



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112019014418-8 A2



(22) Data do Depósito: 12/01/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 14/04/2020

(54) Título: COMPOSIÇÕES PROBIÓTICAS E USOS DAS MESMAS

(51) Int. Cl.: A61K 35/74; A61P 37/00.

(30) Prioridade Unionista: 12/01/2017 GB 1700542.2; 19/06/2017 GB 1709731.2.

(71) Depositante(es): PROBI AB.

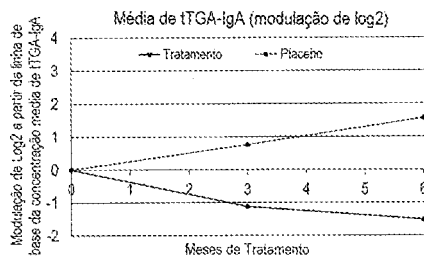
(72) Inventor(es): DANIEL AGARDH; IRINI LAZOU AHRÉN; LARS NIKLAS LARSSON.

(86) Pedido PCT: PCT EP2018050789 de 12/01/2018

(87) Publicação PCT: WO 2018/130667 de 19/07/2018

(85) Data da Fase Nacional: 11/07/2019

(57) Resumo: A presente invenção refere-se a pelo menos uma cepa probiótica de *Lactobacillus* para uso em um indivíduo para a prevenção e/ou o tratamento de autoimunidade de doença celíaca (ADC) ou para uso na prevenção e/ou no tratamento de doença celíaca (DC). Uma composição preferida para uso de acordo com a invenção é uma composição compreendendo uma combinação de *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus plantarum*, especialmente *L. paracasei* 8700:2 (DSM 13434) em combinação com *L. plantarum* HEAL 9 (DSM 15312).



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para:  
**"COMPOSIÇÕES PROBIÓTICAS E USOS DAS MESMAS"**

[0001] A presente invenção refere-se a pelo menos uma cepa probiótica de uma espécie de *Lactobacillus* para uso na prevenção e/ou no tratamento de autoimunidade de doença celíaca (ADC) ou doença celíaca (DC) em um indivíduo.

[0002] A invenção também proporciona composições para tais utilizações e métodos de prevenção e/ou tratamento de ADC e/ou DC envolvendo a administração de uma quantidade eficaz da dita cepa probiótica a um indivíduo.

INTRODUÇÃO

[0003] A doença celíaca (DC) é uma doença crônica mediada pelo sistema imune que afeta a mucosa intestinal do intestino delgado. É causada pela intolerância ao glúten, a principal proteína de armazenamento encontrada no trigo, centeio e cevada (Schuppan D, et al. *Gastroenterology*. 2009; 137 (6): 1912 a 1933). Os sintomas clássicos e os sinais clínicos da doença celíaca incluem desconforto abdominal, distensão e diarreia, seguidos por sinais de desnutrição (por exemplo, perda de peso, anemia e osteoporose). No entanto, uma parcela significativa dos pacientes não apresenta sintomas e é diagnosticada por meio de triagem (Ludvigsson JF, et al. *Journal of Internal Medicine*. 2011; 269 (6): 560 a 671). Atualmente, o tratamento consiste em uma dieta vitalícia livre de glúten (GFD).

[0004] A fisiopatologia da DC não é completamente compreendida, mas propõe-se que seja acionada por células T. Após a digestão das proteínas do glúten no intestino delgado, os peptídeos de gliadina resultantes atravessam de alguma forma a barreira epitelial e são apresentados por células que apresentam antígenos nas estruturas de MHC-II, permitindo a ativação de 1 células de auxiliar T CD4+ específico de gliadina (T<sub>H</sub>) e células T citotóxicas CD8 + (T<sub>C</sub>) na lâmina própria. Isso resulta na regulação positiva de várias citocinas, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-21, em particular, das quais as duas primeiras causam o típico remodelamento da mucosa e atrofia vilosa através da ativação de mielofibroblastos, enquanto a última provavelmente está envolvida na manutenção da atividade das células CD4+ (Schuppan D, *et al.*, *supra*). Na última década, a estimulação direta e concomitante do sistema imunológico inato pelas gliadinas demonstrou ser um fator adicional importante no desenvolvimento da doença. Isso é atualmente atribuído à regulação positiva da sinalização de IL-15 em células dendríticas e macrófagos, causando danos na mucosa através da ativação de linfócitos intraepiteliais (IELs) (Londei M, *et al.*, *Molecular Immunology*. 2005; 42 (8): 913 a 918).

[0005] A prevalência global de DC é estimada em aproximadamente 1%, mas varia muito entre grupos étnicos e localização geográfica. A Suécia está entre as nações mais

afetadas, com uma prevalência estimada de 1,5 a 3% (Ludvigsson JF, et al., *Supra*). Ainda não está totalmente determinado quais processos ajudam a induzir essa reação disfuncional às estruturas da gliadina, e por que a prevalência da doença varia entre as populações. Existe um componente genético claro na DC, como evidenciado pelo fato de que quase todos os pacientes celíacos são portadores dos haplótipos DR3-DQ2 e/ou DR4-DQ8 (Sollid LM, et al. *The Journal of Experimental Medicine*. 1989; 169 (1): 345 a 350). Além disso, também foi constatado que diversos outros genes menos influentes afetam o risco de doença, a maioria deles relacionados com a ativação da resposta imune adaptativa (Hunt KA, et al., *Nature Genetics*. 2008; 40 (4): 395 a 402). A DC compartilha essas características de risco genético com vários outros distúrbios autoimunes, principalmente diabetes tipo 1 (T1D), que compartilha seus principais genes de suscetibilidade nos loci HLA-DQB1 e HLA-DRB1, bem como vários loci não HLA (Smyth DJ, et al., *New England Journal of Medicine*. 2008; 359 (26): 2.767 a 2.777). No entanto, a genética sozinha não pode explicar a DC, uma vez que apenas uma pequena minoria dos portadores desses haplótipos desenvolve a doença. A crescente incidência observada em muitos países durante as últimas décadas também aponta para fatores ambientais que contribuem para a patogênese de alguma forma. Importantes áreas de investigação incluem práticas de

alimentação infantil, alimentação com leite materno, (e variações ou perturbações na microbiota intestinal (De Palma G, et al., Advance: Bifidobacteria and Gram-negative bacteria differentially influence immune responses in the proinflammatory milieu of celiac disease. *Journal of Leukocyte Biology*. 2010; 87 (5): 765 a 778).

[0006] Embora a biópsia intestinal tenha sido considerada o padrão ouro para o diagnóstico de DC, vários marcadores sorológicos foram constatados, dos quais os autoanticorpos transglutaminase teciduais (tTGA) são atualmente os mais comuns na prática clínica devido a sua alta sensibilidade e especificidade de diagnóstico (van der Windt DA, et al., Diagnostic testing for celiac disease among patients with abdominal symptoms: a systematic review. *Jama*. 2010; 303 (17): 1.738 a 1.746). Além disso, as diretrizes revisadas da Sociedade Europeia de Gastreenterologia, Hepatologia, Nutrição Pediátrica (ESPGHAN) em 2012 (Husby S, et al., ESPGHAN guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2012; 54 (1): 136 a 160) sugerem que níveis de tTGA significativamente elevados, se seguidos por testes adicionais apropriados, podem eliminar a necessidade de biópsia para confirmar o diagnóstico. Na maioria dos pacientes com DC, os níveis de tTGA diminuem após a introdução de GFD.

[0007] Em crianças, essa diminuição também é altamente preditiva de melhora histológica na mucosa intestinal (Bannister EG, et al., *American Journal of Gastroenterology*. 2014; 109 (9): 1.478 a 1.483), indicando que o tTGA pode ser utilizado não apenas como uma ferramenta de diagnóstico binária, mas também como um marcador para a atividade da doença e complacência dietética. No entanto, isso traz a questão de como gerenciar pacientes assintomáticos constatados como tendo níveis de tTGA persistentemente elevados, a chamada autoimunidade de DC (ADC), ou mais amplamente referida como potencial DC, se confirmada com características normais da biópsia intestinal. Essas crianças estão em maior risco de desenvolver DC (Liu E, et al., *The New England Journal of Medicine*. 2014; 371 (1): 42 a 49), sem opções de tratamento atualmente disponíveis para reduzir ou eliminar esse risco que não seja um GFD.

#### ANTECEDENTES

[ 0 0 0 8 ] Estudos anteriores mostraram que a microbiota de pacientes com DC ativa é composta por um maior grau de patógenos Gram-negativos em comparação com controles saudáveis e pacientes livres de sintomas (Nadal I, et al., Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease. *Journal of Medical Microbiology*. 2007; 56 (Pt 12): 1.669 a 1.674).

Consequentemente, estudos posteriores sugeriram que tal microbiota potencializa um maior grau de reação inflamatória em resposta às gliadinas (De Palma G, et al., Advance: Bifidobacteria and Gram-negative bacteria differentially influence immune responses in the proinflammatory milieu of celiac disease. *Journal of Leukocyte Biology*. 2010; 87 (5): 765 a 778) e, inversamente, que certas cepas de *Bifidobacterium* influenciam a digestão de gliadinas e reduzem seu potencial imunológico (Laparra JM, et al., Bifidobacteria inhibit the inflammatory response induced by gliadins in intestinal epithelial cells via modifications of toxic peptide generation during digestion. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2010; 109 (4): 801 a 807).

[0009] Alguns estudos publicados recentemente examinaram o efeito da administração de cepas específicas de *Bifidobacterium* no contexto de DC já clinicamente manifestada. Olivares et al. (Olivares M, et al., *The British Journal of Nutrition*. 2014; 112 (1): 30 a 40) 36 crianças recentemente aleatórias diagnosticadas com DC para tratamento com consumo diário ou de *Bifidobacterium longum* CECT 7347 ou placebo por 3 meses, além de GFD. Devido à introdução de GFD, o efeito probiótico nos parâmetros imunológicos é difícil de avaliar; o estudo não examinou os níveis de tTGA, mas encontrou uma diminuição significativa nos níveis totais de células T maduras no grupo de tratamento

em comparação com o placebo. Além disso, mostraram que as crianças no grupo tratado com probióticos alcançaram um maior ganho percentual de altura em comparação com os controles.

[0010] Além disso, Smecuol *et al.* *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2013; 47 (2): 139 a 147) tratou 22 pacientes adultos com DC atualmente não em GFD com *Bifidobacterium infantis* ou placebo diariamente por 3 semanas, e avaliou permeabilidade intestinal, parâmetros imunológicos e mudanças nos sintomas. Os participantes do grupo tratado com probióticos relataram melhora dos sintomas gastrointestinais em comparação aos controles. No entanto, ao contrário de *B. longum* CECT 7347, *B. infantis* (NLS) não conseguiu influenciar os marcadores inflamatórios e a microbiota intestinal e os mecanismos de defesa relacionados ao hospedeiro.

[0011] Embora ambos os estudos acima com cepas específicas de *Bifidobacterium* sugiram algum papel benéfico para essas cepas de *Bifidobacterium* na DC, eles também destacam a necessidade de mais estudos.

[0012] Assim, apesar das investigações significativas de ADC e DC, atualmente, o único tratamento disponível para DC é uma dieta livre de glúten (GFD). Por isso, existe uma necessidade de composições e métodos para prevenir e/ou tratar a autoimunidade da doença celíaca (ADC), ou para prevenir e/ou tratar a doença celíaca (DC).



DECLARAÇÃO DE INVENÇÃO

[0013] De acordo com a invenção, é fornecida pelo menos uma cepa probiótica de uma espécie de *Lactobacillus* para uso em um indivíduo para a prevenção e/ou o tratamento de autoimunidade de doença celíaca (ADC), ou para a prevenção e/ou o tratamento de doença celíaca (DC).

[0014] Por "uso para a prevenção e/ou o tratamento" entende-se um uso que dá origem a um efeito de prevenir, atrasar, reduzir a gravidade e/ou remover um ou mais sintomas e/ou outros marcadores associados com ADC ou DC em um indivíduo.

CEPAS DE LACTOBACILLUS PROBIÓTICOS

[0015] Uma cepa probiótica preferida de uma espécie de *Lactobacillus* é selecionada dentre: *L. paracasei*; *L. plantarum*; *L. acidophilus*; *L. rhamnosus*; *L. casei*; *L. reuteri*; *L. brevis*; *L. crispatus*; *L. bulgaricus*; *L. fermentum*; *L. salivarius*; *L. johnsonii*; e *L. lactis*.

[0016] Preferencialmente, a pelo menos uma cepa probiótica de uma espécie de *Lactobacillus* é de *Lactobacillus paracasei* e/ou *Lactobacillus plantarum*.

DEPÓSITOS DE CEPAS DE LACTOBACILLUS

[0017] Cepas preferidas de *Lactobacilli* para uso de acordo com a presente invenção foram depositadas sob o Tratado de Budapeste pela Probi A.B., Sölvegatan 41, Lund 22370, Suécia, conforme o seguinte:

Espécie	Cepa	Nº de acesso	Data do depósito	Depositante	Depositário
<i>Lactobacillus plantarum</i>	HEAL 9	DSM 15312	27/11/2002	Probi	DSMZ
	HEAL 19	DSM 15313	27/11/2002	Probi	DSMZ
	HEAL 99	DSM 15316	27/11/2002	Probi	DSMZ
	299	DSM 6595	02/07/1991	Probi	DSMZ
	299v	DSM 9843	16/03/1995	Probi	DSMZ
	GOS42	DSM 32131	02/09/2015	Probi	DSMZ
<i>Lactobacillus paracasei</i>	8700:2	DSM 13434	06/04/2000	Probi	DSMZ
	02A	DSM 13432	06/04/2000	Probi	DSMZ
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	271	DSM 6594	02/07/1991	Probi	DSMZ

[0018] Preferencialmente, a cepa de *L. paracasei* é selecionada de um ou mais dentre *L. paracasei* 8700:2 (DSM 13434) *L. paracasei* 02:A (DSM 13432).

[0019] De preferência, a cepa de *L. plantarum* é selecionada de um ou mais dentre *L. plantarum* HEAL 9 (DSM

15312); *L. plantarum* HEAL 19 (DSM 15313); *L. plantarum* HEAL 99 (DSM 15316); *L. plantarum* 299v (DSM 9843); e/ou *L. plantarum* 299 (DSM 6595).

[0020] Vantajosamente, a invenção proporciona uma combinação de pelo menos uma cepa probiótica de *L. paracasei* e pelo menos uma cepa probiótica de *L. plantarum* para uso em um indivíduo para a prevenção e/ou o tratamento de autoimunidade de doença celíaca (ADC), ou para a prevenção e/ou o tratamento de doença celíaca (DC).

[0021] Mais preferencialmente, a combinação é *L. paracasei* 8700:2 (DSM 13434) e *L. plantarum* HEAL 9 (DSM 15312).

[0022] As composições podem compreender a cepa probiótica especificada ou cepas de *Lactobacilli*, mas, preferivelmente, consistem nas cepas especificadas sem outra quantidade eficaz de quaisquer outras cepas probióticas de *Lactobacilli* ou outros micro-organismos.

#### COMPOSIÇÕES E FORMULAÇÕES

[0023] As cepas probióticas da invenção são, preferencialmente, liofilizadas.

[0024] As cepas probióticas da invenção podem ser proporcionadas em conjunto com um carreador, diluente ou excipiente adequados, como uma formulação sólida ou líquida, que pode ser uma formulação farmacêutica em uma modalidade.

[0025] Exemplos de um carreador líquido adequado

incluem água e outros solventes aquosos.

[0026] Exemplos de um carreador sólido adequado incluem maltodextrina, inulina, amido de batata, amido de milho ou outro amido vegetal, celulose microcristalina (MCC) e álcoois de açúcar.

[0027] A composição pode ser uma composição seca fermentada ou não fermentada. No caso de uma composição seca não fermentada, a fermentação ocorre no trato gastrointestinal após a ingestão da composição por um indivíduo.

[0028] Em uso, a cepa probiótica (ou cepas) da invenção pode ser misturada com um carreador líquido ou sólido antes da administração a um indivíduo. Por exemplo, o indivíduo pode misturar a cepa (ou cepas) com um carreador que consiste em água ou algum outro solvente aquoso, ou uma bebida antes da ingestão. Da mesma forma, as cepas probióticas podem ser misturadas com um carreador composto por um ou mais alimentos. Os alimentos preferenciais são produtos sem glúten, tais como produtos lácteos fermentados ou não fermentados, tais como iogurtes, sucos de fruta; bebidas, sopas, alimentos à base de plantas, como produtos de soja, barras de alimentos secas, alimentos para bebês, nutrição infantil, fórmula infantil, substitutos do leite materno desde o nascimento.

[0029] Leite de fórmula infantil ou para bebês é um

carreador particularmente preferencial para o probiótico da cepa (ou cepas) de *Lactobacilli* da invenção. Pode estar em forma de pó seco para misturar com água antes de alimentar os bebês como uma forma líquida pronta para a alimentação. Normalmente é feito de leite de vaca, e contém proteínas de soro de leite e caseína.

[0030] A cepa probiótica (ou cepas) da invenção também pode ser proporcionada em uma composição juntamente com um ou mais ingredientes de suplementos alimentares conhecidos, por exemplo, micronutrientes, tais como vitaminas e minerais.

[0031] Os sintomas clássicos e os sinais clínicos de doença celíaca incluem desconforto abdominal, distensão e diarreia, seguidos por sinais de desnutrição (por exemplo, perda de peso, anemia e osteoporose). Considerando os riscos envolvidos com a desnutrição, foi publicado que as crianças recém-diagnosticadas com doença celíaca eram deficientes em vitamina D, zinco e ferro (Erdem *et al.*, Vitamin and mineral deficiency in children newly diagnosed with celiac disease. *Turk J Med Sci.* 2015;45(4):833 a 836, 2015). Da mesma forma, constatou-se que adultos com doença celíaca recém-diagnosticada e pacientes com DC não tratada também têm valores abaixo dos limites de referência para as vitaminas B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub>, vitamina D, ácido fólico, zinco, magnésio e ferro (Wierdsma *et al.*, Vitamin and mineral deficiencies are highly

prevalent in newly diagnosed celiac disease patients. *Nutrients*. 30 de setembro de 2013; 5 (10): 3.975 a 3.992. doi: 10.3390/nu5103975, Caruso et al., Appropriate nutrient supplementation in celiac disease 2013 *Ann Med*. dezembro de 2013;45(8):522 a 531. doi: 10.3109/07853890.2013.849383. Review, Schøsler et al., Symptoms and findings in adult-onset celiac disease in a historical Danish patient cohort *Scandinavian Journal of Gastroenterology* Vol. 51, ISS. 3.201 a 3.206). Na maioria dos casos, a remoção do glúten da dieta, uma vez que uma pessoa tenha sido diagnosticada com DC ou ADC, restaura a histologia "saudável" do intestino e leva à normalização do estado de vitaminas e minerais. No entanto, a resolução da inflamação da mucosa através da adaptação a uma dieta isenta de glúten nem sempre é suficiente para compensar a deficiência de minerais (caruso et al. 2013 *supra*). Assim, a suplementação de pessoas diagnosticadas com CD/CDA ou em risco de desenvolver CD/CDA com vitaminas e/ou minerais pode ser usada em conjunto com os lactobacilli probióticos de acordo com a invenção. De preferência, a vitamina (ou vitaminas) e/ou o mineral (ou minerais) são selecionados a partir de uma ou mais dentre as vitaminas: A, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, D; e/ou os minerais: ferro, zinco, magnésio.

[0032] Preferencialmente, as composições de cepas probióticas da invenção são proporcionadas na forma de uma cápsula ou comprimido ou um pó para administração oral.

Pacotes compridos (stick packs) são um tipo popular de embalagem de única porção/dose única utilizado na indústria alimentar e no sector farmacêutico (vide [www.selo.com/packaging-machines/stick-packs/](http://www.selo.com/packaging-machines/stick-packs/)). Os mesmos são muito convenientes para os consumidores usarem, e devido ao fato de conterem uma quantidade predeterminada das composições probióticas da invenção, asseguram que a dose correta seja tomada para alcançar um efeito preventivo e/ou terapêutico desejado de acordo com a invenção.

[0033] De preferência, em uso, as cepas probióticas da invenção são administradas a um indivíduo em uma quantidade diária de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^{14}$  unidades formadoras de colônias (UFC), preferivelmente, de  $1 \times 10^9$  a  $1 \times 10^{11}$  UFC e, com máxima preferência,  $1 \times 10^{10}$  UFC. A quantidade diária de UFC é preferencialmente administrada em uma única dose ou serviço.

#### INDIVÍDUOS A SEREM TRATADOS

[0034] De preferência, o indivíduo é um humano. Vantajosamente, o indivíduo humano é uma criança. De preferência, a criança tem menos de 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 ano de idade. Vantajosamente, as composições da invenção são para administração desde o nascimento e, especialmente, a partir do desmame, isto é, o ponto em que o bebê deixa de ser alimentado inteiramente pelo leite materno.

### IDENTIFICAÇÃO DE INDIVÍDUOS EM RISCO

[0035] Preferencialmente, o indivíduo não possui um ou mais dos sintomas de DC, mas tem um risco aumentado de desenvolver DC.

[0036] Idealmente, o indivíduo é identificado como tendo um risco aumentado de DC pela presença de um ou mais fatores de risco sorológicos, imunológicos e/ou genéticos.

[0037] Vários métodos para detectar a presença de fatores de risco sorológicos, imunológicos e/ou genéticos são bem conhecidos por pessoas versadas na técnica; mas exemplos de métodos particularmente adequados são fornecidos no presente documento por conveniência.

### MARCADORES ASSOCIADOS A ADC E/OU DC

- [0038]     • Sorotipagem
- [0039]     ○ DQ2 positivo
- [0040]     ○ DQ8 positivo
- [0041]     • Teste genético
- [0042]     ○ Haplótipo DQ2.5<sub>cis</sub> (DQA1\*05/DQB1\*02)
- [0043]     ○ Haplótipo DQ2.2<sub>cis</sub> (DQA1\*02:01/DQB1\*02:02)
- [0044]     ○ Haplótipo DQ2.5<sub>trans</sub>, por exemplo, haplótipo DQ2.2<sub>cis</sub> (DQA1\*02:01/DQB1\*02:02) com haplótipo DQ7.5<sub>cis</sub> (DQA1\*05:05/DQB1\*03:01)
- [0045]     ○ Haplótipo DQ8<sub>cis</sub> (DQA1\*03/DQB1\*03:02)
- [0046]     ○ Alelo DQA1\*05:01
- [0047]     ○ Alelo DQA1\*05:05



[0048] o Alelo DQB1\*03:02

[0049] O aumento do risco de desenvolver doença celíaca pode ser determinado por sorotipagem imunológica e/ou análise genética. A sorotipagem imunológica é utilizada para identificar a presença do marcador do sorotipo DQ2 e/ou do marcador do sorotipo DQ8. A análise genética de DNA genômico pode ser realizada por PCR específica da sequência utilizando iniciadores específicos da sequência (PCR-SSP) ou por sequenciação do gene. Os métodos de PCR específicos de sequência incluem: PCR com iniciadores específicos de sequência (PCR-SSP) (Sacchetti L, et al., Rapid Identification of HLA DQA1\*0501, DQB1\*0201, and DRB1\*04 Alleles in Celiac Disease by a PCR-Based Methodology. *Clin Chem*. Novembro de 1997; 43 (11): 2.204 a 2.206.); PCR quantitativa em tempo real (qPCR) com iniciadores específicos para sequência e sondas TaqMan (Reinton et al., A one-step real-time PCR assay for detection of DQA1\*05, DQB1\*02 and DQB1\*0302 to aid diagnosis of celiac disease. *J Immunol Methods*. 20 de outubro de 2006; 316 (1-2): 125 a 132. Epub 18 de setembro de 2006.); qPCR com iniciadores específicos para sequência e análise da curva de fusão (Selleski et al., Simplifying celiac disease predisposing HLA-DQ alleles determination by the real time PCR method. *Arq Gastroenterol*. abril a junho de 2015; 52 (2): 143 a 146. doi: 10.1590/S0004-28032015000200013.); Amplificação por PCR

seguida de hibridização com oligonucleotídeos específicos de sequência. Os métodos de sequenciação genética incluem sequenciação Sanger com didesoxinucleotídeos de terminação de cadeia, pirossequenciação, sequenciação por síntese (sequenciação de Illumina), sequenciação por ligação (sequenciação SOLiD), sequenciação de nanoporos (MinION), sequenciação de semicondutores Ion Torrent e sequenciação em tempo real de molécula única (Pacific Biosciences).

[0050] Os marcadores genéticos correspondentes aos sorotipos DQ2 ou DQ8 incluem: haplótipo DQ2.5<sub>cis</sub> (DQA1\*05/DQB1\*02); haplótipo DQ2.2<sub>cis</sub> (DQA1\*02:01/DQB1\*02:02); haplótipo DQ2.5<sub>trans</sub>, por exemplo, haplótipo DQ2.2<sub>cis</sub> (DQA1\*02:01/DQB1\*02:02) com haplótipo DQ7.5<sub>cis</sub> (DQA1\*05:05/DQB1\*03:01); haplótipo DQ8<sub>cis</sub> (DQA1\*03/DQB1\*03:02); alelo DQA1\*05:01; alelo DQA1\*05:05 ; alelo DQB1\*03:02.

[0051] Os marcadores imunológicos para ADC e/ou DC incluem: nível de anticorpo de transglutaminase tecidual, incluindo por ensaios de ligação por radioligandos (Agardh et al., Using radioligand-binding assays to measure tissue transglutaminase autoantibodies in young children. *Acta paediatrica* (Oslo, Noruega: 1992). 2004; 93 (8): 1.046 a 1.051, Agardh et al., Prediction of silent celiac disease at diagnosis of childhood type 1 diabetes by tissue transglutaminase autoantibodies and HLA. *Pediatric diabetes*.

2001; 2 (2): 58 a 65.); Nível do anticorpo endomísio IgA (EMA), incluindo na ausência de uma deficiência na IgA sérica total; níveis de peptídeo de gliadina desaminado (DGP IgA e IgG).

[0052] Preferencialmente, os um ou mais fatores de risco são HLA-DQ2 e/ou HLA-DQ8.

[0053] Preferencialmente, os um ou mais fatores de risco imunológico são a positividade da transglutaminase tecidual persistente (tTGA), isto é, um teste positivo tTGA em duas ou mais ocasiões consecutivas.

[0054] A positividade de tTG pode ser demonstrada pela presença de autoanticorpos tTG, preferencialmente, IgA-tTGA e/ou IgG-tTGA, como aqui descrito.

#### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0055] Figura 1: mostra a alteração no nível médio de tTGA-IgA ao longo do tempo no grupo de tratamento da cepa *L. paracasei* + *L. plantarum* em comparação com o grupo placebo.

[0056] Figura 2: mostra a mudança no nível médio de tTGA-IgG ao longo do tempo no grupo de tratamento com *L. paracasei* + *L. plantarum* comparado ao placebo.

#### EXEMPLOS

[0057] Os materiais, métodos e exemplos a seguir incorporam aspectos da presente invenção.

#### MATERIAIS E MÉTODOS

IDENTIFICAÇÃO DE POPULAÇÃO DE ESTUDO DE INDIVÍDUOS COM  
RISCO AUMENTADO DE DC POR FATORES DE RISCO SOROLÓGICOS E  
IMUNOLÓGICOS GENÉTICOS

[0058] Os participantes foram recrutados da CiPiS e participantes suecos do estudo TEDDY. O protocolo do estudo TEDDY foi minuciosamente descrito em outros lugares (o estudo The Environmental Determinants of Diabetes in the Young (TEDDY): study design. *Pediatric Diabetes*. 2007; 8 (5): 286 a 298). Em resumo, entre 2004 e 2010, os recém-nascidos nesses centros foram genotipados para HLA e considerados elegíveis se portassem um dos seguintes genótipos: DR3-DQ2/DR4-DQ8, DR4-DQ8/DR4-DQ8, DR4-DQ8/DR8, DR3-DQ2/DR3-DQ2, DR4-DQ8/DR4b, DR4-DQ8/DR1, DR4-DQ8/DR13, DR4-DQ8/DR9 ou DR3-DQ2/DR9. No centro sueco, um total de 48.140 crianças foram examinadas, das quais 3.723 foram consideradas elegíveis para HLA. Destes, o consentimento informado por escrito para a participação no estudo foi fornecido pelos pais ou cuidadores primários em um total de 2.525 casos. Dentro do protocolo TEDDY, as amostras de sangue são coletadas a cada 6 meses, e as crianças são examinadas anualmente para tTGA a partir dos 2 anos de idade. Ao mostrar a positividade de tTGA, amostras de sangue precoces são analisadas retrospectivamente para determinar o tempo de soroconversão. Os participantes que obtiveram resultados positivos em duas amostras de sangue consecutivas são

considerados tTGA persistentemente positivos, e considerados como ADC. Todos os resultados definitivos são baseados em análises laboratoriais realizadas no laboratório europeu de referência do Southmead Hospital, Bristol, Reino Unido. Uma avaliação adicional sobre DC está fora do escopo do protocolo TEDDY. Na Suécia, a decisão de realizar uma biópsia intestinal é feita caso a caso, dependendo dos níveis de tTGA, grau de sintomas e sinais de desnutrição.

[0059] No estudo CiPiS, as crianças nascidas em Skåne entre 2000 e 2004 foram examinadas usando genotipagem de HLA de sangue do cordão umbilical e um questionário sobre fatores maternos. Crianças portadoras de DQ2 e/ou DQ8 foram consideradas com risco de HLA. Um total de 6.202 crianças em risco foram convidadas, bem como 7.654 crianças sem risco de HLA como controles. O exame de tTGA foi realizado aos 3 anos de idade em 1.620/6.206 (26,1%) dos participantes do grupo de risco de HLA e 1.815/7.654 (23,7%) dos controles, e aos 9 anos em 1.910/5.870 (32,5%) dos participantes com risco de HLA e 2.176 de 7.072 (30,6%) dos controles. Se testados como tTGA positivo, os participantes foram retestados pelo menos 3 meses depois para confirmar a positividade de tTGA persistente, e, após isso, foram encaminhados para a clínica pediátrica local para uma biópsia intestinal. Os participantes foram continuamente convidados dessas duas coortes entre março de 2012 e agosto de 2015. Os critérios

de inclusão foram os seguintes:

[0060] • Positividade de tTGA em 2 amostras consecutivas, <30 U/ml usando o ensaio de tTGA de Bristol.

[0061] • Nenhum diagnóstico de doença celíaca.

[0062] • Negativo em todos os autoanticorpos associados ao diabetes examinados no protocolo TEDDY (GADA, IAA, IA-2A, ZnT8A).

[0063] • Sem participação no estudo TEDDY através de um protocolo de longa distância.

[0064] Crianças positivas em autoanticorpos associados a T1D foram excluídas do presente estudo para minimizar influências na história natural da autoimunidade das ilhotas. No entanto, será apreciado que os autoanticorpos associados a T1D constituem um marcador sorológico para risco aumentado de desenvolvimento de DC e, como tal, podem ser utilizados para identificar indivíduos preferenciais para tratamento preventivo e/ou terapêutico de acordo com os usos e métodos da presente invenção.

#### PROJETO DE ESTUDO

[0065] As crianças que correspondem aos critérios de inclusão foram convidadas para uma reunião inicial e, em seguida, agendadas para visitas de acompanhamento aproximadamente 3 e 6 meses depois. Os participantes foram randomizados na proporção de 1:1 para grupos de tratamento ou controle. Na reunião inicial e na primeira visita de

acompanhamento, cada grupo recebeu uma formulação em pó contendo *Lactobacilli*, ou um placebo, respectivamente, e instruído a consumir o produto diariamente por ingestão do pó após a dissolução em 100 ml de líquido frio ou após misturar com fruta/alimento, em associação com uma refeição uma vez por dia, durante um período total de 6 meses, parar o consumo de quaisquer outros produtos alimentares contendo probióticos e armazenar os sachês refrigerados (2 a 8 °C). Os pais também foram instruídos a não adicionar o pó a bebidas quentes ou alimentos quentes. Em cada consulta, foram coletados 10 ml de sangue venoso e uma amostra fecal. A alocação para o grupo de tratamento ou controle foi oculta para os participantes, médicos e equipe de laboratório.

ANÁLISE DE AUTOANTICORPOS DE TRANSGLUTAMINASE TECIDUAL  
- FATOR DE RISCO IMUNOLÓGICO PARA O DESENVOLVIMENTO DE DC

[0066] Os ensaios de ligação de radioligandos (RBA) foram utilizados para avaliar tTGA, como previamente descrito ((Agardh D, et al., *Pediatric Diabetes*). 2001; 2 (2): 58 a 65) (Agardh D et al., Using radioligand-binding assays to measure tissue transglutaminase autoantibodies in young children. *Acta paediatrica* (Oslo, Noruega: 1992). 2004; 93 (8): 1.046 a 1.051). Em resumo, a transglutaminase tecidual humana (tTG) foi sintetizada por transcrição e tradução in vitro de cDNA usando o Sistema de lisado de reticulócitos acoplados TNT SP6 (Promega, Madison, WI,

E.U.A.) na presença de 35S-metionina (Perkin Elmer, Waltham, MA, E.U.A.). Tanto IgG-tTGA como IgA-tTGA foram analisados. Para a análise de IgG-tTGA, 35S-tTG foi diluído e adicionado a soro humano e incubadas durante a noite a 4 °C. Proteína sefarose A (PAS) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, E.U.A.) foi usada para separar 35S-tTG livre e ligado a anticorpo ligando-se IgG no soro. O PAS e o soro 35S-tTG imunoprecipitado foram adicionados a uma placa de filtro MultiScreenHTS DV de 96 poços (Merck Life Science, Darmstadt, Alemanha) e incubados em um agitador de placas, seguido de lavagem. O coquetel de cintilação OptiPhase Supermix (Perkin Elmer) foi adicionado, e a reatividade foi medida em um Contador MicroBeta TriLux (Perkin Elmer). A análise IgA-tTGA foi realizada de modo semelhante, com a exceção de que foi utilizada agarose de IgA anti-humano de cabra (Merck Life Science) em vez de PAS. Os níveis de TGA foram expressos como U/ml calculados a partir de curvas padrão contendo aproximadamente 2, 4, 8, 16, 31, 63, 125, 250, 500 e 1.000 U/ml de IgA-tTGA e IgG-tTGA, respectivos. O nível de corte para valores positivos de anticorpos IgG e IgA-tTG-tTG foi fixado em >4,0 U/ml, o que representou o 99º percentual de 398 dadores de sangue adultos (Agardh D, et al., *Acta Paediatrica*. 2004; 93 (8): 1.046 a 1.051). Quando a deficiência seletiva de IgA era suspeita, os participantes foram testados quanto aos níveis de IgA totais como parte de



seus estudos originais; no entanto, tal condição não foi detectada entre os participantes.

#### PREPARAÇÃO DE CULTURA DE LACTOBACILLI E COMPOSIÇÃO DE PRODUTO DE TRATAMENTO

[0067] A cultura de lactobacilli foi preparada por Probi AB, Lund, Suécia. O produto ativo consistia em *L. paracasei* 8700:2 liofilizada (DSM 13434) em combinação com *L. plantarum* HEAL 9 (DSM 15312) com maltodextrina (Glucidex IT-19, Roquette, França) na forma de um pó contendo uma UFC combinada de  $1 \times 10^{10}$ , com cada cepa sendo representada igualmente. O placebo consistiu em maltodextrina em pó e peptona de levedura (HYP-A, BioSpringer, França) para ajustar cor e sabor, de modo que os dois produtos de teste (probiótico e placebo) eram idênticos em aparência e sabor. Os participantes foram instruídos a armazenar o produto na geladeira e consumir um sachê de um grama de produto todas as manhãs. Será apreciado que é a UFC total de *Lactobacillus* em vez da concentração (isto é, massa ou número de *Lactobacillus* por unidade de massa ou volume da composição) que é relevante para a eficácia do produto.

#### ANÁLISE DE CITOMETRIA DE FLUXO

##### SEPARAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES (PBMCS)

[0068] As células mononucleares do sangue periférico (PBMCS) das coortes no Exemplo 1 foram separadas do sangue total por uma centrifugação em gradiente de densidade (1800

G) usando um polissacarídeo hidrófilo (BD Vac ® CPT™ Cell Preparation Tube NC FICOLL™ 4 ml, N° Cat. 362760 Becton Dickinson, NJ, E.U.A.). As células foram separadas dentro de 2 a 24 horas após a coleta da amostra de sangue. A camada mononuclear interfase aspirada foi lavada três vezes com meio RPMI-1640 com L-Glutamina (GIBCO nº 21875034, Thermo Fisher Scientific, Gothenburg, Suécia). As células foram contadas em um Abbott CELL\_DYN Ruby para uma concentração final de 1 a  $4 \times 10^6$ /ml de linfócitos em RPMI-1640 (isto é, o volume da suspensão de PBMC foi ajustado de modo que havia 1 a  $4 \times 10^6$  linfócitos por ml).

#### PROTOCOLO DE IMUNOCOLORAÇÃO

##### RESUMO

[0069] Após a contagem, as PBMCs foram coradas com anticorpos monoclonais dirigidos para estruturas superficiais e intracelulares. Os anticorpos monoclonais (Tabela 2) foram pré-marcados com quatro fluorocromos, isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), proteína Peridínina de clorofila (PerCP) e alofococianina (APC). As células coradas foram analisadas usando um instrumento FACSCalibur® de quatro cores (BD Biosciences, CA, E.U.A.) passando por um feixe de laser. O FACSCalibur® define populações celulares e conta as células por seus atributos característicos de tamanho, granularidade e intensidade de fluorescência. Os detectores ópticos

amplificam e convertem os sinais de luz em sinais de dados elétricos. Os dados foram adquiridos e analisados no software CellQuestPro® (BD Biosciences).

TABELA 1: ANTICORPOS UTILIZADOS NA ANÁLISE DE CITOMETRIA DE FLUXO.

<b>Anticorpo e fluorocromo</b>	<b>Fornecedor</b>	<b>Nº no Catálogo</b>
CCR9 APC	R&D Systems, Inc., Abingdon, Reino Unido	FAB17991A
CD45RO APC	BD Biosciences, CA, E.U.A.	559865
CD62L APC	BD Biosciences, CA, E.U.A.	559772
isótipo de IgG1 APC	BD Biosciences, CA, E.U.A.	555751
CD25 FITC	BD Biosciences, CA, E.U.A.	555431
CD3 FITC	BD Biosciences, CA, E.U.A.	555332
CD38 FITC	BD Biosciences, CA, E.U.A.	340909

CCR4 PE	BD Biosciences, CA, E.U.A.	551120
CD8 PE	BD Biosciences, CA, E.U.A.	345773
CD45RA PE	BD Biosciences, CA, E.U.A.	555489
Integrina beta-7 PE	BD Biosciences, CA, E.U.A.	555945
CD19 PerCP	BD Biosciences, CA, E.U.A.	345778
CD4 PerCP	BD Biosciences, CA, E.U.A.	345770
CD8 PerCP	BD Biosciences, CA, E.U.A.	345774
CD3 FITC/CD16 + CD56 PE	BD Biosciences, CA, E.U.A.	342403
Isótipo de IgG2a FITC/isótipo de IgG1 PE/CD4 PerCP- Cy 5.5	BD Biosciences, CA, E.U.A.	340965

Controle de Isótipos de IgG Humano	Fisher Scientific, Gotemburgo, Suécia	12000C
Kit de coloração para células T reguladoras humanas eBioscience™ (CD4, CD25, FoxP3)	AH diagnostics AB, Solna, Suécia	88-8999-40

TABELA 2: COMBINAÇÕES E CONCENTRAÇÕES DE ANTICORPOS  
USADAS NA ANÁLISE DE CITOMETRIA DE FLUXO.

Coloração Direta					
Tubo	Painel de Mistura	Rótulo	Prep. de mab em 100 µl	Diluição	Número de linfócitos adquiridos, coletados e fechados
1	Controle de isótipo	FITC/PE/P erCP APC	5 µl 2,5 µl	1/20 1/40	3.000
2	CD3 CD16+56 CD19	FITC PE PerCP	5 µl 5 µl 20 µl	1/20 1/5	10000

3	CD3	FITC	5 µl	1/20	10000
	CD45RA	PE	0,4 µl	1/250	
	CD4	PerCP	5 µl	1/20	
	CD45RO	APC	20 µl	1/5	
4	CD3	FITC	5 µl	1/20	10000
	CD45RA	PE	0,4 µl	1/250	
	CD8	PerCP	2,5 µl	1/40	
	CD45RO	APC	20 µl	1/5	
5	CD3	FITC	5 µl	1/20	10000
	CD8	PE	0,4 µl	1/250	
	CD4	PerCP	5 µl	1/20	
	CD62L	APC	2,5 µl	1/40	
6	CD25	FITC	10 µl	1/10	100000
	CD45RA	PE	0,4 µl	1/250	
	CD4	PerCP	5 µl	1/20	
	CD45RO	APC	20 µl	1/5	
7	CD25	FITC	10 µl	1/10	50000
	CCR4	PE	2,5 µl	1/40	
	CD4	PerCP	5 µl	1/20	
	CD45RO	APC	20 µl	1/5	
8	CD25	FITC	10 µl	1/10	50000
	CCR4	PE	2,5 µl	1/40	
	CD4	PerCP	5 µl	1/20	
	CD62L	APC	2,5 µl	1/40	

9	CD45 RA	FITC	10 µl	1/10	50000
	Integrina β	PE	10 µl	1/10	
	CD8	PerCP	5 µl	1/20	
	CCR9	APC	5 µl	1/20	
10	CD3	FITC	5 µl	1/20	50000
	Integrina β	PE	10 µl	1/10	
	CD4	PerCP	5 µl	1/20	
	CCR9	APC	5 µl	1/20	
11	CD3	FITC	5 µl	1/20	50000
	Integrina β	PE	10 µl	1/10	
	CD8	PerCP	5 µl	1/20	
	CCR9	APC	5 µl	1/20	
12	CD38	FITC	10 µl	1/10	50000
	Integrina β	PE	10 µl	1/10	
	CD4	PerCP	5 µl	1/20	
	CD62L	APC	2,5 µl	1/40	
Kit de coloração de células T reguladoras para humanos					
Tubo	Painel de Mistura	Rótulo	Prep. de mab em 100 µl	Diluição	Número de células para adquirir
13	Controle de isótipo IgG2a	PE	20 µl	1/5	3.000

14	CD4/CD25	FITC/APC	Mistura de 20	1/20 e	50000
	FoxP3	PE	20 µl	1/5	

### BLOQUEIO

[0070] As PBMCs foram divididas em dois tubos: tubo A para bloqueio de PBMCs a cerca de  $2$  a  $4 \times 10^6$  linfócitos/ml em RPMI; tubo B para PBMCs para coloração sem bloqueio, diluídas a cerca de  $1$  a  $2 \times 10^6$  linfócitos/ml por adição de RPMI. As PBMCs no tubo A foram bloqueadas por incubação com IgG humana normal (diluição de 1/34) durante 15 minutos a  $2$  a  $8$  °C protegida da luz.

### COLORAÇÃO DIRETA (TUBOS 1 A 12)

[0071] Misturas de anticorpos de acordo com os tubos 1 a 12 da tabela acima foram preparadas em tubos FACS (BD Falcon, nº no catálogo VWR 352052). As PBMCs bloqueadas do tubo A foram adicionadas aos tubos 9 a 11, e as PBMCs não bloqueadas do tubo B foram adicionadas aos tubos 1 a 8 e 12. Os tubos FACS 1 a 12 foram agitados suavemente e incubados durante 30 minutos a  $2$  a  $8$  °C protegidos da luz. As PBMCs coradas foram lavadas adicionando-se 2 ml de solução salina tamponada com fosfato fria (PBS, pH 7,4, nº no catálogo Gibco 10010-015, Fisher Scientific, Gotemburgo, Suécia), submetendo-se a vórtice suavemente, centrifugando-se (10 minutos,  $400 \times g$ ) e rejeitando-se o sobrenadante. As PBMCs



coradas foram fixadas por ressuspensão em 200 µl de solução de formaldeído PBS-1% (3 partes de PBS, pH 7,4, nº no catálogo Gibco 10010-015 para 1 parte de solução de formaldeído a 4%, nº no catálogo da Apoteket 34 24 36) e incubação a 2 a 8 °C durante a noite protegidas da luz.

COLORAÇÃO COM KIT DE COLORAÇÃO DE CÉLULAS T REGULADORAS HUMANAS (TUBOS 13 A 14)

[0072] O tubo FACS 13 (vide tabela acima) foi preparado com 100 µl de PBMCs não bloqueadas do tubo B. O tubo FACS 14 (vide tabela acima) foi preparado para a coloração de superfície com 20 µl do coquetel de CD4 FITC/CD25 APC e 100 µl de PBMCs bloqueadas do tubo A, agitado em vórtice suavemente, e depois, incubo durante 30 minutos a 2 a 8 °C protegido da luz. As PBMCs nos tubos 13 e 14 foram lavadas adicionando-se 2 ml de PBS frio, agitando-se suavemente em vórtice, centrifugando-se (5 minutos, 400 x g), e descartando-se o sobrenadante. As PBMCs nos tubos 13 e 14 foram fixadas por ressuspensão em 1 ml de Solução de Fixação/Permeabilização (uma parte de Fixação/Permeabilização 4X Concentrada e três partes de Diluente de Fixação/Permeabilização) e incubação a 2 a 8 °C durante a noite protegidas da luz.

[0073] As PBMCs fixas (tubos 13 e 14) foram lavadas e permeabilizadas por centrifugação (10 minutos, 400 x g), descarte do sobrenadante, ressuspensão em 2 ml 1X Tampão de

Permeabilização (uma parte de 10X Tampão de Permeabilização e nove partes de água destilada), agito suave, repetição das quatro etapas anteriores novamente e, finalmente, nova centrifugação (10 minutos, 400 x g). As PBMCs no tubo 14 foram bloqueadas por incubação com 2 µl de soro de rato durante 15 minutos a 2 a 8 °C protegidas da luz. Coloração intracelular foi realizada pela adição de 20 ml de isótipo IgG2a de rato de controle PE ao tubo 13 e 20 ml de FoxP3 anti-humana PE ao tubo 14, seguido de incubação por 30 minutos a 2 a 8 °C protegido da luz. As PBMCs coradas foram lavadas com 2 ml de PBS, suavemente submetidos a vórtice, centrifugados (10 minutos, 400 x g) e o sobrenadante foi rejeitado antes de ressuspender as células em 200 µl de PBS antes da análise de citometria de fluxo.

#### ANÁLISE DE CITOMETRIA DE FLUXO

[0074] O Becton Dickinson FACSCalibur® pode detectar 6 parâmetros diferentes de uma única partícula ou célula em um sistema óptico. O instrumento converte a dispersão de luz e intensidade de fluorescência em pulsos digitais. O Forward Scatter (FSC) fornece uma medida do tamanho e o Side Scatter (SSC) fornece uma medida da granularidade citoplasmática. O instrumento possui detectores de fluorescência de quatro cores: o laser azul (488 nm) detecta FL1, FL2 e FL3 e um laser de diodo vermelho adicional (635 nm) detecta o FL4.

[0075] Após a limpeza regular do sistema, foi

realizada uma verificação de calibração com microesferas CaliBRITE de 3 cores (BD nº 340486) e microesferas CaliBRITE APC (BD nº 340487) e o software AutoCOMPTM foi aplicado para definir tensões do tubo fotomultiplicador (PMT) e ajustar e otimizar a compensação de fluorescência dos detectores (FL1; FL2, FL3 e FL4). As microesferas CaliBRITE são de tamanho exato, e são rotuladas com a quantidade exata de fluorocromos simulando leucócitos corados e não corados. O software AutoCOMP™ gera um CalibFile. Todos os anticorpos monoclonais foram pré-titulados com a configuração do instrumento Calib File. O Software CellQuest Pro foi usado para executar o BD FACSCalibur. 3.000 a 10.000 linfócitos adquiridos, coletados e fechados foram medidos para cada tubo de acordo com a tabela acima.

[0076] Anticorpos de controle compatíveis com o isótipo (isótipo IgG2/IgG1/CD4 (FITC, PE e PerCP-Cy 5.5) e isótipo IgG1 (APC), BD biosciences, CA, E.U.A.) foram usados para definir o quadrante de gráfico de pontos e calcular a porcentagem de populações de linfócitos através da subtração de contaminantes não linfócitos. Os linfócitos foram identificados e fechados em um gráfico de pontos exibindo dispersão lateral (granularidade citoplasmática) e células T CD3+ de parâmetro FL1 (intensidade de FITC positiva). Uma porta traseira multicolor de linfócitos foi então mostrada em um gráfico de pontos de FSC e SSC. Uma região foi definida

em torno desses linfócitos identificados (porta dos linfócitos). Novos gráficos de ponto foram exibidos a partir da porta dos linfócitos com diferentes combinações de dois parâmetros (FL1, FL2, FL3 e FL4) dos anticorpos monoclonais corados de interesse e os subconjuntos característicos foram então identificados. Os quadrantes foram definidos nos gráficos de pontos de dois parâmetros do controle de isótipo, população negativa. Um subconjunto é relatado como uma porcentagem de uma população de quadrante na porta dos linfócitos. Células negativas não coradas na porta do linfócito foram subtraídas. O termo "leucócitos", como aqui usado, significa PBMCs (isto é, a população total de células isoladas).

[0077] Especificamente, os subgrupos de células T, CD4<sup>+</sup> (Th) ou CD8<sup>+</sup> (Tc) foram fechados a partir da porta do linfócito. Dessas portas, as células virgens foram fechadas como CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup> e células de memória como CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>. As células efetoras e de memória ativadas e diferenciadas foram fechadas como CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR9<sup>+</sup>β7<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> β7<sup>+</sup>CCR9<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>β7<sup>+</sup>CD62<sup>-</sup>. As células B foram definidas como linfócitos CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>. A partir da porta dos linfócitos, as células CD4<sup>+</sup> foram fechadas, seguidas por fechamento para células CD25<sup>+</sup>.

Essa população foi então examinada para a expressão de células FoxP3+. A partir da porta de CD4+CD25+, a percentagem com a maior expressão de CD25, determinou-se CD4+CD25<sup>alta</sup>. A população de linfócitos CD4+CD25<sup>alta</sup> foi então examinada adicionalmente para a expressão de FoxP3. As células NK foram fechadas a partir da porta dos linfócitos. A partir desta porta, as células NK foram fechadas como células CD3-CD16+/CD56+.

[0078] A região do ensaio de linfócitos continha >70% de linfócitos. A análise intraensaio das células T CD3+ mostrou uma covariância de 3%, e a análise interensaio das células T CD3+ mostrou uma covariância de 5%.

#### ANÁLISE ESTATÍSTICA

[0079] O resultado do estudo foi autoimunidade celíaca avaliada como alterações nos níveis séricos de autoanticorpos tTG (uma criança foi excluída devido a volumes insuficientes) e alterações na resposta imune periférica de células B, células NK e subpopulações de células T reguladoras após 6 meses. A comparação entre os grupos de variáveis binárias foi feita por meio do teste exato de Fisher. A comparação entre grupos em dados categóricos contínuos e ordenados é feita pelo teste de soma de classificação de Wilcoxon, por exemplo, o teste de soma de classificação de Wilcoxon foi usado para comparar os níveis de tTGA entre o grupo tratado com probiótico e o grupo

placebo aos 0, 3 e 6 meses. Para comparar as mudanças nos níveis de tTGA ao longo do tempo dentro de cada grupo, foi utilizado o teste de classificação de Wilcoxon para variáveis contínuas. Os níveis de IgA-tTGA e IgG-tTGA foram analisados como conjuntos de dados separados. Da mesma forma, o teste de soma de classificação de Wilcoxon foi aplicado para a comparação entre os grupos tratados com probiótico e placebo, no que diz respeito às alterações medidas desde a linha de base até 3 e 6 meses para os parâmetros analisados por citometria de fluxo. O teste de classificações sinalizadas de Wilcoxon foi usado para medir as diferenças da linha de base aos 3 e 6 meses dentro de cada grupo. Um teste *t* foi usado para comparar a distribuição de HLA entre os grupos.

[0080] Os dados em falta não foram imputados, isto é, as análises estão em casos observados. Para evitar o efeito de abandono e restringir a comparação do tratamento àquelas crianças que aderiram perfeitamente às instruções do ensaio clínico, foram realizadas análises de intenção de tratar e análise por protocolo. Todos os valores de *p* relatados são de 2 lados, e não foram ajustados para multiplicidade (ou seja, nominal). Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado de significância estatística. As análises estatísticas foram realizadas no StatXact versão 10.1 (Cytel, Cambridge, MA, E.U.A.).

#### RESULTADOS - O TRATAMENTO COM CEPAS DE L. PARACASEI E

L. PLANTARUM REDUZ OS AUTOANTICORPOS TTGA NA AUTOIMUNIDADE  
DA DOENÇA CELÍACA (ADC)

[0081] Um total de 118 crianças preencheram os critérios de inclusão e foram convidadas a participar da pesquisa. Destas, 90 crianças e seus cuidadores concordaram em estudar a participação: 1 do estudo CiPiS e os 89 restantes do estudo TEDDY. Doze (13%) destas deixaram o estudo após a visita inicial. Uma criança foi excluída devido ao fato de as amostras de sangue terem volumes insuficientes para realizar a análise de tTGA. No total, 77 (87%) crianças foram incluídas no conjunto de dados final; 40 (52%) no grupo tratado com probiótico e 37 (48%) no grupo placebo, respectivamente. As características de linha de base desses grupos são mostradas na Tabela 3, e a distribuição de HLA na Tabela 3A. A duração média e mediana do estudo foi de 188 e 190 dias, respectivamente (Q1: 176,5 dias, Q3: 203 dias, distribuídos 153 a 237 dias).

TABELA 3: CARACTERÍSTICAS DE LINHA DE BASE NO INÍCIO DO  
ESTUDO (PRIMEIRA VISITA)

	Tratamento n = 40	Placebo n = 37	valor de p
Idade, anos, média	4,85	4,42	0,284 <sup>1</sup>
Sexo, n			0,172 <sup>2</sup>

Meninos	22	14	
Meninas	18	23	
Peso, kg, média	22,0	20,8	0,182 <sup>1</sup>
Comprimento, cm, média	114,0	110,8	0,243 <sup>1</sup>

<sup>1</sup>teste de Soma de Classificação de Wilcoxon, 2 lados;

<sup>2</sup>teste exato de Fisher, 2 lados

TABELA 3A: DISTRIBUIÇÃO DE HLA DA POPULAÇÃO DO ESTUDO

Tipo de HLA	Grupo	Grupo	valor de p
	probiótico	placebo	
	n (%)	n (%)	
DR3-DQ2/DR4-DQ8	10 (25,0)	16 (42,1)	0,112
DR4-DQ8/DR4-DQ8	10 (25,0)	7 (18,4)	0,488
DR4-DQ8/DR8/DQ4	4 (10,0)	2 (5,2)	0,439
DR3-DQ2/DR3-DQ2	15 (37,5)	13 (34,2)	0,766
DR4/DR1	1 (2,5)	0 (0,0)	0,333

TABELA 4: NÍVEIS DE AUTOANTICORPOS DA TRANSGLUTAMINASE  
TECIDUAL (TTGA), IGA E IGG. VALORES DE P SÃO COMPARAÇÕES  
ENTRE TRATAMENTO E PLACEBO EM CADA VISITA.



	Visita 1	Visita 2 (aprox. 3 meses)	Visita 3 (aprox. 6 meses)
<b>tTGA-IgA, média (mediana)</b>			
Tratamento	158,60 (4,71)	72,84 (3,07)	55,41 (2,69)
Placebo	12,96 (4,38)	21,98 (4,93)	38,23 (3,72)
valor de $p^1$	0,8912	0,3013	0,6545
<b>tTGA-IgG, média (mediana)</b>			
Tratamento	166,98 (1,57)	141,74 (1,64)	86,35 (1,61)
Placebo	8,00 (1,60)	14,26 (1,56)	64,33 (1,36)
valor de $p^1$	0,8480	0,9373	0,5428

<sup>1</sup>teste de soma de classificação de Wilcoxon, 2 lados

[0082] Após 3 meses, os níveis de tTG-IgG diminuíram uma média de  $29,4 \pm 513$  U/ml no grupo probiótico e aumentaram no grupo placebo uma média de  $6,3 \pm 48$  U/ml em relação aos níveis de linha de base ( $p = 0,046$  e  $p = 0,034$ , respectivamente), mas nenhuma diferença significativa nos níveis de IgA-tTG entre os grupos foi observada após 3 meses. Após 6 meses, os níveis diminuíram tanto para IgA-tTG (redução média de  $107,0 \pm 855$  U/ml;  $p=0,013$ ) quanto para

IgG-tTG (redução média de  $84,7 \pm 748$  U/ml;  $p=0,062$ ) no grupo probiótico, enquanto o oposto foi verdadeiro para o grupo placebo, que mostrou níveis aumentados tanto para IgT-tTG (aumento médio de  $25,0 \pm 161$  SD U/ml;  $p=0,043$ ) quanto para IgG-tTG (aumento médio de  $56,2 \pm 349$  U/ml;  $p=0,008$ ) em comparação com a linha de base.

RESULTADOS - O TRATAMENTO COM CEPAS DE *L. PARACASEI* E *L. PLANTARUM* DIMINUI A PROPORÇÃO DE CÉLULAS T NATURAL KILLERS, EQUILIBRA O AUMENTO DA PROPORÇÃO DE CÉLULAS NATURAL KILLER E REDUZ A EXPRESSÃO DE CD62L EM CÉLULAS T CITOTÓXICAS

[0083] A análise por citometria de fluxo foi usada para examinar quaisquer alterações no tamanho e no estado de ativação das populações de glóbulos brancos na linha de base e em cada uma das visitas de acompanhamento, em ambos os grupos de estudo.

[0084] A Tabela 5 mostra que a percentagem de células T natural killers (NK-T), identificadas como células CD3+ CD56+, diminuiu com o tratamento com *Lactobacillus*, e a redução foi estatisticamente significativa na segunda visita de acompanhamento dentro do grupo de tratamento ( $p=0,0297$ ) e entre os grupos tratamento e placebo ( $p=0,0079$ ). A Tabela 6 mostra que a percentagem de células natural killers (NK), identificadas como CD3-CD56+, aumentou de forma estatisticamente significativa na visita de 6 meses no grupo placebo em comparação com o grupo probiótico ( $p = 0,0381$ ).

[0085] A Tabela 7 mostra o número de células T citotóxicas (CD3+CD8+), que foram aumentadas em uma média de 1,74% ( $p=0,017$ ) no grupo placebo na primeira visita de acompanhamento (3 meses) apenas. A Tabela 7A mostra a proporção de células T<sub>H</sub> fechadas (CD3+CD4+), que, na segunda visita de acompanhamento (6 meses), diminuíram em média 5,55% ( $p = 0,039$ ) no grupo placebo, enquanto nenhuma alteração significativa foi observada para o grupo probiótico.

[0086] Além da Tabela 7, a expressão de CD62L na superfície de células CD3+CD8+ nas Tabelas 8 e 9 mostra uma tendência estatística para mais células T citotóxicas CD62L<sup>baixas</sup> ( $p = 0,0815$ ) e menos células T citotóxicas CD62L<sup>altas</sup> ( $p = 0,0729$ ) com tratamento probiótico comparado ao placebo na segunda visita de acompanhamento. CD62L é a molécula de adesão celular L-selectina, envolvida nas interações de linfócitos com células endoteliais, auxiliando na entrada nos tecidos linfoides secundários. A presença de CD62L na superfície celular indica um estado virgem (naïve) (CD62L<sup>alta</sup>), enquanto, quando as células foram ativadas, as mesmas liberam CD62L de sua superfície (CD62L<sup>baixa</sup>). A Tabela 9A também mostra menos células CD3+CD8+CD62L<sup>baixas</sup> (redução média de 0,86%,  $p = 0,014$ ) no grupo placebo na segunda visita de acompanhamento, enquanto nenhuma alteração significativa foi observada para o grupo probiótico.

[0087] Além da Tabela 7A, a Tabela 9B mostra uma

tendência para uma diminuição nas células CD3+CD4+CD62L<sup>baixas</sup> no grupo placebo (redução média de 5,55%,  $p = 0,039$ ), enquanto nenhuma alteração significativa foi observada para o grupo probiótico.

TABELA 5: CD3+CD56+ DE CÉLULAS T NK (% DE CÉLULAS NK-T DE LINFÓCITOS)

Grupo	Estatística	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
<i>Lactobacilli</i>	N	33	39	38	32	31
	Ausente	13	7	8	14	15
	Mín.	0,10	0,10	0,10	-1,54	-3,67
	Mediana	0,44	0,45	0,44	-0,09	-0,16
	Máx.	4,74	3,27	1,60	1,57	1,00
	Média	0,77	0,67	0,51	-0,12	-0,29
	Padrão	0,85	0,62	0,34	0,66	0,81
	valor de P	N/D	N/D	N/D	0,2082	0,0297
Placebo	N	32	34	34	30	30
	Ausente	12	10	10	14	14
	Mín.	0,12	0,22	0,19	-0,95	-0,94
	Mediana	0,46	0,49	0,58	0,02	0,18
	Máx.	1,26	1,30	2,35	0,97	1,72
	Média	0,55	0,59	0,69	0,04	0,13

Padrão	0,30	0,33	0,40	0,41	0,52
valor de P	N/D	N/D	N/D	0,6815	0,1082
valor de P	0,4590	0,8238	0,0202	0,2316	0,0079

TABELA 6: CD3-CD56+ DE CÉLULAS NK (% DE CÉLULAS NK DE LINFÓCITOS)

Grupo	Estatística	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
<i>Lactobacilli</i>	N	33	39	38	32	31
	Ausente	13	7	8	14	15
	Mín.	1,11	3,14	1,68	-26,45	-34,27
	Mediana	8,79	7,63	7,07	0,18	-1,61
	Máx.	43,71	21,95	15,14	8,62	10,74
	Média	10,69	8,33	7,76	-2,01	-2,86
	Padrão	8,99	4,55	3,50	7,54	9,81
	valor de P	N/D	N/D	N/D	0,4559	0,2639
Placebo	N	32	34	34	30	30
	Ausente	12	10	10	14	14
	Mín.	2,37	1,99	3,08	-11,55	-6,78
	Mediana	7,18	7,11	7,65	1,80	2,18
	Máx.	26,01	27,77	47,42	9,55	21,41

Média	8,33	8,44	10,62	0,66	2,68
Padrão	5,52	5,02	8,32	4,29	6,55
valor de P	N/D	N/D	N/D	0,1347	0,0606
valor de P	0,2930	0,8842	0,2172	0,2194	0,0381

TABELA 7: CD3+CD8+ (% DE CÉLULAS T CITOTÓXICAS DE LINFÓCITOS CD3+)

Grupo	Estatística	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
<i>Lactobacilli</i>	N	32	39	38	31	30
	Ausente	14	7	8	15	16
	Mín.	19,23	20,42	24,06	-9,73	-4,15
	Mediana	33,62	33,22	34,56	0,93	1,14
	Máx.	42,13	45,21	44,05	13,63	15,40
	Média	32,51	33,50	34,08	1,24	2,10
	Padrão	6,22	6,04	5,67	4,47	4,94
	valor de P	N/D	N/D	N/D	0,1122	0,0732
Placebo	N	31	32	34	27	29
	Ausente	13	12	10	17	15
	Mín.	17,62	17,33	17,47	-4,17	-14,04
	Mediana	32,39	33,08	31,86	1,12	0,31

Máx.	47,94	50,53	47,49	9,93	16,86
Média	32,10	33,53	33,15	1,74	1,01
Padrão	7,70	8,53	7,37	3,36	6,35
valor de P	N/D	N/D	N/D	0,0171	0,6295
valor de P	0,6181	0,9679	0,4206	0,4643	0,4136

TABELA 7A: CD3+CD4+ (% DE CÉLULAS T AUXILIARES DE LEUCÓCITOS CD3+)

Grupo	Estatística	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
<i>Lactobacilli</i>	N	32	39	38	31	30
	Ausente	14	7	8	15	16
	Mín.	2,13	1,21	4,73	-30,81	-38,10
	Mediana	14,95	13,71	11,75	-1,34	-3,01
	Máx.	48,34	31,08	29,82	19,02	17,09
	Média	17,04	13,84	14,63	-2,47	-3,44
	Padrão	9,78	7,36	6,79	12,40	12,63
	valor de P	N/D	N/D	N/D	0,3176	0,2286
Placebo	N	31	32	34	27	29
	Ausente	13	12	10	17	15
	Mín.	1,06	6,40	0,93	-32,01	-31,93

Mediana	14,04	13,30	13,35	0,04	-4,07
Máx.	50,33	35,42	29,26	11,53	14,57
Média	19,01	15,61	14,20	-4,43	-5,55
Padrão	12,82	8,00	7,13	11,98	12,61
valor de P	N/D	N/D	N/D	0,2508	0,0386
valor de P	0,8244	0,4243	0,8073	0,8649	0,6679

TABELA 8: CD3+CD8+CD62L<sup>BAIXA</sup> (% DE CD62L<sup>BAIXA</sup> DE CÉLULAS CD3+CD8+ OU CÉLULAS T CITOTÓXICAS COM BAIXA EXPRESSÃO DE CD62L COMO % DE LINFÓCITOS)

Grupo	Estatística	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
<i>Lactobacilli</i>	N	31	39	38	30	29
	Ausente	15	7	8	16	17
	Mín.	12,93	11,02	12,99	-30,81	-22,56
	Mediana	30,01	25,78	28,38	0,12	2,86
	Máx.	61,80	70,98	90,33	43,51	60,32
	Média	32,53	32,12	33,72	0,89	3,66
	Padrão	13,05	15,49	18,31	17,39	16,52
	valor de P	N/D	N/D	N/D	1,0000	0,3495
Placebo	N	31	32	34	27	29



Ausente	13	12	10	17	15
Mín.	8,59	10,38	13,17	-25,80	-21,86
Mediana	33,01	28,55	25,92	-2,69	-3,39
Máx.	55,58	63,70	68,32	55,02	34,12
Média	32,15	31,07	28,73	-0,63	-3,25
Padrão	10,91	14,24	13,44	15,51	14,66
valor de P	N/D	N/D	N/D	0,5619	0,1622
valor de P	1,0000	0,7983	0,3736	0,7692	0,0815

TABELA 9: CD3+CD8+CD62L<sup>ALTA</sup> (% DE CD62L<sup>ALTA</sup> DE CÉLULAS CD3+CD8+ OU % DE CÉLULAS T CITOTÓXICAS COM ALTA EXPRESSÃO DE CD62L)

Grupo	Estatística	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
<i>Lactobacilli</i>	N	31	39	38	30	29
	Ausente	15	7	8	16	17
	Mín.	38,20	28,91	7,83	-43,45	-61,92
	Mediana	69,75	73,68	71,19	-0,19	-2,72
	Máx.	87,07	88,73	86,80	31,37	22,56
	Média	67,25	67,68	65,74	-0,87	-4,07
	Padrão	13,13	15,42	18,30	17,46	16,37

	valor de P	N/D	N/D	N/D	1,0000	0,2867
Placebo	N	31	32	34	27	29
	Ausente	13	12	10	17	15
	Mín.	44,42	35,40	31,27	-56,01	-34,20
	Mediana	66,93	71,24	73,51	3,18	3,26
	Máx.	91,41	89,62	86,56	25,80	21,86
	Média	67,62	68,63	71,03	0,56	3,24
	Padrão	10,91	14,31	13,40	15,51	14,65
	valor de P	N/D	N/D	N/D	0,4846	0,1689
valor de P		0,9554	0,8206	0,3001	0,7212	0,0729

TABELA 9A: CD3+CD8+CD62L<sup>BAIXA</sup> (% DE CD62L<sup>BAIXA</sup> DE CÉLULAS CD3+CD8+ OU CÉLULAS T CITOTÓXICAS COM BAIXA EXPRESSÃO DE CD62L COMO % DE LEUCÓCITOS)

Grupo	Estatística	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
<i>Lactobacilli</i>	N	31	39	38	30	29
	Ausente	15	7	8	16	17
	Mín.	0,62	0,14	0,57	-3,63	-5,08
	Mediana	2,53	2,11	2,43	-0,37	-0,10
	Máx.	10,30	14,95	7,67	12,94	4,87

	Média	2,91	2,54	2,75	0,01	-0,01
	Padrão	2,05	2,37	1,61	2,84	1,93
	valor de P	N/D	N/D	N/D	0,2917	0,7922
Placebo	N	31	32	34	27	29
	Ausente	13	12	10	17	15
	Mín.	0,20	0,63	0,23	-5,70	-4,99
	Mediana	2,70	2,26	2,02	-0,31	-0,85
	Máx.	8,68	7,48	7,66	4,58	4,78
	Média	2,98	2,62	2,24	-0,45	-0,86
	Padrão	2,03	1,58	1,56	1,89	2,09
	valor de P	N/D	N/D	N/D	0,2087	0,0143
valor de P		0,7241	0,5793	0,1456	0,8460	0,0879

TABELA 9B: CD3+CD4+CD62L<sup>BAIXA</sup> (% DE CD62L<sup>BAIXA</sup> DE CÉLULAS CD3+CD4+ OU CÉLULAS T AUXILIARES COM BAIXA EXPRESSÃO DE CD62L COMO % DE LEUCÓCITOS)

Grupo	Estatística	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
<i>Lactobacilli</i>	N	31	39	38	30	29
	Ausente	15	7	8	16	17
	Mín.	0,35	0,31	0,63	-5,97	-5,16

	Mediana	2,42	1,74	1,85	-0,47	-0,67
	Máx.	7,69	17,53	10,62	15,99	5,43
	Média	2,83	2,45	2,59	-0,30	-0,18
	Padrão	1,80	2,92	2,05	3,64	2,44
	valor de P	N/D	N/D	N/D	0,1446	0,3330
Placebo	N	31	32	34	27	29
	Ausente	13	12	10	17	15
	Mín.	0,27	0,61	0,13	-4,93	-6,83
	Mediana	2,56	2,19	2,06	-0,23	-0,83
	Máx.	10,62	5,69	6,82	3,67	2,86
	Média	3,25	2,41	2,31	-0,86	-0,91
	Padrão	2,20	1,38	1,54	1,98	2,15
	valor de P	N/D	N/D	N/D	0,0702	0,0506
valor de P		0,4414	0,2857	0,6680	0,8336	0,4559

RESULTADOS - O TRATAMENTO COM CEPAS DE *L. PARACASEI* E *L. PLANTARUM* PREVINE UM AUMENTO DA ATIVAÇÃO DE CÉLULAS T AUXILIARES (CÉLULAS CD4+CD25+) E UM AUMENTO DE CÉLULAS CD4+CD25+FOXP3+

[0088] Uma análise adicional de citometria de fluxo concentrou-se nas células T auxiliares, identificadas como CD3+CD4+, com subpopulações de células T CD4+ diferindo entre

os dois grupos de estudo.

[0089] A Tabela 10 mostra que a população de células  $T_H$  virgens (CD4+CD45RA+CD45RO-) na segunda visita de acompanhamento (6 meses) diminuiu em média 4,73% ( $p = 0,002$ ) no grupo placebo. A Tabela 10 também mostra que o tratamento com *Lactobacillus* preveniu essa diminuição na proporção de células com o marcador de células T virgens CD45RA+/RO- em comparação ao placebo ( $p = 0,0532$  para V1-V0;  $p = 0,0217$  para V2-V0). Por outro lado, a Tabela 11 mostra que a população de células  $T_H$  de memória (CD4+CD45RA-CD45RO+) aumentou em uma média de 3,07% ( $p = 0,003$ ) no grupo placebo na segunda visita de acompanhamento (6 meses). A Tabela 11 também mostra que o tratamento com *Lactobacillus* impediu este aumento na proporção de células com o marcador de células T de memória CD45RA-/RO+ em comparação com o placebo ( $p = 0,0650$  para V1-V0;  $p = 0,0198$  para V2-V0).

[0090] A Tabela 10A mostra que a população de células  $T_c$  virgens (CD8+CD45RA+CD45RO-) na segunda visita de acompanhamento (6 meses) diminuiu em uma média de 2,17% ( $p = 0,030$ ) no grupo placebo, enquanto nenhuma mudança significativa foi observada para o grupo probiótico.

[0091] O tratamento *Lactobacillus* também impediu um aumento na percentagem de células T auxiliares de memória (CD45RO+), em comparação com o placebo (Tabelas 12 a 15), e impediu um aumento na percentagem de células  $T_H$  de memória

que expressam R4CC (CD4+CD45RO+R4CC+) (aumento médio de 7,63% do grupo placebo,  $p = 0,003$ ;  $p = 0,0110$ ; Tabela 15A).

[0092] O tratamento com *Lactobacillus* evita uma diminuição nas células T auxiliares CD4+CD38+CD62L, expressando a ectoenzima CD38 e a molécula de adesão celular das glicoproteínas, mas não L-selectina (CD62L), com uma tendência na segunda visita de acompanhamento (Tabela 16,  $p = 0,0753$ ). O tratamento também previne a diminuição nas células T auxiliares CD4+CCR9+ $\beta$ 7+ observadas na segunda visita de acompanhamento (Tabela 17,  $p = 0,0382$ ). A expressão de  $\beta$ 7 (do receptor de homing intestinal  $\alpha$ 4 $\beta$ 7) na superfície das células T é considerada como característica das células homing intestinais.

[0093] A Tabela 18 mostra que o tratamento com *Lactobacillus* impediu um aumento na proporção de células T auxiliares ativadas na segunda visita de acompanhamento, onde a ativação é identificada por CD25, a saber, a cadeia alfa do receptor de interleucina-2. A Tabela 18A mostra que a percentagem de células CD4+CD25+CD45RA+ virgens diminuiu em uma média de 5,72% ( $p = 0,0179$ ) no grupo placebo na segunda visita de acompanhamento (6 meses), enquanto nenhuma mudança significativa foi observada para o grupo probiótico.

[0094] A Tabela 19 mostra ainda que o tratamento com *Lactobacillus* na segunda visita de acompanhamento impediu um aumento na proporção de células T reguladoras, identificadas

como células CD4+ com alta positividade para CD25 (CD25<sup>alta</sup>).

[0095] A Tabela 20 mostra uma tendência a um aumento na porcentagem de células CD4+CD25+FoxP3+ no grupo placebo na segunda visita de acompanhamento (aumento médio de 0,32%,  $p = 0,0521$ ) e um efeito geral significativo do tratamento probiótico em comparação com placebo ( $p = 0,0275$ ).

TABELA 10: CD4+CD45RA+RO- (% DE CD45RA+CD45RO- DE CÉLULAS CD3+CD4+ OU CÉLULAS T AUXILIARES VIRGENS COMO % DE LINFÓCITOS)

Grupo	Estatística	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
<i>Lactobacilli</i>	N	32	39	38	31	30
	Ausente	14	7	8	15	16
	Mín.	38,93	48,45	49,57	-16,37	-14,55
	Mediana	68,60	66,79	65,01	1,78	-0,59
	Máx.	80,51	83,83	78,37	26,60	17,89
	Média	65,25	66,88	65,68	1,75	-0,08
	Padrão	9,63	8,00	7,95	8,17	6,92
	valor de P	N/D	N/D	N/D	0,3105	0,7457
Placebo	N	31	32	34	27	29
	Ausente	13	12	10	17	15
	Mín.	42,72	46,64	47,24	-19,50	-28,78

Mediana	71,52	68,41	68,87	-1,72	-4,03
Máx.	85,28	82,13	82,39	12,27	19,53
Média	69,70	67,91	65,87	-2,79	-4,73
Padrão	9,62	9,12	9,00	7,67	8,80
valor de P	N/D	N/D	N/D	0,0692	0,0017
valor de P	0,0420	0,4672	0,7901	0,0532	0,0217

TABELA 10A: CD8+CD45RA+RO- (% CD45RA+CD45RO- DE CÉLULAS CD3+CD8+ OU CÉLULAS T CITOTÓXICAS VIRGENS COMO % DE LEUCÓCITOS)

Grupo	Estatística	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
<i>Lactobacilli</i>	N	32	39	38	31	30
	Ausente	14	7	8	15	16
	Mín.	0,85	0,52	1,96	-9,82	-9,82
	Mediana	5,23	5,39	5,79	-0,12	-0,26
	Máx.	14,25	17,78	15,00	10,20	7,09
	Média	6,29	6,06	6,16	0,10	-0,58
	Padrão	3,61	3,62	3,07	5,13	4,34
	valor de P	N/D	N/D	N/D	0,9655	0,4016
Placebo	N	31	32	34	27	29



Ausente	13	12	10	17	15
Mín.	0,94	2,03	0,59	-20,68	-20,47
Mediana	5,57	4,67	4,70	-1,24	-1,71
Máx.	23,89	15,68	14,23	6,07	9,28
Média	7,27	5,94	5,44	-1,88	-2,17
Padrão	5,07	3,64	3,35	4,99	5,38
valor de P	N/D	N/D	N/D	0,0731	0,0308
valor de P	0,6745	0,7197	0,2647	0,2156	0,1951

TABELA 11: CD4+CD45RA-RO+ (% DE CD45RA-CD45RO+ DE CÉLULAS CD3+CD4+ OU % DE CÉLULAS T AUXILIARES DE MEMÓRIA)

Grupo	Estatística	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
<i>Lactobacilli</i>	N	32	39	38	31	30
	Ausente	14	7	8	15	16
	Mín.	5,36	1,96	9,45	-15,41	-10,50
	Mediana	18,46	17,46	18,40	-0,25	0,05
	Máx.	43,39	27,98	35,53	5,00	9,07
	Média	19,61	17,00	18,72	-1,95	-0,34
	Padrão	8,58	5,71	6,20	6,05	5,42
	valor de P	N/D	N/D	N/D	0,2336	0,8513

Placebo	N	31	32	34	27	29
	Ausente	13	12	10	17	15
	Mín.	0,84	0,28	0,31	-6,51	-5,91
	Mediana	14,89	14,47	17,85	0,23	3,82
	Máx.	30,44	40,92	30,94	17,82	11,81
	Média	15,69	16,37	17,76	1,53	3,07
	Padrão	6,03	7,51	7,24	5,21	4,82
	valor de P	N/D	N/D	N/D	0,2220	0,0032
valor de P		0,0749	0,4463	0,6040	0,0650	0,0198

TABELA 12: CD4+CD25+CD45RO+ (% DE CD45RO+ DE CÉLULAS CD3+CD4+CD25+ OU % DE CÉLULAS DE MEMÓRIA DE CÉLULAS T AUXILIARES EXPRESSANDO CD25)

Grupo	Estatística	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
<i>Lactobacilli</i>	N	32	39	38	31	30
	Ausente	14	7	8	15	16
	Mín.	4,30	20,03	29,09	-54,63	-34,75
	Mediana	49,80	48,33	49,82	0,54	4,67
	Máx.	79,94	81,02	75,62	38,33	22,71
	Média	50,68	49,47	50,48	0,51	0,94

	Padrão	17,76	14,48	11,69	15,44	12,57
	valor de P	N/D	N/D	N/D	0,5814	0,4161
Placebo	N	32	33	33	29	29
	Ausente	12	11	11	15	15
	Mín.	1,36	4,51	21,47	-25,54	-26,73
	Mediana	44,76	42,96	48,32	2,13	12,56
	Máx.	66,91	76,11	79,29	45,63	60,72
	Média	41,87	44,75	52,11	3,18	11,75
	Padrão	15,19	15,84	15,63	14,01	17,00
	valor de P	N/D	N/D	N/D	0,2770	0,0006
valor de P		0,0536	0,2195	0,7440	0,7690	0,0027

TABELA 13: CD4+CD25+CCR4+CD45RO+ (% DE CD45RO+ DE CÉLULAS CD4+CD25+CCR4+) (% DE CÉLULAS DE MEMÓRIA DAS CÉLULAS T AUXILIARES QUE EXPRESSAM CD25 E CCR4)

Grupo	Estatística	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
<i>Lactobacilli</i>	N	32	39	38	31	30
	Ausente	14	7	8	15	16
	Mín.	0,00	50,16	48,73	-16,72	-30,75
	Mediana	70,63	74,93	72,53	3,15	2,40

	Máx.	91,41	91,89	92,78	64,64	20,14
	Média	69,16	73,65	72,40	4,13	1,96
	Padrão	16,42	9,60	11,23	14,97	11,94
	valor de P	N/D	N/D	N/D	0,1406	0,2367
Placebo	N	32	33	33	29	29
	Ausente	12	11	11	15	15
	Mín.	7,09	47,80	42,75	-23,37	-10,71
	Mediana	68,36	72,43	75,77	2,30	6,65
	Máx.	91,72	87,69	97,06	53,46	57,05
	Média	67,18	71,72	75,98	4,06	9,38
	Padrão	15,39	9,70	11,15	12,95	13,82
	valor de P	N/D	N/D	N/D	0,0760	0,0007
valor de P		0,4407	0,4513	0,1512	0,9181	0,0825

TABELA 14: CD45RO+ DE CD4+CD25<sup>ALTA</sup> (% DE CD45RO+ DE CÉLULAS CD4+CD25<sup>ALTA</sup> OU % DE CÉLULAS DE MEMÓRIA DAS CÉLULAS T AUXILIARES COM ALTA EXPRESSÃO DE CD25)

Grupo	Estatística	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
<i>Lactobacilli</i>	N	32	39	38	31	30
	Ausente	14	7	8	15	16

	Mín.	3,80	21,34	25,97	-53,86	-39,60
	Mediana	45,89	48,07	46,22	-0,95	-0,41
	Máx.	82,58	84,63	71,63	39,87	30,38
	Média	48,43	46,67	47,65	-0,12	-0,29
	Padrão	18,10	15,41	12,85	15,80	15,81
	valor de P	N/D	N/D	N/D	0,7905	0,8872
Placebo	N	32	32	33	28	29
	Ausente	12	12	11	16	15
	Mín.	1,82	14,37	19,27	-35,46	-41,68
	Mediana	41,13	40,76	44,30	0,45	7,78
	Máx.	73,40	77,40	93,43	44,43	63,66
	Média	41,22	42,91	49,31	1,53	9,35
	Padrão	17,19	16,16	18,32	16,54	21,65
	valor de P	N/D	N/D	N/D	0,6456	0,0121
valor de P		0,1316	0,2188	0,9315	0,7891	0,0456

TABELA 15: CCR4+CD45RO+ DE CD4+CD25<sup>ALTA</sup> (% DE CD45RO+ DE CÉLULAS CCR4+CD4+CD25<sup>ALTA</sup> OU % DE CÉLULAS T AUXILIARES DE MEMÓRIA EXPRESSANDO CCR4 E NÍVEIS ELEVADOS DE CD25)

Grupo	Estatística V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
-------	----------------	----	----	-------	-------

<i>Lactobacilli</i>	N	32	39	38	31	30
	Ausente	14	7	8	15	16
	Mín.	0,00	52,12	55,22	-19,05	-20,84
	Mediana	75,68	79,65	78,81	0,47	3,97
	Máx.	97,30	92,41	95,63	70,53	28,18
	Média	73,10	77,16	77,04	3,32	1,84
	Padrão	17,86	9,84	10,22	16,78	11,65
	valor de P	N/D	N/D	N/D	0,5136	0,3259
Placebo	N	32	32	33	28	29
	Ausente	12	12	11	16	15
	Mín.	9,93	45,90	34,09	-21,33	-22,60
	Mediana	73,76	77,93	82,87	3,82	7,88
	Máx.	94,87	89,46	98,37	64,49	66,47
	Média	71,24	75,47	81,30	4,20	10,67
	Padrão	17,52	10,28	12,33	16,12	17,87
	valor de P	N/D	N/D	N/D	0,2183	0,0011
valor de P		0,6383	0,5311	0,0492	0,9790	0,0452

TABELA 15A: CD45RO+ DE CD4+CCR4+ (% DE CÉLULAS T  
AUXILIARES DE MEMÓRIA EXPRESSANDO CDR4 NA SUA SUPERFÍCIE)

Grupo	Estatística	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
<i>Lactobacilli</i>	N	32	39	38	31	30
	Ausente	14	7	8	15	16
	Mín.	1,71	44,95	38,12	-33,51	-27,79
	Mediana	65,03	70,17	66,43	1,27	0,50
	Máx.	90,03	90,63	86,20	64,29	17,88
	Média	64,95	68,80	66,81	2,74	-0,32
	Padrão	15,29	9,60	10,60	15,27	10,20
	valor de P	N/D	N/D	N/D	0,1461	1,0000
Placebo	N	32	33	34	29	30
	Ausente	12	11	10	15	14
	Mín.	6,23	39,83	40,82	-19,87	-23,38
	Mediana	65,73	68,45	69,99	3,22	5,86
	Máx.	84,23	90,04	90,64	33,60	41,56
	Média	62,97	67,78	70,12	4,63	7,63
	Padrão	15,11	10,42	11,82	12,77	13,92
	valor de P	N/D	N/D	N/D	0,0920	0,0026
valor de P		0,7338	0,7553	0,1900	0,5179	0,0110

TABELA 16: CD38+ DE CD4+CD62L<sup>BAIXA</sup> (% DE CD62L<sup>BAIXA</sup> DE CD38+CD4+ OU % DE CÉLULAS T AUXILIARES EXPRESSANDO CD38 E

BAIXOS NÍVEIS DE CD62L)

Grupo	Estatística	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
<i>Lactobacilli</i>	N	30	39	38	29	28
	Ausente	16	7	8	17	18
	Mín.	1,30	1,42	0,94	-8,68	-6,11
	Mediana	3,90	3,86	3,57	-0,15	0,64
	Máx.	10,53	20,90	23,76	7,98	19,44
	Média	4,89	5,32	5,58	0,17	1,03
	Padrão	3,03	4,01	4,45	3,87	5,00
	valor de P	N/D	N/D	N/D	0,6740	0,5670
Placebo	N	31	32	33	27	28
	Ausente	13	12	11	17	16
	Mín.	1,08	1,03	1,33	-10,31	-12,08
	Mediana	5,23	3,41	3,97	-1,11	-1,32
	Máx.	15,50	20,62	20,32	14,44	17,54
	Média	6,52	5,50	5,31	-0,89	-1,29
	Padrão	4,12	4,88	3,90	5,04	5,50
	valor de P	N/D	N/D	N/D	0,1111	0,0735
valor de P		0,1292	0,4923	0,9202	0,1856	0,0753

TABELA 17: CD4+CCR9+β7+ (% DE CÉLULAS CD4+ POSITIVAS



PARA CCR9 E INTEGRINA  $\beta 7$ )

Grupo	Estatística	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
<i>Lactobacilli</i>	N	32	39	38	31	30
	Ausente	14	7	8	15	16
	Mín.	0,72	0,41	0,52	-4,42	-2,67
	Mediana	1,34	1,26	1,46	-0,13	0,21
	Máx.	5,96	5,62	5,40	1,40	4,32
	Média	1,68	1,44	1,71	-0,41	0,06
	Padrão	1,11	0,88	0,94	1,12	1,25
	valor de P	N/D	N/D	N/D	0,0703	0,6227
Placebo	N	32	31	34	27	30
	Ausente	12	13	10	17	14
	Mín.	0,60	0,59	0,37	-7,10	-5,40
	Mediana	1,65	1,61	1,42	-0,03	-0,33
	Máx.	8,71	2,68	3,31	1,24	1,79
	Média	2,07	1,62	1,61	-0,46	-0,57
	Padrão	1,62	0,63	0,74	1,75	1,36
	valor de P	N/D	N/D	N/D	0,5342	0,0237
valor de P		0,2378	0,0848	0,7900	0,4932	0,0382

TABELA 18: CD4+CD25+ (% DE CD25+ DE CÉLULAS CD3+CD4+ OU

% DE CÉLULAS T AUXILIARES POSITIVAS PARA CD25)

Grupo	Estatística	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
<i>Lactobacilli</i>	N	32	39	38	31	30
	Ausente	14	7	8	15	16
	Mín.	4,78	5,25	5,54	-8,36	-6,83
	Mediana	8,82	9,85	8,83	0,13	-0,10
	Máx.	19,55	15,51	19,82	7,03	8,12
	Média	9,80	9,84	9,57	0,16	-0,12
	Padrão	3,65	2,21	2,99	3,44	4,21
	valor de P	N/D	N/D	N/D	0,7151	0,8078
Placebo	N	32	33	33	29	29
	Ausente	12	11	11	15	15
	Mín.	3,03	4,53	4,70	-5,89	-6,79
	Mediana	9,15	9,89	9,88	1,15	1,37
	Máx.	20,66	15,39	18,29	5,76	12,74
	Média	9,76	10,02	10,60	0,66	1,60
	Padrão	3,76	2,69	3,83	3,06	3,74
	valor de P	N/D	N/D	N/D	0,1828	0,0121
valor de P		0,9628	0,9217	0,3423	0,4124	0,0971

TABELA 18A: CD45RA+ TOTAL DE CD4+CD25+ (% DE CÉLULAS

## CD4+ VIRGENS EXPRESSANDO CD25 EM SUA SUPERFÍCIE)

Grupo	Estatística	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
<i>Lactobacilli</i>	N	31	39	38	30	29
	Ausente	15	7	8	16	17
	Mín.	3,05	11,46	10,09	-23,80	-21,93
	Mediana	28,76	35,65	30,19	0,78	-0,80
	Máx.	57,29	56,58	59,50	32,86	18,99
	Média	31,03	33,89	31,67	1,48	-1,18
	Padrão	14,08	11,63	11,48	11,96	9,86
	valor de P	N/D	N/D	N/D	0,6554	0,5221
Placebo	N	32	33	33	29	29
	Ausente	12	11	11	15	15
	Mín.	19,96	15,04	12,36	-33,69	-32,45
	Mediana	39,71	35,61	35,89	-3,86	-3,76
	Máx.	72,86	65,34	73,61	19,31	10,99
	Média	38,69	37,03	33,75	-3,38	-5,72
	Padrão	12,72	14,35	13,59	11,28	11,09
	valor de P	N/D	N/D	N/D	0,1373	0,0179
valor de P		0,0316	0,4770	0,6121	0,1244	0,1930

TABELA 19: CD4 + CD25<sup>ALTA</sup> (% DE CÉLULAS CD4 + ALTAMENTE

## POSITIVAS PARA CD25, CONSIDERADAS COMO CÉLULAS REGULADORAS

T).

Grupo	Estatística	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
<i>Lactobacilli</i>	N	32	39	38	31	30
	Ausente	14	7	8	15	16
	Mín.	1,83	2,12	2,22	-4,60	-4,14
	Mediana	3,93	4,52	4,30	0,52	0,08
	Máx.	9,31	7,11	8,58	3,91	3,23
	Média	4,17	4,36	4,22	0,29	0,04
	Padrão	1,62	1,10	1,33	1,66	1,98
	valor de P	N/D	N/D	N/D	0,2260	0,8670
Placebo	N	32	33	33	29	29
	Ausente	12	11	11	15	15
	Mín.	1,25	2,03	1,56	-3,54	-3,35
	Mediana	4,04	4,38	4,63	0,38	1,06
	Máx.	8,99	7,52	8,26	3,64	5,39
	Média	4,21	4,49	4,76	0,47	0,90
	Padrão	1,63	1,37	1,71	1,54	1,82
	valor de P	N/D	N/D	N/D	0,0846	0,0081
valor de P		0,8493	0,8332	0,1720	0,7831	0,1026

TABELA 20: CD4+CD25+FOXP3+ (CÉLULAS T REGULADORAS COMO  
% DE LEUCÓCITOS)

Grupo	Estatística	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
<i>Lactobacilli</i>	N	31	39	38	30	29
	Ausente	15	7	8	16	17
	Mín.	0,22	0,18	0,17	-1,78	-2,11
	Mediana	1,62	1,74	1,50	0,04	-0,15
	Máx.	3,58	2,88	3,22	2,10	1,30
	Média	1,55	1,67	1,45	0,11	-0,20
	Padrão	0,79	0,66	0,64	0,86	0,87
	valor de P	N/D	N/D	N/D	0,4995	0,3276
Placebo	N	29	33	34	26	27
	Ausente	15	11	10	18	17
	Mín.	0,29	0,83	0,08	-0,84	-1,71
	Mediana	1,57	1,78	1,83	0,14	0,31
	Máx.	2,75	3,43	3,78	1,32	2,32
	Média	1,54	1,74	1,82	0,19	0,32
	Padrão	0,64	0,54	0,85	0,64	0,91
	valor de P	N/D	N/D	N/D	0,1711	0,0521
valor de P		0,8515	0,9351	0,0326	0,6866	0,0275

DISCUSSÃO

[0096] A principal constatação importante nesse estudo foi o retardo do aumento dos níveis de autoanticorpos tTG pelo uso de cepas de *Lactobacillus* em crianças com autoimunidade celíaca em curso em uma dieta normal (Figuras 1 e 2). Isso dá uma evidência credível de um efeito amortecedor dos suplementos probióticos na autoimunidade celíaca ativa precoce, nunca antes observada anteriormente. Apenas uma dieta sem glúten demonstrou reduzir os níveis de autoanticorpo tTG eficientemente ao longo do tempo (Agardh D, et al., *Acta paediatrica*. 2004; 93 (8): 1.046 a 1.051). O efeito do *Lactobacillus* na autoimunidade celíaca foi apoiado pelas mudanças consistentes na resposta imune periférica envolvida na regulação das células T, que foi observada apenas nas crianças do grupo placebo. Curiosamente, as diferenças na maioria dos subgrupos de linfócitos encontrados no grupo placebo foram semelhantes ao que é encontrado em pacientes com doença celíaca ativa.

[0097] O aumento de células T CD4+CD25+Foxp3 + no grupo placebo, que permaneceu inalterado no grupo de tratamento, poderia ser explicado pelos efeitos de regulação negativa das duas cepas de *Lactobacillus* em células CD4+ ativadas. A redução observada nas células CD3+CD4+ no grupo placebo pode ser considerada secundária à compartimentalização dos linfócitos sensíveis ao glúten

dentro da mucosa intestinal. Além disso, as células  $T_H$  virgens que expressam CD45RA foram reduzidas, e, por sua vez, a percentagem de células  $T_H$  efetoras e de memória que expressam CD45RO foi maior no grupo do placebo, o que foi anteriormente observado em pacientes com doença celíaca não tratada e explicado por percentagens mais elevadas de linfócitos  $\gamma\delta TcR+$  e  $CD45+\alpha\beta TcR+$  ativados por glúten (Kerttula TO, et al., *Clin Exp Immunol.* 1998; 111 (3): 536 a 540). Essa explicação é ainda reforçada pela constatação de um aumento na porcentagem de células CD45RO+ que também expressam CCR4 no grupo placebo, sugerindo uma recirculação de células T reguladoras preparadas. O CCR4 é um importante receptor de quimiocina para o recrutamento de células T para o primeiro sinal da inflamação, e é altamente expresso em células T reguladoras diferenciadas (Iellem A, et al., *Eur J Immunol.* 2003; 33 (6): 1.488 a 1.496). Os aumentos de células  $CD4+CD25^{alta}CD45RO+CCR4+$  e células  $CD4+CD25+Foxp3+$  no grupo placebo indicam uma tentativa de extinguir uma inflamação intestinal em curso e a resposta imune a antígenos de glúten alimentares como anteriormente descrito (Frisullo L, et al., *Human Immunol.* 2009; 70 (6): 430 a 435; Tiittanen M, et al., *Clin Exp Immunol.* 2008; 152 (3): 498 a 507).

[0098] A terceira constatação de relevância particular foi as alterações periféricas nas células NK ao longo do tempo no grupo placebo com autoimunidade celíaca em

curso, o que não foi observado em crianças que receberam probióticos. Verificou-se que a população de células T NK e NK diminui tanto no tecido como na periferia na doença celíaca ativa (Dunne MR, et al., *PLoS ONE*. 2013; 8 (10): e76008). Isso está de acordo com as constatações do presente estudo, onde se verificou que as células NK aumentaram no grupo probiótico, mas não no grupo placebo. Isso reforça ainda mais a importância das células NK na doença celíaca e que o suplemento probiótico pode ter um efeito estimulador direto ou indireto sobre as células NK espelhadas como uma resposta autoimune reduzida na periferia.

#### CONCLUSÕES

[0099] Resumindo, comparando perfis imunológicos entre os grupos, foi possível identificar um efeito supressor distinto na autoimunidade celíaca espelhado como uma diminuição nos níveis de autoanticorpos tTG. Essa observação foi ainda reforçada pelas mudanças consistentes de alterações periféricas nas proporções de linfócitos T envolvidos na regulação autoimune e células NK notavelmente observadas em crianças com autoimunidade celíaca em curso que receberam placebo. Essa nova constatação oferece um novo campo potencial de intervenção terapêutica com bactérias probióticas na doença autoimune humana.

[0100] Optou-se por estudar as alterações imunológicas associadas à patologia da DC sem a influência



deGFD. O tratamento com GDF causa uma mudança rápida em vários marcadores imunológicos, como o tTGA em pacientes com DC. (Midhagen G, et al., *Journal of Internal Medicine*. 2004; 256 (6): 519 a 524) e (Agardh D, et al., *Clinical and Experimental Immunology*. 2006; 144 (1): 67 a 75). Consequentemente, foi utilizado um limite de corte baixo <30 U/ml para a participação no estudo, de acordo com as diretrizes de diagnóstico atuais, afirmando que níveis de tTGA significativamente elevados podem ser evidências suficientes para fazer um diagnóstico de DC sem biópsia intestinal (Husby S, et al., *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2012; 54 (1): 136 a 160. O fato de a maioria de nossos participantes ter entrado no estudo com baixos níveis iniciais de tTGA como um sinal precoce de autoimunidade em andamento era, portanto, esperado e um componente inerente de nossa população.

[0101] Embora os níveis de IgA-tTGA e IgG-tTGA sejam testes de diagnóstico válidos em DC, as recomendações clínicas atuais preconizam o uso de IgA-tTGA em crianças com níveis normais de IgA total, devido a uma maior especificidade e relevância clínica (Husby S, et al *supra*).

[0102] Neste estudo, as alterações nos níveis de IgA-tTGA no grupo tratado com *Lactobacilli* probiótico foram reduzidas de forma mais significativa do que no grupo placebo. De fato, isso foi refletido por duas crianças

tratadas com *Lactobacilli* que progrediram para níveis elevados desde o convite até visita 0 que reduziram significativamente seus níveis de IgA-tTGA após 3 e 6 meses, indicando que os probióticos podem ter tido um efeito em algumas crianças com autoimunidade de DC (dados não mostrados).

[0103] Os *Lactobacilli* probióticos exemplificativos utilizados nesse estudo clínico, *Lactobacillus plantarum* HEAL9 e *Lactobacillus paracasei* 8700:2, mostraram efeitos supressores na autoimunidade de DC em crianças com uma dieta contendo glúten. Isso indicou que as cepas de *Lactobacillus* podem prevenir e/ou retardar a autoimunidade de DC em indivíduos “com risco de HLA”, sugerindo uma possível aplicação preventiva de *Lactobacilli* probiótico em DC.

[0104] Até onde se sabe, este é o primeiro estudo de intervenção a avaliar e mostrar que as espécies probióticas de *Lactobacilli* podem atrasar ou prevenir o desenvolvimento de autoimunidade de DC em crianças com risco genético de DC. Isso indica que as cepas probióticas de *Lactobacillus* da invenção podem ser utilizadas para retardar e/ou prevenir uma progressão de ADC para DC.

**REIVINDICAÇÕES**

1. Pelo menos uma cepa probiótica de *Lactobacillus* **caracterizada** pelo fato de que se destina à uso em um indivíduo para a prevenção e/ou o tratamento de autoimunidade de doença celíaca (ADC), ou para a prevenção e/ou o tratamento de doença celíaca (DC).

2. Pelo menos uma cepa probiótica de *Lactobacillus* para uso, de acordo com a reivindicação 1, sendo que a cepa é **caracterizada** pelo fato de que é de pelo menos um dentre *Lactobacillus paracasei* e/ou *Lactobacillus plantarum*.

3. Pelo menos uma cepa probiótica de *Lactobacillus* para uso, de acordo com a reivindicação 2, sendo que a cepa é **caracterizada** pelo fato de que é selecionada a partir de pelo menos um dentre *Lactobacillus paracasei* 8700: 2 (DSM 13434) e/ou *Lactobacillus plantarum* HEAL 9 (DSM 15312).

4. *Lactobacillus paracasei* 8700: 2 (DSM 13434) em combinação com *Lactobacillus plantarum* **caracterizado** pelo fato de que se destina ao uso na prevenção e/ou no tratamento de ADC ou DC.

5. Pelo menos uma cepa probiótica de *Lactobacillus* para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, sendo que a cepa é **caracterizada** pelo fato de que é administrada em uma quantidade de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^{12}$  UFC por dia.

6. Composição que contém pelo menos uma cepa

probiótica de *Lactobacillus* para uso, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizada** pelo fato de que está em conjunto com um excipiente ou veículo adequado.

7. Composição para uso, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada** pelo fato de que o carreador é um alimento e/ou um micronutriente.

8. Composição para uso, de acordo com a reivindicação 6 ou 7, sendo que a composição é **caracterizada** pelo fato de que é fornecida como uma cápsula, um comprimido ou pó para administração oral.

9. Pelo menos uma cepa probiótica de *Lactobacillus* para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, **caracterizada** pelo fato de que está na forma de uma preparação liofilizada.

10. Método de prevenção e/ou tratamento de ADC ou DC, sendo que o método é **caracterizado** pelo fato de que envolve administrar uma quantidade eficaz de pelo menos uma cepa probiótica de uma espécie de *Lactobacillus* a um indivíduo.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de que o indivíduo é um humano identificado como estando em risco aumentado de DC pela presença de um ou mais fatores de risco serológicos, imunológicos e/ou genéticos.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11,

**caracterizado** pelo fato de que o fator de risco genético é HLA-DQ2 e/ou HLA-DQ8.

13. Método, de acordo com a reivindicação 11 ou 12, **caracterizado** pelo fato de que o fator de risco é positividade de transglutaminase de tecido persistente (tTGA).

14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 13, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade eficaz de pelo menos uma cepa probiótica é de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^{12}$  UFC por dia.

15. Método, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade eficaz de pelo menos uma cepa probiótica é  $1 \times 10^{10}$  UFC por dia.

Fig. 1

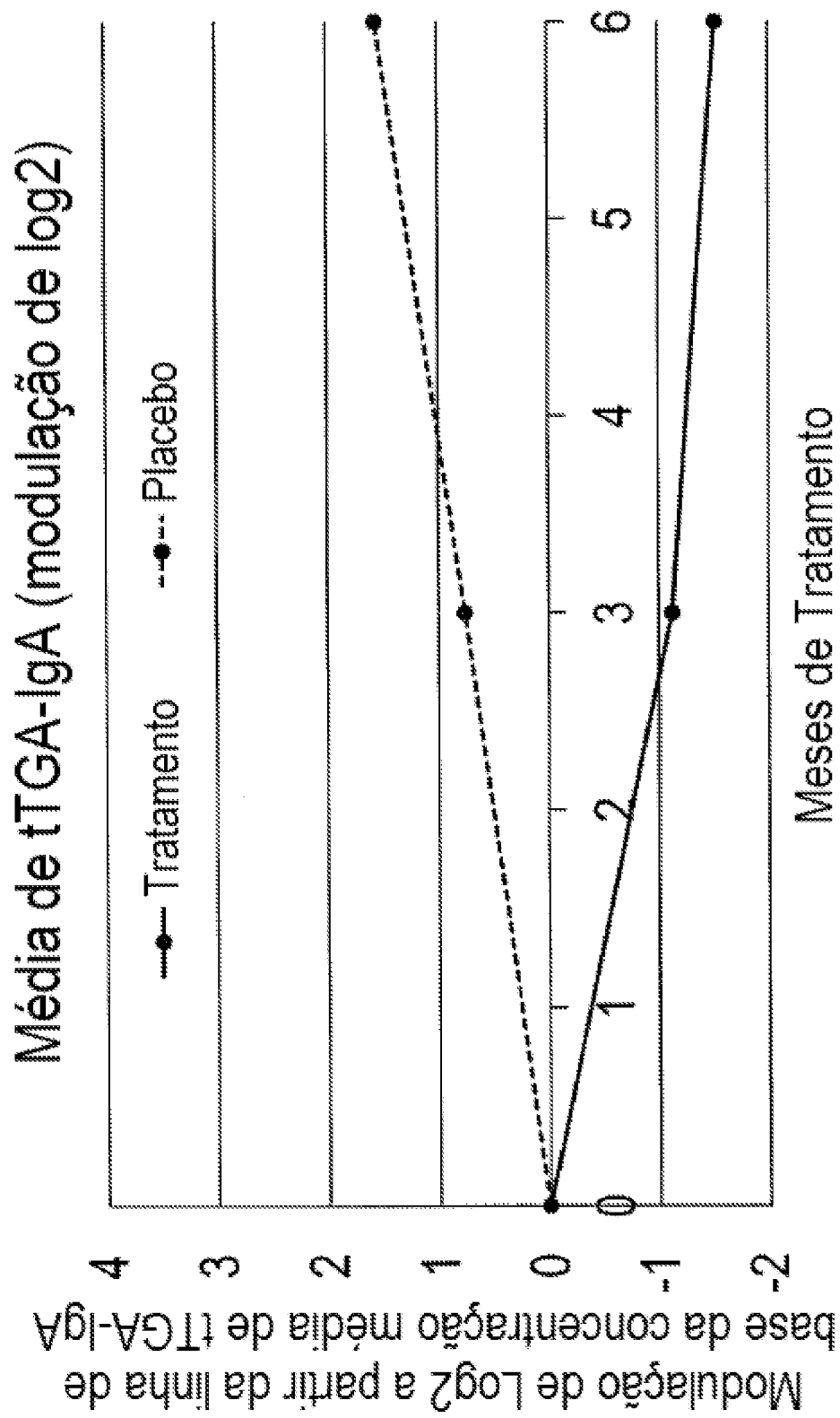
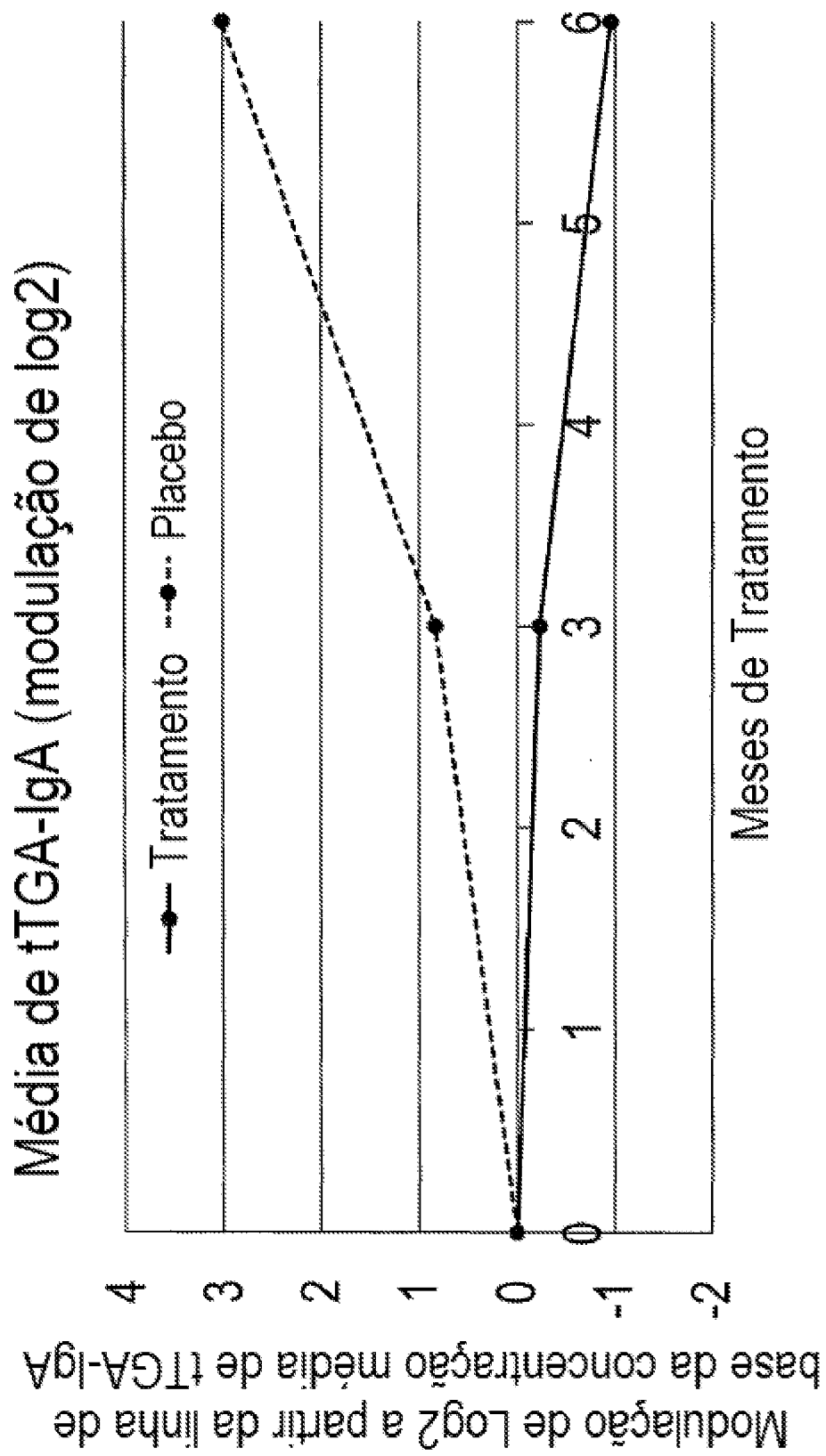


Fig. 2



Resumo da Patente de Invenção para: **"COMPOSIÇÕES PROBIÓTICAS  
E USOS DAS MESMAS"**

A presente invenção refere-se a pelo menos uma cepa probiótica de *Lactobacillus* para uso em um indivíduo para a prevenção e/ou o tratamento de autoimunidade de doença celíaca (ADC) ou para uso na prevenção e/ou no tratamento de doença celíaca (DC). Uma composição preferida para uso de acordo com a invenção é uma composição compreendendo uma combinação de *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus plantarum*, especialmente *L. paracasei* 8700:2 (DSM 13434) em combinação com *L. plantarum* HEAL 9 (DSM 15312).