

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-graduação em Microbiologia

Vívian Correia Miranda

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PROBIÓTICO DE *AKKERMANSIA MUCINIPHILA* BAA-  
835 EM MODELO MURINO DE ALERGIA ALIMENTAR**

Belo Horizonte  
2023

Vívian Correia Miranda

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PROBIÓTICO DE *AKKERMANSIA MUCINIPHILA* BAA-835 EM MODELO MURINO DE ALERGIA ALIMENTAR**

Versão Final

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Carmona Cara Machado

Belo Horizonte  
2023

043

Miranda, Vívian Correia.

Avaliação do efeito probiótico de *Akkermansia muciniphila* BAA-835 em modelo murino de alergia alimentar [manuscrito] / Vívian Correia Miranda. – 2023.

101 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins. Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Carmona Cara Machado.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Probióticos. 3. Hipersensibilidade Alimentar. 4. Ovalbumina. 5. Imunomodulação. I. Martins, Flaviano dos Santos. II. Machado, Denise Carmona Cara. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



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

### ATA DE DEFESA DE TESE

#### ATA DA DEFESA DE TESE DE VIVIAN CORREIA MIRANDA

Nº REGISTRO: 2019663982

Às 13:30 horas do dia 24 de fevereiro de 2023, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Paula Prazeres Magalhães (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau (Universidade Federal de Minas Gerais), Marcos de Carvalho Borges (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo (FMRP/USP), Fabiana da Conceição Pereira Tiago (Centro de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET/MG) e Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins (Orientador), para julgar o trabalho final "**Avaliação do efeito probiótico de *Akkermansia muciniphila* BAA-835 em modelo murino de alergia alimentar**" da aluna Vivian Correia Miranda, requisito final para a obtenção do Grau de **DOCTORA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da tese ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 24 de fevereiro de 2023

#### Membros da Banca:

Profa. Dra. Paula Prazeres Magalhães

Profa. Dra. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau

Prof. Dr. Marcos de Carvalho Borges

Profa. Dra. Fabiana da Conceição Pereira Tiago

#### De acordo:

Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins

(Orientador)

Profa. Daniele da Glória de Souza  
(Coordenadora do Programa de Pós-graduação  
em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por **Flaviano dos Santos Martins, Professor do Magistério Superior**, em 27/02/2023, às 10:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paula Prazeres Magalhaes, Professora do Magistério Superior**, em 27/02/2023, às 15:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabiana da Conceição Pereira Tiago, Usuário Externo**, em 27/02/2023, às 16:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcos de Carvalho Borges, Usuário Externo**, em 02/03/2023, às 11:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau, Membro de comissão**, em 08/03/2023, às 19:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Glória de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 09/03/2023, às 09:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2037503** e o código CRC **45ED9985**.

## AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

Aos meus amigos, Ramon, Viviany e Marcelo, pela escuta, paciência, amizade e momentos de descontração, sei que posso contar com vocês para qualquer situação.

Aos meus amigos e colegas que conheci na UFMG: Mônica, Karen, Gabrielle, Éricka, Spencer, Samantha, Bruno e todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste projeto.

Ao Helder, por toda ajuda na dosagem das imunoglobulinas.

A Luísa, por auxiliar na dosagem da permeabilidade intestinal.

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

A todos os amigos que sempre me apoiaram.

Aos órgãos financiadores deste trabalho, em especial ao CNPq.

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

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

## RESUMO

A alergia alimentar é desencadeada quando há a ativação exacerbada do sistema imune por alérgenos alimentares. Uma das estratégias que vem sendo estudada para o tratamento da alergia alimentar é o uso de probióticos, tendo em vista seus efeitos imunomoduladores. Desse modo, esse trabalho visa avaliar o efeito probiótico de *Akkermansia muciniphila* BAA-835 em um modelo *in vivo* de alergia alimentar, avaliando parâmetros clínicos, imunológicos, histológicos e microbiológicos. Além disso, avaliou-se os efeitos da bactéria inativa e a sua associação com *Bifidobacterium longum* 5<sup>1A</sup> na alergia alimentar. Para isso, camundongos BALB/c foram sensibilizados com ovalbumina (OVA) (dia 0). Depois de 14 dias receberam um reforço. O grupo controle recebeu apenas o adjuvante com salina no dia 0 e apenas salina no dia 14. A partir do dia 18, os camundongos receberam uma dose oral diária de  $1 \times 10^9$  UFC de *A. muciniphila* viável ou inativada ou associado a  $1 \times 10^9$  UFC de *B. longum* 5<sup>1A</sup> até o fim do experimento (dia 28). O grupo controle recebeu apenas salina. A partir do dia 21 os camundongos foram desafiados com uma dieta contendo OVA. No dia 28 os camundongos foram sacrificados. A administração oral de *A. muciniphila* viável promoveu a atenuação significativa da perda de peso, do grau de lesão tecidual, dos níveis de IgE e IgG1 anti-OVA, eosinófilos, neutrófilos, das quimiocinas eotaxina-1 e CXCL1/KC, além de promover a redução significativa das citocinas pró-inflamatórias (IL4, IL6, IL9, IL13, IL17 e TNF). Entretanto, não alterou os níveis de IL10 (citocina anti-inflamatória). Os camundongos alérgicos apresentaram aumento significativo nos níveis de *Staphylococcus* e na frequência de leveduras totais. Em contrapartida, o grupo tratado apresentou redução dos níveis de *Staphylococcus* e na frequência de leveduras totais. O tratamento não promoveu uma atenuação significativa nos níveis aumentados da permeabilidade intestinal. Além disso, a administração oral da bactéria inativada pelo calor (75°C) foi capaz de atenuar os níveis de IgE anti-OVA e de eosinófilos. Por fim, a associação de *A. muciniphila* com *B. longum* 5<sup>1A</sup> não potencializou os efeitos apresentados por *A. muciniphila*, agravando os sinais de inflamação. Nossos dados demonstram que a administração oral de *A. muciniphila* BAA-835 viável e inativada pelo calor promove um efeito imunomodulador sistêmico no modelo analisado, o que sugere suas propriedades probióticas e pós-bióticas.

**Palavras-chave:** Probiótico. *Akkermansia muciniphila*. Alergia alimentar. Ovalbumina. Imunomodulação. Pós-biótico.



## ABSTRACT

Food allergy is triggered when there is an abnormal activation of the immune system by food allergens. One of the strategies that have been studied for the treatment of food allergy is the use of probiotics, considering their immunomodulatory effects. Therefore, the aim of this study is to evaluate the probiotic effect of *Akkermansia muciniphila* BAA-835 in an *in vivo* model of food allergy, analyzing clinical, immunological, histological and microbiological parameters. In addition, the effect of the viability and the association with *Bifidobacterium longum* 5<sup>1A</sup> were also evaluated. For this purpose, mice were sensitized with ovalbumin (OVA) (day 0). After 14 days they received a booster. The control group received only the adjuvant with saline by day 0 and only saline on 14<sup>th</sup> day. On 18<sup>th</sup> day, mice received daily the respective treatment of 1x10<sup>9</sup> UFC of *A. muciniphila* viable or inactivated or associated with *B. longum* 5<sup>1A</sup> until the end of the experiment (day 28). The control group received only saline. From 21<sup>st</sup> day mice were challenged with a diet containing OVA. On 28<sup>th</sup> day mice were euthanized. Oral administration of viable *A. muciniphila* led to a significant attenuation of the body weight loss, tissue damage, levels of IgE and IgG1 anti-OVA, eosinophils, neutrophils, eotaxin-1, CXCL1/KC and levels of pro-inflammatory cytokines (IL4, IL6, IL9, IL13, IL17 and TNF). However, it did not change the levels of IL10 (anti-inflammatory cytokine). Allergic mice showed a significant increase in *Staphylococcus* levels and total yeast frequency. In contrast, the treated group showed a reduction in *Staphylococcus* levels and in the frequency of total yeast. However, the bacteria did not promote a significant attenuation in the levels of intestinal permeability. In addition, the oral administration of the bacterium inactivated by heat (75°C) was able to significantly reduce the IgE anti-OVA and eosinophil levels. Lastly, the association of *A. muciniphila* with *B. longum* 5<sup>1A</sup> did not improve the effects presented by *A. muciniphila* in food allergy, aggravating the signs of inflammation. Our data demonstrate that the oral administration of viable and heat-inactivated *A. muciniphila* BAA-835 promotes a systemic immunomodulatory effect in the analyzed model, which suggests its probiotic and postbiotic properties.

**Keywords:** Probiotic. *Akkermansia muciniphila*. Food allergy. Ovalbumin. Immunomodulation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Anatomia da mucosa intestinal.....	18
Figura 2 – Inflamação alérgica mediada por IgE.....	22
Figura 3 – Linha do tempo de marcos na história dos probióticos.....	25
Figura 4 – Resumo dos mecanismos de ação dos probióticos em doenças alérgicas. .....	27
Figura 5 – Resumo dos mecanismos de interação entre <i>Akkermansia muciniphila</i> e seu hospedeiro.....	30
Figura 6 – Modelo esquemático do período de sensibilização, tratamento e desafio alérgico no modelo murino de alergia alimentar.....	40
Figura 7 – Desenvolvimento ponderal.....	50
Figura 8 – Consumo de ração.....	52
Figura 9 – Avaliação dos níveis de IgE anti-OVA (A) e IgG1 anti-OVA (B).....	53
Figura 10 – Avaliação dos níveis de EPO (A) e Eotaxina-1 (B).....	56
Figura 11 – Fotomicrografias da histologia corada com HE dos 4 grupos (N = 6 animais/grupo) com aumento de 10X:.....	59
Figura 12 – Fotomicrografias da histologia corada com PAS dos 4 grupos (N = 6 animais/grupo) com aumento de 10X:.....	61
Figura 13 – Avaliação dos níveis de MPO (A) e CXCL1/KC (B) no jejuno proximal..	63
Figura 14 – Avaliação dos níveis de IL4 (A), IL9 (B), IL13 (C), IL6 (D), IL17 (E), TNF (F) e IL10 (G) no jejuno proximal.....	66
Figura 15 – Composição da microbiota intestinal por método dependente de cultivo. .....	70
Figura 16 – Avaliação da permeabilidade intestinal.....	73
Figura 17 – Avaliação dos efeitos de <i>A. muciniphila</i> inativada nos níveis de IgE anti-OVA (A) e EPO (B).....	75
Figura 18 – Avaliação da associação de <i>A. muciniphila</i> com <i>B. longum</i> 5 <sup>1A</sup> nos níveis de IgE anti-OVA (A) e EPO (B).....	76

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Receita padrão para roedores baseada na AING93.....	36
Tabela 2 – Desenho experimental com as respectivas designações dos grupos e tratamentos, experimento 1.....	38
Tabela 3 – Desenho experimental com as respectivas designações dos grupos e tratamentos, experimento 2.....	39
Tabela 4 – Escore histopatológico do jejuno proximal.....	43
Tabela 5 – Meios e condições de cultivo para a análise qualitativa e quantitativa da composição da microbiota intestinal presente nas fezes dos camundongos coletadas no último dia do desafio.....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'-Azino-bis (3 - etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
Al(OH) <sub>3</sub>	Hidróxido de alumínio
ANOVA	Análises de variância (do inglês <i>analysis of variance</i> )
APC	Células apresentadoras de antígenos
BAL	Bactérias ácido lácticas
BHI	Infuso de Cérebro e Coração (do inglês <i>Brain Heart Infusion</i> )
CD	Células dendríticas
CEBIO	Centro de Bioterismo
Células M	<i>Microfold</i>
Células NK	Do inglês <i>natural killer cells</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CXCL1/KC	Quimiocina motivo CXC ligante 1
D.O	Densidade ótica
EDTA	Ácido etilenodiamina
ELISA	Ensaio de Absorção Imunoenzimático
EPO	Peroxidase eosinofílica (do inglês <i>Eosinophil Peroxidase</i> )
FAO	Organização das Nações Americanas de Alimento e Agricultura (do inglês <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> )
FcγRs	Receptor de alta afinidade presente nas células mieloides
FcεRI	Receptor de alta afinidade a imunoglobulina do tipo E
FID	Detector de ionização por chama (do inglês <i>flame ionization detector</i> )
GALT	Tecido linfoide associado ao intestino (do inglês <i>gut associated lymphoid tissue</i> )
GAPs	Passagens associadas as células caliciformes (do inglês, <i>goblet cell-associated antigen passages</i> )
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
HE	Hematoxilina e Eosina

HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
i.g.	Intragástrica
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IFN $\gamma$	Interferon gama
IgE	Imunoglobulina do tipo E
IgG	Imunoglobulina do tipo G
IL	Interleucina
ILC	Células linfoides inatas
kCal	Quilocaloria
LP	Lâmina Própria
mg	Miligramas
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal classe ( do inglês, <i>major histocompatibility complex</i> )
mL	Mililitros
MPO	Mieloperoxidase
MRS	de Mann, Rogosa & Sharp
NaCl	Cloreto de Sódio
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato monossódico
NaPO <sub>4</sub>	Fosfato de sódio
NB2	Nível de biossegurança 2
nm	Nanômetro
°C	Graus Celsius
OFC	do inglês <i>oral food challenge</i>
OPD	ortofenileno-diamino
OVA	Ovalbumina
PAF	Fator de ativação de plaquetas (do inglês <i>Platelet-Activating Factor</i> )
PAS	Ácido Periódico de Schiff
PBS	Tampão fosfato-salino (do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Permeabilidade Intestinal
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonil
PP	Placas de Peyer
rpm	Rotação por minuto

s.c.	Subcutânea
SI	Sistema imune
slgA	Imunoglobulina secretória do tipo A
SPT	do inglês <i>Skin Prick Test</i>
TGI	Trato gastrointestinal
Th2	Linfócitos auxiliares (do inglês, <i>helper T cells</i> )
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	Linfócito T regulatório
UFC	Unidades formadoras de colônias
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
WHO	Organização Mundial da Saúde (do inglês <i>World Health Organization</i> )
µg	Micrograma
µm	Micrômetro

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>1.1 Epitélio intestinal.....</b>	<b>16</b>
<b>1.2 Alergia Alimentar.....</b>	<b>20</b>
<b>1.3 Probióticos.....</b>	<b>25</b>
1.3.1 <i>Akkermansia muciniphila</i> .....	28
1.3.2 <i>Bifidobacterium</i> .....	31
1.3.3 <i>Bifidobacterium longum</i> 5 <sup>1A</sup> .....	32
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>34</b>
<b>3. OBJETIVO.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1 Objetivo geral.....</b>	<b>35</b>
<b>3.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>35</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
<b>4.1 Animais.....</b>	<b>36</b>
<b>4.2 Microrganismos.....</b>	<b>37</b>
<b>4.3 Tratamento.....</b>	<b>37</b>
<b>4.4 Desenho Experimental.....</b>	<b>38</b>
4.4.1 Sensibilização.....	39
4.4.2 Desafio alergênico.....	39
<b>4.5 Avaliação clínica dos animais e consumo de alimento.....</b>	<b>40</b>
4.5.1 Consumo de ração.....	40
4.5.2 Desenvolvimento Ponderal.....	40
<b>4.6 Análises histológicas.....</b>	<b>41</b>
4.6.1 Coloração de HE.....	41
4.6.2 Técnica de PAS.....	42
4.6.3 Análise das lâminas e fotodocumentação.....	42
4.6.4 Escore do grau de lesão.....	42
4.6.5 Avaliação da produção de muco.....	43
<b>4.7 Avaliação dos parâmetros imunológicos.....</b>	<b>44</b>
4.7.1 Dosagem da Imunoglobulina IgE anti-OVA.....	44
4.7.2 Dosagem de IgG1 anti-OVA.....	45
4.7.3 Avaliação da atividade da enzima peroxidase eosinofílica (EPO).....	45

4.7.4 Avaliação da atividade da MPO.....	46
4.7.5 Dosagem de quimiocinas e citocinas.....	47
<b>4.8 Avaliação da composição da microbiota intestinal na alergia alimentar após o tratamento probiótico por método dependente de cultivo.....</b>	<b>48</b>
<b>4.9 Permeabilidade Intestinal.....</b>	<b>49</b>
<b>4.10 Análises estatísticas.....</b>	<b>49</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>5.1 Desenvolvimento ponderal e consumo de ração.....</b>	<b>50</b>
<b>5.2 Avaliação das imunoglobulinas IgE e IgG anti-OVA.....</b>	<b>52</b>
<b>5.3 Avaliação da atividade de EPO e níveis de Eotaxina-1 (CCL11).....</b>	<b>55</b>
<b>5.4 Análises histológicas.....</b>	<b>57</b>
5.4.1 Análise da produção de muco.....	60
<b>5.5 Avaliação da atividade de MPO e níveis de CXCL1/KC.....</b>	<b>62</b>
<b>5.6 Avaliação dos níveis de IL4, IL6, IL9, IL10, IL13, IL17 e TNF.....</b>	<b>64</b>
<b>5.7 Avaliação da composição da microbiota intestinal na alergia alimentar após o tratamento probiótico por método dependente de cultivo.....</b>	<b>69</b>
<b>5.8 Avaliação da permeabilidade intestinal.....</b>	<b>72</b>
<b>5.9 Avaliação da viabilidade de <i>A. muciniphila</i> na alergia alimentar.....</b>	<b>74</b>
<b>5.10 Avaliação da associação de <i>A. muciniphila</i> com <i>B. Longum</i> 5<sup>1A</sup> na alergia alimentar.....</b>	<b>75</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>78</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>79</b>
<b>ANEXO A – Certificado da Comissão de ÉTICA no Uso de Animais (CEUA)...</b>	<b>100</b>



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Epitélio intestinal

O intestino é composto pelo intestino delgado e o intestino grosso, sendo o intestino delgado o grande responsável pela entrada de alérgenos provenientes da dieta (NIEWIEM; GRZYBOWSKA-CHLEBOWCZYK, 2022). O intestino delgado compreende a porção do piloro até a válvula ileocecal. Em contrapartida, o intestino grosso contempla o ceco, cólon, reto e tem, como segmento terminal, o ânus. Tanto o intestino delgado quanto o intestino grosso são revestidos pelo epitélio intestinal (MOWAT; AGACE, 2014).

O epitélio intestinal consiste em uma camada única de células que vão diferir de acordo com o segmento do intestino analisado; por exemplo, no intestino delgado há a presença das células de Paneth, que não estão presentes no intestino grosso (Figura 1A-B). As células representadas nas Figuras 1A-B (enterócitos, células de *Tuft*, células calciformes, células enteroendócrinas, células M, células de Paneth) desempenham um papel singular na manutenção da homeostase intestinal (ELLIOTT; KAESTNER, 2015; ALLAIRE *et al.*, 2018).

Os enterócitos são as células mais numerosas do epitélio intestinal, correspondendo a aproximadamente 80% das células epiteliais encontradas, e são especializados principalmente na absorção de moléculas (GEHART; CLEVERS, 2018). A capacidade absorptiva dessas células é maximizada pela presença de microvilosidades em sua superfície que ampliam a área de superfície de contato com os nutrientes (MCCONNELL *et al.*, 2009; HARTMANN *et al.*, 2022).

As células de *Tuft* foram identificadas há 60 anos e representam cerca de 0,4-2% das células epiteliais intestinais. Dentre as funções desempenhadas por estas células estão a capacidade de amplificar a proliferação das células epiteliais intestinais, auxiliar na integridade da barreira intestinal, atuar como quimiosensor, além de ativar respostas imune do tipo 2, por meio da produção da citocina IL25, que atua no recrutamento de eosinófilos para os tecidos inflamados (STEELE; MELCHOR; PETRI JUNIOR, 2016; GEHART; CLEVERS, 2018; HENDEL *et al.*, 2022).

As células caliciformes são responsáveis principalmente pela produção de muco por meio da excreção de mucinas. No intestino, a principal mucina secretada é a MUC2, essa é um dos principais constituintes da camada de muco que reveste o intestino. Sua função primordial é de barreira física que dificulta o contato de microrganismos com as células epiteliais (KNOOP; NEWBERRY, 2018; ZHAO; MAYNARD, 2022).

Além disso, estudos mais recentes têm reportado que as células caliciformes também desempenham um papel essencial no sistema imune (SI), evidenciando que estas células são capazes de secretar proteínas anti-microbianas, quimiocinas, citocinas, além de formarem passagens associadas às células caliciformes (GAPs) (do inglês, *goblet cell-associated antigen passages*) que direcionam substâncias do lúmen para as células apresentadoras de antígeno (APC) situadas na lâmina própria (LP) (KNOOP; NEWBERRY, 2018; GEHART; CLEVERS, 2018; TANG *et al.*, 2022).

As células enteroendócrinas são responsáveis pela secreção de hormônios e são classificadas de acordo com os hormônios produzidos por elas. Dentre seus subtipos, tem-se: as células D (produtoras de somatostatina), células G (que produzem gastrina), e as células produtoras de serotonina (ALLAIRE *et al.*, 2018).

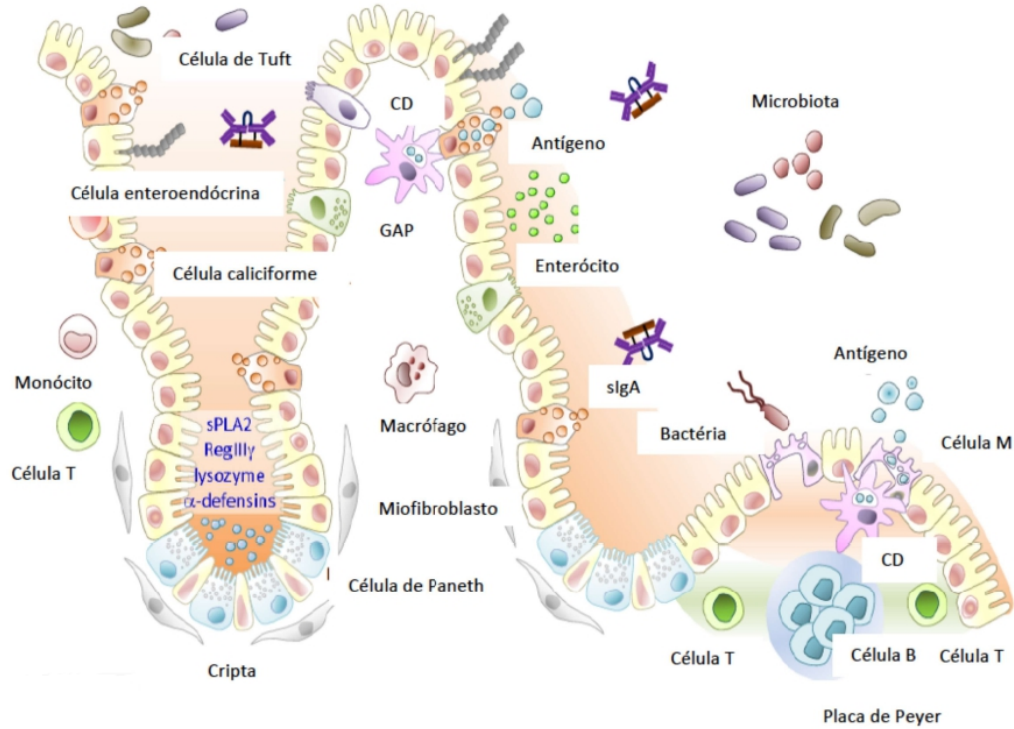
As células linfoides inatas (ILC) apresentam similaridades com os linfócitos, porém não apresentam receptores antígeno-específicos. Em condições de homeostase elas auxiliam na resposta imune contra patógenos por meio da produção de citocinas impedindo a promoção da infecção (GEREMIA; ARANCIBIA-CÁRCAMO, 2017). Entretanto, alguns estudos têm apontado o papel das ILCs em inflamações alérgicas, principalmente o desempenhado pelo subtipo ILC2s. Em processos de inflamação gastrointestinal alérgica, como esofagites eosinofílica, as citocinas IL33 e IL25 podem induzir a produção de citocinas do tipo Th2 pelas ILC2s, que são características no desencadeamento dos processos alérgicos (MORITA; MORO; KOYASU, 2016; KABATA *et al.*, 2022).

As células M (*Microfold*), auxiliam no direcionamento de antígenos do lúmen para as células do SI, situadas na LP (linfócitos T, B, macrófagos e células dendríticas), para que sejam apresentados e processados, sendo este processo facilitado pela proximidade entre estas células e as placas de Peyer (PP) (ROUCH *et al.*, 2016; KIMURA, 2018; BEREK; BELLER; CHU, 2016).

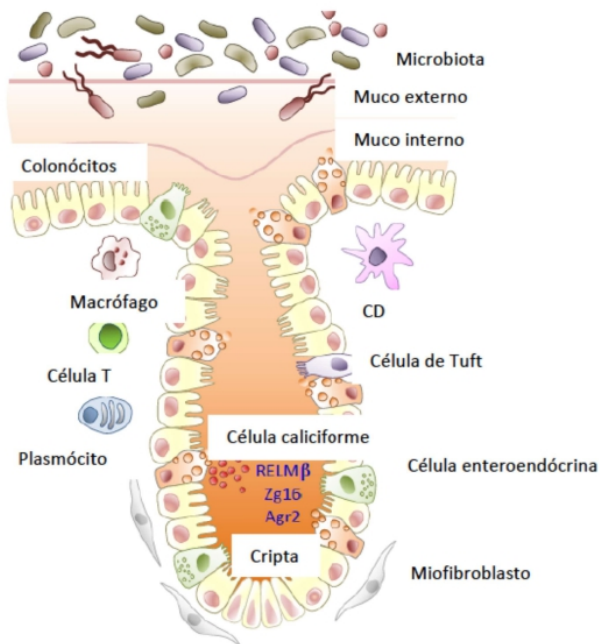
**Figura 1** – Anatomia da mucosa intestinal.

(A) Intestino delgado (B) cólon. CD: Células dendríticas; GAP: Passagens associadas a células caliciformes (do inglês, *globet cell associated antigen passages*).

**A) Intestino Delgado**



**B) Cólon**



Fonte: Adaptado de Allaire *et al.*, 2018.

As PP são constituídas por folículos linfoides que apresentam papel crucial na promoção de tolerância e defesa contra patógenos. Assim, contribuem na constituição do tecido linfoide associado ao intestino (GALT, do inglês *gut associated lymphoid tissue*). As principais células encontradas nestes folículos são linfócitos T, B, macrófagos e células dendríticas (JUNG; HUGOT; BARREAU, 2010). Os linfócitos T e B são células essenciais para a resposta imune e defesa do organismo contra patógenos. Quando ativados, os linfócitos T se diferenciam, culminando no processo de expansão clonal. Ao se diferenciarem, os linfócitos T naïve se transformam em linfócitos efetores, como os linfócitos T auxiliares (cuja principal função é a produção de citocinas, que são proteínas desencadeadoras de diversos processos pró ou anti-inflamatórios), linfócitos T citotóxicos (que promovem a lise de células infectadas por microrganismos), células NK (do inglês, *natural killer*) (que também promovem a eliminação de células infectadas), e os linfócitos B (responsáveis principalmente pela produção de anticorpos) (ABBAS; LICHTMAN, 2007). Dentre os anticorpos produzidos pelas células B, tem-se a sIgA (Imunoglobulina do tipo A secretória). A sIgA é responsável pela imuno exclusão de patógenos, auxilia na regulação da composição da microbiota intestinal e atenua os processos inflamatórios (MATHIAS *et al.*, 2014).

As células de Paneth são células secretórias situadas nas criptas do intestino delgado (Figura 1A). Estas células secretam substâncias antimicrobianas, como as  $\alpha$ -defensinas, lisozimas e fosfolipase A<sub>2</sub> secretória, que auxiliam principalmente na regulação da microbiota intestinal (FILIPP *et al.*, 2018; ALLAIRE *et al.*, 2018).

Tal conjunto de células estão arrançados como mostrado na Figura 1A-B e apresentam conexões por meio das junções intercelulares. Estas, por sua vez, são formadas principalmente pelas junções oclusivas, junções aderentes, desmossomos e junções gap, que são primordiais para o controle do fluxo paracelular de substâncias. Alterações nestes componentes desencadeiam inúmeras enfermidades como doença de Crohn, retocolite ulcerativa e doença celíaca, além de aumentar a permeabilidade intestinal (PI), estimulando o influxo de antígenos (HU *et al.*, 2015).

Outro fator essencial para a manutenção da homeostase intestinal é a presença da microbiota (LEE; TSOLIS; BÄUMLER, 2022). Esta microbiota corresponde ao conjunto de microrganismos (bactéria, fungos, protozoários e vírus)

que vivem em simbiose e desempenham inúmeras funções no metabolismo, na síntese de vitaminas (Vitaminas B e K), sinalização endócrina, prevenção de colonização por patógenos e regulação do SI do hospedeiro (BARKO *et al.*, 2018; IPCI *et al.*, 2017; HOU *et al.*, 2022). O indivíduo tem seu primeiro contato com estes microrganismos ao nascer e, dependendo do tipo de parto, parto normal ou cesariana, esta microbiota vai diferir em sua composição, apresentando características similares à microbiota do trato vaginal (com predominância de *Lactobacillus*, no caso do parto normal) e das fezes, ou da microbiota cutânea materna (com predominância de *Staphylococcus*) (THOMAS *et al.*, 2017). Durante o desenvolvimento do indivíduo a composição da microbiota apresenta modificações; entretanto, alguns filos apresentam uma relação de dominância no intestino de indivíduos saudáveis, como Firmicutes e Bacteroidetes, enquanto Actinobacteria, Proteobacteria e Verrucomicrobia, estão presentes em menor quantidade (TAP *et al.*, 2009; KHO; LAL, 2018).

Todos estes fatores contribuem para que haja a manutenção dos processos de tolerância oral. Esta é definida como a atenuação ativa de respostas imune específicas potencialmente desencadeadas por compostos provenientes da dieta ou até mesmo pela microbiota comensal. Quando esta tolerância é desregulada, ocorre os processos de inflamação e ativação exacerbada do SI que poderá desencadear os processos de alergia alimentar (TORDESILLAS; BERIN, 2018; REZENDE; WEINER, 2022).

## 1.2 Alergia Alimentar

A alergia alimentar é desencadeada quando há a ativação exacerbada do SI por proteínas que normalmente seriam classificadas como inócuas. Tais proteínas geralmente são provenientes de alimentos como ovo, frutos do mar, leite e amendoim. A principal via de entrada desses alérgenos é pela via oral; porém, estudos mais recentes têm destacado o papel da pele no desencadeamento das respostas alérgicas. A alergia alimentar se distingue da intolerância ao alimento pelo fato de a alergia depender da desregulação do SI, e já a intolerância está relacionada a má absorção dos alimentos (TURNBULL; ADAMS; GORARD, 2015;

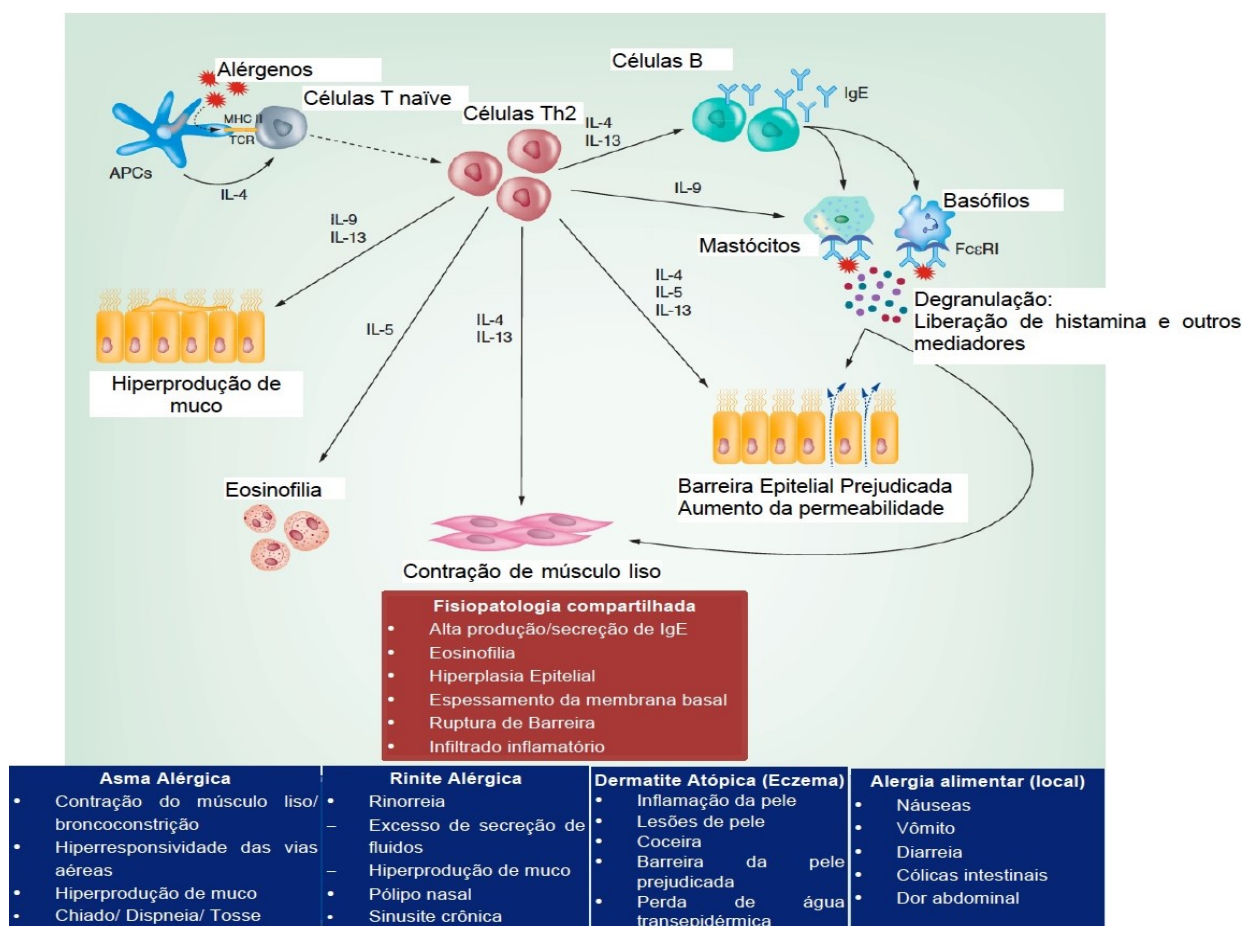
YU; FREELAND; NADEAU, 2016; LOZANO-OJALVO; BERIN; TORDESILLAS, 2018).

As reações alimentares alérgicas são basicamente classificadas em reações mediadas por IgE, não mediadas por IgE e as mistas. As reações mediadas por IgE, que são o foco do presente trabalho, ocorrem quando um indivíduo previamente exposto ao alérgeno sofre uma segunda exposição, acarretando a degranulação mediada por IgE das células imune efectoras (YU; FREELAND; NADEAU, 2016). Ou seja, quando há o contato com o alérgeno, pela primeira vez (sensibilização primária), este é processado e apresentado pelas APCs (macrófagos e células dendríticas). Por sua vez, as APCs associadas ao complexo de histocompatibilidade principal classe II (MHC II, do inglês *major histocompatibility complex type II*) interagem com receptores específicos das células T naïves. Com a presença da interleucina (IL)4, haverá a diferenciação das células T naïves para linfócitos Th2 efetores (do inglês, *helper T cells*). E assim, a célula Th2 efetora além de produzir citocinas (IL4, IL5, IL9, IL13) é responsável por ativar as células B. As células B ativas produzem IgE contra o alérgeno específico. Essas IgE interagem com mastócitos e basófilos por meio dos receptores FcεRI, receptor de alta afinidade a IgE, presentes na superfície dessas células. Em um segundo contato com o alérgeno, há um *cross-linking* desses receptores, e subsequente degranulação dessas células, culminando na liberação dos mediadores inflamatórios e ativação dos eosinófilos, como podem ser visualizados na Figura 2 (POTACZEK *et al.*, 2017; FARIA *et al.*, 2013).

Os eosinófilos se originam na medula espinhal e se diferenciam em resposta à IL5; subsequentemente, migram e circulam pela corrente sanguínea por aproximadamente 20 horas, seguindo, então, para os tecidos, onde ficam localizados por até 14 dias (AHMADI *et al.*, 2016). Em quadros de inflamação, eles são recrutados em elevados níveis por quimiocinas, como a eotaxina-1. Uma vez recrutados, os eosinófilos podem promover danos teciduais, por meio da liberação de enzimas como a peroxidase eosinofílica (EPO). Esta é responsável por catalisar a oxidação de algumas substâncias, como nitrito, gerando espécies altamente reativas que oxidam proteínas. Tal processo pode desencadear estresse oxidativo e morte

celular, promovendo danos teciduais (RAMIREZ *et al.*, 2018; CHU *et al.*, 2014; HOGAN, 2009).

**Figura 2** – Inflamação alérgica mediada por IgE. Mecanismos básicos, patofisiologia, e consequências clínicas selecionadas.



Fonte: Adaptado de Potaczek *et al.*, 2017.

Além dos eosinófilos, é crescente o interesse por outras células que também têm sido relacionadas com o desenvolvimento das reações alérgicas, tais como os neutrófilos. Em processos alérgicos, essas células são capazes de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) e promover a liberação de proteases, como a mieloperoxidase (MPO), que podem promover danos teciduais, intensificando o processo inflamatório. E ainda, o aumento anômalo dos níveis de neutrófilos tem sido associado com a indução dos processos anafiláticos (a anafilaxia é uma reação sistêmica que afeta a pele, os tratos respiratórios, gastrointestinais e o sistema cardiovascular, que se não for propriamente contida pode levar o indivíduo a óbito); tal indução estaria relacionada ao processo de ativação de receptores FcγRs,

presentes nas células mieloides, como neutrófilos, basófilos e macrófagos, com consequente liberação de PAF (do inglês, *Platelet-Activating factor*). Este fator está intimamente relacionado com a indução de anafilaxia (ŽBIKOWSKA-GOTZ *et al.*, 2016; BEUTIER *et al.*, 2017; ROSALES *et al.*, 2016; JÖNSSON *et al.*, 2011). Ademais, Munoz-Cano e colaboradores (2016) sugerem que a imunoglobulina do tipo G (IgG) também auxilia na ativação dos receptores FcγRs. Tal processo seria por meio da formação de imunocomplexos com os alérgenos, que são capazes de ativar os receptores FcγRs. Em camundongos existem 4 subunidades dessa imunoglobulina, sendo que a IgG1 é a subclasse encontrada em maior quantidade frente a alérgenos proteicos (BEUTIER *et al.*, 2017; JÖNSSON *et al.*, 2011).

Os mecanismos descritos anteriormente promovem o desenvolvimento dos sintomas característicos das reações alérgicas mediadas por IgE, como urticária, angioedema, êmese, dor abdominal, diarreia, hipotensão e, nos casos mais graves, anafilaxia (POTACZEK *et al.*, 2017; FARIA *et al.*, 2013; TURNBULL; ADAMS; GORARD, 2015; FISCHER *et al.*, 2018; DE JONG; WICHERS, 2022).

Entretanto, existem ainda as reações alérgicas não mediadas por IgE. Os mecanismos que envolvem tais reações ainda são pouco elucidados. Porém, acredita-se que a ativação de células T por alérgenos alimentares pode mediar a inflamação local devido à liberação de citocinas, tal como o fator de necrose tumoral (TNF) e interferon gama (IFNγ), que favorecem o desencadeamento da inflamação e aumento da PI, evidenciando que as reações não mediadas por IgE afetam principalmente o TGI. Dentre as condições patológicas que envolvem as reações alérgicas não mediadas por IgE pode-se citar a síndrome da enterocolite induzida por proteína da dieta, proctocolite alérgica induzida por proteínas da dieta, enteropatia induzida por proteínas da dieta e doença celíaca. Os sintomas causados por estas condições patológicas podem ser sangramento retal, diarreia e esteatorreia (YU; FREELAND; NADEAU, 2016; NOWAK-WĘGRZYN *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2021).

Ademais, há também desordens que envolvem a ativação de ambas as reações, tanto as mediadas por IgE, quanto não mediadas por IgE. Essas desordens são classificadas como alergias alimentares mistas. Algumas condições patológicas pertencentes a esse grupo são a dermatite atópica, gastroenterite eosinofílica e



esofagite eosinofílica. Os sintomas apresentados podem compreender desde refluxo até anafilaxia (CASTELLAZZI *et al.*, 2013; TURNBULL; ADAMS; GORARD, 2015).

Alguns fatores são considerados de risco para o desencadeamento da alergia alimentar, dentre eles estão etnicidade, fatores genéticos, padrões alimentares característicos de cada região, deficiência em vitamina D e desregulação da composição da microbiota intestinal (disbiose). Alguns autores relataram que a deficiência em vitamina D potencializa a sensibilização aos alérgenos alimentares intensificando os sintomas apresentados (MATSUI *et al.*, 2019). A disbiose pode ser proveniente de diversos fatores, como o uso prolongado de antibióticos, estilo de vida, dieta e higiene excessiva/teoria da higiene. A teoria da higiene foi elucidada por Strachan (1989) e ela correlaciona a diminuição de infecções, devido ao aumento dos hábitos de higiene, com o aumento da incidência de doenças alérgicas (THAM; LEUNG, 2018; SHARMA; IM, 2018; OKADA *et al.*, 2010; PETERS; MAVOA; KOPLIN, 2022; KOSTARA *et al.*, 2021; DOS SANTOS *et al.*, 2022).

O diagnóstico da alergia alimentar é feito considerando o histórico médico do paciente; neste caso, o especialista investiga o tipo de alergia e a possível causa dos sintomas apresentados. Dentre os testes mais utilizados, tem-se o desafio alimentar oral (OFC, do inglês *oral food challenge*), os testes de injeções cutâneas (SPT, do inglês *Skin Prick Test*) e, nos casos das reações mediadas por IgE, dosa-se esta imunoglobulina específica para determinado antígeno (NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES, 2010; CALVANI *et al.*, 2012; TURNBULL; ADAMS; GORARD, 2015; WASERMAN; BÉGIN; WATSON, 2018; TEDNER *et al.*, 2022).

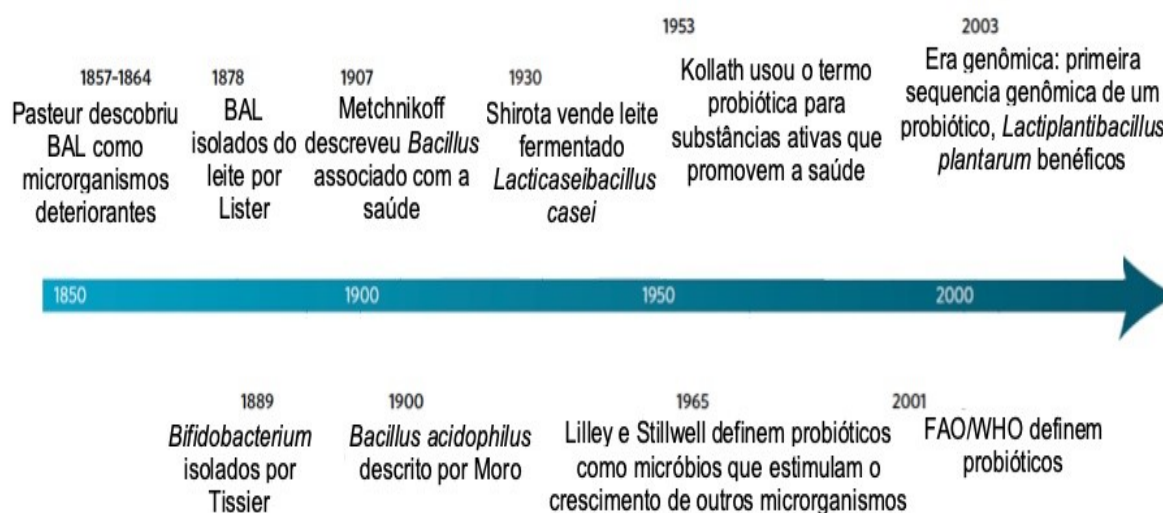
O tratamento da alergia alimentar consiste na remoção do alimento causador desta desordem da dieta. Em casos de contato acidental administra-se epinefrina por via intramuscular, evidenciando a necessidade de novas investigações para o tratamento desta condição patológica (WASERMAN; BÉGIN; WATSON, 2018). Neste sentido, uma das estratégias que vem sendo estudadas para o tratamento da alergia alimentar é o uso de probióticos (CASTELLAZZI *et al.*, 2013; LEE; BANG; WOO, 2013; KIM *et al.*, 2005; BAI *et al.*, 2022).

### 1.3 Probióticos

O termo probiótico tem origem grega que significa “para a vida”. Alguns autores relatam que o termo foi introduzido pela primeira vez a partir de constatações de que indivíduos que viviam na Bulgária apresentavam uma expectativa de vida prolongada, fato atribuído à ingestão regular de alimentos fermentados, como a coalhada (DINAN; QUIGLEY, 2011).

Desde então a história dos probióticos vem sendo delineada. Alguns eventos marcaram a história destes microrganismos até se chegar aos dias atuais em que houve o desenvolvimento de uma definição e um manual que regulamenta o uso dos probióticos (Figura 3). Por esta definição, probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades suficientes conferem benefícios à saúde do hospedeiro (O'TOOLE; MARCHESI; HILL, 2017; FAO/WHO, 2002; HILL *et al.*, 2014; REN *et al.*, 2022).

**Figura 3** – Linha do tempo de marcos na história dos probióticos.



Fonte: Adaptado de O'Toole *et al.* (2017). BAL: Bactérias ácido lácticas. FAO: Organização das Nações Americanas de Alimento e Agricultura (do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*; WHO: Organização Mundial da Saúde (do inglês *World Health Organization*).

Os produtos probióticos estão distribuídos entre alguns setores, tais como: o farmacêutico, de alimentos infantis e produtos lácteos, sendo que o último corresponde à grande maioria e é representado por produtos como iogurtes, leites

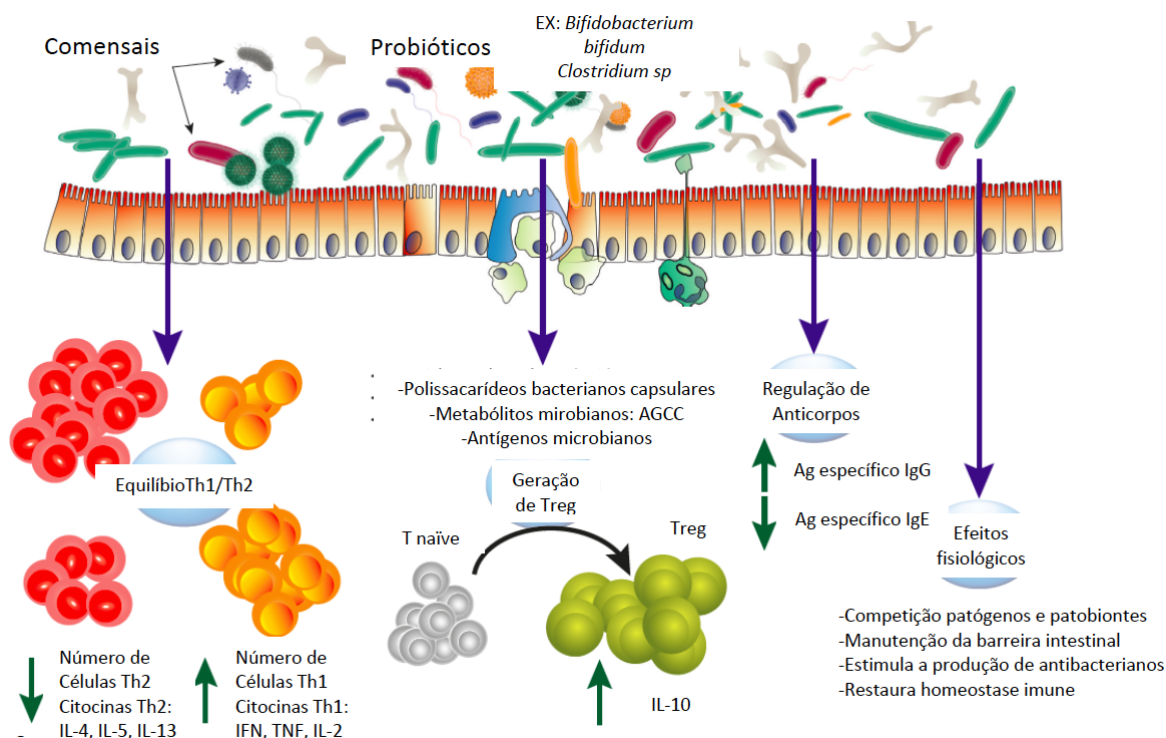
fermentados, queijos e sorvetes (SAAD, 2006). Esses setores já angariaram mais de U\$\$ 40 bilhões de dólares e projeções apontam que em 2023 movimentarão mais de U\$\$ 64 bilhões (GLOBAL MARKET INSIGHTS INC., 2016; REID, GADIR; DHIR, 2019).

Atualmente, há uma gama de produtos que são colocados no mercado como probióticos, mas nem todos cumprem com os requisitos estabelecidos pela sua definição. Além disso, alguns autores relatam falhas na manutenção da viabilidade desses microrganismos presentes nos produtos; tal fato está comumente relacionado às más condições de armazenamento e estocagem do produto, além do não cumprimento dos prazos de viabilidade dos mesmos. Consequentemente, os consumidores podem não usufruir dos efeitos benéficos à saúde conferidos pelos probióticos (DINAN; QUIGLEY, 2011; WENDEL, 2021).

Os probióticos podem atuar nos processos alérgicos por meio de inúmeros mecanismos. Dentre eles tem-se a restauração do equilíbrio entre as repostas do tipo Th1/Th2 e ativação das células T regulatórias (Treg). Além disso, eles podem auxiliar na redução dos níveis de IgE alérgeno específica e aumento dos níveis de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Ainda, podem auxiliar na manutenção da homeostase ao manter a integridade do tecido epitelial, aumentando a produção de antimicrobianos e inibindo, por competição, a sobrevivência de patógenos (Figura 4) (SHARMA; IM, 2018; CHERNIKOVA; DIANA; ZHAO, 2022). Por exemplo, AGCC que são produzidos por alguns probióticos por meio do processo de fermentação de fibras da dieta, atenuam as respostas Th2 na asma e na alergia alimentar (TROMPETTE *et al.*, 2014; TAN *et al.*, 2016). Além disso, estudos realizados por nosso grupo de pesquisa demonstraram que a administração oral de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905, foi capaz de atenuar sinais de inflamação em modelo murino de alergia alimentar à ovalbumina (MIRANDA *et al.*, 2020). Efeitos protetores também foram observados ao administrar tal levedura em modelo murino de asma, que desencadeia um tipo de resposta similar ao da alergia alimentar (FONSECA *et al.*, 2017; MILANI *et al.*, 2022). Sinais de inflamação reduzidos e aumento de IL10 também foram observados por Cheng e colaboradores (2018), onde se avaliou o efeito de *Bifidobacterium bifidum* TMC3115 em um modelo murino de alergia alimentar. Santos e colaboradores (2021) demonstraram que

*Bifidobacterium longum* 5<sup>1A</sup> promoveu a mitigação significativa dos sinais de inflamação em modelo murino de alergia alimentar à ovalbumina.

**Figura 4** – Resumo dos mecanismos de ação dos probióticos em doenças alérgicas.



Fonte: Adaptado de Sharma *et al.*, 2018.

Padrões alterados da composição da microbiota intestinal podem acarretar no desenvolvimento da alergia alimentar (AITORO *et al.*, 2017). Além disso, Nakayama e colaboradores (2011) mostraram diferenças concisas na composição microbiana entre indivíduos alérgicos e não alérgicos. Uma microbiota intestinal alterada pode predispor o indivíduo à alergia alimentar por modificar a sinalização dos receptores do tipo *Toll* (TLR, do inglês *Toll-like receptors*) e modificar a integridade das células epiteliais intestinais (NOWAK-WĘGRZYN; SZAJEWSKA; LACK, 2017; YANG *et al.*, 2022).

Portanto, devido à importância da manutenção da composição microbiana, vários estudos que visam a sua manipulação têm sido realizados e os microrganismos comumente empregados nesses estudos são espécies dos gêneros *Lactobacillus* (*Lactobacillus casei*, *Levilactobacillus brevis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus lactis*) e *Bifidobacterium* (*Bifidobacterium bifidum*,

*Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve*) (CASTELLAZZI *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2005; LEE; BANG; WOO, 2013).

Além destes microrganismos, é crescente o interesse por novos microrganismos que possuam efeitos probióticos, como, por exemplo, a bactéria *Akkermansia muciniphila*, que vem sendo estudada como probiótico de nova geração (CANI; DE VOS, 2017; NAITO; UCHIYAMA; TAKAGI, 2018; DUDÍK *et al.*, 2022).

### 1.3.1 *Akkermansia muciniphila*

Diferentes características tornam um microrganismo capaz de ser utilizado como probiótico. Dentre elas, tem-se a capacidade de resistir a enzimas gastrointestinais, sais biliares, ácidos orgânicos, variações de pH e temperatura (SHI *et al.*, 2016). Estudos realizados por Marcial-Coba e colaboradores (2018) demonstraram que *A. muciniphila* é capaz de sobreviver às condições do trato gastrointestinal (TGI) simulado, além de permanecer viável após o processo de encapsulação. Além disso, Plovier e colaboradores (2017) demonstraram que a administração de *A. muciniphila* tanto viável quanto inativada pelo calor é segura para o uso em humanos, características interessantes para o uso de *A. muciniphila* como potencial probiótico.

*Akkermansia muciniphila* é uma bactéria Gram-negativo, anaeróbia obrigatória, pertencente ao filo Verrucomicrobia. Até o momento, *Akkermansia* é o único gênero dentro do filo Verrucomicrobia presente em amostras intestinais. Ela foi primeiramente isolada por Derrien e colaboradores (2004) a partir de amostras fecais de indivíduos saudáveis. Seu nome foi dado em homenagem ao pesquisador Antoon DL Akkermans, associado à característica da bactéria utilizar mucina como sua principal fonte energética, surgindo então o nome *Akkermansia muciniphila*.

Durante o processo de proliferação celular da bactéria, a mucina é catabolizada, resultando em acetato e propionato como produtos finais. Estes são compostos essenciais para o metabolismo das células epiteliais intestinais (GUO *et al.*, 2017; NAITO; UCHIYAMA; TAKAGI, 2018; GEERLINGS *et al.*, 2018; CANI; DE VOS, 2017). A característica de *A. muciniphila* em catabolizar mucina pode a

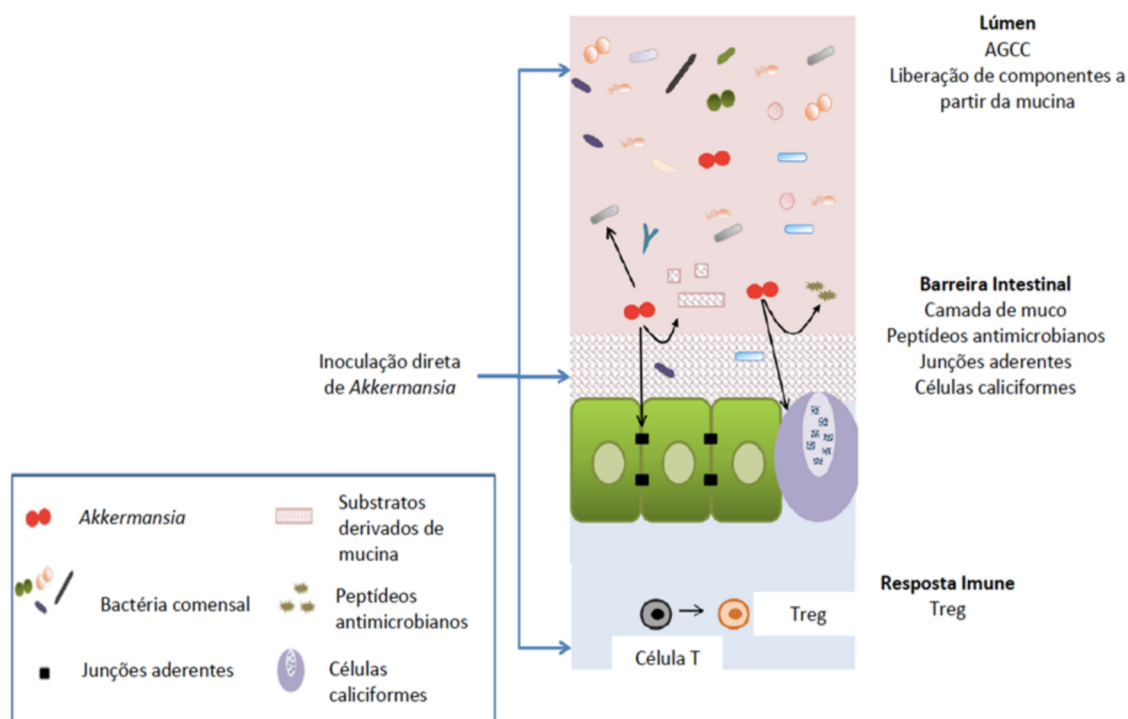
princípio causar dúvidas em relação ao seu uso como probióticos devido ao receio de causar danos na camada de muco que reveste o intestino; porém, já foi demonstrado que ao mesmo tempo em que a bactéria utiliza a mucina como fonte energética, também estimula a síntese de muco, que culmina no alargamento da camada de muco que reveste o intestino, promovendo, assim, uma proteção para a barreira intestinal ao invés de causar danos (OTTOMAN *et al.*, 2017; NAITO; UCHIYAMA; TAKAGI, 2018; DERRIEN; BELZER; DE VOS, 2017).

Em indivíduos saudáveis, aproximadamente 3% da microbiota encontrada no cólon corresponde a *A. muciniphila*. Sua baixa frequência tem sido correlacionada com inúmeras condições patológicas, tais como obesidade, diabetes tipo 2, doenças inflamatórias intestinais e hipertensão (DE VOS, 2017; CANI; DE VOS, 2017; CANI *et al.*, 2022).

Os mecanismos de ação que envolvem os efeitos benéficos de *A. muciniphila* estão sendo amplamente estudados; dentre eles tem-se que a bactéria é capaz de produzir AGCC, estimular a produção de IL10 (citocina anti-inflamatória), promover o aumento de células Treg, estimular a produção de peptídeos antimicrobianos, além de regular a integridade da barreira intestinal. Estes mecanismos estão ilustrados na Figura 5 (NAITO; UCHIYAMA; TAKAGI, 2018; DERRIEN; BELZER; DE VOS, 2017; CHELAKKOT *et al.*, 2018; CANI *et al.*, 2022).

Além disso, estudos recentes têm demonstrado que alguns microrganismos inativados podem exercer efeitos benéficos. Para tais microrganismos foi dado a denominação de pós-bióticos (SALMINEN *et al.*, 2021). Esse termo refere-se a preparação de alimentos contendo microrganismos inativados e/ou seus componentes que conferem benefício à saúde do hospedeiro (SALMINEN *et al.*, 2021). Devido aos seus efeitos benéficos, tais como imunomodulação, regulações de vias bioquímicas e efeitos anti-inflamatórios, é crescente o interesse pelos pós-bióticos, principalmente devido à sua aplicabilidade aumentar o tempo de prateleira dos produtos e ser mais seguro quando recomendados para indivíduos imunocomprometidos (AKTER; PARK; JUNG, 2020).

**Figura 5** – Resumo dos mecanismos de interação entre *Akkermansia muciniphila* e seu hospedeiro.



Fonte: Adaptado de Derrien, Belzer e de Vos, 2017.

Alguns estudos demonstraram que compostos presentes na membrana externa de *A. muciniphila* ou a bactéria pasteurizada promove efeitos benéficos no manejo de doenças metabólicas, inflamatórias e autoimunes (RODRIGUES *et al.*, 2022). Plovier e colaboradores (2017) demonstraram que a administração de *A. muciniphila* inativada pelo calor promoveu melhoras significativas em modelos murinos de obesidade e diabetes tipo 2. Tais efeitos benéficos poderiam estar associados à presença de uma proteína localizada na membrana externa de *A. muciniphila*, denominada Amuc\_1100. Essa proteína é estável após o processo de pasteurização e já foi demonstrado que ela pode interagir com os receptores do tipo Toll 2, promovendo os efeitos benéficos (PLOVIER *et al.*, 2017).

Em complementação, estudos realizados por Pedret e colaboradores (2018) demonstraram que a administração de *Bifidobacterium* pode acarretar no aumento nos níveis de *Akkermansia* e esta mudança promoveu efeitos benéficos em indivíduos obesos. Ademais, Casaro e colaboradores (2021) demonstraram que a administração *B. longum* 5<sup>1A</sup> foi capaz de promover um aumento nos níveis de *Akkermansia* em animais A/J. Os pesquisadores observaram que tal desfecho

ocorreu justamente no grupo de animais que apresentou uma atenuação dos sinais da inflamação no modelo murino de inflamação alérgica das vias aéreas. Sendo assim, infere-se que os efeitos benéficos promovidos por *Akkermansia* podem ser potencializados quando há a uma associação destes microrganismos.

### 1.3.2 *Bifidobacterium*

Bifidobactéria foi primeiramente isolada e descrita por Henry Tissier por volta de 1900. Nesta época ele observou uma bactéria, em formato de Y, que estava presente em fezes de crianças. O gênero *Bifidobacterium* é um dos grupos dominantes presentes no intestino de vários animais, principalmente durante o período de aleitamento materno dos recém-nascidos (corresponde a aproximadamente 80% da microbiota intestinal infantil). Elas são bactérias sacarolíticas, Gram-positivo que pertencem ao filo *Actinobacteria*, família *Bifidobacteriaceae* (LEAHY *et al.*, 2005; MILANI *et al.*, 2016; TURRONI *et al.*, 2012).

Espécies deste gênero tem sido utilizadas em produtos fermentados que auxiliam na digestibilidade da lactose, possuem atividade anticarcinogênica, reduzem os níveis de colesterol e auxiliam na absorção de cálcio e síntese de vitamina B (ABDELAZEZ *et al.*, 2017). Além disso, vários estudos tem demonstrado seus efeitos benéficos promovidos pela produção de AGCC, estímulo à proliferação de células Treg e auxiliam na manutenção da PI estabilizando as claudinas e junções intercelulares (VLASOVA *et al.*, 2016; LÓPEZ *et al.*, 2011; BERGMANN *et al.*, 2013).

Dentre as espécies estudadas tem-se *B. infantis* (atenua a enterocolite necrosante), *B. breve* (atenua sinais de alergia, doença celíaca, obesidade, dentre outras) e *B. longum* (atenua reações adversas causadas pela má absorção do glúten e inflamações alérgicas) (BERGMANN *et al.*, 2013; BOZZI *et al.*, 2018; MCCARVILLE *et al.*, 2017; MENDES *et al.*, 2017). Em um estudo realizado por Souza e colaboradores (2013) avaliou-se o potencial probiótico de quatro espécies de *Bifidobacterium* e, dentre elas, *B. longum* 5<sup>1A</sup> apresentou o melhor potencial probiótico.



### 1.3.3 *Bifidobacterium longum* 5<sup>1A</sup>

A bactéria *B. longum* 5<sup>1A</sup> foi isolada de fezes de uma criança saudável e identificada por ferramentas moleculares. Atualmente pertence à coleção do LABio, Departamento de Microbiologia, ICB/UFMG. Esta bactéria tem sido estudada em vários modelos, tais como asma, alergia alimentar, infecção por *Klebsiella*, giardíase, gota, estudos *in vitro* na área de dermatologia e até mesmo em um ensaio clínico contra constipação intestinal (MENDES *et al.*, 2017; GUERRA *et al.*, 2011; VIEIRA *et al.*, 2015; VIEIRA *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2018; FONSECA, 2015; SANTOS *et al.*, 2021).

Em modelos de asma *B. longum* 5<sup>1A</sup> foi capaz de atenuar os sinais de inflamação no pulmão além de melhorar a hiperresposividade brônquica, estes efeitos estão relacionados com o aumento da produção de AGCC e aumento de células Treg no pulmão (MENDES *et al.*, 2017).

Santos e colaboradores (2021) demonstraram que em modelo de alergia alimentar a administração oral de *B. longum* 5<sup>1A</sup> promoveu uma atenuação sistêmica dos sinais da inflamação no modelo investigado. Tal efeito estaria atrelado aos mecanismos imunomoduladores desempenhados pela bactéria.

No modelo de infecção por *Klebsiella*, *B. longum* 5<sup>1A</sup> promoveu a atenuação da infecção por meio da ativação de macrófagos com consequente produção de radicais livres, além de estimular a síntese de IL10 (VIEIRA *et al.*, 2016). Além disso, em modelos animais de giardíase, *B. longum* 5<sup>1A</sup> e *Weissella paramesenteroides* WpK4 apresentaram potencial probiótico diminuindo a carga parasitária dos animais infectados com o parasita (FONSECA, 2015).

Em modelos de gota, a bactéria promoveu a atenuação dos níveis de leucócitos nas articulações, além de diminuir os níveis das citocinas pró-inflamatórias, além de estimular a síntese de IL10 (VIEIRA *et al.*, 2015).

Estudos, *in vitro*, ainda têm demonstrado o potencial probiótico de *B. longum* 5<sup>1A</sup> para uso em formulações dermatológicas. Esse efeito foi observado devido a funções antagonistas exercidas por essa bactéria contra microrganismos patogênicos (SILVA *et al.*, 2018).

E ainda, *B. longum* 5<sup>1A</sup> é capaz de promover o aumento do trânsito intestinal e melhorar os sintomas da obstrução intestinal crônica, tais como: consistência das fezes, frequência evacuatória, dor ao evacuar e dor abdominal, em crianças e adolescentes. Esse efeito pode estar relacionado com o estímulo a contração do íleo e indução do relaxamento do cólon e ainda, pode estar relacionado com a modificação da composição da microbiota intestinal com consequente modificação de seus metabólitos (GUERRA *et al.*, 2011).

Ademais, Quintanilha e colaboradores (2022) demonstraram que *B. longum* 5<sup>1A</sup> atenuou sinais da inflamação em modelo murino de mucosite intestinal induzida por irinotecano. Em suma, a administração oral de *B. longum* 5<sup>1A</sup> tem sido associada com inúmeros benefícios para a saúde do hospedeiro, tais como os descritos anteriormente.

Estudos realizados por Souza e colaboradores (2012) demonstraram que *B. longum* 5<sup>1A</sup> promove efeitos benéficos até mesmo quando inativada em um modelo murino de salmonelose. Tendo em vista que alguns probióticos podem translocar e desencadear danos em indivíduos imunossuprimidos, o efeito protetor advindo destes microrganismos inativados é de extrema importância (LIONG, 2008).

Além disso, estudos realizados por Bernucci e colaboradores (2017) evidenciaram que *B. longum* 5<sup>1A</sup> é capaz de sobreviver ao processo de microencapsulação por *spray drying*, o que é de interesse biotecnológico, já que este processo pode aumentar o tempo de prateleira do produto, tornando-a apta para formulações biotecnológicas.

## 2. JUSTIFICATIVA

A alergia alimentar é uma condição patológica que pode desencadear quadros clínicos graves, como, por exemplo, a anafilaxia. Atualmente, o método padrão ouro para o tratamento da alergia alimentar consiste na remoção do alimento causador da alergia da dieta. Devido à defasagem em termos de terapias que possam atenuar os sintomas causados pela alergia alimentar e aos fatores negativos atrelados a restrição alimentar do alérgeno (como, por exemplo, a atenção constante aos produtos alimentícios processados e seus rótulos, risco de desnutrição e desconfortos sociais) novas formas de tratamento são necessárias para melhorar a qualidade de vida dos indivíduos alérgicos. Neste sentido, os probióticos vêm sendo apontados como possível alternativa.

Os efeitos benéficos dos probióticos clássicos como espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* já são bem elucidados, porém, pouco se sabe a respeito dos probióticos de nova geração. Dentro dessa terminologia encontra-se a bactéria *A. muciniphila*. Estudos recentes têm demonstrado que essa bactéria é capaz de produzir AGCC, estimular a produção de IL10, promover o aumento de células Treg, além de regular a integridade da barreira intestinal, características que são essenciais para o estabelecimento da tolerância oral, que geralmente está comprometida nos processos de alergia alimentar. Sendo assim, *A. muciniphila* apresenta características interessantes que a tornam um potencial candidato para o tratamento da alergia alimentar. Além disso, alguns estudos demonstraram que *A. muciniphila* apresenta todos os requisitos necessários para que um microrganismo seja considerado um probiótico. Ademais, *A. muciniphila* tanto viável quanto inativada pelo calor é segura para o uso em humanos, o que nos leva a avaliar o efeito dessa bactéria na alergia alimentar, com o intuito de investigar seu papel protetor e os mecanismos envolvidos, já que até o momento nenhum estudo foi desenvolvido a fim de investigar tais aspectos.

Até o momento, pouco se sabe a respeito dos efeitos benéficos da administração dessa bactéria inativada e sua associação com outros microrganismos, como *B. longum* 5<sup>1A</sup>, em modelos experimentais, evidenciando a necessidade de novas investigações.

### 3. OBJETIVO

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial probiótico de *A. muciniphila* BAA-835 em modelo murino de alergia alimentar à ovalbumina.

#### 3.2 Objetivos específicos

- a) Verificar o efeito do tratamento com *A. muciniphila*, avaliando a resposta na alergia alimentar induzida, analisando os parâmetros clínicos, histológicos, imunológicos e microbiológicos.
- b) Verificar o efeito da viabilidade da bactéria na resposta alérgica.
- c) Verificar se os efeitos benéficos promovidos por *A. muciniphila* podem ser potencializados quando associada com *B. longum* 5<sup>1A</sup>.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

O processo de manipulação e manutenção dos animais foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (BRASIL, 2008). Todos os experimentos propostos foram aprovados pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA/UFMG) (ANEXO A). Nesses foram utilizados camundongos (*Mus musculus*), de seis a oito semanas de idade, fêmeas, da linhagem BALB/c, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do ICB/UFMG. Os animais foram mantidos em micro-isoladores ALE.MIL.01.03 (Alesco, Monte Mor, SP, Brasil), no biotério do Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG, nível de biossegurança 2 (NB2). A dieta administrada durante todo o experimento foi baseada no trabalho de Reeves, Nielsen e Fahey (1993) (Tabela 1). Porém, após 21 dias, a caseína, que é a fonte de proteínas da dieta, foi trocada por ovalbumina (OVA) até o término do experimento. Os animais receberam água filtrada *ad libitum*. Um ciclo diurno/noturno de 12 horas foi mantido no biotério, assim como aeração, umidade (60-80%) e temperatura ( $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) também foram controladas. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, sendo este procedimento precedido por anestesia geral com solução de cetamina/xilazina (100 mg/kg de cetamina e 10 mg/kg de xilazina) (CEUA/UFMG). Para cada experimento foram utilizados 6 animais por grupo.

**Tabela 1** – Receita padrão para roedores baseada na AING93.

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

Fonte: Adaptada de Reeves, Nielsen e Fahey, 1993.

## 4.2 Microrganismos

No presente estudo, dois microrganismos foram utilizados: *A. muciniphila* BAA-835 (DSM 22959) e *B. longum* 5<sup>1A</sup>. O primeiro foi obtido da Coleção Alemã de Microorganismos e Culturas Celulares GmbH (DSMZ), Braunschweig, Alemanha). Este foi cultivado em meio *brain heart infusion* (BHI) e preservado em glicerol 20% à -80°C. Sua reativação foi procedida em caldo BHI suplementado com hemina (0,1%), menadiona (0,1%), extrato de levedura (5 g/L), L-cisteína (0,5 g/L) e mucina (0,1%), por 48 horas a 37°C, em jarra anaeróbica, utilizando o kit comercial ANAEROBAC® (PROBAC DO BRASIL, Produtos Bacteriológicos Ltda, São Paulo, SP) como sistema de geração de atmosfera anaeróbica. Para a inativação bacteriana, a cultura foi centrifugada (9500 rpm, 10 minutos) (Centrífuga Heraeus Megafuge 8R, ThermoScientific), ressuspensa em solução salina (0,9%) e a ressuspensão submetida a banho-Maria por 75°C por 10 minutos. Subsequentemente, a amostra foi inoculada em meio BHI suplementado e incubado como descrito anteriormente. A ausência de turbidez foi analisada para confirmar o processo de inativação. *Bifidobacterium longum* 5<sup>1A</sup> também foi incubada nas mesmas condições anaeróbicas, porém em meio *de Mann, Rogosa and Sharp* (MRS) (Merck) suplementado com L-cisteína (0,05%). Ambos os microrganismos foram concentrados até a obtenção de 10<sup>10</sup> unidades formadoras de colônia (UFC)/mL.

## 4.3 Tratamento

Nos grupos tratados com *A. muciniphila*; *B. longum* 5<sup>1A</sup>; *A. muciniphila* inativada ou *A. muciniphila* associada a *B. longum* 5<sup>1A</sup> foram inoculados, diariamente, a partir do terceiro dia antes do desafio alérgico até o fim do experimento, por via intragástrica (i.g.), 0,1 mL da respectiva dose das bactérias viáveis ou inativadas (Tabelas 2 e 3). Para os grupos não tratados foram administrados 0,1 mL de solução salina fisiológica (i.g.), a partir do terceiro dia antes do desafio alérgico até o fim do experimento.

#### 4.4 Desenho Experimental

Para o experimento 1, que visou avaliar o efeito de *A. muciniphila* nos parâmetros clínicos, histológicos, imunológicos e microbiológicos, além do efeito de *A. muciniphila* inativada pelo calor, os animais foram divididos em cinco grupos (N = 6 animais/grupo). Para tal, os animais receberam os seguintes tratamentos em seus respectivos dias (Tabela 2): (I) Animais controle, (II) Animais controle tratados com 0,1 mL de *A. muciniphila* contendo  $1 \times 10^{10}$  UFC/mL, (III) Animais sensibilizados com OVA e (IV) Animais sensibilizados e tratados com 0,1 mL de *A. muciniphila* contendo  $1 \times 10^{10}$  UFC/mL de *A. muciniphila* viável e (V) Animais sensibilizados com OVA e tratados com 0,1 mL de *A. muciniphila* contendo  $1 \times 10^{10}$  UFC/mL da bactéria inativada pelo calor.

**Tabela 2** – Desenho experimental com as respectivas designações dos grupos e tratamentos, experimento 1.

<b>Tempo Tratamento/ Grupo</b>	<b>Dia 0 Sensibilização Primária</b>	<b>Dia 14 Reforço Imunológico</b>	<b>Dia 18 Probiótico</b>	<b>Dia 21 Desafio OVA</b>	<b>Dia 28 Sacrifício</b>
<b>Controle</b>	-	-	-	-	+
<b>Akk</b>	-	-	+	+	+
<b>OVA</b>	+	+	-	+	+
<b>OVA+Akk</b>	+	+	+	+	+
<b>OVA+Akk In</b>	+	+	+	+	+

(OVA: Animais sensibilizados com OVA; Akk: *A. muciniphila* viável; In: inativada). Sinal positivo (+) e negativo (-) indicam a realização ou ausência de determinado tratamento no respectivo grupo.

Fonte: Elaborado pela autora.

E, ainda, para avaliar se os efeitos benéficos de *A. muciniphila* são potencializados quando associados com *B. longum* 5<sup>1A</sup>, realizou-se o experimento 2 (Tabela 3): (I) Animais controle, (II) Animais controle tratados com 0,1 mL de *A. muciniphila* contendo  $1 \times 10^{10}$  UFC/mL, (III) Animais controle tratados com 0,1 mL de *B. longum* 5<sup>1A</sup> contendo  $1 \times 10^{10}$  UFC/mL (IV) Animais controle tratados com 0,1 mL de *A. muciniphila* e *B. longum* 5<sup>1A</sup> contendo  $1 \times 10^{10}$  UFC/mL de cada microrganismo (V) Animais sensibilizados com OVA, (VI) Animais sensibilizados e tratados com 0,1 mL de *A. muciniphila* contendo  $1 \times 10^{10}$  UFC/mL de *A. muciniphila*, (VII) Animais sensibilizados e tratados com 0,1 mL de *B. longum* 5<sup>1A</sup>, (VIII) Animais sensibilizados

e tratados com 0,1 mL de *A. muciniphila* e *B. longum* 5<sup>1A</sup> contendo 1x10<sup>10</sup> UFC/mL de cada microrganismo.

**Tabela 3** – Desenho experimental com as respectivas designações dos grupos e tratamentos, experimento 2.

<b>Tempo Tratamento/ Grupo</b>	<b>Dia 0 Sensibilização Primária</b>	<b>Dia 14 Reforço Imunológico</b>	<b>Dia 18 Probióticos</b>	<b>Dia 21 Desafio OVA</b>	<b>Dia 28 Sacrifício</b>
<b>Controle</b>	-	-	-	-	+
<b>Akk</b>	-	-	+	+	+
<b>B</b>	-	-	+	+	+
<b>Akk +B</b>	-	-	+	+	+
<b>OVA</b>	+	+	-	+	+
<b>OVA+Akk</b>	+	+	+	+	+
<b>OVA+B</b>	+	+	+	+	+
<b>OVA + Akk + B</b>	+	+	+	+	+

(OVA: Animais sensibilizados com OVA; Akk: *A. muciniphila*; B: *B. longum* 5<sup>1A</sup>). Sinal positivo (+) e negativo (-) indicam a realização ou ausência de determinado tratamento no respectivo grupo.

Fonte: Elaborado pela autora.

#### 4.4.1 Sensibilização

A sensibilização dos animais foi executada de acordo com os experimentos realizados por Dourado e colaboradores (2011). Para tal, administrou-se OVA (albumina da clara de ovo, SIGMA Grade V, SIGMA Chemical Co. St. Louis, MO, USA), na dose de 10 µg, adsorvida em hidróxido de alumínio (Al(OH)<sub>3</sub>) (1 mg, SIGMA) e salina (0,2 mL) por via subcutânea (s.c.) no dorso dos camundongos (dia 0). Depois de 14 dias (dia 14) receberam reforço imunológico com 10 µg de OVA em 0,2 mL de solução salina. O grupo controle recebeu apenas o adjuvante, por via s.c., com a solução salina no dia 0 e apenas salina no dia 14 (Figura 6).

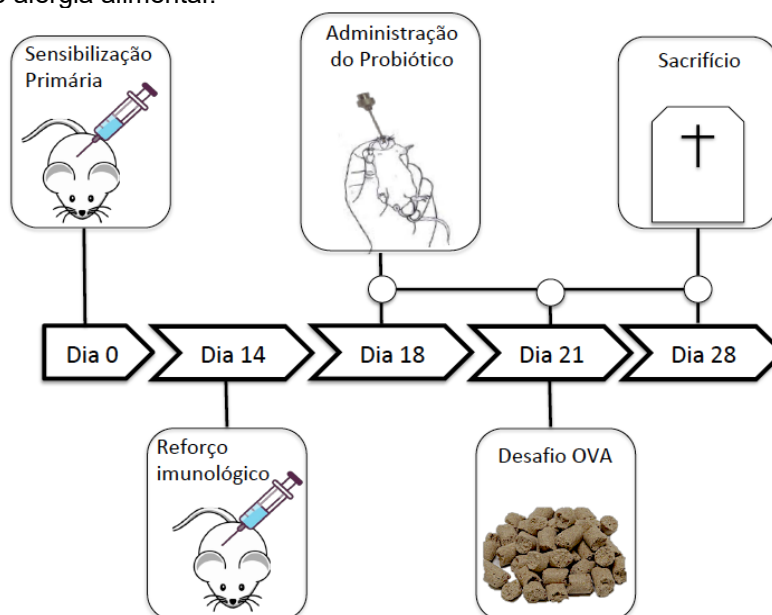
#### 4.4.2 Desafio alérgico

O desafio alérgico foi realizado no 21º dia, que consistiu na troca da dieta balanceada de caseína pela dieta contendo OVA. Para os grupos sensibilizados a ingestão da dieta contendo OVA representa o desafio alérgico (Figura 6). A



determinação do dia para o desafio está em conformidade com o trabalho realizado por Dourado e colaboradores (2011).

**Figura 6** – Modelo esquemático do período de sensibilização, tratamento e desafio alergênico no modelo murino de alergia alimentar.



Fonte: Elaborado pela autora.

## 4.5 Avaliação clínica dos animais e consumo de alimento

### 4.5.1 Consumo de ração

A ração foi pesada antes de ser administrada para os animais e depois de ter sido depositada nos micro-isoladores, a partir do dia 21 até o final do experimento, no dia 28. O resultado foi expresso em consumo estimado em gramas para cada gaiola por dia.

### 4.5.2 Desenvolvimento Ponderal

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

## 4.6 Análises histológicas

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

### 4.6.1 Coloração de HE

Os cortes de quatro  $\mu\text{m}$  do jejuno proximal de cada animal foram desparafinizados em dois banhos de xilol, 15 minutos cada, hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes (100%, 90%, 80% e 70%), por 3 minutos cada, e hidratados em água corrente por 5 minutos. Os cortes foram então corados

por Hematoxilina de Harris por 50 segundos e lavados em água corrente durante 20 minutos. Posteriormente, corou-se com Eosina por 1 minuto e 30 segundos e iniciou-se o processo de desidratação em concentrações crescentes de álcool e diafanizadas em xilol. Os cortes histológicos foram montados.

#### 4.6.2 Técnica de PAS

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

#### 4.6.3 Análise das lâminas e fotodocumentação

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

#### 4.6.4 Escore do grau de lesão

As fotografias do intestino foram realizadas em um aumento de 10X de modo a abranger a maior área possível do órgão. Posteriormente foi feita a elaboração de

um escore levando em consideração a presença de infiltrado inflamatório, produção de muco, tamanho das vilosidades intestinais, hipertrofia das criptas e das células de Paneth, como mostrado na Tabela 4.

**Tabela 4** – Escore histopatológico do jejunó proximal.

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

Fonte: Elaborado pela autora.

#### 4.6.5 Avaliação da produção de muco

As fotografias das lâminas coradas por PAS foram utilizadas para avaliar o número de células caliciformes (coradas em rosa escuro) por campo. Para tal, foram capturadas imagens na objetiva de 10X, de cinco campos aleatórios do jejunó proximal de cada animal (N = 6 animais/grupo), que foram analisadas com o auxílio do programa ImageJ. Os resultados foram expressos em número de células caliciformes/campo.

## 4.7 Avaliação dos parâmetros imunológicos

### 4.7.1 Dosagem da Imunoglobulina IgE anti-OVA

O Ensaio de Absorção Imunoenzimático (ELISA), foi realizado com o soro dos camundongos como descrito por Dourado e colaboradores (2011). Para isso, foram utilizadas microplacas de poliestireno (Nunc, Roskilde, Denmark), que foram previamente sensibilizadas com adição de 50 µL/poço, com anticorpo de rato anti-IgE de camundongo (Rat anti-mouse IgE, Southern Biotechnology, Birmingham, AL) diluído a uma concentração de 1:250 em tampão carbonato pH 9,6, incubadas a 4°C *overnight*. Posteriormente, as placas foram lavadas 3 vezes com solução PBS-Tween 20. Em seguida, adicionou-se 200 µL/poço de solução de caseína 0,25% diluída em tampão salina fosfato (PBS), para bloqueio à temperatura ambiente por 1 hora. Lavou-se três vezes a placa com PBS-Tween 20 e adicionou-se 50 µL/poço do soro total, incubou-se por 2 horas à temperatura ambiente e lavou-se com PBS-Tween 20 5 vezes. Adicionou-se 1 µL de OVA Biotinilada em 50 µL de PBS-Caseína, por poço e incubou-se por 1 hora à temperatura ambiente. Lavou-se novamente três vezes com PBS-Tween 20. Posteriormente, adicionou-se 50 µL/poço de Streptavidina-Peroxidase (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) na concentração de 1:5000 e incubou-se por 45 minutos à temperatura ambiente. Lavou-se a placa três vezes com salina-Tween 20 e prosseguiu-se para a etapa de revelação. Para essa etapa, foram adicionados 100 µL/poço de uma solução de tampão citrato contendo peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e ortofenileno-diamino (OPD) e, em seguida, incubou-se em câmara escura por 15 minutos à temperatura ambiente. Ao fim dos 15 minutos interrompeu-se a reação com a adição de 20 µL/poço de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a 2 N. Além da adição das amostras de soro em teste, foram feitos um controle positivo (pool de soros de animais imunes), um controle negativo (pool de soro de animais normais) e um controle de placa. Então, todas essas amostras foram lidas em 405 nm em leitor de ELISA (Epoch, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). A computação dos resultados foi realizada por meio da densidade ótica (D.O) apresentada pelas amostras.

#### 4.7.2 Dosagem de IgG1 anti-OVA

Para a dosagem da IgG1 anti-OVA foi utilizado a técnica de ELISA. Para tal, foi utilizado o soro dos camundongos como descrito por Saldanha e colaboradores (2004). Para isso, foram utilizadas microplacas de poliestireno (Nunc, Roskilde, Denmark), que foram previamente sensibilizadas com adição de 100 µL/poço, com uma solução de ovalbumina diluída a uma concentração de 400 µg de OVA/mL de tampão carbonato pH 9,6, incubadas a 4°C *overnight*. Posteriormente, as placas foram lavadas cinco vezes com solução PBS-Tween 20. Em seguida, adicionou-se 200 µL/poço de solução de caseína 0,25% diluída em PBS, para bloqueio à temperatura ambiente por 1 hora. Lavou-se duas vezes a placa com PBS-Tween 20 e adicionou-se 200 µL de uma solução de soro (1:20) em PBS-Caseína nos primeiros poços (toda linha A) e 100 µL de PBS-Caseína nos demais poços. Posteriormente, fez-se a diluição seriada transferindo 100 µL dos primeiros poços para as linhas abaixo, adiciona-se PBS-Caseína como branco e como controle positivo fez-se a diluição seriada de uma solução padrão anti-OVA, incubou-se por 1 hora à 37° C e lavou-se com PBS-Tween 20 10 vezes. Prosseguiu-se para a etapa de revelação. Para essa etapa, foi utilizado como substrato 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) (Sigma), incubou-se em câmara escura por 15 minutos à temperatura ambiente. Ao fim dos 15 minutos interrompeu-se a reação com a adição de 20 µL/poço de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a 2 N. Então, todas essas amostras foram lidas em 405 nm leitor de ELISA (Epoch, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). A computação dos resultados foi realizada por meio da D.O apresentada pelas amostras.

#### 4.7.3 Avaliação da atividade da enzima peroxidase eosinofílica (EPO)

A peroxidase eosinofílica é uma enzima expressa especificamente em eosinófilos, portanto, ela permite a verificação indireta da presença de eosinófilos infiltrados em um determinado tecido de interesse. Essa avaliação foi baseada em um trabalho realizado por Strath, Warren e Sanderson (1985). Para esse método,

pesaram-se 100 mg de jejuno proximal, adicionou-se 1,9 mL de PBS (pH 7.2), em seguida homogenizou-se (Ultra-turrax IKA T10 basic) e centrifugou-se o tecido por 10 minutos a 10.000 rpm (Centrífuga Heraeus Megafuge 8R, Thermo Scientific), 4°C. Desprezou-se o sobrenadante. Utilizou-se o *pellet* para a lise hipotônica com a adição de 1,5 mL de salina 0,2%, seguido da adição de 1,5 mL de salina 1,6% suplementada com glicose 5%. Em seguida, a amostra foi novamente centrifugada a 10.000 rpm (Heraeus Megafuge 8R, Thermo Scientific), durante 10 minutos, e o sobrenadante novamente desprezado. O *pellet* foi ressuspenso em 1,9 mL de PBS (pH 7,4), suplementado com HTAB 0,5%. Essa solução foi novamente homogeneizada, e o homogenato separado em alíquotas de 1 mL por microtubo. Prosseguiu-se com a etapa de congelamento/descongelamento, realizada três vezes em nitrogênio líquido. Centrifugou-se novamente a 10.000 rpm (Heraeus Megafuge 8R, Thermo Scientific), por 15 minutos. Apenas o sobrenadante foi avaliado para a quantificação da enzima. Realizou-se esse ensaio em placas de 96 poços, sendo que em cada poço 75 µL de amostra ou branco (PBS) foram incubados com 75 µL do substrato (1,5 mM de o-fenilenodiamina, OPD (Sigma), em tampão Tris-HCl-0,075µM, pH 8, suplementado de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 6,6 mM). A placa foi incubada a 20°C, no escuro, por 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M. A leitura foi realizada em leitor de ELISA (Epoch, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). com filtro de 492 nm. E o resultado expresso de acordo com a D.O.

#### 4.7.4 Avaliação da atividade da MPO

A enzima MPO encontra-se nos grânulos dos neutrófilos (NAUSEEF, 2007). Por meio da avaliação da atividade dessa enzima pode-se inferir o índice de infiltração de neutrófilos para determinado tecido (SOUZA *et al.*, 2000). Para isso, analisou-se o jejuno proximal, que previamente foi congelado a -80°C. Após a etapa de descongelamento, o tecido (100 mg de tecido em 1,9 mL de tampão) foi homogeneizado em tampão com pH 4,7 (0,1 M NaCl, 0,02 M NaPO<sub>4</sub>, 0,015 M Na-EDTA), utilizando-se homogeneizador de tecidos (Ultra-Turrax, IKA T10 basic), centrifugado a 10.000 rpm (Heraeus Megafuge 8R, Thermo Scientific), por 15

minutos e o precipitado foi submetido à lise hipotônica (1,5 mL de solução de NaCl 0,2% com posterior adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5%, 30 segundos após) para lise de hemácias. Após nova centrifugação o precipitado foi ressuspenso em tampão  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,05 M (pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) 0,5% (Sigma) e re-homogeneizado. Transferiu-se alíquotas de 1 mL da suspensão para microtubos de 1,5 mL e realizou-se três ciclos de congelamento/descongelamento utilizando-se nitrogênio líquido. As amostras foram mantidas durante 5 segundos no nitrogênio para o congelamento e o descongelamento foi realizado com a submersão dos microtubos em água. Centrifugou-se novamente essas amostras por 15 minutos a 10.000 rpm (Heraeus Megafuge 8R, Thermo Scientific), e recolheu-se o sobrenadante. A atividade da MPO no precipitado ressuspenso foi calculada pela alteração da D.O a 450 nm utilizando tetrametilbenzidina (TMB) (1,6 mM) (Sigma) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,5 mM). A leitura foi realizada em leitor de ELISA (Epoch, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

#### 4.7.5 Dosagem de quimiocinas e citocinas

Para avaliar a expressão de quimiocinas (CXCL1/KC e CCL11/Eotaxina) e os níveis das citocinas (IL4, IL6, IL9, IL10, IL13, IL17 e TNF), utilizou-se 100 mg do jejuno proximal que foi ressuspenso em 1 mL de solução de extração [PBS contendo um coquetel de anti-proteases (0,1 mM PMSF, 0,1 mM cloreto de benzetônio, 10 mM EDTA e 20 KI de aprotinina A) e 0,05% de Tween 20]. Posteriormente, centrifugou-se por 10 minutos, a 4°C e 10.000 rpm (Heraeus Megafuge 8R, Thermo Scientific). O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C para posterior dosagem das quimiocinas e da citocina IL4. A dosagem das foi realizada por ELISA, conforme trabalho de Martins e colaboradores (2011). Os kits foram obtidos da R&D Systems (DuoSet) (R&D Systems, Minneapolis, USA).



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

No último dia do desafio alergênico amostras de fezes foram coletadas, pesadas e acrescidas de PBS em uma diluição inicial de  $10^{-2}$ . Este procedimento foi realizado de forma estéril. Posteriormente foram feitas novas diluições seriadas na mesma amostra até  $10^{-8}$ . Alíquotas de 0,1 mL destas diluições foram inoculadas em placas de Petri contendo ágar sangue suplementado (AS-S) com 0,1% de hemina, 0,1% de menadiona e 0,5% de extrato de levedura (HOLDMAN; CATO; MOORE, 1977), ágar de Mann, Rogosa and Sharp (MRS) (Merck) suplementado com L-cisteína e ágar Bacteroides Bile Esculina (BBE) (Difco) (LIVINGSTON; KOMINOS; YEE, 1978). As placas foram incubadas por até 7 dias a 37°C com leituras intermediárias, em anaerobiose. Foram retiradas das mesmas diluições 0,1 mL para inocular em placas de ágar sangue (AS), ágar Manitol (Difco), ágar BHI (*Brain Heart Infusion*) (Difco) acrescido de 0,02% de azida sódica, ágar MacConkey (Difco) e ágar Sabouraud (Sb) suplementado com cloranfenicol (100 mg/L). As placas foram incubadas 24-48 horas a 37°C em aerobiose. Após a incubação foi feito a contagem das colônias e os dados foram expressos em  $\log_{10}$  UFC/g de fezes. A lista dos meios, condições de cultura e finalidades dos meios propostos podem ser visualizados na Tabela 5.

**Tabela 5** – Meios e condições de cultivo para a análise qualitativa e quantitativa da composição da microbiota intestinal presente nas fezes dos camundongos coletadas no último dia do desafio.

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

Fonte: Elaborado pela autora.

#### **4.9 Permeabilidade Intestinal**

A permeabilidade intestinal foi determinada por meio da avaliação da radioatividade do sangue após administração oral do ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA) marcado com tecnécio-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ). Para isso, no dia da eutanásia os camundongos receberam 0,1 mL de solução de  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA com 10 MBq de atividade, por gavagem. Passadas 4 horas da administração intragástrica, os animais foram anestesiados e o sangue coletado, pesado e armazenado em tubos apropriados. Os níveis de radioatividade nas amostras foram determinados utilizando um contador gama automatizado (PerkinElmer Wallac Wizard 1470-020 Gamma 25 Counter, PerkinElmer, Waltham, MA), e os dados expressos como porcentagem da dose por grama de sangue (% dose/g) conforme descrito por Trindade e colaboradores (2021).

#### **4.10 Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, San Diego, E.U.A.), utilizando o teste ANOVA, seguido do pós-teste Tukey (análise de variância). Os resultados com  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

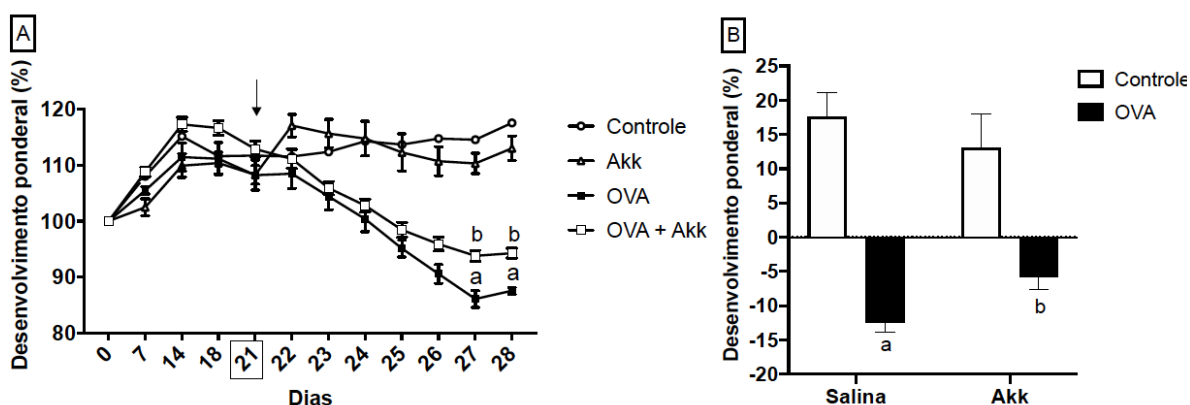
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Desenvolvimento ponderal e consumo de ração

Em modelos de alergia alimentar, uma das características mais evidentes da instalação dos quadros de inflamação é a perda de peso dos animais sensibilizados após a ingestão do alérgeno (DOURADO *et al.*, 2011). Desse modo, com o objetivo de avaliar se a administração da bactéria *A. muciniphila* seria capaz de promover a atenuação da perda de peso, os animais foram pesados diariamente, no início do experimento (dia 0) e nos dias subsequentes, sempre no mesmo horário, e o resultado expresso em porcentagem em relação ao dia 0. Os resultados podem ser visualizados na Figura 7.

#### Figura 7 – Desenvolvimento ponderal.

Os animais foram acompanhados do dia 0 ao dia 28, considerando o peso do dia 0 correspondendo a 100% calculou-se o peso dos dias subsequentes em relação ao dia 0 (A). Os símbolos representam os grupos analisados (Controle; OVA: sensibilizados e desafiados com OVA; Akk: 0,1 mL contendo  $1 \times 10^{10}$  UFC/mL de *A. muciniphila* viável). Com destaque para o dia 21 que representa o dia do desafio. Desenvolvimento ponderal (%) do dia 28 (B). As barras representam os grupos analisados (Controle; OVA: sensibilizados e desafiados com OVA; Akk: 0,1 mL contendo  $1 \times 10^{10}$  UFC/mL de *A. muciniphila* viável). (a:  $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle; b:  $p < 0,05$  em comparação ao grupo OVA). (N = 6 animais/grupo).



Fonte: Elaborado pela autora.

Os dados apresentados na Figura 7A revelam que os animais sensibilizados e desafiados, tratados ou não, apresentam uma queda acentuada de peso em relação aos grupos não sensibilizados, após o desafio (dia 21). A perda de peso pode estar relacionada a diversos fatores, como o aumento dos níveis da citocina IL6, que tem

comprovado papel na perda de peso, lipólise aumentada, diminuição do peso do tecido adiposo, diminuição do tamanho dos adipócitos e aumento da energia requerida para a manutenção dos processos inflamatórios desencadeando o recrutamento dos lipídeos de reserva (DOURADO *et al.*, 2011). Cardoso e colaboradores (2019) ao avaliarem um modelo murino de alergia alimentar a amendoim obtiveram resultados semelhantes, sendo um indício de que a indução da alergia ocorreu em conformidade com o descrito pela literatura.

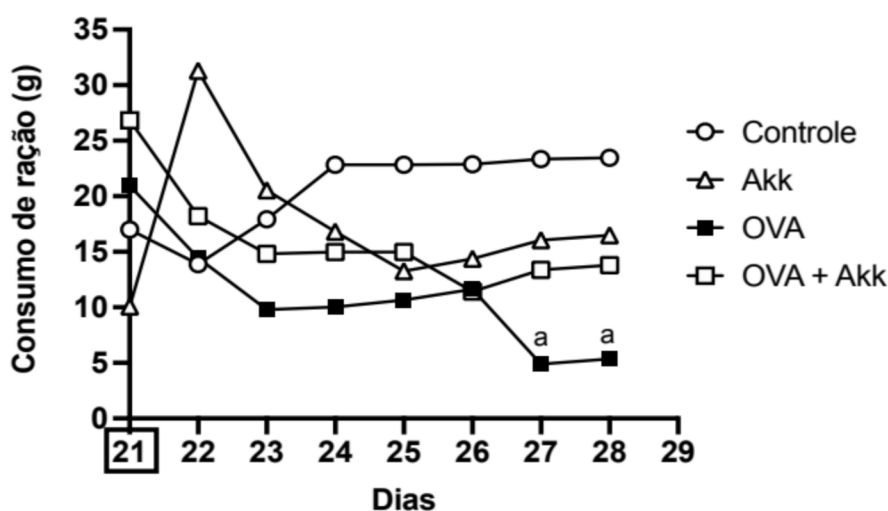
Além disso, pode-se observar que a administração de *A. muciniphila* foi capaz de promover uma atenuação da perda de peso (Figuras 7A e 7B). Resultados semelhantes foram encontrados por Kim, Choi e Ji (2008) em que eles demonstraram que tanto a administração de *B. lactis* quanto a sua associação com *L. acidophilus* foram capazes de atenuar a perda de peso em um modelo murino de alergia alimentar à ovalbumina.

Outro fator associado à perda de peso é a instalação do processo de aversão ao alimento contendo o antígeno, com conseqüente redução do seu consumo. Desta forma, para avaliar se houve uma diminuição do consumo de ração que estivesse relacionado com a perda de peso encontrada, pesou-se a ração antes de alocá-las nos micro-isoladores e no dia seguinte repetiu-se a pesagem, calculando então a diferença em gramas de ração que foi consumida pelos animais. Este procedimento foi realizado para os dias subsequentes ao desafio. Os resultados podem ser observados na Figura 8.

Ao analisarmos a Figura 8 observa-se que após o desafio há uma redução significativa no consumo de ração, no grupo OVA (sensibilizados e desafiados), quando comparados com o grupo controle, o que corrobora os dados da perda de peso. Esse fenômeno já foi descrito por Cara, Conde e Vaz (1994 e 1997) e também mais recentemente por Cardoso e colaboradores (2019). Acredita-se que devido à memória de um estímulo nocivo, há o desencadeamento de parâmetros comportamentais típicos da ansiedade e conseqüentemente o animal reduz seu consumo de alimento como alternativa para cessar os sintomas desencadeados pela alergia (COSTA-PINTO *et al.*, 2005; BASSO *et al.*, 2003).

**Figura 8** – Consumo de ração.

A ração foi pesada antes de ser administrada aos animais e depois de ter sido depositada nos microisoladores, a partir do dia 21 (desafio) até o final do experimento (dia 28). Os símbolos representam os grupos analisados (Controle; OVA: sensibilizados e desafiados com OVA; Akk: 0,1 mL contendo  $1 \times 10^{10}$  UFC/mL de *A. muciniphila* viável). Com destaque para o dia 21 que representa o dia do desafio. (a:  $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle, (N = 6 animais/grupo).



Fonte: Elaborado pela autora.

Em termos de tratamento com *A. muciniphila*, observa-se que a bactéria promoveu um aumento relevante (aproximadamente o dobro) no consumo de ração quando comparado com o grupo OVA, o que pode ter auxiliado para a atenuação da perda de peso no grupo tratado.

## 5.2 Avaliação das imunoglobulinas IgE e IgG anti-OVA

As imunoglobulinas são glicoproteínas presentes em alguns fluidos corporais, como sangue, saliva, fluidos intestinais, colostro e leite materno, responsáveis principalmente por proteger o organismo contra patógenos. Existem basicamente 5 classes de imunoglobulinas: IgM, IgD, IgE, IgG e IgA, sendo que cada uma delas exerce funções singulares para auxiliar na manutenção dos processos de homeostase (BALAN; SIK-HAN; MOUGHAN, 2019; KAPINGIDZA; KOWAL; CHRUSZCZ, 2020).

Algumas imunoglobulinas podem estar associadas ao desenvolvimento de algumas condições patológicas, como é o caso da imunoglobulina do tipo E. A IgE é uma molécula de aproximadamente 190 kDa. Em processos alérgicos ela é

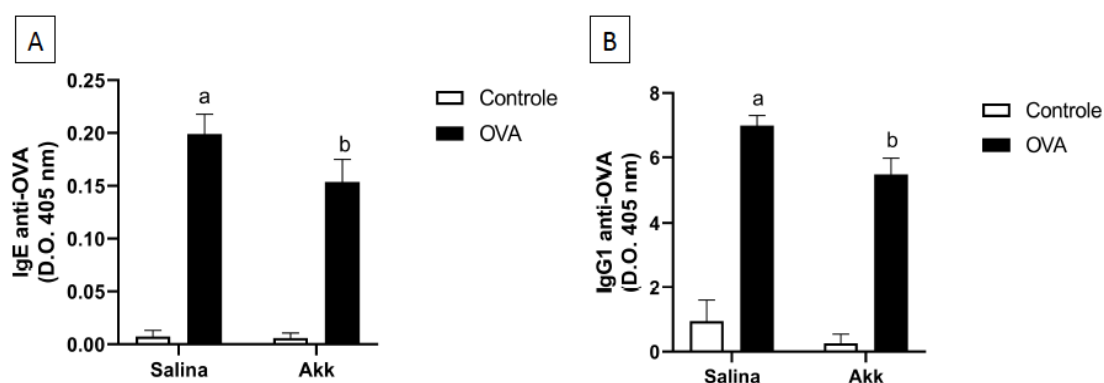
produzida por células B e plasmócitos em resposta a um estímulo antigênico, e, então, quando o indivíduo é re-exposto ao determinado antígeno, há o desencadeamento das reações de hipersensibilidade características das reações alérgicas (KAPINGIDZA; KOWAL; CHRUSZCZ, 2020; KELLY; GRAYSON, 2016).

Uma outra imunoglobulina que também tem sido associada aos processos alérgicos é a IgG. Essa imunoglobulina é a mais abundante no soro humano e é sub-dividida em 4 subclasses: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, e apesar dessas subclasses apresentarem mais de 90% de similaridade em sua estrutura, elas vão diferir quanto à função (VIDARSSON; DEKKERS; RISPENS, 2014). Em processos alérgicos já foi relatado que a IgG1, é capaz de induzir processos anafiláticos por meio da produção de PAF (do inglês, *Platelet-Activating factor*). Para tal, essa imunoglobulina forma imunocomplexos com os alérgenos, que são capazes de interagir com os receptores FcγRs, ativando mastócitos, basófilos, neutrófilos e macrófagos com consequente produção de PAF. Além disso, pacientes com alergia alimentar tendem a ter altos níveis de IgG alérgeno específicos no soro (MIYAJIMA *et al.*, 1997; NUNES *et al.*, 2019; MEULENBROEK *et al.*, 2013).

Portanto, com o intuito de avaliar se a alergia alimentar à ovalbumina induzida no presente trabalho é realmente mediada por IgE, se há alterações nos níveis de IgG1 anti-OVA e se *A. muciniphila* seria capaz de atenuar esses parâmetros, foi realizada a dosagem dessas imunoglobulinas pelo método de ELISA. Os resultados podem ser visualizados na Figura 9.

**Figura 9** – Avaliação dos níveis de IgE anti-OVA (A) e IgG1 anti-OVA (B).

As barras representam os grupos analisados (Controle; OVA: sensibilizados e desafiados com OVA; Akk: 0,1 mL contendo  $1 \times 10^{10}$  UFC/mL de *A. muciniphila* viável). (a:  $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle e b:  $p < 0,05$  em comparação ao grupo OVA). (N = 6 animais/grupo).



Fonte: Elaborado pela autora.

Ao analisarmos a Figura 9 tem-se que os grupos sensibilizados e desafiados, tratados (OVA+Akk) ou não (OVA), apresentam um aumento significativo nos níveis das duas imunoglobulinas (IgE anti-OVA com níveis de D.O de aproximadamente 0,15 e 0,2 e IgG1 anti-OVA com níveis de D.O de aproximadamente 5,5 e 7, respectivamente) quando comparadas aos grupos Controle (não sensibilizados e não desafiados) e Akk (não sensibilizados e desafiados) (IgE com níveis de D.O de aproximadamente 0 nos dois grupos e IgG1 com níveis de D.O próximos de 1 e 0,3, respectivamente). Tal modelo de alergia alimentar à ovalbumina já foi descrito por Saldanha e colaboradores (2004) em que eles demonstraram que ao sensibilizar os camundongos no dia 0, seguidos de um reforço no dia 14 e desafio no dia 21, há o desencadeamento dos processos alérgicos com consequente aumento nos níveis de IgE e IgG1 anti-OVA. Além disso, trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa também demonstraram esse perfil de maior concentração dessas imunoglobulinas antígeno específicas no soro dos animais pertencentes aos grupos sensibilizados e desafiados comparados aos grupos não sensibilizados, desafiados ou não (MIRANDA *et al.*, 2020), comprovando que o modelo proposto está de acordo com a literatura e que as reações alérgicas desencadeadas pelo modelo são mediadas por IgE.

Além disso, pela Figura 9 é possível observar a notória capacidade de *A. muciniphila* em promover a mitigação dos níveis de IgE e IgG1 anti-OVA. Tal fato é um indício de que essa bactéria possui efeitos promissores para ser utilizada no tratamento da alergia alimentar, tendo em vista os efeitos sistêmicos que essas imunoglobulinas podem causar nos quadros de alergia alimentar. Resultados semelhantes foram obtidos por Fu e colaboradores (2020) em que eles avaliaram os efeitos probióticos de uma linhagem de *Lacticaseibacillus casei* em um modelo murino de alergia a tropomiosina, principal proteína responsável por desencadear alergia alimentar aos crustáceos. Ademais, estudos realizados por Fu e colaboradores (2017) também demonstraram a atenuação dessas imunoglobulinas quando os animais alérgicos a tropomiosina do camarão eram tratados com *Bacillus coagulans* ou *Lactiplantibacillus plantarum*. E ainda, Shin e colaboradores (2018) demonstraram que uma combinação de *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactiplantibacillus pentosus*, *Lacticaseibacillus paracasei* e *Bacillus*

*amyloliquefaciens* também desempenhou efeitos semelhantes em um modelo murino de alergia alimentar à ovalbumina. Ademais, Santos e colaboradores (2021) observaram resultados similares administrando *B. longum* 5<sup>1A</sup> também em modelo murino de alergia alimentar, evidenciando o auspicioso papel dos probióticos para o tratamento de tal condição patológica.

### 5.3 Avaliação da atividade de EPO e níveis de Eotaxina-1 (CCL11)

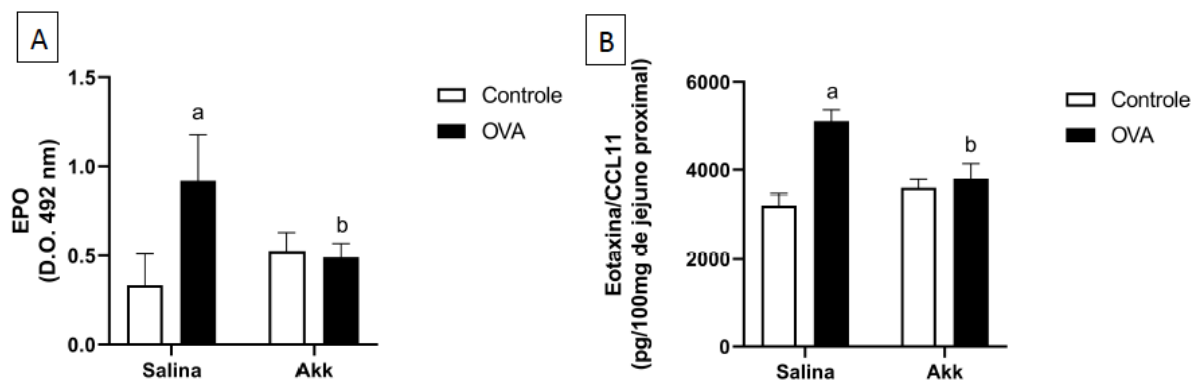
Os eosinófilos foram descritos pela primeira vez em 1879, por Paul Ehrlich, e desde então seu papel vem sendo amplamente investigado. Sabe-se que em quadros de infecções por parasitas eles auxiliam na contenção da infecção, exercendo então um mecanismo de defesa contra esses parasitas. Porém, em processos alérgicos, essas células são recrutadas por algumas moléculas, como a quimiocina CCL11 (Eotaxina-1), para os tecidos inflamados e, uma vez no tecido, liberam seus grânulos, que contém algumas proteínas como a enzima EPO. Essa enzima pode catalisar a oxidação de algumas substâncias gerando ROS. Tal mecanismo pode promover danos teciduais contribuindo para a instalação das reações pró-inflamatórias. Além disso, a enzima EPO é uma proteína presente unicamente nos grânulos citoplasmáticos dos eosinófilos, sendo, portanto, um mecanismo de avaliação indireta da presença de eosinófilos nos tecidos (NEVES; WELLER, 2009; ACHARYA; ACKERMAN, 2014; SPENCER; WELLER, 2010; LACY *et al.*, 2003; COLLINS *et al.*, 1995; ROSENBERG; DYER; FOSTER, 2013; RAVIN; LOY, 2016; ROSENBERG, 2016).

Sendo assim, para investigar se a administração de *A. muciniphila* seria capaz de atenuar os níveis de eosinófilos no jejuno proximal dos camundongos, mensurou-se a atividade da enzima EPO. Além disso, para avaliar se essa atenuação seria por meio da mitigação dos níveis da quimiocina Eotaxina-1, dosou-se a concentração dessa quimiocina e os resultados podem ser observados na Figura 10.



**Figura 10** – Avaliação dos níveis de EPO (A) e Eotaxina-1 (B).

As barras representam os grupos analisados (Controle; OVA: sensibilizados e desafiados com OVA; Akk: 0,1 mL contendo  $1 \times 10^{10}$  UFC/mL de *A. muciniphila* viável). (a:  $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle e b:  $p < 0,05$  em comparação ao grupo OVA). (N = 6 animais/grupo).



Fonte: Elaborado pela autora.

Ao observar a Figura 10A, tem-se que os níveis da atividade da enzima EPO estão significativamente aumentados no grupo sensibilizado e desafiado (OVA), (D.O. com níveis de aproximadamente 1), quando comparado aos grupos Controle (não sensibilizados e não desafiados) e Akk (não sensibilizados e desafiados) (D.O com níveis menores que 0,5), evidenciando que há a formação de um infiltrado eosinofílico no grupo OVA e possivelmente a instalação de um processo inflamatório local. Similarmente, observa-se o mesmo perfil na concentração de eotaxina-1 (Figura 10B), sugerindo que essa quimiocina pode estar envolvida no recrutamento dos eosinófilos para os tecidos inflamados, auxiliando na manutenção do processo inflamatório.

Resultados semelhantes foram obtidos por nosso grupo de pesquisa em que foi observado um aumento dos níveis de eosinófilos e eotaxina-1, no jejuno proximal dos camundongos alérgicos a ovalbumina (MIRANDA *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2021). Além disso, a presença acentuada de eosinófilos nos tecidos de camundongos alérgicos à ovalbumina também já foi descrita por Kim, Choi e Ji (2008), sendo, portanto, uma característica interessante do modelo investigado.

Ademais, ao observar a Figura 10, tem-se ainda que *A. muciniphila* promoveu a atenuação significativa tanto dos níveis da atividade de EPO quanto da concentração de eotaxina-1, evidenciando mais um efeito benéfico exercido pela bactéria para o tratamento de alergia alimentar. Com esse dado é possível inferir

que o possível mecanismo pelo qual os níveis de eosinófilos são reduzidos pela bactéria pode ser por meio da supressão da produção de eotaxina-1. Porém, tal mecanismo necessita de maiores investigações.

Há várias evidências na literatura sobre o efeito dos probióticos na atenuação dos níveis de eosinófilos em processos alérgicos. Hougee e colaboradores (2010) demonstraram que *B. breve* e *L. plantarum* exercem tais efeitos. Além disso, Nawaz e colaboradores (2015) também demonstraram tal efeito utilizando três linhagens de *Lactobacillus*, corroborando o fato de tais microrganismos serem promissores para o tratamento dessas reações, que pode estar relacionado ao seu papel imunomodulador.

#### 5.4 Análises histológicas

O jejuno proximal é a porção do intestino mais afetada em processos de alergia alimentar, sendo assim, essa porção foi utilizada para a confecção das lâminas histológicas (ANTUNES *et al.*, 2019). A partir da análise dos arquivos gerados pela fotodocumentação das lâminas do jejuno proximal, coradas por HE e PAS, foi possível a elaboração de um laudo. Nele foi constatado que as amostras controle, tanto sem tratamento (Controle), quanto tratadas com *A. muciniphila* (Akk), apresentaram-se dentro dos padrões de normalidade. A mucosa apresentou vilosidades íntegras, epitélio contínuo, proporção de células caliciformes/enterócitos e linfócitos intraepiteliais/enterócitos regular, lâmina própria delgada, sem a presença de espaços que possam caracterizar edema. Criptas com celularidade e tamanho normal. A camada muscular da mucosa apresentou-se contínua e preservada. Submucosa delgada e camadas muscular e serosa íntegras. O único ponto levemente diferente foi a presença de um infiltrado de eosinófilos na base da glândula da mucosa no grupo controle tratado com *A. muciniphila* (Akk) quando comparado ao grupo controle (Controle). Esse dado é compatível com a dosagem de EPO, embora a diferença não tenha sido significativa e não se fez a contagem na histologia devido ao número de eosinófilos ser bem pequeno (Figuras 11A e 11C).

Os grupos com alergia experimental, não tratados (OVA), apresentaram mucosa com infiltrado inflamatório, predominantemente de linfócitos, neutrófilos e

eosinófilos (Figuras 11B e 11E). Moderado aumento do número e tamanho de células caliciformes (evidenciado pela coloração com PAS) (Figuras 12B e 12E) e aumento da atividade das Células de Paneth (evidenciado em ambas colorações) (Figuras 11E e 12E).

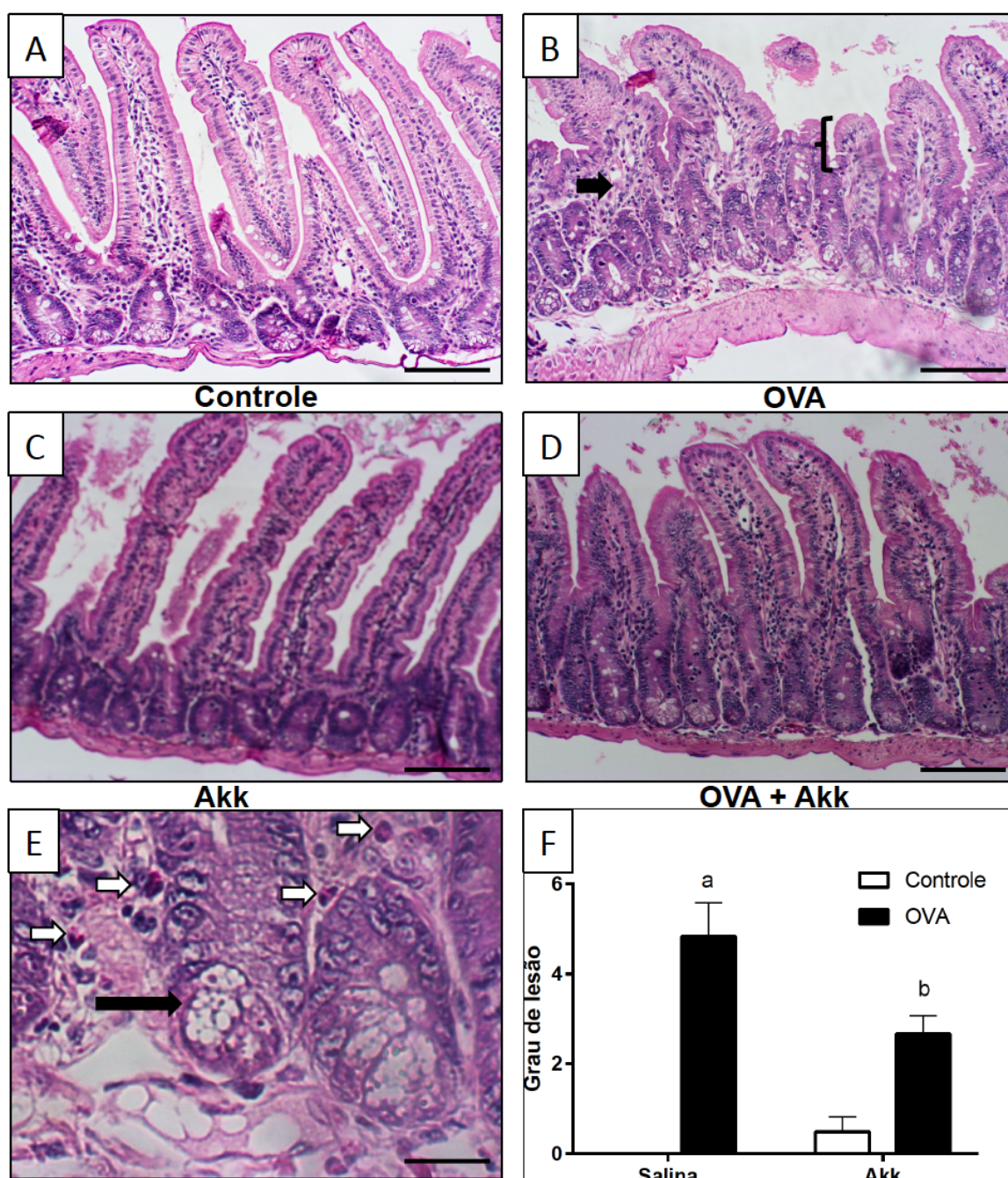
As células de Paneth estão localizadas nas criptas de *Lieberkühn* no intestino delgado e são importantes na manutenção da homeostase, principalmente por produzirem peptídeos antimicrobianos e modularem a composição da microbiota intestinal (HOLLY; SMITH, 2018). No presente trabalho, o aumento da atividade das células de Paneth pode ser evidenciado pelo aumento de tamanho e intensidade da coloração evidenciada pela técnica de PAS (Figuras 11E e 12E). Sendo assim, pode-se inferir que elas estão produzindo mais compostos que apresentam carboidratos em sua estrutura, com conseqüente aumento de sua atividade. Em processos alérgicos pode haver um aumento da permeabilidade intestinal (ANSARI; MU, 2018), que pode ser um estímulo à produção de peptídeos antimicrobianos, pelas células de Paneth, na tentativa de cessar a entrada de potenciais patógenos. Além disso, no grupo OVA a submucosa apresentou discreto infiltrado inflamatório e alguns vasos dilatados. A vilosidade apresentou leve a moderada redução da altura (Figura 11B). Em conjunto essas características são típicas da instalação do processo de alergia alimentar e já são bem estabelecidas na literatura (ANTUNES *et al.*, 2019; TULYEU *et al.*, 2019; MIRANDA *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2021).

O grupo com alergia experimental, tratado com *A. muciniphila* (OVA + Akk) apresentou redução dos sinais inflamatórios alérgicos. A mucosa apresentou infiltrado inflamatório leve a moderado, com discreto aumento de muco. A diminuição do tamanho das vilosidades também foi discreta, assim como a atividade das células de Paneth, evidenciada pela atenuação da intensidade da coloração evidenciada pela técnica de PAS (Figura 12D). Nesse grupo, assim como nos controles, não houve alterações celulares ou vasculares na submucosa (Figura 11D).

A partir desse conjunto de dados foi possível a elaboração de um escore, conforme os critérios descritos na Tabela 4 (Pág. 37), e os dados podem ser observados na Figura 11F. Ao analisar essa figura, tem-se que a administração de *A. muciniphila* foi capaz de atenuar significativamente ( $p < 0,05$ ) os sinais inflamatórios promovidos pela alergia alimentar.

**Figura 11** – Fotomicrografias da histologia corada com HE dos 4 grupos (N = 6 animais/grupo) com aumento de 10X:

Controle (A), OVA (Animais sensibilizados e desafiados com OVA) (B), Akk (Animais controle tratados com *A. muciniphila*) (C), OVA + Akk (Animais sensibilizados com OVA e tratados com *A. muciniphila*) (D). Nas Figuras A, B, C e D, a barra equivale a 100  $\mu$ m. A seta preta curta da figura B destaca o infiltrado inflamatório na mucosa e a chave preta destaca o tamanho do vilão reduzido no jejuno de camundongos submetidos à alergia alimentar. A Figura E é um aumento maior da Figura B e a barra equivale a 25  $\mu$ m. Na Figura E, há um destaque para a mucosa, evidenciando a hipertrofia das células de Paneth (seta preta longa), e a presença de eosinófilos (setas brancas). Na Figura F, a análise do escore histológico. (N = 6 animais/grupo). (a =  $p < 0,05$ , em comparação ao grupo controle e b =  $p < 0,05$ , em comparação com o grupo controle da alergia).



Fonte: Elaborado pela autora.

Similarmente, Liu e colaboradores (2017) mostraram que a administração de *Bifidobacterium infantis* CGMCC313-2 também foi capaz de atenuar os sinais inflamatórios observados em amostras intestinais. Além disso, os autores sugerem que tal atenuação pode estar relacionada a metabólitos produzidos por *B. infantis* CGMCC313-2, como possivelmente AGCC que poderiam atenuar as respostas inflamatórias desencadeadas pelas citocinas do tipo Th2 e, conseqüentemente, promoveria uma mitigação dos sinais inflamatórios observados no intestino. Ademais, Fu e colaboradores (2020) demonstraram que *L. casei* Zhang também promoveu a melhora dos sinais de inflamação no tecido dos camundongos alérgicos a camarão. Os autores inferem que tal efeito protetor poderia estar relacionado a fatores como a inibição de citocinas pró-inflamatórias e a ativação de células Treg. Alguns estudos já demonstraram que *A. muciniphila* é capaz de produzir AGCC, estimular a produção de IL10, promover a expansão de células Treg, além de regular a integridade da barreira intestinal, sendo assim, pode-se inferir que a bactéria promove a atenuação dos sinais inflamatórios por meio desses mecanismos (NAITO; UCHIYAMA; TAKAGI, 2018; DERRIEN; BELZER; DE VOS, 2017; CHELAKKOT *et al.*, 2018).

#### 5.4.1 Análise da produção de muco

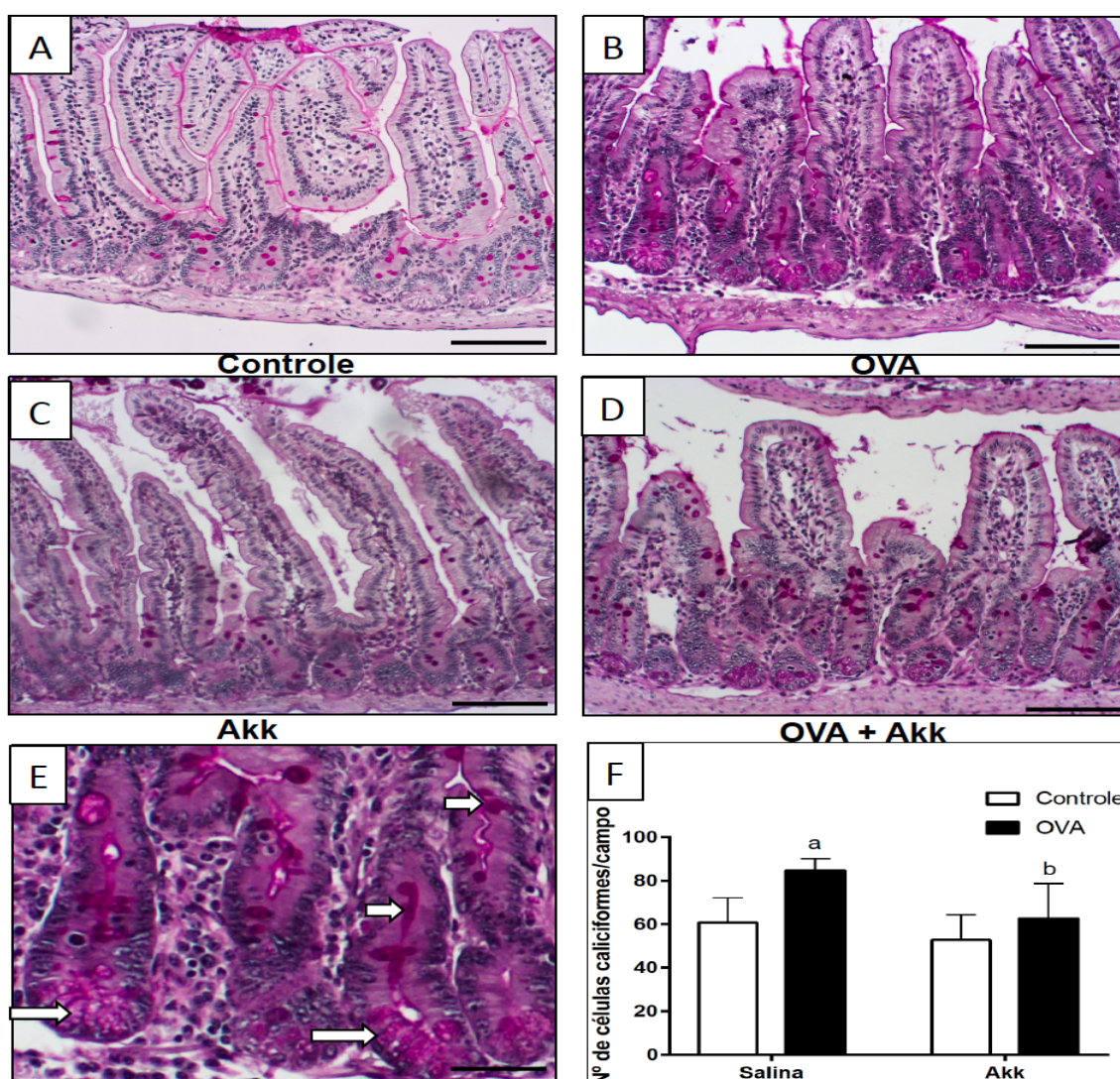
As células caliciformes são células epiteliais especializadas na produção e secreção de mucina, que é uma glicoproteína essencial para a formação da camada de muco que reveste o intestino. Tal camada é essencial para os processos de homeostase impedindo o contato direto das células epiteliais com os microrganismos e compostos com potencial patogênico presentes no lúmen intestinal (KNOOP; NEWBERRY, 2018; GUSTAFSSON; JOHANSSON, 2022).

Alguns estudos têm demonstrado que as células caliciformes secretam mucinas em resposta a alguns mediadores, como, por exemplo, a histamina. E sabe-se que em processos de alergia alimentar um dos mediadores inflamatórios liberados é a histamina, o que pode acarretar em um aumento da produção de muco pelas células caliciformes (HALM; HALM, 2000; POTACZEK *et al.*, 2017). Portanto, com o intuito de avaliar se realmente há o aumento da produção de muco pelas

células caliciformes e se o tratamento com *A. muciniphila* seria capaz de reverter esse quadro, fez-se a avaliação do número de células caliciformes por campo nas lâminas de intestino proximal coradas em PAS e os resultados podem ser visualizados na Figura 12.

**Figura 12** – Fotomicrografias da histologia corada com PAS dos 4 grupos (N = 6 animais/grupo) com aumento de 10X:

Controle (A), OVA (Animais sensibilizados e desafiados com OVA) (B), Akk (Animais controle tratados com *A. muciniphila*) (C), OVA + Akk (Animais sensibilizados com OVA e tratados com *A. muciniphila*) (D). Nas Figuras A, B, C e D, a barra equivale a 100  $\mu$ m. A Figura E é um aumento maior da Figura B e a barra equivale a 50  $\mu$ m. Na Figura E, há um destaque para a mucosa do grupo OVA, evidenciando a hipertrofia das células de Paneth (setas longas), e a hipertrofia das células caliciformes (setas brancas curtas). Na Figura F, a análise do número de células caliciformes por campo, realizada a partir de 5 campos aleatórios do jejuno proximal de cada camundongo. (N = 6 animais/grupo). (a =  $p < 0,05$ , em comparação ao grupo controle e b =  $p < 0,05$ , em comparação com o grupo controle da alergia).



Fonte: Elaborado pela autora.

Pela Figura 12 tem-se que o grupo OVA (sensibilizado e desafiado) apresentou um aumento significativo do número e tamanho das células caliciformes quando comparadas ao grupo controle. Tal fenômeno já foi demonstrado por nosso grupo de pesquisa em trabalhos anteriores (MIRANDA *et al.*, 2020). Alguns estudos demonstraram que essa hiperprodução de muco pode estar relacionada ao aumento das citocinas IL4 e IL13. Além disso, tal hiperprodução de muco pode ser considerada uma forma de defesa do epitélio intestinal para tentar mitigar a entrada de alérgenos e conseqüentemente o aumento da inflamação (SALDANHA *et al.*, 2004; DOURADO *et al.*, 2010).

Ademais, o tratamento com *A. muciniphila* promoveu a atenuação do número de células caliciformes. Tal atenuação pode estar relacionada a algum efeito imunomodulador exercido pela bactéria capaz de diminuir os níveis de IL4 e IL6, promovendo a diminuição do número de células caliciformes.

### **5.5 Avaliação da atividade de MPO e níveis de CXCL1/KC**

Os neutrófilos são as primeiras células recrutadas para os sítios de inflamação. Tal recrutamento é realizado por quimiotaxia. Esse processo consiste na formação de um gradiente de concentração ao longo do endotélio, matriz extracelular e epitélio. Tal quimiotaxia é desempenhada principalmente por quimiocinas como a CXCL1/KC (PETRI; SANZ, 2018; SAWANT *et al.*, 2020).

Os neutrófilos apresentam 5% do seu peso seco correspondendo à mieloperoxidase (MPO), tal enzima está presente nos grânulos azurofílicos dos neutrófilos e é a proteína mais abundante presente nessas células. Portanto, devido a essas características, essa enzima pode ser utilizada para a avaliação indireta da presença de neutrófilos nos tecidos (SOUZA *et al.*, 2000; MUNOZ-CANO *et al.*, 2016; STRZEPA; PRITCHARD; DITTEL, 2017).

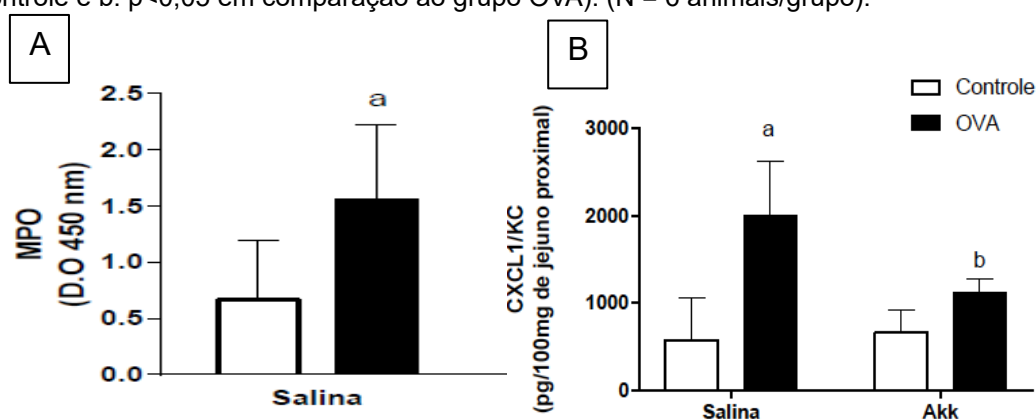
Durante os processos de homeostase, MPO pode catalisar a formação de radicais livres que apresentam propriedades antibacterianas protegendo o indivíduo de possíveis infecções. Entretanto, em quadros de inflamação, como em processos alérgicos, esses radicais livres podem causar danos teciduais com conseqüente agravamento dos quadros de inflamação (STRZEPA; PRITCHARD; DITTEL, 2017; ARATANI, 2018).

Portanto, para avaliar os níveis de neutrófilos e da quimiocina CXCL1/KC, assim como o efeito proporcionado por *A. muciniphila* nesses parâmetros, fez-se a dosagem da atividade de MPO e da sua principal quimiocina nos tecidos. Os resultados podem ser visualizados na Figura 13.

No presente estudo, os animais sensibilizados e desafiados (OVA) apresentaram um aumento significativo dos níveis de MPO quando comparados ao grupo controle. Além disso, o tratamento com *A. muciniphila* foi capaz de reverter esse quadro (Figura 13A). Ademais, o grupo tratado com *A. muciniphila* apresentou uma redução significativa nos níveis de KC, o que corroborou os dados de MPO (Figura 13B).

O papel dos neutrófilos em processos alérgicos ainda é objeto de estudo para inúmeras pesquisas, afinal, pouco se sabe sobre o seu papel nessas condições patológicas. O presente trabalho demonstrou a presença de uma neutrofilia nos camundongos sensibilizados e desafiados (OVA). A presença dessa neutrofilia já foi demonstrada tanto em pacientes que apresentam alergia alimentar quando em modelos murinos de alergia alimentar (KIMURA *et al.*, 2019; MIRANDA *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2021), o que está em concordância com os dados apresentados.

**Figura 13** – Avaliação dos níveis de MPO (A) e CXCL1/KC (B) no jejuno proximal. As barras representam os grupos analisados (Controle; OVA: sensibilizados e desafiados com OVA; Akk: 0,1 mL contendo  $1 \times 10^{10}$  UFC/mL de *A. muciniphila* viável). (a:  $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle e b:  $p < 0,05$  em comparação ao grupo OVA). (N = 6 animais/grupo).



Fonte: Elaborado pela autora.

Além disso, em quadros de alergia alimentar, os neutrófilos podem produzir PAF e esse fator tem sido associado aos processos de anafilaxia, que é um dos quadros mais graves gerados por processos alérgicos (MUNOZ-CANO *et al.*, 2016),



o que torna a capacidade de atenuação dos níveis de MPO apresentada por *A. muciniphila* algo interessante para o seu uso como potencial probiótico. Alguns estudos têm demonstrado que potenciais probióticos como *Lacticaseibacillus paracasei* L9 são capazes de atenuar os níveis de neutrófilos em processos alérgicos (WANG *et al.*, 2017), o que está em concordância com o que foi apresentado no presente estudo.

A partir dos dados apresentados pode-se inferir que o mecanismo pelo qual a bactéria atenua os níveis de neutrófilos nos tecidos inflamados pode estar relacionado à supressão da quimiocina CXCL1/KC, pois, ao analisar a Figura 13, tem-se que a bactéria promove a supressão de ambos os parâmetros, dando respaldo à relação existente entre estes fatores e sugerindo uma possível proteção da bactéria nos tecidos dos camundongos tratados. Porém, maiores investigações são necessárias para esclarecer os mecanismos envolvidos.

## **5.6 Avaliação dos níveis de IL4, IL6, IL9, IL10, IL13, IL17 e TNF**

A citocina IL4 é uma citocina que está intimamente relacionada com o desencadeamento da alergia alimentar. As células que produzem IL4 são amplamente investigadas e, dentre elas, tem-se células T CD4, basófilos, eosinófilos, mastócitos, células T NK e células ILC2, quando estimuladas. Sabe-se que tal citocina auxilia na diferenciação das células T *naïve* em células Th2 efetoras. A célula Th2 efetora além de produzir citocinas, incluindo a IL4, é responsável por ativar as células B. As células B ativas produzem IgE contra o alérgeno específico. Essas IgE interagem com mastócitos e basófilos, e quando há um segundo contato com o alérgeno, há a degranulação dessas células, culminando na liberação dos mediadores inflamatórios, como a histamina e ativação dos eosinófilos. Ainda, alguns estudos apontam que a IL4 também promove a diferenciação de células tronco intestinais em células calciformes, o que pode ser um indício do mecanismo envolvido no aumento do número dessas células encontrado no presente estudo no grupo OVA (POTACZEK *et al.*, 2017; SAITO *et al.*, 2020; JUNTILA, 2018). Portanto, para avaliar se o aumento dos níveis de IgE, eosinófilos e aumento do número de células calciformes observados no grupo OVA do presente estudo, estaria

relacionado com o aumento dos níveis de IL4, e se a supressão desses parâmetros observada após o tratamento com *A. muciniphila* estaria relacionada com a mitigação dos níveis de IL4, dosou-se os níveis dessa citocina e os resultados podem ser visualizados na Figura 14.

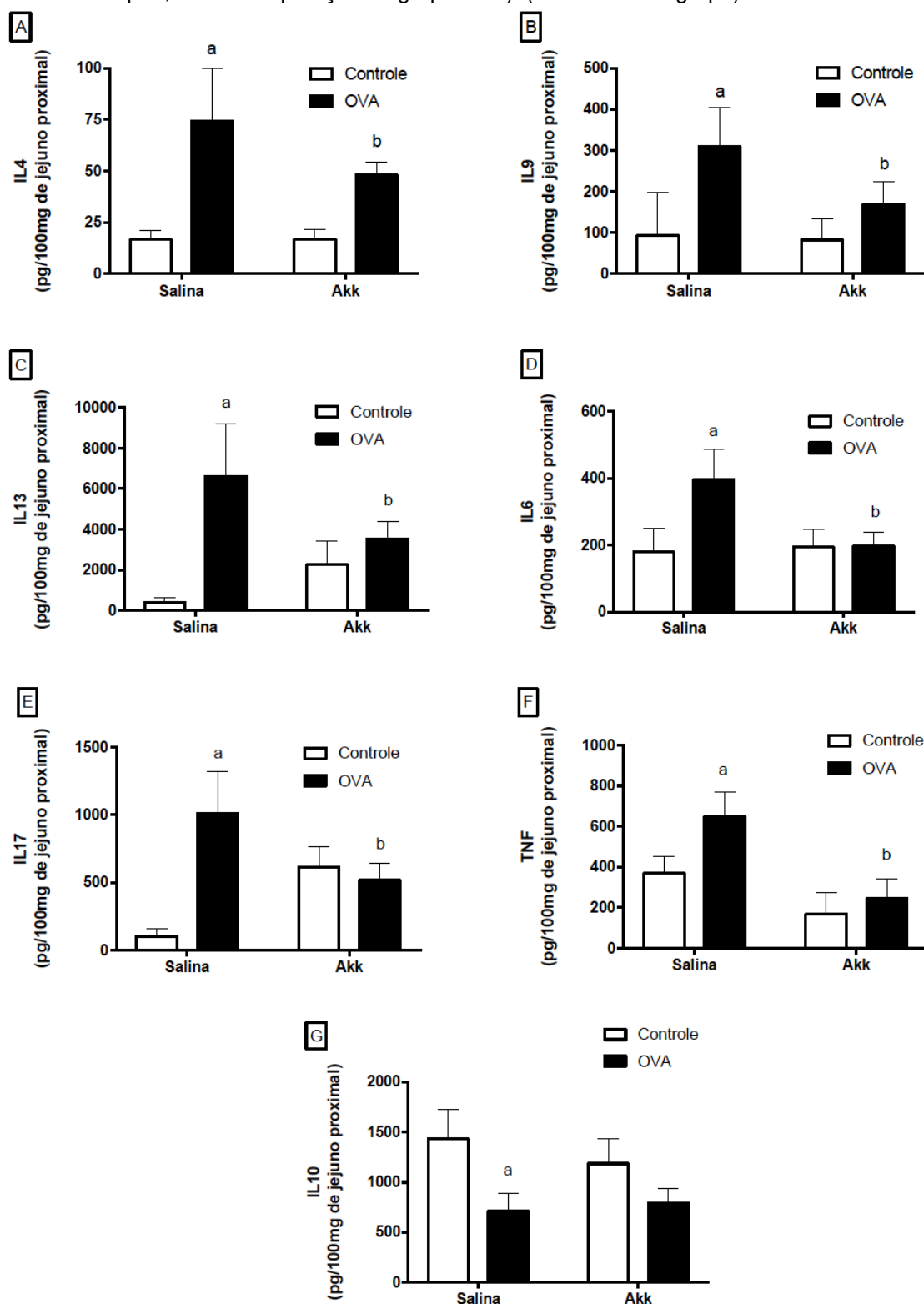
Os resultados apresentados pela Figura 14A mostram que os animais sensibilizados e desafiados (OVA) apresentam aumento significativo de IL4 quando comparados ao grupo controle, evidenciando o papel da IL4 nas inflamações alérgicas mediadas por IgE. Tais resultados corroboram os dados de IgE (Figura 9A), EPO (Figura 10A) e células caliciformes (Figura 12F) apresentados no presente estudo, uma vez que houve o aumento significativo desse conjunto de parâmetros no grupo OVA quando comparados ao grupo controle. Tal fenômeno tem sido amplamente descrito pela literatura (LAM *et al.*, 2015; POTACZEK *et al.*, 2017; SALDANHA *et al.*, 2004). Dourado e colaboradores (2010) demonstraram que camundongos sensibilizados e desafiados que apresentam deficiência na produção de IL4 apresentam baixos níveis de IgE e IgG1 anti-OVA, baixos níveis de eosinófilos e redução da produção de muco pelas células caliciformes, o que estabelece uma correlação dos níveis dessa citocina com o desencadeamento da alergia alimentar. Tais dados estão em conformidade com o encontrado no presente estudo.

Quando avaliamos o efeito promovido por *A. muciniphila* nos níveis de IL4 tem-se que a bactéria foi capaz de promover a redução dos níveis dessa citocina no grupo tratado (Figura 14). Tal resultado corrobora os dados de IgE (Figura 9A), EPO (Figura 10A) e células caliciformes (Figura 12F) apresentados no presente estudo, em que em todos esses parâmetros foi observado uma redução semelhante, o que nos permite inferir que o mecanismo pelo qual a bactéria atenua esses sinais de inflamação desencadeados pela alergia alimentar seria pela supressão da produção de IL4.

Estudos realizados por Song e colaboradores (2020) demonstraram que uma linhagem de *Lactocaseibacillus rhamnosus* também foi capaz de promover a redução dos níveis de IL4 em camundongos sensibilizados e desafiados. E, ainda, Majumder e colaboradores (2020) obtiveram resultados semelhantes utilizando como tratamento da alergia *Lactiplantibacillus pentosus* S-PT84.

**Figura 14** – Avaliação dos níveis de IL4 (A), IL9 (B), IL13 (C), IL6 (D), IL17 (E), TNF (F) e IL10 (G) no jejuno proximal.

As barras representam os grupos analisados (Controle; OVA: sensibilizados e desafiados com OVA; Akk: 0,1 mL contendo  $1 \times 10^{10}$  UFC/mL de *A. muciniphila* viável). (a:  $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle e b:  $p < 0,05$  em comparação ao grupo OVA). (N = 6 animais/grupo).



Fonte: Elaborado pela autora.

Outra citocina envolvida nos processos de alergia alimentar é a IL6, que tem papel essencial na regulação do metabolismo e intercomunicação de diversos tecidos. Dentre esses tecidos, o tecido adiposo ganha destaque, pois seus níveis estão intimamente relacionados com o controle do peso corpóreo (DIAZ-CHAMORRO *et al.*, 2022). Como mencionado anteriormente, o aumento dos níveis da citocina IL6 pode desencadear o aumento da lipólise, atenuação do peso do tecido adiposo, diminuição do tamanho dos adipócitos e aumento da energia requerida para a manutenção dos processos inflamatórios desencadeando o recrutamento dos lipídeos de reserva (DOURADO *et al.*, 2011). Ademais, a IL6 é importante nos processos de diferenciação e maturação das células Th9 e Th17, que pode aumentar a produção das citocinas IL9 e IL17, além de auxiliar na manutenção da resposta Th2. Além disso, alguns estudos clínicos apontam uma correlação dos níveis de IL6 com a gravidade da mastocitose sistêmica, asma e doenças alérgicas. Tal fato estaria relacionado a expressão aumentada de IL6 que contribuiria para a proliferação e formação de mastócitos humanos altamente reativos. Assim, os impactos do aumento da expressão de IL6 em uma resposta alérgica alimentar podem afetar o número e a função dos mastócitos além de contribuir para o aumento de IL9 e IL17 (STARK *et al.*, 2022). Os dados apresentados na Figura 14 demonstram que os animais sensibilizados e desafiados (OVA) apresentam aumento significativo de IL6 (Figura 14D) quando comparados ao grupo controle, e ainda observa-se o aumento de IL9 (Figura 14B) e IL17 (Figura 14E), conforme descrito pela literatura. Ao avaliarmos o efeito promovido por *A. muciniphila* nos níveis de tais citocinas tem-se que a bactéria foi capaz de promover a redução significativa de IL6 (Figura 14D), IL9 (Figura 14B) e IL17 (Figura 14E). Resultados semelhantes foram demonstrados por Santos e colaboradores (2021) ao administrar *B. longum* 5<sup>1A</sup> em modelo murino de alergia alimentar a ovalbumina. Duan e colaboradores (2022) também demonstraram o papel imunomodulador de *Lactobacillus plantarum* JC37 atenuando os níveis de IL17 em modelo murino de alergia alimentar a ovalbumina.

O papel da IL13 na síntese de IgE antígeno específico já é bem consolidado. Tal citocina auxilia na ativação das células B, produção de IgE, liberação de histamina e consequente desencadeamento dos sintomas clássicos da alergia alimentar (RAMSEY; BERIN, 2021). No presente trabalho os animais sensibilizados

e desafiados (OVA) apresentaram um aumento significativo dos níveis de IL13 (Figura 14C), corroborando com o aumento dos níveis de IgE demonstrados (Figura 9A). Em termos de tratamento com *A. muciniphila* observa-se que a bactéria promoveu uma redução significativa dos níveis de IL13 (Figura 14C). Resultados semelhantes foram demonstrados por Lu e colaboradores (2022) em que *Lactiplantibacillus plantarum* CCFM1189 e *Limosilactobacillus reuteri* CCFM119 mitigaram significativamente os níveis de IL13 em um modelo murino de alergia alimentar. O papel dos probióticos em regular os níveis de IL13 também foi observado por Kim e colaboradores (2022) em que administraram *L. plantarum* em modelo murino de alergia. Uma associação de microrganismos composta por *L. paracasei* KF698, *L. pentosus* KF340, *B. amyloliquefaciens* KF26, *P. pentosaceus* KF159 e *L. lactis* KF140 demonstrou resultados promissores na atenuação de IL13 em modelo murino de alergia alimentar a ovalbumina (SHIN *et al.*, 2018).

Outro fator importante no mecanismo envolvido na alergia alimentar é o TNF. Alguns estudos apontam que o mesmo pode ser utilizado como um marcador que prediz a alergia alimentar mediada por IgE e também é um parâmetro importante no acompanhamento dos pacientes. O TNF é liberado pelos mastócitos e auxilia na produção das citocinas Th2, aumentando o influxo de mediadores inflamatórios para o sítio da inflamação (KARA *et al.*, 2020). No presente trabalho, os animais sensibilizados e desafiados (OVA) apresentaram um aumento significativo dos níveis de TNF e, quando tratados com *A. muciniphila*, houve uma atenuação significativa desse parâmetro (Figura 14F). Santos e colaboradores (2021) observaram resultados semelhantes ao administrar *B. longum* 5<sup>1A</sup> em modelo murino de alergia alimentar a ovalbumina, evidenciando o papel dos probióticos em mitigar os níveis de citocinas pró-inflamatórias em modelos murinos de alergia.

Por fim, a citocina IL10 é produzida pelas células Treg e contribui nos processos de tolerância oral (TORDESILLAS; BERIN, 2018). Alguns autores descrevem que tal efeito é em virtude da supressão da expressão dos receptores de alta afinidade FcεRI, com conseqüente redução na síntese de IgE e nos níveis de eosinófilos. Sendo assim, a IL10 é uma citocina chave nos processos de regulação e atenuação da resposta inflamatória desencadeada na alergia alimentar (NEDELKOPOULOU *et al.*, 2020). Entretanto, ao analisarmos os resultados obtidos

no presente estudo (Figura 14G) tem-se que *A. muciniphila* não foi capaz de promover um aumento significativo dos níveis de IL10.

Em suma, a análise do efeito promovido por *A. muciniphila* reforça a capacidade imunomoduladora da bactéria em regular os níveis das citocinas Th2, sendo uma estratégia interessante para auxiliar no tratamento dessa condição patológica.

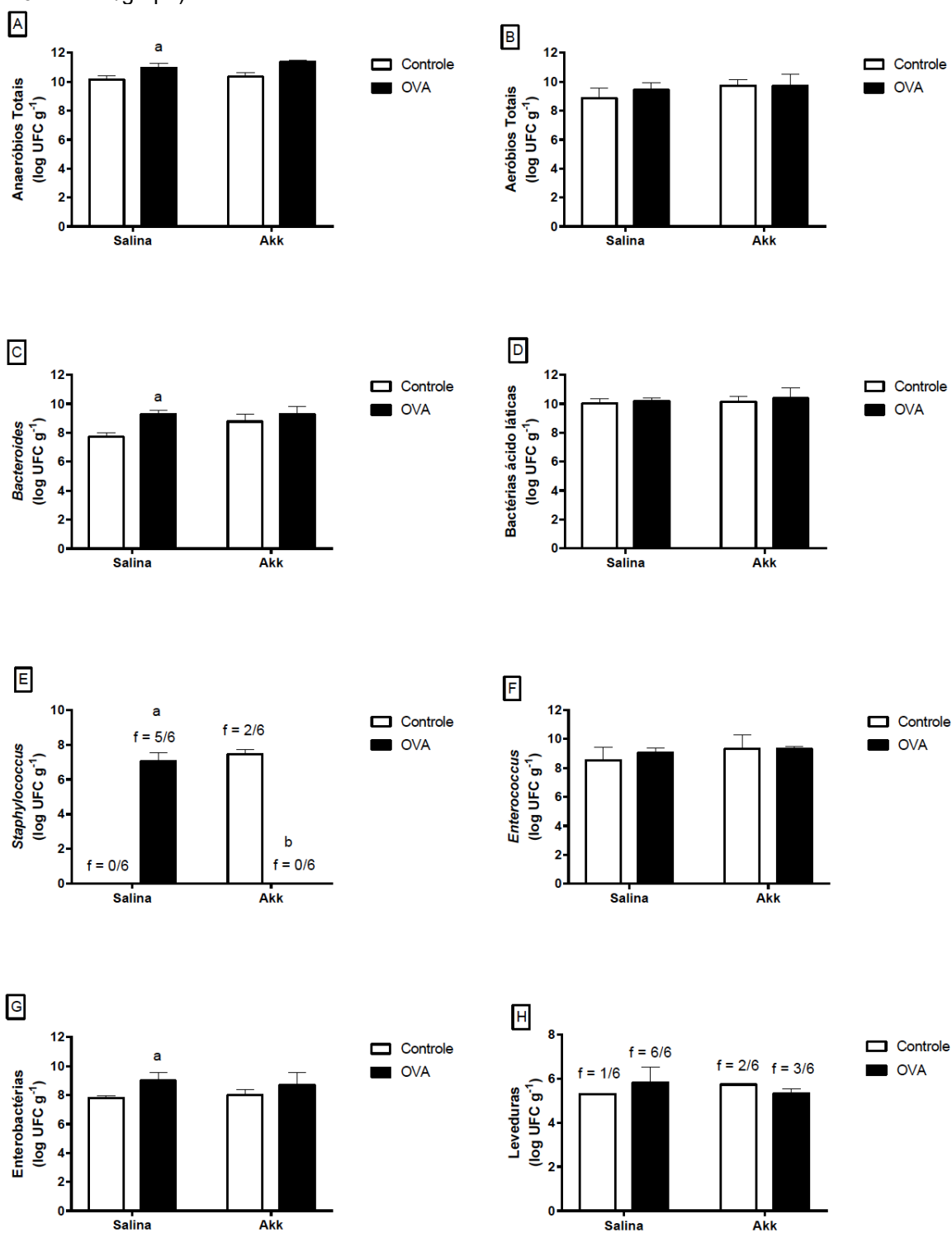
### **5.7 Avaliação da composição da microbiota intestinal na alergia alimentar após o tratamento probiótico por método dependente de cultivo**

A microbiota intestinal é um dos parâmetros intimamente relacionados com o desenvolvimento dos órgãos do SI e das respostas imunes. Sendo assim, alterações na composição da microbiota intestinal podem induzir o desequilíbrio dos processos de tolerância oral, regulação do metabolismo do hospedeiro e afetar a maturação do SI, o que pode desencadear os quadros de alergia. Conseqüentemente, a manipulação da composição da microbiota intestinal tem emergido como uma alternativa interessante para a mitigação dos processos alérgicos (LEE *et al.*, 2020). Nesta perspectiva, a composição da microbiota intestinal foi avaliada pelo método dependente de cultivo e os resultados podem ser visualizados na Figura 15.

Ao analisarmos a Figura 15 tem-se que em camundongos alérgicos (OVA) há o aumento significativo dos anaeróbios totais (Figura 15A), *Bacteroides* spp. (Figura 15C), *Staphylococcus* spp. (Figura 15E), enterobactérias (Figura 15G) e na frequência de leveduras (100%) (Figura 15H) quando comparados ao grupo controle. Tais mudanças representam um indício do desequilíbrio da composição da microbiota intestinal e conseqüente estabelecimento dos processos de disbiose no grupo OVA. A disbiose pode ser definida como alterações na composição e função da microbiota intestinal (LEVY *et al.*, 2017).

**Figura 15** – Composição da microbiota intestinal por método dependente de cultivo.

As letras representam os microrganismos analisados. A: Anaeróbios totais; B: Aeróbios totais; C: Bacteroides spp.; D: bactérias produtoras de ácido láctico; E: *Staphylococcus* spp.; F: *Enterococcus* spp.; G: Enterobactérias; H: Leveduras. As barras representam os grupos analisados (Controle; OVA: sensibilizados e desafiados com OVA; Akk: 0,1 mL contendo  $1 \times 10^{10}$  UFC/mL de *A. muciniphila* viável). (a:  $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle e b:  $p < 0,05$  em comparação ao grupo OVA). (N = 6 animais/grupo).



Fonte: Elaborado pela autora.

Alguns estudos têm relatado uma associação do aumento de *Staphylococcus* spp., principalmente *S. aureus*, com o desencadeamento dos processos de alergia alimentar. Tal associação estaria relacionada aos fatores de virulência dessa bactéria, como proteases, lipases, toxinas e alguns componentes presentes em sua superfície que seriam capazes de promover uma ruptura da barreira epitelial desencadeando no aumento da absorção de alérgenos provenientes da dieta, culminando no desencadeamento dos processos alérgicos (JONES; CURRAN-EVERETT; LEUNG, 2016). Tsilochristou e colaboradores (2019) demonstraram que *S. aureus* está associada com o processo de sensibilização e desencadeamento da alergia alimentar auxiliando na desregulação da tolerância aos alimentos.

Ao analisarmos a capacidade da bactéria *A. muciniphila* em modular os níveis de *Staphylococcus* spp., tem-se que a bactéria foi capaz de reverter esse parâmetro atenuando significativamente os níveis de *Staphylococcus* spp. e, também, a sua frequência, igualando os níveis desse parâmetro ao grupo controle.

Outra modificação na composição da microbiota dos camundongos do grupo OVA foi o aumento de enterobactérias (Figura 15G). Azad e colaboradores (2015) demonstraram um aumento significativo de enterobactérias em amostras de fezes de crianças com alergia alimentar, o que apresenta um perfil que corrobora os dados encontrados no presente estudo. Tal alteração tem sido associada com o desenvolvimento de dermatite atópica, que também pode causar alterações na barreira epitelial com conseqüente absorção de alérgenos alimentares aumentando os riscos de desregulação da tolerância oral. Em relação à modulação proporcionada por *A. muciniphila* frente aos níveis de enterobactérias tem-se que a bactéria não foi capaz de promover a mitigação desses níveis, como indicado na Figura 15G, o número de UFC/g de enterobactérias no grupo tratado permaneceu similar ao grupo OVA.

Outro grupo de microrganismos analisados foram os *Bacteroides* spp. Alguns estudos têm demonstrado que a deficiência de *Bacteroides* spp. em crianças tem sido associada ao desenvolvimento da alergia alimentar (AZAD *et al.*, 2015; LING *et al.*, 2014; MARCOBAL *et al.*, 2010). Porém, no presente estudo nós observamos um aumento dos níveis de *Bacteroides* spp. no grupo OVA (Figura 15C). Tal fato pode estar relacionado aos efeitos linhagem e espécie dependentes desses



microrganismos na microbiota intestinal, pois, apesar de a deficiência de *Bacteroides* spp. ter sido associada à alergia alimentar e outros estudos apontarem seu papel até mesmo na capacidade de algumas espécies de *Bacteroides* spp., como *B. fragilis*, em estimularem a produção de IL10 (citocina que apresenta papel imunomodulador com potencial de mitigar as respostas alérgicas), existem algumas espécies dentro do mesmo gênero que não promovem esses efeitos benéficos, podendo até mesmo estar relacionada à condições patológicas. Por exemplo, alguns estudos apontam que *B. thetaiotaomicron* é capaz de induzir colite em algumas espécies de camundongos (ATARASHI; HONDA, 2011).

Ao avaliar a Figura 15A, observa-se que há um aumento significativo de anaeróbios totais quando comparados ao controle, tal aumento pode ter sido influenciado pela elevação significativa de *Bacteroides*, pois ambas as análises apresentam perfis semelhantes.

Por fim, ao analisarmos a Figura 15H, tem-se que a frequência de leveduras encontradas no grupo OVA foi de 100% contrapondo-se a 16% no grupo controle, o que mostra um aumento da incidência de leveduras no grupo OVA. Tal aumento também é um indício de disbiose intestinal.

Em relação à modulação de *A. muciniphila* no número de UFC/g de leveduras tem-se que a bactéria promoveu uma redução de 50% na frequência, sendo um prenúncio da capacidade moduladora da composição da microbiota intestinal dos camundongos alérgicos (Figura 15H).

Em conjunto, esses dados de microbiota cultivável sugerem que um dos possíveis mecanismos pelo qual *A. muciniphila* exerce seus efeitos benéficos poderia ser pela modificação da microbiota intestinal uma vez que ela foi capaz de reverter os níveis de *Staphylococcus* spp. e atenuar a frequência de leveduras totais, que são importantes sinais dos processos de disbiose.

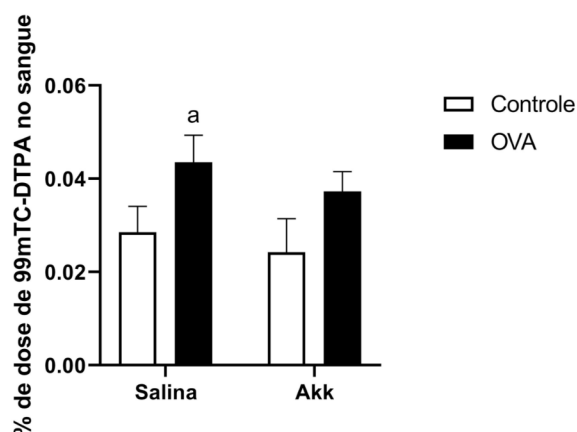
## 5.8 Avaliação da permeabilidade intestinal

A barreira intestinal é uma unidade funcional fisiológica que separa o lúmen intestinal do ambiente interno do corpo. É composta por uma camada de muco que reveste o intestino, pelo epitélio intestinal e células dos sistemas sanguíneo, linfático,

imunológico e nervoso. A camada epitelial é a principal responsável pelo processo de absorção de nutrientes. As células epiteliais são mantidas juntas pelas *tight junctions* (TJs), junções aderentes e junções comunicantes. O principal componente que controla a permeabilidade da barreira intestinal são as TJs, que são as estruturas mais importantes responsáveis pela integridade e seletividade da barreira epitelial. O aumento da permeabilidade intestinal durante o desencadeamento da alergia alimentar culmina em um maior influxo de alérgenos e na ativação exacerbada do sistema imunológico submucoso. Além disso, a liberação de citocinas e mediadores inflamatórios potencializa a degradação da barreira epitelial que intensifica o aumento da permeabilidade intestinal (NIEWIE; GRZYBOWSKA-CHLEBOWCZYK, 2022). Diante do exposto, torna-se necessário investigar se a administração oral de *A. muciniphila* seria capaz de atenuar o aumento da permeabilidade intestinal. Os resultados podem ser visualizados na Figura 16.

**Figura 16** – Avaliação da permeabilidade intestinal.

As barras representam os grupos analisados (Controle; OVA: sensibilizados e desafiados com OVA; Akk: 0,1 mL contendo  $1 \times 10^{10}$  UFC/mL de *A. muciniphila* viável). (a:  $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle). (N = 6 animais/grupo).



Fonte: Elaborado pela autora.

Ao analisarmos a Figura 16 tem-se que em camundongos alérgicos (OVA) há o aumento significativo da permeabilidade intestinal quando comparados ao grupo controle. Tal disfunção estaria relacionada ao comprometimento da regulação do transporte paracelular de substâncias. E assim, como o  $99\text{mTc-DTPA}$  é uma molécula hidrofílica, a mesma atravessa o espaço paracelular e atinge a corrente sanguínea (TRINDADE *et al.*, 2021). Tal fenômeno corrobora os dados observados

por Santos e colaboradores (2021), sendo mais um indício de que animais alérgicos apresentam a ruptura da integridade da barreira epitelial intestinal. Todavia, em termos do potencial de *A. muciniphila* em atenuar o aumento da permeabilidade intestinal observa-se que a bactéria não promoveu uma atenuação significativa desse parâmetro. Trindade e colaboradores (2021) obtiveram resultados semelhantes administrando *L. rhamnosus* viável em modelo murino de mucosite intestinal, inferindo que alguns probióticos não são capazes de restaurar a função das proteínas de junção.

### **5.9 Avaliação da viabilidade de *A. muciniphila* na alergia alimentar**

Como demonstrado até o momento, *A. muciniphila* promove alguns benefícios para a saúde do hospedeiro (melhora nos parâmetros clínicos, histológicos, imunológicos e microbiológicos) no modelo de alergia alimentar investigado. Tal característica faz parte dos critérios para que um microrganismo seja considerado um probiótico. Por definição, para que um microrganismo seja considerado um probiótico ele precisa estar viável (FAO/WHO, 2002). Todavia, o conceito de pós-bióticos tem se destacado nos dias atuais, mostrando que alguns microrganismos são capazes de promover efeitos benéficos mesmo inativados (CUEVAS-GONZÁLEZ; LICEAGA; AGUILAR-TOALÁ, 2020).

Os pós-bióticos apresentam algumas vantagens em relação aos probióticos quanto ao seu uso; por exemplo, seria mais seguro para ser utilizado por indivíduos imunossuprimidos, pois sabe-se que alguns probióticos viáveis são capazes de translocar e desencadear danos a esses indivíduos; além disso, quando adicionados a produtos industriais apresentam tempo de prateleira maior, uma vez que são inativados (AKTER; PARK; JUNG, 2020; LIONG, 2008). Sendo assim, com o intuito de avaliar se o efeito de *A. muciniphila* na atenuação de sinais de alergia alimentar dependeria da viabilidade da bactéria, analisou-se os níveis de IgE anti-OVA e eosinófilos (EPO) e os resultados podem ser visualizados na Figura 17.

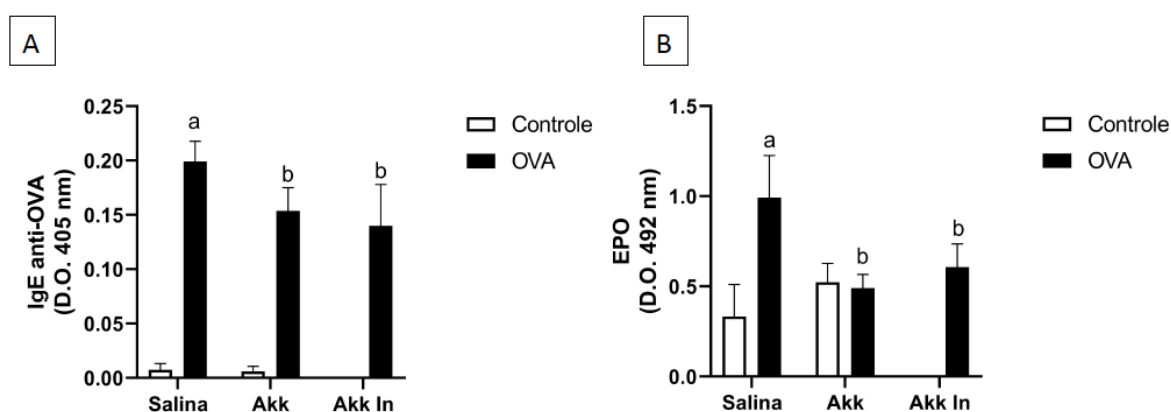
Os dados apresentados na Figura 17 mostram que a bactéria inativada pelo calor também atenua de forma significativa os níveis de IgE anti-OVA e de

eosinófilos, sendo um indício de que *A. muciniphila* também apresenta características interessantes para ser utilizada como pós-biótico.

Os componentes estruturais da parede celular dos pós-bióticos são um dos grandes responsáveis pelo desencadeamento dos efeitos benéficos exercidos pelos mesmos. Sabe-se que *A. muciniphila* apresenta uma proteína extracelular de 32 kDa denominada Amuc\_1100 que é relativamente termoestável, permanecendo ativa após processos de pasteurização (PLOVIER *et al.*, 2017). Tal proteína está relacionada à melhora da barreira epitelial intestinal, além de parâmetros relacionados à obesidade e diabetes tipo 2 (OTTMAN *et al.*, 2017; CHELAKKOT *et al.*, 2018). Sendo assim, maiores investigações são necessárias para avaliar se realmente essa proteína estaria envolvida na atenuação desses parâmetros pró-inflamatórios envolvidos na alergia alimentar.

**Figura 17** – Avaliação dos efeitos de *A. muciniphila* inativada nos níveis de IgE anti-OVA (A) e EPO (B).

As barras representam os grupos analisados (Controle; OVA: sensibilizados e desafiados com OVA; Akk: 0,1 mL contendo  $1 \times 10^{10}$  UFC/mL de *A. muciniphila* viável ou inivável (Akk In)). (a:  $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle e b:  $p < 0,05$  em comparação ao grupo OVA). (N = 6 animais/grupo).



Fonte: Elaborado pela autora.

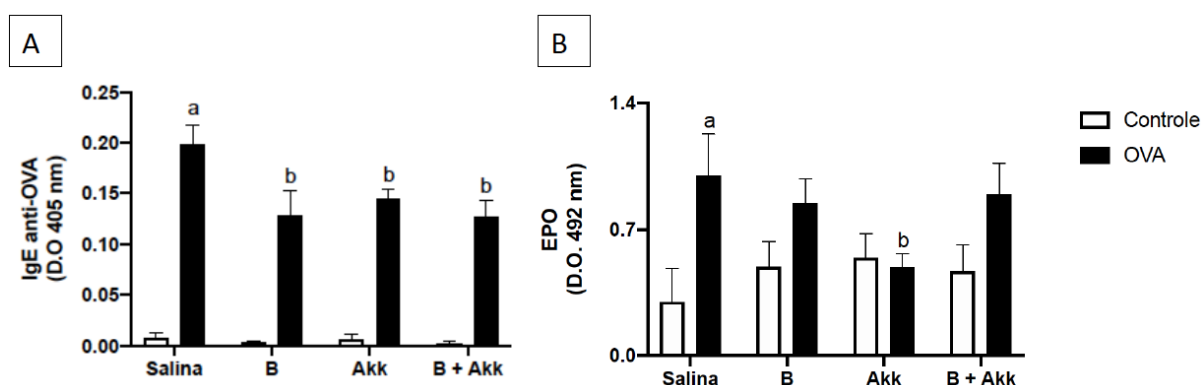
### 5.10 Avaliação da associação de *A. muciniphila* com *B. Longum* 5<sup>1A</sup> na alergia alimentar

Estudos realizados por Pedret e colaboradores (2018) demonstraram que a administração de *Bifidobacterium* pode acarretar o aumento dos níveis de *Akkermansia*. Esta mudança promoveu efeitos benéficos em indivíduos obesos, inferindo que os efeitos benéficos promovidos por *Akkermansia* poderiam ser

potencializados quando há uma associação destes microrganismos. Em um estudo realizado por Souza e colaboradores (2013) foi avaliado o potencial probiótico de quatro espécies de *Bifidobacterium* e, dentre elas, *B. longum* 5<sup>1A</sup> apresentou o melhor potencial probiótico. Além disso, Santos e colaboradores (2021) demonstraram que *B. longum* 5<sup>1A</sup> é capaz de promover a redução significativa dos sinais de inflamação desencadeados pela alergia alimentar à ovalbumina. Sendo assim, com o intuito de avaliar se os efeitos de *A. muciniphila* seriam potencializados com a associação com *B. longum* 5<sup>1A</sup>, avaliou-se os níveis de IgE anti-OVA e eosinófilos. Os resultados podem ser visualizados na Figura 18.

**Figura 18** – Avaliação da associação de *A. muciniphila* com *B. longum* 5<sup>1A</sup> nos níveis de IgE anti-OVA (A) e EPO (B).

As barras representam os grupos analisados (Controle; OVA: sensibilizados e desafiados com OVA; Akk: 0,1 mL contendo 1x10<sup>10</sup> UFC/mL de *A. muciniphila* viável; B: 0,1 mL contendo 1x10<sup>10</sup> UFC/mL de *B. longum* 5<sup>1A</sup>). (a: p<0,05 em comparação ao grupo controle e b: p<0,05 em comparação ao grupo OVA). (N = 6 animais/grupo).



Fonte: Elaborado pela autora.

Ao analisarmos a Figura 18 tem-se que a associação de *A. muciniphila* com *B. longum* 5<sup>1A</sup> apresentou efeito atenuador nos níveis de IgE anti-OVA semelhante aos níveis apresentados pelas bactérias administradas individualmente nos grupos tratados (Figura 18A). Além disso, a associação desses microrganismos não foi capaz de promover a redução dos níveis de eosinófilos, sendo que o perfil encontrado foi semelhante aos níveis apresentados pelo grupo sensibilizado e desafiado (OVA). Em contrapartida, um estudo realizado por Schiavi e colaboradores (2011) demonstrou os efeitos benéficos de uma associação de microrganismos (VSL#3) em um modelo murino de alergia alimentar. Tal associação era formada por *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. casei*, *L. plantarum*,

*Bifidobacterium longum*, *B. infantis*, *B. breve*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, demonstrando que o efeito exercido por essas associações são variados e dependem da composição de microrganismos presentes nesses estudos. Além disso, o presente estudo demonstrou que nem sempre a associação de microrganismos que apresentam efeitos benéficos individualmente vão apresentar efeitos potencializados quando associados, podendo até mesmo agravar os sinais de inflamação, como demonstrado na avaliação dos eosinófilos (Figura 18B).

## 6. CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou que a administração oral de *A. muciniphila* BAA-835 viável e inativada pelo calor promove efeito probiótico sistêmico e local em modelo murino de alergia alimentar. Tal efeito pode estar associado com a redução dos níveis das citocinas pró-inflamatórias (IL4, IL6, IL9, IL13, IL17 e TNF). Os dados apresentados auxiliarão novas investigações que poderão contribuir para o desenvolvimento de novas formas de tratamento que visem promover o bem-estar dos pacientes que são acometidos pela alergia alimentar.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Básica**. Elsevier Brasil. Cap 1, 8-15, 2007.

ABDELAZEZ, A.; MUHAMMAD, Z.; ZHANG, Q. X.; ZHU, Z. T.; ABDELMOTAAL, H.; SAMI, R.; MENG, X. C. Production of a Functional Frozen Yogurt Fortified with *Bifidobacterium* spp. **BioMed Research International**, 2017, 1-10.

ACHARYA, K. R.; ACKERMAN, S. J. Eosinophil granule proteins: form and function. **Journal of Biological Chemistry**, 289(25), 17406-17415, 2014.

AHMADI, Z.; HASSANSHAH, G.; KHORRAMDELAZAD, H.; ZAINODINI, N.; KOO-CHAKZADEH, L. An overlook to the characteristics and roles played by eotaxin network in the pathophysiology of food allergies: allergic asthma and atopic dermatitis. **Inflammation**, 39(3), 1253-1267, 2016.

AITORO, R.; PAPARO, L.; AMOROSO, A.; DI COSTANZO, M.; COSENZA, L.; GRANATA, V.; SCALA, C.; NOCERINO, R.; TRINCHESE, G.; MONTELLA, M.; ER-COLINI, D.; CANANI, B. Gut microbiota as a target for preventive and therapeutic intervention against food allergy. **Nutrients**, 9(7), 672, 2017.

AKTER, S.; PARK, J. H.; JUNG, H. K. Potential Health-Promoting Benefits of Paraprobiotics, Inactivated Probiotic Cells. **Journal of microbiology and biotechnology**, 2020.

ALLAIRE, J. M.; CROWLEY, S. M.; LAW, H. T.; CHANG, S. Y.; KO, H. J.; VALLANCE, B. A. The intestinal epithelium: central coordinator of mucosal immunity. **Trends in Immunology**, 39(9), 677-696, 2018.

ANSARI, I. T.; MU, T. A murine model of wheat versus potato allergy: Patatin and 53kDa protein are the potential allergen from potato. **Molecular immunology**, 101, 284-293, 2018.

ANTUNES, M. M.; COELHO, B. S. L.; VICHI, T. M.; SANTOS, E. A. dos; GONDIM, F. K. B.; DINIZ, A. B.; AGUILAR, E. C.; CARA, D. C.; PORTO, L. C. J.; CASTRO, I. C.; LEITE, J. I. A.; TEIXEIRA, L. G. Oral supplementation with capsaicin reduces oxidative stress and IL-33 on a food allergy murine model. **World Allergy Organization Journal**, 12(7), 100045, 2019.

ARANTES, R. M. E.; NOGUEIRA, A. M. M. F. Distribution of enteroglucagon-and peptide YY-immunoreactive cells in the intestinal mucosa of germ-free and conventional mice. **Cell and Tissue Research**, 290(1), 61-69, 1997.



ARATANI, Y. Myeloperoxidase: its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. **Archives of biochemistry and biophysics**, 640, 47-52, 2018.

ATARASHI, K.; HONDA, K. Microbiota in autoimmunity and tolerance. **Current opinion in immunology**, 23(6), 761-768, 2011.

AZAD, M. B.; KONYA, T.; GUTTMAN, D. S.; FIELD, C. J.; SEARS, M. R.; HAYGLASS, K. T.; MANDHANE, S. E.; TURVEY, S. E.; SUBBARAO, P.; BECKER, A. B.; SCOTT, J. A.; KOZYRSKYJ, A. L. Infant gut microbiota and food sensitization: associations in the first year of life. **Clinical and Experimental Allergy**, 45(3), 632-643, 2015.

BAI, J.; ZHAO, X.; ZHANG, M.; XIA, X.; YANG, A.; CHEN, H. Gut microbiota: A target for prebiotics and probiotics in the intervention and therapy of food allergy. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 1-15, 2022.

BALAN, P.; SIK-HAN, K.; MOUGHAN, P. J. Impact of oral immunoglobulins on animal health-A review. **Animal Science Journal**, 90(9), 1099-1110, 2019.

BARKO, P. C.; MCMICHAEL, M. A.; SWANSON, K. S.; WILLIAMS, D. A. The gastrointestinal microbiome: a review. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 32(1), 9-25, 2018.

BASSO, A. S.; PINTO, F. A. C.; RUSSO, M.; BRITTO, L. R. G.; SÁ-ROCHA, L. C. de; NETO, J. P. Neural correlates of IgE-mediated food allergy. **Journal of Neuroimmunology**, 140(1-2), 69-77, 2003.

BEREK, C.; BELLER, A.; CHU, V. T. Isolation of eosinophils from the lamina propria of the murine small intestine. **Gastrointestinal Physiology and Diseases**. 213-221, 2016.

BERGMANN, K. R.; LIU, S. X.; TIAN, R.; KUSHNIR, A.; TURNER, J. R.; LI, H. L.; DE PLAEN, I. G. Bifidobacteria stabilize claudins at tight junctions and prevent intestinal barrier dysfunction in mouse necrotizing enterocolitis. **The American Journal of Pathology**, 182(5), 1595-1606, 2013.

BERNUCCI, B. S.; LOURES, C. M.; LOPES, S. C.; OLIVEIRA, M. C.; SABINO, A. P.; VILELA, J. M.; OLIVEIRA, E. S. Effect of microencapsulation conditions on the viability and functionality of *Bifidobacterium longum* 51A. **LWT**, 80, 341-347, 2017.

BEUTIER, H.; GILLIS, C. M.; IANNASCOLI, B.; GODON, O.; ENGLAND, P.; SIBILANO, R.; MANCARDI, D. A. IgG subclasses determine pathways of anaphylaxis in mice. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 139(1), 269-280, 2017.

BOZZI CIONCI, N.; BAFFONI, L.; GAGGIÀ, F.; DI GIOIA, D. Therapeutic Microbiology: The Role of *Bifidobacterium breve* as Food Supplement for the Prevention/Treatment of Paediatric Diseases. **Nutrients**, 10(11), 1723, 2018.

BRASIL. **Estabelecimento de procedimentos para uso científico de animais**. Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Constituição Federal, 2008. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm)>. Acesso em: 22 de novembro de 2018.

CALVANI, M.; BERTI, I.; FIOCCHI, A.; GALLI, E.; GIORGIO, V.; MARTELLI, A.; SOPO, S.; PANETTA, V. Oral food challenge: safety, adherence to guidelines and predictive value of skin prick testing. **Pediatric Allergy and Immunology**, 23(8), 754-760, 2012.

CANESSO, M. C. C.; LEMOS, L.; NEVES, T. C.; MARIM, F. M.; CASTRO, T. B. R.; VELOSO, E. S.; QUEIROZ, C.; AHN, J.; SANTIAGO, H.; MARTINS, F.; SILVA, J.; FERREIRA, E.; CARA, D.; VIEIRA, A.; BARBER, G.; OLIVEIRA, S.; FARIA, A. M. C. The cytosolic sensor STING is required for intestinal homeostasis and control of inflammation. **Mucosal immunology**, 11(3), 820-834, 2018.

CANI, P. D.; DE VOS, W. M. Next-generation beneficial microbes: the case of *Akkermansia muciniphila*. **Frontiers in Microbiology**, 8, 1765, 2017.

CANI, P. D.; DEPOMMIER, C.; DERRIEN, M.; EVERARD, A.; DE VOS, W. M. *Akkermansia muciniphila*: paradigm for next-generation beneficial microorganisms. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, 1-13, 2022.

CARA, D. C., CONDE, A. A.; VAZ, N. M. Immunological induction of flavor aversion in mice. **Brazilian journal of medical and biological research**, 27(6), 1331-1341, 1994.

CARA, D. C.; CONDE, A. A.; VAZ, N. M. Immunological induction of flavour aversion in mice. II. Passive/adoptive transfer and pharmacological inhibition. **Scandinavian Journal of Immunology**, 45(1), 16-20, 1997.

CARDOSO, C. R.; PROVINCIIATTO, P. R.; GODOI, D. F.; FONSECA, M. T.; FERREIRA, B. R.; TEIXEIRA, G.; CUNHA, F. Q.; PINZAN, C. F.; DA SILVA, J. S. The signal transducer and activator of transcription 6 (STAT-6) mediates Th2 inflammation and tissue damage in a murine model of peanut-induced food allergy. **Allergologia et immunopathologia**, 47(6), 535-543, 2019.

CASARO, M. B.; THOMAS, A. M.; MENDES, E.; FUKUMORI, C.; RIBEIRO, W. R.; OLIVEIRA, F. A.; CRISMA, A. R.; MURATA, G. M.; BIZZARRO, B.; SÁ-NUNES, A.; SETUBAL, J. C.; MAYER, M. P. A.; MARTINS, F. S.; VIEIRA, A. T.; ANTIORIO, A. T.

F. B.; TAVARES-DE-LIMA, W.; CAMARA, N. O. S.; CURI, R.; DIAS-NETO, E.; FERREIRA, C. M. A probiotic has differential effects on allergic airway inflammation in A/J and C57BL/6 mice and is correlated with the gut microbiome. **Microbiome**, 9(1), 1-16, 2021.

CASTELLAZZI, A.; VALSECCHI, C.; CAIMMI, S.; LICARI, A.; MARSEGLIA, A.; LEONI, M.; CAIMMI, D.; GIUDICE, M.; LEONARDI, S.; ROSA, M.; MARSEGLIA, G. Probiotics and food allergy. **Italian Journal of Pediatrics**, 39(1), 47, 2013.

CHELAKKOT, C.; CHOI, Y.; KIM, D. K.; PARK, H. T.; GHIM, J.; KWON, Y.; JEON, J.; KIM, M.; JEE, Y.; GHO, Y.; PARK, H.; KIM, Y.; RYU, S. *Akkermansia muciniphila*-derived extracellular vesicles influence gut permeability through the regulation of tight junctions. **Experimental and molecular medicine**, 50(2), e450-e450, 2018.

CHENG, R. Y.; YAO, J. R.; WAN, Q.; GUO, J. W.; PU, F. F.; SHI, L.; HE, F. Oral administration of *Bifidobacterium bifidum* TMC3115 to neonatal mice may alleviate IgE-mediated allergic risk in adulthood. **Beneficial Microbes**, 1-14, 2018.

CHERNIKOVA, D. A.; ZHAO, M. Y.; JACOBS, J. P. Microbiome Therapeutics for Food Allergy. **Nutrients**, 14(23), 5155, 2022.

CHU, D. K.; JIMENEZ-SAIZ, R.; VERSCHOOR, C. P.; WALKER, T. D.; GONCHAROVA, S.; LLOP-GUEVARA, A.; KONG, J. Indigenous enteric eosinophils control DCs to initiate a primary Th2 immune response in vivo. **Journal of Experimental Medicine**, 211(8), 1657-1672, 2014.

COLLINS, P. D.; MARLEAU, S.; GRIFFITHS-JOHNSON, D. A.; JOSE, P. J.; WILLIAMS, T. J. Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo. **The Journal of experimental medicine**, 182(4), 1169-1174, 1995.

COSTA-PINTO, F. A.; BASSO, A. S.; BRITTO, L. R. G.; MALUCELLI, B. E.; RUSSO, M. Avoidance behavior and neural correlates of allergen exposure in a murine model of asthma. **Brain, behavior, and immunity**, 19(1), 52-60, 2005.

CUEVAS-GONZÁLEZ, P. F.; LICEAGA, A. M.; AGUILAR-TOALÁ, J. E. Postbiotics and paraprobiotics: From concepts to applications. **Food Research International**, 109502, 2020.

DE JONG, N. W.; WICHERS, H. J. Update on Nutrition and Food Allergy. **Nutrients**, 14(10), 2137, 2022.

DE VOS, W. M. Microbe profile: *Akkermansia muciniphila*: a conserved intestinal symbiont that acts as the gatekeeper of our mucosa. **Microbiology**, 163(5), 646-648, 2017.

DERRIEN, M.; BELZER, C.; DE VOS, W. M. *Akkermansia muciniphila* and its role in regulating host functions. **Microbial Pathogenesis**, 106, 171-181, 2017.

DERRIEN, M.; VAUGHAN, E. E.; PLUGGE, C. M.; DE VOS, W. M. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 54(5), 1469-1476, 2004.

DIAZ-CHAMORRO, S.; GARRIDO-JIMENEZ, S.; BARRERA-LOPEZ, J. F.; MATEOS-QUIROS, C. M.; CUMPLIDO-LASO, G.; LORENZO, M. J.; CENTENO, F. p38 $\delta$  Regulates IL6 Expression Modulating ERK Phosphorylation in Preadipocytes. **Frontiers in cell and developmental biology**, 9, 2021.

DINAN, T. G.; QUIGLEY, E. M. Probiotics in the Treatment of Depression: Science or Science Fiction?. **Australian and New Zealand Journal of Psychiatry**, 45, (12), 1023–1025, 2011.

DOS SANTOS PEREIRA, A. P.; MENDONÇA, R. B.; FONSECA, F. L. A.; MALLOZI, M. C.; SARNI, R. O. S. Vitamin D deficiency in children and adolescents with food allergy: Association with number of allergens, sun exposure and nutritional status. **Allergologia et Immunopathologia**, 50(6), 10-16, 2022.

DOURADO, L. P. A.; DA SILVA SALDANHA, J. C.; GARGIULO, D. L.; NOVIELLO, M. D. L. M.; BRANT, C. C.; REIS, M. L. C.; SOUZA, R. M. F.; FARIA, A. M. C.; SOUZA, D. G.; CARA, D. C. Role of IL-4 in aversion induced by food allergy in mice. **Cellular Immunology**, 262(1), 62-68, 2010.

DOURADO, L. P. A.; NOVIELLO, M. D. L. M.; ALVARENGA, D. M.; MENEZES, Z.; PEREZ, D. A.; BATISTA, N. V.; MENEZES, G. B.; FERREIRA, A. V. M.; SOUZA, D. G.; CARA, D. C. Experimental food allergy leads to adipose tissue inflammation, systemic metabolic alterations and weight loss in mice. **Cellular Immunology**, 270(2), 198-206, 2011.

DUAN, C.; MA, L.; YU, J.; SUN, Y.; LIU, L.; MA, F.; LI, D. Oral administration of *Lactobacillus plantarum* JC7 alleviates OVA-induced murine food allergy through immunoregulation and restoring disordered intestinal microbiota. **European Journal of Nutrition**, 1-14, 2022.

DUDÍK, B.; KIŇOVÁ SEPOVÁ, H.; GREIFOVÁ, G.; BILKA, F.; BÍLKOVÁ A. Next generation probiotics: an overview of the most promising candidates. **Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie: Casopis Spolecnosti pro Epidemiologii a Mikrobiologii Ceske Lekarske Spolecnosti J.E. Purkyne**, 71(1):48-56, 2022.

ELLIOTT, E. N.; KAESTNER, K. H. Epigenetic regulation of the intestinal epithelium. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 72(21), 4139-4156, 2015.

FAO/WHO Working Group. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. **London: World Health Organization, ON, Canada: Food and Agriculture Organization**, 2002.

FARIA, A. M. C.; GOMES-SANTOS, A. C.; GONÇALVES, J. L.; MOREIRA, T. G.; MEDEIROS, S. R.; DOURADO, L. P.; CARA, D. C. Food components and the immune system: from tonic agents to allergens. **Frontiers in Immunology**, 4, 102, 2013.

FERRARIS, R. P.; VILLENAS, S. A.; DIAMOND, J. A. R. E. D. Regulation of brush-border enzyme activities and enterocyte migration rates in mouse small intestine. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, 262(6), G1047-G1059, 1992.

FILIPP, D.; BRABEC, T.; VOBOŘIL, M.; DOBEŠ, J. Enteric  $\alpha$ -defensins on the verge of intestinal immune tolerance and inflammation. **Seminars in Cell and Developmental Biology**. 1-9, 2018.

FISCHER, D.; LEEK, T.; ELLIS, A.; KIM, H. Anaphylaxis. **Allergy Asthma and Clinical Immunology**. 14, 54, 2018.

FONSECA, J. F. **Efeito de *Bifidobacterium longum* 5<sup>1A</sup> e *Weissella paramesenteroides* WPK4 em giardiose experimental**. Biblioteca Digital UFMG. 2015. Disponível em: <[http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/BUBD-9WEVXW/disserta\\_\\_o\\_\\_joice\\_fonseca.pdf?sequence=1](http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/BUBD-9WEVXW/disserta__o__joice_fonseca.pdf?sequence=1)>. Acesso em: 05 de janeiro de 2018.

FONSECA, V. M.; MILANI, T. M.; PRADO, R.; BONATO, V. L.; RAMOS, S. G.; MARTINS, F. S.; BORGES, M. D. C. Oral administration of *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 prevents allergic asthma in mice. **Respirology**, 22(5), 905-912, 2017.

FU, L.; PENG, J.; ZHAO, S.; ZHANG, Y.; SU, X.; WANG, Y. Lactic acid bacteria-specific induction of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T cells ameliorates shrimp tropomyosin-induced allergic response in mice via suppression of mTOR signaling. **Scientific reports**, 7(1), 1987, 2017.

FU, L.; XIE, M.; WANG, C.; QIAN, Y.; HUANG, J.; SUN, Z.; ZHANG, H.; WANG, Y. *Lactobacillus Casei* Zhang Alleviates Shrimp Tropomyosin-Induced Food Allergy by Switching Antibody Isotypes through the NF- $\kappa$ B-Dependent Immune Tolerance. **Molecular Nutrition and Food Research**, 64(10), 1900496, 2020.

GEERLINGS, S.; KOSTOPOULOS, I.; DE VOS, W.; BELZER, C. *Akkermansia muciniphila* in the Human Gastrointestinal Tract: When, Where, and How?. **Microorganisms**, 6(3), 75, 2018.

GEHART, H.; CLEVERS, H. Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, 1, 2018.

GENEROSO, S.; VIANA, M.; SANTOS, R.; MARTINS, F.; MACHADO, J.; ARANTES, R.; NICOLI, J.; CORREIA, M.; CARDOSO, V. N. *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 protects against bacterial translocation, preserves gut barrier integrity and stimulates the immune system in a murine intestinal obstruction model. **Archives of Microbiology**, 192(6), 477-484, 2010.

GEREMIA, A.; ARANCIBIA-CÁRCAMO, C. V. Innate lymphoid cells in intestinal inflammation. **Frontiers in Immunology**, 8, 1296, 2017.

GLOBAL MARKET INSIGHTS INC. **Probiotics Market Size to Exceed USD 64 Billion by 2023: Global Market Insights Inc.** 2016. Disponível em: <<https://www.prnewswire.com/news-releases/probiotics-market-size-to-exceed-usd-64-billion-by-2023-global-market-insights-inc-578769201.html>>. Acesso em: 22 de maio de 2019.

GUERRA, P. V.; LIMA, L. N.; SOUZA, T. C.; MAZOCHI, V.; PENNA, F. J.; SILVA, A. M.; GUIMARÃES, E. V. Pediatric functional constipation treatment with Bifidobacterium-containing yogurt: a crossover, double-blind, controlled trial. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, 17(34), 3916, 2011.

GUO, X.; LI, S.; ZHANG, J.; WU, F.; LI, X.; WU, D.; LI, P. Genome sequencing of 39 *Akkermansia muciniphila* isolates reveals its population structure, genomic and functional diversity, and global distribution in mammalian gut microbiotas. **BMC Genomics**, 18(1), 800, 2017.

GUSTAFSSON, J. K.; JOHANSSON, M. E. The role of goblet cells and mucus in intestinal homeostasis. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, 1-19, 2022.

HALM, D. R.; HALM, S. T. Secretagogue response of goblet cells and columnar cells in human colonic crypts. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, 278(1), C212-C233, 2000.

HARTMANN, C.; THÜRING, E. M.; GREUNE, L.; MICHELS, B. E.; PAJONCZYK, D.; LEUSSINK, S.; EBNET, K. Intestinal brush border formation requires a TMIGD1-

based intermicrovillar adhesion complex. **Science Signaling**, 15 (751), eabm2449, 2022.

HENDEL, S. K.; KELLERMANN, L.; HAUSMANN, A.; BINDSLEV, N.; JENSEN, K. B.; NIELSEN, O. H. Tuft cells and their role in intestinal diseases. **Frontiers in Immunology**, 13, 2022.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R.; FLINT, H.; SALMINEN, S.; CALDER, P.; SANDERS, M. 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 and Hepatology**, 11(8), 506–514, 2014.

HOGAN, S. P. Functional role of eosinophils in gastrointestinal inflammation. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, 29(1), 129-140, 2009.

HOLDMAN, L. V.; CATO, E. P.; MOORE, W. E. C. Anaerobe Laboratory Manual. The Virginia Polytechnic Institute and State. **University Anaerobe Laboratory**, 156, 1977.

HOLLY, M. K.; SMITH, J. G. Paneth cells during viral infection and pathogenesis. **Viruses**, 10(5), 225, 2018.

HOU, K.; WU, Z. X.; CHEN, X. Y.; WANG, J. Q.; ZHANG, D.; XIAO, C.; CHEN, Z. S. Microbiota in health and diseases. **Signal transduction and targeted therapy**, 7(1), 1-28, 2022.

HOUGEE, S.; VRIESEMA, A. J. M.; WIJERING, S. C.; KNIPPELS, L. M. J.; FOLKERTS, G.; NIJKAMP, F. P.; KNOL, J.; GARSSSEN, J. Oral treatment with probiotics reduces allergic symptoms in ovalbumin-sensitized mice: a bacterial strain comparative study. **International archives of allergy and immunology**, 151(2), 107-117, 2010.

HU, C. A. A.; HOU, Y.; YI, D.; QIU, Y.; WU, G.; KONG, X.; YIN, Y. Autophagy and tight junction proteins in the intestine and intestinal diseases. **Animal Nutrition**, 1(3), 123-127, 2015.

IPCI, K.; ALTINTOPRAK, N.; MULUK, N. B.; SENTURK, M.; CINGI, C. The possible mechanisms of the human microbiome in allergic diseases. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, 274(2), 617-626, 2017.

JONES, A. L.; CURRAN-EVERETT, D.; LEUNG, D. Y. Food allergy is associated with *Staphylococcus aureus* colonization in children with atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 137(4), 1247-1248, 2016.

JÖNSSON, F.; MANCARDI, D. A.; KITA, Y.; KARASUYAMA, H.; IANNASCOLI, B.; VAN ROOIJEN, N.; BRUHNS, P. Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis. **The Journal of Clinical Investigation**, 121(4), 1484-1496, 2011.

JUNG, C.; HUGOT, J. P.; BARREAU, F. Peyer's patches: the immune sensors of the intestine. **International Journal of Inflammation**, 2010.

JUNTTILA, I. S. Tuning the cytokine responses: an update on interleukin (IL)-4 and IL-13 receptor complexes. **Frontiers in immunology**, 9, 888, 2018.

KABATA, H.; MOTOMURA, Y.; KINIWA, T.; KOBAYASHI, T.; MORO, K. ILCs and Allergy. In **Innate Lymphoid Cells** (pp. 75-95). Singapore: Springer Nature Singapore, 2022.

KAPINGIDZA, A. B.; KOWAL, K.; CHRUSZCZ, M. Antigen-Antibody Complexes. **Sub-cellular biochemistry**, 94, 465–497, 2020.

KARA, M.; BESER, O. F.; KONUKOGLU, D. İ. L. D. A. R.; COKUGRAS, H. A. L. U. K.; ERKAN, T. Ü. L. A. Y.; KUTLU, T.; COKUGRAS, F. C. The utility of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10 in the diagnosis and/or follow-up food allergy. **Allergologia et Immunopathologia**, 48(1), 48-55, 2020.

KELLY, B. T.; GRAYSON, M. H. Immunoglobulin E, what is it good for?. **Annals of allergy, asthma and immunology: official publication of the American College of Allergy, Asthma, and Immunology**, 116(3), 183–187, 2016.

KHO, Z. Y.; LAL, S. K. The Human Gut Microbiome—A Potential Controller of Wellness and Disease. **Frontiers in Microbiology**, 9, 2018.

KIM, H.; KWACK, K.; KIM, D.; JI, G. E. Oral probiotic bacterial administration suppressed allergic responses in an ovalbumin-induced allergy mouse model. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 45(2), 259–267, 2005.

KIM, J. Y.; CHOI, Y. O.; JI, G. E. Effect of oral probiotics (*Bifidobacterium lactis* AD011 and *Lactobacillus acidophilus* AD031) administration on ovalbumin-induced food allergy mouse model. **J Microbiol Biotechnol**, 18(8), 1393-1400, 2008.

KIM, S. Y.; LEE, J. O.; KIM, Y. J.; JANG, Y. N.; LEE, J. M.; PARK, A. Y.; KIM, B. J. Effects of Oral Administration of *Lactiplantibacillus Plantarum* APsulloc 331261



(GTB1TM) Isolated from Green Tea on Atopic Dermatitis (AD)-like Skin Lesion Mouse Models. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2022.

KIMURA, M.; ITO, Y.; SHIMOMURA, M.; YONEDA, K.; NAITO, C.; ADACHI, Y.; MEGURO, T. Neutrophilia and hyperamylasemia in patients with immediate food allergy. **Pediatrics International**, 61(1), 23-30, 2019.

KIMURA, S. Molecular insights into the mechanisms of M-cell differentiation and transcytosis in the mucosa-associated lymphoid tissues. **Anatomical Science International**, 1-12, 2018.

KNOOP, K. A.; NEWBERRY, R. D. Goblet cells: multifaceted players in immunity at mucosal surfaces. **Mucosal Immunology**, 1, 2018.

KOSTARA, M.; GIAPROS, V.; SERBIS, A.; SIOMOU, E.; CHOLEVAS, V.; RALLIS, D.; TSABOURI, S. Food allergy in children is associated with Vitamin D deficiency: a case-control study. **Acta Paediatrica** 111(3):644-645, 2021.

LACY, P.; LATIF, D. A.; STEWARD, M.; MUSAT-MARCU, S.; MAN, S. P.; MOQBEL, R. Divergence of mechanisms regulating respiratory burst in blood and sputum eosinophils and neutrophils from atopic subjects. **The Journal of Immunology**, 170(5), 2670-2679, 2003.

LAM, Y. F.; TONG, K. K.; KWAN, K. M.; TSUNNEYAMA, K.; SHU, S. A.; LEUNG, P. S.; CHU, K. H. Gastrointestinal immune response to the shrimp allergen tropomyosin: histological and immunological analysis in an animal model of shrimp tropomyosin hypersensitivity. **International archives of allergy and immunology**, 167(1), 29-40, 2015.

LEAHY, S. C.; HIGGINS, D. G.; FITZGERALD, G. F.; VAN SINDEREN, D. Getting better with bifidobacteria. **Journal of Applied Microbiology**, 98(6), 1303-1315, 2005.

LEE, J. Y.; TSOLIS, R. M.; BÄUMLER, A. J. The microbiome and gut homeostasis. **Science**, 377(6601), eabp9960, 2022.

LEE, J.; BANG, J.; WOO, H. J. Effect of orally administered *Lactobacillus brevis* HY7401 in a food allergy mouse model. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 23(11), 1636–1640, 2013.

LEE, K. H.; SONG, Y.; WU, W.; YU, K.; ZHANG, G. The gut microbiota, environmental factors, and links to the development of food allergy. **Clinical and Molecular Allergy**, 18, 1-11, 2020.

LEVY, M.; KOLODZIEJCZYK, A. A.; THAISS, C. A.; ELINAV, E. Dysbiosis and the immune system. **Nature Reviews Immunology**, 17(4), 219-232, 2017.

LING, Z.; LI, Z.; LIU, X.; CHENG, Y.; LUO, Y.; TONG, X.; YUAN, L.; WANG, Y.; SUN, J.; LI, L.; XIANG, C. Altered fecal microbiota composition associated with food allergy in infants. **Applied and environmental microbiology**, 80(8), 2546-2554, 2014.

LIONG, M. T. Safety of probiotics: translocation and infection. **Nutrition Reviews**, 66(4), 192-202, 2008.

LIU, M. Y.; YANG, Z. Y.; DAI, W. K.; HUANG, J. Q.; LI, Y. H.; ZHANG, J.; QIU, C. Z.; WEI, C.; ZHOU, Q.; SUN, X.; FENG, X.; LI, D. F.; WANG, H. P.; ZHENG, Y. J. Protective effect of *Bifidobacterium infantis* CGMCC313-2 on ovalbumin-induced airway asthma and  $\beta$ -lactoglobulin-induced intestinal food allergy mouse models. **World journal of gastroenterology**, 23(12), 2149, 2017.

LIVINGSTON, S. J.; KOMINOS, S. D.; YEE, R. B. New medium for selection and presumptive identification of the *Bacteroides fragilis* group. **Journal of Clinical Microbiology**, 7(5), 448-453, 1978.

LÓPEZ, P.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, I.; GUEIMONDE, M.; MARGOLLES, A.; SUÁREZ, A. Immune response to *Bifidobacterium bifidum* strains support Treg/Th17 plasticity. **Plos One**, 6(9), e24776, 2011.

LOZANO-OJALVO, D.; BERIN, C.; TORDESILLAS, L. Immune basis of food allergic reactions. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, 1, 2018.

LU, W.; QIAN, L.; FANG, Z.; WANG, H.; ZHU, J.; LEE, Y. K.; CHEN, W. Probiotic strains alleviated OVA-induced food allergy in mice by regulating the gut microbiota and improving the level of indoleacrylic acid in fecal samples. **Food and Function**, 13(6), 3704-3719, 2022.

MAJUMDER, K.; JIN, Y.; SHIBATA, H.; MINE, Y. Oral intervention of *Lactobacillus pentosus* S-PT84 attenuates the allergenic responses in a BALB/c mouse model of egg allergy. **Molecular Immunology**, 120, 43-51, 2020.

MARCIAL-COBA, M. S.; CIEPLAK, T.; CAHÚ, T. B.; BLENNOW, A.; KNØCHEL, S.; NIELSEN, D. S. Viability of microencapsulated *Akkermansia muciniphila* and *Lactobacillus plantarum* during freeze-drying, storage and in vitro simulated upper gastrointestinal tract passage. **Food and Function**, 9(11), 5868-5879, 2018.

MARCOBAL, A.; BARBOZA, M.; FROEHLICH, J. W.; BLOCK, D. E.; GERMAN, J. B.; LEBRILLA, C. B.; MILLS, D. A. Consumption of human milk oligosaccharides by gut-related microbes. **Journal of agricultural and food chemistry**, 58(9), 5334-5340, 2010.

MARTINS, F. S.; VIEIRA, A. T.; ELIAN, S. D.; ARANTES, R. M.; TIAGO, F. C.; SOUSA, L. P.; ARAÚJO, H. R.; PIMENTA, P. F.; BONJARDIM, C. C.; NICOLI, J. R.; TEIXEIRA, M. M. Inhibition of tissue inflammation and bacterial translocation as one of the protective mechanisms of *Saccharomyces boulardii* against *Salmonella* infection in mice. **Microbes and Infection**, 15(4), 270-279, 2013.

MARTINS, F.; ELIAN, S.; VIEIRA, A.; TIAGO, F.; MARTINS, A.; SILVA, F.; SOUZA, E.; SOUSA, L.; ARAÚJO, H.; PIMENTA, P.; BONJARDIM, C.; ARANTES, R.; TEIXEIRA, M.; NICOLI, J. Oral treatment with *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 modulates immune responses and interferes with signal pathways involved in the activation of inflammation in a murine model of typhoid fever. **International Journal of Medical Microbiology**, 301(4), 359-364, 2011.

MATHIAS, A.; PAIS, B.; FAVRE, L.; BENYACOU, J.; CORTHÉSY, B. Role of secretory IgA in the mucosal sensing of commensal bacteria. **Gut Microbes**, 5(6), 688-695, 2014.

MATSUI, T.; TANAKA, K.; YAMASHITA, H.; SANEYASU, K. I.; TANAKA, H.; TAKASATO, Y.; ITO, K. Food allergy is linked to season of birth, sun exposure, and vitamin D deficiency. **Allergology International**, 68(2), 172-177, 2019.

MCCARVILLE, J. L.; DONG, J.; CAMINERO, A.; BERMUDEZ-BRITO, M.; JURY, J.; MURRAY, J. A.; LANGELLA, P. A commensal *Bifidobacterium longum* strain improves gluten-related immunopathology in mice through expression of a serine protease inhibitor. **Applied and Environmental Microbiology**, AEM-01323, 2017.

MCCONNELL, R. E.; HIGGINBOTHAM, J. N.; SHIFRIN, D. A.; TABB, D. L.; COFFEY, R. J.; TYSKA, M. J. The enterocyte microvillus is a vesicle-generating organelle. **The Journal of Cell Biology**, 185(7), 1285-1298, 2009.

MENDES, E.; ACETTURI, B. G.; THOMAS, A. M.; MARTINS, F. D. S.; CRISMA, A. R.; MURATA, G.; RIBEIRO, W. R. Prophylactic supplementation of *Bifidobacterium longum* 51A protects mice from ovariectomy-induced exacerbated allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness. **Frontiers in Microbiology**, 8, 1732, 2017.

MEULENBROEK, L. A.; DE JONG, R. J.; DEN HARTOG JAGER, C. F.; MONSUUR, H. N.; WOUTERS, D.; NAUTA, A. J.; KNIPPELS, L. M.; VAN NEERVEN, R. J.; RUITER, B.; LEUSEN, J. H.; HACK, C. E. IgG antibodies in food allergy influence

allergen–antibody complex formation and binding to B cells: a role for complement receptors. **The Journal of Immunology**, 191(7), 3526-3533, 2013.

MILANI, C.; TURRONI, F.; DURANTI, S.; LUGLI, G. A.; MANCABELLI, L.; FERRARIO, C.; VENTURA, M. Genomics of the genus *Bifidobacterium* reveals species-specific adaptation to the glycan-rich gut environment. **Applied and Environmental Microbiology**, 82(4), 980-991, 2016.

MILANI, T.; SANDY, C. M.; CALAZANS, A. P. C. T.; SILVA, R. Q.; FONSECA, V.; MARTINS, F. S.; BORGES, M. C. Dose–Response Effect of *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 on the Prevention of Asthma in an Animal Model. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 1-9, 2022.

MIRANDA, V. C.; SANTOS, S. S.; ASSIS, H. C.; FARIA, A. M. C.; QUINTANILHA, M. F.; MORÃO, R. P.; NICOLI, J. R.; CARA, D. C.; MARTINS, F. S. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 in a murine model of food allergy. **Beneficial Microbes**, 11(3), 255-268, 2020.

MIYAJIMA, I.; DOMBROWICZ, D.; MARTIN, T. R.; RAVETCH, J. V.; KINET, J. P.; GALLI, S. J. Systemic anaphylaxis in the mouse can be mediated largely through IgG1 and Fc gammaRIII. Assessment of the cardiopulmonary changes, mast cell degranulation, and death associated with active or IgE- or IgG1-dependent passive anaphylaxis. **The Journal of clinical investigation**, 99(5), 901-914, 1997.

MORITA, H.; MORO, K.; KOYASU, S. Innate lymphoid cells in allergic and nonallergic inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 138(5), 1253-1264, 2016.

MOWAT, A. M.; AGACE, W. W. Regional specialization within the intestinal immune system. **Nature Reviews Immunology**, 14(10), 667, 2014.

MUNOZ-CANO, R.; PICADO, C.; VALERO, A.; BARTRA, J. Mechanisms of Anaphylaxis Beyond IgE. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, 26(2), 73-82, 2016.

NAITO, Y.; UCHIYAMA, K.; TAKAGI, T. A next-generation beneficial microbe: *Akkermansia muciniphila*. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, 18-57, 2018.

NAKAYAMA, J.; KOBAYASHI, T.; TANAKA, S.; KORENORI, Y.; TATEYAMA, A.; SAKAMOTO, N.; SONOMOTO, K. Aberrant structures of fecal bacterial community in allergic infants profiled by 16S rRNA gene pyrosequencing. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, 63(3), 397-406, 2011.

NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the NI-AID-sponsored expert panel. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 126(6), S1-S58, 2010.

NAUSEEF, W. M. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. **Immunological Reviews**, 219(1), 88-102, 2007.

NAWAZ, M.; MA, C.; BASRA, M. A. R.; WANG, J.; XU, J. Amelioration of ovalbumin induced allergic symptoms in BALB/c mice by potentially probiotic strains of lactobacilli. **Beneficial Microbes**, 6(5), 669-678, 2015.

NEDELKOPOULOU, N.; DHAWAN, A.; XINIAS, I.; GIDARIS, D.; FARMAKI, E. Interleukin 10: the critical role of a pleiotropic cytokine in food allergy. **Allergologia et Immunopathologia**, 48(4), 401-408, 2020.

NEVES, J. S.; WELLER, P. F. Functional extracellular eosinophil granules: novel implications in eosinophil immunobiology. **Current opinion in immunology**, 21(6), 694-699, 2009.

NIEWIEM, M.; GRZYBOWSKA-CHLEBOWCZYK, U. Intestinal Barrier Permeability in Allergic Diseases. **Nutrients**, 14(9), 1893, 2022.

NOWAK-WĘGRZYN, A.; KATZ, Y.; MEHR, S. S.; KOLETZKO, S. Non-IgE-mediated gastrointestinal food allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 135(5), 1114-1124, 2015.

NOWAK-WĘGRZYN, A.; SZAJEWSKA, H.; LACK, G. Food allergy and the gut. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, 14(4), 241, 2017.

NUNES, M. P. O.; VAN TILBURG, M. F.; TRAMONTINA FLOREAN, E. O. P.; GUEDES, M. I. F. Detection of serum and salivary IgE and IgG1 immunoglobulins specific for diagnosis of food allergy. **PloS one**, 14(4), e0214745, 2019.

O'TOOLE, P. W.; MARCHESI, J. R.; HILL, C. Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics. **Nature Microbiology**, 2(5), 17057, 2017.

OKADA, H.; KUHN, C.; FEILLET, H.; BACH, J. F. The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. **Clinical and Experimental Immunology**, 160(1), 1-9, 2010.

OTTMAN, N.; GEERLINGS, S. Y.; AALVINK, S.; DE VOS, W. M.; BELZER, C. Action and function of *Akkermansia muciniphila* in microbiome ecology, health and disease. **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology**. 6(31), 637-342, 2017.

OTTMAN, N.; REUNANEN, J.; MEIJERINK, M.; PIETILÄ, T. E.; KAINULAINEN, V.; KLIEVINK, J.; HUUSKONEN, L.; AALVINK, S.; SKKURNIK, M.; BOEREN, S.; SATOKARI, R.; MERCENIER, A.; PALVA, A.; SMIDT, H.; DEVOS, W.; BELZER, C. Pili-like proteins of *Akkermansia muciniphila* modulate host immune responses and gut barrier function. **PloS one**, 12(3), e0173004, 2017.

PEDRET, A.; VALLS, R. M.; CALDERÓN-PÉREZ, L.; LLAURADÓ, E.; COMPANYS, J.; PLA-PAGÀ, L.; CAIMARI, A. Effects of daily consumption of the probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis CECT 8145 on anthropometric adiposity biomarkers in abdominally obese subjects: a randomized controlled trial. **International Journal of Obesity**, 1, 2018.

PEDROSO, S. H.; VIEIRA, A. T.; BASTOS, R. W.; OLIVEIRA, J. S.; CARTELLE, C. T.; ARANTES, R. M.; NICOLI, J. R. Evaluation of mucositis induced by irinotecan after microbial colonization in germ-free mice. **Microbiology**, 161(10), 1950-1960, 2015.

PETERS, R. L.; MAVOA, S.; KOPLIN, J. J. An Overview of Environmental Risk Factors for Food Allergy. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 19(2), 722, 2022.

PETRI, B.; SANZ, M. J. Neutrophil chemotaxis. **Cell and tissue research**, 371(3), 425-436, 2018.

PLOVIER, H.; EVERARD, A.; DRUART, C.; DEPOMMIER, C.; VAN HUL, M.; GEURTS, L.; CHILLOUX, J.; OTTMAN, N.; DUPARC, T.; LICHTENSTEIN, L.; MYRIDAKIS, A.; DELZENNE, N.; KLIEVINK, J.; BHATTACHARJEE, A.; VAN DER ARK, K.; AALVINK, S.; MARTINEZ, L.; DUMAS, M. E.; MAITER, D.; LOUMAYE, A.; HERMANS, M.; THISSEN, J. P.; BELZER, C.; DE VOS, Willem; CANI, P. A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. **Nature medicine**, 23(1), 107, 2017.

POTACZEK, D. P.; HARB, H.; MICHEL, S.; ALHAMWE, B. A.; RENZ, H.; TOST, J. Epigenetics and allergy: from basic mechanisms to clinical applications. **Epigenomics**, 9(4), 539-571, 2017.

QUINTANILHA, M. F.; MIRANDA, V. C.; SOUZA, R. O.; GALLOTTI, B.; CRUZ, C.; SANTOS, E. A.; MARTINS, F. S. *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 5<sup>1A</sup>

attenuates intestinal injury against irinotecan-induced mucositis in mice. **Life Sciences**, 289, 120243, 2022.

RAMIREZ, G. A.; YACOUB, M. R.; RIPA, M.; MANNINA, D.; CARIDDI, A.; SAPORITI, N.; DAGNA, L. Eosinophils from Physiology to Disease: A Comprehensive Review. **BioMed Research International**, 2018.

RAMSEY, N.; BERIN, M. C. Pathogenesis of IgE-mediated food allergy and implications for future immunotherapeutics. **Pediatric Allergy and Immunology**, 32(7), 1416-1425, 2021.

RAVIN, K. A.; LOY, M. The eosinophil in infection. **Clinical reviews in allergy and immunology**, 50(2), 214-227, 2016.

REEVES, P.; NIELSEN, F.; FAHEY, G. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, 123(11), 1939-1951, 1993.

REID, G.; GADIR, A. A.; DHIR, R. Probiotics: Reiterating What They Are and What They Are Not. **Frontiers in Microbiology**, 10, 1–6, 2019.

REN, Z.; HONG, Y.; HUO, Y.; PENG, L.; LV, H.; CHEN, J.; WAN, C. Prospects of Probiotic Adjuvant Drugs in Clinical Treatment. **Nutrients**, 14(22), 4723, 2022.

REZENDE, R. M.; WEINER, H. L. Oral tolerance: an updated review. **Immunology Letters**, 245, 29-37, 2022.

RODRIGUES, V. F.; ELIAS-OLIVEIRA, J.; PEREIRA, Í. S.; PEREIRA, J. A.; BARBOSA, S. C.; MACHADO, M. S. G.; CARLOS, D. *Akkermansia muciniphila* and gut immune system: A good friendship that attenuates inflammatory bowel disease, obesity, and diabetes. **Frontiers in Immunology**, 13, 2022.

ROSALES, C.; DEMAUREX, N.; LOWELL, C. A.; URIBE-QUEROL, E. Neutrophils: their role in innate and adaptive immunity. **Journal of Immunology Research**, 1-2, 2016.

ROSENBERG, H. F. Eosinophils. **Encyclopedia of Immunobiology**, 334–344, 2016.

ROSENBERG, H. F.; DYER, K. D.; FOSTER, P. S. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, 13(1), 9-22, 2013.

ROUCH, J. D.; SCOTT, A.; LEI, N. Y.; SOLORZANO-VARGAS, R. S.; WANG, J.; HANSON, E. M.; ECKMANN, L. Development of functional microfold (M) cells from intestinal stem cells in primary human enteroids. **Plos One**, 11(1), e0148216, 2016.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 42(1), 1–16, 2006.

SAITO, Y.; IWATSUKI, K.; INABA, A.; SATO, M.; TADAISHI, M.; SHIMIZU, M.; KOBAYASHI-HATTORI, K. Interleukin-4 suppresses the proliferation and alters the gene expression in enteroids. **Cytotechnology**, 1-10, 2020.

SALDANHA, J. C. S.; GARGIULO, D. L.; SILVA, S. S.; CARMO-PINTO, F. H.; ANDRADE, M. C.; ALVAREZ-LEITE, J. I.; CARA, D. C. A model of chronic IgE-mediated food allergy in ovalbumin-sensitized mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 37(6), 809-816, 2004.

SALMINEN, S.; COLLADO, M. C.; ENDO, A.; HILL, C.; LEBEER, S.; QUIGLEY, E. M.; SANDERS, M. E.; SHAMIR, R.; SWANN, J. R.; SZAJEWSKA, H.; VINDEROLA, G. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, 18, 649-667, 2021.

SANTOS, S. S.; MIRANDA, V. C.; TRINDADE, L. M.; CARDOSO, V. N.; REIS, D. C.; CASSALI, G. D.; MARTINS, F. S. *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 51A Attenuates Signs of Inflammation in a Murine Model of Food Allergy. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 1-11, 2021.

SAWANT, K. V.; SEPURU, K. M.; LOWRY, E.; PENARANDA, B.; FREVERT, C. W.; GAROFALO, R. P.; RAJARATHNAM, K. Neutrophil recruitment by chemokines Cxcl1/KC and Cxcl2/MIP2: Role of Cxcr2 activation and glycosaminoglycan interactions. **Journal of Leukocyte Biology**, 2020.

SCHIAVI, E., BARLETTA, B., BUTTERONI, C., CORINTI, S., BOIRIVANT, M., DI FELICE, G. Oral therapeutic administration of a probiotic mixture suppresses established Th2 responses and systemic anaphylaxis in a murine model of food allergy. **Allergy**, 66(4), 499-508, 2011.

SHARMA, G.; IM, S. H. Probiotics as a Potential Immunomodulating Pharmabiotics in Allergic Diseases: Current Status and Future Prospects. **Allergy, Asthma and Immunology Research**, 10(6), 575-590, 2018.

SHI, L. H.; BALAKRISHNAN, K.; THIAGARAJAH, K.; MOHD ISMAIL, N. I.; YIN, O. S. Beneficial Properties of Probiotics. **Tropical Life Sciences Research**, 27(2), 73-90, 2016.



SHIN, H. S.; EOM, J. E.; SHIN, D. U.; YEON, S. H.; LIM, S. I.; LEE, S. Y. Preventive effects of a probiotic mixture in an ovalbumin-induced food allergy model. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 28, 65-76, 2018.

SILVA, A. K. S.; SILVA, T. R. N.; NICOLI, J. R.; VASQUEZ-PINTO, L. M. C.; MARTINS, F. S. In vitro evaluation of antagonism, modulation of cytokines and extracellular matrix proteins by *Bifidobacterium* strains. **Letters in Applied Microbiology**, 67(5), 497-505, 2018.

SONG, J.; LI, Y.; LI, J.; WANG, H.; ZHANG, Y.; SUO, H. *Lactobacillus rhamnosus* 2016SWU. 05.0601 regulates immune balance in ovalbumin-sensitized mice by modulating the immune-related transcription factors expression and gut microbiota. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2020.

SOUZA, D.; CARA, D.; CASSALI, G.; COUTINHO, S.; SILVEIRA, M.; ANDRADE, S.; POOLE, S.; TEIXEIRA, M. Effects of the PAF receptor antagonist UK74505 on local and remote reperfusion injuries following ischaemia of the superior mesenteric artery in the rat. **British Journal of Pharmacology**, 131(8), 1800-1808, 2000.

SOUZA, T. C.; SILVA, A. M.; DREWS, J. R. P.; GOMES, D. A.; VINDEROLA, C. G.; NICOLI, J. R. In vitro evaluation of *Bifidobacterium* strains of human origin for potential use in probiotic functional foods. **Beneficial Microbes**, 4(2), 179-186, 2013.

SOUZA, T. C.; ZACARIAS, M. F.; SILVA, A. M.; BINETTI, A.; REINHEIMER, J.; NICOLI, J. R.; VINDEROLA, G. Cell viability and immunostimulating and protective capacities of *Bifidobacterium longum* 51A are differentially affected by technological variables in fermented milks. **Journal of Applied Microbiology**, 112(6), 1184-1192, 2012.

SPENCER, L. A.; WELLER, P. F. Eosinophils and Th2 immunity: contemporary insights. **Immunology and cell biology**, 88(3), 250-256, 2010.

STARK, K. G.; FALKOWSKI, N. R.; BROWN, C. A.; MCDONALD, R. A.; HUFFNAGLE, G. B. Contribution of the microbiome, environment, and genetics to mucosal Type 2 immunity and anaphylaxis in a murine food allergy model. **Frontiers in Allergy**, 3, 2022.

STEELE, S. P.; MELCHOR, S. J.; PETRI JR, W. A. Tuft Cells: New Players in Colitis. **Trends in Molecular Medicine**, 22(11), 921-924, 2016.

STRACHAN, D. P. Hay fever, hygiene, and household size. **British Medical Journal**, 299(6710), 1259, 1989.

STRATH, M.; WARREN, D. J.; SANDERSON, C. J. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. **Journal of Immunological Methods**, 83(2), 209-215, 1985.

STRZEPA, A.; PRITCHARD, K. A.; DITTEL, B. N. Myeloperoxidase: A new player in autoimmunity. **Cellular immunology**, 317, 1-8, 2017.

TAN, J.; MCKENZIE, C.; VUILLERMIN, P. J.; GOVERSE, G.; VINUESA, C. G.; MEBIUS, R. E.; MACKAY, C. R. Dietary fiber and bacterial SCFA enhance oral tolerance and protect against food allergy through diverse cellular pathways. **Cell Reports**, 15(12), 2809-2824, 2016.

TANG, M.; MEI, J.; SUN, M.; MA, K.; ZHAO, A.; FU, X. An optimized method to visualize the goblet cell-associated antigen passages and identify goblet cells in the intestine, conjunctiva, and airway. **Immunobiology**, 227(6), 152260, 2022.

TAP, J.; MONDOT, S.; LEVENEZ, F.; PELLETIER, E.; CARON, C.; FURET, J. P.; DORE, J. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. **Environmental Microbiology**, 11(10), 2574-2584, 2009.

TEDNER, S. G.; ASARNOJ, A.; THULIN, H.; WESTMAN, M.; KONRADSEN, J. R.; NILSSON, C. Food allergy and hypersensitivity reactions in children and adults—A review. **Journal of Internal Medicine**, 291(3), 283-302, 2022.

THAM, E. H.; LEUNG, D. Y. How Different Parts of the World Provide New Insights Into Food Allergy. **Allergy, Asthma and Immunology Research**, 10, 2018.

THOMAS, S.; IZARD, J.; WALSH, E.; BATICH, K.; CHONGSATHIDKIET, P.; CLARKE, G.; GILLIGAN, J. P. The host microbiome regulates and maintains human health: a primer and perspective for non-microbiologists. **Cancer Research**, 77(8), 1783-1812, 2017.

TORDESILLAS, L.; BERIN, M. C. Mechanisms of Oral Tolerance. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, 1-11, 2018.

TRINDADE, L. M.; TORRES, L.; MATOS, I. D.; MIRANDA, V. C.; DE JESUS, L. C. L.; CAVALCANTE, G.; DE VASCONCELOS GENEROSO, S. Paraprobiotic *Lactocaseibacillus rhamnosus* protects intestinal damage in an experimental murine model of mucositis. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 1-13, 2021.

TROMPETTE, A.; GOLLWITZER, E. S.; YADAVA, K.; SICHELSTIEL, A. K.; SPRENGER, N.; NGOM-BRU, C.; MARSLAND, B. J. Gut microbiota metabolism of

dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. **Nature Medicine**, 20(2), 159, 2014.

TSILOCHRISTOU, O.; DU TOIT, G.; SAYRE, P. H.; ROBERTS, G.; LAWSON, K.; SEVER, M. L.; BAHNSON, H. T.; RADULOVIC, S.; BASTING, M.; PLAUT, M.; LACK, G. Association of *Staphylococcus aureus* colonization with food allergy occurs independently of eczema severity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 144(2), 494-503, 2019.

TULYEU, J.; KUMAGAI, H.; JIMBO, E.; WATANABE, S.; YOKOYAMA, K.; CUI, L.; OSAKA, H.; MIENO, M.; YAMAGATA, T. Probiotics Prevents Sensitization to Oral Antigen and Subsequent Increases in Intestinal Tight Junction Permeability in Juvenile–Young Adult Rats. **Microorganisms**, 7(10), 463, 2019.

TURNBULL, J. L.; ADAMS, H. N.; GORARD, D. A. The diagnosis and management of food allergy and food intolerances. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, 41(1), 3-25, 2015.

TURRONI, F.; PEANO, C.; PASS, D. A.; FORONI, E.; SEVERGNINI, M.; CLAESSION, M. J.; GUEIMONDE, M. Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota. **Plos One**, 7(5), 2012.

VIDARSSON, G.; DEKKERS, G.; RISPENS, T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. **Frontiers in immunology**, 5, 520, 2014.

VIEIRA, A. T.; GALVAO, I.; AMARAL, F. A.; TEIXEIRA, M. M.; NICOLI, J. R.; MARTINS, F. S. Oral treatment with *Bifidobacterium longum* 51A reduced inflammation in a murine experimental model of gout. **Beneficial Microbes**, 6(6), 799-806, 2015.

VIEIRA, A. T.; ROCHA, V. M.; TAVARES, L.; GARCIA, C. C.; TEIXEIRA, M. M.; OLIVEIRA, S. C.; NICOLI, J. R. Control of *Klebsiella pneumoniae* pulmonary infection and immunomodulation by oral treatment with the commensal probiotic *Bifidobacterium longum* 51A. **Microbes and Infection**, 18(3), 180-189, 2016.

VLASOVA, A. N.; KANDASAMY, S.; CHATTHA, K. S.; RAJASHEKARA, G.; SAIF, L. J. Comparison of probiotic lactobacilli and bifidobacteria effects, immune responses and rotavirus vaccines and infection in different host species. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 172, 72-84, 2016.

WANG, X.; HUI, Y.; ZHAO, L.; HAO, Y.; GUO, H.; REN, F. Oral administration of *Lactobacillus paracasei* L9 attenuates PM2. 5-induced enhancement of airway hyperresponsiveness and allergic airway response in murine model of asthma. **PLoS One**, 12(2), e0171721, 2017.

WASERMAN, S.; BÉGIN, P.; WATSON, W. IgE-mediated food allergy. **Allergy, Asthma and Clinical Immunology**, 14(2), 55, 2018.

WENDEL, U. Assessing viability and stress tolerance of probiotics—a review. **Frontiers in Microbiology**, 12, 2021.

YANG, H.; QU, Y.; GAO, Y.; SUN, S.; WU, R.; WU, J. Research Progress on the Correlation between the Intestinal Microbiota and Food Allergy. **Foods**, 11(18), 2913, 2022.

YU, W.; FREELAND, D. M. H.; NADEAU, K. C. Food allergy: immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, 16(12), 751-765, 2016.

ZHANG, S.; SICHERER, S.; BERIN, M. C.; AGYEMANG, A. Pathophysiology of non-IgE-mediated food allergy. **ImmunoTargets and Therapy**, 10, 431, 2021.

ZHAO, Q.; MAYNARD, C. L. Mucus, commensals, and the immune system. **Gut Microbes**, 14(1), 2041342, 2022.

ŻBIKOWSKA-GOTZ, M.; PALGAN, K.; GAWRONSKA-UKLEJA, E.; KUZMINSKI, A.; PRZYBYSZEWSKI, M.; SONCHA, E.; BARTUZI, Z. Expression of IL-17A concentration and effector functions of peripheral blood neutrophils in food allergy hypersensitivity patients. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, 29(1), 90-98, 2016.

**ANEXO A – Certificado da Comissão de ÉTICA no Uso de Animais (CEUA)**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

**Protocolo CEUA:** 110/2019**Título do projeto:** Avaliação do efeito probiótico de *Akkermansia muciniphila* e sua associação com *Bifidobacterium longum* 51A em modelos murinos de doenças alérgicas**Finalidade:** Pesquisa**Pesquisador responsável:** Flaviano dos Santos Martins**Unidade:** Instituto de Ciências Biológicas**Departamento:** Departamento de Microbiologia**Situação atual:** **Decisão Final - Aprovado**Aprovado na reunião do dia 13/05/2019. Validade: 13/05/2019 à 12/05/2024  
Belo Horizonte, 13/05/2019.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG  
[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

Fonte: Comissão de ética no uso de animais (CEUA).