pathways in RAW264, *Cells. J Agric Food Chem*, 2018, **29**, 7655-7662.
16. L.J. BERNINI, AN. Simão, DF. Alfieri DF, MA. Lozovoy, NL. Mari, CH. de Souza, I. Dichi I, GN. Costa. Beneficial effects of *Bifidobacterium lactis* on lipid profile and cytokines in patients with metabolic syndrome: A randomized trial. Effects of probiotics on metabolic syndrome, *Nutrition*, 2016, **32**, 716-719.
17. Li. X, S. Hu, J. Yin, X. Peng, L. King, L. Li, Z. Xu, L. Zhou, Z. Peng, X. Ze, X. Zhang, Q. Hou, Z. Shan, L. Liu. Effect of synbiotic supplementation on immune parameters and gut microbiota in healthy adults: a double-blind randomized controlled trial. *Gut microbes*, 2023, **15**.
18. L. F. Romao da Silva, Y. de Oliveira, E. L. de Souza, M. O. de Luna Freire, V. A. Braga, M. Magnani and J. L. de Brito Alves, Effects of probiotic therapy on cardio-metabolic parameters and autonomic modulation in hypertensive women: a randomized, triple-blind, placebo-controlled trial, *Food Funct*, 2020, **11**, 7152-7163.
19. L. B. T. Yugar, J. C. Yugar-Toledo, N. Dinamarco, L. G. Sedenho-Prado, B. V. D. Moreno, T. A. Rubio, A. Fattori, B. Rodrigues, J. F. Vilela-Martin and H. Moreno, The Role of Heart Rate Variability (HRV) in Different Hypertensive Syndromes, *Diagnostics (Basel)*, 2023, **13**.
20. D. Tell, R. L. Burr, H. L. Mathews and L. W. Janusek, Heart Rate Variability and Inflammatory Stress Response in Young African American Men: Implications for Cardiovascular Risk, *Front Cardiovasc Med*, 2021, **8**, 745864.
21. J. Xiu, X. Lin, Q. Chen, P. Yu, J. Lu, Y. Yang, W. Chen, K. Bao, J. Wang, J. Zhu, X. Zhang, Y. Pan, J. Tu, K. Chen and L. Chen, The aggregate index of systemic inflammation (AISI): a novel predictor for hypertension, *Front Cardiovasc Med*, 2023, **10**, 1163900.
22. I. Robles-Vera, N. de la Visitacion, M. Toral, M. Sanchez, M. Romero, M. Gomez-Guzman, T. Yang, J. L. Izquierdo-Garcia, E. Guerra-Hernandez, J. Ruiz-Cabello, M. K. Raizada, F. Perez-Vizcaino, R. Jimenez and J. Duarte, Probiotic *Bifidobacterium breve* prevents DOCA-salt hypertension, *FASEB J*, 2020, **34**, 13626-13640.
23. N. de la Visitacion, I. Robles-Vera, J. Moleon-Moya, M. Sanchez, R. Jimenez, M. Gomez-Guzman, C. Gonzalez-Correa, M. Olivares, M. Toral, M. Romero and J. Duarte, Probiotics Prevent Hypertension in a Murine Model of Systemic Lupus Erythematosus Induced by Toll-Like Receptor 7 Activation, *Nutrients*, 2021, **13**.
24. I. Robles-Vera, M. Toral and J. Duarte, Microbiota and Hypertension: Role of the Sympathetic Nervous System and the Immune System, *Am J Hypertens*, 2020, **33**, 890-901.
25. M. Akdis, O. Palomares, W. van de Veen, M. van Splunter, CA. Akdis. TH17 and TH22 cells: A confusion of antimicrobial response with tissue inflammation versus protection. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2012 Jun;**129**(6):1438-49.
26. M. Toral, M. Romero, A. Rodriguez-Nogales, R. Jimenez, I. Robles-Vera, F. Algieri, N. Chueca-Porcuna, M. Sanchez, N. de la Visitacion, M. Olivares, F. Garcia, F. Perez-Vizcaino, J. Galvez and J. Duarte, *Lactobacillus fermentum* Improves Tacrolimus-Induced Hypertension by Restoring Vascular Redox State and Improving eNOS Coupling, *Mol Nutr Food Res*, 2018, **62**, e1800033.
27. X. Luo, Z. Han, Q. Kong, Y. Wang, H. Mou and X. Duan, *Clostridium butyricum* Prevents Dysbiosis and the Rise in Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats, *Int J Mol Sci*, 2023, **24**.
28. S. Jayakumar, M. Carbonneau, N. Hotte, A. D. Befus, C. St Laurent, R. Owen, M. McCarthy, K. Madsen, R. J. Bailey, M. Ma, V. Bain, K. Rioux and P. Tandon, VSL#3 (R) probiotic therapy does not reduce portal pressures in patients with decompensated cirrhosis, *Liver Int*, 2013, **33**, 1470-1477.
29. ACP. Volp, CG. Alfenas, NMB. Costa, VPR. Minim, PC. Stringueta, J. Bressan. Capacidade dos biomarcadores inflamatórios em prever a síndrome metabólica: Inflammation biomarkers capacity in predicting the metabolic syndrome. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2008 Apr;**52**(3):537-49.

30. Oliveira CMB de, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomão R. Citocinas e dor. *Revista Brasileira de Anestesiologia*. 2011 Apr;**61**(2):260–5.
31. S. Xu, J. Zhang, J. Liu, J. Ye, Y. Xu, Z. Wang, J. Yu, D. Ye, M. Zhao, Y. Feng, W. Pan, M. Wang and J. Wan, The role of interleukin-10 family members in cardiovascular diseases, *Int Immunopharmacol*, 2021, **94**, 107475.
32. E. Bellikci-Koyu, B. P. Sarer-Yurekli, C. Karagozlu, F. Aydin-Kose, A. G. Ozgen and Z. Buyuktuncer, Probiotic kefir consumption improves serum apolipoprotein A1 levels in metabolic syndrome patients: a randomized controlled clinical trial, *Nutr Res*, 2022, **102**, 59-70.
33. L. N. Benson, Y. Guo, K. Deck, C. Mora, Y. Liu and S. Mu, The link between immunity and hypertension in the kidney and heart, *Front Cardiovasc Med*, 2023, **10**, 1129384.
34. A. A. Imani Fooladi, H. Mahmoodzadeh Hosseini, M. R. Nourani, S. Khani and S. M. Alavian, Probiotic as a novel treatment strategy against liver disease, *Hepat Mon*, 2013, **13**, e7521.
35. M. Malik, T. M. Suboc, S. Tyagi, N. Salzman, J. Wang, R. Ying, M. J. Tanner, M. Kakarla, J. E. Baker and M. E. Widlansky, *Lactobacillus plantarum* 299v Supplementation Improves Vascular Endothelial Function and Reduces Inflammatory Biomarkers in Men With Stable Coronary Artery Disease, *Circ Res*, 2018, **123**, 1091-1102.
36. L. B. Tonucci, K. M. Olbrich Dos Santos, L. Licursi de Oliveira, S. M. Rocha Ribeiro and H. S. Duarte Martino, Clinical application of probiotics in type 2 diabetes mellitus: A randomized, double-blind, placebo-controlled study, *Clin Nutr*, 2017, **36**, 85-92.
37. C. Tenorio-Jimenez, M. J. Martinez-Ramirez, I. Del Castillo-Codes, C. Arraiza-Irigoyen, M. Tercero-Lozano, J. Camacho, N. Chueca, F. Garcia, J. Olza, J. Plaza-Diaz, L. Fontana, M. Olivares, A. Gil and C. Gomez-Llorente, *Lactobacillus reuteri* V3401 Reduces Inflammatory Biomarkers and Modifies the Gastrointestinal Microbiome in Adults with Metabolic Syndrome: The PROSIR Study, *Nutrients*, 2019, **11**.
38. B. Chamarthi, G. H. Williams, V. Ricchiuti, N. Srikumar, P. N. Hopkins, J. M. Luther, X. Jeunemaitre and A. Thomas, Inflammation and hypertension: the interplay of interleukin-6, dietary sodium, and the renin-angiotensin system in humans, *Am J Hypertens*, 2011, **24**, 1143-1148.
39. P. M. Ridker, N. Rifai, M. J. Stampfer and C. H. Hennekens, Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men, *Circulation*, 2000, **101**, 1767-1772.
40. N. J. Tripolt, B. Leber, D. Blattl, M. Eder, W. Wonisch, H. Scharnagl, T. Stojakovic, B. Obermayer-Pietsch, T. C. Wascher, T. R. Pieber, V. Stadlbauer and H. Sourij, Short communication: Effect of supplementation with *Lactobacillus casei* Shirota on insulin sensitivity, beta-cell function, and markers of endothelial function and inflammation in subjects with metabolic syndrome--a pilot study, *J Dairy Sci*, 2013, **96**, 89-95.
41. M. M. P. Lira, J. E. M. de Medeiros Filho, V. J. Baccin Martins, G. da Silva, F. A. de Oliveira Junior, E. J. B. de Almeida Filho, A. S. Silva, J. Henrique da Costa-Silva and J. L. de Brito Alves, Association of worsening of nonalcoholic fatty liver disease with cardiometabolic function and intestinal bacterial overgrowth: A cross-sectional study, *PLoS One*, 2020, **15**, e0237360.
42. N. N. Crispim Carvalho, V. J. Baccin Martins, V. A. da Nobrega, A. de Arruda Neta, L. A. Cavalcante da Fonseca, F. Bandeira and J. L. de Brito Alves, Effects of Preoperative Sarcopenia-Related Parameters on Cardiac Autonomic Function in Women with Obesity Following Bariatric Surgery: A One-Year Prospective Study, *Nutrients*, 2023, **15**.
43. F. A. Oliveira Junior, R. A. Pereira, A. S. Silva, J. L. Brito Alves, J. H. Costa-Silva, V. A. Braga and C. M. Balarini, Different acquisition systems for heart rate variability analysis may lead to diverse outcomes, *Braz J Med Biol Res*, 2022, **55**, e11720.
44. K. C. Marques, J. A. S. Quaresma and L. F. M. Falcao, Cardiovascular autonomic dysfunction in "Long COVID": pathophysiology, heart rate variability, and inflammatory markers, *Front Cardiovasc Med*, 2023, **10**, 1256512.
45. P. C. T. Costa, J. R. de Souza, P. C. Lima, D. B. Duarte, T. A. F. Viana das Neves, J. K. G. Pereira, C. C. Silva-Luis, R. C. S. de Moraes, V. A. Braga, E. L. de Souza, V. J. B. Martins and J. L. de Brito Alves, Evaluation of cardiac autonomic function and low-grade inflammation in children with obesity living in the Northeast Brazilian region, *J Pediatr (Rio J)*, 2023, DOI: 10.1016/j.jpmed.2023.07.003.
46. K. N. Kim, Y. Yao and S. Y. Ju, Heart rate variability and inflammatory bowel disease in humans: A systematic review and meta-analysis, *Medicine (Baltimore)*, 2020, **99**, e23430.
47. S. Rahman, M. Habel and R. J. Contrada, Poincare plot indices as measures of sympathetic cardiac regulation: Responses to psychological stress and associations with pre-ejection period, *Int J Psychophysiol*, 2018, **133**, 79-90.

48. F. Shaffer and J. P. Ginsberg, An Overview of Heart Rate Variability Metrics and Norms, *Front Public Health*, 2017, **5**, 258.
49. R. von Kanel, R. M. Carney, S. Zhao and M. A. Whooley, Heart rate variability and biomarkers of systemic inflammation in patients with stable coronary heart disease: findings from the Heart and Soul Study, *Clin Res Cardiol*, 2011, **100**, 241-247.
50. T. M. Cooper, P. S. McKinley, T. E. Seeman, T. H. Choo, S. Lee and R. P. Sloan, Heart rate variability predicts levels of inflammatory markers: Evidence for the vagal anti-inflammatory pathway, *Brain Behav Immun*, 2015, **49**, 94-100.
51. F. Euteneuer, M. Neubert, S. Salzmann, M. Wilhelm, S. Fischer, U. Ehlert and W. Rief, Associations between indices of 24-hour heart rate variability and inflammation in individuals with major depressive disorder, *Int J Psychophysiol*, 2023, **188**, 72-78.
52. A. L. Wegeberg, T. Okdahl, T. Floyel, C. Brock, N. Ejksjaer, S. Riahi, F. Pociot, J. Storling and B. Brock, Circulating Inflammatory Markers Are Inversely Associated with Heart Rate Variability Measures in Type 1 Diabetes, *Mediators Inflamm*, 2020, **2020**, 3590389.
53. E. Kosek, R. Altawil, D. Kadetoff, A. Finn, M. Westman, E. Le Maitre, M. Andersson, M. Jensen-Urstad and J. Lampa, Evidence of different mediators of central inflammation in dysfunctional and inflammatory pain--interleukin-8 in fibromyalgia and interleukin-1 beta in rheumatoid arthritis, *J Neuroimmunol*, 2015, **280**, 49-55.
54. Liang T, Wu L, Xi Y, Li Y, Xie X, Fan C, et al. Probiotics supplementation improves hyperglycemia, hypercholesterolemia, and hypertension in type 2 diabetes mellitus: An update of meta-analysis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2020 May 21;61(10):1670–88.
55. Cicero AFG, Fogacci F, Bove M, Giovannini M, Borghi C. Impact of a short-term synbiotic supplementation on metabolic syndrome and systemic inflammation in elderly patients: a randomized placebo-controlled clinical trial. *European Journal of Nutrition* [Internet]. 2021 Mar 1;60(2):655–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32417946/>
56. Andrade C. Sample Size and Its Importance in Research. *Indian Journal of Psychological Medicine* [Internet]. 2020 Jan 6;42(1):102–3. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6970301/>

APÊNDICE B – Parecer de aprovação do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeitos da suplementação com Probiatop (mix de probióticos) no tratamento da hipertensão arterial

Pesquisador: José Luiz de Brito Alves

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 58276916.2.0000.5183

Instituição Proponente: Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Final

Detalhe:

Justificativa: Envio, em anexo, o relatório final.

Data do Envio: 13/05/2020

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

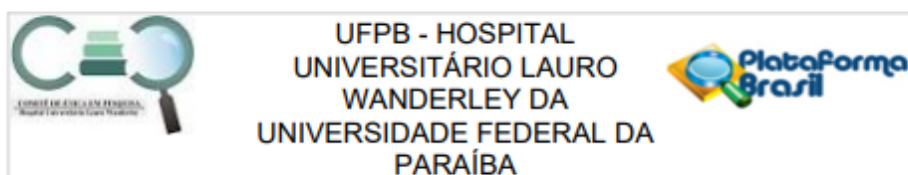
DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.033.013

Apresentação da Notificação:

Apresentação de Relatório Final da pesquisa objetivou mostrar os resultados finais do trabalho intitulado "Efeitos da suplementação com Probiatop (mix de probióticos) no tratamento da hipertensão arterial". O protocolo de pesquisa foi aprovado através do parecer nº 3.567.665, emitido em 11 de setembro de 2019. Tratou-se de um estudo prospectivo clínico randomizado, duplo-cego e controlado por placebo, quarenta mulheres com hipertensão arterial primária, 20-50 anos, divididos em dois grupos. Pacientes do grupo probiótico receberam diariamente sachês contendo *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* e Pacientes do grupo placebo que receberam diariamente sachês idênticos contendo polidextrose. Ambos os grupos avaliados por 8 semanas. Os participantes foram

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 58.059-900
UF: PB **Município:** JOÃO PESSOA
Telefone: (83)3216-7964 **Fax:** (83)3216-7522 **E-mail:** comitedeetica.hulw2018@gmail.com



Continuação do Parecer: 4.033.013

recrutados no ambulatório de nutrição do Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). O projeto teve início em Setembro de 2016 e agora solicita, por emenda, a extensão do prazo de execução para março de 2020, em virtude da inserção de um teste respiratório para os participantes recrutados, além da realização de coleta de fezes com o objetivo de verificar a microbiota fecal dos participantes. Além disso, foram observadas e mensuradas as variáveis antropométricas (peso, IMC e circunferência da cintura).

O pesquisador conseguiu inferir que a terapia probiótica por 8 semanas foi capaz de reduzir os níveis de glicemia de jejum, melhorando o perfil lipídico, a microbiota intestinal e a modulação autonômica em mulheres hipertensas.

Objetivo da Notificação:

Obtenção de certidão definitiva do Comitê de Ética em Pesquisa do HULW (CEP-HULW).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos previsíveis e benefícios apontados estavam coerentes com a proposta da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

O relatório final apresentado expressa coerência com o projeto aprovado através do parecer nº. 3.567.665, demonstrando cumprimento, em todas as fases do estudo, da metodologia proposta e aprovada pelo CEP/HULW.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados os termos necessários à notificação, conforme exigências contidas na Resolução 466/2012, do CNS/MS.

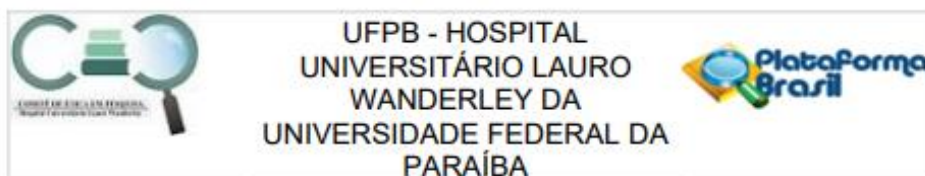
Recomendações:

Considerando as orientações contidas na Resolução CNS nº466/12, recomenda-se que os resultados da pesquisa sejam publicizados junto à instituição onde a pesquisa foi desenvolvida no sentido de contribuir para a melhoria da prática, preservando, a imagem e o anonimato dos participantes; e encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores e pessoal técnico integrante da equipe de pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e de acordo com a Resolução CNS 466/12, sou favorável à aprovação do relatório final da pesquisa e emissão da certidão definitiva.

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 58.059-900
UF: PB **Município:** JOAO PESSOA
Telefone: (83)3216-7964 **Fax:** (83)3216-7522 **E-mail:** comitedeetica.hulw2018@gmail.com



Continuação do Parecer: 4.033.013

Considerações Finais a critério do CEP:

Ratificamos o parecer de APROVAÇÃO da NOTIFICAÇÃO enviada – relatório final - emitido pelo Colegiado do CEP/HULW, em Reunião Ordinária realizada no dia 12 de maio de 2020.

Favor acessar o PARECER CONSUBSTANCIADO na Plataforma Brasil (o qual encontra-se nos arquivos do seu protocolo de pesquisa na Plataforma Brasil), documento necessário para apresentar aos meios de publicação/divulgação do estudo realizado. O Manual Funcionalidades da Aba Pesquisador na Plataforma Brasil, contém instruções de como localizar o parecer. O CEP/HULW parabeniza o(a) pesquisador(a)!

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório Final	Relatorio.pdf	13/05/2020 12:15:32	José Luiz de Brito Alves	Postado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JOAO PESSOA, 18 de Maio de 2020

Assinado por:
Caliandra Maria Bezerra Luna Lima
(Coordenador(a))

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 58.059-900
UF: PB **Município:** JOAO PESSOA
Telefone: (83)3216-7964 **Fax:** (83)3216-7522 **E-mail:** comitedeetica.hulw2018@gmail.com