



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE BACHARELADO EM FÁRMACIA**

BRUNO VINICIUS DA SILVA MOURA

EFEITO ANTIALÉRGICO DO PROBIÓTICO *LACTICASEIBACILLUS PARACASEI* NA SÍNDROME DA ASMA E RINITE ALÉRGICA COMBINADAS (CARAS) EXPERIMENTAL

João Pessoa – PB

2024

BRUNO VINICIUS DA SILVA MOURA

EFEITO ANTIALÉRGICO DO PROBIÓTICO *LACTICASEIBACILLUS PARACASEI* NA SÍNDROME DA ASMA E RINITE ALÉRGICA COMBINADAS (CARAS) EXPERIMENTAL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Farmácia do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Regina Piuvezam

Coorientadora: Dra. Raquel Fragoso Pereira Cavalcanti

João Pessoa - PB

2024

**Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação**

M929e Moura, Bruno Vinicius da Silva.

Efeito antialérgico do probiótico Lacticaseibacillus paracasei na Síndrome da Asma e Rinite Alérgica Combinadas (CARAS) experimental / Bruno Vinicius da Silva Moura. - João Pessoa, 2024.

51 f. : il.

Orientação: Marcia Regina Piuvezam.

Coorientação: Raquel Fragoso Pereira Cavalcanti.
TCC (Graduação) - UFPB/CCS.

1. Farmacologia. 2. Resposta TH2. 3. IgE. 4. Probióticos. 5. IFN- γ . 6. Imunomodulação. I. Piuvezam, Marcia Regina. II. Cavalcanti, Raquel Fragoso Pereira. III. Título.

UFPB/CCS

CDU 615(043.2)

BRUNO VINICIUS DA SILVA MOURA

EFEITO ANTIALÉRGICO DO PROBIÓTICO *LACTICASEIBACILLUS PARACASEI* NA SÍNDROME DA ASMA E RINITE ALÉRGICA COMBINADAS (CARAS) EXPERIMENTAL

Aprovado em 17 de outubro de 2024.

Documento assinado digitalmente
gov.br MARCIA REGINA PIUVEZAM
Data: 22/10/2024 10:29:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Orientadora – Profa. Dra. Marcia Regina Piuvezam
Universidade Federal da Paraíba – UFPB

Documento assinado digitalmente
gov.br RAQUEL FRAGOSO PEREIRA CAVALCANTI
Data: 24/10/2024 12:19:40-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Coorientadora - Dra. Raquel Fragoso Pereira Cavalcanti
Universidade Federal da Paraíba – UFPB

Documento assinado digitalmente
gov.br NAIARA NAIANA DEJANI
Data: 24/10/2024 11:58:19-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinador I – Profa. Dra. Naiara Naiana Dejani
Universidade Federal da Paraíba – UFPB

Documento assinado digitalmente
gov.br ADRIANO FRANCISCO ALVES
Data: 22/10/2024 15:51:34-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinador II – Prof. Dr. Adriano Francisco Alves
Universidade Federal da Paraíba – UFPB

**João Pessoa - PB
2024**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha mãe Edvânia da Silva Moura pelo amor incondicional, apoio emocional e compreensão durante toda a jornada acadêmica.

À minha orientadora Márcia Regina Piuvezam pela orientação dedicada, paciência e conhecimento compartilhado, fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho e por ter me dado a grande oportunidade de fazer parte do Laboratório de Imunofarmacologia da UFPB (LIMFA).

À minha coorientadora Raquel Fragoso e a Francisco Allysson por todo o suporte e orientação durante meus anos de iniciação científica no LIMFA, que foi de valor imensurável para minha formação acadêmica.

A todos os alunos e professores participantes do LIMFA que tive oportunidade de conhecer durante minha jornada acadêmica, por fazer desse espaço não apenas um ambiente de pesquisa e aprendizado, mas um lugar onde os alunos se sintam valorizados, capacitados e motivados a contribuir com a ciência.

Agradeço também aos professores e professoras que contribuíram com seus ensinamentos ao longo da minha formação.

Aos amigos e colegas de curso, especialmente aos que frequentavam diariamente o centro acadêmico de Farmácia, pelo incentivo mútuo e troca de experiências que enriqueceram minha trajetória acadêmica. Também gostaria de agradecer a todos os amigos e colegas de outros cursos que pude conhecer graças às vivências na UFPB.

Gostaria de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos, a Universidade Federal da Paraíba e a instituição Servier Medical Art pelos recursos fornecidos para elaboração desse trabalho, sejam recursos humanos, financeiros ou acadêmicos, e pelo estímulo ao desenvolvimento científico e profissional.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A Síndrome da Asma e Rinite Alérgica Combinadas (CARAS) é uma doença crônica que acomete o sistema respiratório, trata-se da coexistência da asma e rinite alérgica no mesmo indivíduo. Sua patogênese é caracterizada por uma resposta imune do tipo 2 (T_H2), caracterizada por eosinofilia e aumento dos níveis séricos de imunoglobulina E alérgeno específica (IgE). Evidências demonstram que a microbiota pulmonar e intestinal possui importante papel na homeostase do sistema imunológico e que o uso emergente de probióticos acarreta efeitos antialérgicos. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito da suplementação oral com *Lacticaseibacillus paracasei* (*Lp*) em modelo de CARAS experimental. Camundongos BALB/c fêmeas (n=5) foram sensibilizados com ovalbumina (OVA, 5mg/mL), desafiados com OVA (5% em solução salina), suplementados por via oral com *Lp* (1 x 10⁹ UFC) ou tratados com dexametasona (2mg/kg), uma hora antes de cada desafio antigênico. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo CEUA/UFPB (7316150420). Os animais alérgicos e suplementados com o *Lp* apresentaram diminuição nos níveis séricos de IgE OVA-específica ($p < 0,001$) e das citocinas IL-4 e IL-13 ($p < 0,001$) dependente do aumento nos níveis de IFN- γ ($p < 0,01$). Em adição, a suplementação com *Lp* reduziu os sinais clínicos da rinite alérgica como espirros e fricções nasais, e a hiper-reatividade à histamina. No pulmão dos animais alérgicos e suplementados com o *Lp*, constatou-se atenuação dos aspectos histológicos alterados tais como redução do infiltrado celular, diminuição da deposição de muco e da deposição de matriz extracelular. Portanto, os resultados preliminares obtidos nesse estudo indicam que o probiótico *Lacticaseibacillus paracasei* apresenta efeito antialérgico, promovendo desvio de resposta imune do tipo T_H2 para o tipo T_H1 e, consequentemente, melhora dos sinais clínicos, bem como do aspecto histológico pulmonar, característicos da fisiopatologia da CARAS.

Palavras-chave: Resposta T_H2; IgE; Probióticos; IFN- γ ; Imunomodulação.

ABSTRACT

Combined Allergic Rhinitis and Asthma Syndrome (CARAS) is a chronic disease that affects the respiratory system, characterized by the coexistence of asthma and allergic rhinitis in the same individual. Its pathogenesis is marked by a type 2 immune response (T_H2), characterized by eosinophilia and increased serum levels of allergen-specific immunoglobulin E (IgE). Evidence suggests that pulmonary and intestinal microbiota play a significant role in the homeostasis of the immune system, and the emerging use of probiotics has shown antiallergic effects. Therefore, the objective of this study was to investigate the effect of oral supplementation with *Lacticaseibacillus paracasei* (*Lp*) in an experimental CARAS model. Female BALB/c mice (n=5) were sensitized with ovalbumin (OVA, 5 mg/mL), challenged with OVA (5% in saline solution), and supplemented orally with *Lp* (1 x 10⁹ CFU) or treated with dexamethasone (2 mg/kg), one hour before each antigen challenge. The experimental protocols were approved by the CEUA/UFPB (7316150420). The allergic animals supplemented with *Lp* showed a decrease in serum levels of OVA-specific IgE (p < 0.001) and the cytokines IL-4 and IL-13 (p < 0.001), associated with increased levels of IFN- γ (p < 0.01). Additionally, *Lp* supplementation reduced clinical signs of allergic rhinitis such as sneezing and nasal rubbing, as well as histamine hyperreactivity. In the lungs of allergic animals supplemented with *Lp*, there was attenuation of altered histological aspects, such as reduced cellular infiltrate, decreased mucus deposition, and reduced extracellular matrix deposition. Therefore, the preliminary results obtained in this study indicate that the probiotic *Lacticaseibacillus paracasei* has an antiallergic effect, promoting a shift in the immune response from T_H2 to T_H1 type and consequently improving clinical signs and the histological aspects of the lungs, characteristic of the pathophysiology of CARAS.

Keywords: T_H2 response; IgE; Probiotics; IFN- γ ; Immunomodulation.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Esquema dos mecanismos fisiopatológicos na CARAS..... | 17 |
| Figura 2 - Esquema dos mecanismos de ação dos probióticos..... | 20 |
| Figura 3 - Protocolo experimental..... | 26 |
| Figura 4 - Fotomicrografias representativas do pulmão dos camundongos suplementados com <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> (<i>Lp</i>) e corados com Hematoxilina Eosina (HE), Ácido Periódico de Schiff (PAS) ou Tricômico de Masson (TM)..... | 38 |
| Figura 5 - Mapa conceitual dos efeitos do probiótico <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> (<i>Lp</i>) em modelo de Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS) experimental..... | 44 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|--|----|
| Gráfico 1 - Efeito da suplementação com <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> (<i>Lp</i>) no nível sérico de IgE OVA-específica de camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS)..... | 30 |
| Gráfico 2 - Efeito da suplementação <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> (<i>Lp</i>) nos níveis das citocinas do perfil TH2 (IL-4 (A) e IL-13 (B)) no BALF de camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS)..... | 31 |
| Gráfico 3 - Efeito da suplementação com <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> (<i>Lp</i>) nos níveis das citocinas do perfil TH1 (IFN- γ) no BALF de camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS)..... | 32 |
| Gráfico 4 - Efeito da suplementação com <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> (<i>Lp</i>) na quantificação de espirros (A) e fricções nasais (B) em camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS)..... | 33 |
| Gráfico 5 - Efeito da suplementação com <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> (<i>Lp</i>) na quantificação de espirros (A) e fricções nasais (B) em camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS) após administração de doses crescentes de histamina..... | 36 |
| Gráfico 6 - Morfometria do pulmão dos camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS) suplementados com <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> (<i>Lp</i>)..... | 38 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCCs: ácidos graxos de cadeia curta

ANOVA: análise de variância

BALF: fluido do lavado broncoalveolar

CARAS: síndrome da asma e rinite alérgicas combinadas

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DCs: células dendríticas

Dexa: dexametasona

FB: fibroblastos

Fc ϵ RI: receptores de alta afinidade I

GATA-3: fator de transcrição de ação trans específicos de células T do tipo 2

GPCRs: receptores acoplados à proteína G

HE: hematoxilina eosina

IFN- γ : interferon-gama

IgA: imunoglobulina A

IgE: imunoglobulina E

IL: interleucina – (4, 5, 13, 25, 33)

ILC-2: células linfóides inatas do grupo 2

Lp: *Lacticaseibacillus paracasei*

LIKA: Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

M2: macrófago do tipo 2

MAMPs: padrões moleculares associados ao micro-organismo

MHC-II: complexo principal de histocompatibilidade classe 2

OVA: ovalbumina

PAS: ácido periódico de shiff

PBS: phosphate buffered saline

PRRs: receptores de reconhecimento padrão

RA: rinite alérgica

STAT-6: transdutor de sinal e ativador de transcrição 6

TGF-β: fator de crescimento e transformação β

TLRs: receptores toll-like

TM: tricômico de masson

TSLP: linfopoetina do estroma tímico

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 12 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 14 |
| 2.1 Origem e definição da CARAS | 14 |
| 2.2 Mecanismos fisiopatológicos e regulatórios da CARAS | 15 |
| 2.3 Tratamento da CARAS | 17 |
| 2.4 Microbiota intestinal e probióticos | 18 |
| 2.5 Mecanismos de ação dos probióticos | 19 |
| 2.6 Relação entre a microbiota intestinal e vias aéreas | 21 |
| 2.7 <i>Lacticaseibacillus paracasei</i>..... | 21 |
| 3 OBJETIVOS..... | 23 |
| 3.1 Objetivo geral | 23 |
| 3.2 Objetivos específicos | 23 |
| 4 METODOLOGIA..... | 24 |
| 4.1 Obtenção e preparo do <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> (<i>Lp</i>) | 24 |
| 4.2 Animais | 24 |
| 4.3 Grupos experimentais..... | 25 |
| 4.4 Protocolo experimental de CARAS | 25 |
| 4.5 Quantificação de IgE | 26 |
| 4.6 Quantificação de citocinas (IL-4, IL-13 e IFN-γ) | 26 |
| 4.7 Quantificação dos sinais clínicos..... | 27 |
| 4.8 Avaliação da hiper-reatividade nasal induzida por histamina..... | 27 |
| 4.9 Avaliação histológica e morfometria do pulmão | 27 |
| 4.10 Análise estatística | 28 |

| | |
|--|-----------|
| 5 RESULTADOS | 30 |
| 5.1 <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> (<i>Lp</i>) reduz níveis sérico de IgE OVA-específica em camundongos com CARAS..... | 30 |
| 5.2 <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> (<i>Lp</i>) reduz os níveis das citocinas do perfil TH2 (IL-4 e IL-13) no BALF de camundongos com CARAS..... | 31 |
| 5.3 <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> (<i>Lp</i>) aumenta os níveis de citocina do perfil TH1 (IFN-γ) no BALF de camundongos com CARAS..... | 32 |
| 5.4 <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> (<i>Lp</i>) reduz sinais clínicos da rinite em camundongos com CARAS | 33 |
| 5.5 <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> (<i>Lp</i>) reduz hiper-reatividade nasal induzida por histamina em camundongos com CARAS | 35 |
| 5.6 Análise histológica pulmonar de camundongos com CARAS e suplementados com <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> (<i>Lp</i>)..... | 37 |
| 6 DISCUSSÃO..... | 40 |
| 7 CONCLUSÃO..... | 44 |
| REFERÊNCIAS..... | 45 |
| Anexo A | 50 |
| Anexo B | 51 |

1 INTRODUÇÃO

A Síndrome da Asma e Rinite Alérgica Combinadas (CARAS) é uma doença crônica que acomete o sistema respiratório, caracterizada pela coexistência de asma e rinite alérgica no mesmo indivíduo (Paiva Ferreira *et al.* 2019). A prevalência dessas doenças alérgicas tem aumentado globalmente, repercutindo na qualidade de vida da população (Tohidinik *et al.* 2019).

Estudos têm demonstrado haver relação epidemiológica e fisiopatológica entre asma e rinite alérgica. Epidemiologicamente, entre 70% e 90% dos indivíduos diagnosticados com asma possui rinite alérgica, enquanto 40% dos pacientes acometidos com rinite alérgica possui asma (Pawankar *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2019). Em termos fisiopatológicos, os indivíduos apresentam resposta imune do tipo 2 (T_H2), caracterizada por eosinofilia e níveis séricos aumentados de imunoglobulina E (IgE) alérgeno específica. A hiper-reatividade das vias aéreas e produção elevada de muco são características clínicas comuns nessas duas doenças (Bezerra Barros *et al.*, 2020).

Atualmente, a farmacoterapia utilizada para o tratamento da CARAS é baseada no uso de anti-histamínicos, descongestionantes nasais, broncodilatadores e corticosteroides. Entretanto, essas classes terapêuticas estão relacionadas à inúmeros efeitos colaterais e adversos, como sedação, taquicardia, retenção urinária e glaucoma, entre outros, dificultando a adesão terapêutica pelo paciente (Carlson, 2019). Logo, faz-se necessário a busca por novas abordagens terapêuticas para o manejo dessa síndrome.

Estudos têm mostrado que a microbiota pulmonar e intestinal possui um importante papel na homeostase do sistema imunológico, e que a disbiose ou alteração das cepas bacterianas no trato gastrointestinal e respiratório estão associadas ao desenvolvimento de doenças pulmonares (Ashique *et al.*, 2022). Nesse contexto, o uso emergente de bactérias ácido lácticas com potencial probiótico são uma opção promissora no manejo de doenças alérgicas inflamatórias crônicas (Garcia-Castillo *et al.*, 2018).

Na literatura, é visto que espécies do gênero *Lactobacillus* demonstram efeitos terapêuticos pela modulação da resposta imune, diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e promovendo resposta imune anti-inflamatória (Anatriello *et al.*, 2019; Kalliomäki *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2022). É provável que o efeito anti-inflamatório e a eficácia de bactérias ácido lácticas sejam resultado de uma combinação de vias de sinalização ativadas por um padrão específico de ligantes derivados do probiótico (MAMPs- Padrões Moleculares Associados ao Micro-organismo) que interagem com os receptores (PRRs- Receptores de Reconhecimento Padrão) presentes nas células hospedeiras (Samuelson; Welsh; Shellito, 2015). Contudo, os detalhes sobre os mecanismos exatos de ação pelo qual as células probióticas interagem com as células hospedeiras ainda não são completamente caracterizados (Sharma; Im, 2018).

Trabalhos anteriores demonstraram efeito antialérgico do probiótico *Lacticaseibacillus paracasei* (*Lp*) em estudo clínico de dermatite atópica, efeito também observado em modelo experimental de asma alérgica (Wang *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017). Diante do exposto, a suplementação com o *Lp* surge como alternativa promissora para a modulação da resposta imune na CARAS.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Origem e definição da CARAS

A asma alérgica (AA), é uma doença inflamatória crônica que acomete as vias aéreas inferiores, ocorre em resposta a alérgenos, tais como ácaros, pelos de animais, pólen e mofo, sendo caracterizada por obstrução e inflamação do pulmão, que resulta em sintomas como tosse, sibilância, aperto no peito e dificuldade respiratória (Gans, *et al.*, 2020; Paiva Ferreira *et al.*, 2019). Já a rinite alérgica (RA) é uma condição inflamatória crônica das mucosas nasais, que ocorre em resposta aos mesmos alérgenos da AA, sendo caracterizada por sintomas como congestão nasal, espirros, prurido e rinorreia, que causam redução da sensibilidade olfatória e disfunção da mucosa nasal (De Paula, *et al.*, 2024).

Essas duas condições estão intimamente relacionadas uma vez que acometem o sistema respiratório, compartilham os mesmos fatores de risco, como predisposição genética e sensibilidade a alérgenos ambientais; mesma fisiopatologia, sendo mediadas por IgE alérgeno específica, apresentando o mesmo perfil de células inflamatórias, e serem desencadeadas por desequilíbrio das respostas TH1 / TH2; apresentam o mesmo princípio terapêutico, como uso de anti-histamínicos, descongestionantes e corticosteroides (Paiva Ferreira *et al.*, 2021). Somado a isso, dados epidemiológicos demonstram que a AA acomete mais de 300 milhões de pessoas mundialmente, e destes, 70-90% possuem RA. Enquanto a RA acomete mais de 400 milhões de pessoas, e destes, 40% possuem AA (Pawankar *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2019; Chiu *et al.*, 2021; Hoyte *et al.*, 2018).

Diante de tantas semelhanças fisiopatológicas entre a RA e AA e por ser, cada vez mais comum, que o mesmo indivíduo apresente ambas as doenças, levou-se a classificação de uma única doença que acomete o sistema respiratório, intitulada de Síndrome da Asma e Rinite Alérgica Combinadas (CARAS) (Paiva Ferreira *et al.*, 2019).

2.2 Mecanismos fisiopatológicos e regulatórios da CARAS

A CARAS se apresenta em indivíduos atópicos, ou seja, geneticamente predisponentes ao desenvolvimento de alergias (Paiva Ferreira *et al.*, 2019). O processo alérgico em indivíduos com CARAS ocorre de maneira mais exacerbada quando comparado a indivíduos que apresentam apenas uma condição, seja AA ou RA (Li *et al.*, 2016).

A fisiopatologia da CARAS é mediada por uma resposta imune TH2, que ocorre em três fases (Figura 1). Na fase de sensibilização, ocorre o primeiro contato do alérgeno com o indivíduo atópico, o qual adentra as mucosas do epitélio respiratório, estimulando células epiteliais a liberarem IL-33, IL-25 e Linfopoetina do Estroma Tímico (TSLP), por consequência, induzindo a produção de IL-13 e IL-5 por células linfoides inatas do tipo 2 (ILC-2) e ativação de células dendríticas (DCs) responsáveis por reconhecer o alérgeno (Eifan; Durham, 2016; Li *et al.*, 2016). As DCs se direcionam aos linfonodos para apresentar peptídeos alergênicos, via molécula do Complexo Maior de Histocompatibilidade de Classe 2 (MHC-II), aos linfócitos T CD4⁺ virgens, que polarizam para o perfil TH2 na presença de IL-4, com ativação dos fatores de transcrição GATA-3 (fator de transcrição de ação trans específicos de células T do tipo 3) e STAT-6 (transdutor de sinal e ativador de transcrição 6). Os linfócitos TH2 produzem IL-4, IL-13 e IL-5 (citocinas típicas do perfil TH2) promovendo a diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos produtores de IgE alérgeno específica, a qual se ligam aos seus receptores de alta afinidade I (FcεRI) presentes em mastócitos, basófilos e eosinófilos (Nasr *et al.*, 2017; Holgate *et al.*, 2015).

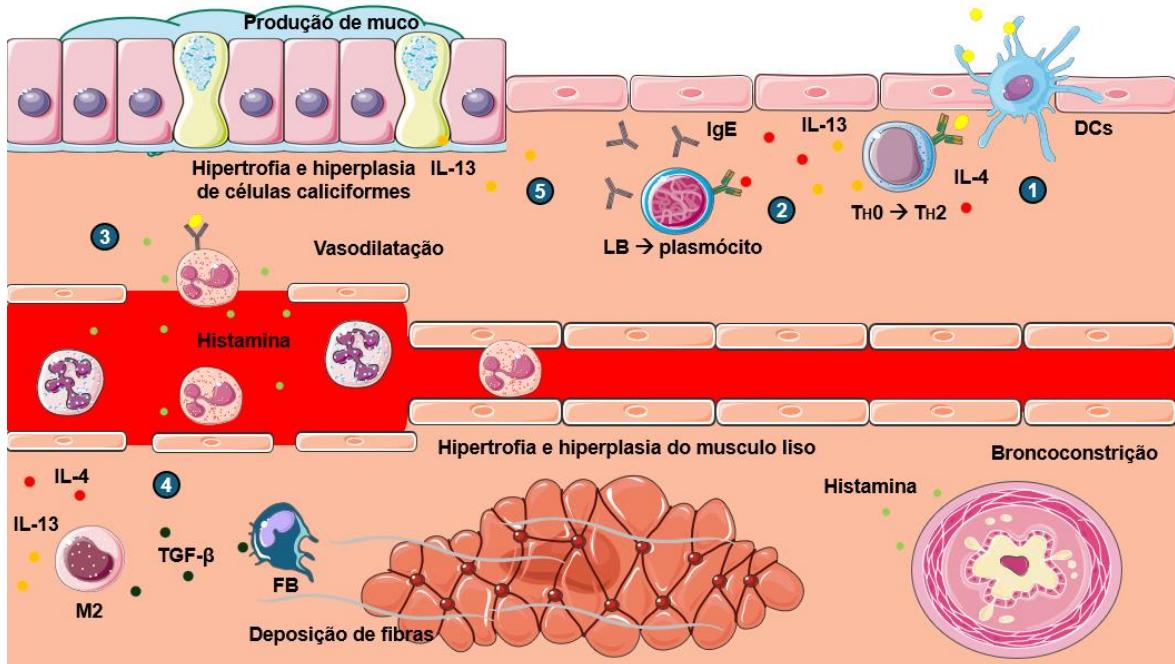
Na fase de reação imediata, o alérgeno se liga ao complexo IgE–FcεRI, provocando a liberação de mediadores pré-estocados, como a histamina, e formação como prostaglandinas e leucotrienos dentre outros mediadores inflamatórios. A histamina, por ser um dos primeiros mediadores liberados pelas células inflamatórias, possui papel central na fisiopatologia da CARAS, sendo responsável por provocar efeitos como: vasodilatação local; aumento da permeabilidade vascular; migração de mais células inflamatórias para as vias

aéreas e broncoconstricção. Em adição, esse mediador atua em terminações nervosas sensoriais, originando sintomas nasais, como espirros, prurido, congestão e corrimento nasal (Watts *et al.*, 2019; Xu; Zhang; Wang, 2014).

Na fase de reação tardia, acontece a manutenção do processo inflamatório TH2 e cronicidade da CARAS, contando com a participação de diversas células e mediadores inflamatórios. A IL-4 e a IL-13 são as principais responsáveis pela amplificação do processo inflamatório, uma vez que induzem macrófagos tipo 2 (M2) a produzir TGF- β , a qual ativa os fibroblastos a produzirem fibras colágenas que se depositam nas vias áreas, ocasionando fibrose tecidual (Boulet, 2018; Holgate *et al.*, 2015). Essas citocinas também são capazes de ativar diretamente os fibroblastos, resultando em hiperprodução de colágeno nas vias áreas, e promover hipertrófia e hiperplasia de células musculares lisas, levando a um quadro de hiper-reatividade das vias aéreas. A IL-13 também é responsável pela produção excessiva de muco, hiperplasia e hipertrófia de células caliciformes (Sakano *et al.*, 2018). Os eosinófilos também contribuem para o remodelamento das vias aéreas, e o seu acúmulo induz a ruptura da integridade do epitélio, originando o quadro de hiper-reatividade das vias aéreas (Boulet, 2018; George *et al.*, 2016).

A regulação da resposta imunológica na CARAS ocorre por mediação de diferentes perfis de células T, pela liberação de citocinas capazes de suprimir a resposta inflamatória exacerbada e processos de sensibilização do organismo a alérgenos. A produção de IFN- γ , citocina típica do perfil de resposta imune tipo TH1, está associada a inibição da resposta imune do tipo TH2, pela inibição da formação do fator de transcrição GATA-3 responsável por gerar células desse perfil, e a inibição da produção de IgE alérgeno específica (Ayakannu *et al.*, 2019; Anatriello *et al.*, 2019).

Figura 1 – Esquema dos mecanismos fisiopatológicos da CARAS.



Legenda: (1) Células apresentadoras de抗原s, como as células dendríticas (DCs) capturam os抗原s e os apresentam aos linfócitos TH0, que na presença da IL-4, polarizam para o perfil TH2. (2) Os linfócitos TH2 liberam IL-4 e IL-13 que induzem os linfócitos B a se diferenciarem em plasmócitos produtores de IgE alérgeno específica. (3) A reação cruzada que ocorre após o reconhecimento do alérgeno induz a liberação de histamina, provocando vasodilatação, aumento da permeabilidade celular, recrutamento de células inflamatórias para as vias aéreas e broncoconstricção. (4) As citocinas IL-4 e IL-13 estimulam os macrófagos M2 (M2) a produzir TGF-β, ativando fibroblastos (FB) que irão depositar fibras colágenas nas vias aéreas, ocasionando fibrose tecidual e remodelamento. Essas citocinas também levam a hipertrofia e hiperplasia das células musculares lisas e caliciformes. (5) A IL-13 é responsável por induzir a hiperprodução de muco nas vias aéreas.

Fonte: autoria própria.

2.3 Tratamento da CARAS

O tratamento da CARAS consiste em associações de medidas não farmacológicas, como evitar ambientes que haja exposição a alérgenos, e medidas farmacológicas, de acordo com a complexidade do quadro clínico do indivíduo acometido (Takkinsatian, *et al.*, 2022). Dentre as classes farmacoterapêuticas utilizadas, estão os descongestionantes nasais, anti-histamínicos, antagonistas de receptores de leucotrienos e corticosteroides. Todavia, os efeitos colaterais e adversos derivados do uso desses medicamentos prejudicam a qualidade de vida

dos pacientes, levando a desconforto, limitações nas atividades diárias e, em alguns casos, à interrupção do tratamento (Hoyte *et al.*, 2018; Paiva Ferreira *et al.*, 2019). Logo, é fundamental o desenvolvimento de pesquisas experimentais para a descoberta de novas alternativas terapêuticas que possam contribuir no tratamento da CARAS.

2.4 Microbiota intestinal e probióticos

O intestino humano é o lar de mais de 300 trilhões de bactérias simbióticas, além de diversos outros microrganismos, como fungos, vírus e protozoários, que juntos, constituem a microbiota (Oliveira *et al.*, 2021). O número de bactérias que habitam o intestino chega a ser superior ao número de células do hospedeiro, logo, são capazes de interferir em importantes funções metabólicas, imunológicas e nutricionais (Sales *et al.*, 2021). Manter a homeostase da microbiota é fundamental para obtenção de um intestino saudável, pois previne infecções e outras doenças. Diversos estudos já demonstraram correlação entre o desequilíbrio da microbiota e o surgimento de doenças, como desordens intestinais, sistêmicas, atopias, tumores e infecções oportunistas (Ma *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2021; Qiu *et al.*, 2022).

A microbiota também desempenha importante papel na digestão e absorção de nutrientes, fermentando fibras dietéticas insolúveis, sintetizando vitaminas essenciais, como as do complexo B e vitamina K, e influenciando na expressão de genes relacionados com o transporte e absorção de nutrientes ao longo do trato gastrointestinal (Woraprayote *et al.*, 2016). Além disso, a microbiota intestinal possui um papel essencial na modulação do sistema imune, interferindo na tolerância imunológica, na resposta inflamatória e na proteção contra patógenos (Wang *et al.*, 2023).

Devido aos benefícios já relatados na literatura, a eficácia e a segurança do uso, o consumo de probióticos, de venda livre para promover a saúde, cresceu nos últimos anos, sendo definidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas,

conferem benefícios à saúde do hospedeiro (WHO, 2006). Nesse contexto, destacam-se o uso de bactérias ácido-láticas e as bifidobactérias, como as espécies do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* sendo, atualmente, as mais comercializadas no mercado (Puupponen-Pimia *et al.*, 2002).

Os probióticos podem ser encontrados no mercado em forma de suplementos alimentares, alimentos funcionais e produtos farmacêuticos, e para isso, devem apresentar em sua composição uma ou mais cepas bacterianas bem caracterizadas, uma vez que os efeitos probióticos são específicos para cada cepa. Pesquisas recentes comprovam que o mercado global de probióticos fatura bilhões de euros anualmente, contribuindo para o crescimento dos estudos acerca de características específicas das cepas e montagem de uma base científica sólida, demonstrando o potencial terapêutico sobre a saúde humana (Behera; Panda, 2020).

2.5 Mecanismos de ação dos probióticos

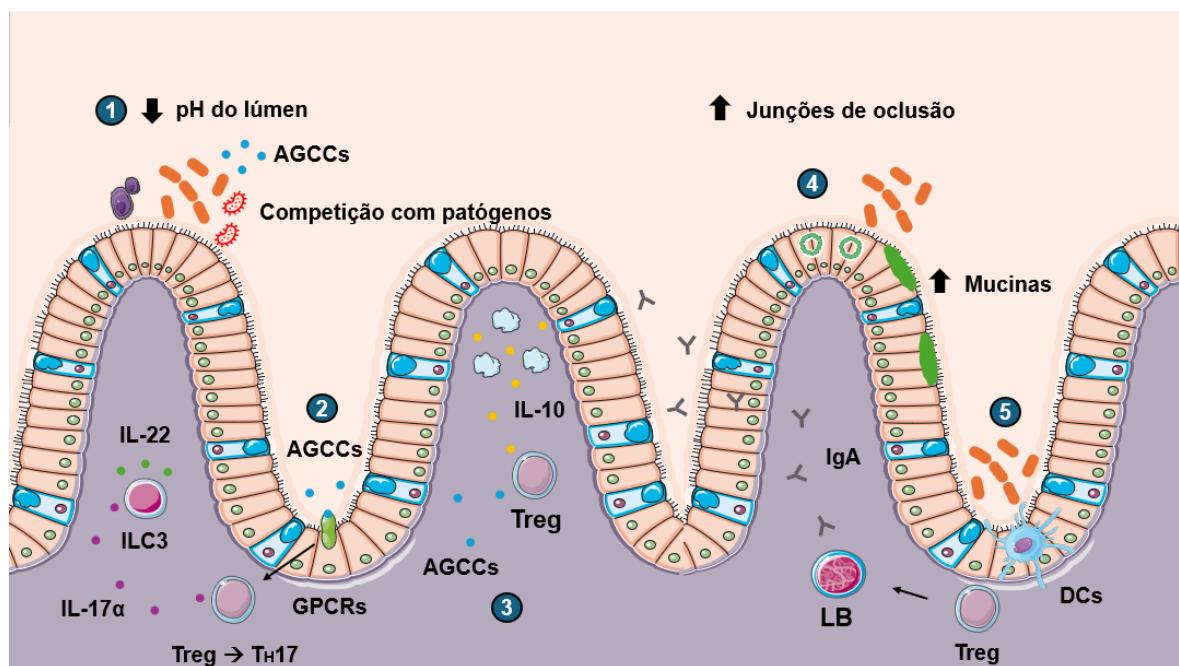
Os probióticos contribuem para manter a homeostase do organismo por diversos mecanismos. As bactérias ácido-láticas competem com bactérias patogênicas por nutrientes e sítios de adesão no trato gastrointestinal, e produzem ácidos orgânicos, como ácido lático e ácido acético, que reduzem o pH no lúmen intestinal, e como consequência, a acidificação do microambiente reduz o crescimento de patógenos, que se adaptam melhor ao pH neutro ou alcalino. Alguns probióticos podem ainda, produzir substâncias com propriedades antimicrobianas, como bacteriocinas e peróxido de hidrogênio (Wan *et al.*, 2015; Puupponen-Pimia *et al.*, 2002; Ashique *et al.*, 2022).

A interação dos probióticos com linfócitos T e as células dendríticas por meio de receptores toll-like (TLRs) geram efeitos imunomoduladores, principalmente pela regulação da produção de citocinas, conferindo uma resposta anti-inflamatória e um padrão tolerogênico (Maldonado., 2019; Mazziotta *et al.*, 2023). Eles também produzem ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), sendo os principais o acetato, o propionato e o butirato. Os AGCCs são capazes de ativar receptores acoplados

à proteína G (GPCRs) relacionados ao aumento da expressão das junções de oclusão, que mantêm as células intestinais unidas. Também estão relacionados à produção de mucinas, que são essenciais para manter a integridade da barreira intestinal (Ashique *et al.*, 2022), assim como favorecem a expressão de FoxP3 (Thorburn *et al.*, 2015). Alguns desses efeitos estão esquematizados na figura 2.

Processos de diferenciação, recrutamento e ativação de células imunes, como as células T, células dendríticas e macrófagos, também podem ser ativados por meio dos AGCCs produzidos pelos probióticos (Mazziotta *et al.*, 2023). A interação entre esses microrganismos e o sistema imune é complexa e envolve diferentes mecanismos, podendo variar de acordo com a cepa probiótica, composição da microbiota intestinal, dieta, uso de medicamentos e estilo de vida.

Figura 2 – Esquema dos mecanismos de ação dos probióticos.



Legenda: Os probióticos colonizam a mucosa intestinal e liberam ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) que (1) diminuem o pH intestinal, inibindo a adesão de patógenos. (2) Os AGCCs ativam receptores de proteína G (GPCRs) que estimulam a polarização dos Linfócitos T reguladores (Treg) para o perfil T_H17, produzindo IL-17 α que ativa Linfócitos inatos tipo 3 (ILC3) a produzir IL-22 (relacionada a manutenção da homeostase intestinal e promoção da cicatrização e regeneração tecidual). (3) Os AGCCs também estimulam as células Treg a produzirem IL-10 em processos inflamatórios crônicos. (4) Os probióticos também estimulam a produção de mucinas e aumentam a expressão de junções de oclusão, sendo fundamentais para a integridade da barreira epitelial. (5) A interação de células dendríticas com probióticos induz ativação de células Treg que estimulam linfócitos B a produzirem grandes quantidades de imunoglobulina A (IgA).

Fonte: adaptado de Lu *et al.*, 2021.

2.6 Relação entre a microbiota intestinal e vias aéreas

A relação entre a microbiota intestinal e as vias aéreas têm despertado um crescente interesse na comunidade científica, embora existam muitas lacunas a serem elucidadas. Estudos indicam que a disbiose (desequilíbrio da microbiota) pode influenciar no desenvolvimento de doenças que acometem as vias aéreas (Oliveira *et al.*, 2021). A comunicação entre esses sistemas é conhecida como eixo intestino-pulmão, e possui um importante papel na regulação da resposta imune no organismo, uma vez que o intestino é o maior órgão com função imune, que abriga a maior parte das células da imunidade adaptativa (Tang, 2015; Oliveira *et al.*, 2021).

É proposto na literatura que a modulação da resposta imune nas vias aéreas pela microbiota intestinal ocorre principalmente pela liberação de AGCCs, que exercem efeitos anti-inflamatórios ao interagir com receptores presentes nas células imunológicas, como os MAMPs (Samuelson; Welsh; Shellito, 2015). Contudo, os mecanismos imunomoduladores associados a regulação da homeostase das vias aéreas por bactérias ácido-láticas não são totalmente compreendidos. Logo, elucidar esses mecanismos pode trazer benefícios terapêuticos para doenças das vias aéreas.

2.7 *Lacticaseibacillus paracasei*

O *Lacticaseibacillus paracasei* é uma espécie de bactéria ácido láctica comumente encontrada no trato gastrointestinal humano, assim como em produtos alimentícios, principalmente os que são derivados do leite, como iogurtes e queijos. Esta espécie pode adaptar-se a uma diversidade de nichos ecológicos e possui alta tolerância a estresses ambientais (Torres-Miranda *et al.*, 2022). Uma grande diversidade de benefícios é descrita na literatura para cepas dessa bactéria, que

incluem desde atividade antimicrobiana à capacidade de imunomodulação do sistema imune (Bengoa *et al.*, 2021).

Um estudo demonstrou que o *Lp* foi capaz de reduzir a migração de células imunes e reduzir citocinas pró-inflamatórias, IL1- β e TNF- α , em modelo de diabetes tipo 1 experimental, melhorando a disfunção metabólica que ocorre nessa doença devido ao processo inflamatório crônico (Jongdee *et al.*, 2023). Outro estudo realizado em modelo experimental de dermatite atópica demonstrou que a administração oral de *Lp* reduziu os níveis séricos de IgE, aumentou a proporção de linfócitos T reguladores e a produção da citocina anti-inflamatória IL-10, reduzindo as lesões cutâneas características dessa doença (Kim *et al.*, 2020).

Em modelo experimental de asma alérgica exacerbada por PM 2.5 o *Lp* também demonstrou efeito antialérgico (Wang *et al.*, 2017). Outra linhagem de *Lp* KW3110 administrado oralmente em camundongos alérgicos à ovalbumina (OVA) demonstrou efeitos antialérgicos por modular as citocinas TH1 e TH2, via indução de IL-12 e inibição de IL-4 (Fujiwara *et al.*, 2004). Diante do exposto, o probiótico *Lp* apresenta grande potencial de regular o processo alérgico que ocorre na CARAS.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da suplementação oral com *Lacticaseibacillus paracasei* (*Lp*) em camundongos no modelo experimental da CARAS induzido por ovalbumina (OVA).

3.2 Objetivos específicos

- ❖ Investigar o efeito do *Lp* nos níveis séricos de imunoglobulina E (IgE) OVA-específico em animais com CARAS;
- ❖ Investigar o efeito do *Lp* nos níveis das citocinas do perfil TH2 (IL-4 e IL-13) e perfil TH1 (IFN- γ);
- ❖ Avaliar o efeito do *Lp* nos sinais clínicos em animais com CARAS;
- ❖ Avaliar o efeito do *Lp* na hiper-reatividade nasal induzida por histamina em animais com CARAS;
- ❖ Avaliar o efeito do *Lp* no pulmão de animais com CARAS.

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção e preparo do *Lacticaseibacillus paracasei* (*Lp*)

A cepa *Lacticaseibacillus paracasei* (LPc-G110) foi obtida de uma farmácia magistral (João Pessoa, PB, Brasil), acompanhada de seu certificado de análise (anexo 1) e previamente identificada por análise da sequência gênica 16S rRNA. Os animais receberam uma dose de *Lp* (1×10^7 UFC/ 0,2 mL PBS/ animal) administrada nos dias sete, seis e cinco antes da primeira sensibilização, que configura o dia zero do protocolo experimental. No período de sensibilizações, o *Lp* foi administrado uma hora antes da sensibilização nos dias zero ao dois e dias sete ao nove. No período de desafios, os animais também foram suplementados uma hora antes de cada desafio, totalizando 23 suplementações durante esse período (Anatriello *et al.*, 2019). Na figura 3 é ilustrado os dias em que foram realizadas as suplementações.

4.2 Animais

Camundongos isogênicos da linhagem BALB/c fêmeas, pesando de 20 a 25g, com idade entre 6 e 8 semanas foram utilizados nos experimentos. Os animais foram obtidos da unidade de produção animal (UPA) do laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), UFPE. Eles foram mantidos a uma temperatura de 22 ± 2 °C, em gaiolas de polipropileno e em ciclos de claro e escuro de 12 horas (6:00 as 18:00 claro e 18:00 as 6:00 escuro) com livre acesso a água, e alimentação a base de ração do tipo pellets durante todo o período experimental. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as orientações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), além de observar as exigências dispostas na Lei nº11794/2008. A eutanásia dos animais foi feita por meio de administração intraperitoneal de solução anestésica contendo 300 mg/kg de Ketamina e 30 mg/kg de Xilasina solução salina

(NaCl 0,9%). Este projeto foi aprovado pela Comité de Ética no Uso Animal (CEUA/UFPB) sob o protocolo de número 7316150420 (anexo 2).

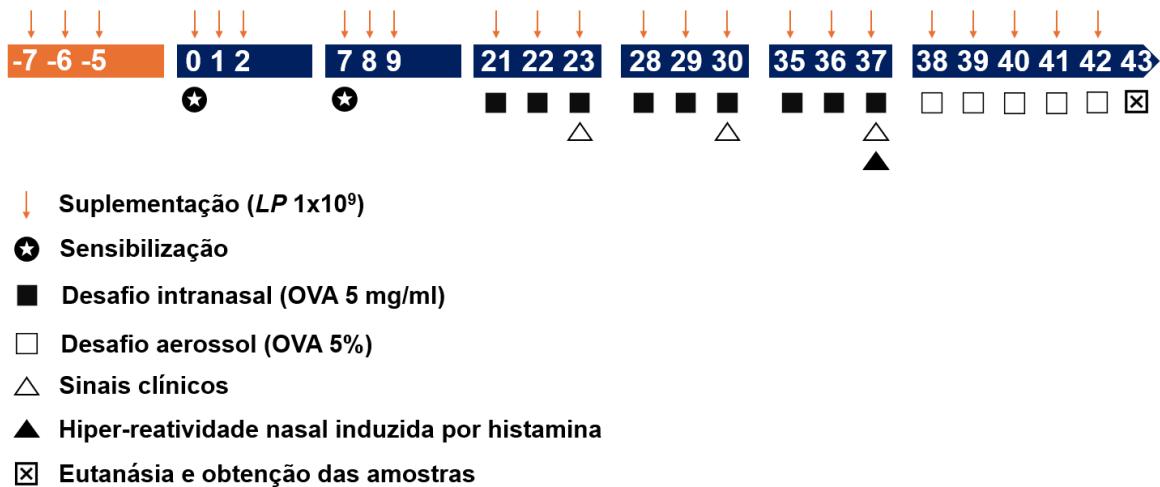
4.3 Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais (n=5), o grupo BASAL (animais saudáveis) corresponde a animais não sensibilizado e não desafiado com OVA. O grupo OVA (animais doentes) corresponde a animais sensibilizado e desafiado com OVA, apresentando o quadro fisiopatológico da CARAS. O grupo DEXA representa os animais sensibilizados com OVA e tratados por via oral com dexametasona (2mg/kg, DECADRON, Achê®), e o grupo *Lp* (*Lacticaseibacillus paracasei*) corresponde aos animais sensibilizados com OVA e suplementados com o *Lp* na dose de 1×10^9 UFC/0,2 mL PBS por via oral.

4.4 Protocolo experimental de CARAS

Nos dias 0 e 7 os camundongos foram sensibilizados com injeção de 10 μ L/g, intraperitoneal (i.p.), de uma suspensão contendo 50 μ g/mL de OVA grade V (Ovalbumina, SIGMA Chemical, St. Louis, MO) e 10 mg/mL de hidróxido de alumínio (VETEC, Rio de Janeiro, RJ) em solução salina. Durante 3 dias consecutivos, em 3 semanas consecutivas, dos dias 21 a 37, os animais foram desafiados por instilação nasal com uma solução de OVA-V (5mg/mL), foi administrado 20 μ L/ animal. A partir do 38º dia, por cinco dias consecutivos, os animais foram desafiados com aerossol de OVA grade II (SIGMA Chemical, St. Louis, MO) a 5% em solução salina. Os desafios foram realizados durante 30 minutos diários em uma câmara fechada, sob um fluxo contínuo de aerossol, com o auxílio de um nebulizador ultrassônico (Paiva Ferreira *et al.*, 2021). No 43º dia do protocolo, foi o desfecho do modelo experimental. A Figura 3 ilustra as etapas do protocolo experimental da CARAS.

Figura 3 - Protocolo experimental



Fonte: autoria própria.

4.5 Quantificação de IgE

A quantificação de IgE foi realizada no dia 43° do protocolo experimental, 24 horas após o último desafio, os camundongos de todos os grupos experimentais (basal, OVA, Dexa, *Lp*) foram anestesiados, e em seguida, foi realizado um corte no plexo braquial para a coleta do sangue. As amostras de sangue foram centrifugadas para obtenção do soro por 300 g, a 4°C por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram submetidas à técnica do Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para quantificação dos níveis séricos de IgE total e IgE OVA-específica seguindo as recomendações do Kit do fabricante (eBioscience®, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA).

4.6 Quantificação de citocinas (IL-4, IL-13 e IFN-γ)

No dia 43° do protocolo experimental, o BALF foi coletado com 1,5 mL de PBS gelado, injetado no pulmão do animal pela traqueia e foi transferido para microtubos e armazenados em isopor refrigerado. Os microtubos foram centrifugados (centrífuga CR422, JONAM) a 300 g, em uma temperatura de 4 °C,

por 6 minutos (Paiva Ferreira *et al.*, 2021). Os sobrenadantes foram separados e congelados no freezer a uma temperatura de -20°C para dosagem de citocinas quantificadas pelo método imunoenzimático ELISA, de acordo com as recomendações do Kit do fabricante (BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA).

4.7 Quantificação dos sinais clínicos

Os sinais clínicos nasais, espirros e fricções nasais, foram quantificados por 10 minutos, em cada camundongo de cada grupo nos dias 23º, 30º e 37º do protocolo, imediatamente após o desafio com OVA (Paiva Ferreira *et al.*, 2021).

4.8 Avaliação da hiper-reatividade nasal induzida por histamina

A hiper-reatividade nasal à histamina foi estabelecida pela quantificação, durante 10 minutos, dos sinais clínicos espirro e fricção nasal, após a aplicação de doses crescentes de histamina (Sigma-Aldrich®) diluída em solução salina, na cavidade nasal dos camundongos. No dia 37º, uma hora após o desafio com o alérgeno, foi utilizado quatro microlitros de doses crescentes de histamina (0,1, 1, 10, 100 e 1000 nmol/ animal) na instilação intranasal de maneira consecutiva em intervalos de 60 minutos (Cavalcanti *et al.*, 2023).

4.9 Avaliação histológica e morfometria do pulmão

No último dia do protocolo experimental, o pulmão foi coletado e fixado em formalina tamponada por 48 horas. O material histológico foi inicialmente desidratado por imersões de 1 hora em concentrações crescentes de álcool etílico a 70, 80, 90 e 100%. Em seguida, foi realizada a diafanização, onde o material foi

imerso duas vezes em xanol com duração de 1 h, cada imersão. Posteriormente, o material foi imerso em 2 banhos de parafina líquida mantida a temperatura de 56ºC, por um período de 1 hora. Após impregnação pela parafina, o material histológico foi emblocado. Os blocos solidificados foram retirados das formas e, em seguida, foram realizados os cortes histológicos no micrótomo, na espessura de 4 μm .

Após a microtomia, as fitas foram colocadas em banho-maria e “pescadas” com auxílio das lâminas. Em seguida, as lâminas foram reservadas para secagem. Após a adesão dos cortes às lâminas, eles foram corados com hematoxilina-eosina (HE) para análise do infiltrado inflamatório, ácido periódico de Schiff (PAS) para quantificação de mucinas neutras produzidas pelas células caliciformes e tricrômico de Masson (TM) para quantificação da deposição da matriz extracelular (MEC). As fotomicrografias foram capturadas pela câmera Nikon DS-Ri2 acoplada ao microscópio (Nikon Eclipse Ci®) e o software NIS-Element D. As imagens foram calibradas no programa ks300.

Os cortes histológicos corados com Hematoxilina e Eosina (HE), pelo Tricrômico de Masson ou positivos para a reação histoquímica pelo Ácido Periódico de Schiff, foram visualizados por microscopia de luz na objetiva de 40X, e foram digitalizadas 15 imagens aleatórias utilizando o mesmo microscópio e microcâmera, analisados em cada tipo de reação. Todo o interstício foi excluído da análise utilizando ferramentas do programa. Todos os tipos de pixels das lesões envolvidas foram selecionados para a criação de uma imagem binária e cálculo da área em μm^2 . Em cada imagem foram selecionados todos os pixels com tons de azuis (Tricrômico de Masson) ou Roxos - Bonina (Ácido Periódico de Schiff) para a criação de uma imagem binária, processamento digital e cálculo da área em μm^2 . A área da matriz extracelular ou das mucinas neutras foram calculadas por meio de algoritmos construídos pelo software Image-Pro Plus versão 4.5.0.29.

4.10 Análise estatística

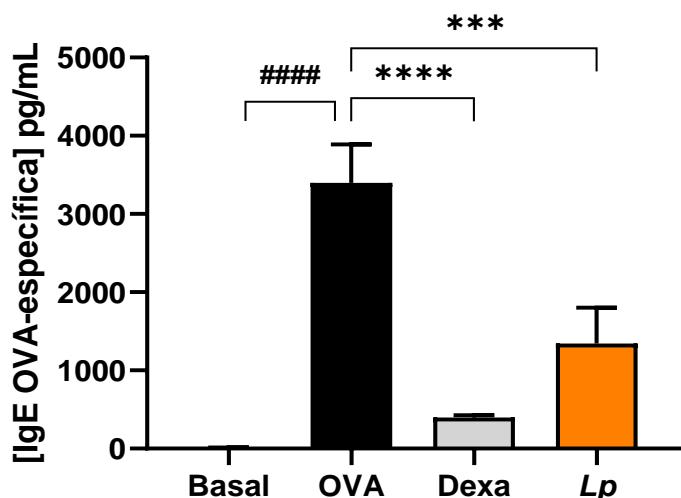
Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (e.p.m.) e analisados estatisticamente utilizando análise de variância (ANOVA one-way), seguido de pós-teste de Tukey para comparação múltipla entre os grupos experimentais. Os valores foram considerados significativos quando os valores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

5 RESULTADOS

5.1 *Lacticaseibacillus paracasei* (*Lp*) reduz níveis sérico de IgE OVA-específica em camundongos com CARAS

O grupo OVA ($p < 0,0001$) apresentou aumento nos níveis séricos de IgE OVA-específica em comparação ao grupo basal. A suplementação com o *Lp* ($p < 0,001$) reduziu em 60% os níveis IgE de OVA-específica quando comparado ao grupo OVA. O tratamento com dexametasona também reduziu os níveis séricos de IgE OVA-específica ($p < 0,0001$) (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Efeito da suplementação com *Lacticaseibacillus paracasei* (*Lp*) nos níveis séricos de IgE OVA-específica de camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgica Combinadas (CARAS).



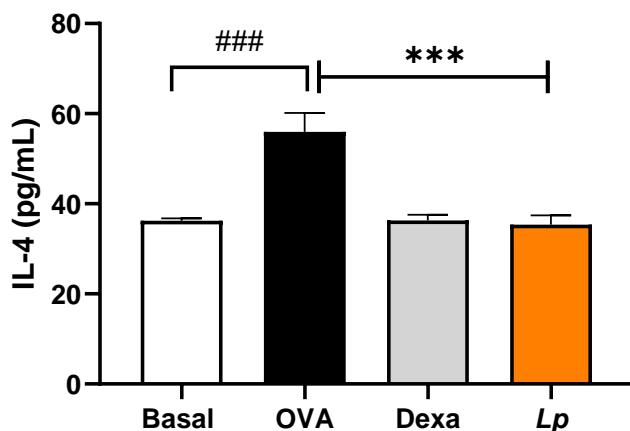
As colunas e barras verticais representam a média e o erro padrão da média (e.p.m.) respectivamente. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada pelo ANOVA one-way seguido do pós-teste de Tukey (concentração de IgE OVA-específica vs. grupo experimental). Os camundongos BALB/c ($n= 5$) foram distribuídos em grupos: Basal (animais saudáveis); OVA (animais doentes por ovalbumina); Dexa (droga padrão, dexametasona 2 mg/kg); e *Lp* (animais suplementados com *Lacticaseibacillus paracasei* 1×10^9 UFC). $###p < 0,0001$ (OVA vs. basal); $****p < 0,0001$ (OVA vs. Dexa); $***p < 0,001$ (OVA vs. *Lp*).

5.2 *Lacticaseibacillus paracasei* (*Lp*) reduz os níveis das citocinas do perfil TH2 (IL-4 e IL-13) no BALF de camundongos com CARAS

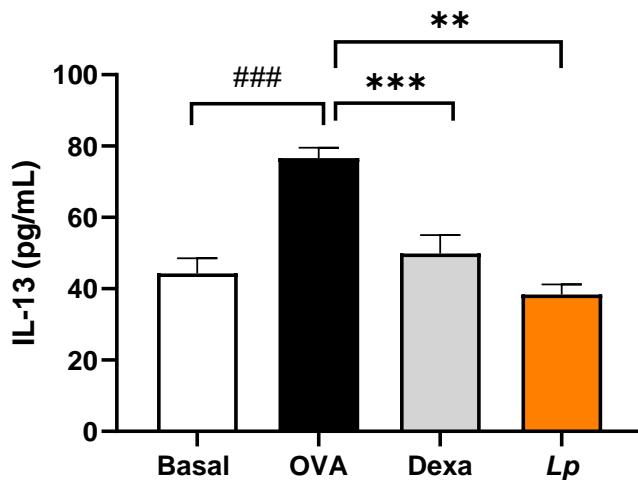
No grupo OVA, os níveis de IL-4 ($p < 0,001$) (Gráfico 2A) e IL-13 ($p < 0,001$) (Gráfico 2B) do BALF aumentaram quando comparados com os dos animais do grupo basal. A suplementação com o *Lp* ($p < 0,001$) reduziu os níveis de IL-4 e IL-13 em comparação ao grupo OVA em 37% e 50%, respectivamente. Em adição, a dexametasona ($p < 0,001$) também reduziu os níveis dessas citocinas (Gráfico 2A e 2B, respectivamente).

Gráfico 2 - Efeito da suplementação *Lacticaseibacillus paracasei* (*Lp*) nos níveis das citocinas do perfil TH2 (IL-4 (A) e IL-13 (B)) no BALF de camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgica Combinadas (CARAS).

A



B

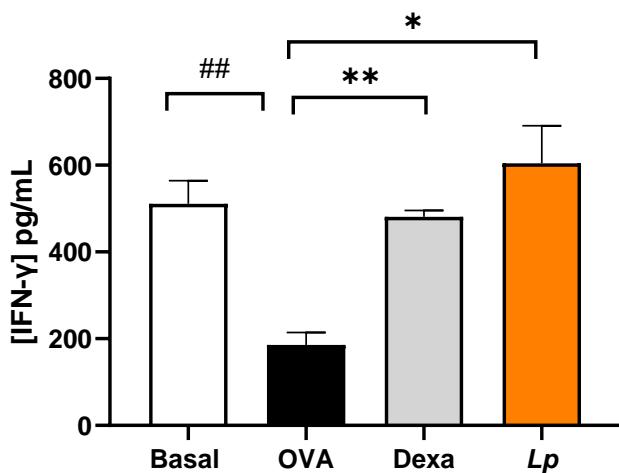


As colunas e barras verticais representam a média e o erro padrão da média (e.p.m.) respectivamente. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada pelo ANOVA one-way seguido do pós-teste de Tukey (IL-4 (A) e IL-13 (B) vs. grupo experimental). Os camundongos BALB/c ($n=5$) foram distribuídos em grupos: Basal (animais saudáveis); OVA (animais doentes por ovalbumina); Dexa (droga padrão, dexametasona 2 mg/kg) e *Lp* (animais suplementados com *Lacticaseibacillus paracasei* 1×10^9 UFC). $###p < 0,001$ (OVA vs. basal); $***p < 0,001$ (OVA vs. Dexa e *Lp*); $**p < 0,01$ (OVA vs. Dexa).

5.3 *Lacticaseibacillus paracasei* (*Lp*) aumenta os níveis de citocina do perfil TH1 (IFN- γ) no BALF de camundongos com CARAS

No grupo OVA, os níveis de IFN- γ ($p < 0,01$) no BALF dos animais estavam reduzidos em comparação com os animais do grupo basal. A suplementação com o *Lp* ($p < 0,001$) aumentou os níveis de IFN- γ em 226% em comparação ao grupo OVA. A dexametasona também aumentou significativamente os níveis dessa citocina nos animais com CARAS (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Efeito da suplementação com *Lacticaseibacillus paracasei* (*Lp*) nos níveis das citocinas do perfil TH1 (IFN- γ) no BALF de camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgica Combinadas (CARAS).



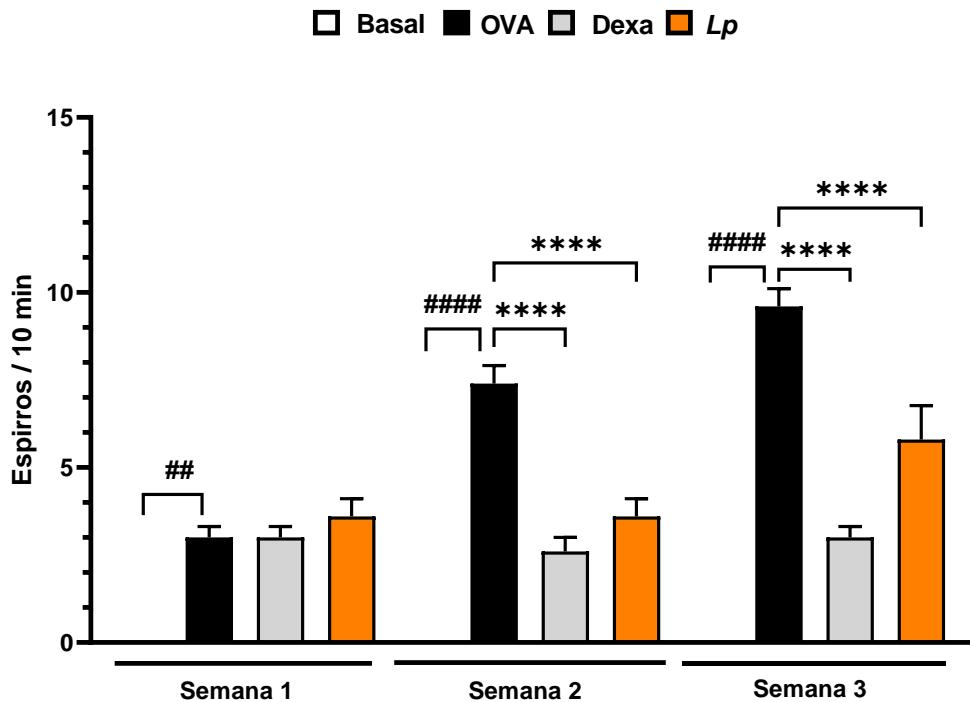
As colunas e barras verticais representam a média e o erro padrão da média (e.p.m.) respectivamente. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada pelo ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey* (IFN-γ vs. grupo experimental). Os camundongos BALB/c (n= 5) foram distribuídos em grupos: Basal (animais saudáveis); OVA (animais doentes por ovalbumina); Dexa (droga padrão, dexametasona 2 mg/kg) e *Lp* (animais suplementados com *Lacticaseibacillus paracasei* 1 x 10⁹ UFC). **p < 0,01 (OVA vs. basal); ***p < 0,001(OVA vs. Dexa e *Lp*); *p < 0,01(OVA vs. Dexa e *Lp*).

5.4 *Lacticaseibacillus paracasei* (*Lp*) reduz sinais clínicos da rinite em camundongos com CARAS

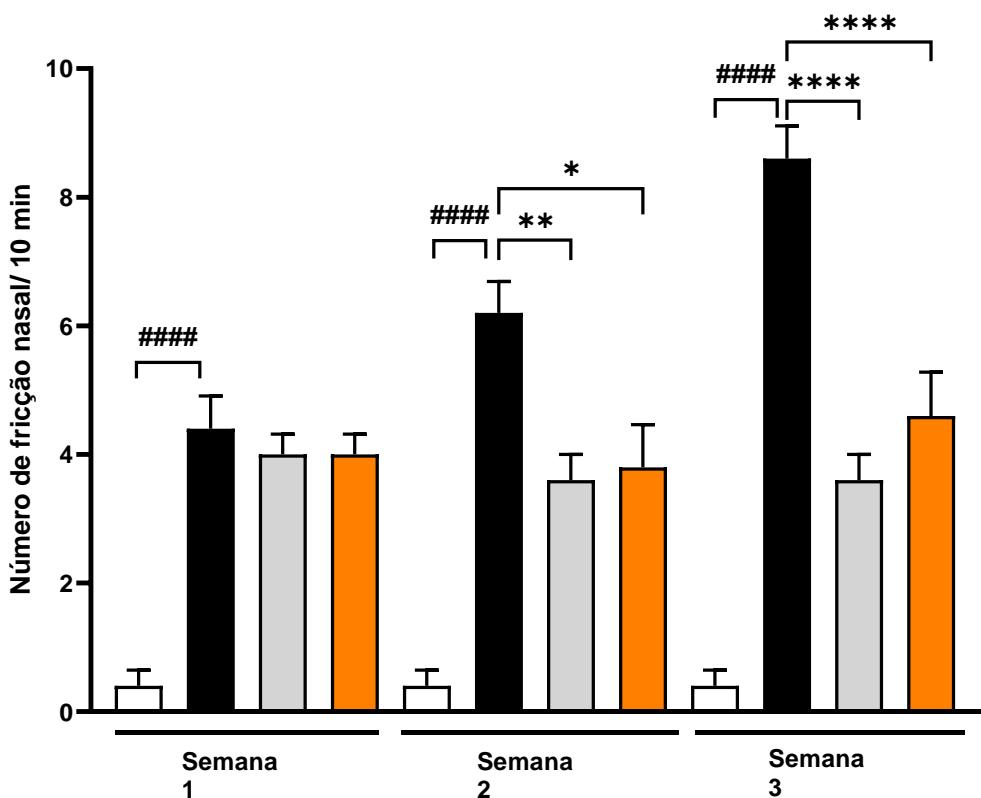
No grupo OVA, os números de espirros (p < 0,0001) (Gráfico 4A) e de fricções nasais (p < 0,0001) (Gráfico 4B) aumentaram em comparação com os animais do grupo basal. A suplementação com o *Lp* reduziu o número de espirros em 40% (p < 0,001) (Gráfico 4A) e o número de fricções nasais em 47% em comparação ao grupo OVA (p < 0,01) (Gráfico 4B). Observou-se redução significativa no número de espirros e fricções nasais no grupo Dexa, como esperado.

Gráfico 4 - Efeito da suplementação com *Lacticaseibacillus paracasei* (*Lp*) na quantificação de espirros (A) e fricções nasais (B) em camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgica Combinadas (CARAS)

A



B



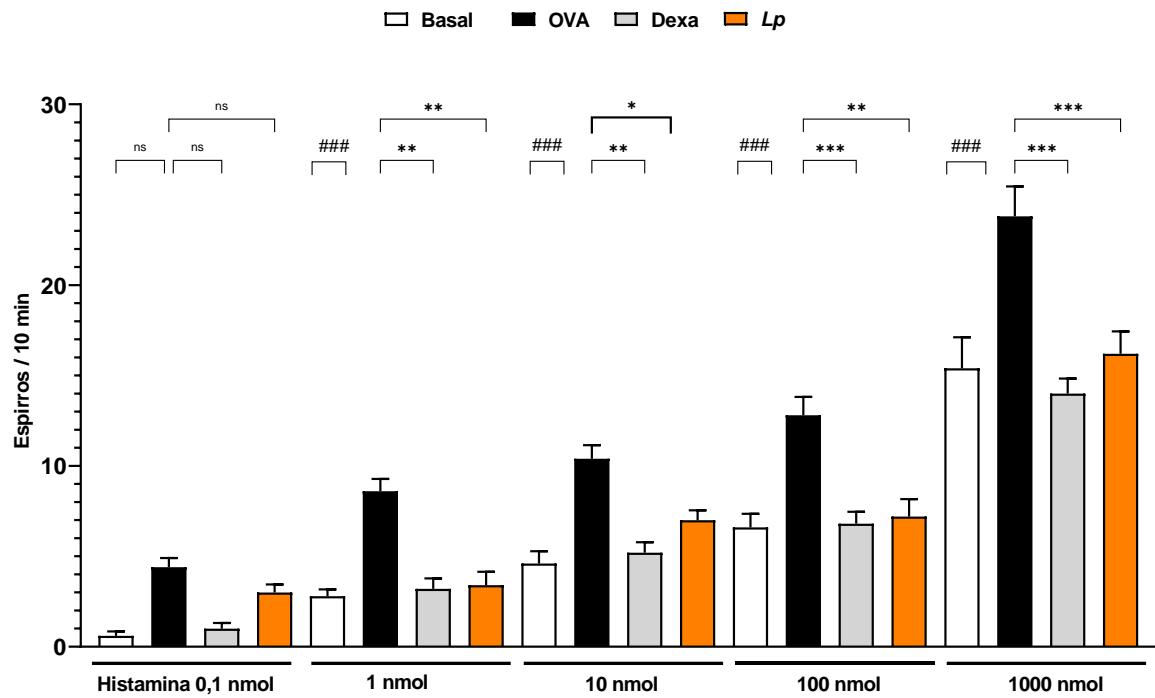
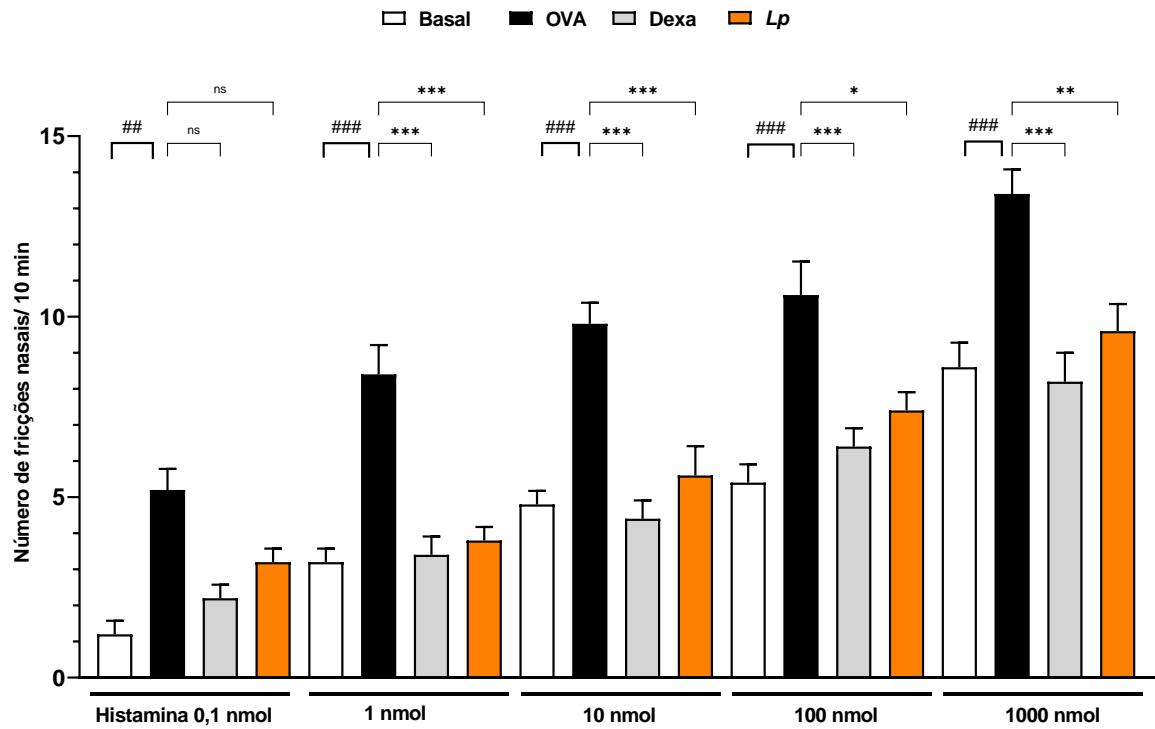
As colunas e barras verticais representam a média e o erro padrão da média (e.p.m.) respectivamente. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada pelo ANOVA one-way seguido do pós-teste de Tukey (grupos vs. número de espirros (A) ou fricções nasais (B)). Os camundongos BALB/c (n= 5) foram distribuídos em grupos: Basal (animais saudáveis); OVA (animais doentes por ovalbumina); Dexa (droga padrão, dexametasona 2 mg/kg); *Lp* (animais suplementados com *Lacticaseibacillus paracasei* 1 x 10⁹ UFC). #####p < 0,0001 (OVA vs. basal); ****p < 0,0001(OVA vs. Dexa, *Lp*) **p < 0,001(OVA vs. Dexa) *p < 0,05 (OVA vs. *Lp*).

5.5 *Lacticaseibacillus paracasei* (*Lp*) reduz hiper-reatividade nasal induzida por histamina em camundongos com CARAS

A suplementação com o *Lp* reduziu o número de espirros após a administração da histamina nas doses de 1 nmol (↓ 60%; p < 0,01), 10 nmol (↓ 35%; p < 0,05) 100 nmol (↓ 44%; p < 0,01) e 1000 nmol (↓ 5%; p < 0,001) em comparação ao grupo OVA (Gráfico 5A). O grupo Dexa apresentou redução semelhante ao da cepa bacteriana em análise (Gráfico 5A).

No grupo *Lp*, também houve redução do número de fricções nasais após a administração de histamina nas doses de 1 nmol (↓ 55%; p < 0,001), 10 nmol (↓ 43%; p < 0,001), 100 nmol (↓ 30%; p < 0,05) e 1000 nmol (↓ 28%; p < 0,01) em comparação ao grupo OVA nas respectivas doses (Gráfico 5B). A dexametasona reduziu o número de fricções nasais a partir da dose de 1nmol de histamina (Gráfico 5B).

Gráfico 5 – Efeito da suplementação com *Lacticaseibacillus paracasei* (*Lp*) na quantificação de espirros (A) e fricções nasais (B) em camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgica Combinadas (CARAS) após administração de doses crescentes de histamina.

A**B**

As colunas e barras verticais representam a média e o erro padrão da média (e.p.m.) respectivamente. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada pelo ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey* (dose da histamina vs. número de espirros (A) ou fricções nasais (B)). Os camundongos BALB/c ($n= 5$) foram distribuídos em grupos: Basal (animais saudáveis); OVA (animais doentes por ovalbumina); Dexa (droga padrão, dexametasona 2 mg/kg) e Lp (animais

suplementados com *Lacticaseibacillus paracasei* 1 x 10⁹ UFC). ***p < 0,001 (OVA vs. basal); ***p < 0,001(OVA vs. Dexa e *Lp*), **p < 0,01 (OVA vs. Dexa e *Lp*), *p < 0,05 (OVA vs. *Lp*).

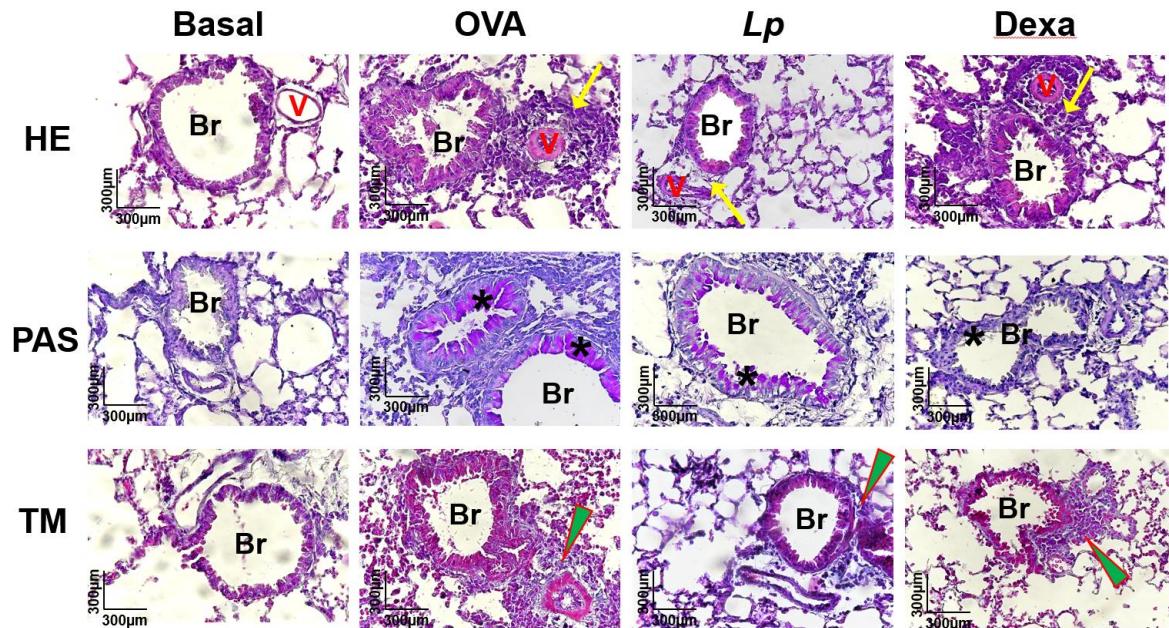
5.6 Análise histológica pulmonar de camundongos com CARAS e suplementados com *Lacticaseibacillus paracasei* (*Lp*)

A migração de células inflamatórias foi avaliada pela coloração da Hematoxilina Eosina (HE). Os pulmões dos animais do grupo OVA (p < 0,001) apresentaram aumento no infiltrado inflamatório nas regiões peribronquiolares e perivasculares (Figura 4-HE – seta amarela) em comparação ao grupo basal. A suplementação com o *Lp* (p < 0,01) reduziu em 9% o infiltrado em comparação ao grupo OVA (Figura 4-HE e Gráfico 6A). Também houve redução significativa do infiltrado no grupo Dexa.

A deposição de mucinas neutras pelas células caliciformes foi avaliada pela coloração do Ácido Periódico de Shiff (PAS), e evidência na cor roxa (bonina), essa deposição. Nos animais do grupo OVA (p < 0,001) houve aumento da deposição de muco pelas células caliciformes nos bronquíolos em comparação ao grupo basal (Figura 4-PAS – asterisco). A suplementação com o *Lp* (p < 0,01) reduziu em 47% a quantidade de muco em comparação ao grupo OVA (Figura 4-PAS e Gráfico 6B). A dexametasona também reduziu significativamente a deposição de muco, como esperado.

A deposição de matriz extracelular foi avaliada pela coloração do Tricômico de Masson (TM), que evidência na cor azul essa alteração. Nos animais do grupo OVA (p < 0,001) houve aumento da deposição de matriz extracelular nas regiões peribronquiolares e perivasculares independentemente dos alvéolos em comparação ao grupo basal (Figura 4-TM – seta verde). A suplementação com o *Lp* (p < 0,01) reduziu em 30% a deposição de matriz extracelular em comparação ao grupo OVA (Figura 4-TM e Gráfico 6C). O grupo Dexa também apresentou redução desse parâmetro.

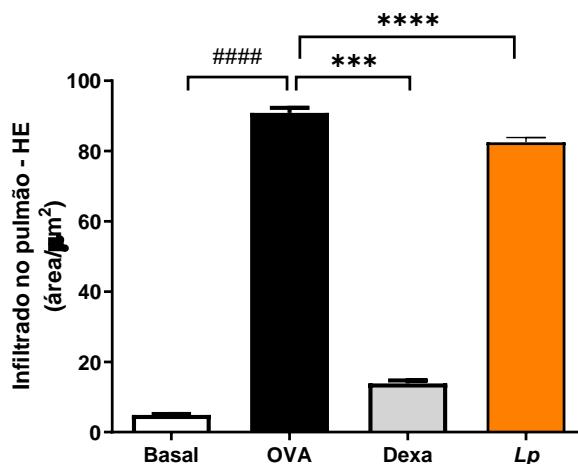
Figura 4 – Fotomicrografias representativas do pulmão dos camundongos suplementados com *Lacticaseibacillus paracasei* (*Lp*) e corados com Hematoxilina Eosina (HE), Ácido Periódico de Schiff (PAS) ou Tricômico de Masson (TM).

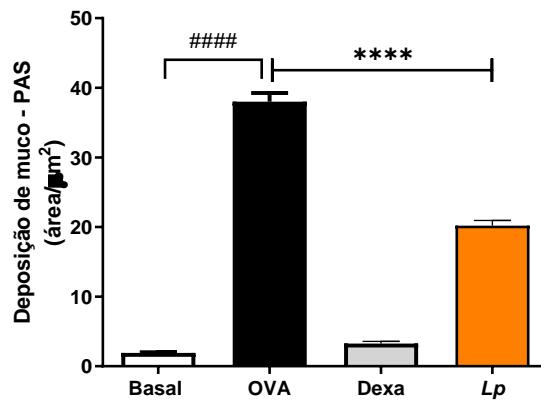
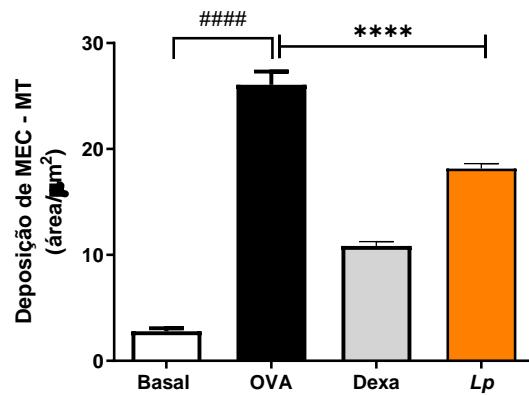


As colunas representam os grupos: Basal (animais saudáveis); OVA (animais doentes por ovalbumina); Dexa (droga padrão, dexametasona 2 mg/kg) e *Lp* (animais suplementados com *Lacticaseibacillus paracasei* 1×10^9 UFC). As linhas horizontais representam a coloração utilizada: Hematoxilina Eosina (HE), Ácido Periódico de Schiff (PAS) e Tricômico de Masson (TM). Aumento total 400x (300 μ m). Os símbolos indicam o parâmetro avaliado: infiltrado inflamatório (seta amarela), células caliciformes (asterisco) e deposição de MEC (seta verde), Br (Bronquiolo), V (Vaso).

Gráfico 6 – Análise morfométrica do pulmão dos camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS) suplementados com *Lacticaseibacillus paracasei* (*Lp*)

A



B**C**

As colunas e barras verticais representam a média e o erro padrão da média (e.p.m.) respectivamente. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada pelo ANOVA one-way seguido do pós-teste de Tukey (Alteração morfológica vs. escore). Os camundongos BALB/c (n= 5) foram distribuídos em grupos: Basal (animais no estado fisiológico); OVA (animais doentes por ovalbumina); Dexa (droga padrão, dexametasona 2 mg/kg) e Lp (animais suplementados com *Lacticaseibacillus paracasei* 1 x 10⁹ UFC). ****p < 0,0001 (OVA vs. basal); ****p < 0,0001(OVA vs. Dexa e Lp), ***p < 0,001 (OVA vs. Dexa e Lp).

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, a suplementação com o *Lp* reduziu os níveis séricos de IgE OVA-específica e a produção de IL-4 e IL-13. Esse efeito pode estar relacionado a modulação de linfócitos T pela interação com o probiótico, reduzindo a polarização dessas células para o perfil TH2 e consequentemente, a diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos produtores de IgE OVA-específica. Estudos têm demonstrado que os probióticos são capazes de modular a polarização de linfócitos T (Hrdý *et al.*, 2020). Além disso, as citocinas IL-4 e IL-13 também participam do processo de sensibilização alérgica, induzindo a diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos produtores de IgE OVA-específica, logo, a redução dos níveis de IgE pode estar relacionada a redução dessas citocinas.

Fang *et al.* (2022) demonstram, em modelo murino de dermatite atópica, que o probiótico *Limosilactobacillus reuteri* (*Lr*) reduziu os níveis de IgE nos animais suplementados. Outro estudo realizado por Choi *et al.* (2018) em modelo experimental de artrite reumatoide (RA), demonstrou que a administração oral de *Lactobacillus plantarum* CJLP133 e CJLP243 também diminuiu os níveis de IgE-alérgeno específica.

A manutenção do processo inflamatório crônico na CARAS é mediado principalmente por meio das citocinas IL-4 e IL-13. Essas citocinas funcionam como *feedback* positivo na manutenção da resposta imune do tipo TH2, induzindo a polarização de linfócitos TH0 para o perfil TH2. Devido ao compartilhamento de receptores celular, amplificam o processo inflamatório na CARAS e induzem o remodelamento tecidual, hipertrofia e hiperplasia do músculo liso e de células caliciformes, levando ao quadro de hiper-reatividade das vias áreas (Paiva Ferreira *et al.*, 2019).

Nosso estudo demonstrou que a suplementação com o *Lp* reduziu os níveis dessas citocinas no BALF dos camundongos com CARAS. Esse efeito pode estar relacionado com a capacidade dos probióticos de regular diversas vias de sinalização que resultam na expressão de citocinas e quimiocinas, como já demonstrado em um estudo realizado por Yao *et al.* (2017), no qual, a interação entre probióticos e células hospedeiras regulou a expressão de receptores Toll-like

(TLRs), que estão associados a produção de citocinas pró-inflamatórias. Assim como também foi demonstrado em um estudo realizado por Wu *et al.* (2022) em modelo experimental de asma alérgica (AA), que a suplementação com os probióticos (*Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Lactobacillus rhamnosus* GG e *Bifidobacterium animalis*) regularam negativamente a expressão de NF-κB, que está diretamente relacionado com a expressão do TLR4.

Os resultados obtidos corroboram também com os resultados dos estudos feitos por Zhang *et al.* (2021) e Anatriello *et al.* (2019) em modelo murino de AA, realizado com a administração de outras cepas probióticas, uma mistura probiótica (*Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium animals*) e *Lactobacillus bulgaricus* N45.10 (*Lb*), respectivamente onde, ambos os estudos demonstraram a capacidade dos probióticos em reduzir as citocinas do perfil TH2 no BALF dos animais doentes.

A regulação imunológica na CARAS pode ser obtida por meio de diferentes mecanismos, dentre eles, pela polarização das células T para o perfil TH1 em detrimento ao perfil TH2. A citocina IFN-γ possui como função induzir as DCs a apresentar抗ígenos e polarizar os linfócitos TH0 para o perfil TH1 (Eifan *et al.*, 2012). Logo, a quantificação dessa citocina pode ser utilizada como um marcador da polarização do perfil TH1. Neste trabalho, o grupo CARAS apresentou redução nos níveis de IFN-γ, indicando prevalência do perfil TH2, enquanto a suplementação com o *Lp* aumentou os níveis dessa citocina, demonstrando a capacidade dessa cepa probiótica em promover uma imuno regulação para o perfil TH1 e consequentemente, redução do processo inflamatório na CARAS. Esses resultados foram semelhantes aos obtidos por Choi *et al.* (2018), no qual a administração dos probióticos também aumentou os níveis de IFN-γ.

Na RA, os sintomas nasais como espirros, fricções nasais, rinorreia e congestão nasal, surgem devido ao processo inflamatório que ocorre nas vias aéreas superiores. A presença desses sintomas afeta não apenas a qualidade de vida dos indivíduos acometidos, como também a produtividade no trabalho, gerando impactos financeiros (Vandenplas *et al.*, 2018). Nossa estudo demonstrou que a suplementação com o *Lp* reduziu os sinais clínicos, espirros e fricções nasais,

a partir da segunda semana de suplementação. Esse efeito pode ser resultado do desvio de resposta imune para o perfil TH1 em detrimento ao TH2, reduzindo o processo inflamatório na CARAS. A ausência de redução dos sinais clínicos na primeira semana de avaliação pode ser atribuída ao período necessário para que o *Lp* colonize efetivamente o epitélio intestinal. Resultados semelhantes foram observados em um estudo realizado com as cepas *Bifidobacterium longum* IM55 e *Lactobacillus plantarum* IM76 em modelo murino de RA (Kim *et al.*, 2019).

O quadro de hiper-reatividade inespecífica que ocorre na RA é devido a destruição do epitélio nasal pelo acúmulo de eosinófilos. Como consequência, há exposição das terminações nervosas dos nervos sensoriais dessa região, tornando-os sensíveis à estímulos inespecíficos (Paiva Ferreira *et al.*, 2019). Logo, a avaliação dos danos causados pelo infiltrado inflamatório pode ser realizada pela administração de histamina exógena, uma vez que essa molécula se liga aos receptores sensoriais nos neurônios, estando envolvida com o processo alérgico e inflamatório na CARAS. Observamos que o *Lp* reduziu a hiper-reatividade nasal induzida por histamina a partir da dose de 1 nmol, demonstrando, portanto, melhora da integridade do epitélio. Esse efeito pode ser resultado da redução da migração eosinofílica para as vias aéreas superiores. A redução da hiper-reatividade nasal pelo probiótico *Limosilactobacillus fermentum* também foi observada por Cavalcanti *et al.* (2023).

A avaliação dos parâmetros histológicos permitiu observar as alterações patológicas provocadas pela CARAS no tecido pulmonar e o efeito da suplementação com o *Lp* na preservação do tecido. A coloração com Hematoxilina Eosina (HE) permitiu visualizar a redução do infiltrado inflamatório no grupo *Lp*, enquanto a coloração com Ácido Periódico de Shiff (PAS) permitiu visualizar a redução da hipertrofia e hiperplasia de células caliciformes e deposição de muco por essas células. A coloração com Tricômico de Masson (TM) demonstrou que a suplementação com o *Lp* também reduziu a deposição de matriz extracelular no tecido, que estão diretamente relacionadas com o quadro de remodelamento tecidual das vias aéreas na CARAS. Esses resultados corroboram com os de Zhang *et al.* (2021), que ao analisar os aspectos histopatológicos, demonstraram que a suplementação com uma mistura de probióticos reduziu o processo de

remodelamento tecidual, reduzindo a produção de muco e a deposição de colágeno no pulmão de camundongos asmáticos.

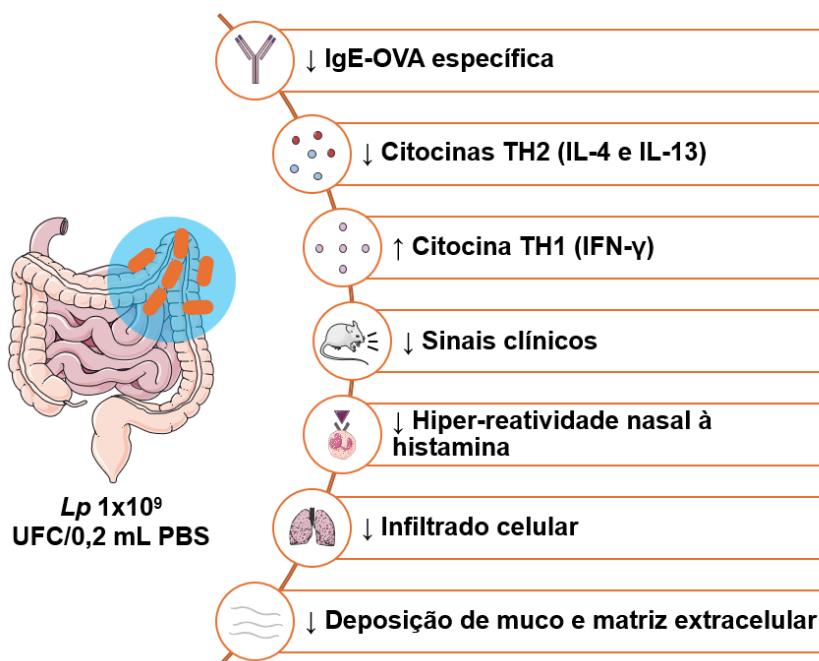
Portanto, os resultados apresentados nesse trabalho quanto à suplementação oral de animais com CARAS com o *Lacticaseibacillus paracasei* (*Lp*) nos fornecem subsídios comprobatórios do efeito antialérgico e imunomodulador do probiótico. Em adição, nos incentivam a dar continuidade aos estudos na perspectiva de elucidar mecanismos de ação envolvidos no sentido de contribuir com a regulamentação clínica de probióticos como práticas integrativas e complementares em saúde no controle do processo inflamatório das vias aéreas de indivíduos com CARAS.

7 CONCLUSÃO

Diante do exposto acima, conclui-se que a suplementação oral com *Lacticaseibacillus paracasei* em modelo de Síndrome da Asma e Rinite Alérgica Combinadas (CARAS) experimental apresentou efeito antialérgico pelos seguintes mecanismos:

- ❖ Redução dos níveis séricos de IgE OVA-específica;
- ❖ Redução dos níveis de citocinas do perfil TH2 (IL-4 e IL-13);
- ❖ Aumento do nível de citocina do perfil TH1 (IFN- γ);
- ❖ Redução dos sinais clínicos da rinite alérgica, espirros e fricções nasais;
- ❖ Redução da hiper-reatividade nasal induzida por histamina;
- ❖ Redução dos parâmetros histopatológicos do tecido pulmonar como infiltração celular, índice de muco e deposição de matriz extracelular.

Figura 5 – Mapa conceitual dos efeitos do probiótico *Lacticaseibacillus paracasei* (*Lp*) em modelo de Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS) experimental.



Legenda: UFC: unidade formadora de colônia; ↓: redução; ↑: aumento.

Fonte: autoria própria.

REFERÊNCIAS

- ANATRIELLO, E. et al. Oral feeding of *Lactobacillus bulgaricus* N45.10 inhibits the lung inflammation and airway remodeling in murine allergic asthma: Relevance to the Th1/Th2 cytokines and STAT6/T-bet. **Cellular Immunology**, v. 341, p. 103928, 1 jul. 2019.
- ASHIQUE, S. et al. Short Chain Fatty Acids: Fundamental mediators of the gut-lung axis and their involvement in pulmonary diseases. **Chemico-Biological Interaction**, v. 368, p.110-131, 2022.
- AYAKANNU, R. et al. Relationship between various cytokines implicated in asthma. **Human immunology**, v. 80, p. 755-763, 2019.
- BEHERA, S. S.; PANDA, S. K. Ethnic and industrial probiotic foods and beverages: efficacy and acceptance. **Current Opinion in Food Science**, v. 32, p. 29-36, 2020.
- BENGOA, A. A. et al. Health-Promoting Properties of *Lacticaseibacillus paracasei*: A Focus on Kefir Isolates and Exopolysaccharide-Producing Strains. **Foods (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 10, p. 2239, 2021.
- BEZERRA BARROS, G. C. et al. 4-Carvomenthenol ameliorates the murine combined allergic rhinitis and asthma syndrome by inhibiting IL-13 and mucus production via p38MAPK/NF-κB signaling pathway axis. **International Immunopharmacology**, v. 88, n. August, p. 106938, 2020.
- BOULET, L.-P. Airway remodeling in asthma. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 24, n. 1, p. 56–62, jan. 2018.
- CARLSON, B. M. The Respiratory System. **The Human Body**, p. 303-319, 2019.
- CAVALCANTI, R. F. P., et al. *Limosilactobacillus fermentum* modulates the gut airway axis by improving the immune response through FOXP3 activation on combined allergic rhinitis and asthma syndrome (CARAS). **Immunobiology**, [S.L.], v. 228, n. 5, p. 152721, set. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2023.152721>.
- CHIU, C. J. et al. Asthma in the precision medicine era: Biologics and probiotics. **International Journal of Molecular Sciences**, 2021. v. 22, n. 9, p. 1–19.
- CHOI, S.-P. et al. Oral administration of *Lactobacillus plantarum* CJLP133 and CJLP243 alleviates birch pollen-induced allergic rhinitis in mice. **Journal Of Applied Microbiology**, [S.L.], v. 124, n. 3, p. 821-828, 28 jan. 2018. Wiley.
- DE PAULA, N. M. G. et al. Aspectos terapéuticos de la rinitis alérgica en niños y adolescentes. **Cuadernos de Educación y Desarrollo**, v. 16, n. 2 Edição Especial, 12 jan. 2024.
- EIFAN, A. O.; DURHAM, S. R. Pathogenesis of rhinitis. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 46, p. 1139-1151, 2016.

FANG, Zhifeng et al. *Limosilactobacillus reuteri* Attenuates Atopic Dermatitis via Changes in Gut Bacteria and Indole Derivatives from Tryptophan Metabolism. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 23, n. 14, p. 7735, 13 jul. 2022. MDPI AG.

FAO/WHO. Joint FAO/WHO Expert Consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina, October, 2001. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf>>. Acesso em 01 jun. 2024.

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

GANS, Melissa D.; GAVRILOVA, T. Understanding the immunology of asthma: Pathophysiology, biomarkers, and treatments for asthma endotypes, **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 36, n. 36, p. 118–127, 2020.

GARCIA-CASTILLO, V. et al. *Lactobacillus fermentum* UCO-979C beneficially modulates the innate immune response triggered by *Helicobacter pylori* infection *in vitro*. **Beneficial Microbes**, v. 18, p. 829-841, 2018.

GEORGE, L.; BRIGHTLING, C. E. Eosinophilic airway inflammation: role in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Therapeutic advances in chronic disease**, v. 7, n. 1, p. 34–51, jan. 2016.

HILL, Colin et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, [S.L.], v. 11, n. 8, p. 506-514, 10 jun. 2014.

HOLGATE, S. T. et al. Asthma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, p. 15025, 10 set. 2015.

HOYTE, Flavia C. et al. Recent advances in allergic rhinitis. **F1000Research**, [S.L.], v. 7, p. 1333, 23 ago. 2018. F1000 Research Ltd.

HRDÝ, J. et al. *Lactobacillus reuteri* 5454 and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* 5764 improve colitis while differentially impacting dendritic cells maturation and antimicrobial responses. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 24 mar. 2020.

JONGDEE NOPPARAT et al, Probiotics of *Lacticaseibacillus paracasei* SD1 and *Lacticaseibacillus rhamnosus* SD11 attenuate inflammation and β -cell death in streptozotocin-induced type 1 diabetic mice. **PloS one**, v. 18, n. 4, p. e0284303–e0284303, 2023.

KALLIOMÄKI, M. et al. Guidance for Substantiating the Evidence for Beneficial Effects of Probiotics: Prevention and Management of Allergic Diseases by Probiotics. **The Journal of Nutrition**, v. 140, n. 3, p. 713S-721S, 1 mar. 2010.

KIM, W. et al. *Lactobacillus paracasei* KBL382 administration attenuates atopic dermatitis by modulating immune response and gut microbiota. **Gut Microbes**, v. 12, n. 1, p. 1–14, 2020.

KIM, W.-G. et al. *Bifidobacterium longum* IM55 and *Lactobacillus plantarum* IM76 alleviate allergic rhinitis in mice by restoring Th2/Treg imbalance and gut microbiota disturbance. **Beneficial Microbes**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 55-67, 8 fev. 2019. Wageningen Academic Publishers.

LI, H. T. et al. Treatment of allergic rhinitis with CpG oligodeoxynucleotides alleviates the lower airway outcomes of combined allergic rhinitis and asthma syndrome via a mechanism that possibly involves in TSLP. **Experimental Lung Research**, v. 42, p. 322-333, 2016.

LIU, X. et al. Gut microbiota-mediated immunomodulation in tumor, **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 40, n. 1, 2021.

LU, K. et al. Probiotics in Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 11, p. 408, 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/638148>>.

MA, P. et al. Gut microbiota: A new insight into lung diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 155, p. 113810, 2022.

MALDONADO GALDEANO, C. et al. Beneficial Effects of Probiotic Consumption on the Immune System. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 74, n. 2, p. 115–124, 2019.

MAZZIOTTA, C. et al. Probiotics Mechanism of Action on Immune Cells and Beneficial Effects on Human Health. **Cells**, v. 12, n. 1, p. 184, 2023.

NASR, W. et al. The Role of the Level of Interleukin-33 in the Therapeutic Outcomes of Immunotherapy in Patients with Allergic Rhinitis. **International Archives of Otorhinolaryngology**, 28 ago. 2017.

OLIVEIRA, G. L. V. et al. Microbiota Modulation of the Gut-Lung Axis in COVID-19, **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 635471, 2021.

OLIVEIRA, M. L. et al. A relação da microbiota intestinal na síndrome do intestino irritável. **Revista Eletrônica Acervo Científico**, v. 20, p. e6220, 4 fev. 2021.

PAIVA FERREIRA, L. K. D. et al. Combined allergic rhinitis and asthma syndrome (CARAS). **International Immunopharmacology**, v. 74, p. 105718, 1 set. 2019.

PAIVA FERREIRA, L. K. D. et al. MHTP, a synthetic alkaloid, attenuates combined allergic rhinitis and asthma syndrome through downregulation of the p38/ERK1/2 MAPK signaling pathway in mice. **International Immunopharmacology**, v. 96, p.107-120, 2021.

PAWANKAR, R. et al. Allergic rhinitis and its impact on asthma update (ARIA 2008) -western and Asian-Pacific perspective. **Asian Pacific journal of allergy and immunology**, v.27, p. 237-243, 2009.

PUUPPONEN-PIMIA, R. et al. Development of functional ingredients of gut health. **Trends in Food Science and Technology**, v. 13, p. 3-11, 2002.

QIU, P. et al. The Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Disease. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, 2022.

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

SALES, P. C. S. L. et al. Correlação entre a alteração da microbiota gastrintestinal com o surgimento e complicações na doença de Parkinson: papel de citocinas inflamatórias no eixo bidirecional intestino-cérebro. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e51310212788, 26 fev. 2021.

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

SAKANO, E. et al. IV Brazilian Consensus on Rhinitis-an update on allergic rhinitis. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 84, p. 3-14, 2018.

TAKKINSATIAN, P. et al. Dietary Factors Associated with Asthma Development: A Narrative Review and Summary of Current Guidelines and Recommendations. **Journal of Asthma and Allergy**, 2022. v. 15, n. August, p. 1125–1141.

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

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

THORBURN, A. N. et al. Evidence that asthma is a developmental origin disease influenced by maternal diet and bacterial metabolites. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, 23 jun. 2015.

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

TORRES-MIRANDA, Alexis; MELIS-ARCOS, Felipe; GARRIDO, Daniel. Characterization and Identification of Probiotic Features in Lacticaseibacillus Paracasei Using a Comparative Genomic Analysis Approach. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 14, n. 6, p. 1211–1224, 2022.

VANDENPLAS O. et al. Impact of Rhinitis on Work Productivity: A Systematic Review. **J Allergy Clin Immunol.** [S.L.], v. 6, n. 4, p. 1274-1286, jul. 2018.

WAN, L. Y. M.; CHEN, Z. J.; SHAH, N. P.; et al. Modulation of Intestinal Epithelial Defense Responses by Probiotic Bacteria. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 16, p. 2628–2641, 2015.

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

WANG, J. et al. Gut-Microbiota-Derived Metabolites Maintain Gut and Systemic Immune Homeostasis. **Cells**, v. 12, n. 5, p. 793–793, 2023.

WANG, X. et al. Oral administration of *Lactobacillus paracasei* L9 attenuates PM2.5-induced enhancement of airway hyperresponsiveness and allergic airway response in murine model of asthma. **PLoS One**, v. 15; p. 0171721, 2017.

WATTS, A. M. et al. Modulation of allergic inflammation in the nasal mucosa of allergic rhinitis sufferers with topical pharmaceutical agents. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. MAR, 2019.

WHO. Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Geneva, 2006. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/924154647X>. Acesso em: 19 out. 2024.

WORAPRAYOTE, W. et al. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. **Meat Science**, v.120, p. 118-132, 2016.

WU, Z. et al. Study effect of probiotics and prebiotics on treatment of OVA-LPS-induced of allergic asthma inflammation and pneumonia by regulating the TLR4/NF- κ B signaling pathway. **Journal of Translational Medicine**, v. 20, n. 1, p. 1–14, 2022.

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

YAO, P. et al. Effects of probiotics on Toll-like receptor expression in ulcerative colitis rats induced by 2,4,6-trinitro-benzene sulfonic acid. **Molecular Medicine Reports**, v. 15, n. 4, p. 1973–1980, 21 fev. 2017.

ZHANG, J. et al. Exploration of the effect of mixed probiotics on microbiota of allergic asthma mice. **Cellular Immunology**, 2021. v. 367, p. 104399.

ANEXOS

Anexo A

Certificado de análise

| | | | |
|--|--|----------------------|----------|
|  LEMMA CLASSE SUPERIOR EM ANÁLISE | Importação /Distribuição: LEMMA SUPPLY SOLUTIONS LTDA Gestão da Qualidade | | |
| CERTIFICADO DE ANÁLISE | | | |
| Nome do Produto | <i>Lactobacillus paracasei</i> 100 bilhões UFC/g | | |
| Nº Lote | IJ1504 | Identificação: | LPc-G110 |
| Data da Fabricação | 10/2019 | Validade | 10/2021 |
| Origem | China | | |
| Testes/Análise | Especificação /Método | Resultado | |
| Aparência | Pó liofilizado de cor branca pálida a marrom | Conforme | |
| Umidade % | ≤ 5.0 | 3.0 | |
| PH (10%) | 4.0~6.0 | 4.21 | |
| Densidade, g/ml | 0.35~0.75 | 0.69 | |
| Contagem de viabilidade- UFC/g | ≥ 80 bilhões de UFC/g | 100 bilhões de UFC/g | |
| Bactéria não-acido lácteo-UFC/g | ≤ 500 | <10 | |
| Testes de patógenos para: | | | |
| 1. Coliformes - UFC/g | ≤ 10 | <10 | |
| 2. Bacillus spp, UFC/g | - | <10 | |
| 3. Enterococcus spp, MPN/g | - | <3 | |
| 4. Fungos e leveduras -UFC/g | ≤ 10 | <10 | |
| 3. Bactéria patogênica (<i>Shigella sonnei</i> , <i>Salmonella</i> Sp <i>Staphylococcus aureus</i>) | Negativa | Ausente | |
| Chumbo (Pb) mg/kg | ≤ 1.0 | <1.0 | |
| Total Arsênico mg/kg | ≤ 0.5 | <0.5 | |
| Conteúdo líquido/g | Conforme | Conforme | |
| Observação: | Identificação da cultura é confirmada de acordo com o nível de gênero/espécie baseado na sequência 16s r-RNA *Atenção: A cor das cepas pode variar a cada lote de produção de acordo com o processo de fermentação e a potência | | |

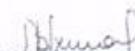
Armazenar em recipiente fechado, em local seco e fresco.

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

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

Este documento é uma cópia fiel do certificado de analise original, as informações descritas acima foram fornecidas pelo fabricante da matéria prima.

=> **Importante:** Documento confidencial, não-sujeito a divulgação em qualquer meio, caso contrário estará sujeito a penalidades cabíveis.


Letícia Rita Rezende
Responsável Técnico – CRF-16.114/SP

24/01/2020

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

Anexo B

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



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais

Reitoria



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo dos efeitos e mecanismos de ação de produtos naturais e sintéticos bioativos em modelos experimentais de edema inflamatório, lesão pulmonar aguda (LPA) e síndrome da asma e rinite alérgicas combinadas (CARAS)", protocolado sob o CEUA nº 7316150420 (000064), sob a responsabilidade de **Marcia Regina Pluvezam** e equipe; **LARISSA ADILUS MARIA PAIVA FERREIRA**; **Larissa Rodrigues Bernardo**; **Grasiela Costa Bezerra**; **Raquel Fragoso Pereira**; **Francisco Allysson Assis Ferreira Gadelha**; **LAÉRCIA KARLA DIEGA PAIVA FERREIRA** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 15/05/2020.

We certify that the proposal "Study of effects and mechanisms of action of natural and synthetic bioactive products in experimental models of inflammatory edema, acute lung injury (ALI) and combined allergic asthma and rhinitis syndrome (CARAS)", utilizing 676 isogenics mice (325 males and 351 females), 312 Heterogenics mice (312 females), protocol number CEUA 7316150420 (000064), under the responsibility of **Marcia Regina Pluvezam** and team; **LARISSA ADILUS MARIA PAIVA FERREIRA**; **Larissa Rodrigues Bernardo**; **Grasiela Costa Bezerra**; **Raquel Fragoso Pereira**; **Francisco Allysson Assis Ferreira Gadelha**; **LAÉRCIA KARLA DIEGA PAIVA FERREIRA** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 05/15/2020.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 05/2020 a 12/2025 Área: Ciências Farmacêuticas

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

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

João Pessoa, 03 de março de 2021

Prof. Dra. Jайлана де Соуза Акуино
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

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

Cidade Universitária, s/n - Castelo Branco (II) Prédio da Reitoria - Gabinete da Vice-reitoria - CEP 58051-085 - João Pessoa/PB - tel: 55 (83) 3216-7155
Horário de atendimento: 24h a 6h das 14 às 17h - e-mail: ceua@ufpb.br
CEUA N 7316150420