

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM SAÚDE**

MARINA CAÇADOR AYUPE

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA OBESIDADE NA MICROBIOTA PULMONAR EM  
MODELO MURINO DE ASMA ALÉRGICA**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Ferreira

Co-Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Flávia Márcia de Castro Silva

**JUIZ DE FORA**

**2018**

**Marina Caçador Ayupe**

Avaliação da influência da obesidade na microbiota pulmonar em modelo murino de asma alérgica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Brasileira, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Saúde. Área de concentração: Imunologia

Aprovada em 15 de Agosto de 2018

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Paula Ferreira - Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof.<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup> Fábio Barrozo Canto

Universidade Federal Fluminense

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Miriam Maria Silva Costa Franco

Universidade Federal de Juiz de Fora

## **AGRADECIMENTOS**

Durante esses dois anos que estive no Mestrado, aprendi bastante. Acredito que posso comparar o laboratório de Imunologia a um ser vivo. A célula é a menor unidade estrutural de um ser vivo, elas são essenciais, pois são responsáveis por desempenhar diversas funções em um organismo. Penso que cada um que contribuiu para minha formação é uma célula.

Agradeço a Deus, por me fazer acreditar que sempre há um novo amanhecer.

Agradeço incondicionalmente, aos meus pais, exemplos de dedicação, esforço e persistência. Obrigada por me fazerem acreditar que sou capaz e por tantas vezes anularem seus sonhos, para que os meus se realizassem. Também agradeço por me mostrar que a educação ainda é o melhor caminho a se seguir.

Ao meu namorado Thiago, pela paciência, compreensão e apoio.

À minha co-orientadora, Flávia, exemplo de dedicação, persistência e amor pelo que faz. Peça fundamental no desenvolvimento do projeto, companheira de noites viradas em experimentos, inúmeras análises de Citometria e contagens de bactérias, incansável na busca por artigos, além de me ajudar muito na escrita e correção do artigo e da dissertação e dona de um Cappuccino ótimo.

Ao amigo do laboratório, Erick, exemplo de persistência, determinação e opinião forte, aquele que sabe todas as respostas. Quantas vezes já te amolei com contas, inúmeras perguntas no meio de uma madrugada de experimento, para não contar as vezes que te liguei e você sempre pronto a me ajudar. Além de ter sido essencial na escrita do artigo, dono das frases poéticas, em inglês, também me ajudou muito na formatação e escrita da dissertação. Leverei comigo suas explicações e sua calma na hora dos experimentos.

À minha amiga e companheira do laboratório Marci, sempre se dedicou a me ajudar no que eu precisasse. Quantas conversas, noites de experimentos, principalmente na técnica da FISH. Sempre me passou muita calma e confiança. À aluna de IC Viviane, muito dedicada e comprometida. Me ajudou muito com os animais, durante os experimentos e no processamento das amostras.

Agradeço também à dedicação e comprometimento da Poly, Julliane e Dionéia, vocês foram essenciais durante o projeto. Ju e Dionéia, como foi bom trabalhar com vocês. Duas profissionais sensatas e com o coração enorme.

Também agradeço à Sirley e Leidiana, pessoas de um coração puro, sempre me passavam calma e serenidade.

Ao professor Gilson, agradeço pela paciência em me ajudar na análise da Citometria.

Aos amigos do laboratório: Aninha, Sara, Paula, Gaby, Bárbara, Luiz e Ari que também contribuíram para o desenvolvimento do projeto.

Finalmente, agradeço imensamente à minha orientadora Ana Paula Ferreira que abriu as portas para mim e confiou no meu trabalho e sempre me ajudou em tudo o que eu precisasse, muito obrigada.

Considero todos vocês como uma célula, cada um desempenhando funções diferentes e juntos, foram essenciais na minha formação profissional e pessoal.

À CAPES, FAPEMIG, CNPq e UFJF, pelo apoio financeiro indispensável para a elaboração do projeto e produção científica.

## RESUMO

A asma é a doença inflamatória crônica mais frequente das vias aéreas e sua prevalência aumentou em todo o mundo. A obesidade é um fator de risco para asma e estudos preliminares demonstraram que indivíduos obesos asmáticos apresentam níveis elevados de IL-17A e neutrófilos nos pulmões, demonstrando que eles apresentam um fenótipo distinto da alergia clássica. Evidências indicam que a microbiota intestinal desempenha um papel importante na determinação das diferentes características da asma. No entanto, não há estudos mostrando a influência da obesidade sobre a microbiota pulmonar. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a influência da obesidade na microbiota pulmonar em modelo de asma alérgica. Camundongos BALB/c fêmeas alimentados com uma dieta hiperlipídica durante 14 semanas, sensibilizados e desafiados com Ovalbumina (OVA), foram eutanasiados 24h e 48h após o último desafio com OVA. A microbiota pulmonar foi analisada através das técnicas de Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) e pela Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR). O efeito da microbiota pulmonar em células dendríticas foi avaliado através de co-cultura com células dendríticas derivadas da medula óssea (BDMC). Tanto a obesidade como a asma, aumentaram a proporção de Firmicutes/Bacteroidetes no intestino. Obesos e obesos-alérgicos apresentaram maiores níveis de IL-17A nos pulmões. A obesidade aumentou a contagem de Proteobacteria e reduziu a de Firmicutes nos pulmões, associada à maior expressão de TLR-4 e à redução da expressão de TLR-2 em CDs pulmonares. Após a indução da alergia, esses marcadores aumentaram ao longo do tempo, em animais obesos alérgicos, os quais apresentaram menor número de Proteobacteria e maior Firmicutes, em comparação ao grupo alérgico. A co-cultura de BMDs de obesos com a microbiota pulmonar reduziu a expressão de TLR-2/4 e CD80. Esses dados sugerem que a obesidade é capaz de modificar a microbiota pulmonar, antes e após a indução da alergia. Essas alterações promoveram a quebra da homeostasia pulmonar, causando o atraso da resposta imune e o desenvolvimento de uma resposta Th17. Este trabalho fornece um novo mecanismo no qual a obesidade piora a asma. Assim, a melhor compreensão dessas interações contribuirão para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento adequadas para este fenótipo distinto de asma.

**Palavras chave:** asma alérgica, obesidade, microbiota pulmonar, células dendríticas

## ABSTRACT

Asthma is the most common inflammatory airway disease and its prevalence has increased worldwide. Obesity is also a risk factor for asthma and preliminary studies demonstrated that obese asthmatic subjects presented high levels of IL-17A and neutrophils in the lungs, demonstrating that they have a distinct phenotype from classic allergy. Evidence has been raised indicating that the gut microbiota play an important role setting different features of asthma. However, there are not studies showing the influence of obesity in a pulmonary microbiota. Therefore, the present study aimed to evaluate the influence of obesity on the pulmonary microbiota in a model of allergic asthma. Female BALB/c mice fed a high fat diet during 14 weeks, sensitized and challenged with Ovalbumin (OVA), were euthanized 24h and 48h after the last OVA challenge. Pulmonary microbiota was analyzed through Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) and quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR). Lung microbiota effect over dendritic cells was evaluated in coculture with bone marrow derived dendritic cells (BMDC). Both obesity and allergy increased Firmicutes/Bacteroidetes ratio in the gut. Obese and obese-allergic mice presented higher pulmonary IL-17A levels. Obesity increased Proteobacteria and diminished Firmicutes counting, associated with higher TLR-4 and reduced TLR-2 expression by pulmonary DCs. After allergy induction, these markers increased over time, obese allergic mice, which presented diminished Proteobacteria and increased Firmicutes number, compared to allergic group. Obese BMDC coculture with lung microbiota, showed reduced TLR-2/4 and CD80 expression. These data suggests obesity is able to modify pulmonary microbiota, before and after allergy induction. These changes promoted lung homeostasis disruption, causing the delay of immune response development and Th17 profile onset. This work provides a novel mechanism by which obesity worsens asthma. Hence, the better understanding of those interactions will contribute to the development of new treatment strategies suitable for that distinct asthma phenotype.

**Keywords:** allergic asthma, obesity, pulmonary microbiota, dendritic cells

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b>	Distribuição da asma no mundo (Adaptado de Rowe, 2011)	15
<b>Figura 2:</b>	Reconhecimento dos diferentes tipos de microrganismos pelos TLRs (Adaptado de O'NEILL, 2013)	17
<b>Figura 3:</b>	Resposta imunológica na asma alérgica.	19
<b>Figura 4:</b>	Prevalência da obesidade no mundo (Adaptado da Organização Mundial de Saúde, 2016).	20
<b>Figura 5:</b>	Ligação entre a microbiota pulmonar e intestinal durante a homeostase e em doenças respiratórias	27
<b>Tabela 1:</b>	Divisão dos grupos experimentais de acordo com a indução dos modelos.	32
<b>Tabela 2:</b>	Composição das dietas padrão e hiperlipídica em gramas.	33
<b>Figura 6:</b>	Delineamento experimental.	35
<b>Quadro 1:</b>	Sondas utilizadas para a técnica de FISH	42
<b>Quadro 2:</b>	Primers utilizados para realização da qPCR.	44
<b>Quadro 3:</b>	Especificações dos marcadores utilizados na Citometria de Fluxo	45
<b>Figura 7:</b>	Caracterização da obesidade em camundongos fêmeas da linhagem Balb/c.	49
<b>Figura 8:</b>	Contagem total e específica de leucócitos no Lavado Bronco-Alveolar (LBA).	51
<b>Figura 9:</b>	Contagem do número de leucócitos totais, de eosinófilos e neutrófilos na medula óssea.	53
<b>Figura 10:</b>	Avaliação do infiltrado inflamatório pulmonar.	55
<b>Figura 11:</b>	Avaliação do infiltrado eosinofílico no tecido pulmonar.	57
<b>Figura 12:</b>	Avaliação do nº de células caliciformes produtoras de muco.	59
<b>Figura 13:</b>	Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).	61
<b>Figura 14:</b>	Avaliação dos níveis das citocinas epiteliais no tecido pulmonar.	63

<b>Figura 15:</b>	Avaliação dos níveis das citocinas pró-inflamatórias no tecido pulmonar.	65
<b>Figura 16:</b>	Avaliação dos níveis da quimiocina CCL11 no tecido pulmonar.	67
<b>Figura 17:</b>	Avaliação dos níveis dos anticorpos IgG1 anti-OVA, IgG2a anti-OVA e IgE anti-OVA	69
<b>Figura 18:</b>	<i>Dot-plots</i> representativos de citometria de fluxo para seleção de células dendríticas provenientes do pulmão.	71
<b>Figura 19:</b>	Número absoluto de CDs CD11b <sup>+</sup> MHCII <sup>+</sup> /TLR-2 <sup>+</sup> e de CDs CD11b <sup>+</sup> MHCII <sup>+</sup> /TLR-4 <sup>+</sup>	73
<b>Figura 20:</b>	Número absoluto de CDs CD11b <sup>+</sup> MHCII <sup>+</sup> /CD80 <sup>+</sup> .	75
<b>Figura 21:</b>	Número absoluto de CDs CD11b <sup>+</sup> MHCII <sup>+</sup> /PDL-1 <sup>+</sup> .	77
<b>Figura 22:</b>	Quantificação relativa por qPCR dos filamentos de bactérias no intestino	79
<b>Figura 23:</b>	Quantificação dos filamentos de bactérias no tecido pulmonar pela técnica de FISH.	81
<b>Figura 24:</b>	FISH dos pulmões dos animais.	83
<b>Figura 25:</b>	FISH dos pulmões dos animais.	84
<b>Figura 26:</b>	Quantificação relativa por qPCR dos filamentos de bactérias no pulmão.	86
<b>Figura 27:</b>	<i>Dot-plots</i> representativos de citometria de fluxo para seleção de células dendríticas derivadas da medula óssea.	88
<b>Figura 28:</b>	Expressão de CDs CD11c <sup>+</sup> /MHCII <sup>+</sup> /TLR-2 <sup>+</sup> derivadas da medula óssea e cultivadas com a microbiota pulmonar.	90
<b>Figura 29:</b>	Expressão de CDs CD11c <sup>+</sup> /MHCII <sup>+</sup> /TLR-4 <sup>+</sup> derivadas da medula óssea e cultivadas com a microbiota pulmonar	91
<b>Figura 30:</b>	Expressão de CDs CD11c <sup>+</sup> /MHCII <sup>+</sup> /CD80 <sup>+</sup> derivadas da medula óssea e cultivadas com a microbiota pulmonar.	93
<b>Figura 31.</b>	Expressão de CDs CD11c <sup>+</sup> /MHCII <sup>+</sup> /PDL-1 <sup>+</sup> derivadas da medula óssea e cultivadas com a microbiota pulmonar.	95
<b>Figura 32.</b>	Dosagem de citocinas no sobrenadante da co-cultura de CDs CD11c <sup>+</sup> /MHCII <sup>+</sup> /PDL-1 <sup>+</sup> derivadas da medula óssea e cultivadas com a microbiota pulmonar.	97

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCG – Bacillus Calmette – Guerin

BMDC – Células Dendríticas derivadas da medula óssea (do inglês: ‘Bone marrow derived dendritic cells’)

CD – Células dendríticas

CD# – Cluster de diferenciação (Cluster of differentiation)

DAMPs – Padrões moleculares associados ao dano (do inglês: “damage associated molecular patterns”)

DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês “deoxyribonucleic acid”)

DO – densidade ótica

EDTA – Etileno Diamina tetra acetato dissódico)

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção associado à enzima (do inglês “Enzyme linked Immunosorbent Assay”)

EPM – Erro Padrão da Média

EPO – Peroxidase eosinofílica (do inglês “Eosinophilic Peroxidase”)

FISH – Hibridização Fluorescente *in situ* (do inglês: “Fluorescent *in situ* Hybridization”)

GM-CSF - Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (do inglês “Granulocyte-macrophagecolony-stimulating factor”)

GINA – Iniciativa Global para a Asma (do inglês “*Global Initiative for Asthma*”)

HE – Hematoxilina e Eosina

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina (do inglês “Interleukin”)

ILC – Células linfoides inatas (do inglês “Innate Lymphoid cells”)

IMC- Índice de Massa Corporal

Kg – quilogramas

LBA – Lavado bronco-alveolar (do inglês bronchoalveolar lavage”)

LPS – Lipopolissacarídeo

m – Metros

µl – microlitros

MHC de classe II – Molécula de Histocompatibilidade de classe II (do inglês “Major Histocompatibility Complex II”)

MPO – Mieloperoxidase (do inglês “Myeloperoxidase”)

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPD – Diidrocloreto de O- fenilediamina (do inglês “O-phenylenediamine dihydrochlorid”)

OVA – Ovalbumina

PAMPs – Padrões moleculares associados a patógeno (do inglês: “Pathogen Associated Molecular Patterns”)

PAS – Ácido Periódico de Shiff (Periodic Shiff Acid)

PBS – Tampão fosfato de salina (do inglês Phosphate Buffer Saline”)

PD-1 – Morte programada (do inglês “Programmed death”)

PDL-1 – Ligante de Morte Programada (do inglês “Programmed death -1”)

pH – Potencial de Hidrogênio

PRRs – Receptores de reconhecimento de padrão (do inglês: “pattern recognition receptors)

PSA – Polissacarídeo A

qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (do inglês: “Quantitative Polymerase Chain Reaction “)

RPM – rotações por minuto

SFB – Soro Fetal Bovino

SCFA – Ácidos graxos de cadeia curta (do inglês “Short Chain Fatty Acids”)

SR – “*sirius red*”

TA – Temperatura ambiente

TGI – Trato Gastrointestinal

Th – T auxiliares (do inglês “T helper”)

TLR – receptores do tipo toll (do inglês “Toll Like Receptor”)

TNF  $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral (do inglês “ Tumoral Necrose Factor”)

TSLP – Linfopoetina Estromal Tímica (do inglês ” thimic stromal lymphopoieti”)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
1.1 Asma .....	14
1.2 Obesidade .....	19
1.3 Influência da obesidade na microbiota e na asma alérgica .....	22
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
2.1 Objetivo geral .....	30
2.2 Objetivos específicos .....	30
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
3.1 Animais.....	32
3.2 Grupos experimentais .....	32
3.3 Composição das dietas .....	33
3.4 Indução do modelo de obesidade .....	34
3.5 Avaliação da porcentagem de ganho de massa corporal.....	34
3.6 Indução do modelo de alergia pulmonar experimental.....	34
3.7 Obtenção do material biológico .....	35
<b>3.7.1 Coleta do soro</b> .....	<b>35</b>
<b>3.7.2 Coleta e processamento do Lavado Bronco-Alveolar (LBA) para contagem total e diferencial de células</b> .....	<b>36</b>
<b>3.7.3 Coleta da medula óssea</b> .....	<b>36</b>
<b>3.7.4 Coleta e processamento do pulmão para dosagem de citocinas, CCL11 e da atividade da enzima MPO.</b> .....	<b>36</b>
<b>3.7.5 Coleta do tecido adiposo perigonadal</b> .....	<b>37</b>
<b>3.7.6 Coleta do intestino</b> .....	<b>37</b>
3.8 Dosagem sérica de anticorpos anti-OVA.....	37
3.9 Contagem total e diferencial de leucócitos no lavado broncoalveolar .....	38
3.10 Contagem total e diferencial de granulócitos na medula óssea .....	38
3.11 Avaliação histológica do tecido pulmonar.....	38
<b>3.11.1 Escore inflamatório</b> .....	<b>39</b>
<b>3.11.2 Número de eosinófilos no tecido pulmonar</b> .....	<b>39</b>
<b>3.11.3 Número de células produtoras de muco no epitélio pulmonar</b> .....	<b>39</b>

3.12 Dosagem de citocinas e CCL11 no homogenato do tecido pulmonar e no sobrenadante da co-cultura.....	39
3.14 Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).....	40
3.15 Hibridização Fluorescente <i>in situ</i> (FISH) .....	41
3.16 Extração de DNA bacteriano do tecido pulmonar e intestino .....	42
3.17 Quantificação relativa do DNA bacteriano por QPCR .....	43
3.18 Citometria de Fluxo .....	44
3.19 Co-cultura de células dendríticas derivadas da medula óssea com a microbiota pulmonar .....	45
<b>3.20 Análise Estatística.....</b>	<b>47</b>
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
4.1 Caracterização da obesidade em camundongos fêmeas da linhagem Balb/c ....	48
<b>4.1.1 Porcentagem de ganho de massa em gramas e acúmulo de gordura perigonadal.....</b>	<b>48</b>
4.2 Influência da obesidade induzida por dieta hiperlipídica sobre a resposta imune em modelo de alergia pulmonar, 24 e 48 horas após o último desafio com a ovalbumina .....	50
<b>4.2.1 Contagem de células totais e específicas no Lavado Bronco-Alveolar (LBA) .....</b>	<b>50</b>
<b>4.2.2 Contagem de leucócitos total e específica na medula óssea .....</b>	<b>52</b>
<b>4.2.3 Escore inflamatório .....</b>	<b>54</b>
<b>4.2.4 Avaliação do infiltrado eosinofílico no tecido pulmonar .....</b>	<b>56</b>
<b>4.2.5 Contagem de células caliciformes produtoras de muco no epitélio das vias aéreas .....</b>	<b>58</b>
<b>4.2.6 Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) .....</b>	<b>60</b>
<b>4.2.7 Avaliação dos níveis das citocinas epiteliais no tecido pulmonar .....</b>	<b>62</b>
<b>4.2.8 Avaliação dos níveis das citocinas pró-inflamatórias no tecido pulmonar .....</b>	<b>64</b>
<b>4.2.9 Avaliação da quimiocina CCL11 no tecido pulmonar .....</b>	<b>66</b>
<b>4.2.10 Avaliação dos níveis de anticorpos IgG1, IgG2a e IgE anti-OVA .....</b>	<b>68</b>
4.3 Influência da obesidade sobre a resposta de CDs pulmonares, em modelo de ASMA .....	70
<b>4.3.1 Identificação e caracterização de células dendríticas no tecido pulmonar .....</b>	<b>70</b>
<b>4.3.2 Avaliação dos receptores TLR-2 e TLR-4 em células dendríticas pulmonares CD11b<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup> .....</b>	<b>72</b>

<b>4.3.3 Avaliação do marcador CD80 em células dendríticas pulmonares CD11b<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup> .....</b>	<b>74</b>
<b>4.3.4 Avaliação da expressão de PDL-1 em CDs CD11b<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup> no pulmão.....</b>	<b>76</b>
4.4 Avaliação da influência da obesidade na microbiota intestinal e pulmonar em modelo de alergia pulmonar .....	78
<b>4.4.1 Quantificação relativa de bactérias no intestino .....</b>	<b>78</b>
<b>4.4.2 Quantificação de bactérias no tecido pulmonar .....</b>	<b>80</b>
4.4.2.1 Localização de bactérias no tecido e no macerado pulmonar.....	82
4.4.2.2 Quantificação relativa de bactérias no pulmão .....	85
4.5 Avaliação da influência da microbiota pulmonar sobre CDs derivadas da medula óssea.....	87
<b>4.5.1 Identificação e caracterização de células dendríticas CD11c<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> diferenciadas da medula óssea .....</b>	<b>87</b>
<b>4.5.2 Avaliação da expressão dos receptores TLR-2 e TLR-4 em CDs CD11c<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup> derivadas da medula óssea e cultivadas com a microbiota pulmonar .....</b>	<b>89</b>
<b>4.5.3 Avaliação da expressão do marcador CD80 em CDs CD11c<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup> derivadas da medula óssea e cultivadas com a microbiota pulmonar .....</b>	<b>92</b>
<b>4.5.4 Avaliação da expressão de PDL-1 em CDs CD11c<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> derivadas da medula óssea e cultivadas com a microbiota pulmonar .....</b>	<b>94</b>
<b>4.5.5 Dosagem das citocinas IL-4, IL-6 e IL-10 no sobrenadante da co-cultura de CDs CD11c<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> derivadas da medula óssea e cultivadas com a microbiota pulmonar .....</b>	<b>96</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>98</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>107</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>108</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ASMA

A asma é definida como uma doença inflamatória pulmonar crônica caracterizada por um histórico de sintomas respiratórios como: sibilância, falta de ar, aperto no peito e tosse. Estes sintomas são decorrentes da hiperresponsividade brônquica, hipersecreção de muco e remodelamento das vias aéreas. Evoluindo para um quadro crônico, os pulmões passam por alterações na sua fisiologia, apresentando hipertrofia e hiperplasia da musculatura das vias aéreas, aumento no número de células caliciformes produtoras de muco no epitélio e fibrose da membrana basal subepitelial, podendo levar ao declínio da função pulmonar (GINA, 2017).

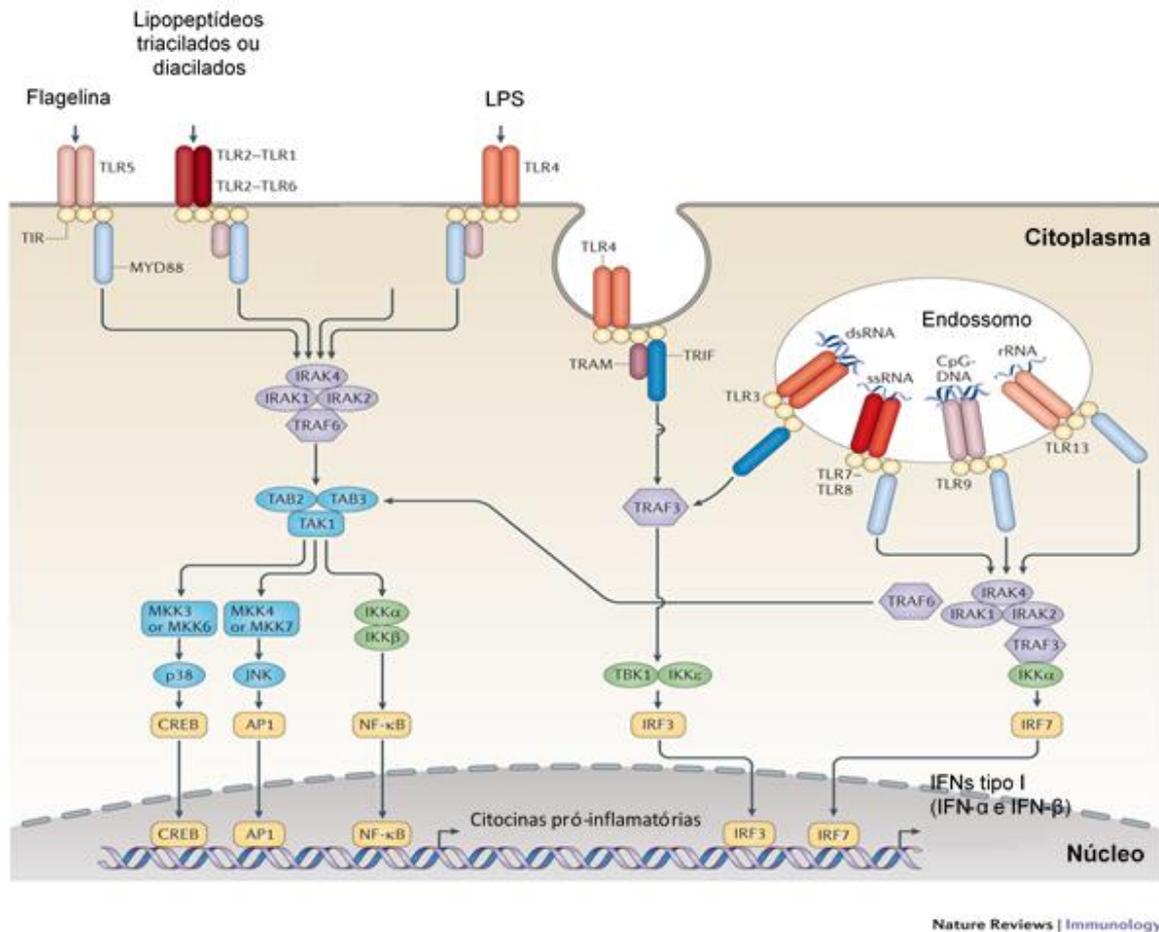
O termo alergia ou atopia (do grego *atopos* – fora do lugar), foi proposto por Clemens von Pirquet em 1906 para chamar atenção à propensão de alguns indivíduos a desenvolverem sinais e sintomas de reatividade ou “reação de hipersensibilidade”, quando expostos a determinadas substâncias (SILVERSTEIN, 2000). A asma alérgica se desenvolve em decorrência de uma associação entre fatores genéticos, ambientais e imunológicos que culminam em uma reação exagerada a antígenos ambientais inócuos, também chamados de alérgenos (BURBANK et al., 2017).

Nas últimas décadas, tem-se observado um aumento na prevalência da asma, sobretudo em países desenvolvidos, tornando-se uma das doenças inflamatórias pulmonares mais comuns (ANTÓ, 2012). Enquanto há 50 anos, os casos relatados eram de 2% a 4% (SMITH J.M ET AL, 1961), dados atuais mostram um aumento nos índices da doença, para 15% a 20% em todo o mundo (MORAES; SEARS; SUBBARAO, 2018), correspondendo a aproximadamente 300 milhões de pessoas afetadas e 250 mil mortes anuais (LOFTUS; WISE, 2016). Este aumento substancial da doença é alarmante, uma vez que afeta a qualidade de vida do indivíduo, além de representar forte impacto financeiro e social (ROWE; SEVCIK; VILLA-ROEL, 2011) (Figura 1).



Dentre os fenótipos de asma, a asma alérgica é aquela mais prevalente na população, apresentando uma resposta imune bem caracterizada. Os pulmões estão em constante exposição à inúmeros antígenos ambientais, como poluentes, microrganismos e poeira. Uma vez inalados, eles percorrem os brônquios e chegam ao epitélio das vias aéreas (PERMAUL et al., 2012). Esse epitélio é formado por dois tipos celulares – células ciliadas e secretoras que secretam uma variedade de moléculas antimicrobianas, como defensinas, IgA e mucinas que representam a primeira linha de defesa do tecido pulmonar (EVANS et al., 2015; WINE; JOO, 2004). Também estão presentes na superfície desse epitélio, receptores de reconhecimento padrão (PRRs - do termo em inglês *pattern recognition receptors*), que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs - do termo em inglês *pathogen associated molecular patterns*) ou padrões moleculares associados a danos (DAMPs – do termo em inglês *damage associated molecular pattern*). Estes receptores estão relacionados à imunidade inata e são extremamente importantes na patogênese da asma (TARTEY; TAKEUCHI, 2017).

Dentre os PRR, estão os receptores do tipo toll ou TLRs (do termo em inglês – *toll like receptor*), que além de serem expressos em células epiteliais também são encontrados em macrófagos, mastócitos, eosinófilos, basófilos células dendríticas (CDs) e em células endoteliais. Em humanos já foram identificados cerca de 10 TLRs, sendo que TLR1 e 2 reconhecem triacil lipopeptídios; TLR2 e 6, diacil lipopeptídios; TLR-4, lipopolissacarídios (LPS); TLR5, flagelina, localizados na superfície da célula. Já os TLR3, que reconhecem RNA de fita dupla, TLRs7 e 8, reconhecem RNA de fita simples de origem viral; TLR9, que detecta sequências repetidas de citosina-guanina – CpG estão localizados intracelularmente, em endossomos, podendo responder à presença de patógenos intracelulares (BLASIUS; BEUTLER, 2010; PHIPPS et al., 2007; TAKEDA; AKIRA, 2004). A partir do reconhecimento por esses receptores, se inicia uma cascata de sinalização intracelular, que irá culminar na produção de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (O'NEILL; GOLENBOCK; BOWIE, 2013) (Figura 2).

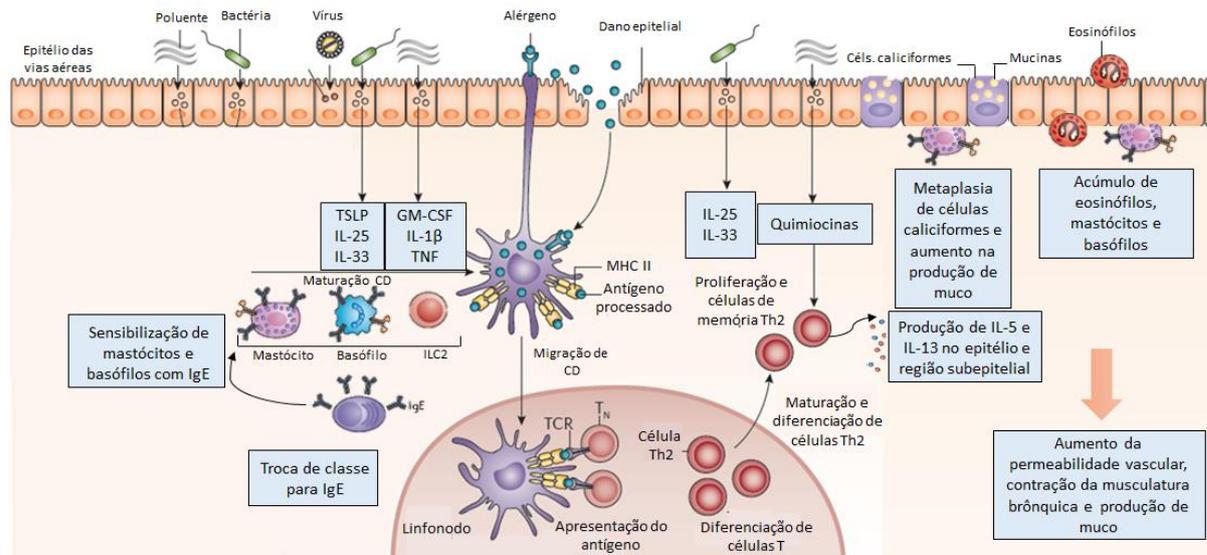


**Figura 2:** Reconhecimento dos diferentes tipos de microrganismos pelos TLRs. As células do sistema imune podem reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) através de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), como os TLR. Os receptores TLR1 e 2 (reconhecem triacil lipopolipeptídios), TLR2 e 6 (reconhecem diacil lipopolipeptídios), TLR4 (reconhece LPS - lipopolissacarídeo) e TLR5 (reconhece flagelina), localizados na superfície celular. Já os TLR3 (reconhece RNA de fita dupla), TLR7 e 8 (reconhecem RNA de fita simples), TLR-9 (reconhece sequências repetidas de citocina-guanina -CpG), os quais se encontram na membrana dos endossomos. (Adaptado de O'NEILL, 2013).

A resposta alérgica se inicia na fase de sensibilização logo após a captura do antígeno pelas CDs residentes, estimulando as células epiteliais a secretarem citocinas como a interleucina (IL)-25, IL-33 e linfopietina estromal tímica - TSLP (*thimic stromal lymphopietin*) que irão atuar em células linfoides inatas do tipo 2 (do termo em *inglês innate linfoide cells-2*) e na maturação e ativação de CDs (ALLAKHVERDI et al., 2007; TREJO BITTAR; YOUSEM; WENZEL, 2015). Destacando o papel crucial das CDs na polarização da resposta imunológica em diferentes perfis, Th1, Th2, Th17, ou regulatório, estas possuem uma importante função na comunicação entre resposta imune inata e adaptativa (DE JONG; SMITS; KAPSENBERG, 2005). As CDs irão capturar o antígeno, processá-lo e apresentá-lo

ligado ao MHC de classe II (do termo em inglês – *Major Histocompatibility Complex II*) aos linfócitos T virgem, presentes nos órgãos linfoides secundários. A interação entre CDs e linfócitos, irá resultar na diferenciação de linfócitos T CD4 para o perfil de resposta imune Th2, essencial ao desenvolvimento da resposta alérgica, promovendo a liberação de citocinas como a IL-4 que irá atuar em linfócitos B alérgeno-específicos, para que haja troca da classe de IgM para IgE (WU; ZARRIN, 2014). A IgE produzida e liberada se liga aos receptores de alta afinidade para a porção Fc da imunoglobulina (Fc $\epsilon$ RI), presente na superfície de mastócitos, basófilos e eosinófilos (SCHMIT et al., 2017). A IL-5 é responsável por manter a sobrevivência e o recrutamento de eosinófilos para as vias aéreas que irão liberar substâncias contidas em seus grânulos, como a peroxidase eosinofílica-EPO (*eosinophilic peroxidase*), que atua induzindo lesão e remodelamento tecidual (SVERRILD et al., 2017). Já a IL-9 e IL-13, induzem produção de muco pelas células caliciformes do epitélio pulmonar em resposta ao dano tecidual, levando à hiperresponsividade das vias aéreas (FAHY, 2015; HOLGATE, 2012; SVERRILD et al., 2017).

A fase efetora ocorre a partir de contatos posteriores com o alérgeno que se liga ao complexo IgE-Fc $\epsilon$ RI, promovendo a ativação e degranulação de mastócitos e basófilos, que liberam mediadores inflamatórios como histamina, leucotrienos, prostaglandinas, além de citocinas e quimiocinas. Essas substâncias, promovem o aumento da permeabilidade vascular, a contração da musculatura brônquica e a produção de muco (GALLI; TSAI; PILIPONSKY, 2008; SCHMIT et al., 2017). Exposições repetidas e prolongadas ao alérgeno, levam à alterações na fisiologia dos pulmões, aumento na produção de muco, hiperplasia das células epiteliais, fibrose pulmonar, devido ao depósito de colágeno e metaplasia brônquica, resultando em remodelamento pulmonar e cronicidade da doença (Figura 3) (HOLGATE et al., 2015).



**Figura 3:** Resposta imunológica na asma alérgica. A exposição a antígenos ambientais como microrganismos e poluentes são reconhecidos por receptores da imunidade inata presentes nas células epiteliais das vias aéreas, as quais produzem TSLP, IL-25 e IL-33 e por CDs no pulmão. As CDs apresentam os antígenos ligado ao MHC de classe II aos LT virgens, promovendo a expansão de linfócitos de perfil Th2 e culminando na produção de IL-4 (promove troca de classe de IgM para IgE em linfócitos B), IL-5 (atrai eosinófilos), IL-13 (induz a produção de muco pelas células caliciformes do epitélio pulmonar, levando à hiperresponsividade das vias aéreas. Contatos posteriores com o alérgeno, irá culminar na produção de mediadores inflamatórios por mastócitos e basófilos, causando aumento da permeabilidade vascular, contração da musculatura brônquica e a produção de muco (Adaptado de Holgate, 2015).

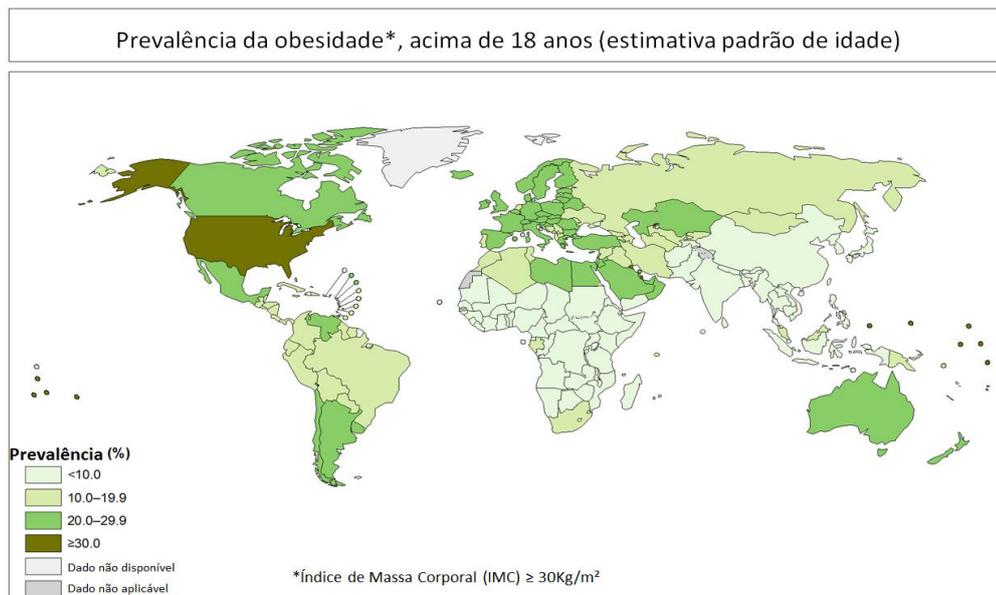
Apesar desses mecanismos envolvidos na resposta da asma alérgica serem bem estabelecidos, estudos mais recentes, demonstram que os índices de prevalência da asma ainda são alarmantes, pois, crescem principalmente em países desenvolvidos e em desenvolvimento (MORAES; SEARS; SUBBARAO, 2018). Cada vez mais, busca-se entender como os seguintes fatores podem influenciar e até mesmo determinar o surgimento e desenvolvimento da asma, como: dieta materna, exposição a certos tipos de microrganismos, tratamentos constantes com antibióticos, práticas de higiene, tipos de parto, dieta e obesidade (RUSSELL et al., 2015; STATOVCI et al., 2017; ULRİK, 2016).

## 1.2 OBESIDADE

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o sobrepeso e a obesidade são definidos pelo acúmulo excessivo de gordura mensurado pelo Índice de Massa

Corpórea (IMC), o qual é determinado pela divisão do peso do indivíduo em quilogramas (Kg) pela sua altura em metros (m) ao quadrado. Uma pessoa com o IMC acima ou equivalente a  $30 \text{ Kg/m}^2$  é geralmente considerado obeso e de  $25 \text{ Kg/m}^2$  com sobrepeso (WHO, 2003).

Considerada atualmente uma epidemia do século XXI (DI CESARE et al., 2016), a incidência da obesidade cresce em todo o mundo, sobretudo em países desenvolvidos. Estima-se que 1,5 bilhões de adultos estão com sobrepeso e 640 milhões são obesos. Estudos epidemiológicos mostram que as causas da obesidade são múltiplas (SEABOLT; WELCH; SILVER, 2015), dentre elas, o consumo excessivo de dietas ricas em gordura e com baixo teor de nutrientes, altos níveis de ingestão de açúcares e gorduras saturadas, combinado à redução da atividade física (Figura 4) (DUGAS et al., 2016; GUIDA; VENEMA, 2015; WHO, 2003; YAWN et al., 2015).



**Figura 4:** Prevalência da obesidade no mundo (Adaptado da Organização Mundial de Saúde, 2016).

O tecido adiposo é o centro do controle energético do corpo, sendo dividido em tecido adiposo branco e tecido adiposo marrom (INAGAKI; SAKAI; KAJIMURA, 2016). No contexto da obesidade, o tecido adiposo branco se destaca, o qual exerce várias funções, dentre elas, função mecânica, de proteção e atua como isolante térmico. Além dessas funções, o tecido adiposo branco é constituído principalmente por células chamadas de adipócitos que armazenam energia na forma de lipídeos e possuem a capacidade de hidrolisar e liberar estas moléculas como ácidos graxos durante um período prolongado de jejum (MATAFOME; SEIÇA, 2017; MUIR et al., 2016).

Juntamente com os adipócitos, outras células do sistema imune residem no tecido adiposo, como macrófagos M2 produtores de IL-10, IL-4 e IL-13, eosinófilos e linfócitos Tregs (KUSMINSKI; BICKEL; SCHERER, 2016).

Contudo, o consumo excessivo de gordura promove a hipertrofia e hiperplasia do tecido adiposo que passa por modificações em sua composição celular, apresentando predominância de macrófagos M1, células dendríticas, mastócitos, linfócitos T CD8+ e linfócitos T CD4+ produtores de IFN- $\gamma$  (KUSMINSKI; BICKEL; SCHERER, 2016). Em adição, o recrutamento de macrófagos para o tecido adiposo é uma característica marcante do processo inflamatório da obesidade, os quais liberam citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  (*tumoral necrose factor  $\alpha$* ), IL-1 $\beta$ , IL-6, promovendo uma inflamação sistêmica de baixo grau (ZHENG et al., 2016). Concomitante à liberação dessas citocinas, os adipócitos liberam adipocinas, dentre elas a leptina, um hormônio essencial para controlar o estado de saciedade do indivíduo. Estudos demonstram em indivíduos e em modelo experimental que obesos apresentam resistência a esse hormônio, apresentando níveis séricos de leptina elevados e baixa sinalização de seu receptor no hipotálamo (ALAMZADEH et al., 2017).

Estudos epidemiológicos indicam que a inflamação sistêmica de baixo grau da obesidade está associada ao aumento no número de casos de asma, tanto em adultos quanto em crianças. De fato, já foi observado que o risco de desenvolvimento da asma aumenta juntamente com o IMC (ANTÓ, 2012; ELKS et al., 2012; MICHELSON et al., 2009). Além da obesidade gerar um efeito alarmante na epidemiologia da asma, ainda afeta os sintomas da doença, pois indivíduos obesos asmáticos, apresentam piora das sintomas respiratórios, como aumento da hiperresponsividade brônquica, obstrução do fluxo aéreo e maior produção de muco, alterando e piorando a função pulmonar (BAFFI; WINNICA; HOLGUIN, 2015; ULRİK, 2016). Além disso, esses pacientes não respondem à terapias convencionais com utilização de broncodilatores, glicocorticóides, anti-leucotrienos ou ao tratamento com anticorpos anti-IgE (CARPAIJ; VAN DEN BERGE, 2018; ULRİK, 2016).

Diante desses fatores, constatou-se que a asma associada à obesidade, representa um fenótipo clínico distinto da asma alérgica convencional (GIBEON et al., 2013). Além da piora na fisiologia pulmonar, observa-se em obesos asmáticos, uma mudança de perfil celular no tecido pulmonar, com aumento de neutrófilos, resposta

imune de perfil Th17 (ZHAO; LLOYD; NOBLE, 2013) e redução dos níveis de IgE (FAJT; WENZEL, 2015), comparado à asma alérgica. Apesar dos estudos demonstrarem os efeitos da obesidade sobre a resposta imune alérgica, os mecanismos envolvidos na mudança de fenótipo clínico observado em obesos asmáticos, ainda não estão totalmente elucidados.

Recentemente, nosso grupo demonstrou, em modelo experimental, o aumento da resposta inflamatória nos pulmões de camundongos obesos alérgicos. Esse aumento foi associado a um atraso no desenvolvimento da resposta imune, o que acarretou menores níveis séricos de IgE, de citocinas de perfil Th2 consequentemente um menor influxo de eosinófilos para as vias aéreas. Em contrapartida houve aumento tardio de uma resposta de perfil Th17 com maior recrutamento de neutrófilos. Além disso, os animais obesos não alérgicos apresentaram um elevado número de mastócitos, aumento nos níveis das citocinas IL-9 e IL-17A, sugerindo um desequilíbrio da homeostasia pulmonar, independente do processo alérgico (SILVA et al., 2017). No entanto, os fatores que levaram os animais obesos alérgicos a apresentarem esse fenótipo diferenciado, ainda não foram elucidados.

Atualmente, descobertas no campo da microbiologia aliadas ao manejo de técnicas moleculares, abriram portas na busca pelo entendimento da influência de certos tipos de microrganismos, no aparecimento e agravamento de algumas doenças, dentre elas a asma e a obesidade (CHO; SHORE, 2016; KUMARI; KOZYRSKYJ, 2017; STATOVCI et al., 2017).

### **1.3 INFLUÊNCIA DA OBESIDADE NA MICROBIOTA E NA ASMA ALÉRGICA**

O termo microbiota foi primeiramente proposto por Joshua Lederberg em 2001, referindo-se à comunidade de microrganismos incluindo bactérias, fungos, vírus e protozoários que colonizam o corpo humano (LEDERBERG; MCCRAY, 2001). Esta microbiota está amplamente distribuída pela epiderme (GRICE; SEGRE, 2011), mucosas (MOEN et al., 2016), trato gastrointestinal (DONALDSON; LEE; MAZMANIAN, 2015), respiratório (MAN; DE STEENHUIJSEN PITERS; BOGAERT, 2017), trato urinário (MARTIN, 2012) e placenta (AAGAARD et al., 2014), desempenhando funções vitais para o organismo.

Uma das regiões com maior abundância de espécies de bactérias no corpo humano e um dos locais mais estudados, é o trato gastrointestinal (TGI), com mais de 100 trilhões de microrganismos (MARTÍNEZ; MULLER; WALTER, 2013). Em um indivíduo adulto, os principais filos encontrados são: Bacteroidetes, Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria, distribuídos ao longo do TGI em diferentes proporções. Fisiologicamente, a distribuição dessa microbiota é influenciada pelo pH local, disponibilidade de oxigênio, concentrações de ácidos biliares, tempo de retenção da digesta, quantidade de nutrientes, produção de mucinas e outros produtos de defesa do hospedeiro (DONALDSON; LEE; MAZMANIAN, 2015). Por exemplo, no intestino delgado, prevalecem bactérias que crescem rapidamente em um ambiente anaeróbio com alta produção de ácido biliático e produtos antimicrobianos. Esse local estimula o crescimento de bactérias pertencentes ao Filo Firmicutes e inibe àquelas do Filo Bacteroidetes (ISLAM et al., 2011). O ceco e o cólon são os locais mais abundantes em microrganismos do TGI, onde acontecem a digestão dos carboidratos provenientes de uma dieta rica em fibras, resultando na liberação de ácidos graxos de cadeia curta – SCFA (short chain fatty acids), os quais são essenciais no fornecimento de energia para o hospedeiro, função exercida principalmente, por bactérias do filo Bacteroidetes (GU et al., 2013).

Além do efeito proporcionado pelos SCFA nas células do sistema imune, a interação da microbiota intestinal com o sistema imunológico, estimula a produção de mucinas, peptídeos antimicrobianos e IgA, prevenindo o crescimento de bactérias patogênicas e seu acesso ao epitélio intestinal. Em contrapartida, as células imunes são capazes de tolerar a presença desses microrganismos, através de mecanismos que envolvem a participação de linfócitos T regulatórios (Tregs). Dessa forma, já foi observado que cepas da classe *Clostridia*, são capazes de induzir aumento na diferenciação, expansão e migração de Tregs no intestino (ATARASHI et al., 2013). Durante a colonização do intestino pela espécie *Bacteroides fragilis*, as CDs reconhecem o polissacarídeo A (PSA) presente na cápsula dessas bactérias, promovendo a produção de IL-10, assim contribuindo para um perfil regulatório (ROUND; MAZMANIAN, 2010). Além disso, alguns membros do filo Bacteroidetes influenciam o ambiente intestinal durante a diferenciação de linfócitos Th17 que são essenciais para estimular a produção de antimicrobianos pelas células epiteliais do intestino e para a manutenção da homeostasia no TGI (IVANOV et al., 2008).

Os efeitos da microbiota intestinal saudável também se estendem para outros órgãos como os pulmões. Em modelo experimental, os SCFA podem alcançar os pulmões e exercer um efeito protetor no desenvolvimento da asma, uma vez que atuam na hematopoiese e na ativação de CDs, levando a uma redução do perfil da resposta imune Th2 (TROMPETTE et al., 2014). Além desse efeito, Thoburn *et.al.*, demonstrou que a dieta materna rica em fibras, durante a gravidez, reduz o desenvolvimento de doenças alérgicas da prole na fase adulta (THORBURN et al., 2015). Esses trabalhos destacam a importância do eixo existente entre o TGI e os pulmões.

Por outro lado, alguns fatores externos como: infecções, consumo de dieta rica em lipídios e açúcares, pobre em fibras; e o uso constante de antibióticos, podem levar ao desequilíbrio da microbiota intestinal, também chamada de disbiose intestinal (FUJIMURA; LYNCH, 2015). Essa perturbação na homeostasia do TGI não está relacionada somente ao desenvolvimento da asma (ABRAHAMSSON et al., 2014), mas também a algumas doenças cardiovasculares (LI; TANG, 2018), doenças inflamatórias intestinais crônicas (RATH, 2003) e obesidade (GUIDA; VENEMA, 2015). Enfatizando o papel da dieta e sobretudo da obesidade na microbiota intestinal, em humanos obesos é encontrada menor diversidade bacteriana (LE CHATELIER et al., 2013; TURNBAUGH et al., 2009). Já é conhecido que os filos mais afetados são Firmicutes e Bacteroidetes, sendo que a obesidade promove redução de Bacteroidetes e aumento de Firmicutes no intestino (HARLEY I.T.W., 2012). Por outro lado, membros do filo Firmicutes têm maior capacidade de extrair e estocar energia da dieta e também de manipular o ganho de peso do hospedeiro (TURNBAUGH et al., 2006). Em adição, a obesidade acarreta aumento da permeabilidade intestinal, a qual promove a entrada de produtos bacterianos na corrente sanguínea, como o LPS, levando a uma inflamação sistêmica (PENDYALA; WALKER; HOLT, 2012; TEIXEIRA et al., 2012).

A microbiota intestinal durante a obesidade contribui para o processo inflamatório sistêmico, promovendo redução no metabolismo de SCFA (SCHWIERTZ et al., 2009), o qual já foi associado à proteção da asma (TROMPETTE et al., 2014). Esse efeito também é observado sobre a resposta imunológica, uma vez que a ação mútua entre a microbiota intestinal e células Th17, em níveis basais, contribuem para a homeostase intestinal, porém a disbiose promove aumento sistêmico dos níveis de

IL-17A, podendo chegar até os pulmões (MATHEWS et al., 2014). Enfatizando o papel da microbiota, a suplementação com probióticos se mostrou eficaz na redução da inflamação associada à obesidade, pela diminuição dos níveis sistêmicos de IL-17A (MOYA-PÉREZ; NEEF; SANZ, 2015). Da mesma forma, camundongos neonatos que receberam probióticos, preveniu o desenvolvimento da resposta imune alérgica pelo aumento de linfócitos Tregs (NUNES et al., 2018).

Nesse sentido, contribuindo para o efeito proporcionado pelos microrganismos, Strachan, em 1989 propôs a “Hipótese da Higiene”, a qual preconiza que a exposição reduzida à produtos microbianos na infância, poderia aumentar o risco de desenvolvimento de doenças alérgicas em indivíduos susceptíveis geneticamente (STRACHAN, 1989). Tal fato seria decorrente de um maior estímulo do sistema imune inato iniciado pelos componentes microbianos, com consequente desvio para a resposta imune do tipo Th1 em detrimento de uma resposta de perfil Th2 (GARN; RENZ, 2007). Neste contexto, a vacinação com o *Bacillus Calmette – Guerin* (BCG) induz o direcionamento da resposta imune para o perfil Th1, reduzindo o risco de desenvolvimento de alergias em humanos (LAGRANDERIE et al., 2010) e em modelo experimental (CLÁUDIA CARVALHO GOUVEIA et al., 2013). Outro trabalho mostrou que crianças que crescem em ambientes de fazendas apresentaram menores níveis de sensibilização a alérgenos em comparação àquelas, com a mesma idade, que não viveram nesse ambiente (PETERS et al., 2011). Uma das explicações seria a maior exposição a uma diversidade de microrganismos nestes locais durante a infância, que poderiam apresentar um efeito protetor no desenvolvimento de alergias (FROIDURE; PILETTE, 2016; ROOK, 2010; YAZDANBAKHS, 2012).

Contudo, se atentando para o passado das doenças alérgicas, estudos mais recentes demonstravam que a Hipótese da Higiene apresentava lacunas, uma vez que o aumento de doenças helmínticas em países em desenvolvimento, relacionada a uma resposta imune de perfil Th2, associado à redução de doenças alérgicas. Assim como doenças autoimunes, inflamatórias e certos tipos de infecções, de perfil Th1, não exercem um papel protetor na alergia (YAZDANBAKHS, 2012). A partir dessas descobertas, foi criada a “Hipótese da diversidade microbiana” ou biodiversidade, a qual discute a importância da relação entre a comunidade microbiana e o hospedeiro. Rook *et. al* e Haahtela *et. al* discutem que o equilíbrio entre a microbiota e o sistema imunológico é proporcionado pela presença de linfócitos Tregs e que o aumento na

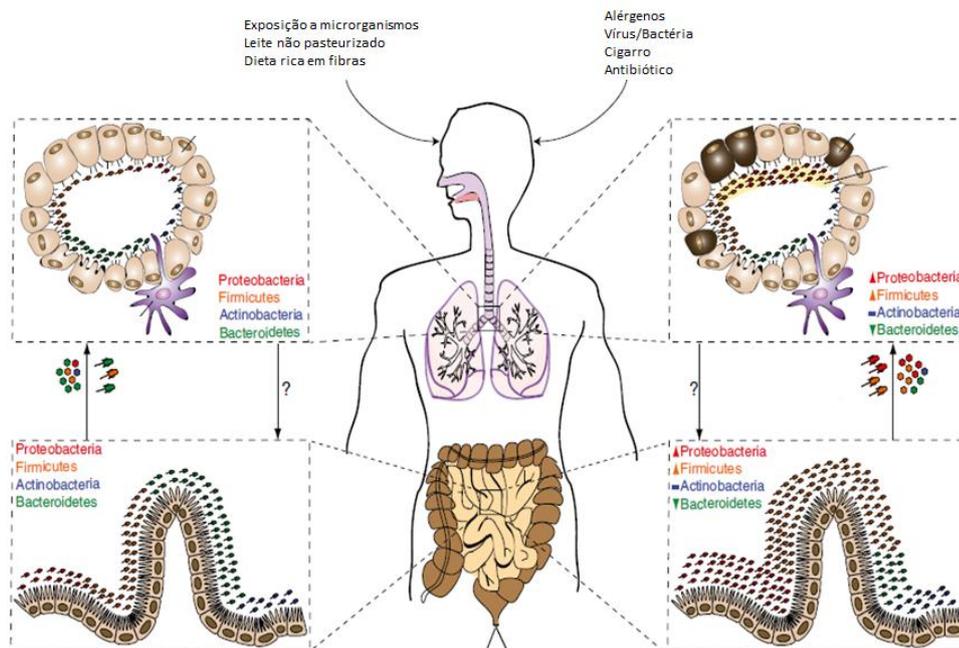
prevalência das alergias associada à disbiose intestinal, se deve à redução de Tregs e consequente redução na tolerância a esses microrganismos (ROOK, 2013; VON HERTZEN; HANSKI; HAAHTELA, 2011).

Em concordância com essa hipótese, estudos demonstram que o aumento de *Bacteroides fragilis* e uma menor abundância de *Escherichia coli* (*Proteobacteria* - gram-negativa) no TGI estão associadas ao maior risco de desenvolvimento de asma nos primeiros anos de vida (VAEL et al., 2008). Também já foi observado que durante a infância, crianças que apresentam susceptibilidade para desenvolver alergia, possuem menos LPS nas fezes (ARRIETA et al., 2015). A exposição ao LPS é importante pois ele regula respostas imunes do tipo Th2 e a baixa exposição pode afetar o desenvolvimento de tolerância das células intestinais e de alergias (DE SMEDT et al., 1996) Por outro lado, a presença de *Bifidobacterium longum* no intestino, diminui a incidência de asma em crianças (AKAY et al., 2014; VAN NIMWEGEN et al., 2011). Recentemente, foi realizado um estudo em camundongos neonatos, mostrando que o tratamento com a bactéria *H. pylori* após as sensibilizações e desafios com a OVA, foi capaz de prevenir o desenvolvimento de alergia, reduzindo a apresentação do antígeno pelas CDs nos pulmões e linfonodos (VAN WIJCK et al., 2018).

No início da vida, um fator relacionado com o aumento de doenças alérgicas é o tipo de parto, uma vez que a colonização da microbiota intestinal é iniciada durante o nascimento. Crianças que nascem por cesariana, apresentam colonização do intestino pela bactéria *Clostridium difficile*, a qual já foi associada a manifestações alérgicas no primeiro mês de vida e aumento de asma depois dos 6-7 anos (LEE; GONG; RYOO, 2017). Também já foi relatado que o tratamento com antibióticos na fase perinatal, contribui para mudanças no TGI, as quais influenciam o desenvolvimento de doenças pulmonares (RUSSELL et al., 2015).

A reformulação da “Hipótese da Higiene” se estende não só ao estabelecimento e composição de uma microbiota intestinal, mas também em outros tecidos, como nos pulmões. Nos últimos anos, com o avanço de técnicas independentes de cultivo para detecção de microrganismos, como por exemplo, a detecção de DNA (do termo em inglês *deoxyribonucleic acid*) bacteriano, pôde-se constatar que o ambiente pulmonar de um indivíduo saudável não é estéril (BASSIS et al., 2015; T BOUTIN; BRETT FINLAY, 2016). Embora o trato respiratório inferior apresente uma quantidade de

microrganismos muito menor que o trato respiratório superior, diversos fatores contribuem para a colonização nos pulmões. Em um ambiente pulmonar saudável, o fluxo de ar e de microrganismos é “bidirecional”, ou seja, a colonização pelas bactérias é dinâmica, tornando a microbiota pulmonar diferente daquelas do TGI, onde o fluxo é “unidirecional”. A diferença de temperatura observada nas porções do pulmão é outro fator importante para a distribuição regional de diferentes populações bacterianas. Na sua parte superior, onde se encontram a traqueia e os brônquios, as temperaturas são menores comparadas ao restante do corpo, por conta do ar frio que entra nos pulmões (HUFFNAGLE; DICKSON; LUKACS, 2017). Nesse ambiente, predominam bactérias semelhantes àsquelas encontradas na orofaringe. Os gêneros mais encontrados na porção inferior do pulmão, são: *Prevotella* (Bacteroidetes), *Streptococcus* (Firmicutes), *Fusobacterium* (Fusobacteria) e *Haemophilus* (Proteobacteria) (Figura 5) (AHO et al., 2015; DICKSON et al., 2017; MARSLAND; TROMPETTE; GOLLWITZER, 2015).



**Figura 5:** Ligação entre a microbiota pulmonar e intestinal durante a homeostase e em doenças respiratórias. Em um ambiente intestinal e pulmonar saudável, os filos mais predominantes são: Bacteroidetes e Firmicutes. Em uma doença respiratória, ocorre disbiose tanto da microbiota intestinal quanto das vias aéreas, com aumento dos filos Proteobacteria e Firmicutes. É proposto que exista comunicação entre a microbiota desses dois compartimentos, levando a alterações na resposta imunológica tanto pelo crescimento de bactérias no trato respiratório quanto pelo aumento na disponibilidade de seus metabólitos, como por exemplo, os ácidos graxos de cadeia curta que promovem o crescimento de certas bactérias (Bacteroidetes) e / ou atuam diretamente como moléculas imunomoduladoras. (Adaptado de Marsland *et al.*, 2015).

A presença dessa microbiota pulmonar saudável, auxilia na manutenção da integridade do tecido (YUN et al., 2014) e na homeostasia pulmonar (GOLLWITZER et al., 2014). Gollwitzer *et. al* demonstrou que a microbiota pulmonar, em neonatos, promove tolerância a alérgenos inalados, por um mecanismo mediado pela expressão do ligante da molécula inibitória PD-1 (do termo em inglês - *programmed death-1*) o PDL-1 (do termo em inglês - *programmed death ligand*) em CDs, levando ao desenvolvimento de um perfil regulatório (GOLLWITZER et al., 2014). Além desses efeitos, os microrganismos têm a capacidade de modular o sistema imune inata. Já foi demonstrado em modelo experimental, que a exposição intranasal a *Escherichia coli* e *Acinetobacter Lwoff* protegem contra alergia, via reconhecimento pelos TLRs 2, 3, 4, 7 e 9 (CONRAD et al., 2009). Eder *et.al*, 2004, mostrou que um polimorfismo no gene que codifica o receptor TLR-2, foi relacionado a um menor diagnóstico de asma em crianças (EDER et al., 2004). A infecção por *Acinetobacter baumannii*, foi capaz de reduzir eosinófilos no LBA e também a produção de muco nas vias aéreas em modelo de asma alérgica (QIU et al., 2011).

Por outro lado, a espécie *Streptococcus pneumoniae* encontrada no pulmão, foi associada a um maior desenvolvimento de asma crônica em adultos e crianças (CLINICAL; JOURNAL, 2010; KLEMETS et al., 2010). As espécies de bactérias *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Moraxella catarrhalis* e *Pseudomonas aeruginosa* estão associadas a um perfil de asma neutrofílico, com aumento na expressão da quimiocina CXCL8 (*motif chemokine ligand 8*) – quimioatraente para neutrófilos. Esses eventos estão relacionadas ao aumento no reconhecimento dessas bactérias pelo receptores TLR-2 e TLR-4 (GREEN et al., 2014; SIMPSON et al., 2007).

Na asma, a microbiota pulmonar sofre disbiose (HILTY et al., 2010a). A partir do sequenciamento do gene ribossomal 16S, foram encontradas no lavado broncoalveolar-LBA (do termo em inglês – *bronchoalveolar lavage*) aproximadamente, 5000 sequências de genes de bactérias em pacientes com asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (HILTY et al., 2010). Danos à barreira epitelial e na função dos cílios, redução do reflexo da tosse, aumento da secreção e viscosidade do muco em decorrência da asma, levam a um aumento da temperatura dos pulmões, criando zonas anaeróbias, alterando a disponibilidade de nutrientes e pH que favorecem o crescimento de microrganismos patogênicos, ao invés de eliminá-los (SULLIVAN et

al., 2016). Em um ambiente pulmonar saudável observa-se uma predominância de componentes do Filo Bacteroidetes, ao contrário do que é encontrado em doenças pulmonares, onde se encontram maior número de bactérias da classe Gammaproteobacteria. Importante ressaltar que essa classe tem a capacidade de utilizar subprodutos da inflamação para sobreviver em condições com baixa oxigenação (CHARLSON et al., 2011; HILTY et al., 2010a; KRAUSE et al., 2017; SCALES; DICKSON; HUFFNAGLE, 2016). Dentre as espécies, destacam-se *Haemophilus influenza*, *Moraxella catharralis*, todas gram-negativas pertencentes ao Filo Proteobacteria (78,79).

Baseado nas informações acima e considerando o importante papel da disbiose do TGI no desenvolvimento, tanto da obesidade quanto da asma, e a escassez de estudos avaliando o papel da obesidade sobre a microbiota pulmonar, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência da obesidade sobre a microbiota pulmonar e na modulação de células dendríticas em modelo murino de asma alérgica.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da obesidade sobre a microbiota pulmonar e sua influência na modulação de células dendríticas em camundongos BALB/c submetidos ao modelo experimental de asma alérgica.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a obesidade induzida por dieta hiperlipídica em camundongos da linhagem BALB/c, através dos seguintes parâmetros:
  - ✓ Acompanhamento do consumo diário da dieta e do ganho semanal de massa corporal;
  - ✓ Avaliação do acúmulo de tecido adiposo na região perigonadal.
  
- Avaliar a influência da obesidade sobre modelo de alergia pulmonar induzida por ovalbumina, através dos seguintes parâmetros:
  - ✓ Contagem total e diferencial de células no LBA e de granulócitos na medula óssea;
  - ✓ Avaliação do grau do infiltrado celular inflamatório no tecido pulmonar; contagem de eosinófilos e células caliciformes produtoras de muco no tecido pulmonar;
  - ✓ Determinação da atividade da MPO e dos níveis de CCL11 no homogenato de tecido pulmonar;
  - ✓ Dosagem de citocinas (TSLP, IL-25, IL-33, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e IL-17A) e anticorpos (IgE anti-OVA, IgG1 anti-OVA e IgG2a anti-OVA) no tecido pulmonar através de ELISA.

- Avaliar a influência da obesidade na microbiota pulmonar e na modulação de células dendríticas em modelo de alergia pulmonar:
  - ✓ Quantificar e identificar os grandes grupos de bactérias no pulmão através da técnica de FISH (Hibridização Fluorescente *in situ*);
  - ✓ Quantificação relativa por qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase) dos filos de bactérias no intestino e pulmões e da espécie *Moraxella catharralis* nos pulmões;
  - ✓ Realizar cultura de células dendríticas derivadas da medula óssea.
  - ✓ Obter a microbiota pulmonar;
  - ✓ Estimular, *in vitro*, células dendríticas com a microbiota pulmonar;
  - ✓ Avaliar através de citometria de fluxo a expressão de moléculas co-estimulatórias (CD80 e MHCII), inibitória (PD-L1) e receptores da imunidade inata (TLR-2 e TLR-4) em células dendríticas pulmonares e derivadas da medula óssea, estimuladas ou não com a microbiota pulmonar;

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Para realização deste trabalho, foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem BALB/c, com 4-6 semanas idade, provenientes do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora (CBR-UFJF). Estes animais foram mantidos no setor de manutenção e experimentação do Laboratório de Imunologia do ICB-UFJF, onde ficaram em gaiolas-padrão, em estante climatizada. O protocolo experimental realizado nesse trabalho está de acordo com a Comissão de Ética na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFJF) da Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora, sob o protocolo 038/2016.

#### 3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais, de acordo com a indução da asma e da obesidade. Grupo controle (CN), alimentados com dieta padrão, sem a indução de alergia; grupo obesidade (OB), alimentado com dieta hiperlipídica, sem indução de alergia; grupo alergia pulmonar (AP), alimentado com dieta padrão, sensibilizados e desafiados com ovalbumina; grupo obesidade e alergia pulmonar (OB/AP), alimentado com dieta hiperlipídica, sensibilizados e desafiados com ovalbumina (Tabela 1).

**Tabela 1:** Divisão dos grupos experimentais de acordo com a indução dos modelos.

Grupos	Identificação	Indução do modelo de obesidade	Indução do modelo de alergia pulmonar
CN	Controle	-	-
OB	Obesidade	+	-
AP	Alergia pulmonar	-	+
OB/AP	Obesidade e alergia pulmonar	+	+

### 3.3 COMPOSIÇÃO DAS DIETAS

Foram utilizadas durante todo o protocolo dois tipos de dietas: a dieta padrão comercial para roedores AIN 93G da marca Nuvilab®, contendo por Kg, 10% de Kcal derivada de gordura; e a dieta hiperlipídica (Prag Soluções Biociências Ltda) contendo por Kg, 60% de Kcal derivada de gordura. Na tabela 2 foram discriminados os constituintes de ambas as dietas.

**Tabela 2:** Composição das dietas padrão e hiperlipídica em gramas.

<b>Composição</b>	<b>Dieta Padrão</b>	<b>Dieta Hiperlipídica</b>
Amido de milho	398,0	0,000
Caseína	200,0	258,500
Amido dextrinizado	132,0	161,500
Sacarose	100,0	89,000
Óleo de soja	70	32,300
Fibra	50,	64,600
L-cistina	3,00	3,900
Colina	2,50	2,600
BHT	0	0,28
Mix mineral PSB 10026	35,0	12,900
Mix vitamínico	10,0	12,900
Banha	0,0	316,600
Fosfato de Cálcio dibásico	0	16,800
Citrato de Potássio	0	21,300
Carbonato de Cálcio	0	7,100
<b>TOTAL</b>	<b>1000,03</b>	<b>1000,28</b>

### **3.4 INDUÇÃO DO MODELO DE OBESIDADE**

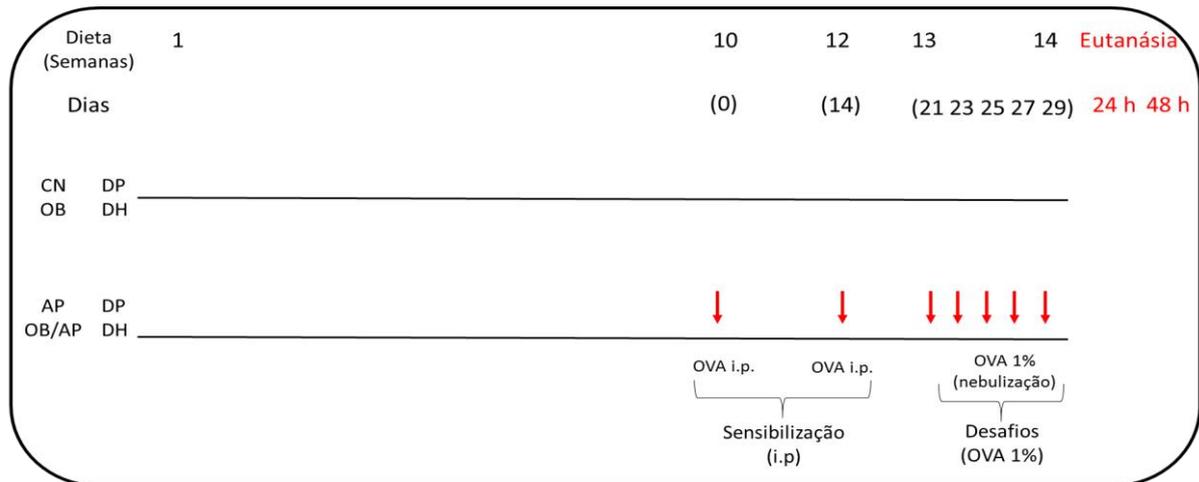
Para indução do modelo de obesidade, os animais do grupo OB, foram alimentados com dieta hiperlipídica, contendo 60% de calorias derivadas de gordura por 14 semanas. Já os animais dos grupos CN e AP, foram alimentados com a dieta padrão comercial, contendo 10% de gordura durante todo o protocolo.

### **3.5 AVALIAÇÃO DA PORCENTAGEM DE GANHO DE MASSA CORPORAL**

Durante todo o protocolo de indução da obesidade, os animais tiveram sua ração controlada e pesada em balança semi-analítica (Micronal B6000®, Brasil) duas vezes por semana, no mesmo horário. O peso dos animais foi avaliado semanalmente, nos mesmos dias e horários, durante 14 semanas, para obtenção da porcentagem de ganho de massa.

### **3.6 INDUÇÃO DO MODELO DE ALERGIA PULMONAR EXPERIMENTAL**

A indução do modelo de alergia pulmonar, foi realizada nos grupos AP e OB/AP através de duas sensibilizações. A primeira, correspondeu à 10<sup>a</sup> semana de dieta e a segunda na 12<sup>a</sup> semana de dieta, correspondendo aos dias 0 e 14 do protocolo de indução da alergia pulmonar. Os animais foram imunizados com injeção intraperitoneal contendo 3 µg de OVA (Grade V, Sigma-Aldrich Corp, EUA) e 1 mg de hidróxido de alumínio (Sigma-Aldrich Corp, EUA). Posteriormente, na 13<sup>a</sup> semana de dieta, correspondendo aos dias 21, 23, 25, 27 e 29 do protocolo de indução de alergia pulmonar, os animais foram desafiados através de nebulização com OVA 1% em tampão PBS por 20 minutos. Todos os animais foram eutanasiados em 24 e 48 horas após o último desafio com a OVA. A figura 6 mostra o delineamento experimental da indução do modelo de alergia pulmonar.



**Figura 6:** Delineamento experimental. Delineamento experimental do protocolo de indução de obesidade e alergia pulmonar experimental. DP – dieta padrão; DH – Dieta hiperlipídica.

### 3.7 OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO

As amostras biológicas foram coletadas após 14 semanas de dieta, nos tempos de 24 e 48 horas após o último desafio com OVA. A eutanásia dos animais foi feita através de dose letal de solução de ketamina (90mg/Kg, Syntec, Brasil) e xilasina (10mg/kg, Agener União, Brasil) por via intraperitoneal, seguida de exsanguinação e ruptura do diafragma. As amostras foram devidamente identificadas, armazenadas individualmente, e mantidas sob refrigeração em freezer a -80°C até serem processadas e analisadas.

#### 3.7.1 Coleta do soro

Após a anestesia, o sangue foi coletado a partir de punção cardíaca. As amostras foram centrifugadas a 7.500 x g, por 10 minutos à temperatura ambiente (Centrífuga 5410, Eppendorf, Alemanha) para obtenção do soro, que foi armazenado a -80°C.

Para análise de IgE, IgG1 e IgG2a anti-OVA, uma alíquota do soro foi acondicionada para posterior detecção do anticorpo específico quantificado como densidade ótica (DO) em leitor de microplacas (SpectraMax 190, Molecular Devices, EUA).

### **3.7.2 Coleta e processamento do Lavado Bronco-Alveolar (LBA) para contagem total e diferencial de células**

O lavado broncoalveolar (LBA) foi coletado através da inserção de sonda (CPL Medical's, São Paulo, SP, Brasil) na traquéia exposta. Os pulmões foram então lavados com 1.0 mL de PBS 1x e logo em seguida, o LBA coletado foi utilizado para a contagem total de células, posteriormente centrifugado a 1500 rpm, por 15 minutos a 4°C (CR 312, Thermo Electron Corporation, EUA, para contagem diferencial de células.

### **3.7.3 Coleta da medula óssea**

Para contagem de granulócitos na medula óssea, os dois ossos do fêmur dos animais foram retirados com material cirúrgico (pinças e tesouras). O canal medular foi lavado com 1 mL de PBS 1x gelado, utilizando uma seringa de 5 mL e uma agulha (25x0,70 mm ou 22G). A suspensão coletada foi utilizada para contagem total e diferencial de granulócitos na medula óssea.

### **3.7.4 Coleta e processamento do pulmão para dosagem de citocinas, CCL11 e da atividade da enzima MPO.**

Após a coleta do LBA, a caixa torácica do animal foi exposta, em seguida o lobo pulmonar esquerdo foi coletado e acondicionado à -80° C para posterior dosagem citocinas, CCL11 e MPO. Para a obtenção do homogenato, 100 mg do lobo esquerdo do pulmão foi macerado em 1 mL de PBS contendo inibidores de proteases (0,1mM fluoreto de fenilmetilsulfonil, 0,1 mM cloreto de benzetonio, 10 mM EDTA e 2 µL de aprotinina A) e 0,05% Tween 20. As amostras foram então centrifugadas a 3000 rpm, por 15 minutos a 4°C (CR 312, Thermo Electron Corporation, EUA). Os sobrenadantes foram armazenados a -80°C, até serem utilizados para dosagem de citocinas e quimiocinas através de ELISA.

### **3.7.5 Coleta do tecido adiposo perigonadal**

O tecido adiposo perigonadal foi coletado por incisão na região abdominal. Em seguida, foi pesado em balança semi-analítica (Micronal B6000®, Brasil).

### **3.7.6 Coleta do intestino**

O ceco do animal foi removido por corte nas regiões proximal e distal. Posteriormente, o mesmo foi limpo para retirada da digesta, colocado em microtubo e armazenado em -80°C para quantificação do DNA bacteriano por qPCR.

## **3.8 DOSAGEM SÉRICA DE ANTICORPOS ANTI-OVA**

A avaliação da produção IgE, IgG1 e IgG2a específica anti-OVA foi analisada através de ELISA. Após a sensibilização com 10 µL de OVA (Grade V; Sigma-Aldrich Corp, St Louis, MO, USA) em 1 mL de tampão carbonato (100 µL/poço), a placa foi incubada a 4°C por 18 horas e lavada com PBST. Após bloqueio com 5% de caseína em PBST (200 µL/poço), a placa foi lavada e as amostras de soro foram adicionadas, na concentração de 1:20 (IgE, IgG1 e IgG2a) seguindo-se uma incubação por 1 hora. A seguir, a placa foi novamente lavada e os anticorpos anti-IgE, IgG1 e IgG2a, (Pharmlingen™, Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) foram adicionados. A estreptavidina marcada com peroxidase (Pharmlingen™, Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) foi adicionada após incubação (1h a TA) e lavagem da placa. A seguir, a reação foi revelada pela adição de substrato contendo ácido cítrico 0,1M, citrato de sódio 0,1M, água destilada, cromógeno OPD e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%. A reação foi bloqueada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N e a leitura foi realizada em leitor de microplacas a 492 nm (SpectraMax® 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). A detecção do anticorpo específico foi quantificada como densidade ótica (DO) em leitor de microplacas (SpectraMax 190, Molecular Devices, EUA).

### **3.9 CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS NO LAVADO BRONCOALVEOLAR**

A contagem total de células no LBA foi realizada utilizando corante de Turk (Sigma-Aldrich). As células foram contadas em câmara de Neubauer e os resultados foram expressos como número específico de células x  $10^4$ /mL de LBA. O sedimento do LBA foi utilizado para a contagem diferencial de leucócitos, feita em *cytospin*. Para isto, 200  $\mu$ L do sedimento do LBA, contendo aproximadamente  $1 \times 10^4$  células, foram citocentrifugados a 600 rpm x g por 6 minutos à T.A (FANEM 248, São Paulo, Brasil). Posteriormente, as lâminas foram coradas com Panótico rápido (Laborclin Ltda, Pinhais, Brasil), sendo contadas 300 células por lâmina, em microscópio ótico Zeiss (Hallbergmoos, Alemanha) em aumento de 400X.

### **3.10 CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE GRANULÓCITOS NA MEDULA ÓSSEA**

Após a coleta na medula óssea, a suspensão celular foi diluída na proporção de 1:10 e homogeneizada em tubo cônico de 15 mL. Esta suspensão celular foi utilizada para contagem total de células em câmara de Neubauer (com corante de Turk). Para isto, 100  $\mu$ L do sedimento do eluído de medula óssea, contendo aproximadamente  $1 \times 10^6$  células, foi citocentrifugado a 600 rpm por 6 minutos à T.A (FANEM 248, São Paulo, Brasil). Posteriormente, as lâminas foram coradas com Panótipo rápido (Laborclin Ltda, Pinhais, Brasil). De acordo com critérios morfológicos e com a coloração diferenciada apresentada pelos grânulos eosinofílicos, foram contadas 300 células no total entre neutrófilos e eosinófilos maduros, em microscópio ótico Zeiss (Hallbergmoos, Alemanha) em aumento de 400X.

### **3.11 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO TECIDO PULMONAR**

Para avaliação histológica, o lobo pulmonar direito foi fixado por 24h em solução de formol tamponado 10% e após esse tempo foi acondicionado em álcool 70%, até a inclusão em parafina. Após os procedimentos rotineiros de inclusão em parafina, foram realizados cortes semi-seriados de 4  $\mu$ m de espessura, em micrótomo (Leica RM 2125RT, Biosystems, Alemanha).

### **3.11.1 Escore inflamatório**

Para a determinação do escore inflamatório, as lâminas foram coradas com Hematoxilina e eosina (H&E) e observadas em toda sua extensão em microscópio óptico Zeiss (Hallbergmoos, Alemanha), em aumento de 200X. As áreas peribronquiolar e perivascular foram avaliadas de acordo com o grau de infiltrado celular inflamatório, ao qual foram atribuídos escores de 0 a 5 para cada campo (CLÁUDIA CARVALHO GOUVEIA et al., 2013). Onde 0, ausência de processo inflamatório; 1, células inflamatórias esparsas; 2, uma camada de células inflamatórias ao redor da estrutura avaliada; 3, anel de células inflamatórias contendo 2 a 4 camadas; 4, aglomerado focal de células inflamatórias ao redor da estrutura; 5, infiltrado inflamatório intenso.

### **3.11.2 Número de eosinófilos no tecido pulmonar**

Para realização da contagem de eosinófilos no tecido pulmonar, após seções rotineiras de desparafinização e reidratação, os cortes foram corados com o corante Direct Red 80-Sirius Red (Sigma Aldrich), por uma hora, e foram analisados 20 campos, em uma área delimitada por retículo Olympus (10  $\mu\text{m}$  X 10  $\mu\text{m}$ ) na região peribroncovascular, em aumento de 1000X, a contagem foi expressa por número de eosinófilos por 100  $\mu\text{m}^2$ .

### **3.11.3 Número de células produtoras de muco no epitélio pulmonar**

A avaliação da produção de muco pelas células caliciformes foi realizada nos cortes pulmonares corados com Ácido periódico Shiff (PAS) (Easypath – Erviegas Ltda) e foi expressa pela média da contagem do número de células PAS positivas por 100  $\mu\text{m}^2$  em 20 campos, sendo a área delimitada por retículo Olympus (10  $\mu\text{m}$  X 10  $\mu\text{m}$ ) na região do epitélio pulmonar, em aumento de 400X.

## **3.12 DOSAGEM DE CITOCINAS E CCL11 NO HOMOGENATO DO TECIDO PULMONAR E NO SOBRENADANTE DA CO-CULTURA**

O sobrenadante do homogenato do tecido pulmonar foi utilizado no ensaio enzimático ELISA para as citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 (BD OptEIA, BD Biosciences,

EUA), IL-9, IL-13, IL-25, IL-33, TSLP e a quimiocina CCL11 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), IL-17A (eBioscience, Inc) de acordo com as instruções dos fabricantes. Para isso, placas de 96 poços foram sensibilizadas com o anticorpo de captura diluído em tampão e incubadas por 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas em PBS Tween 20 0,05% (PBST), seguindo-se um bloqueio dos sítios inespecíficos da placa por 1 hora. As amostras foram adicionadas em cada poço e paralelamente para obtenção das curvas-padrão, foram adicionadas as concentrações conhecidas dos recombinantes específicos para cada citocina. Após o tempo pré estabelecido foram realizadas a lavagem das placas. Em seguida para os kits BD OpTEIA, o complexo anticorpo de captura biotilado e streptavidina foram adicionados e incubados por 2 horas a TA. Para os kits R&D Systems eBioscience, primeiramente foi adicionado e incubado o anticorpo de captura por 2 horas a TA, as placas foram lavadas e posteriormente adicionadas a streptavidina por 1 hora a TA, quando as placas foram lavadas foi adicionado o substrato. A reação foi interrompida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M e as leituras foram realizadas a 450 nm em leitor de microplacas (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices, EUA).

### **3.14 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO)**

Para a dosagem da atividade da enzima MPO o sedimento do homogenato pulmonar foi processado, após lise das hemácias, as amostras foram novamente centrifugadas a 440 x g, por 15 minutos a 4°C (CR 312, Thermo Electron Corporation, EUA), o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 3 mL de hexadeciltrimetil brometo de amônio (HTAB) 0,5% em PBS e homogeneizado. A seguir, as amostras foram congeladas três vezes em nitrogênio líquido e centrifugadas conforme condições descritas acima.

Para avaliação da MPO, 100ul de cada amostra foi adicionado em cada poço, posteriormente foram adicionados 100ul de substrato com 6mM de OPD em tampão citrato a 10mM (pH = 4,5) acrescido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A reação foi parada com 50 ul de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M e a leitura foi realizada a 492 nm em leitor de microplacas (SpectraMax® 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

### 3.15 HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE *IN SITU* (FISH)

Os pulmões dos animais foram coletados em ambiente estéril, pesados e acondicionados em 1 mL de solução de paraformaldeído a 2%, transferidos para tubo cônico de 1,5 mL e refrigeradas a 4°C até o processamento. As amostras foram maceradas utilizando *cell strainer* (70µm) e logo após foi adicionado 0,001% de TWEEN, sonicadas (Vibra Cell VCX 130PB, Sonics & Materials<sup>®</sup>) em uma frequência de 3 Hertz por minuto, três vezes, com intervalo de 1 minuto para cada amostra. Em seguida, o material foi centrifugado por três vezes a 500 g por 5 minutos, o sobrenadante foi removido e o pellet ressuspendido em água ultra pura. O material foi filtrado a vácuo em filtros de polycarbonato (Nuclepore<sup>®</sup> - 0,2 µm). As amostras de pulmão foram previamente filtradas em filtro de polycarbonato de 2 µm (Nuclepore<sup>®</sup>), para que as células do tecido ficassem ali retidas e em seguida a solução foi filtrada em filtro de 0,2 µm.

Posteriormente, foi realizado o processo de hibridização. Os filtros contendo as amostras foram marcados com a sonda específica e colocados em lâminas. As sondas foram diluídas em seus respectivos tampões de hibridização, na concentração final de 2,5 ng/µL e colocadas em câmara de hibridização a 42°C por 12 horas.

Após esse tempo, o excesso de sonda foi retirado com solução de lavagem específica e colocadas na estufa a 48°C durante 15 minutos. Posteriormente, as amostras foram coradas com *DAPI* (4',6-diamidino-2-phenylindole) por 5 minutos e em seguida as lâminas foram montadas com glicerol PBS 2% e visualizadas em microscópio de fluorescência (Olympus, USA).

Também foi realizada a hibridização nos tecidos pulmonar e do ceco. Os pulmões e o ceco dos animais foram retirados em ambiente estéril e acondicionados em paraformaldeído a 2% durante 24h e no dia seguinte as amostras foram passadas para o álcool 70%. Após os procedimentos rotineiros de inclusão com parafina descritos anteriormente, os cortes passaram por três banhos de xilol por 10 minutos cada, a fim de retirar o excesso de parafina dos tecidos. A partir desse procedimento, o material foi submetido à hibridização com a sonda EUB 338, seguindo o protocolo descrito anteriormente para a realização da técnica de FISH (FARIA CARRADA et al., 2016; YUN et al., 2014). O quadro 1 mostra as sondas utilizadas com sua respectiva solução de hibridização.

**Quadro 1:** Sondas utilizadas para a técnica de FISH. \*Porcentagem de formamida da solução de hibridização.

Grupos alvo	SONDA - Cy3	Sequência (5'- 3')	% de FA*
-	NON	TAGTGACGCCGTCGA	30
Universal	EUB338 I	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	30
	EUB338 II	GCAGCCACCCGTAGGTGT	
	EUB338 III	GCTGCCACCCGTAGGTGT	
Bacteroidetes	BAC303	CCAATGTGGGGGACCTT	40
Fusobacteria	FUS664	CTTGTAGTTCCGCTACCTC	40
Actinobacteria	HCG236	AACAAGCTGATAGGCCGC	30
Firmicutes	LGC354A	TGGAAGATTCCCTATTGC	35
	LGC354B	CGGAAGATTCCCTACTGC	
	LGC354C	CCGAAGATTCCCTACTGC	
Alphaproteobacteria	ALF968	GGTAAGGTTCTGCGCGTT	30
Betaproteobacteria	BET42a	GCCTTCCCCTTCGTTT	
Gammaproteobacteria	GAM42a	GCCTTCCCACATCGTTT	
Epsilonproteobacteria	EPSY549	CAGTGATTCCGAGTAACG	

### 3.16 EXTRAÇÃO DE DNA BACTERIANO DO TECIDO PULMONAR E INTESTINO

Para extração de DNA bacteriano, foram coletados um lóbulo pulmonar de aproximadamente 0,2 mg de pulmão e fragmento do ceco 0,4 mg. Após a coleta, as amostras foram maceradas com *cellstrainer* (70 µm) em solução de TE (Tris-EDTA: Tris 10nM e EDTA 1nM pH 8,0). Posteriormente, o macerado foi centrifugado a 500 rpm por 1 minuto para que as fibras e os restos alimentares decantassem e as células ficassem em suspensão. Foi coletado o sobrenadante, centrifugou-se novamente a 1200 rpm por 15 minutos, adicionou-se 500 µL de solução de lise (Sacarose 25% em TE, EDTA 0,5M, Tris 1M, Lisozima e H<sub>2</sub>O). Nessa etapa, as amostras ficam em banho-maria 37°C por 10 minutos. Posteriormente, adicionou-se 50 µL de SDS 20% (Duodecil sulfato de sódio diluído em TE) e incubou à T.A. por 30 minutos.

A extração do DNA se deu a partir do protocolo de fenol-clorofórmio. Adicionou-se 500 µL de fenol, foi agitado e centrifugado por 14000 rpm durante 10 minutos, foi

retirada a fase aquosa e foi passado para um novo tubo microtubo de 1,5 mL e descartou-se a parte com o fenol. Após esse processo, acrescentou-se 500  $\mu\text{L}$  de clorofórmio à solução, novamente foi centrifugado a 14000 rpm por 10 minutos, retirou-se a fase aquosa e esta foi transferida para outro tubo de 1,5 mL, sendo a parte com clorofórmio descartada. Em seguida adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  de acetato de sódio 5M diluído em água ultra pura, 1,2 mL de etanol gelado e deixar 18 horas a 4°C.

Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 30 minutos, desprezou-se o sobrenadante, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de etanol 70%, centrifugou 14000 rpm por 5 minutos, retirou-se o excesso de álcool e o restante secou à TA. Posteriormente, o DNA foi ressuspendido em 50  $\mu\text{L}$  de solução de TE, quantificado em aparelho nanodrop e armazenado em freezer -20°C.

### **3.17 QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DO DNA BACTERIANO POR QPCR**

Para realização da reação de qPCR, as amostras de DNA foram diluídas para a concentração final de 50 ng/ $\mu\text{L}$ . A reação foi feita em placa de 96 poços e realizada da seguinte forma: para os pulmões, o volume final da reação foi de 25  $\mu\text{L}$ , contendo 12,5  $\mu\text{L}$  do qPCR mix, 3  $\mu\text{L}$  de DNA a uma concentração de 50 ng/ $\mu\text{L}$ , 1,25  $\mu\text{L}$  de cada primer a uma concentração de 0,5  $\mu\text{M}$  e 7  $\mu\text{L}$  de água livre de DNAase (Promega®) e para o ceco 5  $\mu\text{L}$  de reação de PCR, contendo 5  $\mu\text{L}$  do qPCR mix, 3  $\mu\text{L}$  de DNA a uma concentração de 50 ng/ $\mu\text{L}$ , 0,5  $\mu\text{L}$  de cada primer a uma concentração de 0,5  $\mu\text{M}$  e 1  $\mu\text{L}$  de água livre de DNAase (Promega®), totalizando 10  $\mu\text{L}$  da reação. A sequência dos primers utilizados encontram-se no quadro 2.

**Quadro 2: Primers utilizados para realização da qPCR.** Para bases degeneradas, de acordo com (IUPAC): R = representa nucleotídeos A/G, Y = representa nucleotídeos C/T e V = representa nucleotídeos A/C/G.

Grupos alvo	Sequência (5'- 3')	Referência
Universal	ATTACCGCGGCTGCTGG ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	(GUO et al., 2008)
Bacteroidetes	CRAACAGGATTAGATACCCT GGTAAGGTTCCCTGCGGTAT	(TROMPETTE et al., 2014b)
Firmicutes	TGAAACTYAAAGGAATTGACG ACCATGCACCACCTGTC	(TROMPETTE et al., 2014b)
Proteobacteria	CATGACGTTACCGCGAGAAGAAG CTCTACGAGACTCAAGCTTGC	(LEULIER; LEMAITRE, 2008)
<i>Moraxella catharralis</i>	GTGAGTGCCGCTTTAVCAACC TGTATCGCCTGCCAAGACAA	(KAIS et al., 2006)

A qPCR foi realizada no sistema StepOne Plus (Applied Biosystems) usando as seguintes condições: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, 95 °C por 15 segundos 60 °C por 1 minuto, com 40 ciclos. Os valores de Ct foram calculados a partir da fórmula previamente descrita (YUN-WEN YANG, 2015), considerando os valores de Ct <35 positivo e ≥36 e <40 são indeterminados (BOLOTIN et al., 2015). Foram realizadas duplicatas e o resultado foi obtido no Software do StepOne Plus (Applied Biosystems).

### 3.18 CITOMETRIA DE FLUXO

Para análise de citometria de fluxo, os pulmões dos animais foram coletados e acondicionados em 10 mL de meio de cultura RPMI até o processamento. As amostras foram maceradas em tampão de extração (Meio de cultura RPMI com 5% de Soro Fetal Bovino e 0,075 g de EDTA – etileno diamina tetra acetato dissódico) em *cellstrainer* (70 µm). Em seguida, os macerados foram centrifugados a 1500 rpm, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado em 1 mL de Tampão de FACS (PBS 1x com 2% de Soro Fetal Bovino e 0,1% de azida sódica).

Uma alíquota das células foi contada com Azul de Tripán (1:20) e foram plaqueadas  $1 \times 10^6$  de células por poço em placa de fundo U. Para bloquear possíveis regiões que o anticorpo possa se ligar, foi feita uma solução de bloqueio de receptores Fc (1:150 de soro de camundongo em tampão FACS). Após esse processo, as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm, por 10 minutos, a 4°C. A marcação das células com os anticorpos específicos estão no quadro 3. Foi realizada a leitura de 50.000 eventos em citômetro FACSCantoll (BD, EUA). As análises dos dados foram realizadas no software Flow J V10 (BD, EUA).

**Quadro 3:** Especificações dos marcadores utilizados na Citometria de Fluxo

Painel	Marcador	Diluição	Fluorocromo	Clones	Fabricante
CDs	CD11c	1:200	BV 510	HL3	BD
	CD11b	1:200	FITC	M1/70	
	MHCII	1:200	APC	MAS-32.1	
	CD80	1:150	PE	16-10A1	
	PDL-1	1:150		MIH5	
	TLR-2	1:100		6C2	
TLR-4	TF901				

### 3.19 CO-CULTURA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA COM A MICROBIOTA PULMONAR

Para derivação de células dendríticas da medula óssea dos animais dos grupos controle e obeso, foram retirados os dois fêmures dos animais, em fluxo laminar, utilizando materiais cirúrgicos estéreis. Os ossos foram limpos, cortados em suas duas extremidades e lavados, inserindo uma seringa no canal medular com 5 mL de meio de cultura RPMI para cada. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm, por 5 minutos, a 4°C e o precipitado foi ressuscitado em 1 mL de meio de cultura RPMI suplementado (10% de Soro Fetal Bovino, 1% de antibiótico, 1% de aminoácido e os fatores de crescimento celular GM-CSF na concentração de 20 ng/mL e IL-4 na concentração de 10ng/mL).

Uma alíquota foi retirada para contagem de células diluídas em Azul de Tripán (1:50) em Câmara de Neubauer afim de verificar a viabilidade celular. Logo após, as

células foram plaqueadas na concentração de  $5 \times 10^6$ /mL, em placas de 6 poços e incubadas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C por 4 dias. No 4º dia, as amostras foram coletadas, transferidas para um tubo cônico e centrifugadas a 1000 rpm, por 10 minutos, 10°C, posteriormente, foi descartado o sobrenadante e o pellet foi ressuscitado em meio de cultura RPMI suplementado e as células foram novamente plaqueadas em placa de 6 poços e novamente colocadas na estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por mais três dias.

No 7º dia, foram adicionados mais 2 mL de meio de cultura RPMI suplementado, as células foram transferidas para tubo cônico, centrifugadas a 1000 rpm, por 10 minutos, 10°C e o “pellet” foi ressuscitado em meio não suplementado com os recombinantes e uma alíquota foi novamente usada para contagem em Câmara de Neubauer, com posterior plaqueamento das células na concentração de  $5 \times 10^4$  células/poço em placa de fundo U.

No dia seguinte, a suspensão de CDs foi centrifugada a 1500 rpm, por 5 minutos a 4°C, e logo em seguida foi plaqueada a microbiota pulmonar juntamente com as CDs.

Para realizar a co-cultura de CDs com a microbiota pulmonar, os pulmões dos animais dos grupos controle e obeso foram coletados, pesados e macerados em *cellstrainer* (70 µm) em meio de cultura RPMI suplementado sem antibiótico, em ambiente estéril. Para minimizar a quantidade de restos celulares e outros componentes do tecido pulmonar, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm, por 10 minutos, a 10°C por 3 (YADAVA et al., 2016). A cada intervalo da centrifugação, as amostras foram sonicadas durante 1 minuto, para que as bactérias e seus componentes pudessem se separar de materiais sólidos provenientes do tecido pulmonar. A fim de obter uma maior quantidade de células procariotas, o material foi centrifugado a 14000 rpm, por 10 minutos, 10°C por 2x e o precipitado foi ressuscitado em 5 mL de meio de cultura RPMI sem antibiótico.

Em seguida, o macerado pulmonar contendo a microbiota foi plaqueada em MOI de 10 (10 bactérias para 1 CD) juntamente com as CDs. O grupo controle, foi estimulado com a microbiota também de animais controle e o grupo obeso, foi estimulado com a microbiota do mesmo grupo de animais. A interação foi realizada durante 1h e após esse período, as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm, por 5 minutos, a 4°C. Posteriormente, foram marcadas com os anticorpos para citometria

de fluxo. A fim de confirmar a presença de bactérias no material, foram coletados 200µL de cada solução e realizada a técnica de FISH.

### **3.20 Análise Estatística**

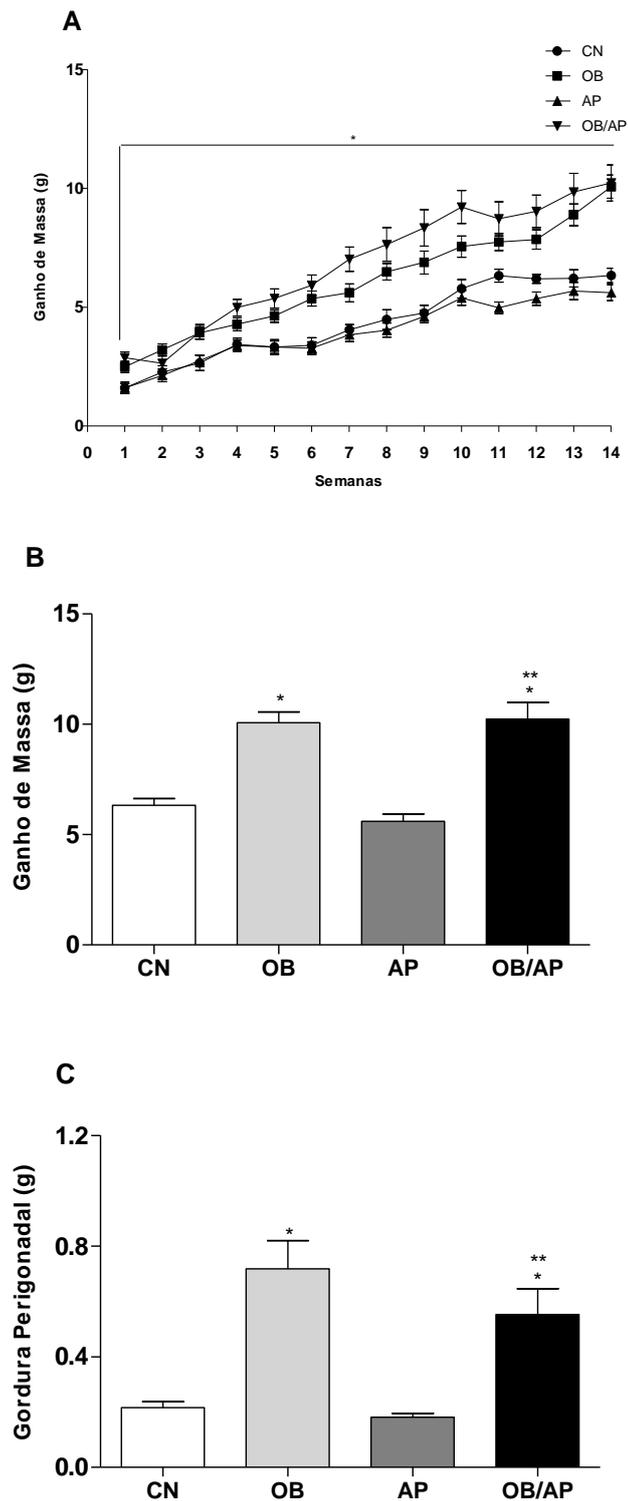
As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Graph Pad Prism 5.0 (Graphpad Software, EUA). As variáveis numéricas foram avaliadas nos diferentes grupos pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov para distribuição gaussiana dos dados. Posteriormente foi utilizada ANOVA para realização da curva de peso e da curva do consumo das dietas e em seguida o pós teste de Bonferroni. Para as demais análises foi utilizado o Teste t não pareado para os dados paramétricos e o teste de Mann Whitney para os dados não paramétricos. O nível de significância admitido para os testes foi de  $p \leq 0,05$ . Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 CARACTERIZAÇÃO DA OBESIDADE EM CAMUNDONGOS FÊMEAS DA LINHAGEM BALB/C**

#### **4.1.1 Porcentagem de ganho de massa em gramas e acúmulo de gordura perigonadal**

Para validação do protocolo de indução da obesidade, foi analisado o ganho de massa dos animais CN, OB, AP e OB/AP, semanalmente, ao longo de 14 semanas de dieta. Foi observado que a partir da 1ª semana de dieta, os animais dos grupos OB e OB/AP apresentaram aumento significativo na porcentagem de ganho de massa, quando comparados aos grupos CN e AP, sendo que este perfil se estendeu até o final do protocolo (Figuras 7A e 7B). Em paralelo, também foi visto que os animais dos grupos OB e OB/AP apresentaram o maior acúmulo de gordura perigonadal, quando comparados aos animais do grupo CN (Figura 7C).



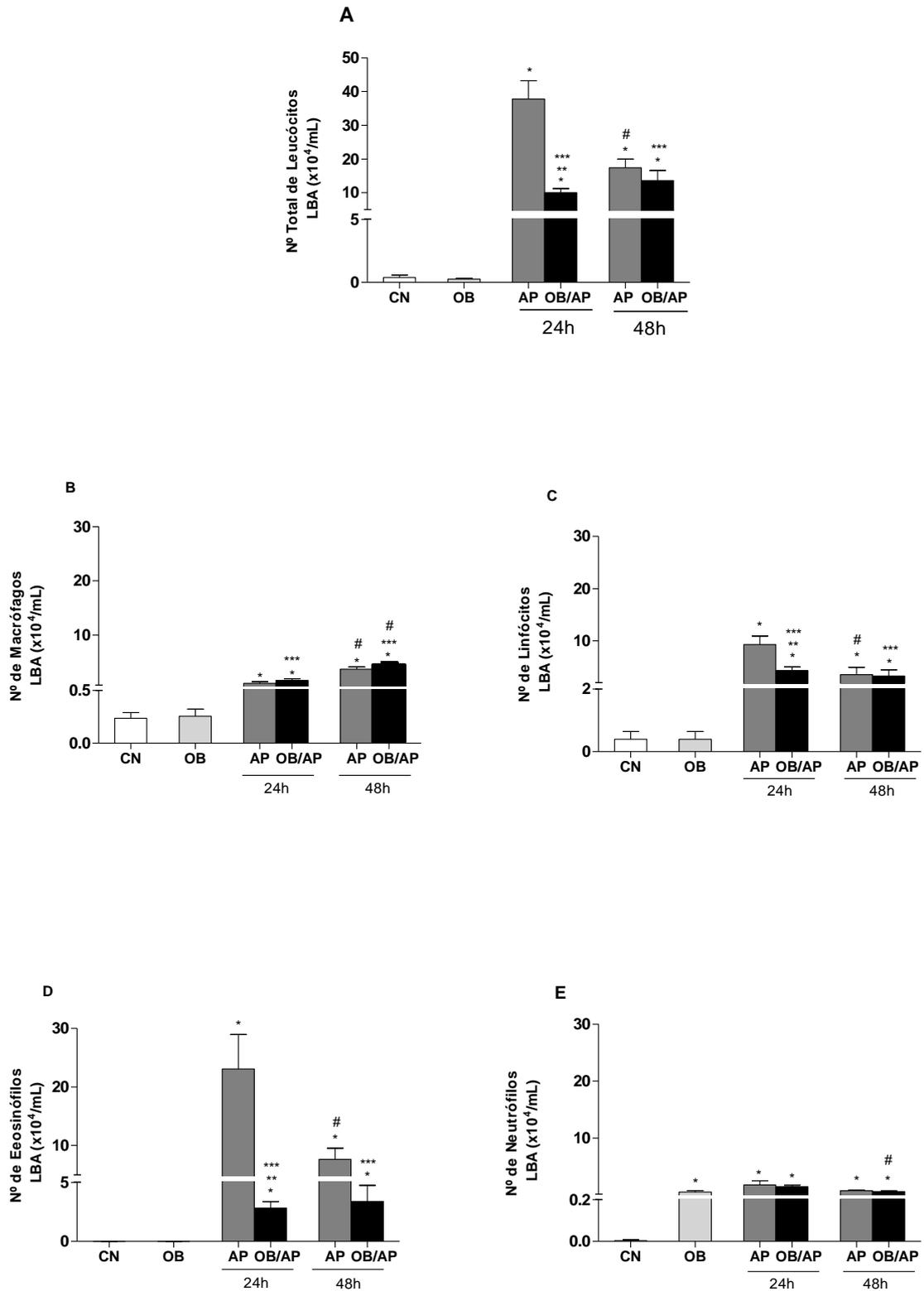
**Figura 7: Caracterização da obesidade em camundongos fêmeas da linhagem Balb/c.** Avaliação da porcentagem de ganho de massa (A), representação da porcentagem de ganho de massa na 14ª semana de dieta (B) e acúmulo de gordura perigonadal (C), nos grupos CN, OB, AP e OB/AP, durante 14 semanas de indução do protocolo de obesidade.  $p < 0,05$  \*comparado ao grupo CN; \*\*comparado ao grupo AP. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. (n=5).

## **4.2 INFLUÊNCIA DA OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA SOBRE A RESPOSTA IMUNE EM MODELO DE ALERGIA PULMONAR, 24 E 48 HORAS APÓS O ÚLTIMO DESAFIO COM A OVALBUMINA**

### **4.2.1 Contagem de células totais e específicas no Lavado Bronco-Alveolar (LBA)**

Um importante parâmetro para confirmação da indução do modelo de alergia pulmonar é a contagem de células no lavado bronco-alveolar, tendo em vista que durante o processo inflamatório encontra-se um infiltrado celular intenso no tecido pulmonar. Foi quantificado o número de células totais e diferenciais no LBA, 24h e 48h após o último desafio com a OVA (Figuras 8A – 8E). A contagem de leucócitos totais revelou aumento significativo nos grupos AP e OB/AP, nos dois tempos analisados, quando comparados ao grupo CN. Também foi visto que a contagem de leucócitos totais no grupo AP 48h foi menor em relação à contagem do grupo AP 24h. Contudo, o grupo OB/AP em 24h, apresentou contagem de células reduzida, quando comparado ao grupo AP 24h e aumento significativo, quando comparado ao grupo OB (Figura 8A).

Em paralelo, observou-se que o número de eosinófilos, macrófagos, linfócitos e neutrófilos, foi maior nos grupos AP e OB/AP, nos dois tempos analisados, quando comparados ao grupo CN e OB, com exceção da contagem de neutrófilos que não demonstrou diferença significativa entre o grupo OB/AP e o grupo OB (Figura 8B – 8E). Já em 48h, o grupo AP apresentou aumento de macrófagos, redução de linfócitos (Figura 8C) e eosinófilos (Figura 8D), quando comparado ao grupo AP 24h. Porém, em 24h, o grupo OB/AP demonstrou redução significativa de linfócitos (Figura 8C) e de eosinófilos (Figura 8D), quando comparado ao grupo AP, e esta diferença se manteve em 48h.



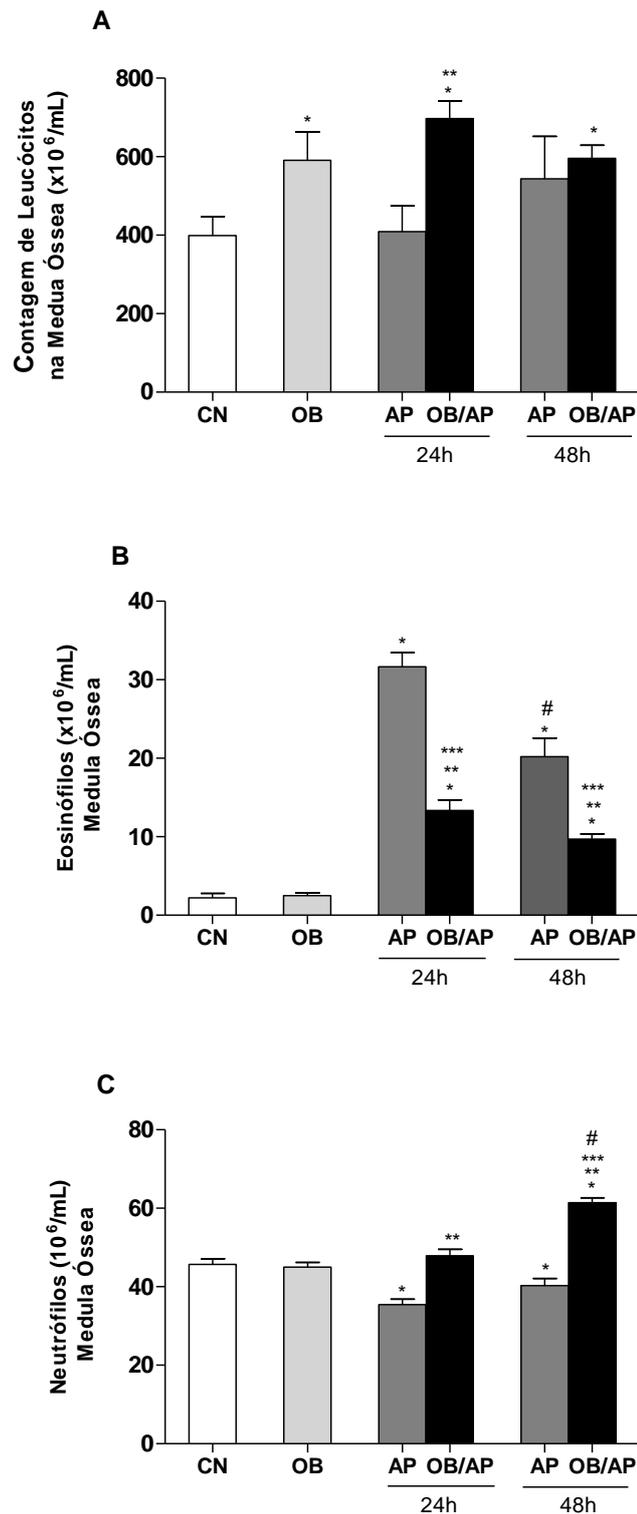
**Figura 8: Contagem total e específica de leucócitos no Lavado Bronco-Alveolar (LBA).** Número total de Leucócitos (A), macrófagos (B), linfócitos (C), eosinófilos (D) e neutrófilos (E), nos grupos CN, OB, AP e OB/AP, 24h e 48h após o último desafio com a OVA.  $p < 0,05$  \*comparado ao grupo CN; \*\*comparado ao AP; \*\*\*OB/AP 24h e OB/AP 48h comparado ao OB; # AP e OB/AP 48h comparado com AP e OB/AP 24h. Os dados são expressos como média +/- EPM. (n=5).

#### 4.2.2 Contagem de leucócitos total e específica na medula óssea

Nosso grupo demonstrou que os animais obesos alérgicos apresentam alteração na produção de células na medula óssea destacando para a produção de eosinófilos e neutrófilos (SILVA et al., 2017). Neste trabalho foi quantificado o número de leucócitos totais na medula óssea nos tempos de 24h e 48h após o último desafio com a OVA (Figura 9A – 9C). Na contagem de células totais, os animais do grupo OB apresentaram maior número de leucócitos, em relação ao grupo CN, porém não foi visto diferença significativa nos animais AP 24h e 48h, quando comparados ao grupo CN. Já nos animais OB/AP em 24h e 48h, houve aumento na quantidade de células em comparação ao CN.

Na contagem de eosinófilos (Figura 9B), foi observado aumento significativo no grupo AP 24h e 48h comparado ao grupo CN, sendo que no grupo AP 48h houve redução significativa dessas células em comparação ao AP 24h. Além disso, o grupo OB/AP mostrou um número menor dessas células em 24h e 48h, quando comparadas tanto ao grupo AP 24h e 48h quanto ao grupo OB (Figura 9B).

Também foi quantificado o número de neutrófilos na medula óssea dos animais (Figura 9C), o qual pode ser destacado diminuição significativa dessas células nos animais AP 24h e AP 48h, quando comparados ao grupo CN, já nos animais OB/AP houve aumento significativo na contagem de neutrófilos nos dois tempos analisados, quando comparados ao grupo AP 24h e 48h, sendo que esse aumento foi ainda maior no grupo OB/AP 48h, quando comparado ao grupo OB/AP 24h (Figura 9C).

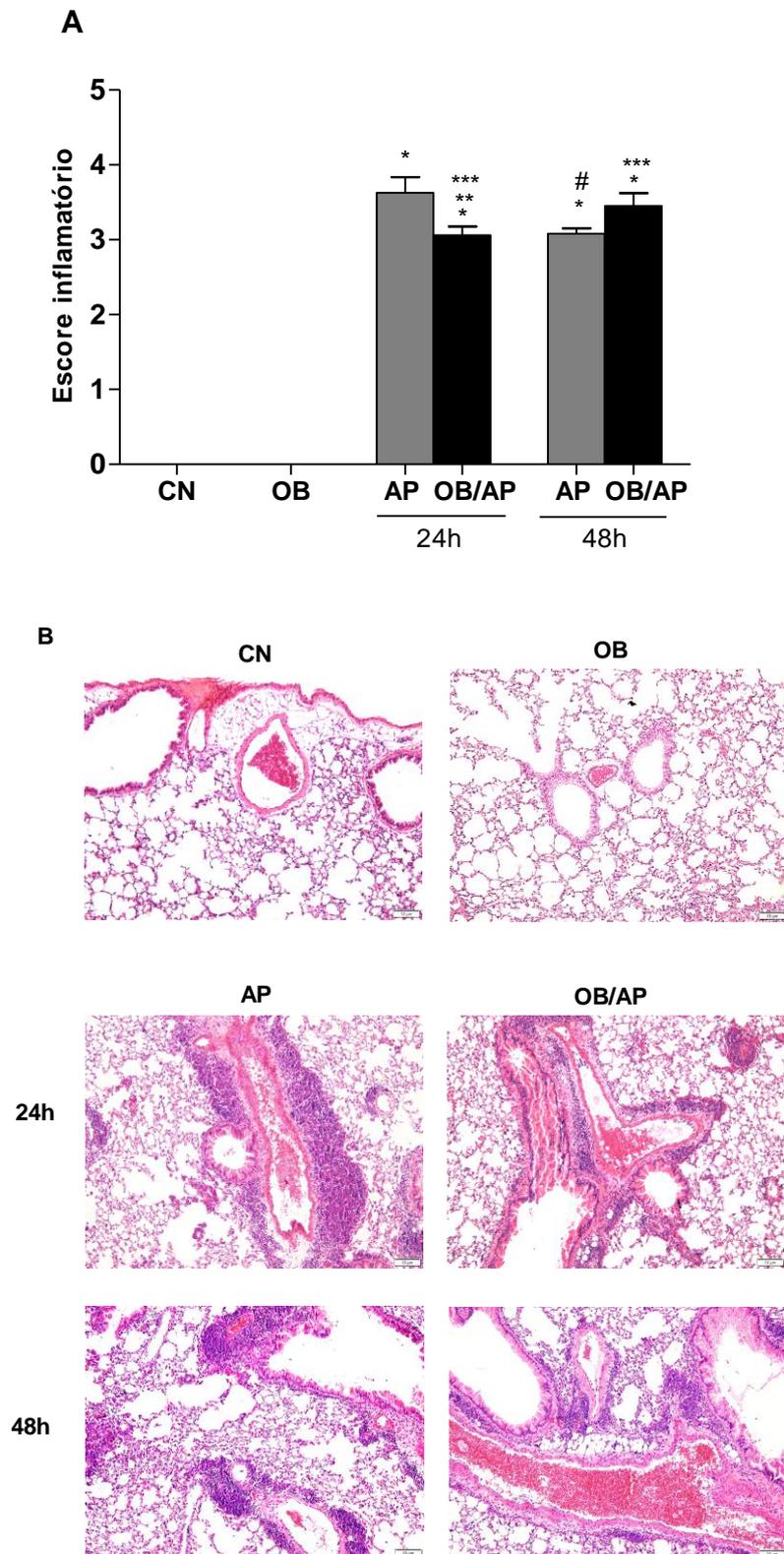


**Figura 9: Contagem do número de leucócitos totais, de eosinófilos e neutrófilos na medula óssea.** Contagem de leucócitos totais (A), de eosinófilos (B) e neutrófilos (C), nos grupos CN, OB, AP e OB/AP, 24h e 48h após o último desafio com a OVA.  $p < 0,05$  comparado ao grupo CN; \*\*comparado ao AP; \*\*\*OB/AP 24h e OB/AP 48h comparado ao OB; # AP e OB/AP 48h comparado com AP e OB/AP 24h. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. (n=5).

### 4.2.3 Escore inflamatório

Com o intuito de analisar o grau de inflamação no tecido pulmonar dos animais, foi feita uma avaliação semi-quantitativa do infiltrado celular nos espaços peribroncovasculares, em 24h e 48h após o desafio com a OVA (Figura 10A e 10B). Os grupos AP e OB/AP em 24h e 48h apresentaram aumento significativo do escore inflamatório, em relação ao grupo CN e OB (Figura 10A). Na análise comparativa dos dois tempos, foi observado que o grupo AP 48h mostrou redução significativa do escore inflamatório, quando comparado ao grupo AP 24h.

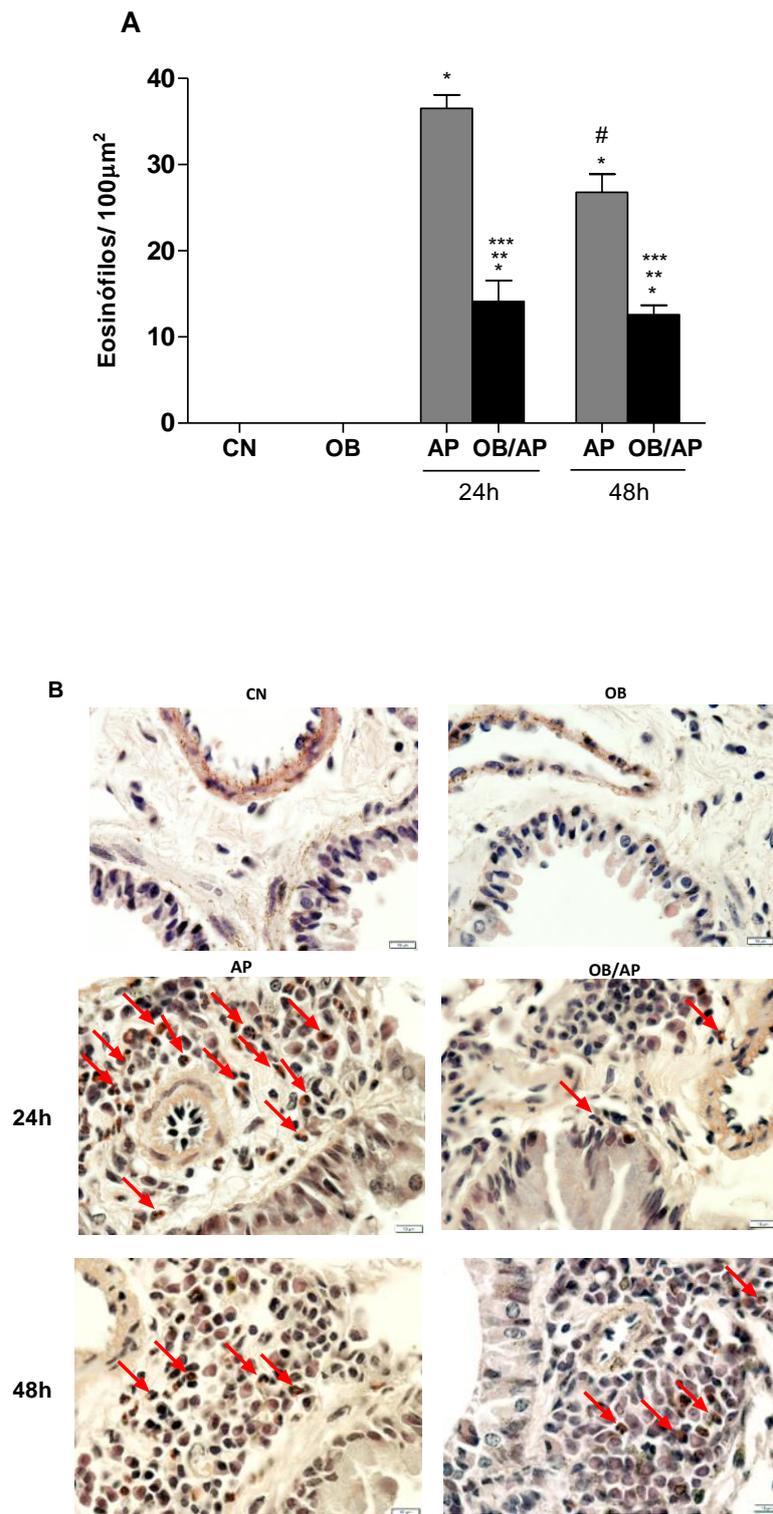
Foi visto um menor infiltrado celular no grupo OB/AP 24h, quando comparado ao grupo AP 24h (Figura 10A e 10B). Não houve diferença significativa entre os grupos alérgicos em 48h. A Figura 10B representa os cortes histológicos dos diferentes grupos corados com HE.



**Figura 10: Avaliação do infiltrado inflamatório pulmonar.** Escore inflamatório dos grupos CN, OB, AP e OB/AP, em 24h e 48h após o último desafio com a OVA (A); Imagem representativa do pulmão dos animais dos grupos CN, OB, AP e OB/AP 24h e 48h após o último desafio com a OVA (coloração HE) (B), aumento de 100 vezes,  $p < 0,05$  \*comparado ao grupo CN; \*\*comparado ao AP; \*\*\*OB/AP 24h e OB/AP 48h comparado ao OB; # AP e OB/AP 48h comparado com AP e OB/AP 24h. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. (n=5).

#### **4.2.4 Avaliação do infiltrado eosinofílico no tecido pulmonar**

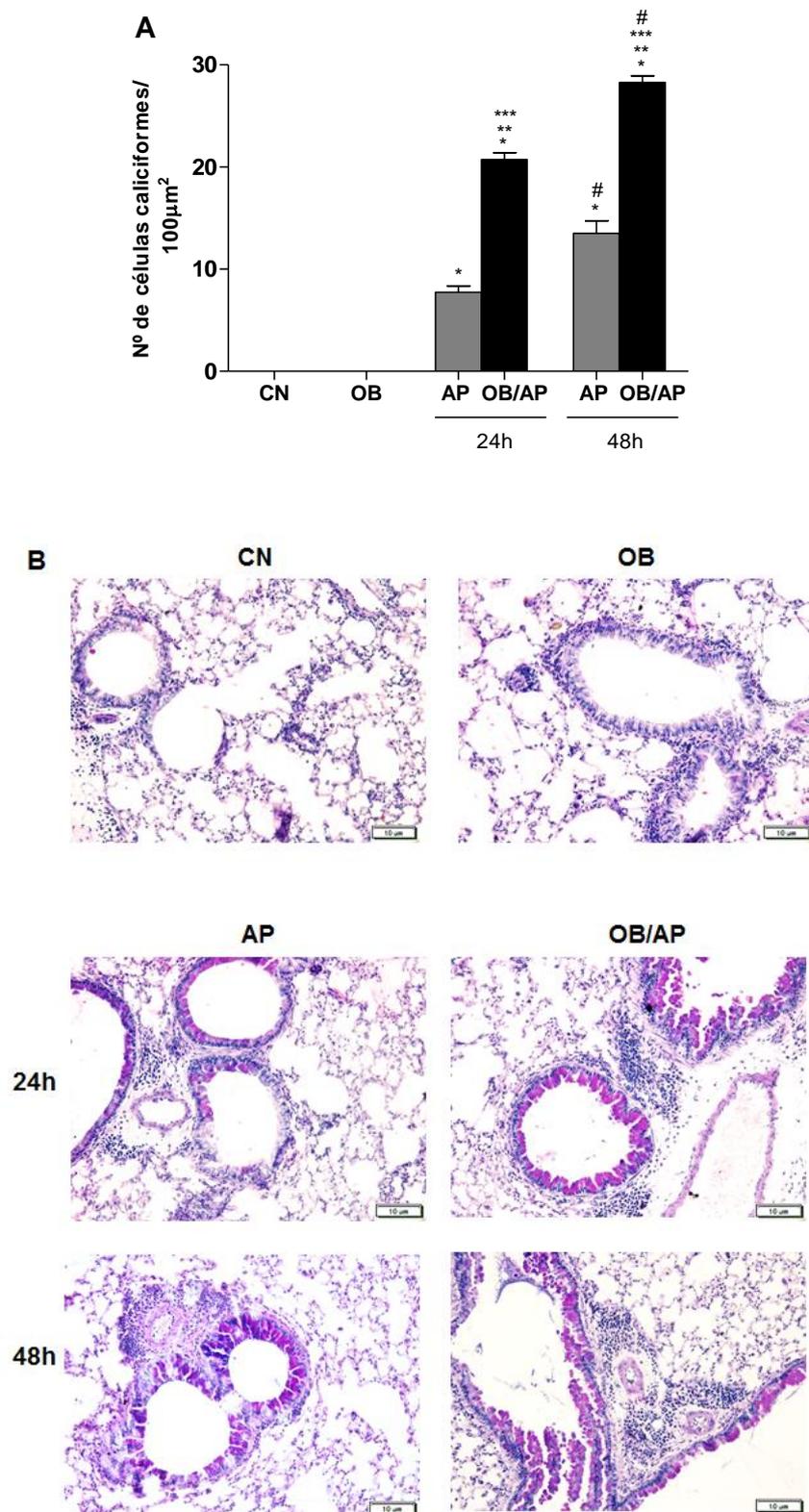
O infiltrado pulmonar eosinofílico é uma característica importante da resposta imune alérgica (WELLER; SPENCER, 2017). Por isso, essas células foram quantificadas no tecido pulmonar dos animais estudados, em 24 e 48h após o último desafio com a OVA (Figura 11A e 11B). Os grupos AP e OB/AP em 24h e 48h apresentaram aumento significativo do infiltrado eosinofílico nos pulmões, quando comparados ao grupo CN e OB (Figura 11A). O grupo AP 48h reduziu de forma significativa a contagem de eosinófilos nos pulmões, nos dois tempos analisados, quando comparados ao grupo AP 24h. No entanto, o grupo OB/AP apresentou um menor número de eosinófilos nos pulmões, quando comparados ao grupo AP, em ambos os tempos analisados (Figuras 11A e 11B). Estes resultados foram representados na Figura 11B, a partir de cortes histológicos corados com Sirius-Red.



**Figura 11: Avaliação do infiltrado eosinofílico no tecido pulmonar.** Número de eosinófilos 24h e em 48h após o último desafio com a OVA (A); Imagem representativa do infiltrado eosinofílico no tecido pulmonar nos grupos CN, OB, AP, OB/AP 24h e 48h após o último desafio com a OVA, coloração Sirius Red (B), aumento de 1000 vezes.  $p < 0,05$  \*comparado ao grupo CN; \*\*comparado ao AP; \*\*\*OB/AP 24h e OB/AP 48h comparado ao OB; # AP e OB/AP 48h comparado com AP e OB/AP 24h. Os dados são expressos como média +/- EPM. (n=5).

#### **4.2.5 Contagem de células caliciformes produtoras de muco no epitélio das vias aéreas**

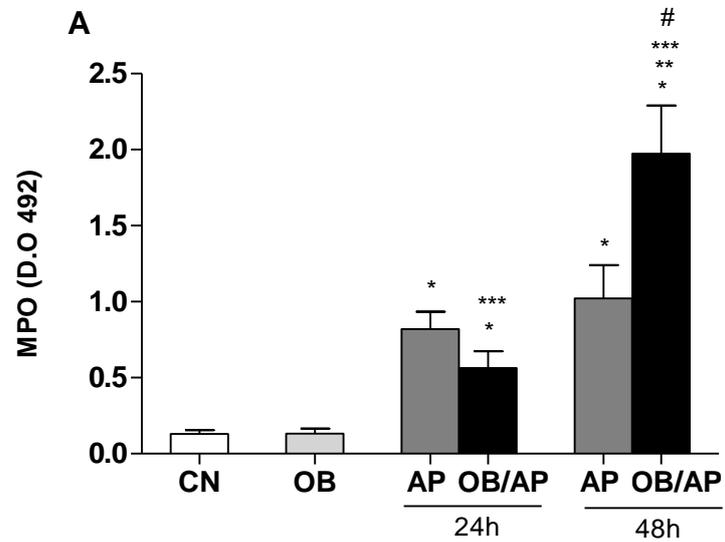
Na asma, a hiperplasia e metaplasia das células caliciformes produtoras de muco, são consideradas características importantes do remodelamento tecidual (DUNICAN et al., 2018). Essas células foram contadas nas vias aéreas dos animais estudados, 24h e 48h após o último desafio com a OVA (Figuras 12A e 12B). Nos dois tempos analisados, os grupos AP e OB/AP apresentaram maior contagem de células produtoras de muco, quando comparados ao grupo CN e OB. No entanto, o grupo OB/AP, apresentou aumento significativo, quando comparado ao grupo AP, em ambos os tempos analisados (Figura 12A e 12B). A imagem representativa com os cortes histológicos dos pulmões corados com PAS encontra-se na Figura 12B.



**Figura 12: Avaliação do nº de células caliciformes produtoras de muco.** Número de células produtoras de muco 24h e 48h após o último desafio com a OVA (A); Imagem representativa das células produtoras de muco nas vias aéreas nos grupos CN, OB, AP, OB/AP 24h e 48h após o último desafio com a OVA, coloração Ácido Periódico de Schiff (B), aumento 400x.  $p < 0,05$  \*comparado ao grupo CN; \*\*comparado ao AP; \*\*\*OB/AP 24h e OB/AP 48h comparado ao OB; # AP e OB/AP 48h comparado com AP e OB/AP 24h. Os dados são expressos como média +/- EPM. (n=5).

#### **4.2.6 Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)**

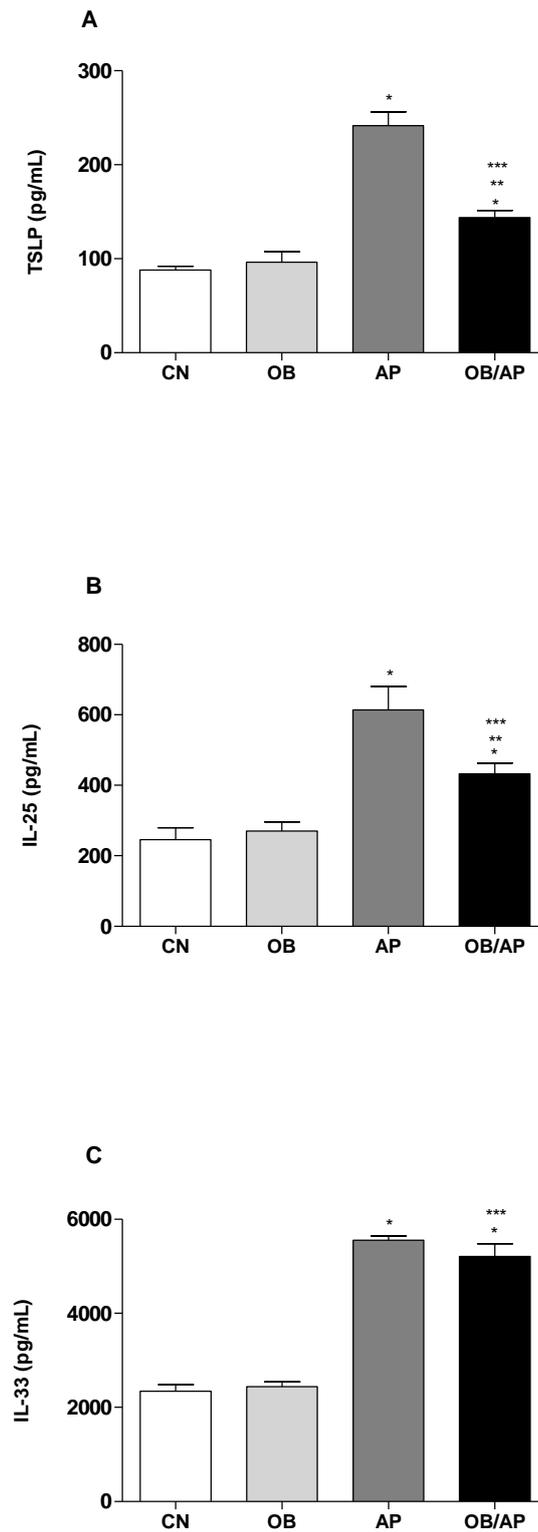
Como foi observado aumento no número de neutrófilos na medula óssea dos animais OB/AP, também foi avaliado em 24h e 48h, a atividade da enzima mieloperoxidase, presente em abundância nos grânulos de neutrófilos, caracterizando a presença dessas células no tecido pulmonar (Figura 13A). Os grupos AP e OB/AP, apresentaram aumento significativo na atividade da enzima MPO, quando comparados ao grupo CN, nos dois tempos analisados. Porém, o grupo OB/AP em 48h, exibiu aumento nos níveis dessa enzima, quando comparado aos grupos AP 24h e 48h (Figura 13A).



**Figura 13: Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).** Atividade da MPO em 48h após o último desafio com a OVA (A) D.O, densidade ótica.  $p < 0,05$  \*comparado ao grupo CN; \*\*comparado ao AP; \*\*\*OB/AP 24h e OB/AP 48h comparado ao OB; # AP e OB/AP 48h comparado com AP e OB/AP 24h. Os dados são expressos como média +/- EPM. (n=5).

#### **4.2.7 Avaliação dos níveis das citocinas epiteliais no tecido pulmonar**

Com o intuito de avaliar a influência da obesidade na resposta imune alérgica, foram quantificados os níveis das citocinas epiteliais no pulmão dos animais estudados, 24 horas após o último desafio com a OVA (Figuras 14A – 14C). Essas citocinas são importantes, pois são as primeiras a serem secretadas pelo epitélio brônquico durante o processo alérgico (HOLGATE et al., 2015). Foi observado aumento significativo das citocinas epiteliais TSLP (Figura 14A), IL-25 (Figura 14B) e IL-33 (Figura 14C) e nos grupos AP e OB/AP, quando comparados ao grupo CN e OB. Também foi visto que os níveis das citocinas TSLP (Figura 14A) e IL-25 (Figura 14B) estavam reduzidas no grupo OB/AP, quando comparado ao grupo AP, porém não houve diferença significativa com relação à IL-33 (Figura 14C) nesses dois grupos.



**Figura 14: Avaliação dos níveis das citocinas epiteliais no tecido pulmonar.** Níveis das citocinas epiteliais TSLP (A), IL-25 (B) e IL-33 (C) 24h após o último desafio com a OVA, através de ELISA.  $p < 0,05$ . \*comparado ao grupo CN, \*\*comparado ao grupo AP, \*\*\*OB/AP comparado ao grupo OB. Os dados são expressos como média +/- EPM. (n=5).

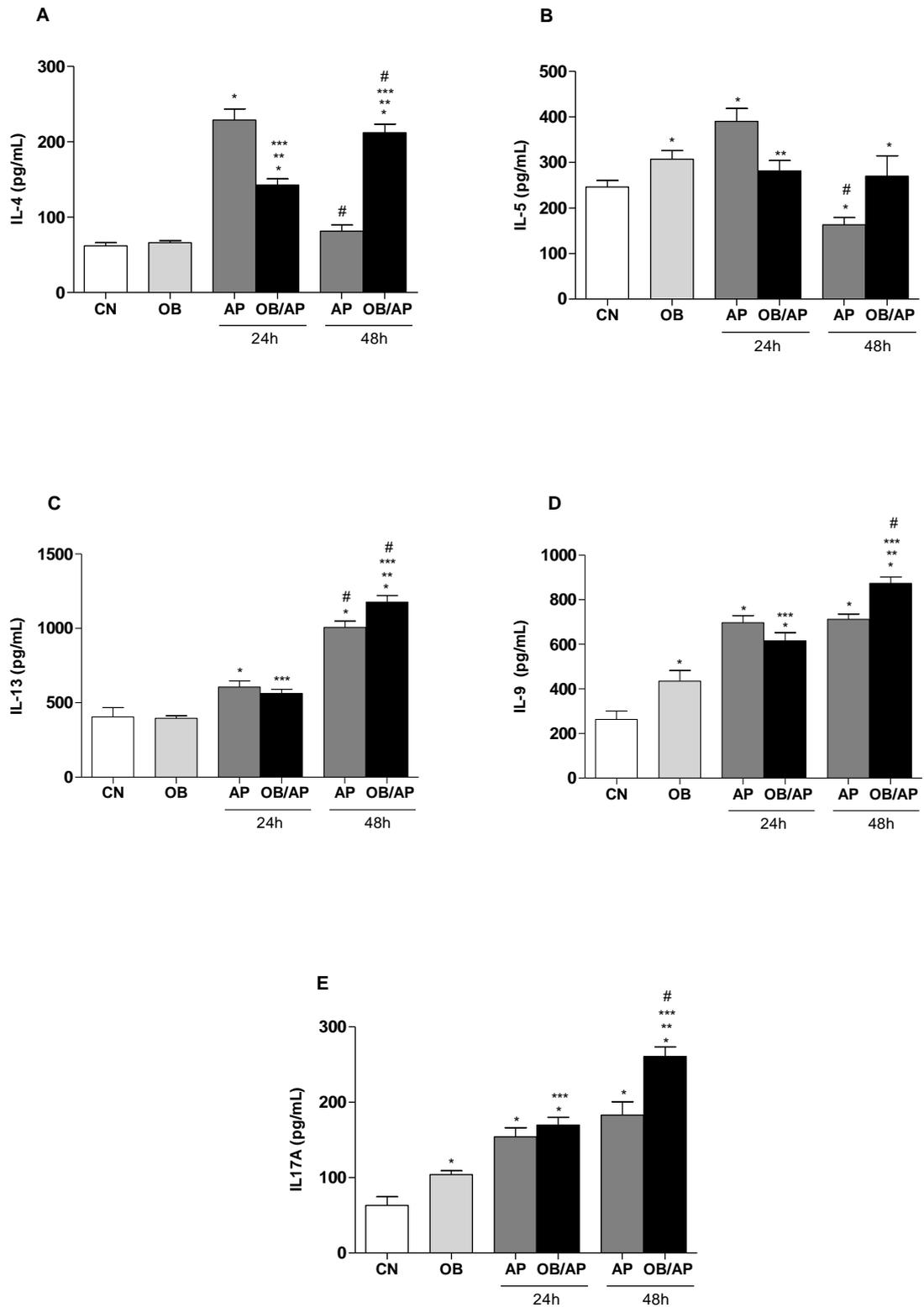
#### **4.2.8 Avaliação dos níveis das citocinas pró-inflamatórias no tecido pulmonar**

As citocinas de perfil Th2 (IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13) assim como a IL-17A de perfil Th17, são citocinas que exercem funções essenciais no desenvolvimento e manutenção da resposta alérgica (LLOYD; HESSEL, 2010). Os níveis de cada uma delas foi mensurado nos animais estudados, 24h e 48h após o último desafio com a OVA (Figuras 15A – 15E). O grupo OB, exibiu aumento significativo das citocinas IL-5 (Figura 15B), IL-9 (Figura 15D) e IL-17A (Figura 15E), quando comparado ao grupo CN.

Em 24h, foi observado aumento significativo de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-9 (Figuras 15A – 15D) e da IL-17A (Figura 15E) no grupo AP, quando comparado ao grupo CN. Na análise comparativa entre os dois tempos, verificou-se que o grupo AP 48h, apresentou redução significativa dos níveis de IL-4 e IL-5 (Figura 18A e 18B) e aumento de IL-13 (Figura 15C), quando comparado ao grupo AP 24h.

Contudo, o grupo OB/AP em 24h, apresentou níveis menores de IL-4 e IL-5 (Figuras 15A e 15B), quando comparado ao grupo AP.

Em 48h o grupo OB/AP mostrou aumento significativo nos níveis de IL-4 (Figura 15A), IL-5 (Figura 15B) IL-13 (Figura 15C), IL-9 (Figura 15D) e IL-17A (Figura 15E), quando comparado aos grupos AP 48h e ao OB/AP 24h.

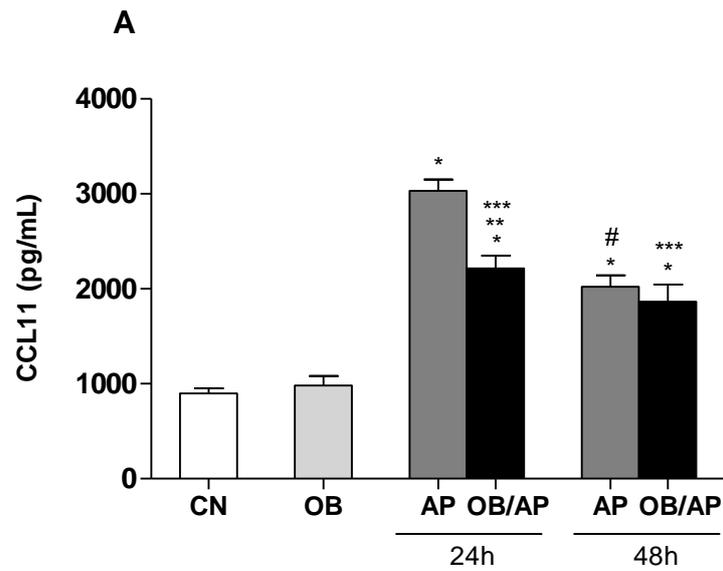


**Figura 15: Avaliação dos níveis das citocinas no tecido pulmonar.** Níveis das citocinas Th2 (A-D) e IL-17A (E) 24h e 48h após o último desafio com a OVA, através de ELISA.  $p < 0,05$  \*comparado ao grupo CN; \*\*comparado ao AP; \*\*\*OB/AP 24h e OB/AP 48h comparado ao OB; # AP e OB/AP 48h comparado com AP e OB/AP 24h. Os dados são expressos como média +/- EPM. (n=5).

#### **4.2.9 Avaliação da quimiocina CCL11 no tecido pulmonar**

A quimiocina CCL11 é importante no desenvolvimento da resposta imune alérgica, uma vez que ela é um fator quimiotático no direcionamento de eosinófilos para as vias aéreas (SILVA et al., 2017). Essa quimiocina foi dosada em 24h e 48h após o último desafio com a OVA (Figura 16A), em todos os animais estudados. A análise demonstrou aumento significativo no grupo AP e OB/AP 24h e 48h, quando comparados ao grupo CN. Em 48h, o grupo AP apresentou redução significativa de CCL11, quando comparado ao grupo AP 24h.

Já no grupo OB/AP 24h os níveis de CCL11 estavam menores, quando comparados ao grupo AP 24h, porém não houve diferença em 48h, quando comparado ao grupo AP (Figura 16A).



**Figura 16: Avaliação dos níveis da quimiocina CCL11 no tecido pulmonar.** Nível da quimiocina CCL11 (A) 24h e 48h após o último desafio com a OVA, através de ELISA.  $p < 0,05$ . \*comparado ao grupo CN; \*\*comparado ao AP; \*\*\*OB/AP 24h e OB/AP 48h comparado ao OB; # AP e OB/AP 48h comparado com AP e OB/AP 24h. Os dados são expressos como média +/- EPM. (n=5).

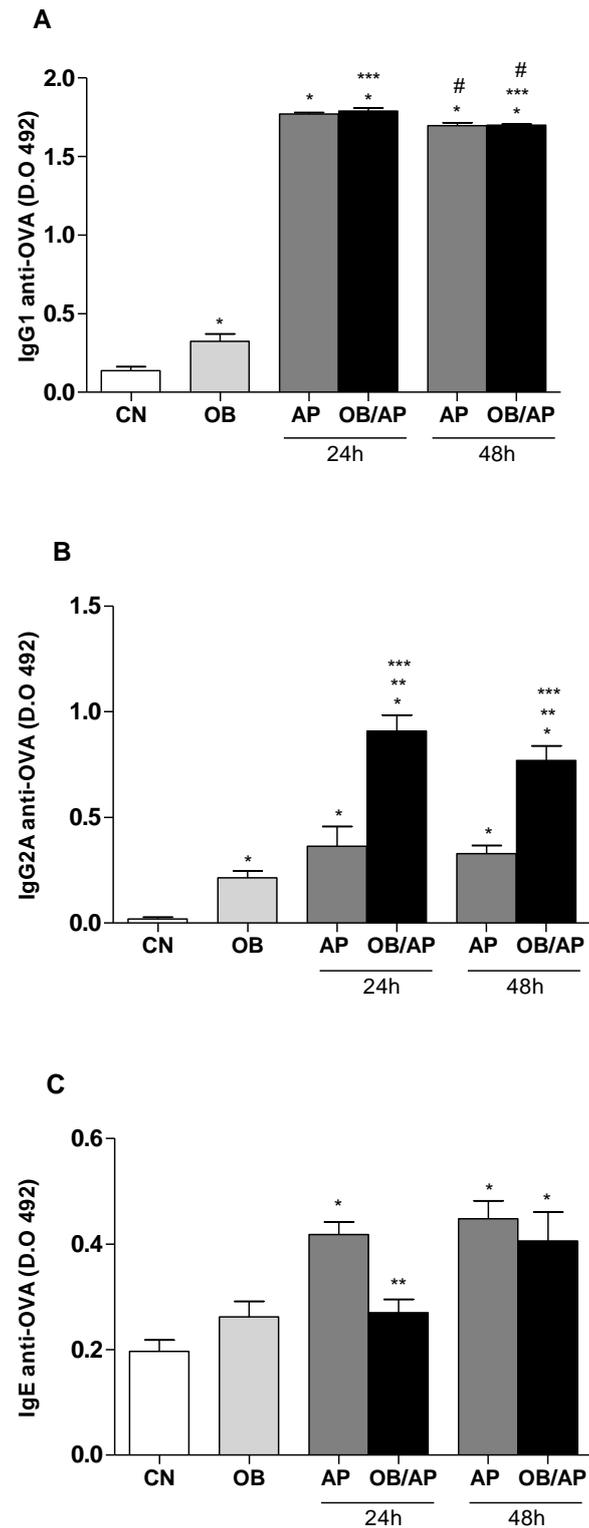
#### **4.2.10 Avaliação dos níveis de anticorpos IgG1, IgG2a e IgE anti-OVA**

Os anticorpos IgG1 e IgG2a estão relacionados, respectivamente, à respostas do tipo Th2 e Th1. Por isso, foram avaliados seus níveis séricos em 24h e 48h após o último desafio com a OVA (Figura 17A – 17B). O grupo OB apresentou aumento de IgG1 e IgG2a, quando comparado ao grupo CN (Figuras 17A – 17B). Também foi observado que os grupos AP e OB/AP, apresentaram aumento significativo nos níveis de IgG1 e IgG2a, quando comparados ao grupo CN, nos dois tempos analisados, (Figuras 17A – 17B).

Apesar de não apresentar diferença significativa entre os grupos AP e OB/AP tanto em 24h quanto em 48h, na dosagem do anticorpo IgG1, observou-se que o grupo AP e OB/AP 48h exibiram níveis de IgG1 reduzidos, quando comparados aos grupos AP 24h e OB/AP 24h (Figura 17A).

Com relação ao anticorpo IgG2a, foi visto que seus níveis estavam elevados no grupo OB/AP 24h, quando comparado ao grupo AP 24h e esse perfil se manteve com relação ao tempo de 48h (Figura 17B).

Também foi avaliado os níveis do anticorpo IgE, característico da resposta alérgica (Figura 17C). Os resultados obtidos mostraram que os grupos AP e OB/AP nos dois tempos analisados, apresentaram aumento significativo nos níveis desse anticorpo, quando comparados ao grupo CN. Em paralelo, os níveis de IgE estavam reduzidos no grupo OB/AP 24h, quando comparado ao grupo AP 24h. Em 48h, não foi visto diferença significativa entre os grupos (Figura 17C).



**Figura 17: Avaliação dos níveis dos anticorpos IgG1, IgG2a e IgE anti-OVA.** Dosagem de anticorpos IgG1 (A), IgG2a (B) e IgE anti-OVA (C) 24h e 48h após o último desafio com a OVA, através de ELISA.  $p < 0,05$ . \*comparado ao grupo CN; \*\*comparado ao AP; \*\*\*OB/AP 24h e OB/AP 48h comparado ao OB; # AP e OB/AP 48h comparado com AP e OB/AP 24h. Os dados são expressos como média +/- EPM. (n=5).

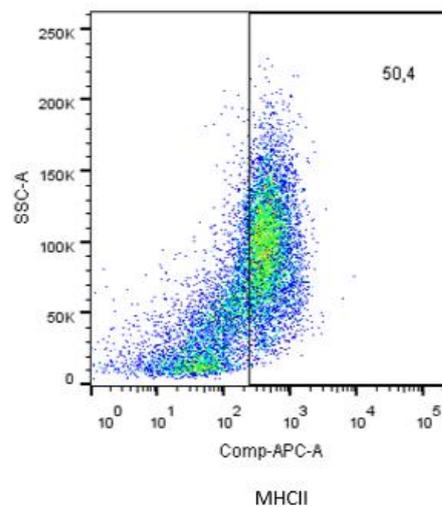
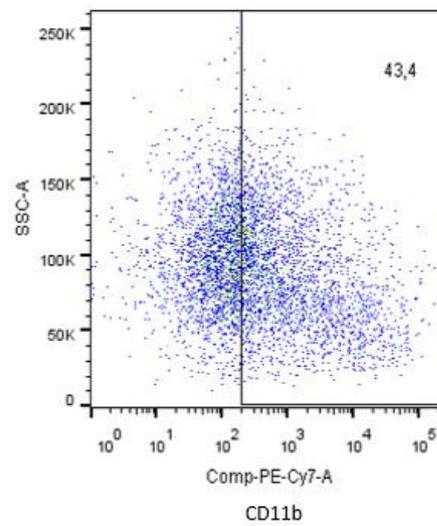
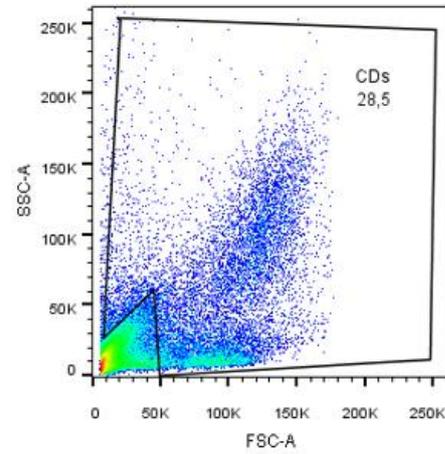
### **4.3 INFLUÊNCIA DA OBESIDADE SOBRE A RESPOSTA DE CDS PULMONARES, EM MODELO DE ASMA**

#### **4.3.1 Identificação e caracterização de células dendríticas no tecido pulmonar**

A partir dos resultados anteriores que demonstraram que a obesidade promove profundas alterações na resposta imune pulmonar no contexto de asma alérgica, o próximo passo foi avaliar se essas mudanças também estariam afetando a resposta imune iniciada pelas CDs pulmonares.

As CDs pulmonares são células heterogêneas que apresentam em sua superfície diversos marcadores, os quais estão relacionados com seu estado de ativação, diferenciação ou regulação (LU et al., 2013). Com o intuito de selecionar CDs capazes de responder a estímulos em todos os grupos estudados, foram selecionadas CDs com expressão dos marcadores CD11b e MHCII partir do *gate* definido de acordo com tamanho e granulosidade (Figuras 18A – 18C).

A



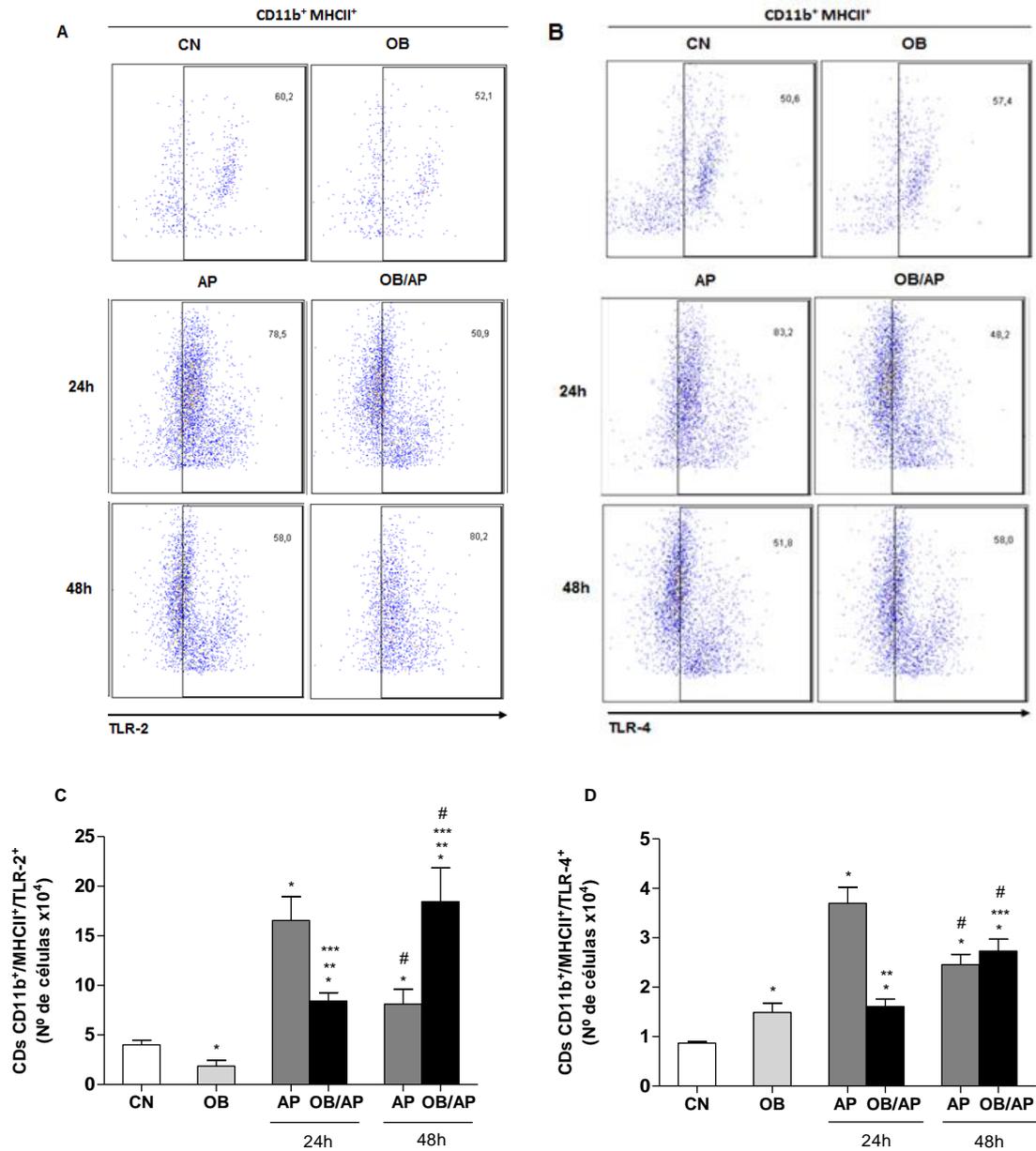
**Figura 18. *Dot-plots* representativos de citometria de fluxo para seleção de células dendríticas provenientes do pulmão.** A partir do *gate* determinado de acordo com tamanho celular (FSC) e granulosidade (SSC) específicos, foram selecionadas as células positivas para os marcadores CD11b<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup> (A). Os valores no quadrante estão expressos em porcentagem.

#### 4.3.2 Avaliação dos receptores TLR-2 e TLR-4 em células dendríticas pulmonares CD11b<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup>

Os TLRs presentes na superfície de CDs pulmonares, reconhecem PAMPs oriundos da parede celular de bactérias gram-positivas (TLR-2) e gram-negativa (TLR-4), conseqüentemente culminando na ativação dessas células. A partir da identificação das CDs CD11b<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup>, foram avaliados os marcadores TLR-2/4 expressos por essas células, em 24h e 48h após o último desafio com a OVA (Figura 19).

De forma interessante, foi observado um efeito contrário da obesidade no número de células CDs CD11b<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup> expressando TLR-2 e TLR-4. Enquanto para o receptor TLR-2 foi observada uma menor frequência dessas células, para o TLR-4 houve na frequência de CDs CD11b<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup> expressando esse receptor, no grupo OB quando comparados ao grupo CN (Figura 19).

Após as sensibilizações e desafios com a OVA, foi visto aumento significativo na frequência de CDs CD11b<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup> expressando TLR-2 e TLR-4 nos grupos AP e OB/AP, quando comparados ao grupo CN e OB, em ambos os tempos analisados. Sendo que no grupo AP, o pico dessa resposta foi em 24h. Embora, no grupo OB/AP em 24h, tenha sido observado um menor número de CDs CD11b<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup> expressando TLR-2 e TLR-4, quando comparado ao grupo AP, em 48h, houve aumento significativo de CDs expressando esses receptores, quando comparado ao grupo OB/AP 24h. Contudo, não houve diferença significativa com relação ao TLR-4, entre os grupos alérgicos no tempo de 48h (Figura 19).

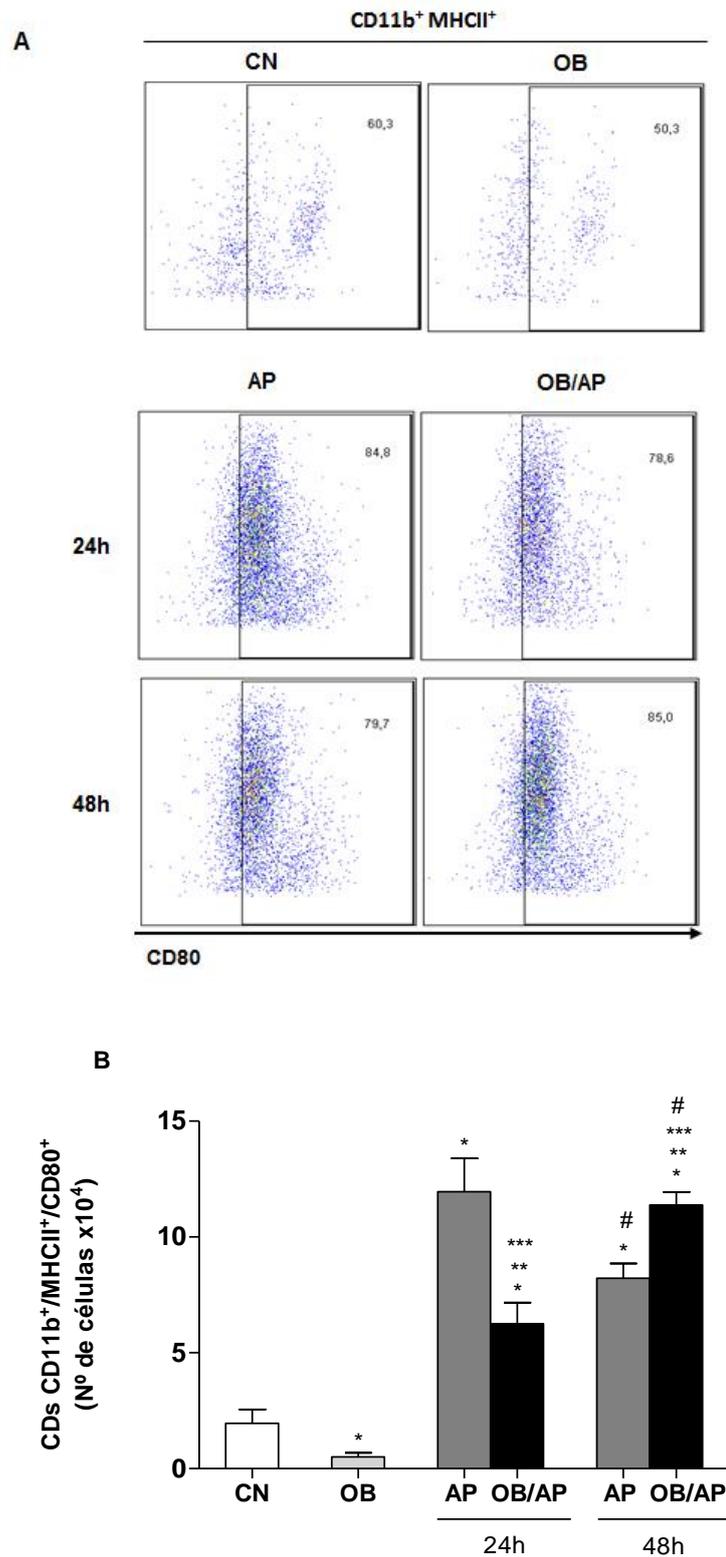


**Figura 19. Número absoluto de CDs CD11b<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>/TLR-2<sup>+</sup> e CD11b<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>/TLR-4<sup>+</sup>.** Dot-plots representativos (A e B); Número absoluto de CDs CD11b<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>/TLR-2<sup>+</sup> e CD11b<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>/TLR-4<sup>+</sup> nos grupos CN, OB, AP e OB/AP (C e D).  $p < 0.05$  \*comparado ao grupo CN; \*\*comparado ao AP; \*\*\*OB/AP 24h e OB/AP 48h comparado ao OB; # AP e OB/AP 48h comparado com AP e OB/AP 24h. Os dados são expressos como média +/- EPM. (n=5).

### **4.3.3 Avaliação do marcador CD80 em células dendríticas pulmonares CD11b<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup>**

Considerando-se que o marcador CD80 presente na superfície de CDs pulmonares seja importante para definir o estado de ativação dessas células, a expressão desse marcador foi avaliada (PIZZOLLA et al., 2016). Os resultados demonstraram que houve menor frequência de CDs CD11b<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup> expressando CD80 no grupo OB, quando comparado ao grupo CN.

Após as sensibilizações e desafios com a OVA, os grupos AP e OB/AP, apresentaram aumento significativo no número de CDs CD11b<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup> expressando CD80, quando comparados aos grupos CN e OB, nos dois tempos analisados. Apesar do número de CDs expressando esse marcador tenha sido menor no grupo OB/AP em 24h, quando comparado ao grupo AP 24h, em 48h foi visto aumento dessas células expressando CD80, no grupo OB/AP, quando comparado ao AP. Da mesma forma, foi constatado que o pico da resposta imune alérgica foi em 24h (Figura 20).

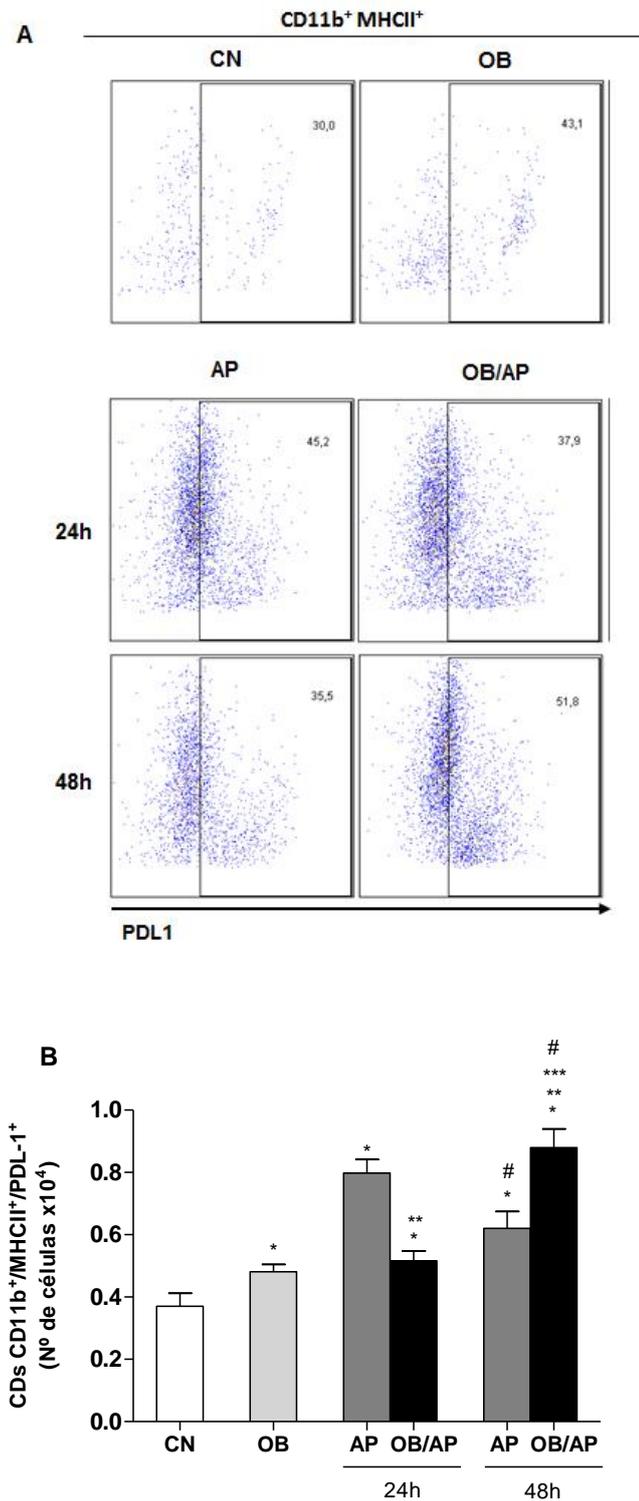


**Figura 20. Número absoluto de CDs CD11b<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>/CD80<sup>+</sup>.** Dot-plots representativos (A); Número absoluto de CDs CD11b<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>/CD80<sup>+</sup> nos grupos CN, OB, AP e OB/AP (B).  $p < 0.05$  \*comparado ao grupo CN; \*\*comparado ao AP; \*\*\*OB/AP 24h e OB/AP 48h comparado ao OB; # AP e OB/AP 48h comparado com AP e OB/AP 24h. Os dados são expressos como média +/- EPM. (n=5).

#### **4.3.4 Avaliação da expressão de PDL-1 em CDs CD11b<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup> no pulmão**

Considerando-se que diversas moléculas presentes na superfície de CDs podem influenciar a resposta imunológica na asma e que a molécula de PDL-1 exerce funções tanto pró-asmáticas quanto de regulação da resposta alérgica (KEIR et al., 2008), este marcador foi avaliado, em 24h e 48h após o último desafio com OVA. Os resultados obtidos demonstraram que o grupo OB apresentou aumento significativo na frequência de CDs CD11b<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup> expressando PDL-1, quando comparado ao grupo CN.

Após as sensibilizações e desafios com a OVA, os grupos AP e OB/AP apresentaram aumento significativo na frequência de CDs expressando PDL-1, quando comparados ao grupo CN e OB, em ambos os tempos analisados. Contudo, em 24h, foi encontrado menor número de CDs expressando PDL-1 no grupo OB/AP, quando comparado ao AP, em 48h, o grupo OB/AP exibiu aumento dessas células expressando PDL-1, quando comparado ao grupo AP. Na análise entre os dois tempos, o pico da expressão de PDL-1 no grupo AP foi no tempo de 24h, no grupo OB/AP foi em 48h (Figura 21).



**Figura 21. Número absoluto de CDs CD11b<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>/PDL-1<sup>+</sup>.** Dot-plots representativos (A); Número absoluto de CDs CD11b<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>/PDL-1<sup>+</sup> nos grupos CN, OB, AP e OB/AP (B).  $p < 0.05$  \*comparado ao grupo CN; \*\*comparado ao AP; \*\*\*OB/AP 24h e OB/AP 48h comparado ao OB; # AP e OB/AP 48h comparado com AP e OB/AP 24h. Os dados são expressos como média +/- EPM. (n=5).

## 4.4 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA OBESIDADE NA MICROBIOTA INTESTINAL E PULMONAR EM MODELO DE ALERGIA PULMONAR

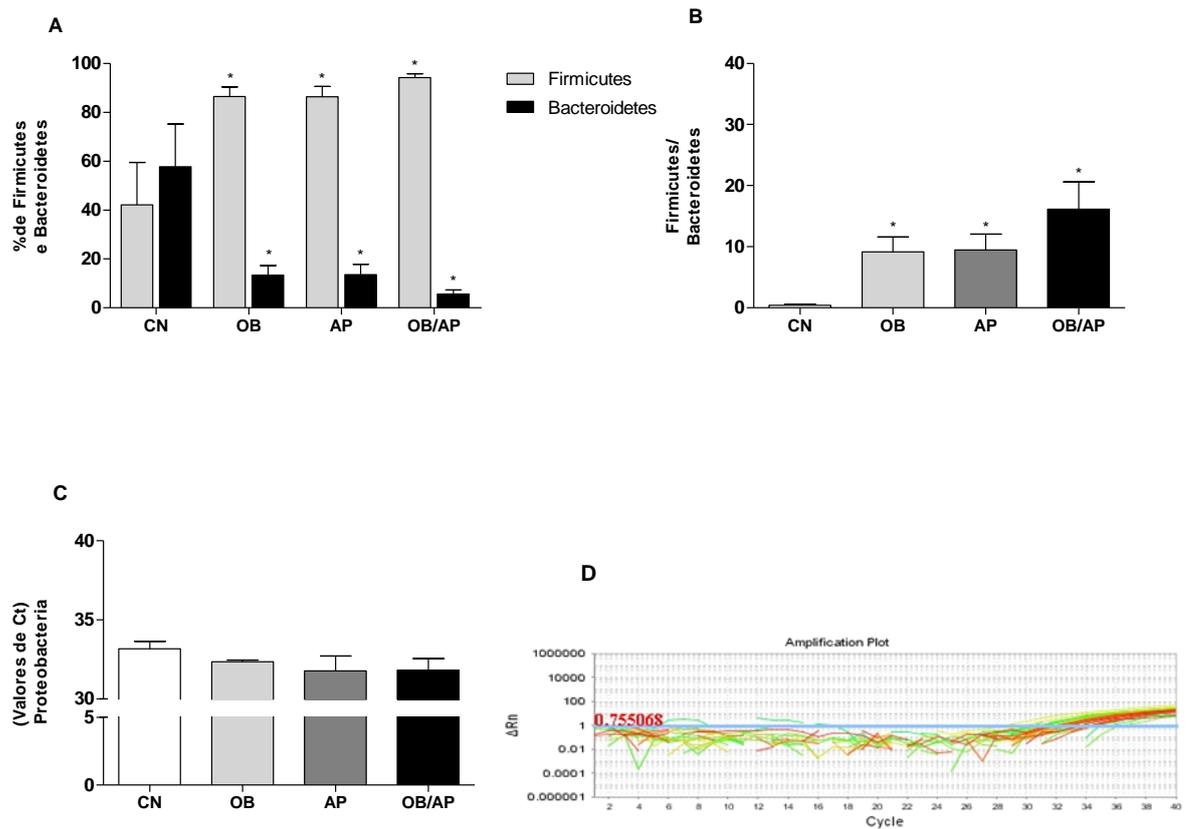
### 4.4.1 Quantificação relativa de bactérias no intestino

O trato gastrointestinal, abriga a maior quantidade e diversidade de microrganismos do corpo humano e onde se encontram filios de bactérias importantes tanto para a homeostasia do tecido quanto no desenvolvimento de doenças. Os principais filios encontrados no intestino humano são: Firmicutes, Bacteroidetes e Proteobacteria (DONALDSON; LEE; MAZMANIAN, 2015) . Portanto, estes foram os filios quantificados pela técnica de qPCR (Figuras 23A – 23E). Nesse trabalho, não foi observada diferença significativa na porcentagem de Firmicutes e Bacteroidetes no grupo CN. Porém, o filo Firmicutes apresentou maior porcentagem, comparado ao filo Bacteroidetes, em todos os grupos analisados (Figura 22A e 22B).

Com relação ao filo Bacteroidetes, foi observado que somente os animais do grupo OB apresentaram aumento significativo na quantidade relativa deste filo no intestino, quando comparado ao grupo CN. Também foi visto que o grupo OB/AP apresentou redução significativa no número relativo de Bacteroidetes no intestino em comparação ao grupo OB (Figura 22A).

Para o filo Firmicutes, foi observado aumento significativo na porcentagem em todos os grupos analisados (OB, AP e OB/AP), quando comparado ao CN. Embora não tenha sido observada diferença significativa na porcentagem desse filo entre os grupos analisados (Figura 22A).

Já o filo Proteobacteria, apesar de não ter apresentado diferença significativa dos grupos analisados, os valores de Ct e o *plot* de amplificação demonstram que após 30 ciclos as curvas de amplificação ultrapassam o limiar de amplificações inespecíficas, demonstrando que há pequena quantidade de DNA do filo Proteobacteria nos grupos analisados (Figuras 22C e 22D).

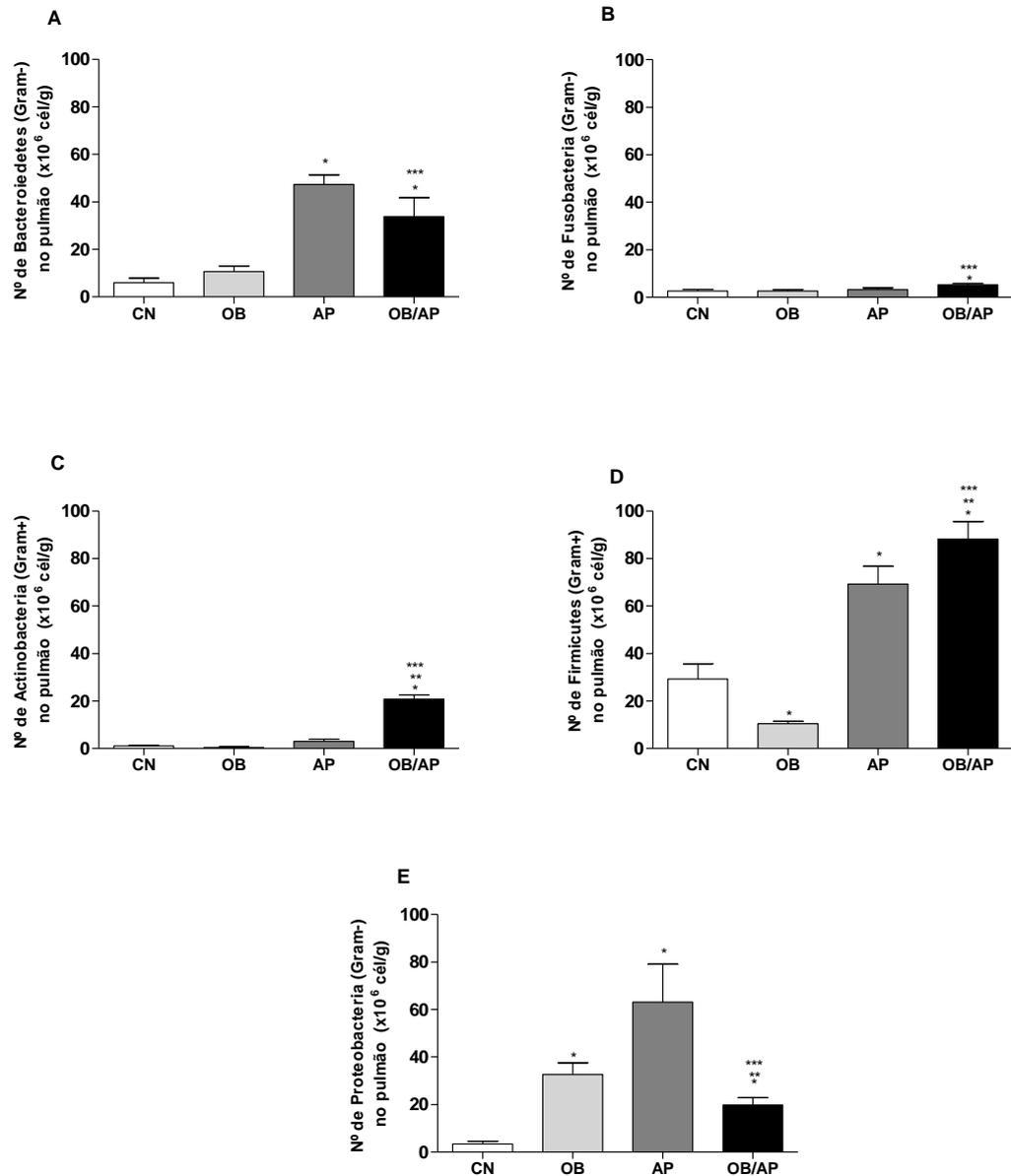


**Figura 22: Quantificação relativa por qPCR dos filios de bactérias no intestino.** Quantificação relativa dos filios Bacteroidetes, Firmicutes e Proteobacteria no intestino nos grupos CN, OB, AP e OB/AP. % de Firmicutes e Bacteroidetes (A), Proporção de Firmicutes/Bacteroidetes (B), Valores de Ct do filo Proteobacteria no intestino (C) e *plot* de amplificação do filo Proteobacteria (D),  $\Delta Rn$ : é a razão entre o sinal fluorescente produzido pela amplificação pelo sinal do corante de referência. Threshold (limiar – 0,75) é o limite do sinal de amplificação inespecífico, Ct: quantidade de ciclos necessários para que o sinal fluorescente ultrapasse o limite definido pelo threshold. Valores de Ct são inversamente proporcionais à quantidade de DNA da amostra.  $p < 0.05$ . \*comparado ao grupo CN. (n=5).

#### 4.4.2 Quantificação de bactérias no tecido pulmonar

Estudos recentes demonstram que o pulmão não é um ambiente estéril (DICKSON et al., 2018; HILTY et al., 2010a). Tendo em vista que o ambiente pulmonar durante a obesidade estava alterado, foi avaliado se essas mudanças poderiam afetar a microbiota pulmonar. Para isso, o presente estudo quantificou os principais filos de bactérias encontrados na microbiota pulmonar: Bacteroidetes, Fusobacteria, Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria, 48h após o último desafio com OVA (Figura 23A – 23E), pela técnica da FISH. Foi observada redução significativa do filo Firmicutes (Figura 23D) e aumento de Proteobacteria (Figura 23E) no grupo OB, quando comparado ao grupo CN. Já o grupo AP apresentou aumento significativo de Bacteroidetes (Figura 23A), Firmicutes (Figura 23D) e Proteobacteria (Figura 23E), quando comparado ao grupo CN.

No grupo OB/AP, houve aumento significativo de todos os filos analisados, quando comparado aos grupos CN e OB, com exceção de Proteobacteria, o qual houve redução em relação ao grupo OB (Figuras 23A – 23E). Porém em comparação ao grupo AP, foi observado aumento significativo dos filos Firmicutes (Figura 23D) e Actinobacteria (Figura 23C) e redução do filo Proteobacteria (Figura 23E). Esses resultados também foram demonstrados em porcentagem, de acordo com cada filo (Figura 23F).

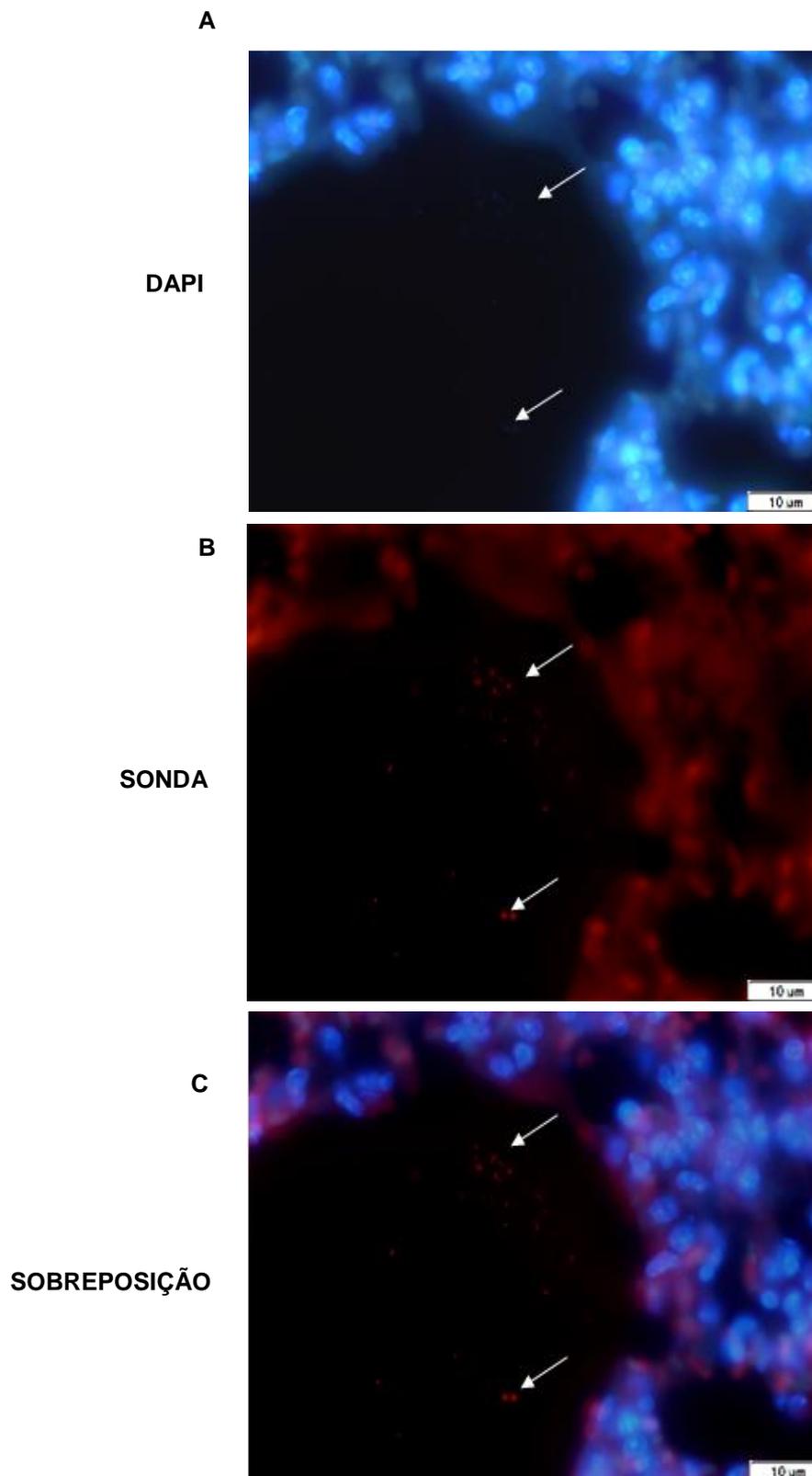


**Figura 23: Quantificação dos filamentos de bactérias no tecido pulmonar pela técnica de FISH.** Contagem dos filamentos de bactérias: Bacteroidetes (A), Fusobacteria (B), Actinobacteria (C), Firmicutes (D), Proteobacteria (E) no tecido pulmonar, 48h após o último desafio com a OVA.  $p < 0,05$  \*comparado ao grupo CN, \*\*comparado ao grupo AP, \*\*\*comparado ao grupo OB. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. (n=5).

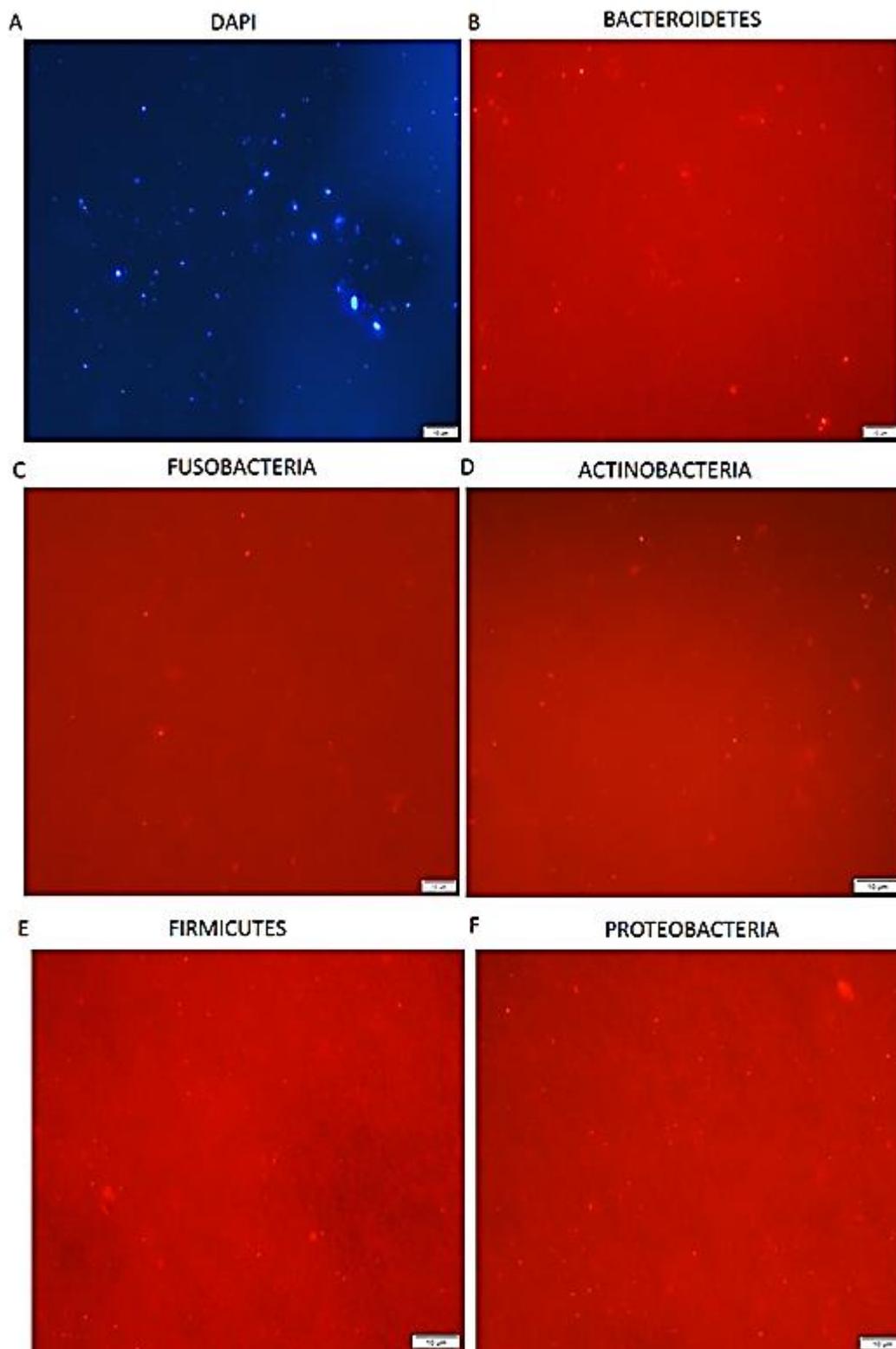
#### *4.4.2.1 Localização de bactérias no tecido e no macerado pulmonar*

Para mostrar a localização das bactérias no tecido pulmonar, foi utilizada a técnica da FISH, utilizando o corante DAPI, o qual possui afinidade por DNA e a mistura de três sondas EUB I, II e III, que se pareiam ao RNA bacteriano (Figura 24A – 24C). A figura 24 mostra uma imagem representativa de um corte de tecido pulmonar, tendo como foco uma via aérea, demonstrando a localização das bactérias nos pulmões.

A figura 25 ilustra os filamentos de bactérias hibridizados no macerado do tecido pulmonar. DAPI (Figura 25A), Bacteroidetes (Figura 25B), Fusobacteria (Figura 25C), Actinobacteria (Figura 25D), Firmicutes (Figura 25E) e Proteobacteria (Figura 25F).



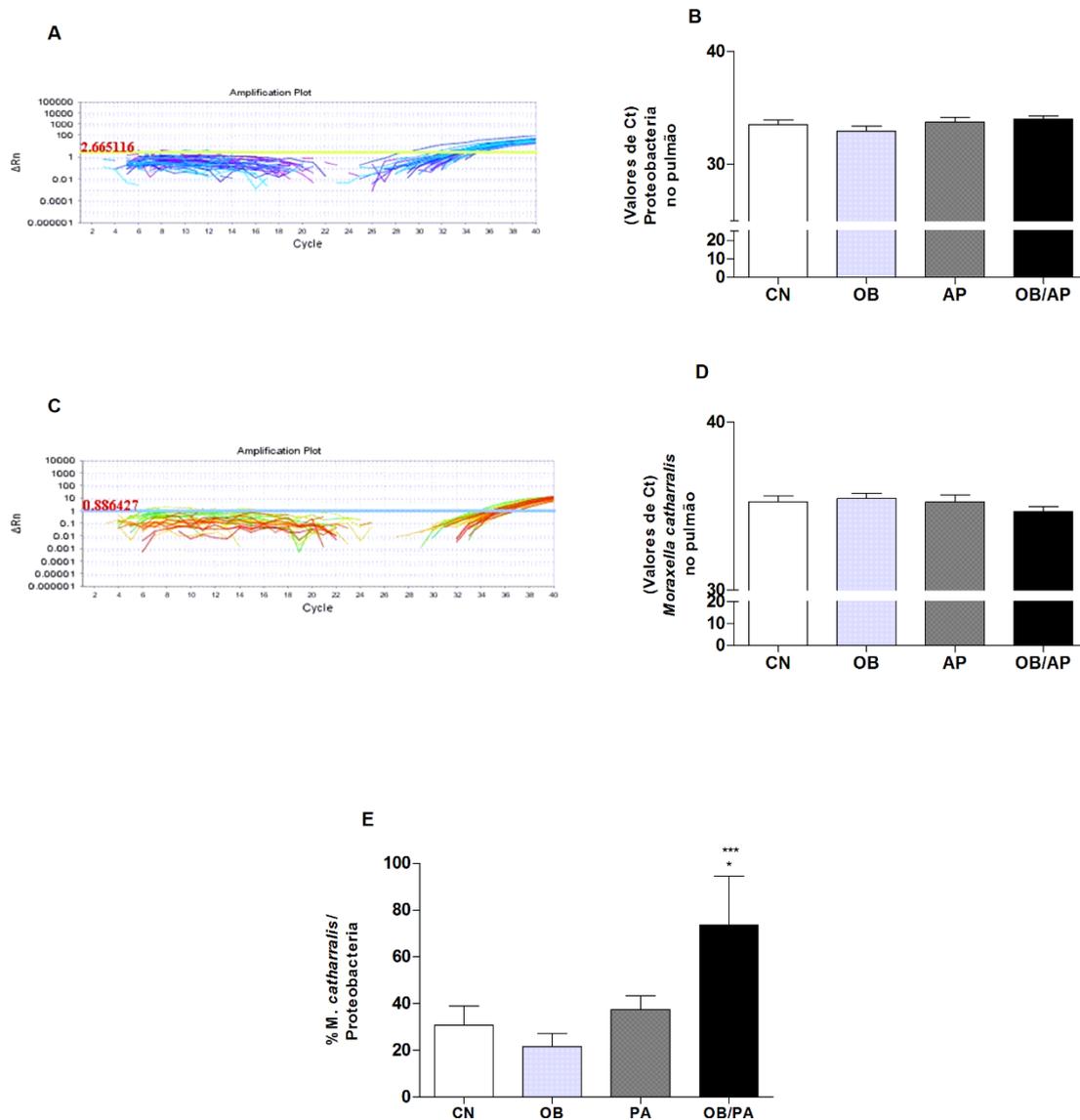
**Figura 24. FISH dos pulmões dos animais.** Lâminas do tecido pulmonar dos animais estudados. Marcação do tecido pulmonar com DAPI (A), Marcação com a mistura das três sondas EUB I, II e III (B) e sobreposição da sonda EUB no DAPI (C). Setas mostrando a localização das bactérias no tecido pulmonar. Escala de 10 μm.



**Figura 25. FISH dos pulmões dos animais.** Macerado de tecido pulmonar dos animais estudados. Marcação do tecido pulmonar com DAPI (A), com as sondas BAC (B), FUS (C), HCG (D), LGC (E) e PROT (F). Escala de 10  $\mu$ m.

#### 4.4.2.2 Quantificação relativa de bactérias no pulmão

Já está descrito na literatura que uma das espécies encontradas nos pulmões de asmáticos é a *Moraxella catharralis*, pertencente ao filo Proteobacteria e que se relaciona com o agravamento da doença (ALNAHAS et al., 2017). Diante dessa informação, foi quantificado, pela técnica de qPCR, tanto o filo quanto a espécie no pulmão dos animais (Figura 26A – 26E). Apesar de não ter sido encontrada diferença significativa entre os grupos tanto de Proteobacteria quanto de *M. catharralis*, observa-se pelo *plot* de amplificação que essas bactérias estavam presentes nos pulmões dos animais, porém em pouca quantidade, pois a amplificação inicia-se somente após 34 ciclos (Figura 26A – 26D). Interessante destacar que a espécie *M. catharralis* foi detectada em maior quantidade dentro do filo Proteobacteria, no grupo OB/AP, quando comparado aos grupos CN e OB. Comparados os grupos alérgicos, houve tendência do grupo OB/AP em apresentar maior quantidade de *M. catharralis* (Figura 26E).

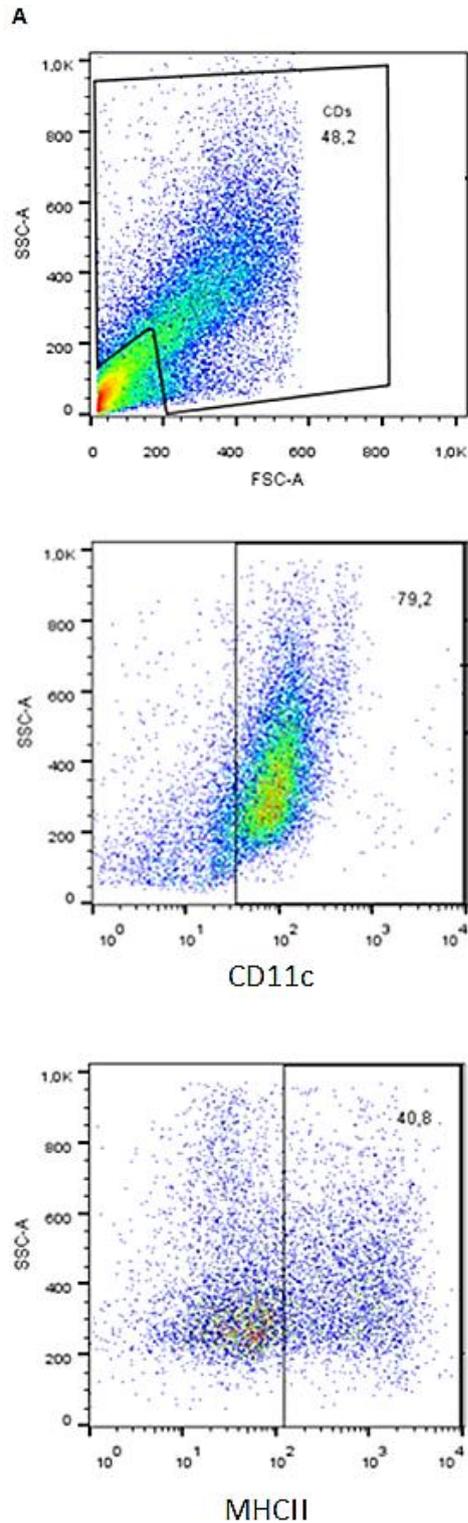


**Figura 26: Quantificação relativa por qPCR dos filios de bactérias no pulmão.** Plot de amplificação (A) e valores de Ct de Proteobacteria (B), plot de amplificação (C) e valores de Ct da espécie *Moraxella catharralis* (D) e Proporção de *Moraxella catharralis* dentro do filo Proteobacteria (E) no pulmão dos grupos CN, OB, AP e OB/AP.  $\Delta Rn$ : é a razão entre o sinal fluorescente produzido pela amplificação pelo sinal do corante de referência. Threshold (limiar) é o limite do sinal de amplificação inespecífico. Ct: quantidade de ciclos necessários para que o sinal fluorescente ultrapasse o limite definido pelo threshold. Valores de Ct são inversamente proporcionais à quantidade de DNA da amostra.  $p < 0,05$  \*comparado ao grupo CN; \*\*\* comparado ao grupo OB. Os dados são expressos como média +/- EPM. (n=5).

## **4.5 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA MICROBIOTA PULMONAR SOBRE CDS DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA**

### **4.5.1 Identificação e caracterização de células dendríticas CD11c<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> diferenciadas da medula óssea**

A partir dos dados observados que demonstraram alteração da microbiota pulmonar influenciada pela obesidade, o passo seguinte foi avaliar o efeito dessa mudança na resposta imune iniciada pelas CDs. Para isso, foi realizada co-cultura de CDs derivadas da medula óssea de animais do grupo CN e OB com a microbiota pulmonar dos seus respectivos grupos. Com o intuito de selecionar CDs derivadas da medula óssea desses animais, foram selecionadas células com expressão dos marcadores CD11c e MHCII. Desse modo, a partir do *gate* definido de acordo com tamanho e granulosidade (Figura 27).

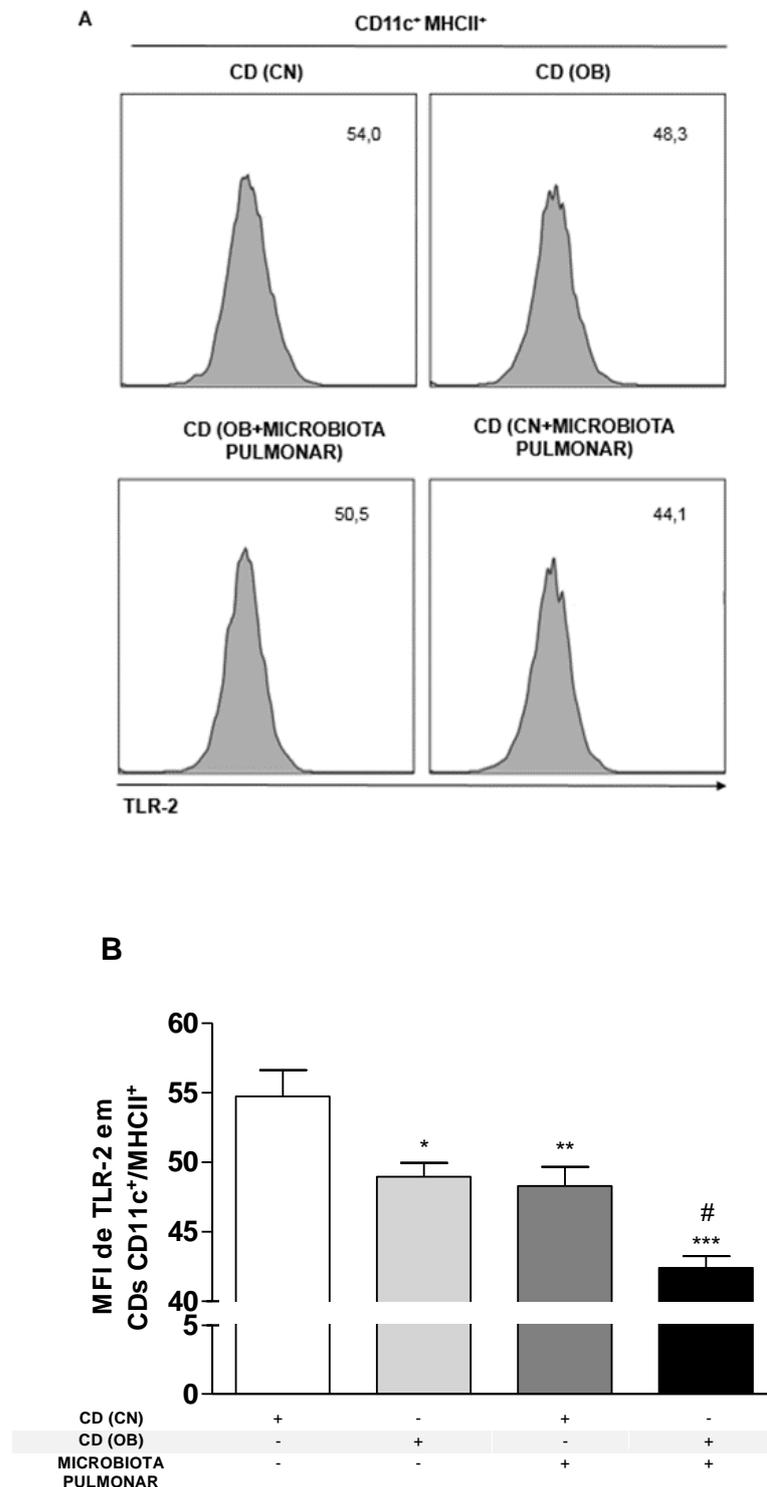


**Figura 27. Dot-plots representivos de citometria de fluxo para seleção de células dendríticas derivadas da medula óssea.** A partir do *gate* determinado de acordo com tamanho celular (FSC) e granulosidade (SSC) específicos, foram selecionadas as células CD11c<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup>. Os valores nos quadrantes estão expressos em porcentagem.

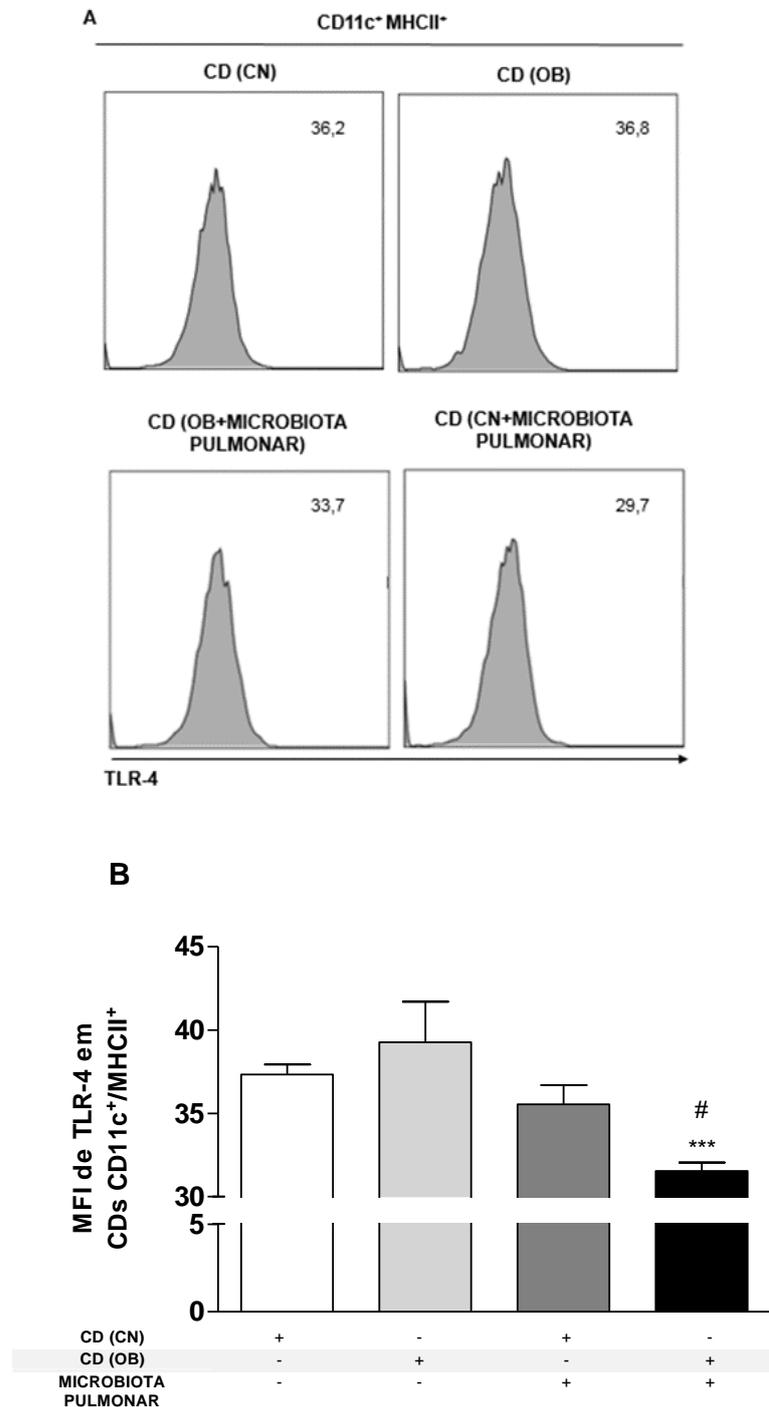
#### **4.5.2 Avaliação da expressão dos receptores TLR-2 e TLR-4 em CDs CD11c<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup> derivadas da medula óssea e cultivadas com a microbiota pulmonar**

Como CDs pulmonares apresentaram alterações nos receptores TLR-2 e TLR-4, também foram avaliados esses receptores na co-cultura. Foi observado que a obesidade por si só reduziu a expressão de TLR-2 em CDs CD11c<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup>, quando comparado ao grupo CN. Após o estímulo com a microbiota pulmonar, a expressão desse receptor reduziu ainda mais tanto no grupo CN quanto no grupo OB, quando comparados aos seus respectivos controles. (Figura 28).

Com relação ao receptor TLR-4, antes do estímulo com a microbiota pulmonar, não foi observada diferença significativa no grupo OB, quando comparado ao grupo CN. Porém quando as CDs foram estimuladas com a microbiota pulmonar, houve redução significativa na expressão de TLR-4 no grupo OB, quando comparado tanto ao seu grupo controle, quanto ao grupo CN estimulado com a microbiota pulmonar (Figura 29).



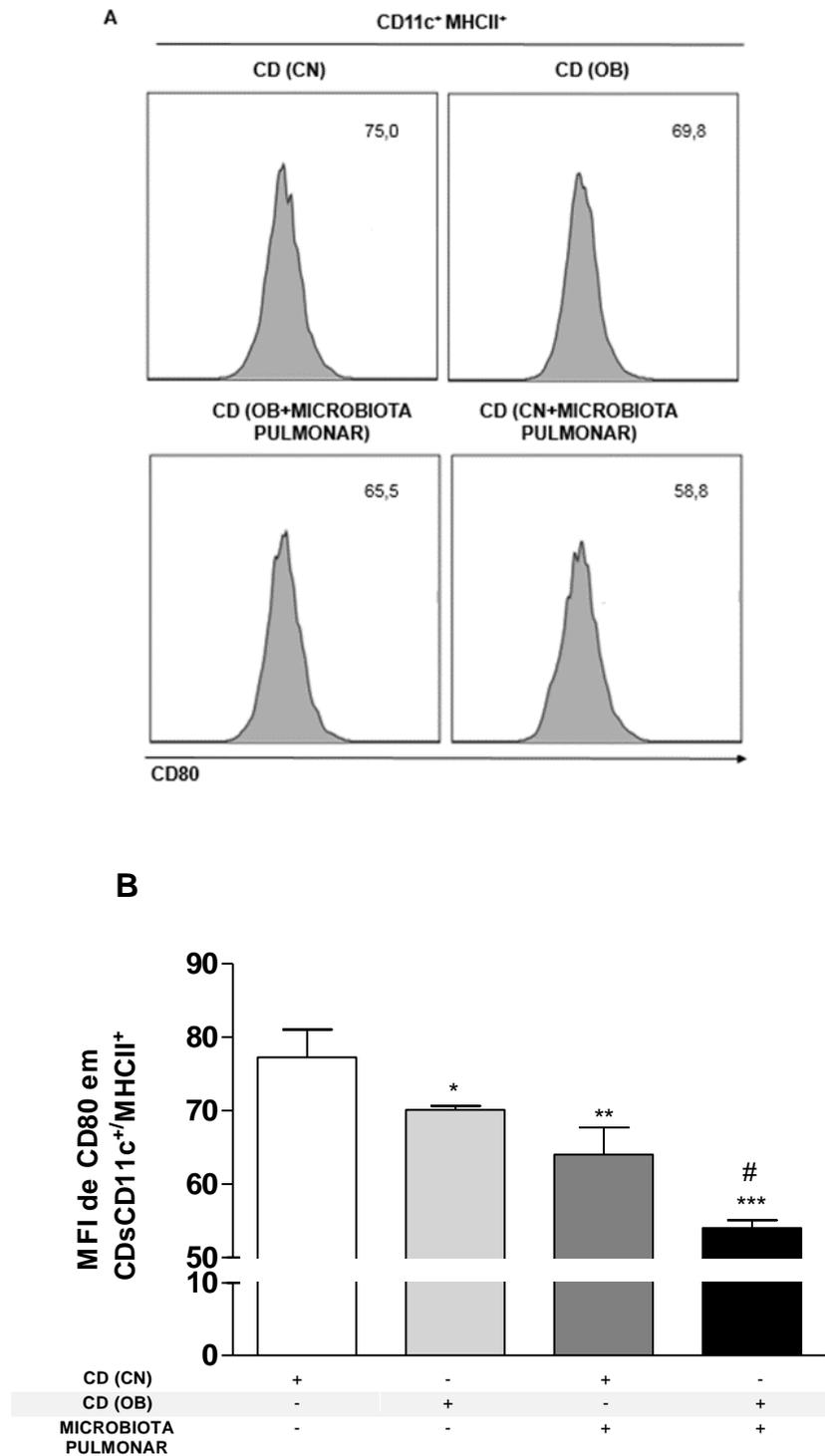
**Figura 28. Expressão de TLR-2 em CDs CD11c<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup> derivadas da medula óssea e cultivadas com a microbiota pulmonar.** *Dot-plots* representativos (A); Mediana de Intensidade de Fluorescência (MFI) de TLR-2 em CDs CD11c<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup> nos grupos CN(CD), OB(CD), CN (CD+microbiota pulmonar) e OB (CD+microbiota pulmonar) (B).  $p < 0.05$  \* comparado ao CN (CD), \*\* CN (CD) comparado com CN (CD+ microbiota pulmonar), \*\*\* OB (CD) comparado com OB (CD+ microbiota pulmonar) e # CN (CD+ microbiota pulmonar) comparado com OB (CD+ microbiota pulmonar).



**Figura 29. Expressão de TLR-4 em CDs CD11c<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup> derivadas da medula óssea e cultivadas com a microbiota pulmonar.** *Dot-plots* representativos (A); Mediana de Intensidade de Fluorescência (MFI) de TLR-4 em CDs CD11c<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup> nos grupos CN(CD), OB(CD), CN (CD+microbiota pulmonar) e OB (CD+microbiota pulmonar.) (B).  $p < 0.05$ . \* comparado ao CN (CD), \*\* CN (CD) comparado com CN (CD+ microbiota pulmonar), \*\*\* OB (CD) comparado com OB (CD+ microbiota pulmonar) e # CN (CD+ microbiota pulmonar) comparado com OB (CD+ microbiota pulmonar). Os dados são expressos como média +/- EPM. (n=5).

#### **4.5.3 Avaliação da expressão do marcador CD80 em CDs CD11c<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup> derivadas da medula óssea e cultivadas com a microbiota pulmonar**

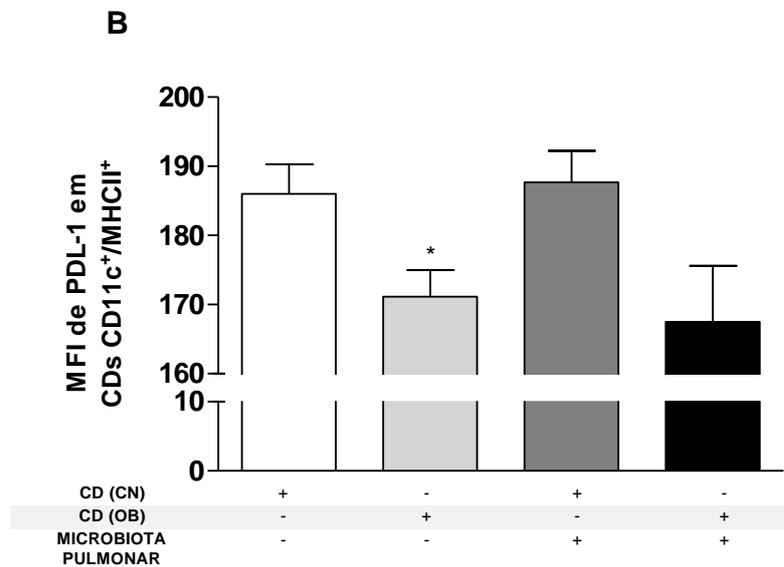
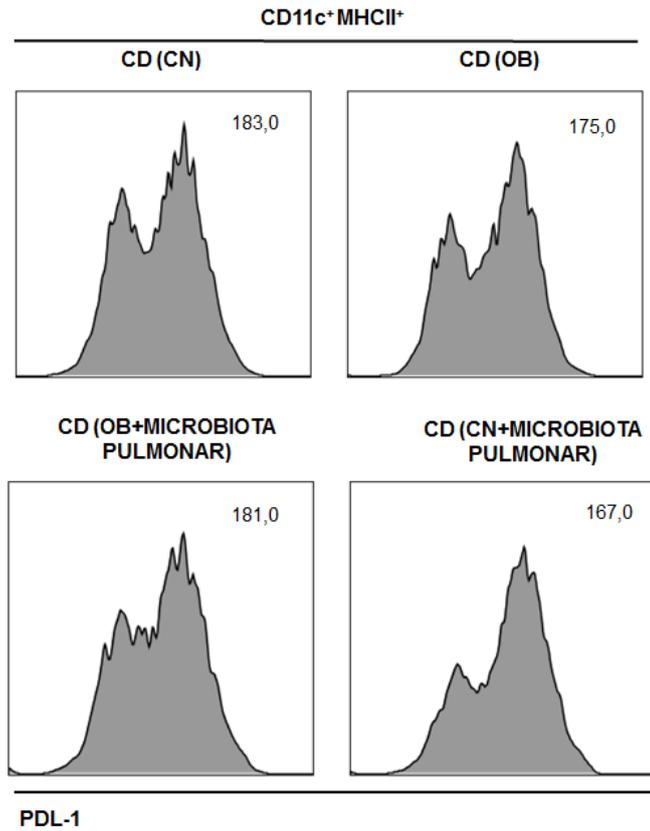
A molécula co-estimulatória CD80 é um importante indicador da ativação das CDs (PIZZOLLA et al., 2016). Neste estudo, CDs CD11c<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup> do grupo OB apresentou menor expressão de CD80, quando comparado ao grupo CN. Após o estímulo com a microbiota pulmonar, a expressão de CD80 reduziu de forma significativa no grupo CN, quando comparado ao CN sem estímulo. Sendo que essa expressão foi ainda menor no grupo OB estimulado com a microbiota pulmonar, quando comparado aos grupos controles (Figura 30).



**Figura 30. Expressão de CD80 CDs CD11c<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup> derivadas da medula óssea e cultivadas com a microbiota pulmonar.** *Dot-plots* representativos (A); Mediana de Intensidade de Fluorescência (MFI) de CDs de CD80 em CD11c<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup> nos grupos CN(CD), OB(CD), CN (CD+microbiota pulmonar) e OB (CD+microbiota pulmonar.) (B).  $p < 0.05$  \* comparado ao CN (CD), \*\* CN (CD) comparado com CN (CD+ microbiota pulmonar), \*\*\* OB (CD) comparado com OB (CD+ microbiota pulmonar) e # CN (CD+ microbiota pulmonar) comparado com OB (CD+ microbiota pulmonar). Os dados são expressos como média +/- EPM. (n=5).

#### **4.5.4 Avaliação da expressão de PDL-1 em CDs CD11c<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> derivadas da medula óssea e cultivadas com a microbiota pulmonar**

A molécula PDL-1 presente na superfície de CDs, é essencial na regulação da resposta imunológica (KEIR et al., 2008). A partir dos resultado encontrados, foi observado que a obesidade reduziu a expressão de PDL-1, quando comparado ao CN sem estímulo. Contudo a adição da microbiota não alterou a expressão desse marcador, nos grupos controle e obeso (Figura 31).



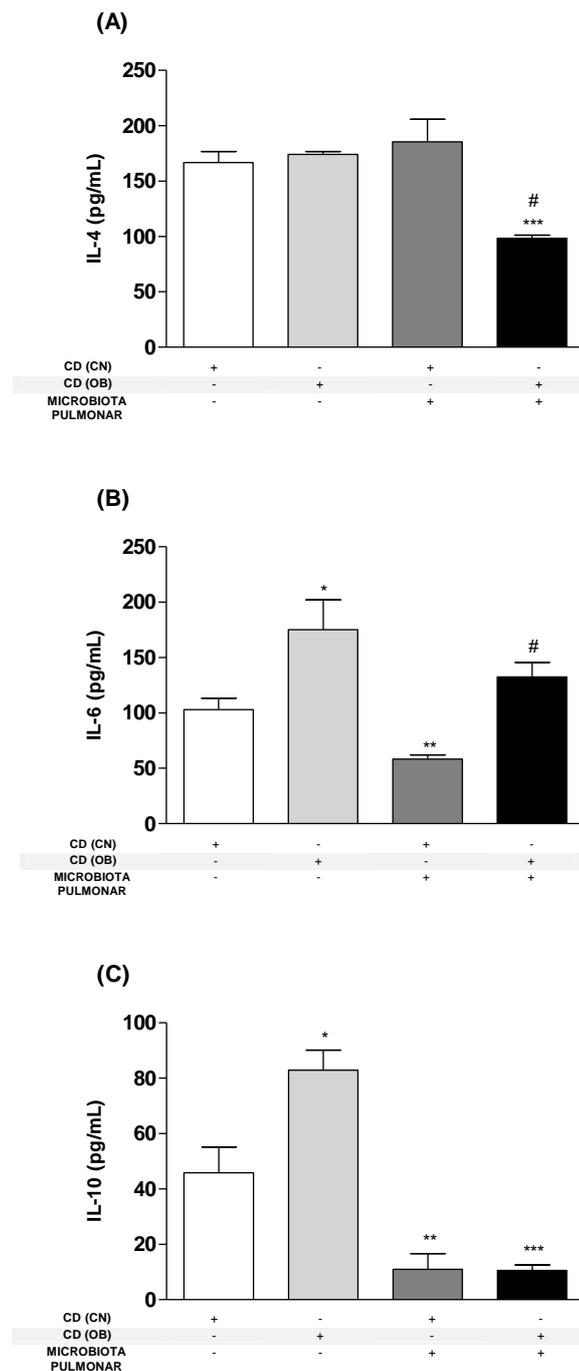
**Figura 31. Expressão de PDL-1 em CD11c<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup> derivadas da medula óssea e cultivadas com a microbiota pulmonar.** *Dot-plots* representativos (A); Mediana de Intensidade de Fluorescência (MFI) de PDL-1 em CD11c<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup> nos grupos CN(CD), OB(CD), CN (CD+microbiota pulmonar) e OB (CD+microbiota pulmonar.) (B).  $p < 0.05$  \* comparado ao CN (CD), \*\* CN (CD) comparado com CN (CD+ microbiota pulmonar), \*\*\* OB (CD) comparado com OB (CD+ microbiota pulmonar) e # CN (CD+ microbiota pulmonar) comparado com OB (CD+ microbiota pulmonar). Os dados são expressos como média +/- EPM. (n=5).

#### **4.5.5 Dosagem das citocinas IL-4, IL-6 e IL-10 no sobrenadante da co-cultura de CDs CD11c<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> derivadas da medula óssea e cultivadas com a microbiota pulmonar**

A dosagem de IL-4 no sobrenadante da cocultura de BMDC demonstrou que a microbiota do grupo obeso foi capaz de reduzir os níveis dessa citocina em BMDCs de animais do mesmo grupo, enquanto não houve alteração nos níveis de IL-4 na cocultura de BDMCs magros (Figura 32A).

Já os níveis de IL-10, demonstraram que BDMCs do grupo obeso apresentaram níveis elevados de IL-10 independente do estímulo. Após o estímulo com a microbiota, foi visto que as BDMCs tanto de controle quanto de obeso reduziu significativamente a produção dessa citocina IL-10, quando comparados ao seus respectivos controles (Figura 32B).

Com relação à IL-6, seus níveis estavam elevados em BDMCs de obesos, sendo que após o estímulo com a microbiota não houve alteração significativa nesse grupo, contudo houve redução de IL-6 nas BDMCs do grupo controle (Figura 32C).



**Figura 32. Dosagem de citocinas no sobrenadante da co-cultura de CDs CD11c<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup> derivadas da medula óssea e cultivadas com a microbiota pulmonar.** Níveis da citocina IL-4 (A), da citocina IL-6 (B) e da IL-10 (C) nos grupos CN(CD), OB(CD), CN (CD+microbiota pulmonar) e OB (CD+microbiota pulmonar.), através de ELISA.  $p < 0.05$  \* comparado ao CN (CD), \*\* CN (CD) comparado com CN (CD+ microbiota pulmonar), \*\*\* OB (CD) comparado com OB (CD+ microbiota pulmonar) e # CN (CD+ microbiota pulmonar) comparado com OB (CD+ microbiota pulmonar). Os dados são expressos como média +/- EPM. (n=5).

## 5 DISCUSSÃO

Estudos recentes demonstram que os índices de prevalência da asma vem aumentando, sobretudo em países desenvolvidos e em desenvolvimento (MORAES; SEARS; SUBBARAO, 2018b). As possibilidades para explicar esse aumento estão cada vez mais associadas à redução na exposição a certos tipos de microrganismos, a tratamentos constantes com antibióticos, parto, dieta e obesidade (VAN TILBURG BERNARDES; ARRIETA, 2017).

Já é bem estabelecido que a obesidade é um fator de risco para o desenvolvimento de várias doenças, dentre elas: Diabetes tipo 2, hipertensão, aterosclerose e câncer (MEDINA-REMÓN; KIRWAN; LAMUELA-RAVENTÓS, 2016). Diversos trabalhos em modelo experimental (SILVA et al., 2017) e em humanos (GIBEON et al., 2013), já relataram que o aumento no índice de massa corporal (IMC) é um fator de risco para o desenvolvimento da asma, demonstrando que obesos asmáticos apresentam piora dos sintomas respiratórios e um fenótipo de asma distinto da convencional, com aumento de neutrófilos no tecido pulmonar, redução nos níveis séricos de IgE e aumento na produção de muco (GIBEON et al., 2013; SILVA et al., 2017). Contudo, ainda são escassos estudos que avaliam os mecanismos imunológicos envolvidos por trás da associação entre essas duas doenças, consideradas atualmente um problema grave de saúde pública.

No presente estudo, os animais foram submetidos a uma dieta com alto teor de gordura e apresentaram evidente aumento de massa corporal a partir da segunda semana de dieta associada ao acúmulo de massa na região perigonadal, características do estado obeso (GONZÁLEZ-MUNIESA et al., 2017). Este trabalho usou o mesmo protocolo de indução de obesidade de Silva *et al.*, em camundongos da linhagem BALB/c, porém a única diferença foi a duração da dieta, que neste é de 4 semanas a mais (SILVA et al., 2017).

Posteriormente, foi demonstrado que as sensibilizações e desafios com a OVA, também mostraram resultados satisfatórios, uma vez que houve aumento na produção de citocinas de perfil Th2 e níveis séricos de IgE/IgG1 – específica para OVA, juntamente com a contagem de células totais no BAL, particularmente de eosinófilos. Em concordância com a eosinofilia no BAL, também foi visto aumento na produção dessas células na medula óssea e na quantidade dessas células no tecido pulmonar,

associado a níveis elevados de IL-5 e de CCL11. Em paralelo, houve aumento de TSLP, IL-25, IL-33, IL-4, IL-9 e IL-13 nesses animais. Estes dados são importantes, pois refletem a inflamação característica da asma alérgica (FAHY, 2015). Os resultados também indicaram que o pico da resposta alérgica acontece em 24h após o último desafio com a OVA, uma vez que em 48 horas houve declínio significativo nos parâmetros analisados acima.

Já há muito se sabe do processo imunológico envolvido no desenvolvimento da asma alérgica, porém quando ela é acompanhada de outras comorbidades como a obesidade, seus mecanismos se tornam mais complexos. Nesse contexto, é crescente o número de trabalhos demonstrando a relação entre essas doenças (CANÖZ et al., 2008; GIBEON et al., 2013; KIM; ELLWOOD; ASHER, 2009; SILVA et al., 2017). Na literatura já estão descritos diversos mecanismos pelos quais a obesidade influencia a resposta imune nos pulmões, dentre eles: redução na função pulmonar, níveis séricos de leptina, glicose e lipídios elevados e um processo inflamatório sistêmico (KIM et al., 2014; MATHEWS et al., 2014; SHOWALTER et al., 2018). O presente trabalho, demonstrou que a obesidade por si só elevou os níveis de IL-5, IL-9 e IL17A nos pulmões, Kim *et al.* demonstrou um aumento de IL-17A, relacionado ao aumento da hiperresponsividade brônquica em animais obesos (KIM et al., 2014). Ao passo que, após a indução de alergia, a obesidade promoveu um atraso no desenvolvimento da resposta alérgica, promovendo uma menor produção de eosinófilos na medula óssea consequentemente levando a um menor número de eosinófilos no tecido pulmonar e no BAL. Em paralelo, foi visto aumento na produção de neutrófilos na medula óssea associado aos níveis elevados de MPO e da citocina IL-17A nos pulmões em 48h, corroborando com estudo, desenvolvido pelo nosso grupo, que demonstrou um atraso na resposta imune nos animais obesos alérgicos (SILVA et al., 2017) e com o desenvolvimento de uma resposta de perfil Th17 (MATHEWS et al., 2014; SILVA et al., 2017). Apesar do presente trabalho não ter quantificado o número de neutrófilos no tecido pulmonar, foi visto que os níveis de MPO e IL-17A estavam aumentados nos pulmões dos animais obesos alérgicos, sugerindo que houve recrutamento de neutrófilos proporcionado pela IL17A. Portanto, esses dados demonstram que os animais obesos apresentaram alterações em seu ambiente pulmonar, independente de estímulos alergênicos, sugerindo uma alteração da resposta imune comparada à dos animais controle.

Vale ressaltar que os animais obesos alérgicos apresentaram níveis reduzidos das citocinas epiteliais TSLP e IL-25, assim como das citocinas IL-4 e IL-5, o que pode ter colaborado com o atraso no desenvolvimento da resposta alérgica e o aparecimento do perfil Th17. Estudos demonstraram que níveis reduzidos de TSLP e de IL-25 na ausência do receptor de TSLP ou no bloqueio de IL-25 favorece o desenvolvimento de uma resposta alérgica neutrofílica, com níveis elevados de IL-17A (BARLOW et al., 2011; YADAVA et al., 2014). Em paralelo, houve aumento na produção de muco pelas células caliciformes do pulmão, associado aos níveis elevados de IL-9 e IL-13, que são citocinas relacionadas à produção de muco (DUNICAN et al., 2018). Diante desses resultados, foi demonstrado que obesidade leva a uma mudança de perfil celular nos animais alérgicos, com consequente piora na fisiologia pulmonar e na resposta alérgica, em concordância com estudos anteriores (GIBEON et al., 2013; PETERS et al., 2011; SILVA et al., 2017; UMETSU, 2017).

Tendo em vista as alterações da resposta imune observadas nos pulmões dos animais obesos alérgicos, este trabalho buscou entender se essas mudanças poderiam estar relacionadas à disbiose pulmonar, e conseqüentemente, levar a uma mudança de perfil de resposta imune mediada pelas CDs.

Dados atuais colocam em evidência o papel primordial da microbiota intestinal no metabolismo energético e na manutenção da homeostasia do sistema imunológico (CERF-BENSUSSAN; GABORIAU-ROUTHIAU, 2010; HOOPER; LITTMAN; MACPHERSON, 2012). Diante desse fato, estudos demonstram que as funções exercidas pela microbiota no TGI, podem ter um efeito sistêmico, influenciando até mesmo na imunidade pulmonar (CLAUS et al., 2011; ROOKS; GARRETT, 2016; WELDON et al., 2015). Já está bem caracterizada que a microbiota intestinal saudável é composta predominantemente de membros do filo Bacteroidetes, seguido do filo Firmicutes. Porém, propõe-se que o estilo de vida ocidental limita a colonização no intestino, que por sua vez interrompe o funcionamento normal do sistema imunológico e aumenta o risco de desenvolvimento da asma (PENDERS et al., 2014).

Atualmente tem-se destacado o desenvolvimento da obesidade à disbiose do TGI. Dietas com alto teor de gordura aumentam a taxa de Firmicutes/Bacteroidetes no intestino, além de reduzir a diversidade bacteriana no local (COMPARE et al., 2016; HARLEY I.T.W., 2012; RAVUSSIN et al., 2012). Firmicutes são bactérias

predominantemente anaeróbias e gram-positivas, apresentando a molécula de peptidoglicano na superfície de sua parede celular. Essa molécula é importante na sinalização para várias células do sistema imunológico e é reconhecida por receptores da imunidade inata como os TLR-2 (ROUND et al., 2011). Já o filo Bacteroidetes que engloba bactérias aeróbias e anaeróbias gram-negativas, possuem na composição da sua parede celular, lipopolissacarídeos ou LPS que é reconhecido pelo receptor TLR-4 (BASHIR et al., 2004; MARCELO MACEDO ROGERO, 2018).

Neste estudo, tanto a obesidade quanto a asma promoveram um aumento significativo da proporção Firmicutes/Bacteroidetes no intestino, quando comparados ao CN. Em relação ao efeito da obesidade, os dados podem ser explicados pela maior capacidade do filo Firmicutes em extrair e estocar energia proveniente da dieta, levando ao ganho de peso (DUGAS et al., 2016; TURNBAUGH et al., 2006). Com relação ao efeito proporcionado pelas sensibilizações e desafios com a OVA na microbiota intestinal, os resultados obtidos vão ao encontro daqueles encontrados na literatura, os quais suportam um efeito bidirecional entre o eixo intestino-pulmões (BARFOD et al., 2017).

Embora estudos já tenham demonstrado a comunicação existente entre intestino e pulmão (MARSLAND; TROMPETTE; GOLLWITZER, 2015), o trabalho atual fornece a primeira evidência da influência da obesidade na microbiota pulmonar. Para detectar a presença de bactérias no pulmão, foi utilizada a técnica de Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) que forneceu a avaliação dos microrganismos em seu ambiente natural. O que consiste em uma informação muito mais rica do que somente presença ou ausência, além de informações como forma, atividade e localização de bactérias *in situ* e também possibilitando quantificar grupos menos frequentes (MOTER; GOBEL, 2000). Além disso, a utilização da FISH permitiu uma avaliação mais profunda da microbiota, já que o uso de todo o pulmão possibilita a superação de problemas como a distribuição geográfica e a incapacidade de remoção de bactérias estreitamente aderidas ao epitélio.

Os pulmões não são mais considerados um órgão estéril, e eles são conhecidos por conter predominantemente bactérias dos filos Bacteroidetes e Firmicutes. Sabe-se que em humanos e em camundongos, a exposição a microrganismos começa ainda na infância e marca o estabelecimento de uma microbiota pulmonar. Essa microbiota é importante na manutenção da homeostasia

pulmonar e na morfogênese do trato respiratório. O que é comprovado em camundongos *germ-free* que apresentam pulmões menores e diminuição do número de alvéolos maduros, esse prejuízo ao desenvolvimento dos pulmões se estende também à maturação da imunidade pulmonar (MAN; DE STEENHUIJSEN PITERS; BOGAERT, 2017; SINGH et al., 2017; YUN et al., 2014).

No presente estudo, foi possível visualizar, quantificar e localizar as bactérias no tecido pulmonar dos grupos, demonstrando que os filos mais predominantes nos pulmões dos animais saudáveis foram: Bacteroidetes, Firmicutes e Proteobacteria, corroborando com dados já existentes na literatura (BECK; YOUNG; HUFFNAGLE, 2012; NGUYEN; VISCOGLIOSI; DELHAES, 2015). De forma interessante, a obesidade alterou a contagem de dois filos de bactérias nos pulmões, levando à redução de Firmicutes e aumento no número de Proteobacteria. Embora estudos avaliando o efeito da obesidade na microbiota pulmonar sejam escassos, Cho *et al* discute que uma das possíveis explicações para essas alterações na composição da microbiota pulmonar seria que, durante a obesidade, há aumento de lipídios e glicose na corrente sanguínea que podem alcançar os pulmões e criar um microambiente favorável ao crescimento de algumas bactérias (CHO; SHORE, 2016). De fato, estudos demonstram que os pulmões de animais obesos apresentam alterações metabólicas e níveis elevados de leptina nos pulmões (SHOWALTER et al., 2018; SILVA et al., 2017).

Uma importante questão surgiu a partir desse resultados: qual seria o efeito da disbiose pulmonar na resposta imune iniciada pelas CDs? As CDs são uma população heterogênea de células derivadas da medula óssea altamente especializadas em reconhecer, processar e apresentar os antígenos para linfócitos T virgens. Considerando que CDs expressando o marcador CD11b<sup>+</sup> são as principais responsáveis por transportar o antígeno dos pulmões para os linfonodos, mostrando ser indispensável no desenvolvimento de uma resposta imune de perfil Th2 (PLANTINGA et al., 2013). Sabe-se que CDs expressam em sua membrana, dentre outros receptores, TLR-2 e TLR-4. De forma interessante foi observado uma menor frequência de CDs pulmonares expressando TLR-2 e um aumento na frequência dessas células expressando TLR-4. Esses resultados foram associados com a mudança na proporção dos filos Firmicutes/Proteobacteria nos pulmões dos

animais obesos, já que Firmicutes é ligante de TLR-2 e Proteobacteria é ligante de TLR-4.

Além das alterações observadas com nos TLRs, CDs apresentaram menor expressão da molécula co-estimulatória CD80, sugerindo uma menor ativação. Já foi observado que CDs derivadas de camundongos deficientes no receptor de leptina (db/db) (LAM et al., 2006) ou alimentados com HFD demonstraram redução de moléculas co-estimulatórias (PIZZOLLA et al., 2016). Podemos sugerir que o aumento no número de bactérias do filo Proteobacteria nos animais obesos, poderia estar associado a essa menor ativação uma vez que já foi demonstrado que a exposição contínua ao LPS inibe a ativação de CDs (DE SMEDT et al., 1996).

No entanto, os efeitos observados nas CDs pulmonares dos animais obesos podem estar refletindo uma série de mudanças no microambiente pulmonar, além daquelas causadas pela microbiota pulmonar. Portanto, a fim de compreender o efeito direto da microbiota sobre as CDs, foi realizada a co-cultura da microbiota pulmonar com as BMDCs dos animais controle e obesos. Este procedimento permitiu avaliar o efeito da obesidade nas CDs, antes do contato com a microbiota e o efeito direto da microbiota pulmonar sobre essas células. Embora BMDCs não sejam residentes dos pulmões e possam não expressar as mesmas características que uma célula residente, elas são recrutadas durante a resposta imune e irão interagir com a microbiota pulmonar. No presente estudo, a obesidade por si só, reduziu a expressão de TLR-2 e CD80, no entanto, o contato com a microbiota reduziu, ainda mais, a expressão de TLR-2/4 e CD80 em células derivadas da medula óssea dos animais obesos. Esses dados comprovam que a microbiota pulmonar age de forma sinérgica com a obesidade, reduzindo a ativação de CDs.

Nossos resultados, indicam que essa menor ativação de CDs com menor expressão de TLR-2, associada à menor contagem de Firmicutes, contribuiu para o menor reconhecimento desse filo, possibilitando seu afloramento súbito após a indução de asma. A proliferação de espécies de Firmicutes, como o *Staphylococcus aureus*, pode levar ao estabelecimento de uma resposta imune Th1/Th17, através da modulação de PRRs (ASKARIAN et al., 2018).

Apesar do aumento de CDs pulmonares expressando TLR-4 em animais obesos, os resultados da co-cultura indicam que a microbiota pulmonar promove a redução desse receptor. Sugerindo que o padrão observado nos pulmões de obesos

poderia ser determinado por outros fatores característicos do estado obeso, como distúrbios metabólicos (MARCELO MACEDO ROGERO, 2018).

Nesse contexto, analisou-se a influência da obesidade e da alergia sobre a microbiota pulmonar e o que essa interação implicaria na resposta iniciada pelas CDs. No trato respiratório, as bactérias se localizam em sítios específicos, a fim de manter a homeostasia do tecido (MAN; DE STEENHUIJSEN PITERS; BOGAERT, 2017; YUN et al., 2014). Durante o estado inflamatório crônico, característico da asma alérgica, os pulmões sofrem disbiose e alteram a microbiota ali existente, apresentando aumento dos filos Bacteroidetes, Firmicutes e Proteobacteria (HILTY et al., 2010; HUANG et al., 2015; LEGATZKI; RÖSLER; VON MUTIUS, 2014). Em concordância com esses dados, esse trabalho demonstrou que os animais alérgicos magros, apresentaram maior contagem desses três filos no pulmão. Sustentando esses resultados, um estudo relatou que bactérias do filo Proteobacteria são abundantes nos pulmões e que estão fortemente associadas à maior hiperresponsividade das vias aéreas (HUANG et al., 2012). Além disso, crianças que desenvolveram asma após os sete anos de idade apresentaram aumento da resposta alérgica, com elevada produção de IL-5 e IL-13 e também com aumento de IL-17A, na presença de espécies pertencentes ao filo Proteobacteria nos pulmões, dentre elas *Moraxella catharralis* (LARSEN et al., 2001). Além disso, espécies do filo Firmicutes já foram associadas à asma eosinofílica (ZHANG et al., 2016).

Apesar deste estudo não ter avaliado a função pulmonar dos animais, foi observado que houve aumento de muco e de IL-13 nos animais alérgicos, sugerindo alterações na fisiologia pulmonar nesse grupo. Embora o muco auxilie na eliminação de microrganismos patogênicos no tecido pulmonar, em doenças crônicas como a asma, ocorre aumento dessa produção, promovendo um ambiente propício para o crescimento de bactérias, com grande disponibilidade de nutrientes, redução dos níveis de oxigênio e da temperatura (SASS et al., 2013; SCHMIDT et al., 2014).

Sabe-se que o reconhecimento do alérgeno pelas CDs ocorre principalmente através de receptores TLR-2 e TLR-4, desencadeando uma cascata de ativação que culmina na produção de citocinas de perfil Th2 (TAN et al., 2011). Já foi demonstrado que a administração do alérgeno HDM leva ao aumento da expressão de TLR-4, relacionado à uma maior migração de CDs para os linfonodos drenantes, assim como o aumento de células Th2 efetoras (HAMMAD et al., 2009). Também já foi relatado

que camundongos que desenvolveram asma induzida por OVA, apresentaram características marcantes de uma resposta de perfil Th2 dependente da sinalização por TLR-2 (LI et al., 2016; REDECKE et al., 2018). Em concordância com estes estudos, o presente trabalho demonstrou que os animais alérgicos apresentaram aumento na frequência de CDs CD11b<sup>+</sup> MHCII<sup>+</sup> expressando CD80, TLR-2 e TLR-4 em 24h e menor expressão desses marcadores em 48h, sugerindo uma relação entre o reconhecimento do antígeno e a progressão da asma no modelo estudado. Por outro lado, a expressão desses marcadores nos animais obesos alérgicos apresentaram o pico em 48 horas após o último desafio com a OVA. O que sugere que alterações na expressão desses receptores pode ser um ponto chave para o atraso da resposta imune alérgica, observada em obesos.

Surpreendentemente, a composição da microbiota nos pulmões dos animais obesos asmáticos também estava alterada, uma vez que houve aumento dos membros do filo Firmicutes e Actinobacteria e redução de Proteobacteria. A maior frequência de CDs expressando TLR-4 antes das sensibilizações e desafios com o alérgeno pode ter contribuído para a maior eliminação de membros do filo Proteobacteria no pulmão dos animais obesos asmáticos. A colonização pulmonar por algumas espécies deste filo, como *Moraxella catharralis*, durante a infância, têm sido associada ao maior risco de desenvolvimento de asma ao longo da vida (BISGAARD et al., 2007; TEO et al., 2016). Nesse estudo, foi observado que a proporção *M.catharralis*/Proteobacteria aumentou de forma significativa nos animais obesos alérgicos, demonstrando que essa espécie foi resistente aos mecanismos de eliminação favorecidos pela maior expressão de TLR-4. Tal fato pode estar associado à piora da asma e o aparecimento de uma resposta de perfil Th17 (ALNAHAS et al., 2017; LARSEN et al., 2015).

Além da menor expressão de TLR-2/4, a menor expressão de CD80 em animais obesos alérgicos, demonstra um prejuízo às funções de CDs. De acordo com estudo prévio que demonstrou uma associação entre o alto consumo de gordura e a inibição da ativação das CDs, levando a uma menor produção de citocinas de perfil Th2 (PIZZOLLA et al., 2016). E ainda, CDs pulmonares de camundongos obesos desafiados por diferentes patógenos apresentaram deficiência no recrutamento e na apresentação de antígeno, acarretando um atraso na produção e liberação de citocinas inflamatórias, bem como na migração de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (SMITH et al.,

2009). Diante desses resultados, observa-se que a obesidade promove profundas mudanças na resposta imune nos pulmões. Além disso, os dados demonstram que a microbiota de obesos é capaz de reduzir a ativação das CDs, sugerindo um mecanismo de evasão bacteriano que culmina com o comprometimento da resposta a outros antígenos, como os alérgenos.

Apesar de apresentar funções ainda contraditórias, o ligante da molécula de PD-1, o PDL-1, pode ser encontrado na superfície de CDs e está relacionado à supressão da resposta imunológica (KEIR et al., 2008). Neste sentido, Golwitzer *et al* demonstrou que a microbiota pulmonar promove o aumento na expressão de PDL-1 em CDs pulmonares, durante o processo de colonização. Essa alta expressão, acaba por gerar tolerância a alérgenos, contudo a quebra desse mecanismos em camundongos neonatos, leva à maior susceptibilidade à alergia (GOLLWITZER et al., 2014). Neste trabalho, foi observado que a obesidade aumentou de forma significativa a frequência de CDs pulmonares expressando PDL-1, sugerindo que a obesidade promoveu maior regulação das CDs, o que poderia ter influenciado no crescimento e estabelecimento de bactérias patogênicas nos pulmões.

Contudo, a molécula de PDL-1 apresenta certa dualidade, uma vez que ela pode atuar na regulação da resposta imune (KEIR et al., 2008) ou apresentar um efeito pró-asmático (AKBARI, 2010). Nesse estudo, foi visto que os animais do grupo alérgico apresentaram aumento na frequência de CDs pulmonares expressando PDL-1, demonstrando que esse marcador está associado à progressão da asma.

Os conhecimentos gerados ao longo deste trabalho, fornecem subsídios para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que tenham como alvo a microbiota pulmonar, principalmente a utilização de probióticos e antibióticos. Nesse contexto, essas novas terapias apresentariam uma especificidade e eficácia maiores, se adequando a diferentes fenótipos e sobrepujando situações como a resistência à terapias com corticosteroides.

## **6 CONCLUSÃO**

Alterações na microbiota pulmonar influenciadas pela obesidade, podem ter promovido o desequilíbrio na homeostasia pulmonar, afetando a resposta imune iniciada pelas CDs. Este efeito pode ter se estendido após as sensibilizações e desafios com a OVA e ter contribuído para o atraso na resposta imune alérgica de perfil Th2, com consequente desvio para o perfil Th17.

## 7 REFERÊNCIAS

- AAGAARD, K. et al. The placenta harbors a unique microbiome. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 237, 2014.
- ABRAHAMSSON, T. R. et al. Low gut microbiota diversity in early infancy precedes asthma at school age. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 44, n. 6, p. 842–850, jun. 2014.
- AHO, V. T. E. et al. The microbiome of the human lower airways: A next generation sequencing perspective. **World Allergy Organization Journal**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2015.
- AKAY, H. K. et al. The relationship between bifidobacteria and allergic asthma and/or allergic dermatitis: A prospective study of 0-3 years-old children in Turkey. **Anaerobe**, v. 28, p. 98–103, 2014.
- AKBARI, O. ET. A. PD-L1 and PD-L2 modulate airway inflammation and iNKT-celldependent airway hyperreactivity in opposing directions. **Mucosal Immunology**, v. 3, n. 1, p. 81–91, 2010.
- ALAMZADEH, M. et al. The serum level of leptin in patients with obesity: Asthmatic and non-asthmatic children. **Journal of Comprehensive Pediatrics**, v. 8, n. 2, 2017.
- ALLAKHVERDI, Z. et al. Thymic stromal lymphopoietin is released by human epithelial cells in response to microbes , trauma , or infl ammation and potently activates mast cells. v. 204, n. 2, p. 253–258, 2007.
- ALNAHAS, S. et al. IL-17 and TNF- $\alpha$  Are Key Mediators of Moraxella catarrhalis Triggered Exacerbation of Allergic Airway Inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1562, 14 nov. 2017.
- ANTÓ, J. M. Recent advances in the epidemiologic investigation of risk factors for Asthma: A review of the 2011 literature. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 12, n. 3, p. 192–200, 2012.
- Are we too clean? Reframing the hygiene hypothesis and its implications for allergies, infectious diseases and our lifestyles. **Perspectives in Public Health**, v. 136, n. 4, p. 194–194, 2016.
- ARRIETA, M.-C. et al. Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 307, p. 307ra152-307ra152, 2015.
- ASKARIAN, F. et al. Staphylococcus aureus modulation of innate immune responses through Toll-like (TLR), (NOD)-like (NLR) and C-type lectin (CLR) receptors. **FEMS Microbiology Reviews**, 8 jun. 2018.
- ATARASHI, K. et al. Treginduction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. **Nature**, v. 500, n. 7461, p. 232–236, 2013.
- BAFFI, C. W.; WINNICA, D. E.; HOLGUIN, F. Asthma and obesity: mechanisms and

- clinical implications. **Asthma Research and Practice**, v. 1, n. 1, p. 1, 2015.
- BARFOD, K. K. et al. Alterations of the murine gut microbiome in allergic airway disease are independent of surfactant protein D. **Heliyon**, v. 3, n. 3, p. e00262, 2017.
- BARLOW, J. L. Ã. et al. Reciprocal expression of IL-25 and IL-17A is important for allergic airways hyperreactivity *Clinical & Experimental Allergy*. p. 1447–1455, 2011.
- BASHIR, M. E. H. et al. Toll-Like Receptor 4 Signaling by Intestinal Microbes Influences Susceptibility to Food Allergy. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 11, p. 6978–6987, 1 jun. 2004.
- BASSIS, C. M. et al. Analysis of the upper respiratory tract microbiotas as the source of the lung and gastric microbiotas in healthy individuals. **mBio**, v. 6, n. 2, p. 1–10, 2015.
- BECK, J. M.; YOUNG, V. B.; HUFFNAGLE, G. B. The microbiome of the lung. **Translational Research**, v. 160, n. 4, p. 258–266, 2012.
- BISGAARD, H. et al. Childhood Asthma after Bacterial Colonization of the Airway in Neonates. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 15, p. 1487–1495, 11 out. 2007.
- BLASIUS, A. L.; BEUTLER, B. Intracellular Toll-like Receptors. **Immunity**, v. 32, n. 3, p. 305–315, 2010.
- BOLOTIN, S. et al. Correlation of Real Time PCR Cycle Threshold Cut-Off with Bordetella pertussis Clinical Severity. p. 1–10, 2015.
- BURBANK, A. J. et al. Environmental determinants of allergy and asthma in early life. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 140, n. 1, p. 1–12, 2017.
- CANÖZ, M. et al. The relationship of inflammatory cytokines with asthma and obesity. **Clinical and Investigative Medicine**, v. 31, n. 6, p. 373–379, 2008.
- CARPAIJ, O. A.; VAN DEN BERGE, M. The asthma–obesity relationship. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 24, n. 1, p. 42–49, 2018.
- CERF-BENSUSSAN, N.; GABORIAU-ROUTHIAU, V. The immune system and the gut microbiota: Friends or foes? **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 10, p. 735–744, 2010.
- CHARLSON, E. S. et al. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 184, n. 8, p. 957–963, 2011.
- CHO, Y.; SHORE, S. A. Obesity, Asthma, and the Microbiome. **Physiology**, v. 31, n. 2, p. 108–116, 2016.
- CLÁUDIA CARVALHO GOUVEIA, A. et al. Th2 Responses in OVA-Sensitized BALB/c Mice Are Down-Modulated By Mycobacterium bovis BCG Treatment. **Journal of Clinical Immunology**, v. 33, p. 235–245, 2013.

- CLAUS, S. P. et al. Colonization-induced host-gut microbial metabolic interaction. **mBio**, v. 2, n. 2, p. 1–8, 2011.
- CLINICAL, T.; JOURNAL, R. Pneumococcal carriage is more common in asthmatic than in non-asthmatic young men. 2010.
- COMPARE, D. et al. The Gut Bacteria-Driven Obesity Development. **Digestive Diseases**, v. 34, n. 3, p. 221–229, 2016.
- CONRAD, M. L. et al. Maternal TLR signaling is required for prenatal asthma protection by the nonpathogenic microbe *Acinetobacter lwoffii* F78. v. 206, n. 13, p. 2869–2877, 2009.
- DE JONG, E. C.; SMITS, H. H.; KAPSENBERG, M. L. Dendritic cell-mediated T cell polarization. **Springer Seminars in Immunopathology**, v. 26, n. 3, p. 289–307, 2005.
- DE SMEDT, T. et al. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. **The Journal of experimental medicine**, v. 184, n. 4, p. 1413–24, 1996.
- DI CESARE, M. et al. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: A pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. **The Lancet**, v. 387, n. 10026, p. 1377–1396, 2016.
- DICKSON, R. P. et al. Bacterial Topography of the Healthy Human Lower Respiratory Tract. **mBio**, v. 8, n. 1, p. e02287-16, 8 mar. 2017.
- DICKSON, R. P. et al. The Lung Microbiota of Healthy Mice are Highly Variable, Cluster by Environment, and Reflect Variation in Baseline Lung Innate Immunity. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, p. rccm.201711-21800C, 13 mar. 2018.
- DONALDSON, G. P.; LEE, S. M.; MAZMANIAN, S. K. Gut biogeography of the bacterial microbiota. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 20–32, 2015.
- DUGAS, L. R. et al. The obese gut microbiome across the epidemiologic transition. **Emerging Themes in Epidemiology**, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2016.
- DUNICAN, E. M. et al. Mucus plugs in patients with asthma linked to eosinophilia and airflow obstruction Find the latest version : Mucus plugs in patients with asthma linked to eosinophilia and airflow obstruction. 2018.
- EDER, W. et al. Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers. **Allergy Clinical Immunology**, v. 113, p. 482–488, 2004.
- ELKS, C. E. et al. Adult obesity susceptibility variants are associated with greater childhood weight gain and a faster tempo of growth: The 1946 British Birth Cohort Study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 95, n. 5, p. 1150–1156, 2012.
- EVANS, S. E. et al. Inducible Innate Resistance of Lung Epithelium to Infection. p. 413–435, 2015.

FAHY, J. V. Type 2 inflammation in asthma-present in most, absent in many. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 1, p. 57–65, 2015.

FAJT, M. L.; WENZEL, S. E. Asthma phenotypes and the use of biologic medications in asthma and allergic disease: The next steps toward personalized care. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 2, p. 299–310, 2015.

FARIA CARRADA, C. et al. Salivary Periodontopathic Bacteria in Children and Adolescents with Down Syndrome. **PLoS ONE**, v. 11, n. 10, p. 162988, 2016.

FROIDURE, A.; PILETTE, C. From the hygiene hypothesis to A20: The protective effect of endotoxins against asthma development. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 46, n. 2, p. 192–193, 2016.

FUJIMURA, K. E.; LYNCH, S. V. Microbiota in allergy and asthma and the emerging relationship with the gut microbiome. **Cell Host and Microbe**, v. 17, n. 5, p. 592–602, 2015.

GALLI, S. J.; TSAI, M.; PILIPONSKY, A. M. The development of allergic inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 445–454, 2008.

GARN, H.; RENZ, H. Epidemiological and immunological evidence for the hygiene hypothesis. **Immunobiology**, v. 212, n. 6, p. 441–452, 27 jun. 2007.

GIBEON, D. et al. Obesity-associated severe asthma represents a distinct clinical phenotype analysis of the british thoracic society diffi cult asthma registry patient cohort according to bmi. **Chest**, v. 143, n. 2, p. 406–414, 2013.

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

GOLLWITZER, E. S. et al. Lung microbiota promotes tolerance to allergens in neonates via PD-L1. **Nature Medicine**, v. 20, n. 6, p. 642–647, 2014.

GONZÁLEZ-MUNIESA, P. et al. Obesity. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, 2017.

GREEN, B. J. et al. Potentially Pathogenic Airway Bacteria and Neutrophilic Inflammation in Treatment Resistant Severe Asthma. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e100645, 23 jun. 2014.

GRICE, E. A.; SEGRE, J. A. The skin microbiome. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 244–53, 2011.

GU, S. et al. Bacterial Community Mapping of the Mouse Gastrointestinal Tract. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e74957, 2013.

GUIDA, S.; VENEMA, K. Gut microbiota and obesity: Involvement of the adipose tissue. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 407–423, 2015.

GUO, X. et al. Development of a real-time PCR method for Firmicutes and

Bacteroidetes in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, p. 367–373, 2008.

HAMMAD, H. et al. House dust mite allergen induces asthma via TLR4 triggering of airway structural cells. **Nat Med.**, v. 15, n. 4, p. 410–416, 2009.

HARLEY I.T.W., K. C. L. Obesity and the gut microbiome. **Molecular Metabolism**, v. 1, n. 1–2, p. 21–31, 2012.

HILTY, M. et al. Disordered microbial communities in asthmatic airways. **PLoS ONE**, v. 5, n. 1, 2010a.

HILTY, M. et al. Disordered Microbial Communities in Asthmatic Airways. **PLoS ONE**, v. 5, n. 1, p. e8578, 5 jan. 2010b.

HOLGATE, S. T. Innate and adaptive immune responses in asthma. **Nature Medicine**, v. 18, n. 5, p. 673–683, 2012.

HOLGATE, S. T. et al. Asthma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, n. September, p. 1–22, 2015.

HOOPER, L. V; LITTMAN, D. R.; MACPHERSON, A. J. Interactions between the microbiota and the immune system. **Science (New York, N.Y.)**, v. 336, n. 6086, p. 1268–73, 8 jun. 2012.

HUANG, Y. J. et al. Airway Microbiota and Bronchial Hyperresponsiveness in Patients with Sub-optimally Controlled Asthma. **J Allergy Clin Immunol**, v. 127, n. 2, p. 372–381, 2012.

HUANG, Y. J. et al. The airway microbiome in patients with severe asthma: Associations with disease features and severity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 136, n. 4, p. 874–884, 2015.

HUFFNAGLE, G. B.; DICKSON, R. P.; LUKACS, N. W. The respiratory tract microbiome and lung inflammation: A two-way street. **Mucosal Immunology**, v. 10, n. 2, p. 299–306, 2017.

INAGAKI, T.; SAKAI, J.; KAJIMURA, S. Transcriptional and epigenetic control of brown and beige adipose cell fate and function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n. 8, p. 480–495, 2016.

ISLAM, K. B. M. S. et al. Bile acid is a host factor that regulates the composition of the cecal microbiota in rats. **Gastroenterology**, v. 141, n. 5, p. 1773–1781, 2011.

IVANOV, I. I. et al. Specific Microbiota Direct the Differentiation of IL-17-Producing T-Helper Cells in the Mucosa of the Small Intestine. **Cell Host and Microbe**, v. 4, n. 4, p. 337–349, 2008.

JOSEPH A. BELLANTI, R. A. S. Unraveling the conundrum of asthma phenotypes and endotypes. **Editorial**, v. 39, p. 7–8, 2018.

KAIS, M. et al. Quantitative detection of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus*

influenzae, and *Moraxella catarrhalis* in lower respiratory tract samples by real-time PCR. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 55, n. 3, p. 169–178, 2006.

KEIR, M. E. et al. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. 2008.

KIM, H. Y. et al. Interleukin-17-producing innate lymphoid cells and the NLRP3 inflammasome facilitate obesity-associated airway hyperreactivity. **Nature Medicine**, v. 20, n. 1, p. 54–61, 2014.

KIM, J. H.; ELLWOOD, P. E.; ASHER, M. I. Diet and asthma: Looking back, moving forward. **Respiratory Research**, v. 10, p. 1–7, 2009.

KLEMETS, P. et al. Risk of invasive pneumococcal infections among working age adults with asthma. **Thorax**, v. 65, n. 8, p. 698–702, 2010.

KRAUSE, R. et al. Mycobiome in the lower respiratory tract - a clinical perspective. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JAN, p. 1–9, 2017.

KUMARI, M.; KOZYRSKYJ, A. L. Gut microbial metabolism defines host metabolism: an emerging perspective in obesity and allergic inflammation. **Obesity Reviews**, v. 18, n. 1, p. 18–31, 2017.

KUSMINSKI, C. M.; BICKEL, P. E.; SCHERER, P. E. Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 9, p. 639–660, 2016.

LAGRANDERIE, M. et al. Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin Killed by Extended Freeze-Drying Targets Plasmacytoid Dendritic Cells To Regulate Lung Inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 2, p. 1062–1070, 2010.

LAM, Q. L. K. et al. Involvement of leptin signaling in the survival and maturation of bone marrow-derived dendritic cells. **European Journal of Immunology**, v. 36, n. 12, p. 3118–3130, dez. 2006.

LARSEN, J. M. et al. Children with asthma by school age display aberrant immune responses to pathogenic airway bacteria as infants Study cohort. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 133, n. 4, p. 1008–1013.e4, 2001.

LARSEN, J. M. et al. Chronic obstructive pulmonary disease and asthma-associated Proteobacteria, but not commensal *Prevotella* spp., promote Toll-like receptor 2-independent lung inflammation and pathology. **Immunology**, v. 144, n. 2, p. 333–42, fev. 2015.

LE CHATELIER, E. et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. **Karine Clément**, v. 13, p. 28, 2013.

LEDERBERG, B. J.; MCCRAY, A. T. ' Ome Sweet ' Omics-- A Genealogical Treasury of Words. **The Scientist**, v. 15, n. 7, p. 8, 2 abr. 2001.

LEE, S. H.; GONG, Y. N.; RYOO, E. Clostridium difficile colonization and/or infection during infancy and the risk of childhood allergic diseases. **Korean journal of**

**pediatrics**, v. 60, n. 5, p. 145–150, maio 2017.

LEGATZKI, A.; RÖSLER, B.; VON MUTIUS, E. Microbiome Diversity and Asthma and Allergy Risk. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 14, n. 10, p. 1–9, 2014.

LEULIER, F.; LEMAITRE, B. Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: a case-control study. **BMC Medicine**, v. 9, p. 1–14, 2008.

LI, D. Y.; TANG, W. H. W. Contributory Role of Gut Microbiota and Their Metabolites Toward Cardiovascular Complications in Chronic Kidney Disease. **Seminars in Nephrology**, v. 38, n. 2, p. 193–205, 2018.

LI, X. et al. Ovalbumin-induced experimental allergic asthma is Toll-like receptor 2 dependent. **Allergy Asthma**, v. 35, p. 15–20, 2016.

LIM, M. Y. et al. Analysis of the association between host genetics, smoking, and sputum microbiota in healthy humans. **Scientific Reports**, v. 6, n. March, p. 1–9, 2016.

LLOYD, C. M.; HESSEL, E. M. Functions of T cells in asthma: More than just TH2 cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 12, p. 838–848, 2010.

LOFTUS, P. A.; WISE, S. K. Epidemiology of asthma. p. 245–249, 2016.

LU, T. X. et al. The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. **Annu Rev Immunol**, v. 41, n. 9, p. 15–25, 2013.

MAN, W. H.; DE STEENHUIJSEN PITERS, W. A. A.; BOGAERT, D. The microbiota of the respiratory tract: Gatekeeper to respiratory health. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 259–270, 2017.

MARCELO MACEDO ROGERO, P. C. C. Obesity, Inflammation, Toll-Like Receptor 4 and Fatty Acids. **Nutrients**, v. 10, p. 1–19, 2018.

MARSLAND, B. J.; TROMPETTE, A.; GOLLWITZER, E. S. The Gut-Lung Axis in Respiratory Disease. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 12 Suppl 2, p. S150-6, nov. 2015.

MARTIN, D. H. The microbiota of the vagina and its influence on women's health and disease. **American Journal of the Medical Sciences**, v. 343, n. 1, p. 2–9, 2012.

MARTÍNEZ, I.; MULLER, C. E.; WALTER, J. Long-Term Temporal Analysis of the Human Fecal Microbiota Revealed a Stable Core of Dominant Bacterial Species. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, 2013.

MATAFOME, P.; SEIÇA, R. Obesity and Brain Function. v. 19, p. 3–31, 2017.

MATHEWS, J. A. et al. Induction of IL-17A precedes development of airway hyperresponsiveness during diet-induced obesity and correlates with complement factor D. v. 5, n. September, p. 1–9, 2014.

MEDINA-REMÓN, A.; KIRWAN, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Dietary patterns

and the risk of obesity , type 2 diabetes mellitus , cardiovascular diseases , asthma , and neurodegenerative diseases. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 0, n. 0, p. 1–35, 2016.

MICHELSON, P. H. et al. Obesity, inflammation, and asthma severity in childhood: Data from the National Health and Nutrition Examination Survey 2001-2004. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 103, n. 5, p. 381–385, 2009.

MOEN, A. E. F. et al. Simultaneous purification of DNA and RNA from microbiota in a single colonic mucosal biopsy. **BMC Research Notes**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2016.

MORAES, T.; SEARS, M.; SUBBARAO, P. Epidemiology of Asthma and Influence of Ethnicity. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 39, n. 01, p. 003-011, 10 fev. 2018a.

MORAES, T.; SEARS, M.; SUBBARAO, P. Epidemiology of Asthma and Influence of Ethnicity. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 39, n. 01, p. 003-011, 10 fev. 2018b.

MOTER, A.; GOBEL, U. B. Fluorescence in situ hybridization ( FISH ) for direct visualization of microorganisms. v. 41, p. 85–112, 2000.

MOYA-PÉREZ, A.; NEEF, A.; SANZ, Y. Bifidobacterium pseudocatenulatum CECT 7765 Reduces Obesity-Associated Inflammation by Restoring the Lymphocyte-Macrophage Balance and Gut Microbiota Structure in High-Fat Diet-Fed Mice. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, p. e0126976, 10 jul. 2015.

MUIR, L. A. et al. Adipose tissue fibrosis, hypertrophy, and hyperplasia: Correlations with diabetes in human obesity. **Obesity**, v. 24, n. 3, p. 597–605, 2016.

NGUYEN, L. D. N.; VISCOGLIOSI, E.; DELHAES, L. The lung mycobiome: An emerging field of the human respiratory microbiome. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. FEB, p. 1–10, 2015.

NUNES, C. F. et al. Probiotic treatment during neonatal age provides optimal protection against experimental asthma through the modulation of microbiota and T cells. **International Immunology**, 2018.

O'NEILL, L. A. J.; GOLENBOCK, D.; BOWIE, A. G. **The history of Toll-like receptors-redefining innate immunity** *Nature Reviews Immunology* Nature Publishing Group, , 17 jun. 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nri3446>>. Acesso em: 18 set. 2018

PENDERS, J. et al. New insights into the hygiene hypothesis in allergic diseases. n. April, p. 239–244, 2014.

PENDYALA, S.; WALKER, J. M.; HOLT, P. R. A high-fat diet is associated with endotoxemia that originates from the gut. **Gastroenterology**, v. 142, n. 5, p. 1100–1101, 2012.

PERMAUL, P. et al. Allergens in urban schools and homes of children with asthma. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 23, n. 6, p. 543–549, 2012.

PETERS, J. I. et al. Impact of obesity in asthma: Evidence from a large prospective disease management study. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 106, n. 1, p. 30–35, 2011.

PHIPPS, S. et al. The contribution of toll-like receptors to the pathogenesis of asthma. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, n. 6, p. 463–470, ago. 2007.

PIZZOLLA, A. et al. High Fat Diet Inhibits Dendritic Cell and T Cell Response to Allergens but Does Not Impair Inhalational Respiratory Tolerance. p. 1–18, 2016a.

PIZZOLLA, A. et al. High fat diet inhibits dendritic cell and T cell response to allergens but does not impair inhalational respiratory tolerance. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, p. 1–18, 2016b.

PLANTINGA, M. et al. Conventional and Monocyte-Derived CD11b+ Dendritic Cells Initiate and Maintain T Helper 2 Cell-Mediated Immunity to House Dust Mite Allergen. **Immunity**, v. 38, n. 2, p. 322–335, 2013.

QIU, H. et al. Acinetobacter baumannii infection inhibits airway eosinophilia and lung pathology in a mouse model of allergic asthma. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. 1–10, 2011.

RATH, H. C. Role of commensal bacteria in chronic experimental colitis: Lessons from the HLA-B27 transgenic rat. **Pathobiology**, v. 70, n. 3, p. 131–138, 2003.

RATNER, A. J. et al. Synergistic proinflammatory responses induced by polymicrobial colonization of epithelial surfaces. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 9, p. 3429–3434, 2005.

RAVUSSIN, Y. et al. Responses of gut microbiota to diet composition and weight loss in lean and obese mice. **Obesity**, v. 20, n. 4, p. 738–747, 2012.

REDECKE, V. et al. Cutting Edge: Activation of Toll-Like Receptor 2 Induces a Th2 Immune Response and Promotes Experimental Asthma. p. 3–8, 2018.

ROOK, G. A. Regulation of the immune system by biodiversity from the natural environment: An ecosystem service essential to health. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 46, p. 18360–18367, 2013.

ROOK, G. A. W. 99th Dahlem Conference on Infection, Inflammation and Chronic Inflammatory Disorders: Darwinian medicine and the “hygiene” or “old friends” hypothesis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 160, n. 1, p. 70–79, 2010.

ROOKS, M. G.; GARRETT, W. S. Gut microbiota, metabolites and host immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 6, p. 341–352, 2016.

ROUND, J. L. et al. The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota. **Science (New York, N.Y.)**, v. 332, n. 6032, p. 974–7, 20 maio 2011.

ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 27, p. 12204–

12209, 2010.

ROWE, B. H.; SEVCIK, W.; VILLA-ROEL, C. Management of severe acute asthma in the emergency department. **Current Opinion in Critical Care**, v. 17, n. 4, p. 335–341, 2011.

RUSSELL, S. L. et al. Perinatal antibiotic-induced shifts in gut microbiota have differential effects on inflammatory lung diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 1, p. 100–109, 2015.

SASS, A. M. et al. The unexpected discovery of a novel low-oxygen-activated locus for the anoxic persistence of *Burkholderia cenocepacia*. v. 7, n. 8, p. 1568–1581, 2013.

SCALES, B. S.; DICKSON, R. P.; HUFFNAGLE, G. B. Review A tale of two sites : how inflammation can reshape the microbiomes of the gut and lungs. v. 100, n. November, 2016.

SCHMIDT, A. et al. Neutrophil elastase-mediated increase in airway temperature during inflammation. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 13, n. 6, p. 623–631, 2014.

SCHMIT, D. et al. Allergic airway inflammation induces migration of mast cell populations into the mouse airway. **Cell and Tissue Research**, v. 369, n. 2, p. 331–340, 2017.

SCHWIERTZ, A. et al. Microbiota and SCFA in Lean and Overweight Healthy Subjects. **Obesity**, v. 18, n. 1, p. 190–195, 2009.

SEABOLT, L. A.; WELCH, E. B.; SILVER, H. J. Imaging methods for analyzing body composition in human obesity and cardiometabolic disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1353, n. 1, p. 41–59, 2015.

SHOWALTER, M. R. et al. Obesogenic diets alter metabolism in mice. **PLOS ONE**, v. 13, n. 1, p. e0190632, 11 jan. 2018.

SILVA, F. M. C. et al. Obesity promotes prolonged ovalbumin-induced airway inflammation modulating T helper type 1 (Th1), Th2 and Th17 immune responses in BALB/c mice. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 189, n. 1, p. 47–59, 2017.

SILVERSTEIN, A. M. Clemens freiherr von pirquet: Explaining immune complex disease in 1906. **Nature Immunology**, v. 1, n. 6, p. 453–455, 2000.

SIMPSON, J. L. et al. Innate immune activation in neutrophilic asthma and bronchiectasis. **Thorax**, v. 62, n. 3, p. 211–218, 2007.

SINGH, N. et al. The development of lower respiratory tract microbiome in mice. **Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 61, 2017.

SMITH, A. G. et al. Selective impairment in dendritic cell function and altered antigen-specific CD8 + T-cell responses in diet-induced obese mice infected with influenza virus. **Immunology**, v. 126, n. 2, p. 268–279, 2009.

SMITH J.M ET AL. Prevalence and natural history of asthma in schoolchildren. **British**

**Medical Journal**, p. 711–713, 1961.

STATOVCI, D. et al. The impact of western diet and nutrients on the microbiota and immune response at mucosal interfaces. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. JUL, 2017.

STRACHAN, D. P. Hay fever, hygiene, and household size. **British Medical Journal**, v. 299, p. 1259–60, 1989.

SULLIVAN, A. et al. “The Microbiome and the Pathophysiology of Asthma”. **Respiratory Research**, v. 17, n. 1, p. 1–11, 2016.

SVERRILD, A. et al. Eosinophilic airway inflammation in asthmatic patients is associated with an altered airway microbiome. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 140, n. 2, p. 407–417.e11, 2017.

T BOUTIN, R. C.; BRETT FINLAY, B. Microbiota-Mediated Immunomodulation and Asthma: Current and Future Perspectives. **Curr Treat Options Allergy**, v. 3, p. 292–309, 2016.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. TLR signaling pathways. **Seminars in Immunology**, v. 16, n. 1, p. 3–9, 2004.

TAN, A. M. et al. TLR4 Signaling in Stromal Cells Is Critical for the Initiation of Allergic Th2 Responses to Inhaled Antigen. **Respiratory Research**, v. 12, 2011.

TARTEY, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and Toll-like receptor targeted therapeutics in innate immune cells. **International Reviews of Immunology**, v. 36, n. 2, p. 57–73, 2017.

TEIXEIRA, T. F. S. et al. Intestinal permeability parameters in obese patients are correlated with metabolic syndrome risk factors. **Clinical Nutrition**, v. 31, n. 5, p. 735–740, 2012.

TEO, S. M. et al. The infant airway microbiome in health and disease impacts later asthma development. **Cell Host Microbe**, v. 17, n. 5, p. 704–715, 2016.

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

TREJO BITTAR, H. E.; YOUSEM, S. A.; WENZEL, S. E. Pathobiology of Severe Asthma. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 10, n. 1, p. 511–545, 2015.

TROMPETTE, A. et al. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. v. 20, n. 2, 2014a.

TROMPETTE, A. et al. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. **Nature Medicine**, 2014b.

TURNBAUGH, P. J. et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, v. 444, n. 7122, p. 1027–1031, 2006.

TURNBAUGH, P. J. et al. LETTERS A core gut microbiome in obese and lean twins. **Life Sciences**, v. 9, p. 454, 2009.

ULRIK, C. S. Asthma symptoms in obese adults: The challenge of achieving asthma control. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 9, n. 1, p. 5–8, 2016.

UMETSU, D. T. Mechanisms by which obesity impacts upon asthma. **Thorax**, v. 72, n. 2, p. 174–177, 2017.

VAEL, C. et al. Early intestinal *Bacteroides fragilis* colonisation and development of asthma. **BMC Pulmonary Medicine**, v. 8, p. 1–6, 2008.

VAN NIMWEGEN, F. A. et al. Mode and place of delivery, gastrointestinal microbiota, and their influence on asthma and atopy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 128, n. 5, p. 948–955.e3, 2011.

VAN TILBURG BERNARDES, E.; ARRIETA, M.-C. Hygiene Hypothesis in Asthma Development: Is Hygiene to Blame? **Archives of Medical Research**, 2017.

VAN WIJCK, Y. et al. Therapeutic Application of an Extract of *Helicobacter pylori* Ameliorates the Development of Allergic Airway Disease. **The Journal of Immunology**, p. j1700987, 2018.

VON HERTZEN, L.; HANSKI, I.; HAAHTELA, T. Natural immunity. Biodiversity loss and inflammatory diseases are two global megatrends that might be related. **EMBO Reports**, v. 12, n. 11, p. 1089–1093, 2011.

WELDON, L. et al. The gut microbiota of wild mice. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–15, 2015.

WELLER, P. F.; SPENCER, L. A. Functions of tissue-resident eosinophils. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 12, p. 746–760, 2017.

WHO. Obesity and Overweight. **Global Strateg on Diet, Physical Activity and Health**, p. 1–2, 2003.

WINE, J. J.; JOO, N. S. Submucosal Glands and Airway Defense. n. 13, 2004.

WU, L. C.; ZARRIN, A. A. The production and regulation of IgE by the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 4, p. 247–259, 2014.

YADAVA, K. et al. Thymic stromal lymphopoietin plays divergent roles in murine models of atopic and nonatopic airway inflammation. v. 69, n. 1, p. 1333–1342, 2014.

YADAVA, K. et al. Microbiota promotes chronic pulmonary inflammation by enhancing IL-17A and autoantibodies. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 193, n. 9, p. 975–987, 2016.

YAWN, B. P. et al. Obesity, low levels of physical activity and smoking present opportunities for primary care asthma interventions: An analysis of baseline data from the Asthma Tools Study. **npj Primary Care Respiratory Medicine**, v. 25, n. March, p. 1–7, 2015.

YAZDANBAKHSH, M. Allergy , Parasites , and the Hygiene Hypothesis. v. 490, n. 2002, 2012.

YUN-WEN YANG, M.-K. C. ET. A. Use of 16S rRNA Gene-Targeted Group-Specific Primers for Real- Time PCR Analysis of Predominant Bacteria in Mouse Feces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 19, p. 6749–6756, 2015.

YUN, Y. et al. Environmentally determined differences in the murine lung microbiota and their relation to alveolar architecture. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1–24, 2014.

ZHANG, Q. et al. Airway Microbiota in Severe Asthma and Relationship to Asthma Severity and Phenotypes. **PLoS ONE**, v. 11, p. 1–16, 2016.

ZHAO, J.; LLOYD, C. M.; NOBLE, A. Th17 responses in chronic allergic airway inflammation abrogate regulatory T-cell-mediated tolerance and contribute to airway remodeling. **Mucosal Immunology**, v. 6, n. 2, p. 335–346, 2013.

ZHENG, C. et al. Local proliferation initiates macrophage accumulation in adipose tissue during obesity. **Cell death & disease**, v. 7, p. e2167, 2016.