

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DE BIOLÓGICAS

**Erick Esteves de Oliveira**

**OBESIDADE E ASMA:  
ALTERAÇÕES DA RESPOSTA IMUNE EM ÓRGÃOS LINFÓIDES  
PERIFÉRICOS E EFEITO DO TRATAMENTO COM AZITROMICINA**

**Tese**

Juiz de Fora

2019

**ERICK ESTEVES DE OLIVEIRA**

**OBESIDADE E ASMA:  
ALTERAÇÕES DA RESPOSTA IMUNE EM ÓRGÃOS LINFÓIDES  
PERIFÉRICOS E EFEITO DO TRATAMENTO COM AZITROMICINA**

Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

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

**Co-orientadora: Dr.<sup>a</sup> Flávia Márcia de Castro e Silva**

**Colaboração: Prof. Dr. Joerg Mattes**

Juiz de Fora

2019

*“Mesmo quando tudo parece desabar,  
cabe a mim decidir entre rir ou chorar,  
ir ou ficar, desistir ou lutar;  
porque descobri, no caminho incerto da vida,  
que o mais importante é o decidir.”*  
Cora Coralina

***Dedico esse trabalho***

*Aos meus pais que sempre estiveram do meu lado,  
em todas as adversidades.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente ao universo, por colocar pessoas boas no meu caminho; por mostrar que não importa o caos que nos cerque, sempre haverá alguém que nos mostre que nem tudo está perdido. Obrigado por me mostrar que por mais que andemos bem sozinhos, juntos andamos melhor;

Aos meus pais, Vanderlei e Eliane, que nunca mediram esforços, distâncias, lágrimas ou sorrisos nesses anos de formação acadêmica. Obrigado por me incentivarem e lutarem ao meu lado, sempre;

À minha avó Senilia, por ser minha companheira, de quarto, de gargalhadas e choradeiras, de onde você estiver, sei que olha por mim;

À minha madrinha Eva, pela constante preocupação com o meu futuro e por ser um exemplo de luta a ser seguido;

À minha orientadora, Ana Paula, por me acolher no laboratório, por estar disponível para escutar e aconselhar; por acreditar em mim e no meu trabalho; por me ensinar a diferença entre orientador e supervisor;

À minha co-orientadora, Flávia Márcia, obrigado primeiramente pela amizade; obrigado pelas noites viradas, pelo ombro pra chorar, por falar o que eu não queria escutar, e ouvir o que eu precisava dizer; obrigado por todas as lições valiosas, você sempre me ensinou bem mais do que poderia caber nessas páginas;

À Marina, pela ajuda em todos esses anos, em que dividimos a bancada, as angústias e as alegrias; sem você tudo teria sido muito mais difícil;

À Marcilene, pela participação e ajuda nos experimentos, e pelas inúmeras conversas frente as xícaras de café;

À aluna de iniciação científica Viviane, obrigado pela dedicação e compromisso para que tudo desse certo;

Ao Professor Gilson, por muitas vezes deixar de lado seus afazeres para auxiliar tanto na realização dos experimentos de citometria, mas também por ajudar nas análises e por sanar as infinitas dúvidas que surgiram no caminho;

Ao Dr. Marco Antônio e Daniele Reis por me ajudarem com as análise de expressão gênica e por abrirem as portas de seu laboratório, para que eu realizasse essa etapa;

Ao Professor Joerg Mattes, por me receber em seu laboratório. Obrigado também a toda a sua equipe, Patrícia, Mel, Ana e principalmente ao Adam, pela imensa ajuda em todos os experimentos;

Aos colegas do laboratório, Juciane, Ari, Bárbara, Luiz, Luan, Aninha, Pollyana, Gabriela, Paula, Gabi e Letícia; que ao longo desses anos, em algum momento ajudaram na realização desse projeto;

À Leidiana e Sirley, pela paciência e dedicação ao laboratório, por tornarem nosso trabalho menos desgastante e acima de tudo pelos anos de amizade;

À todos aqueles que passaram pela minha vida no laboratório de Imunologia e me inspiraram de alguma forma Alessa, Ana Cláudia, Ana Márcia, Alexandre, Alyria, Alice, Carol, Caio, Fernanda, Sandra, Leandra, Lily, Ingrid, Laura, Kyssia, Wesley, Pollyana, Sara, Bia, Diego e Jacy;

Ao professor Henrique por me acolher no laboratório e por indiretamente ajudar na realização desse projeto;

Ao Luke, por dividir sua vida comigo, por me escutar e me apoiar quando tudo parecia dar errado;

À Annette por me receber em sua casa durante um ano, e por ter sido minha família quando todos os meus estavam distantes;

Aos amigos da Austrália, Laurie e Helen, por me receberem como um filho e pela preocupação com o meu bem-estar. Matt, Michelle, Annette, Andreza, Marcos e Tessa pela amizade e por terem feito a distância doer menos. Patrícia, por ter sido meu apoio, minha companhia e minha proteção, quando tudo a volta era hostil.

À Danielle minha amiga-irmã, por todos os anos de amizade, por sempre estar por perto mesmo que distante. Agradeço também, ao Vítor, Ju, Caio, Bárbara, Rafael e Daniel, por serem a família que a universidade me deu.

Aos meus amigos acrobatas Cecília, Jonathan, Vinicius, Josy, David, Diego, Thaís, Sarah, Ricardo, Marcela e Cíntia, por participarem de todas as minhas conquistas e por serem meu refúgio nas horas difíceis.

À Júlia e Léo, por terem me aguentado nos momentos de desespero, por estarem sempre de portas e sorrisos abertos para me receber, e por cuidarem de mim como irmãos. Não há palavras que possam expressar minha gratidão.

Aos animais, agradeço, pois sem vocês nada disso seria possível; e peço perdão, pelas vezes em que sentiram na pele as dores e angústias que tentamos evitar aos nossos iguais;

Aos órgãos de fomento FAPEMIG, CNPq e CAPES; À Universidade Federal de Juiz de Fora; e a todas as políticas públicas e investimentos em educação, os quais me permitiram chegar até aqui.

## Resumo

Asma e obesidade são doenças que acometem um número crescente de indivíduos. A concomitância das mesmas é razão de preocupação, tendo em vista que indivíduos obesos apresentam uma maior taxa de exacerbação da asma, são mais resistentes aos tratamentos convencionais e apresentam um fenótipo distinto da doença. A ocorrência de neutrofilia, em detrimento da eosinofilia; associado a baixos níveis de IgE é uma característica de obesos-asmáticos. Entretanto, pouco se sabe sobre a influência da obesidade na resposta imune em órgãos linfoides periféricos durante o desenvolvimento da asma alérgica, principalmente sobre os principais componentes dos centros germinativos, linfócitos B e T foliculares ( $T_{FH}$ ). Além disso, estudos tem buscado desenvolver tratamentos mais eficazes pra esse subgrupo de pacientes. Dentre essas alternativas o uso de antibióticos macrolídeos, como a azitromicina pode ser uma forma de tratar casos de asma resistente, que apresentem um perfil neutrofílico. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da obesidade sobre os mecanismos envolvidos na imunopatogênese da alergia pulmonar experimental induzida por OVA/HDM, bem como avaliar o efeito da azitromicina nesses modelos. Além dos parâmetros histológicos, dosagem de citocinas e avaliação da função pulmonar, também foi avaliada por imunofenotipagem a composição da população de células nos órgãos linfoides periféricos, durante a resposta alérgica. Foi observado um dano à resposta imune em animais obesos alérgicos desde o epitélio, com a menor produção de IL-25 e TSLP, associada a menor ativação e migração de células dendríticas para os linfonodos. Nos órgãos linfoides periféricos foi observado um perfil diferenciado de resposta, com regulação de células B e  $T_{FH}$ , e maior diferenciação de células T foliculares regulatórias. Além disso, esses órgãos apresentaram respostas alérgicas distintas, com uma maior influência da obesidade no baço, promovendo a polarização para  $T_{H17}$ ; e exacerbação do perfil  $T_{H2}$  nos linfonodos. Essas modificações refletiram nos menores níveis de IgE e aumento de IgG2a. Nos pulmões houve aumento de neutrofilia e redução da eosinofilia, associado a menor produção de CCL11. O tratamento com azitromicina reduziu muitos parâmetros relacionados à asma, dentre eles, a neutrofilia, a resposta  $T_{H17}$ , bem como a expressão de fatores quimioatraentes para neutrófilos, como KC e MIP-2; além da hiperresponsividade brônquica em obesos-alérgicos. Em adição, o tratamento também reduziu a frequência de LB e  $T_{FH}$  nos linfonodos desses animais, acompanhado da menor frequência de células  $T_H$  produtoras de IL-4, IL-17A e  $IFN\gamma$ . Somado a isso, animais obesos alérgicos tratados apresentaram maior expressão de mir-155 nos pulmões. Entretanto, o tratamento não afetou a resposta de perfil  $T_{H2}$ /eosinofílica, além de agravar a resposta neutrofílica em alérgicos magros. Esses resultados demonstram que a obesidade afeta o desenvolvimento da asma nos órgãos linfoides periféricos, e ainda, que a azitromicina foi eficiente no tratamento do perfil neutrofílico de resposta, característico de um quadro alérgico agravado pela obesidade.

**Palavras-chave:** asma, obesidade, neutrofilia, azitromicina, centro germinativo

## Abstract

Both asthma and obesity present rising prevalence. Their concomitance is a reason for concern, as obese individuals present higher exacerbation rates, are refractory to conventional treatments and display a distinct phenotype of the disease. The occurrence of neutrophilia, over the establishment of the eosinophilia; associated with low IgE titers is one of the marks of obese-asthmatics. However, the influence of obesity on the immune response on the peripheral lymphoid organs, during allergic asthma development is still unknown, mainly when it comes to B cells and follicular helper T cells ( $T_{FH}$ ), the main components of the germinal centers. In addition, recent effort has been done towards the development of more efficient treatments for these patients. Among those alternatives, the use of macrolides, as azithromycin, can be highlighted as good approach for resistant-asthma, associated with neutrophilia. Therefore, the present study aimed to evaluate the obesity effects over the immunopathological mechanisms involved OVA/HDM-induced pulmonary allergy and the effect of azithromycin over these models. Histological analysis, cytokines quantification and lung function evaluation were performed on top of immunophenotyping of the cells from the peripheral lymphoid organs, during the allergic response. The immune response was dampened from the epithelium, as shown by the diminished IL-25 and TSLP production, associated with the diminished activation and migration of dendritic cells to the lymph nodes. The immune response observed in the peripheral lymphoid organs was affected, with B cell and  $T_{FH}$  regulation, associated with increased follicular regulatory T cells ( $T_{FR}$ ) differentiation. Those organs displayed distinct allergic features, with greater obesity influence over the spleen, promoting the  $T_H17$  polarization; and  $T_H2$  exacerbation on the lymph nodes. Those changes were associated with low IgE titers and increased IgG2a levels. Meanwhile, the lungs exhibited an increased neutrophilia, over the eosinophilia, associated with the diminished CCL11 expression. The azithromycin treatment reduced several parameters related to asthma, as the neutrophilia, the  $T_H17$  response, the expression of neutrophil chemoattractants, (KC and MIP2), on top of the reduction of the bronchial hyperresponsiveness on obese allergic animals. In addition, the treatment also reduced the B cells and  $T_{FH}$  frequency on their lymph nodes, followed by diminished frequencies of IL-4, IL-17A e  $IFN\gamma$  producing  $T_H$  cells. Additionally, obese-allergic treated animals overexpressed mir155 in their lungs. However the treatment did not affect the  $T_H2$ /eosinophilic response, and it even had worsen the neutrophilic response on lean allergic mice. Altogether, these results demonstrate obesity affects asthma development on the peripheral lymphoid organs, and also, azithromycin was efficient on the treatment of the neutrophilic profile of the obesity aggravated allergy.

**Keywords:** asthma, obesity, neutrophilia, azithromycin, germinal centers.



## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1</b> – Mapa de prevalência mundial dos sintomas da Asma em indivíduos entre 18 e 45 anos.....	<b>20</b>
<b>Figura 2</b> – Imagem representativa da resposta imune na asma alérgica.....	<b>23</b>
<b>Figura 3</b> – Desenvolvimento da resposta nos centros germinativos.....	<b>25</b>
<b>Tabela 1</b> – Composição das dietas padrão e hiperlipídica.....	<b>49</b>
<b>Tabela 2</b> – Grupos de animais utilizados no protocolo de asma induzida por OVA.....	<b>50</b>
<b>Tabela 3</b> – Grupos de animais utilizados no protocolo de asma induzida por HDM.....	<b>51</b>
<b>Figura 4</b> - Delineamento experimental do protocolo de indução de obesidade e alergia pulmonar experimental induzida por OVA.....	<b>53</b>
<b>Figura 5</b> - Delineamento Experimental - Obesidade e alergia pulmonar induzida por OVA e resposta em órgãos linfóides periféricos (Objetivo 1).....	<b>54</b>
<b>Figura 6</b> - Delineamento experimental do protocolo de indução de obesidade e alergia pulmonar experimental induzida por OVA e tratamento com azitromicina.....	<b>55</b>
<b>Figura 7</b> - Delineamento Experimental - Obesidade e alergia pulmonar induzida por OVA e tratamento com azitromicina (Objetivo 2).....	<b>56</b>
<b>Figura 8</b> – Delineamento experimental e grupos experimentais divididos por procedimentos. Em modelo concomitante de obesidade e alergia pulmonar induzida por HDM e tratamento com azitromicina.....	<b>57</b>
<b>Figura 9</b> - Delineamento Experimental - Obesidade e alergia pulmonar induzida por HDM e tratamento com azitromicina (Objetivo 3).....	<b>58</b>
<b>Quadro 1</b> – Painel de fluorocromos utilizados na fenotipagem por	<b>66</b>

Citometria de Fluxo.....	
<b>Tabela 4</b> – Listagem de primers utilizados para qPCR.....	<b>67</b>
<b>Figura 10</b> – Acompanhamento de peso e acúmulo de gordura, em modelo de OVA.....	<b>70</b>
<b>Figura 11</b> – Contagem absoluta de células no sangue, em modelo de OVA.....	<b>72</b>
<b>Figura 12-</b> Avaliação das atividades de peroxidases de granulócitos, em homogenato de pulmão, em modelo de OVA.....	<b>74</b>
<b>Figura 13</b> – Contagem de eosinófilos no tecido pulmonar.....	<b>76</b>
<b>Figura 14</b> – Avaliação da produção de citocinas no homogenato de tecido pulmonar.....	<b>78</b>
<b>Figura 15</b> – Avaliação da produção de anticorpos em modelo de OVA.....	<b>80</b>
<b>Figura 16</b> – Contagem de células nos órgãos linfoides periféricos.....	<b>81</b>
<b>Figura 17</b> – Imunofenotipagem de Células dendríticas CD11c <sup>+</sup> MHCII <sup>+</sup> nos linfonodos mediastinais e baço.....	<b>83</b>
<b>Figura 18</b> – Frequência de células dendríticas CD11c <sup>+</sup> MHCII <sup>+</sup> .....	<b>84</b>
<b>Figura 19</b> – Imunofenotipagem de Linfócitos B CD19 <sup>+</sup> CD40 <sup>+</sup> .....	<b>87</b>
<b>Figura 20</b> - Imunofenotipagem de Linfócitos B CD19 <sup>+</sup> CD40 <sup>+</sup> , no baço.....	<b>89</b>
<b>Figura 21</b> – Estratégia de <i>gating</i> para seleção de linfócito T foliculares CD4 <sup>+</sup> CXCR5 <sup>+</sup> PD1 <sup>+</sup> nos linfonodos mediastinais.....	<b>91</b>
<b>Figura 22</b> – Estratégia de <i>gating</i> para seleção de linfócito T foliculares CD4 <sup>+</sup> CXCR5 <sup>+</sup> PD1 <sup>+</sup> no baço.....	<b>92</b>
<b>Figura 23</b> – Imunofenotipagem de linfócitos T foliculares nos órgãos linfoides periféricos.....	<b>93</b>

<b>Figura 24</b> – Imunofenotipagem de linfócitos T foliculares nos órgãos linfoides periféricos, 72h após a segunda sensibilização.....	<b>94</b>
<b>Figura 25</b> – Estratégia de <i>gating</i> para seleção de linfócito T auxiliares (CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> ) expressando diferentes fatores de transcrição.....	<b>96</b>
<b>Figura 26</b> – Imunofenotipagem de Linfócitos T auxiliares (CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> ) nos linfonodos mediastinais expressando diferentes fatores de transcrição.....	<b>97</b>
<b>Figura 27</b> – Imunofenotipagem de Linfócitos T auxiliares (CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> ) nos linfonodos mediastinais expressando diferentes citocinas.....	<b>99</b>
<b>Figura 28</b> - Reposta alérgica clássica, eosinofílica em animais tratados com azitromicina.....	<b>102</b>
<b>Figura 29</b> - Expressão de <i>muc5ac</i> e neutrofilia frente ao tratamento com azitromicina.....	<b>104</b>
<b>Figura 30</b> - Imunofenotipagem de Linfócitos B CD19 <sup>+</sup> CD40 <sup>+</sup> , em linfonodos mediastinais e baço, em animais tratados com azitromicina.....	<b>107</b>
<b>Figura 31</b> – Imunofenotipagem de linfócitos T foliculares nos órgãos linfoides periféricos, em animais tratados com azitromicina.....	<b>109</b>
<b>Figura 32</b> – Imunofenotipagem de Linfócitos T auxiliares (CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> ) nos linfonodos mediastinais expressando diferentes fatores de transcrição, em animais tratados com azitromicina.....	<b>111</b>
<b>Figura 33</b> – Imunofenotipagem de Linfócitos T auxiliares (CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> ) nos linfonodos mediastinais expressando diferentes citocinas, em animais tratados com azitromicina.....	<b>113</b>
<b>Figura 34</b> – Imunofenotipagem de Linfócitos T auxiliares (CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> ) nos pulmões expressando diferentes citocinas, em animais tratados com azitromicina.....	<b>115</b>
<b>Figura 35</b> – Avaliação da obesidade em modelo de HDM.....	<b>117</b>
<b>Figura 36</b> – Avaliação da função pulmonar em modelo de HDM.....	<b>119</b>

<b>Figura 37</b> – Avaliação histológica do pulmão em modelo alergia pulmonar induzida por HDM e obesidade induzida por HFD.....	<b>121</b>
<b>Figura 38</b> – Expressão de fatores das respostas T <sub>H</sub> 2/eosinofílica e T <sub>H</sub> 17/neutrofílica, nas vias aéreas.....	<b>123</b>
<b>Figura 39</b> – Expressão de fatores das respostas T <sub>H</sub> 2/eosinofílica e T <sub>H</sub> 17/neutrofílica, em pulmões inteiros.....	<b>125</b>
<b>Figura 40</b> – Expressão de microRNAs no pulmão inteiro, em modelo de HDM.....	<b>127</b>
<b>Figura 41</b> - Resumo gráfico.....	<b>141</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

APCs – Antigen presenting cell / Células apresentadoras de antígenos

CCL11 - Chemokine (C-C motif) ligand 11/Quimiocina (C-C motivo) ligante 11

CDs – Células dendríticas

CN – Controle

DH – Dieta Hiperlipídica

DP- Dieta Padrão

EPO – Eosinophil peroxidase/Peroxidase eosinofílica

FcεRI- Receptor I para porção Fc da Imunoglobulina-E

GINA – Global Initiative for Asthma / Iniciativa Global para Asma

HDL – lipoproteína de alta densidade

HDM – House Dust Mite /Ácaro da Poeira Doméstica

HFD – High Fat Diet / Dieta hiperlipídica

HTAB - hexadeciltrimetil brometo de amônio

IFN- $\gamma$  - Interferon-gama

Ig- Imunoglobulina

ILCs -1, 2, 3 - Innate lymphoid cell/células linfóides inatas.

IMC – índice de massa corporal

iNOS – Induzible Nitric Oxid Sintase/Óxido Nítrico Sintase induzível

LBA – lavado broncoalveolar

MCP1 – Monocyte Chemoattractant Protein/Proteína quimioatraente de monócitos 1

MHC-II – Major Histocompatibility complex/ Principal Complexo de histocompatibilidade

MID1 - E3 ubiquitin-protein ligase Midline-1

MPO - Mieloperoxidase

OB – Obesidade

OMS – Organização Mundial de Saúde / World Health Organization

OPD - Ortofenildiamina

OVA - Ovalbumina

PAMPs - Pathogen-associated molecular pattern/Padrão molecular associado ao patógeno

PBS – tampão salina fosfato

ROR $\gamma$ T - Retineic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor gamma / Receptor nuclear órfão relacionado ao ácido retinóico - gama

ROS – reactive oxygen species / espécies reativas do oxigênio

RPM – rotações por minuto

SOCS1 – Suppressor of Cytokine Signaling

Tbet – T box transcription fator

T<sub>FH</sub> – Linfócitos T foliculares

T<sub>FR</sub> – Linfócitos T foliculares regulatórios

T<sub>H</sub> – T helper – T auxiliares

TLRs – Toll Like Receptors / Receptores do tipo Toll

TNF- $\alpha$  – Tumor necrose factor alpha / Fator de necrose tumoral

TRAIL – TNF-related apoptosis-inducing ligand

TRegs – T regulatórias

TSLP – Thymic stromal Lymphopoietin / linfopoiética do estroma tímico

## Sumário

1 Introdução .....	19
1.1 Asma.....	19
1.2 Obesidade e Asma .....	29
1.3 Modelos de obesidade e asma .....	33
1.4 MicroRNAs.....	36
1.5 Tratamento e resistência .....	39
1.6 Justificativa .....	44
2 Objetivos .....	46
2.1 Objetivos específicos.....	46
2.1.1 Avaliar o efeito da obesidade sobre a resposta imune em órgãos linfoides periféricos (linfonodos mediastinais e baço) em modelo murino de obesidade induzida por dieta e alergia pulmonar induzida por OVA .....	46
2.1.2 Avaliar os efeitos, locais e a nível de órgãos linfoides periféricos, do tratamento com azitromicina em modelo murino de obesidade induzida por dieta e alergia pulmonar induzida por OVA .....	47
2.1.3 Avaliar o efeito do tratamento com azitromicina na resposta imune e na expressão de miRNAs relacionados ao desenvolvimento da asma, em modelo murino de obesidade induzida por dieta e alergia pulmonar induzida por açúcar da poeira doméstica (HDM) .....	47
3 Material e métodos .....	48
3.1 Animais.....	48
3.2 Composição das dietas.....	48
3.3 Grupos experimentais.....	49
3.4 Indução do modelo de obesidade.....	51
3.5 Avaliação do consumo da ração e da massa corporal .....	52
3.6 Indução do modelo de alergia pulmonar experimental e tratamento com azitromicina.....	52

3.7 Avaliação de hiperresponsividade brônquica.....	59
3.8 Obtenção do material biológico .....	59
3.9 Coleta do soro .....	59
3.10 Coleta e processamento do pulmão para dosagem de citocinas, EPO e MPO e histologia.....	60
3.11 Coleta do tecido adiposo .....	60
3.12 Dosagem sérica de anticorpos anti-OVA.....	60
3.13 Avaliação histológica do tecido pulmonar .....	61
3.14 Score inflamatório .....	61
3.15 Contagem de eosinófilos no tecido pulmonar .....	62
3.16 Contagem de células caliciformes produtoras de muco .....	62
3.16 Imunohistoquímica para MPO .....	62
3.17 Dosagem de citocinas e CCL11/eotaxina no homogenato do tecido pulmonar .....	63
3.18 Avaliação da atividade das enzimas peroxidase eosinofílica (EPO) e mieloperoxidase (MPO) .....	64
3.19 Citometria de Fluxo.....	64
3.20 PCR quantitativo .....	66
3.21 Avaliação da expressão de microRNAs .....	68
3.22 Análise estatística .....	68
<b>4 Resultados .....</b>	<b>69</b>
4.1 Modelo de Obesidade e Alergia Pulmonar induzida por Ovalbumina (OVA) ...	69
4.1.1 Dieta hiperlipídica induz aumento de peso e acúmulo de gordura .....	69
4.1.2 Obesidade induz o aumento no número de leucócitos no sangue durante a resposta alérgica induzida por OVA.....	71
4.1.3 Obesidade reduz peroxidase eosinofílica (EPO) e aumenta mieloperoxidase (MPO) no tecido pulmonar .....	73



4.1.4	Obesidade causa redução de infiltrado eosinofílico no tecido pulmonar durante resposta alérgica.....	75
4.1.6	Obesidade intensifica a produção de IgG2a e reduz produção de IgE durante resposta alérgica em animais obesos .....	79
4.1.9	Obesidade reduz frequência de células dendríticas no linfonodo de animais obesos alérgicos .....	84
4.1.13	Obesidade causa redução na frequência de células T <sub>FH</sub> na sensibilização .....	94
4.1.14	Obesidade causa aumento de linfócitos de perfil Th2 nos linfonodos e aumenta resposta de perfil Th17 após indução de alergia pulmonar .....	95
4.1.15	Obesidade aumenta a produção de IL-4 por células T nos linfonodos mediastinais e de IL17A e IFN- $\gamma$ por células do baço, após indução de alergia pulmonar .....	98
4.2	Tratamento com Azitromicina em modelo de Obesidade e Alergia Pulmonar induzida por Ovalbumina (OVA) .....	100
4.2.1	Azitromicina não afeta fatores relacionados com resposta T <sub>H</sub> 2/eosinofílica em animais obesos alérgicos .....	101
4.2.2	Azitromicina reduz expressão de Muc5ac e perfil neutrofílico, causados pela obesidade durante o desenvolvimento da alergia pulmonar .....	103
4.2.3	Tratamento com azitromicina promove recuperação de população de células B regulatórias (PDL1 <sup>high</sup> ) e diminui a ativação de células B convencionais .....	105
4.2.4	Azitromicina reduz a frequência de linfócitos T <sub>FH</sub> nos linfonodos e a expressão de PD1 no baço .....	108
4.2.5	Azitromicina reduz tanto a expressão de GATA3 em animais magros alérgicos e de ROR $\gamma$ T em animais obesos alérgicos .....	110
4.2.6	Azitromicina reduz a frequência de células produtoras de IL-4, IL17A e IFN $\gamma$ no linfonodo, e recupera células produtoras de IL-4 no baço .....	112
4.3	Modelo de Obesidade e Alergia Pulmonar com Ácaro da Poeira Doméstica (HDM do inglês: <i>House Dust Mite</i> ) e tratamento com azitromicina.....	116

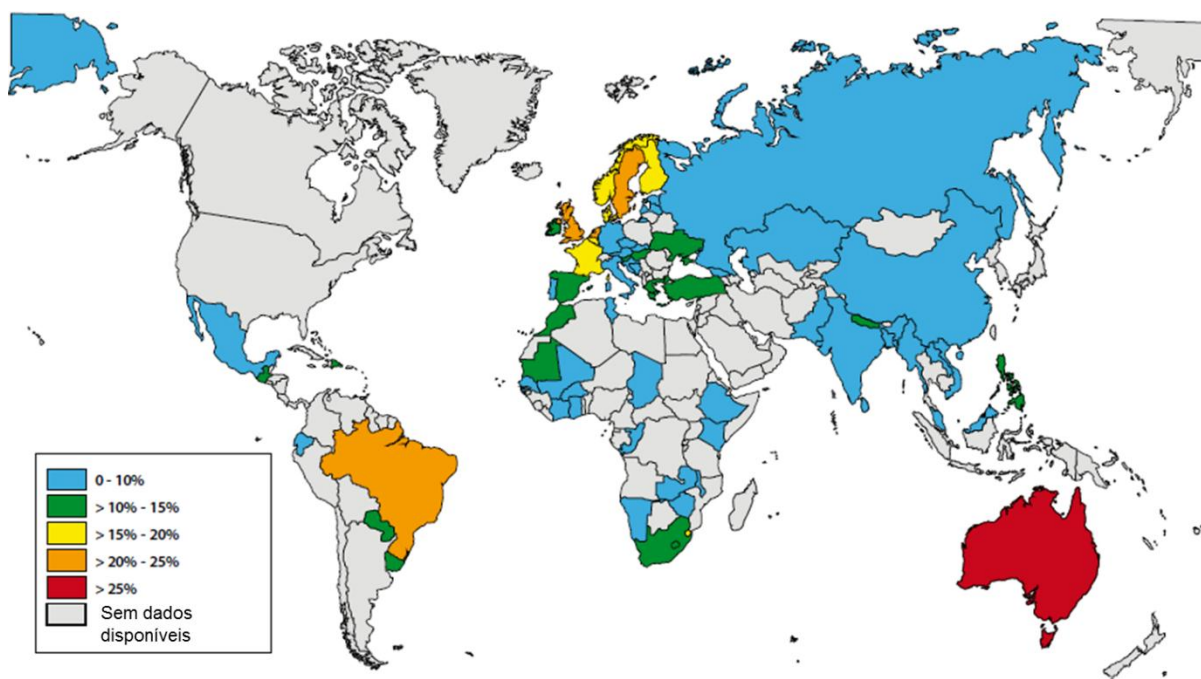
4.3.1	Indução de obesidade .....	116
4.3.2	Obesidade aumenta a hiperresponsividade brônquica na alergia pulmonar contudo esse efeito é revertido pela azitromicina.....	118
4.3.3	Obesidade induz aumento de infiltrado neutrofílico na alergia pulmonar induzida por HDM, que é reduzido pelo tratamento com Azitromicina .....	120
4.3.4	Obesidade reduz parâmetros relacionados à resposta eosinofílica/ $T_H2$ aumenta resposta de perfil neutrofílico/ $T_H17$ nas vias aéreas, e azitromicina não afeta esses parâmetros.....	122
4.3.5	Azitromicina reverte o aumento na expressão genica de fatores ligados à resposta $T_H17$ /neutrofílica, causado pela obesidade no pulmão como um todo .....	124
4.3.6	Obesos não apresentam expressão diferencial de mir-155, mas azitromicina causou aumento em sua expressão .....	126
5	Discussão.....	128
6	Conclusão .....	142
7	Referências .....	143
	Anexo .....	166

# 1 Introdução

## 1.1 Asma

A asma é uma doença inflamatória pulmonar crônica, que apresenta como sintomas: hiperresponsividade das vias aéreas, com episódios recorrentes de sibilância; dispneia; aperto no peito e tosse. Levando à graus variáveis de obstrução e limitação do fluxo aéreo, causadas por broncoconstrição, hipersecreção de muco e desenvolvimento do processo inflamatório (GINA, 2018). Além disso, com a evolução do quadro crônico, o tecido afetado passa por um processo de remodelamento tecidual, com 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 (HOLGATE, 2012).

De acordo com o Guia da Iniciativa Global para a Asma, essa doença acomete cerca de 300 milhões de pessoas (7% a 10% da população mundial), e nas próximas duas décadas, segundo estimativa, esse número aumentará para 400 milhões de indivíduos. Apesar de ainda haverem problemas de diagnóstico, calcula-se que, anualmente, 346.000 pessoas morram desta doença. (GINA, 2018). No Brasil, existem cerca de 20 milhões de asmáticos e em 2011 a doença foi responsável por 160 mil hospitalizações, sendo um dos países com maior prevalência da doença (SOCIEDADE-BRASILEIRA-DE-PNEUMOLOGIA, 2012). Além disso, o *The Global Asthma Report* de 2018 destaca o Brasil como um dos países com maior incidência da doença, sobretudo entre adolescentes, e ainda indica que apesar da alta incidência de sintomas somente 12% dos asmáticos cheguem a receber um diagnóstico médico. O documento ainda destaca que o país não apresenta nenhum plano nacional de controle da doença, mesmo com a manutenção das altas taxas de prevalência (GLOBAL ASTHMA NETWORK, 2018).



**Figura 1** – Mapa de prevalência mundial dos sintomas da Asma em indivíduos entre 18 e 45 anos (GLOBAL ASTHMA NETWORK, 2018).

Essas altas taxas de prevalência refletem em grandes prejuízos econômicos. Um estudo realizado no Brasil, estima que as despesas com internações e medicamentos cheguem a 733 dólares anuais por paciente, e que suas famílias cheguem a gastar 929 dólares anuais por paciente (STIRBULOV et al., 2016). Contudo, pacientes com asma controlada representam um gasto duas vezes menor quando comparado a pacientes com a doença não controlada (SANTOS et al., 2007). Além dos gastos diretos com a assistência à saúde, o caráter altamente debilitante da doença implica prejuízos econômicos causados pelo afastamento ao trabalho e menor produtividade dos indivíduos afetados (NURMAGAMBETOV; KUWAHARA; GARBE, 2018).

Além da escassez de investimentos no controle da asma, seu manejo é dificultado pela alta heterogeneidade da doença. Apesar de apresentar um conjunto específico de sintomas, diferentes processos patogênicos podem estar envolvidos. Nesse contexto, utiliza-se características clínicas (como a capacidade respiratória e sintomas), demográficas (como idade e sexo) e patofisiológicas (como tipo de infiltrado inflamatório e citocinas produzidas) para classificar a asma em fenótipos distintos (WENZEL, 2012). Ainda assim, esses fenótipos não refletem mecanismos

semelhantes para o estabelecimento da doença, sendo necessária uma subdivisão em endótipos, que leva em consideração tais parâmetros e possui maior relevância em relação ao direcionamento do tratamento (AGACHE et al., 2012; LOTVALL et al., 2011).

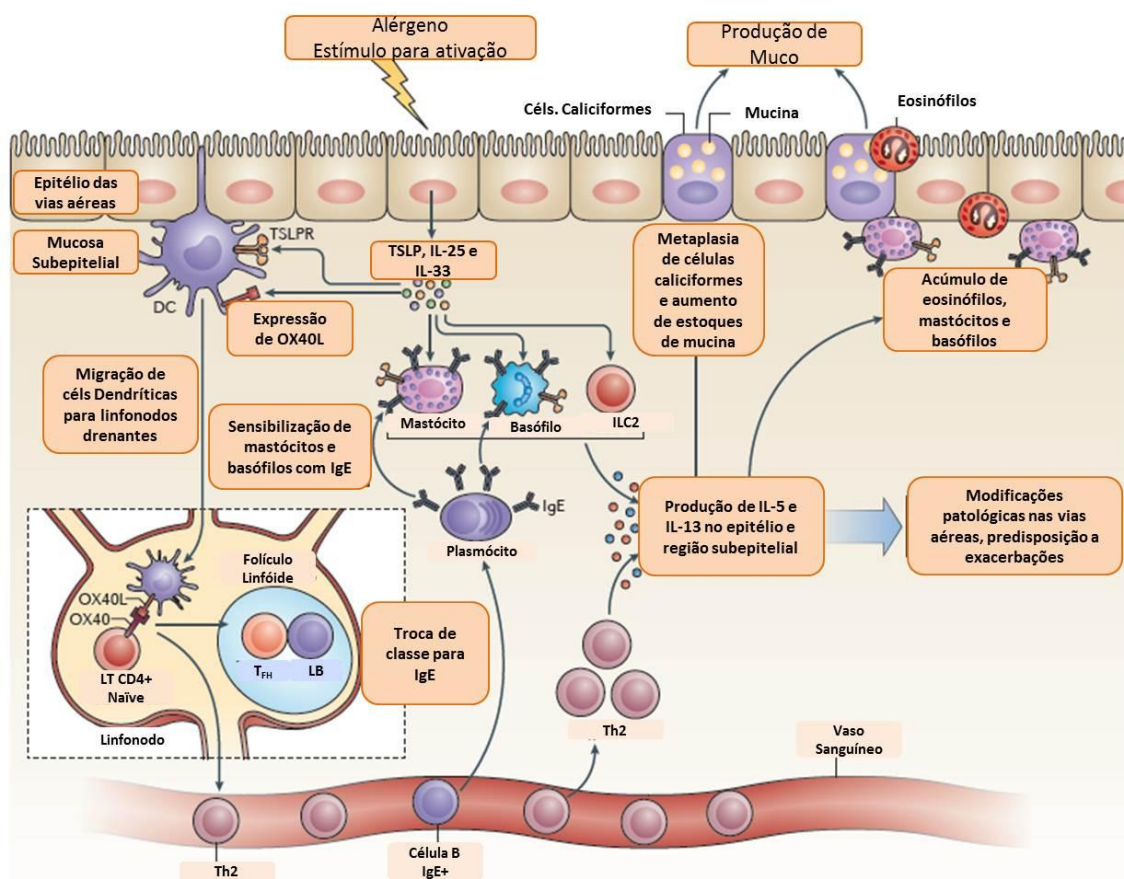
Dentre os diversos fenótipos de asma, a forma alérgica, é a mais comum, e afeta, principalmente, crianças e adultos jovens com predisposição genética para o desenvolvimento da mesma (WENZEL, 2012). Nesse sentido estudos tem demonstrado uma série de polimorfismos relacionados com a suscetibilidade ao desenvolvimento de asma. Dentre esses podemos destacar diferenças em genes ligados a receptores adrenérgicos da musculatura lisa, que podem levar a redução da função respiratória (THOMSEN et al., 2012). Adicionalmente, modificações em gene relacionado ao inflamassoma NLRP3 pode acarretar uma predisposição à ativação frente a estímulos alérgicos, tornando esses indivíduos mais suscetíveis ao desenvolvimento de asma (LEAL et al., 2018). Além disso, polimorfismos ligados aos receptores do tipo Toll (TLRs) 2, 4 e 9, já foram relacionados com o desenvolvimento de asma sendo importantes fatores para o agravamento da doença (SCHURMAN et al., 2018; TIZAOUI et al., 2015).

O fenótipo alérgico da asma pode ser identificado pelo teste positivo de hipersensibilidade cutânea, e altos níveis séricos de IgE para antígenos alergênicos (SCHATZ et al., 2014; WENZEL, 2012). Ainda assim, atualmente é reconhecida uma grande variedade de endótipos dentro desse tipo de asma, caracterizados pela participação de diferentes subtipos de células T, bem como a expressão diferencial de moléculas no epitélio, variações nos tipos celulares presentes no escarro e até mesmo composições distintas de microbiota (ZISSLER et al., 2016).

Apesar da grande variabilidade encontrada na asma alérgica, o desenvolvimento de sua forma clássica se inicia com a perda de integridade do epitélio das vias aéreas, permitindo o acesso do alérgeno às células imunes residentes (LAMBRECHT; HAMMAD, 2012; XIAO et al., 2011). Nessa etapa ocorre também o reconhecimento do alérgeno por Receptores de Reconhecimento de Padrão (PRRs – do inglês Pattern Recognition Receptors) presentes nas células epiteliais e células dendríticas levando a sua ativação. Posteriormente, células epiteliais liberam quimiocinas, como CCL20 que atraem células dendríticas imaturas para o local de contato com o alérgeno (SALAZAR; GHAEMMAGHAMI, 2013). Dessa forma o nível de expressão dos PRRs, principalmente em células epiteliais,

irá contribuir para a determinação da sensibilidade aos alérgenos. Nesse contexto, infecções e respostas inflamatórias não alérgicas podem promover a maior expressão de PRRs ou então de fatores envolvidos mais abaixo na cascata de sinalização, como NF- $\kappa$ B; tornando esses indivíduos mais propensos ao desenvolvimento de alergia (LAMBRECHT; HAMMAD, 2012).

Dentre as citocinas epiteliais liberadas durante o estabelecimento do processo alérgico, destacam-se interleucina (IL)-25, IL-33 e linfopoiatina estromal tímica (TSLP), que atuam promovendo a maturação e ativação de células dendríticas. Essas citocinas também atuam em células linfoides inatas do tipo 2 (ILC2) induzindo a produção de IL-5, IL-9 e IL-13 (HALIM et al., 2014; SAENZ et al., 2010). Após fagocitar o alérgeno, sob estímulo das citocinas epiteliais, as células dendríticas migram para os linfonodos drenantes, onde apresentam o antígeno processado para os linfócitos T virgens recirculantes, induzindo a ativação dos mesmos, com diferenciação para um perfil de células T auxiliares do tipo 2 ( $T_{H2}$ ) (KAPSENBERG, 2003), num processo dependente da expressão do fator de transcrição GATA3 que pode ou não ser influenciado pela sinalização de IL-4 (OLIPHANT; BARLOW; MCKENZIE, 2011). Nesse caso uma importante fonte de IL-4, que sustenta a diferenciação para  $T_{H2}$ , são as ILC2 que respondem principalmente a estímulos oriundos do epitélio (ZHU, 2015) (Fig. 2).



**Figura 2** – Imagem representativa da resposta imune na asma alérgica. A resposta se inicia no epitélio, onde ocorre o contato com o alérgeno e a ativação dessas células através de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs). Essas células liberam citocinas que vão atuar no recrutamento e ativação de mastócitos, basófilos e ILCs, mas também vão ativar células dendríticas, as quais irão transportar o alérgeno processado para o linfonodo. Quando entram em contato com as células dendríticas ativadas, linfócitos T virgens se diferenciam e passam a expressar receptores CXCR5 que reconhecem a quimiocina CXCL13 expressa nos centros germinativos. Esses linfócitos migram então para a área de contato com células B, onde iram promover o amadurecimento do folículo linfóide e promover a troca de isotipos para IgE. Parte dos linfócitos se diferenciarão em  $T_H2$  e migrarão para a periferia onde principalmente através da produção de IL-5 e IL-13 irão promover a proliferação e sobrevivência de eosinófilos; a metaplasia das células caliciformes e a produção de muco; bem como todas as outras modificações ocorridas na resposta alérgica em um asmático (FAHY, 2015). Imagem adaptada de Fahy, 2015.

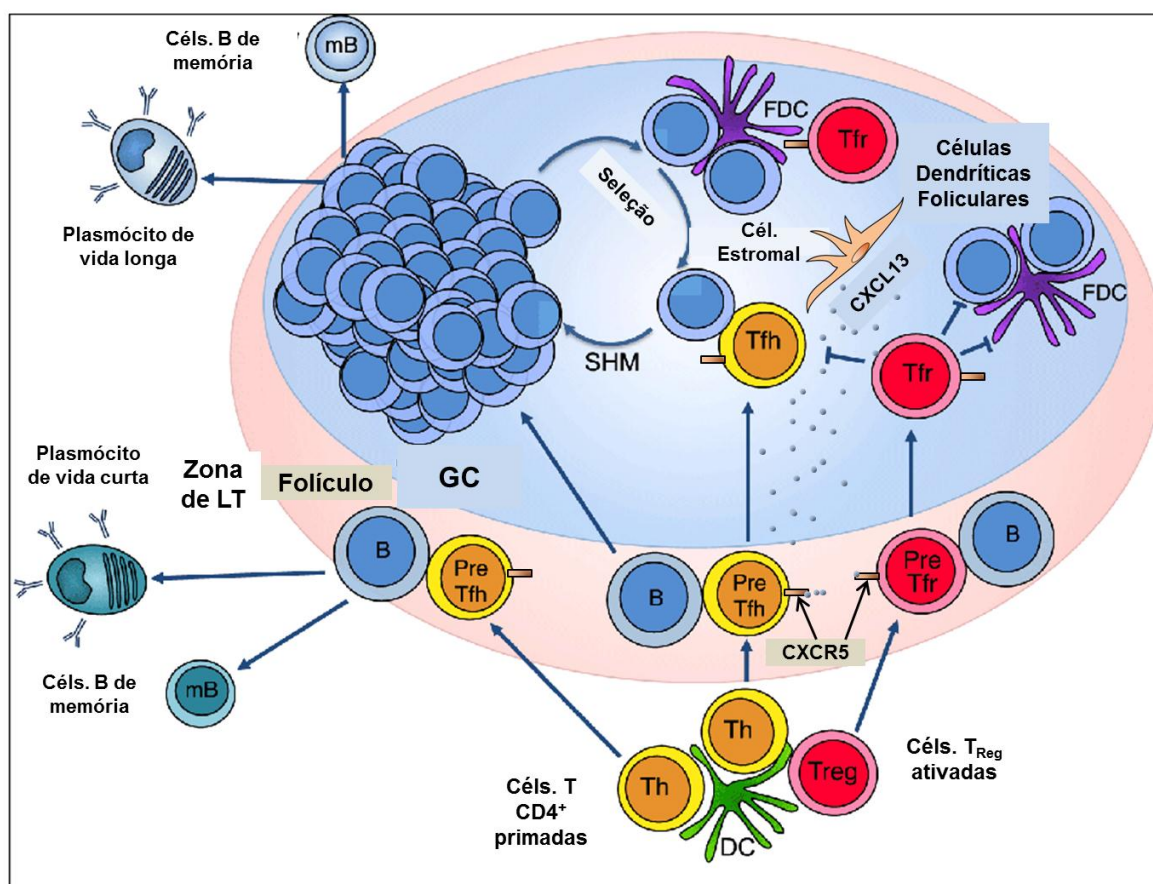
Células dendríticas que migram para os linfonodos também induzem a diferenciação de células T foliculares ( $T_{FH}$ ), que participam da ativação de linfócitos B (LB) nos folículos linfóides, resultando na produção de anticorpos de alta afinidade (KRISHNASWAMY et al., 2017; PATTARINI et al., 2017). Nesse contexto, o desenvolvimento de uma resposta humoral eficiente é dependente da formação de centros germinativos a partir dos folículos primários, estruturas dinâmicas onde LB passam por uma contínua maturação de afinidade e seleção, que culminam com a formação de anticorpos de alta afinidade (MESIN; ERSCHING; VICTORA, 2016). Durante esse processo, células  $T_{FH}$  mantêm a estrutura e função do centro

germinativo e regulam a resposta de células B, principalmente através da expressão inicial de IL-21, que irá promover a hipermutação somática e estimular a expressão do fator de transcrição pró-proliferativo Bcl-6 em LB. Em adição a IL-21, a síntese tardia de IL-4 por LT<sub>FH</sub>, a produção de IgG e a expressão do Blimp-1, fator de transcrição essencial para a maturação de células B em plasmócitos secretores de anticorpos (WEINSTEIN et al., 2016).

A diferenciação de células T<sub>FH</sub> se inicia a partir do contato com as células dendríticas, as quais fornecem estímulos como IL-6 e o ligante-ICOS, aumentando a expressão do fator de transcrição Bcl-6. Concomitantemente, ocorre a diminuição da expressão do receptor CCR7 e aumento na expressão de CXCR5, a qual reconhece a quimiocina CXCL13. Esses receptores possuem papéis opostos, sendo responsáveis pela manutenção do linfócito T<sub>FH</sub> na zona de célula T, e pela sua migração para a borda T/B no folículo linfoide, respectivamente. Estímulos adicionais, advindos do contato com células B cognatas, promovem a entrada dessas células no centro germinativo e sua progressão de pré-T<sub>FH</sub> para um estágio maduro, quando passam a expressar CXCR5<sup>hi</sup> PD1<sup>hi</sup> em sua superfície. Essas células são as mais eficientes na indução de mudança de classe e secreção de anticorpos em células B, no centro germinativo (MA et al., 2017) (Fig. 3).

Além das células T<sub>FH</sub>, também pode ocorrer a diferenciação de células T foliculares regulatórias (T<sub>FR</sub>), as quais também apresentam proliferação e desenvolvimento dependente da expressão de Bcl-6 e possuem o receptor de quimiocina CXCR5 responsável por sua migração para os folículos linfoides, contudo expressam o fator de transcrição Foxp3 (LINTERMAN et al., 2011). Essas células são capazes de suprimir a resposta humoral, atuando diretamente na regulação tanto dos linfócitos B, mas também indiretamente através da regulação das células T<sub>FH</sub> (SAGE; SHARPE, 2015) (Fig. 3).





**Figura 3 – Desenvolvimento da resposta nos centros germinativos.** Células dendríticas portando o alérgeno fazem a apresentação aos linfócitos T virgens recirculantes, promovendo a diferenciação em subtipos de  $T_H$ . Dentre esses subtipos, destaca-se os linfócitos  $T_{FH}$ , caracterizados pela expressão do receptor para quimiocina CXCR5, que reconhece a CXCL13, liberada pelas células estromais, e que guia os  $LT_{FH}$  para os centros germinativos. Inicialmente essas células interagem com LB gerando plasmócitos de vida curta e células B de menor especificidade. Nos centros germinativos (GC) as células B passam por diversos ciclos de hipermutação somática (SHM) e seleção que resultam no desenvolvimento de plasmócitos de vida longa e células B de memória, os quais produzem anticorpos de alta afinidade. Durante esse processo, células dendríticas foliculares (FDC) exercem a dupla função de manter a apresentação de antígeno e fornecer estímulos proliferativos. Durante a ativação inicial de LT virgens, pode ocorrer a diferenciação de linfócitos T foliculares regulatórios ( $T_{FR}$ ), os quais expressam o fator de transcrição Foxp3 e atuam no centro germinativo e regulando a ativação de linfócitos T e B. (Adaptado de LINTERMAN; HILL; YU, 2016)

Tendo em vista o papel essencial da resposta humoral durante o desenvolvimento dos processos alérgicos, variações nessas populações podem afetar o curso desse grupo de doenças. Nesse contexto, sabe-se que as populações de linfócitos  $T_{FH}$  impactam a produção de anticorpos, sobretudo IgE, sendo responsável por induzir a troca de classes, e a maturação de afinidade (NOBLE; ZHAO, 2016). Essa imunoglobulina, quando liberada, se liga a receptores de alta afinidade para a porção Fc da IgE ( $Fc\epsilon RI$ ), na membrana de mastócitos e basófilos determinando assim a fase de sensibilização da resposta alérgica (GALLI; TSAI; PILIPONSKY, 2008)

Um segundo contato com o alérgeno inicia a fase efetora da reação, promovendo a ligação cruzada entre complexos IgE-FcεRI, levando a ativação e degranulação de mastócitos e basófilos, os quais liberam mediadores inflamatórios como histamina, leucotrienos e prostaglandinas. Estas substâncias atuam nas células musculares, provocando broncoconstrição e aumento da permeabilidade vascular. Além disso, produzem citocinas como IL-9 e IL-13 que causam aumento da produção de muco e hiperresponsividade das vias aéreas, sintomas característicos da asma (GALLI; TSAI; PILIPONSKY, 2008). Contatos repetidos com o alérgeno geram uma inflamação persistente, levando a doença à cronicidade, alterando a fisiologia pulmonar em decorrência do remodelamento tecidual nas vias aéreas (YASUKAWA et al., 2013).

Adicionalmente, IL-5 liberada por linfócitos T<sub>H</sub>2 ativados e por ILCs 2 induzem aumento na produção de eosinófilos, na medula óssea; bem como sua ativação e sobrevivência nos pulmões (NUSSBAUM et al., 2013). Contudo, outras citocinas como a IL-4 (CHEN et al., 2004), IL-13 (MATTESS et al., 2002) e IL-33 (CHERRY et al., 2008) podem atuar da mesma forma. Outro fator importante para o influxo de eosinófilos é a quimiocina CCL11 ou eotaxina-1, principal fator quimiotático para eosinófilos (POPE et al., 2005).

Embora, tradicionalmente, a asma seja vista como uma doença alérgica de perfil imunológico T<sub>H</sub>2, grande parte dos asmáticos apresentam outros fenótipos da doença. Muitas vezes, estes fenótipos, podem não estar associados à histórico familiar de alergia e os sintomas aparecem somente no início da fase adulta frente a estímulos não-alérgênicos como stress, exercícios, menopausa, ar frio, cigarro e obesidade (AMELINK et al., 2013b; WENZEL, 2012). Além disso, a própria asma alérgica apresenta grande variabilidade e influência de fatores como idade, sexo e concomitância de outras condições como a obesidade (NEWSON et al., 2014; WANG et al., 2011). Os endótipos da asma alérgica podem ser divididos em dois grupos principais, um grupo que representa a forma clássica da asma alérgica, com resposta T<sub>H</sub>2 alta; e um outro grupo com resposta T<sub>H</sub>2 baixa, podendo haver resposta neutrofílica ou paucigranulocítica (STOKES; CASALE, 2016).

O perfil neutrofílico se destaca por estar associado à resistência ao tratamento convencional com corticosteroides inalados e com a maior gravidade da doença (RAY; KOLLS, 2017b). Nesse perfil, vale ressaltar que a ausência de TSLP em modelo murino de asma atópica, promove o desenvolvimento do perfil T<sub>H</sub>17 em

detrimento da resposta  $T_H2$  (YADAVA et al., 2014), num processo dependente da expressão do fator de transcrição  $ROR\gamma T$  (ANO et al., 2013). Durante o desenvolvimento desse tipo de resposta ocorre uma cooperação entre linfócitos  $T_H17$  e neutrófilos, os quais são capazes de produzir quimiocinas para atrair uns aos outros (MARTIN PELLETIER et al., 2010). Recentemente foi demonstrado que os citoplastos de neutrófilos, originários do processo de netose (no qual o neutrófilo extravasa seu DNA e proteínas associadas formando as NETs – do inglês *neutrophil extracellular traps*), são capazes por si só de direcionar a diferenciação de linfócitos T virgens para  $T_H17$  em ensaio *in vitro*. Adicionalmente a presença desses citoplastos apresentaram uma forte correlação com os níveis de IL-17A no escarro de pacientes com asma grave (KRISHNAMOORTHY et al., 2018). A migração de neutrófilos para o local da inflamação está associada à maior produção de CXCL8 (IL-8) ou de IL17A, bem como em resposta a liberação de CXCL1 (KC) e CXCL2 (MIP-2), ambas reconhecidas pelo receptor de quimiocinas CXCR2 presente em neutrófilos (HOSOKI et al., 2016). Nesse contexto, sabe-se que o bloqueio desse receptor, ao inibir a inflamação neutrofílica, pode prevenir a ocorrência de diversos fatores característicos da asma alérgica como a hiperresponsividade e a produção exacerbada de muco (MIZUTANI; NABE; YOSHINO, 2014) .

A presença de neutrófilos se relaciona com a maior gravidade da doença, pois essas células contribuem para a migração de mais neutrófilos e macrófagos, e para intensificação do remodelamento tecidual (CIEPIELA; OSTAFIN; DEMKOW, 2015; RAY; KOLLS, 2017a). Esse efeito é agravado pela liberação de enzimas como a Metaloproteinase-9 (MMP-9) e elastase neutrofílica, ambas participam do remodelamento tecidual. Através da clivagem de colágeno e elastina, essas proteinases geram matricinas, as quais se ligam aos receptores de quimiocina CXCR1 e CXCR2, atraindo mais neutrófilos (GU et al., 2018). Além de sua capacidade proteolítica, a elastase neutrofílica também promove a produção de IL-8 pelo epitélio, levando assim ao maior recrutamento de neutrófilos, além de agir reduzindo a expressão do Inibidor de Metaloproteinase-I (TIMP1), o qual atua inibindo MMP-9 (SIMPSON et al., 2005).

Outro fator importante presente nos grânulos de neutrófilos é a mieloperoxidase (MPO), essa enzima é capaz de causar dano tecidual ao reagir com outros metabólitos, e ainda ativar o endotélio e recrutar mais neutrófilos (AROCA et al., 2014; MONTESEIRIN, 2009). Nesse contexto, indivíduos asmáticos apresentam

maior atividade da MPO, em comparação com indivíduos saudáveis, e esse parâmetro está associado à maior degranulação de neutrófilos e maior gravidade da doença (JATAKANON et al., 1999).

A inflamação neutrofílica na asma está geralmente associada à inflamação sistêmica com elevada expressão de genes envolvidos com a produção de citocinas como a IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  (FU et al., 2013). Além disso esse tipo de resposta é sustentado pela imunidade adaptativa através da proliferação de linfócitos T<sub>H</sub>1 e T<sub>H</sub>17, e elevados níveis das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-17A (FOGLI et al., 2013). Todas essas modificações estão ligadas ao estabelecimento de um perfil distinto de resposta, com manutenção da gravidade dos sintomas e resistência a terapias convencionais tanto em humanos (MOORE et al., 2010; VAZQUEZ-TELLO et al., 2013), como em modelo experimental (BRANDT; KHURANA HERSHEY, 2016).

## 1.2 Obesidade e Asma

Dentre os indivíduos que apresentam esse perfil neutrofílico de asma, destacam-se indivíduos obesos. Estudos clínicos demonstram uma correlação positiva entre obesidade e a neutrofilia na asma (SCOTT et al., 2011a; TELENGA et al., 2012b). E ainda, associa-se a obesidade à não-recuperação da capacidade respiratória após o tratamento com corticoide inalado, essa avaliação é feita através da medição do volume expiratório forçado (FEV – do inglês *Forced Expiratory Volume*) antes e depois do tratamento (TELENGA et al., 2012b). Além disso, pacientes asmáticos obesos com episódios de exacerbação, que recorrem ao serviço de emergência necessitam mais de hospitalização do que os pacientes magros (HASEGAWA et al., 2014). Por isso, a obesidade é considerada um fator de risco para a asma, podendo levar ao desenvolvimento da doença em indivíduos até então não-asmáticos, ou então causar o agravamento da doença em indivíduos já acometidos (DIXON; POYNTER, 2016).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define como obesidade o acúmulo anormal ou excessivo de gordura, condição geralmente avaliada através do índice de massa corporal, medida que leva em consideração a massa do indivíduo e sua altura. Dados epidemiológicos revelam que nas três últimas décadas o número de obesos mais do que dobrou, e que atualmente existem 600 milhões de adultos obesos (ARROYO-JOHNSON; MINCEY, 2016). Esses dados são preocupantes, pois o aumento da incidência de obesidade está correlacionado com a maior ocorrência de dislipidemia, diabetes do tipo 2, hipertensão, acidente vascular cerebral, apneia do sono, osteoartrite, cânceres e doenças respiratórias (APOVIAN, 2016).

Sabe-se que a função primária do tecido adiposo é o armazenamento de gordura, bem como a sua hidrólise e liberação durante jejuns prolongados (GUILHERME et al., 2008), contribuindo para a remoção do excesso de lipídios e glicose e circulação, promovendo a manutenção da homeostase (LUO; LIU, 2016). Contudo esse tecido também funciona como um órgão endócrino podendo impactar diretamente o funcionamento de outros órgãos através da liberação de citocinas que são comumente conhecidas como adipocinas. Dentre elas destacam-se o TNF- $\alpha$ , IL-6, CCL2 e leptina (KERSHAW; FLIER, 2004). Essas moléculas são responsáveis pela manutenção de um estado inflamatório crônico de baixo grau, caracterizado por

uma baixa produção, de fatores inflamatórios, próximo a níveis basais e ausência de sinais clínicos (MEDZHITOV, 2008; MRAZ; HALUZIK, 2014).

Dentre as adipocinas supracitadas destaca-se a leptina, citocina da família da IL-6, que é produzida principalmente no tecido adiposo e apresenta receptores em quase todos os tecidos do corpo (ABELLA et al., 2017). A grande diversidade dos receptores de leptina também interferem em sua função, e a forma com domínio citoplasmático longo (Ob-Rb) é a mais eficiente na transdução de sinais oriundos da ligação da leptina, esta forma está presente em diversas células do sistema imune, demonstrando a importância da ligação entre tecido adiposo e sistema imune (LAGO et al., 2007).

De forma geral, a sinalização da leptina atua nas células do sistema imune promovendo a ativação e prolongando a sobrevivência das mesmas, favorecendo assim a manutenção de processos inflamatórios (PROCACCINI et al., 2017). Nas células dendríticas a leptina promove ativação das vias do NF- $\kappa$ B e AKT, aumenta a produção de IL1 $\beta$ , IL-6, IL-12 e MIP-2 e ainda favorece o *priming* de linfócitos T auxiliares para T<sub>H</sub>1 (MATTIOLI et al., 2005). Além disso, na ausência de receptores para leptina, células T CD4<sup>+</sup> se diferenciam menos em células T<sub>H</sub>17 (KOSARAJU et al., 2017; REIS et al., 2015). Nesse sentido já foi demonstrado que a ligação de receptores de leptina leva à intensificação da via do mTOR, que por sua vez resulta na maior ativação de células T efetoras, em detrimento de respostas regulatórias (PROCACCINI et al., 2012).

Além de afetar o funcionamento do sistema imune através da liberação de citocinas, o tecido adiposo também abriga diversas células imunes residentes. Na ausência de obesidade essas células exercem um importante papel na homeostase, eliminando células apoptóticas e promovendo angiogênese. Contudo o acúmulo anormal de gordura induz aumento no número de células residentes bem como a modificação do perfil dessas para um perfil pró-inflamatório (SCHIPPER et al., 2012). Com a instauração do processo inflamatório no tecido adiposo, ocasionado pelo maior acúmulo de gordura, ocorre a mudança/recrutamento de macrófagos alternativamente ativados ou M2 para o perfil M1 ou classicamente ativados, que expressam proteínas coestimulatórias e MHCII, sustentando uma maior proliferação de células T CD4<sup>+</sup> (CHYLIKOVA et al., 2018; MORRIS et al., 2013). Contudo, o número de células regulatórias (Tregs), importantes na inibição de perfis T<sub>H</sub>1 e T<sub>H</sub>17,

decrece fortemente, favorecendo a proliferação dos perfis inflamatórios (FERRANTE; JR, 2013).

As alterações observadas no tecido adiposo, bem como as modificações sistêmicas, ocasionadas pela obesidade, afetam o funcionamento normal dos pulmões. Nesse sentido, a ocorrência de síndrome metabólica, está associada à redução da função pulmonar até mesmo em indivíduos não asmáticos. Somado a isso, a concomitância das duas condições está relacionada a um prognóstico pior, com perdas mais expressivas da função pulmonar em comparação com indivíduos magros (FORNO et al., 2015). O pior quadro apresentado por indivíduos obesos-asmáticos está ligado tanto a modificações mecânicas e fisiológicas, ao menor volume dos pulmões e a maior hiperresponsividade brônquica; à modificações da metabólicas e imunes; a maior quantidade de leptina nos pulmões, assim bem como a mudança do perfil clássico de asma alérgica  $T_H2$ /eosinofílica para um perfil  $T_H1/T_H17$ /neutrofílica, associado a um maior infiltrado de neutrófilos (BAFFI; WINNICA; HOLGUIN, 2015a; FU et al., 2013; SCOTT et al., 2011a; TELENGA et al., 2012b). Vários estudos tem tentado explicar as modificações que proporcionam esse perfil, característico de obesos asmáticos.

Nesse sentido, já foi demonstrado, em modelo murino de obesidade e asma, que macrófagos M1 exercem um importante papel na perda da função pulmonar e diferenciação de resposta característica de animais obesos, através da produção de IL-1 $\beta$  (KIM et al., 2014; ZHANG et al., 2018b). Além disso, animais *knockout* para inflamassoma NLRP3, não apresentam aumento da hiperresponsividade das vias aéreas causada pela dieta, mesmo desenvolvendo as alterações metabólicas causadas pela obesidade. Contudo a administração de IL-1 $\beta$  para esses animais induz hiperresponsividade, num mecanismo dependente da produção de IL17A por células linfoides inatas do tipo 3 (ILC3) (KIM et al., 2014). Em concordância com esses dados, foi demonstrado um aumento da expressão de NLRP3, bem como de genes associados (caspase-1 e IL-1 $\beta$ ), em pacientes com asma neutrofílica em comparação com pacientes com a forma eosinofílica ou paucigranulocítica da doença (SIMPSON et al., 2014a). Interessantemente, a redução do perfil  $T_H2$  já foi demonstrada em modelo murino, onde a alimentação com dieta rica em lipídios levou a falhas na ativação de células dendríticas, reduzindo a expressão de MHCII, de moléculas co-estimulatórias e até mesmo de CCR7, receptor responsável pelo

direcionamento dessas células para os linfonodos (PIZZOLLA et al., 2016; SILVA et al., 2017a).

As alterações ocorridas nos indivíduos obesos comprometem até mesmo o diagnóstico. Marcadores comumente utilizados para indicar eosinofilia (Óxido nítrico exalado – FeNO, nível sérico de IgE, contagem de eosinófilos no sangue e escarro) apresentam forte correlação em indivíduos magros, ao passo que em indivíduos obesos, apresentam uma correlação fraca entre esses fatores (LUGOGO et al., 2017). Além disso, a sobreposição de sintomas respiratórios, entre asma e obesidade, pode levar a erros no diagnóstico clínico. A dificuldade em se identificar dispneia e obstrução do fluxo aéreo pode fazer com que a asma em obesos seja subdiagnosticada (MOHANAN et al., 2014).

A grande diversidade de fenótipos, e os diversos mecanismos envolvidos no desenvolvimento concomitante de asma e obesidade, contribuem para que essa relação ainda não seja completamente entendida. Especula-se sobre a relação de causa e efeito entre as duas doenças, pois a obesidade pode contribuir para o surgimento da asma através do estabelecimento de um estado de inflamação crônica, enquanto a asma também pode promover o surgimento da obesidade ao contribuir para o sedentarismo e devido ao uso de corticoides (BAFFI; WINNICA; HOLGUIN, 2015b). Em um estudo recente, demonstrou-se que crianças asmáticas apresentam um risco 51% maior de se tornarem obesas do que as crianças não asmáticas (CHEN et al., 2015). Entretanto a obesidade e o alto consumo de açúcar na infância também estão associados ao desenvolvimento de asma (MCCALLISTER; MEDRANO; WOJCICKI, 2018). Somado a isso, a adoção de práticas de prevenção a obesidade, como cuidados com a alimentação e prática de exercícios físicos está relacionada à redução no desenvolvimento de asma (PAPOUTSAKIS et al., 2018).

Sendo assim, a alta complexidade tanto da asma, quanto da obesidade, dificulta a compreensão da relação entre as duas patologias. Além disso, fatores como o sexo do paciente, a idade de estabelecimento da doença, a propensão ao seu desenvolvimento da mesma, bem como outros fatores ambientais pode ter um forte impacto nessa relação. Nesse contexto tem-se buscado mimetizar os diversos fenótipos de asma em modelos animais, bem como simular os fatores que afetarão o desenvolvimento dessa doença.



### 1.3 Modelos de obesidade e asma

Na busca pelo melhor entendimento da associação entre obesidade e asma, diversos modelos animais tem sido desenvolvidos, e os mesmos refletem a mesma diversidade encontrada nas doenças que simulam (CALIXTO et al., 2010; DE VRIES et al., 2009; DIETZE et al., 2012; MITO et al., 2002). A obesidade pode ser simulada com o uso de animais *knockout*, deficientes em leptina ou em seu receptor, os quais se tornam obesos devido a hiperfagia. Também podem ser utilizados modelos com modificações mais abaixo na cascata de sinalização da leptina, como camundongos que não possuem Proopiomelanocortina (POMC), ou não possuem Carboxipeptidase E (CPE), responsável pela conversão de POMC para sua forma ativa, comprometendo a sinalização desse importante anorexogênico. Esses modelos podem ser utilizados em associação com dietas hiperlipídicas para exacerbação da obesidade (BUTLER; CONE, 2003; LUTZ; WOODS, 2012). No entanto, modelos de obesidade induzida por dieta simulam melhor o desenvolvimento de obesidade em humanos. Nestes modelos, diversas linhagens de camundongos, com graus variáveis de susceptibilidade ao desenvolvimento da obesidade podem ser utilizadas, bem como dietas distintas com alto teor lipídico ou então as chamadas dietas de cafeteria que simulariam os hábitos alimentares ocidentais (BUETTNER; SCHOLMERICH; BOLLHEIMER, 2007; LUTZ; WOODS, 2012; MONTGOMERY et al., 2013). Dentre as linhagens de camundongos utilizados nesses modelos, os C57BL/6 apresentam maior ganho de peso e desenvolvimento de distúrbios metabólicos (COLLINS et al., 2004; MORI et al., 2010).

Diferentemente da linhagem supracitada, camundongos BALB/c são resistentes ao desenvolvimento de obesidade induzida por dieta hiperlipídica, contudo, alguns estudos demonstraram acúmulo de gordura, ganho de massa corporal e instauração de um estágio pró-inflamatório mediante alimentação com dieta rica em lipídios (FEARNSIDE et al., 2008; MORI et al., 2010; SILVA et al., 2017a). Em contrapartida, camundongos BALB/c são mais propensos ao estabelecimento de respostas alérgicas, por terem uma maior propensão ao desenvolvimento de respostas de perfil T<sub>H</sub>2, ao passo que animais C57BL/6 são mais resistentes a esse tipo de resposta (SAHU et al., 2010). Adicionalmente, camundongos BALB/c simulam com maior fidelidade uma resposta de asma alérgica

típica de humanos, com aumento de hiperresponsividade brônquica, elevada produção de IgE específica para o alérgeno, um número maior de mastócitos e de citocinas do perfil  $T_H2$  (SAHU *et al.*, 2010; WHITEHEAD *et al.*, 2003).

Mesmo com a grande diversidade de estudos baseados em modelos animais, o conhecimento se concentra no estudo da asma alérgica clássica. Contudo, recentemente, tem sido feito um esforço maior para entender o desenvolvimento dos demais fenótipos, principalmente naqueles caracterizados pela resistência aos tratamentos convencionais (MARTIN *et al.*, 2014), como por exemplo, a simulação de asma severa/difícil de tratar, com a aplicação do alérgeno combinado ao adjuvante completo de Freund para simular a neutrofilia característica desse perfil (LEE *et al.*, 2017b). Entretanto muitos outros fatores podem estar ligados a relação de obesidade e asma, que nem sempre resulta em aumento da neutrofilia.

Nota-se que a combinação entre a linhagem de animal utilizada e método de indução tanto da obesidade como da asma (Alergia Pulmonar Experimental) irá resultar em características distintas dos modelos. Em modelo de asma alérgica induzida por ovalbumina (OVA) e obesidade induzida por dieta hiperlipídica em camundongos C57BL6, Mito e colaboradores demonstraram a redução de IgE específica em camundongos tratados com duas dietas distintas ricas em gordura (MITO *et al.*, 2002), resultados que corroboram com os encontrados por Vries e colaboradores que demonstraram a redução do infiltrado de eosinófilos e de IL-5, bem como a redução de citocinas pró-inflamatórias nos linfonodos drenantes (DE VRIES *et al.*, 2009). Contudo, utilizando o mesmo alérgeno e a mesma linhagem de camundongos, já foi demonstrado maior infiltrado inflamatório eosinofílico no tecido pulmonar, e maior produção de citocinas de perfil  $T_H2$  em camundongos obesos em comparação com camundongos magros, mas com reduzida eosinofilia no lavado broncoalveolar (CALIXTO *et al.*, 2010), contrastando com a resposta alérgica comum em C57BL/6, na qual há maior migração de eosinófilos para a luz da via aérea (GUEDERS *et al.*, 2009).

O aumento da resposta  $T_H2$ , através da indução da obesidade por dieta hiperlipídica, também já foi relatado em camundongos da linhagem BALB/c, com aumento da hiperresponsividade brônquica, aumento da produção de IL-4 e IgE mesmo na ausência do alérgeno (CHEN, *et al.*, 2015). No entanto, em modelo desenvolvido com o mesmo alérgeno, em camundongos AKR, a obesidade diminuiu o limiar de resposta durante sensibilização, onde camundongos obesos produziram

mais IgE com menos sensibilizações. Além disso, observou-se uma correlação positiva entre o peso do animal e a contagem de eosinófilos (DIETZE et al., 2012). Já em modelo induzido através de sensibilizações e desafios com ácaro da poeira doméstica (HDM – do inglês *house dust mite*) em camundongos C57BL/6, Diaz e colaboradores demonstraram que a obesidade induzida por dieta causou uma redução na eosinofilia acompanhada de aumento do infiltrado de macrófagos (DIAZ et al., 2015). Em modelo induzido com o mesmo alérgeno em camundongos BALB/c a obesidade intensificou a neutrofilia, a hiperresponsividade brônquica e a atração de macrófagos para o pulmão (TASHIRO et al., 2017).

Em trabalho publicado em 2017, Silva e colaboradores demonstraram em modelo de alergia induzida por sensibilizações e desafios com ovalbumina em camundongos BALB/c, que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica causa um atraso na resposta alérgica. Ainda nesse modelo o pico de resposta do animal obeso ocorre em 48h, e não em 24h após o último desafio, como ocorre com os animais magros. Também foi demonstrado um maior infiltrado de neutrófilos e uma mudança na população de macrófagos, como uma diminuição da população do subtipo M2 e maior número de M1 inflamatório. A menor produção de IgE nos animais obesos alérgicos em relação aos alérgicos magros, também foi uma das marcas do modelo (SILVA et al., 2017a). Em conjunto essas características se assemelham a fenótipos de asma resistentes ao tratamento com corticosteroides (SAMITAS; ZERVAS; GAGA, 2017).

## 1.4 MicroRNAs

Frente a grande necessidade de caracterização dos diferentes fenótipos de asma, além da distinção de suscetibilidade e resistência a tratamentos, bem como na busca de novos alvos para terapias, os microRNAs ganharam importância (PAULMURUGAN, 2013). Essas moléculas são sequências de RNA de aproximadamente 22 nucleotídeos de comprimento que ao invés de codificarem peptídeos atuam na regulação pós-transcricional, ou seja, atuam na degradação de RNAs mensageiros (mRNA) ou inibição de sua transcrição diminuindo assim a expressão das proteínas codificadas por eles (BARTEL, 2009). Durante a inibição por degradação, o miRNA guia um complexo de proteínas, denominado RISC (do inglês - RNA induced silencing complex), até o mRNA alvo para que este seja degradado. A inibição também pode ser feita através da desestabilização do mRNA, com remoção da cauda poli-A; através do impedimento físico da ligação ao ribossomo e do mascaramento da região de iniciação ou inibição do alongamento (FILIPOWICZ; BHATTACHARYYA; SONENBERG, 2008).

Nos pulmões esses microRNAs são expressos tanto por células estruturais e residentes, como também por células infiltradas devido a um processo inflamatório. São responsáveis pela regulação de vias moleculares envolvidas tanto na imunidade inata como na adaptativa, nas vias aéreas (FOSTER et al., 2013). Esses miRNAs atuam na homeostase pulmonar, controlando a transcrição de genes codificadores de fatores de transcrição e proteínas relacionadas com o desenvolvimento da resposta inflamatória alérgica (COLLISON *et al.*, 2011; O'CONNELL *et al.*, 2010). Por isso, essas moléculas são de grande importância para o estudo de desequilíbrios do sistema imune, e possuem grande potencial para diagnóstico, tendo em vista que diversos trabalhos já demonstraram sua expressão diferencial em diversas doenças (WANG; CHEN; SEN, 2016). A fácil detecção de miRNAs em fluidos corporais e em amostras de tecido, demonstrando expressão diferencial em indivíduos asmáticos, desperta o interesse nessas moléculas tanto para o diagnóstico, como para terapia dessa doença, principalmente nos casos de asma grave e resistente ao tratamento (TAY et al., 2014).

O controle das exacerbações da asma é de extrema importância para prevenir o dano tecidual e remodelamento das vias aéreas, nesse contexto, já foi

demonstrado que o uso de técnicas de diagnóstico clínico padrão associado à dosagem sérica de miRNAs envolvidos com a via do NF- $\kappa$ B e da AKT (miR-146b, miR-206 e miR-720), permite prever a ocorrência de exacerbações, melhorando o manejo da doença (KHO et al., 2018). Além disso a expressão de miRNAs pode ser utilizada na separação dos diversos fenótipos da asma, bem como na determinação da gravidade da doença (RODRIGO-MUÑOZ et al., 2018). Já foi demonstrado que miR-223-3p, miR-142-3p e miR-629-3p são mais expressos em pacientes com asma grave, e estão associados ao maior recrutamento de neutrófilos (MAES et al., 2016). Neste grupo de pacientes também há menor expressão de TLR7, que é associada à maior expressão dos miRNAs que tem esse receptor como alvo: mir-150, mir-152 e mir-375 (RUPANI et al., 2016). Pacientes com asma grave também apresentam maior expressão de mir-221 e mir-222 frente a estímulo com Fator de Crescimento Tumoral (TGF- $\beta$ ), induzindo proliferação de músculo liso, resultando em maior hiperresponsividade brônquica (PERRY et al., 2014). Mir-19 apresenta uma função semelhante em células do epitélio brônquico, sendo altamente expresso na asma grave em comparação com os controles asmáticos (HAJ-SALEM et al., 2015).

Em modelo de alergia pulmonar resistente a corticosteróides induzida por OVA, foi verificado que o microRNA-21 (*mir21*) é altamente expresso e o uso de *antagomirs*, para inibir sua ação, torna os camundongos sensíveis ao tratamento (NOTI et al., 2013), além de resultar em redução da produção de citocinas de perfil Th2 e diminuição da eosinofilia (LEE et al., 2017). Também já foi demonstrado em modelo animal que mir-9 atua na resistência a glicocorticoides, degradando PP2A – *protein phosphatase 2A* (LI et al., 2015), um importante inibidor da síntese de diversas citocinas de perfil T<sub>H</sub>2, como IL-25, IL-33, CCL20, IL-5 e IL-13 (COLLISON, et al., 2013). MicroRNAs também podem inibir o estabelecimento da alergia, sabe-se que a aplicação *let-7* nas vias aéreas de camundongos reduz IL-13 e, melhora o quadro alérgico, com menor produção de muco e infiltrado inflamatório (HAJ-SALEM et al., 2015).

Os estudos apresentados, demonstram uma grande diversidade de miRNAs que compõem uma assinatura específica na asma e das respostas envolvidas no seu estabelecimento. Portanto o conhecimento da expressão de miRNAs em modelos experimentais pode indicar possíveis alvos terapêuticos, bem como

contribuir para o entendimento dos efeitos de possíveis terapias utilizadas nesses modelos.

Em adição ao miRNAs já citados cabe destacar a expressão de mir-155, um dos miRNAs altamente expressos durante o desenvolvimento da asma alérgica (MALMHÄLL et al., 2014, 2017; PLANK et al., 2015). Além disso, sabe-se que esses miRNAs são importantes na proliferação e diferenciação de ILC2 frente ao estímulo com IL-33, além disso impedem que essas células entrem em apoptose, sustentando as respostas de perfil T<sub>H</sub>2 (KNOLLE et al., 2018). Sua expressão elevada também está associada à redução da expressão da molécula inibitória CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4), resultando na maior sobrevivência e proliferação dos linfócitos (ZHANG *et al.*, 2017).

Por outro lado, o mir-223 já foi associado ao desenvolvimento de resposta neutrofílicas (MAES et al., 2016). Contudo, esse microRNA é altamente expresso em eosinófilos em diferenciação, e apesar de seu silenciamento estar ligado ao aumento na proliferação dos progenitores de eosinófilos, essas células tem sua diferenciação retardada (LU et al., 2013). Somado a isso este também é um dos miRNAs mais expressos na esofagite eosinofílica (LU et al., 2012), doença alérgica comumente associada a asma (DURRANI; MUKKADA; GUILBERT, 2016).

## 1.5 Tratamento e resistência

Na busca por um manejo eficiente da asma, primeiramente é necessário fazer um diagnóstico preciso que se baseia na presença dos sintomas característicos da asma, confirmação de obstrução das vias aéreas (avaliada por VEF<sub>1</sub>) reversível com uso salbutamol ou com terapia com anti-inflamatórios por quatro semanas. A verificação do fenótipo alérgico da doença é feito através do relato de histórico de doenças alérgicas no paciente e na família, positividade no teste de hipersensibilidade cutânea e na dosagem de dosagem de IgE específica (HORAK et al., 2016). Por mais que não faça parte do procedimento padrão, no diagnóstico de asma, a dosagem de óxido nítrico exalado (FeNO) pode fornecer boas informações sobre o *status* da doença, sua gravidade e diagnóstico em casos onde não há clareza nos demais parâmetros (MAJID; KAO, 2010). Além disso, um estudo já demonstrou que o manejo da asma baseado no FeNO, durante a gravidez, contribui para a redução da incidência da doença nos filhos, ressaltando a importância dessa forma de acompanhamento no prognóstico da doença (MORTEN et al., 2016).

Mesmo não apresentando cura, o manejo da asma tem como reverter a obstrução do fluxo aéreo, bem como reduzir o processo inflamatório, evitando o remodelamento e perda da função pulmonar. Nesse contexto,  $\beta$ -agonistas são bronco dilatadores comumente utilizados, que agem em receptores beta adrenérgicos desencadeando um mecanismo que culmina com o sequestro intracelular de íons cálcio e consequente relaxamento da musculatura lisa (CAZZOLA et al., 2013). Além de seu papel no alívio imediato dos sintomas, esse tipo de medicamento também já demonstrou eficácia na redução da transição epitélio-mesenquimal induzida por eosinófilos, reduzindo a expressão de marcadores característicos de remodelamento *in vitro* (KAINUMA et al., 2017).

Para controles a longo prazo,  $\beta$ -agonistas são comumente utilizados em associação com corticoides inalados. Esse grupo de medicamentos pode ser tanto inalado, como utilizado oralmente, e representam o principal grupo de medicamentos para controle da asma. Tais medicamentos possuem múltiplas funções, atuam tanto induzindo a apoptose de células inflamatórias, principalmente eosinófilos, bem como na inibição da expressão e produção de diversas quimiocinas responsáveis por mais células inflamatórias como CCL11 e CCL5 (BARNES, 2010). Além disso, o uso de

corticosteroides ajuda na manutenção da expressão de receptores  $\beta_2$  adrenérgicos; bem como o uso de  $\beta$ -agonistas contribui para a maior expressão de receptores de glucocorticóides, portanto a utilização conjunta desses garante uma maior eficiência do tratamento, em comparação com o aumento da dosagem de ambas as monoterapias (TAYLOR; HANCOX, 2000). Contudo, o funcionamento dessa classe de medicamento pode ser afetado pelo desenvolvimento da obesidade, pois o conjunto de células que se acumulam no pulmão de obesos alérgicos, incluindo em sua neutrófilos e  $T_{H17}$ , é em sua maioria não-responsiva a corticosteroides (UMETSU, 2017).

Pacientes que apresentam pouca melhora com o uso desses medicamentos inalados, geralmente são submetidos a tratamentos com altas dosagens de corticosteroides ingeridos, e que apresentam fortes efeitos colaterais. Nesse contexto iniciou-se o uso de anticorpos monoclonais no tratamento da asma. O primeiro a ser utilizado foi omalizumab, anticorpo monoclonal anti-IgE, o qual demonstra eficiência em pacientes que não demonstram melhora durante o tratamento com corticoesteróides (HENDELES et al., 2015).

Posteriormente foram desenvolvidos tratamentos com anticorpos específicos para citocinas ou para seus receptores a fim de fazer o bloqueio seletivo de vias envolvidas no tratamento da asma. Para isso, podem ser usados como exemplo o Mepolizumab e Reslizumab, anti-IL-5; ou Benralizumab, anti-IL-5R; anticorpos que atuam impedindo a maturação e proliferação de eosinófilos (PATTERSON; BORISH; KENNEDY, 2015). Além desses anticorpos outros mais foram criados, bloqueando diversas outras vias principalmente dentro da asma alérgica clássica, como IL-4 e IL9. Entretanto por mais que já existam anticorpos anti-IL17A, que poderiam ter um bom efeito na resposta neutrofílica na asma, estudos com esses anticorpos ainda são incipientes (MITCHELL.; EL-GAMMAL; O'BYRNE, 2016). Em conjunto o uso de anticorpos monoclonais representa uma nova fonte de tratamentos pra asma, e mesmo que muito se questione sobre a segurança de seu uso, os estudos mais recentes tem demonstrado baixa incidência de efeitos colaterais e melhoras consideráveis (PASSALACQUA et al., 2016).

Outra abordagem possível é a imunoterapia direcionada por antígenos, na qual estes são utilizados em concentrações crescentes a fim de induzir dessensibilização. Esse processo se dá pela indução de células dendríticas de perfil regulatório bem como a indução de perfis regulatórios em linfócitos T e B, além de já



ter sido demonstrado um desvio para resposta de perfil  $T_H1$ , diminuindo a intensidade de respostas  $T_H2$  (SHAMJI; DURHAM, 2017). A carência de trabalhos e falta de padronização dos estudos realizados com esse tipo de terapia faz com que esse tipo de abordagem ainda seja controverso (DHAMI et al., 2017). Entretanto, tanto a aplicação subcutânea, como a sublingual tem demonstrado redução dos sintomas e diminuição na necessidade de utilização de medicamentos (CANONICA et al., 2016)

Apesar do recente avanço nas terapias para a asma, principalmente através do uso de anticorpos monoclonais, essa não se adequa a realidade de muitos pacientes, tendo em vista o alto custo (OBA; SALZMAN, 2004). Somado a isso, a ocorrência de resistência ao tratamento padrão com corticoides é um problema a ser superado tanto em pacientes com respostas eosinofílica/ $T_H2$ , mas principalmente naqueles que desenvolvem respostas de perfil neutrofílico (FAHY, 2015). Nesse contexto, há grande diversidade de respostas dentro do grupo composto por indivíduos ditos não- $T_H2$ , e diversos fatores podem levar ao desenvolvimento deste fenótipo. Em alguns casos, o afastamento do paciente de poluentes e fumaça de cigarro, ou então a resolução de infecções que induzem respostas do tipo  $T_H1$  e  $T_H17$ , parece tornar os indivíduos mais suscetíveis aos tratamento convencionais. Nos casos em que isso não é possível busca-se diminuir as respostas não- $T_H2$  envolvidas, principalmente a neutrofilia, através do usos de vitamina D3, estatinas e macrolídeos, como a Azitromicina (SAMITAS; ZERVAS; GAGA, 2017).

Antibióticos macrolídeos como Eritromicina, Claritromicina e Azitromicina, possuem atividades que vão além da inibição ou morte de bactérias. Sabe-se que essa classe de antibióticos funciona como um antagonista da elastase neutrofílica, substância liberada pelos neutrófilos e que atua no epitélio estimulando a produção de muco. Esses medicamentos atuam diminuindo a produção de IL-8 e aumentando a fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos, contribuindo para a redução da neutrofilia. Essas propriedades fazem dessa classe de antibióticos bons candidatos para o combate da asma grave, que muitas vezes envolve neutrofilia e pode estar associada a um quadro de infecção (BRUSSELLE; JOOS, 2014). Contudo, ainda há certa carência de informações sobre o funcionamento desses medicamentos no combate da asma resistente ao tratamento com corticosteróides. Portanto, estudos recentes buscam avaliar a relevância da utilização dos macrolídeos, bem como caracterizar seus mecanismos de ação (GIBSON *et al.*,

2017; JOHNSTON *et al.*, 2016; KEW *et al.*, 2015a), porém os resultados de tais estudos ainda são conflitantes.

Em estudo realizado no Reino Unido onde foi investigada a eficiência da azitromicina em comparação com placebo em pacientes com episódios de asma aguda, concluiu-se que o uso do medicamento não resultou em nenhum benefício (JOHNSTON *et al.*, 2016), contudo o fenótipo de asma dos pacientes não foi utilizado como critério de seleção e houve grande número de pacientes eliminados da pesquisa por estarem utilizando antibióticos, ou seja, prováveis alvos da terapia com macrolídeos. Resultados semelhantes foram encontrados em estudo realizado através de revisão de material já publicado e extração de informações em bancos de dados, no qual não foi observado nenhuma melhora clínica frente ao uso de macrolídeos, porém, houve redução de níveis séricos de proteína catiônica eosinofílica (ECP – do inglês *Eosinophil Cationic Protein*), bem como a redução da contagem de eosinófilos, porém esses valores não refletiram nenhuma melhora clínica (KEW *et al.*, 2015). Além disso, esse estudo apresenta pontos que indicam a possibilidade de não haver um bom aproveitamento do tratamento, por não haver uniformidade na coleta de dados, e não serem padronizados os critérios para determinação de asma não-eosinofílica.

Em contraposição aos estudos apresentados, em um trabalho realizado na Austrália, no qual o critério de seleção era de pacientes com asma persistente e descontrolada, observou-se que o tratamento com azitromicina reduziu o número de infecções, diminuiu o número de internações devido a exacerbações e ainda aumentou o número de pessoas sem exacerbações durante o período avaliado (GIBSON *et al.*, 2017). Somado a isso, a metanálise de dados obtidos em diversos estudos revela que há um melhor aproveitamento do tratamento, com esse medicamento, em indivíduos com asma não-eosinofílica, ou com reduzida eosinofilia (TIAN *et al.*, 2019).

O uso de macrolídeos em modelos animais de asma alérgica demonstram prováveis mecanismos de ação. Em modelo de asma alérgica induzida com ovalbumina em camundongos BALB/c, a Claritromicina diminuiu tanto a hiperresponsividade brônquica, como o infiltrado inflamatório no pulmão (HRVACIC *et al.*, 2009). Resultados semelhantes foram encontrados com Roxitromicina, no qual demonstrou-se que o medicamento impediu a translocação do fator de transcrição NF-kB para o núcleo, diminuindo assim a expressão de diversas citocinas e

quimiocinas, resultando em melhoras na produção de muco, no infiltrado inflamatório e na hiperresponsividade brônquica (CI et al., 2012). Em modelo de asma crônica a azitromicina apresentou efeito semelhante inibindo tanto citocinas pró-eosinofílicas como também diminuindo a expressão de elastase neutrofílica, e assim afetando diretamente a produção de muco e reduzindo o remodelamento tecidual (KANG et al., 2016).

Estudos têm demonstrando que efeitos benéficos podem ser obtidos a partir do uso de azitromicina na asma, com redução de remodelamento, redução da produção de muco e conservação da integridade do epitélio (BEIGELMAN et al., 2009; LIU et al., 2017). Entretanto, faz-se necessária a avaliação do uso desse medicamento em situações onde perfil neutrofílico de asma é exacerbado, com ou sem a ocorrência concomitante da eosinofilia, principalmente na concomitância de asma e obesidade, tendo em vista que a interação entre essas doenças não é completamente compreendida e têm contribuído grandemente para o aumento da ocorrência de formas mais graves e difíceis de tratar da asma.

## 1.6 Justificativa

Sabe-se que a obesidade é capaz de alterar as resposta alérgicas de diversas formas (BAFFI; WINNICA; HOLGUIN, 2015a; CARPAIJ; VAN DEN BERGE, 2018; SCOTT et al., 2011b; XU et al., 2016). Nesse sentido, um estudo prévio realizado no Centro de Tecnologia Celular e Imunologia Aplicada da UFJF (IMUNOCET) (SILVA et al., 2017b) caracterizou um perfil de obesidade e asma que simula aquele encontrado em indivíduos obesos, os quais apresentam um desenvolvimento tardio de asma (HOLGUIN et al., 2011). Contudo, pouco se sabe sobre a atuação dos órgãos linfoides periféricos no desenvolvimento desse modelo, principalmente no que se refere às modificações ocorridas na resposta humoral e na formação dos centros germinativos nesses órgãos. Nesse contexto, o recente surgimento de novas técnicas de *delivery* de drogas e até mesmo de terapias gênicas abre um leque de possibilidades a partir do momento em que se conhecem as modificações características de cada órgão.

A obesidade é um fator de risco para a asma, e uma das principais preocupações em relação a esse grupo (obeso-asmático) é o desenvolvimento de resistência aos tratamentos convencionais com corticosteroides, muitas vezes relacionado ao desenvolvimento de um perfil neutrofílico de inflamação pulmonar (TELENGA et al., 2012a). Diante disso, sabe-se que antibióticos macrolídeos tem grande potencial no controle de repostas neutrofílicas (PIACENTINI et al., 2007; SIMPSON et al., 2014b), e a utilização dessa classe de medicamentos, principalmente da azitromicina é uma potencial forma de tratar esse subgrupo de pacientes (obesos asmáticos) que apresentam esse tipo peculiar de resposta alérgica (neutrofílica) na asma. Contudo, a utilização clínica dessas drogas ainda apresenta certa controvérsia quanto a real melhora desses pacientes (GIBSON et al., 2017; JOHNSTON et al., 2016; KEW et al., 2015), portanto estudos experimentais que ajudem a esclarecer o funcionamento desses medicamentos em obesos-alérgicos são de extrema importância, principalmente tendo em vista que representam uma forma acessível de reverter fenótipos graves.

O melhor entendimento dessas formas mais graves de asma tem grande importância na busca por novas abordagens de tratamento mais eficientes. Dessa forma, faz-se necessário investigar os mecanismos moleculares envolvidos no agravamento da asma pela obesidade, mas também desvendar os mecanismos

envolvidos no tratamento com azitromicina. Nesse contexto, sabe-se do importante papel dos miRNAs na regulação de processos inflamatórios e no funcionamento do sistema imune, sobretudo durante o desenvolvimento da asma (DANIEL et al., 2018; KOHLHAAS et al., 2009; QAYUM et al., 2016; ZHANG et al., 2017b; ZHOU et al., 2015), o que ressalta a importância do conhecimento a cerca de sua expressão para o melhor entendimento da asma em obesos, e frente a medicamentos como a azitromicina.

## 2 Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da obesidade sobre a resposta imune nos pulmões e nos órgãos linfoides periféricos em modelo experimental de asma, bem como as alterações nessas respostas frente ao tratamento com azitromicina

### 2.1 Objetivos específicos

#### 2.1.1 Avaliar o efeito da obesidade sobre a resposta imune em órgãos linfoides periféricos (linfonodos mediastinais e baço) em modelo murino de obesidade induzida por dieta e alergia pulmonar induzida por OVA

- Verificar a indução de obesidade induzida por dieta em camundongos BALB/c;
- Avaliar as alterações sistêmicas nas populações de células inflamatórias durante a concomitância da Alergia Pulmonar e da Obesidade,
- Avaliar as alterações histopatológicas pulmonares implicadas na alergia pulmonar em obesos;
- Avaliar a atividade enzimática de granulócitos;
- Avaliar o perfil de citocinas no tecido pulmonar;
- Avaliar a produção de anticorpos específicos para o alérgeno;
- Avaliar o fenótipo de células T auxiliares ( $T_H$ )
- Avaliar o fenótipo das células que compõe os centros germinativos através da caracterização de linfócitos T foliculares, linfócitos B e Células Dendríticas presentes nos linfonodos mediastinais e no baço;
- Avaliar as modificações ocasionadas pela obesidade, durante a sensibilização, principalmente referente às populações de células que povoam os órgãos linfoides periféricos;

**2.1.2 Avaliar os efeitos, locais e a nível de órgãos linfoides periféricos, do tratamento com azitromicina em modelo murino de obesidade induzida por dieta e alergia pulmonar induzida por OVA**

- Avaliar o efeito do tratamento sobre o ganho de peso dos animais
- Avaliar o efeito do tratamento sobre as alterações histopatológicas no pulmão
- Avaliar as alterações promovidas pelo tratamento na produção de citocinas no tecido pulmonar
- Avaliar o efeito do tratamento sobre as populações de linfócitos T auxiliares no pulmão e nos órgãos linfoides periféricos
- Avaliar o efeito do tratamento sobre os principais componentes dos centros germinativos nos órgãos linfoides periféricos (linfócitos T foliculares e Linfócitos B)

**2.1.3 Avaliar o efeito do tratamento com azitromicina na resposta imune e na expressão de miRNAs relacionados ao desenvolvimento da asma, em modelo murino de obesidade induzida por dieta e alergia pulmonar induzida por açúcar da poeira doméstica (HDM)**

- Avaliar o efeito da obesidade e do tratamento com azitromicina na função pulmonar
- Avaliar o efeito histopatológico pulmonar do tratamento e da obesidade Avaliar o efeito ocasionado pela obesidade e pelo tratamento na expressão gênica de fatores relacionados às respostas eosinofílica e neutrofílica, nas vias aéreas e no pulmão
- Avaliação da expressão diferencial de microRNAs envolvidos na resposta alérgica;

### **3 Material e métodos**

#### **3.1 Animais**

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem BALB/c, de 4 a 6 semanas de idade, provenientes do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora (CBR-UFJF). Após uma semana de aclimação, 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 neste trabalho está de acordo com a Comissão de Ética na Experimentação Animal, com os critérios 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 os seguintes números 094/2012, 038/2016 e 019/2017.

Para a realização do protocolo de HDM, camundongos BALB/c (Fêmeas de 4 a 6 semanas) livres de patógenos foram obtidos da Australian BioResources Pty. Ltd.. Estes foram mantidos em gaiolas com ventilação individual com um ciclo de 12h claro-escuro, em uma sala de manutenção livre de patógenos específicos. Os animais passaram por período de aclimação com visitas diárias. Todos os procedimentos anteriores à eutanásia foram realizados em capela de fluxo laminar. Além disso, todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética e Cuidado Animal da University of Newcastle, Austrália, sob o protocolo 2016-602.

#### **3.2 Composição das dietas**

Foram utilizadas durante todo o protocolo dois tipos de dietas: a dieta padrão comercial para roedores AIN 93G da marca Nuvilab®, 10% de Kcal derivada de gordura; e a dieta hiperlipídica contendo 60% de Kcal derivada de gordura (Prag Soluções Ltda). Na tabela 1 foram discriminados os constituintes das dietas padrão e hiperlipídica



Tabela 1 – Composição das dietas padrão e hiperlipídica

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

\* Os valores representam a massa em gramas por porção de 1000g

### 3.3 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em 6 grupos experimentais, de acordo com os procedimentos adotados. Grupo controle ou magro não-alérgico (CN), alimentado com a dieta padrão. Grupo obeso não-alérgico (HFD), alimentado com dieta hiperlipídica. Grupo alérgico magro (OVA), alimentado com dieta padrão, sensibilizado e desafiado com a ovalbumina. Grupo obeso alérgico (HFD-OVA), alimentado com dieta hiperlipídica, sensibilizado e desafiado com a ovalbumina. Além disso, dois grupos adicionais de alérgicos magros e obesos alérgico tratados com azitromicina, OVA AZM e HFD-OVA AZM respectivamente. Conforme descrito na Tabela 2. Contudo, os resultados iniciais de 48h após o último desafio não contam com os grupos tratados com azitromicina.

**Tabela 2** – Grupos de animais utilizados no protocolo de asma induzida por OVA, de acordo com os procedimentos adotados.

<b>Grupos</b>	<b>Indução do modelo de obesidade</b>	<b>Indução modelo de alergia pulmonar experimental</b>	<b>Tratamento com azitromicina</b>
<b>CN</b>	-	-	-
<b>HFD</b>	+	-	-
<b>OVA</b>	-	+	-
<b>OVA AZM</b>	-	+	+
<b>HFD-OVA</b>	+	+	-
<b>HFD-OVA AZM</b>	+	+	+

Os animais do protocolo de asma induzida por HDM (*House Dust Mite* – Ácaro da poeira doméstica) foram divididos em cinco grupos experimentais, de acordo com os procedimentos adotados. Grupo controle ou magro não-alérgico (SAL), alimentado com a dieta padrão. Grupo obeso não-alérgico (OB), alimentado com dieta hiperlipídica. Grupo alérgico magro (HDM), alimentado com dieta padrão, sensibilizado e desafiado com a HDM. Grupo obeso alérgico (OB/HDM), alimentado com dieta hiperlipídica, sensibilizado e desafiado com a HDM. Além disso, um grupo adicional obesos alérgico tratados com azitromicina, OB/HDM+AZM. Conforme descrito na Tabela 3.

**Tabela 3** – Grupos de animais utilizados no protocolo de asma induzida por HDM, de acordo com os procedimentos adotados.

<b>Grupos</b>	<b>Indução do modelo de obesidade</b>	<b>Indução modelo de alergia pulmonar experimental</b>	<b>Tratamento com azitromicina</b>
<b>CN</b>	-	-	-
<b>OB</b>	+	-	-
<b>HDM</b>	-	+	-
<b>OB/HDM</b>	+	+	-
<b>OB/HDM+AZM</b>	+	+	+

### 3.4 Indução do modelo de obesidade

Para indução do modelo de obesidade no modelo de OVA, todos os animais receberam dieta padrão durante um período de aclimação de uma semana, após sua chegada no biotério do Centro de Tecnologia Celular e Imunologia Aplicada – IMUNOCET. A partir da 6<sup>a</sup> semana de idade, os animais dos grupos obesos (HFD e HFD-OVA) foram alimentados com dieta hiperlipídica, contendo 60% de calorias derivadas de gordura por 14 semanas, até a 20<sup>a</sup> semana de idade. Enquanto os animais pertencentes aos grupos magros, ou controles de dieta, (CN e OVA) foram alimentados com a dieta padrão, contendo 10% de calorias derivadas de gordura durante todo o protocolo.

Para a indução da obesidade no modelo de HDM, os animais passaram por uma semana de aclimação, quando foram diariamente manejados, após esse período foram submetidos ao protocolo de obesidade. Camundongos dos grupos obesos foram alimentados exclusivamente com uma dieta com 60% de calorias provenientes de gordura (SF13-092; Specialty Feeds, Glen Forrest, WA, Australia). Os grupos não-obesos receberam a ração padrão com 12% de calorias provenientes de gordura (Specialty Feeds, Glen Forrest, WA, Australia).

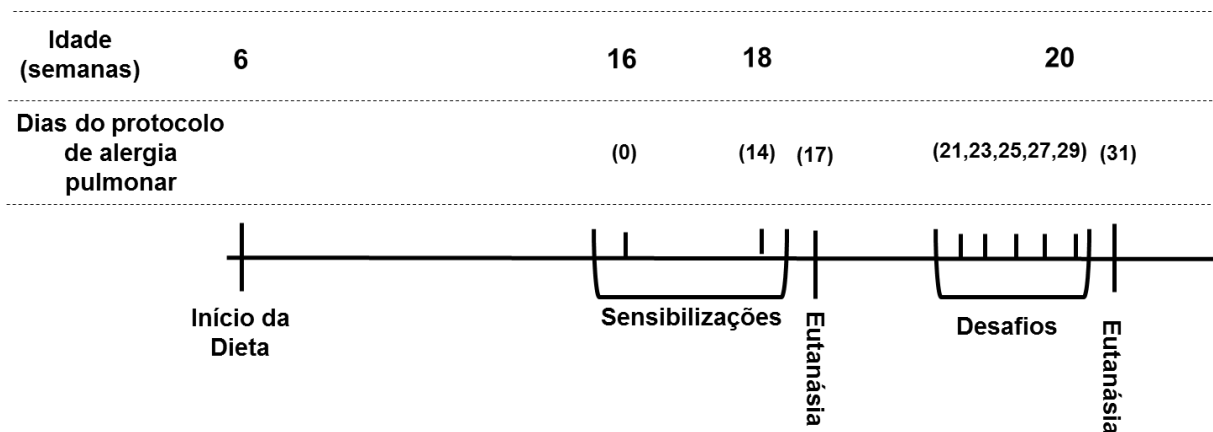
### 3.5 Avaliação do consumo da ração e da massa corporal

Para análise do consumo da dieta, a ingestão alimentar foi monitorada durante todo o protocolo, duas vezes por semana, onde o consumo da ração foi mensurado em balança semi-analítica (Micronal B6000®, Brasil). Para avaliação da curva do consumo da dieta, foi avaliada a média do consumo diário por semana, da 6ª a 20ª semana de idade (1ª a 14ª semana de dieta). O peso de cada animal foi avaliado semanalmente no mesmo dia e horário, durante todo o protocolo de obesidade. Além disso foi avaliado o peso da gordura perigonadal e o índice de massa corporal. Este último foi obtido levando em consideração a altura (comprimento do animal da ponta do nariz até a base da cauda) e o peso do animal segundo a seguinte fórmula:

$$IMC = \frac{Peso}{distancia\ naso - anal^2}$$

### 3.6 Indução do modelo de alergia pulmonar experimental e tratamento com azitromicina

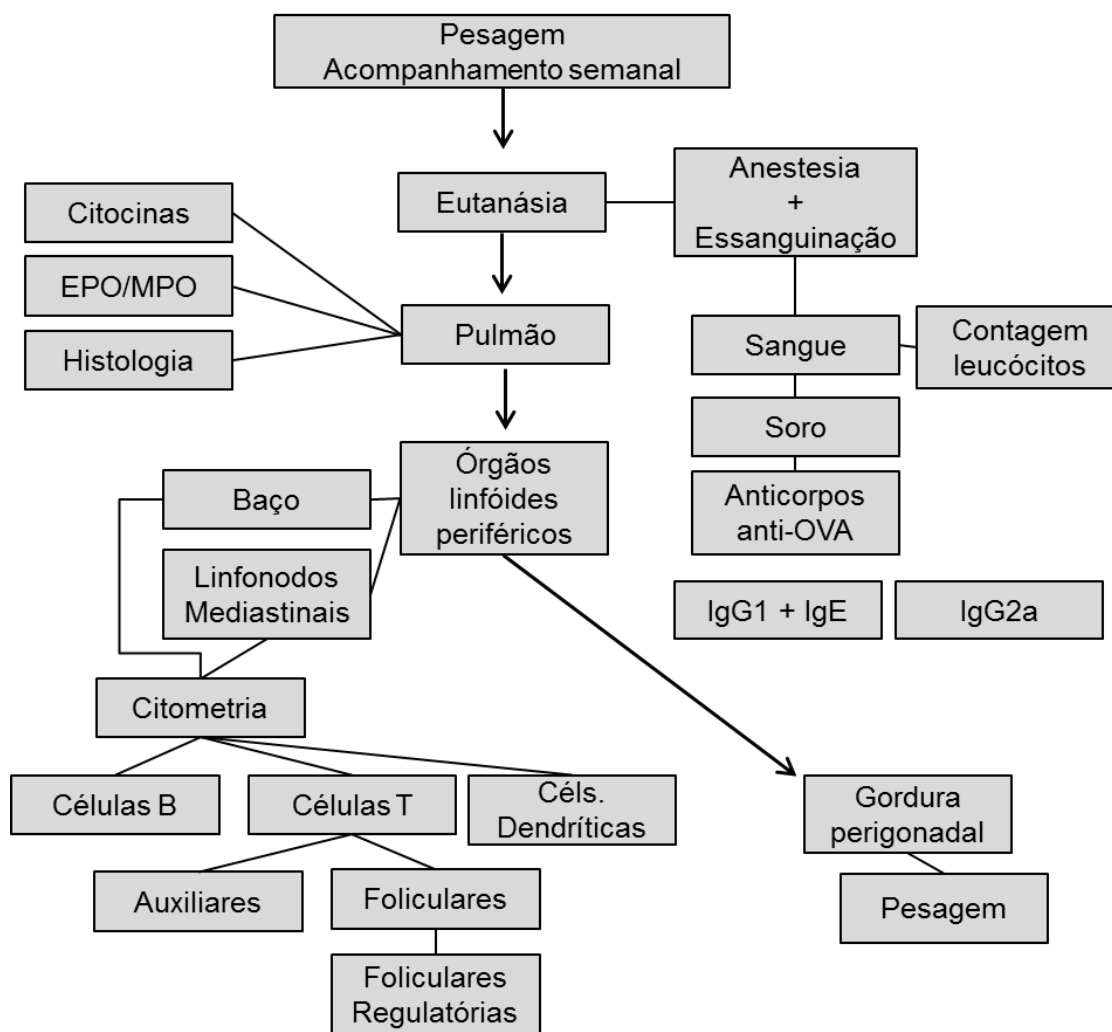
A indução da alergia pulmonar por OVA nos animais foi realizada através de duas sensibilizações, sendo a primeira, na 10ª semana de dieta e a segunda na 12ª semana de dieta, o que correspondeu aos dias 0 e 14 do protocolo de indução da alergia pulmonar. Os animais foram imunizados com injeção intraperitoneal contendo 3 µg de OVA (Grade V, Sigma-Aldrich Corp, EUA) e 1 mg de adjuvante hidróxido de alumínio (Sigma-Aldrich Corp, EUA). Na 13ª 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. A eutanásia e coleta de amostras foi realizada 72h após a última sensibilização e às 48h após o último desafio, como demonstrado na figura 4.



**Figura 4** - Delineamento experimental do protocolo de indução de obesidade e alergia pulmonar experimental induzida por OVA. Animais magros (CN, OVA) receberam dieta padrão com 10% de calorias provenientes de gordura, ao passo que animais submetidos ao protocolo de obesidade (HFD, HFD-OVA) receberam dieta hiperlipídica com 60% de calorias proveniente de gordura. As sensibilizações foram realizadas através de injeção intraperitoneal com 3 $\mu$ g de OVA em hidróxido de alumínio, nos grupos OVA e HFD-OVA. Desafios com 1% de OVA em tampão fosfato salino (PBS), através de nebulização foram realizados nos mesmos grupos. A eutanásia ocorreu 72h após a segunda sensibilização e 48h após o último desafio com OVA.

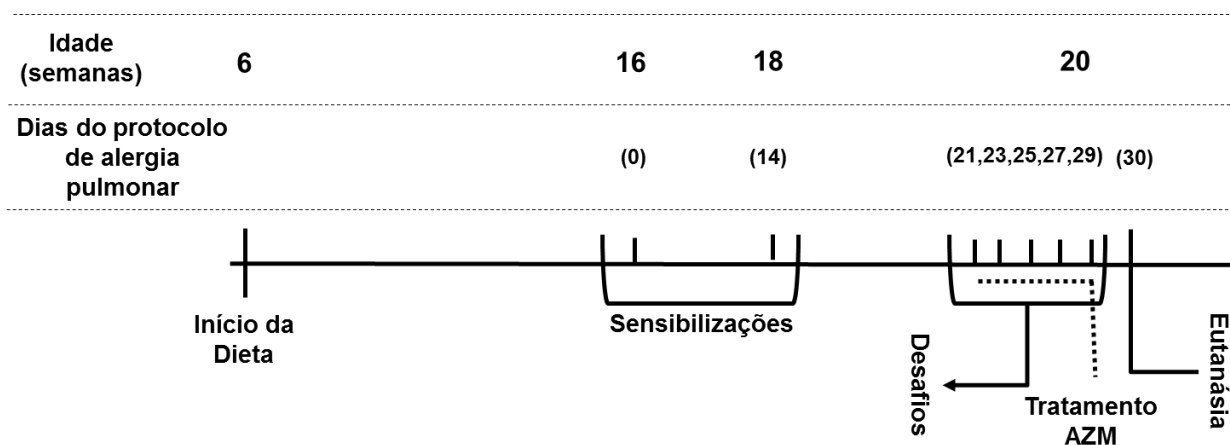
Para validação do modelo de obesidade e asma, para o tempo de dieta de 14 semanas, o que difere do trabalho publicado posteriormente com o mesmo modelo (SILVA *et al.*, 2017), foi realizada a coleta de amostras conforme indicado na figura 5. Após a eutanásia foram coletado o sangue com heparina para contagem total de leucócitos, bem como a contagem diferencial dos mesmos. Também foi coletado sangue sem heparina, para coagulação e obtenção de soro para a dosagem de anticorpos séricos IgG1, IgE e IgG2a específicos para OVA. O lobo pulmonar esquerdo foi coletado para avaliação histológica, com contagem de eosinófilos na coloração de Sirius Red. Os lobos foram utilizados para obtenção de macerado onde foi avaliada a presença de diversas citocinas e das peroxidases características de eosinófilos e neutrófilos (EPO e MPO respectivamente). Além disso, foram coletados os órgãos linfoides periféricos, baço e linfonodos mediasitinais, para avaliação da resposta imune e montagem de resposta nos centros germinativos através de imunofenotipagem por citometria de fluxo, com avaliação das populações de células dendríticas (DCs); linfócitos T auxiliares de dos perfis T<sub>H1</sub>, T<sub>H2</sub> e T<sub>H17</sub>; linfócitos T foliculares e foliculares regulatórios (T<sub>FH</sub> e T<sub>FR</sub>); e linfócitos B. A gordura perigonadal dos animais foi coletada e pesada em balança analítica como mais uma forma de indicar o desenvolvimento de obesidade.

**Delineamento Experimental**  
**Obesidade e alergia pulmonar induzida por OVA**  
**Resposta em órgãos linfóides periféricos**  
**(Objetivo 1)**



**Figura 5 - Delineamento Experimental - Obesidade e alergia pulmonar induzida por OVA e resposta em órgãos linfóides periféricos (Objetivo 1).** Procedimentos realizados com fêmeas da linhagem Balb/c, após indução de obesidade com dieta hiperlipídica e desenvolvimento de alergia pulmonar experimental utilizando OVA. Antes do dia da eutanásia os animais foram pesados semanalmente; às 24h e 48h após o último desafio foi realizado procedimento de anestesia com cetamina e xilasina, seguido de exsanguinação e rompimento do diafragma. Foi realizada a contagem diferencial de leucócitos no sangue, em lâmina de esfregaço sanguíneo. O soro foi separado do sangue total para realização de ELISA indireto para quantificação de anticorpos específicos para OVA, IgG1 e IgE, característicos de resposta  $T_H2$  e IgG2a característica de respostas  $T_H1/T_H17$ . Foram coletados lobos pulmonares para realização de homogenato e dosagem de proteínas no tecido por ELISA; lobos para avaliação histológica (contagem de eosinófilos com Sirius Red). Os órgãos linfóides periféricos (baço e linfonodos mediastinais) foram removidos para imunofenotipagem, ctm marcação para células B, células T auxiliares, células T foliculares e células dendríticas. Também foi retirada a medula óssea do fêmur para contagem diferencial. Além disso foi feita a pesagem da gordura perigonadal como medida adicional de desenvolvimento de obesidade.

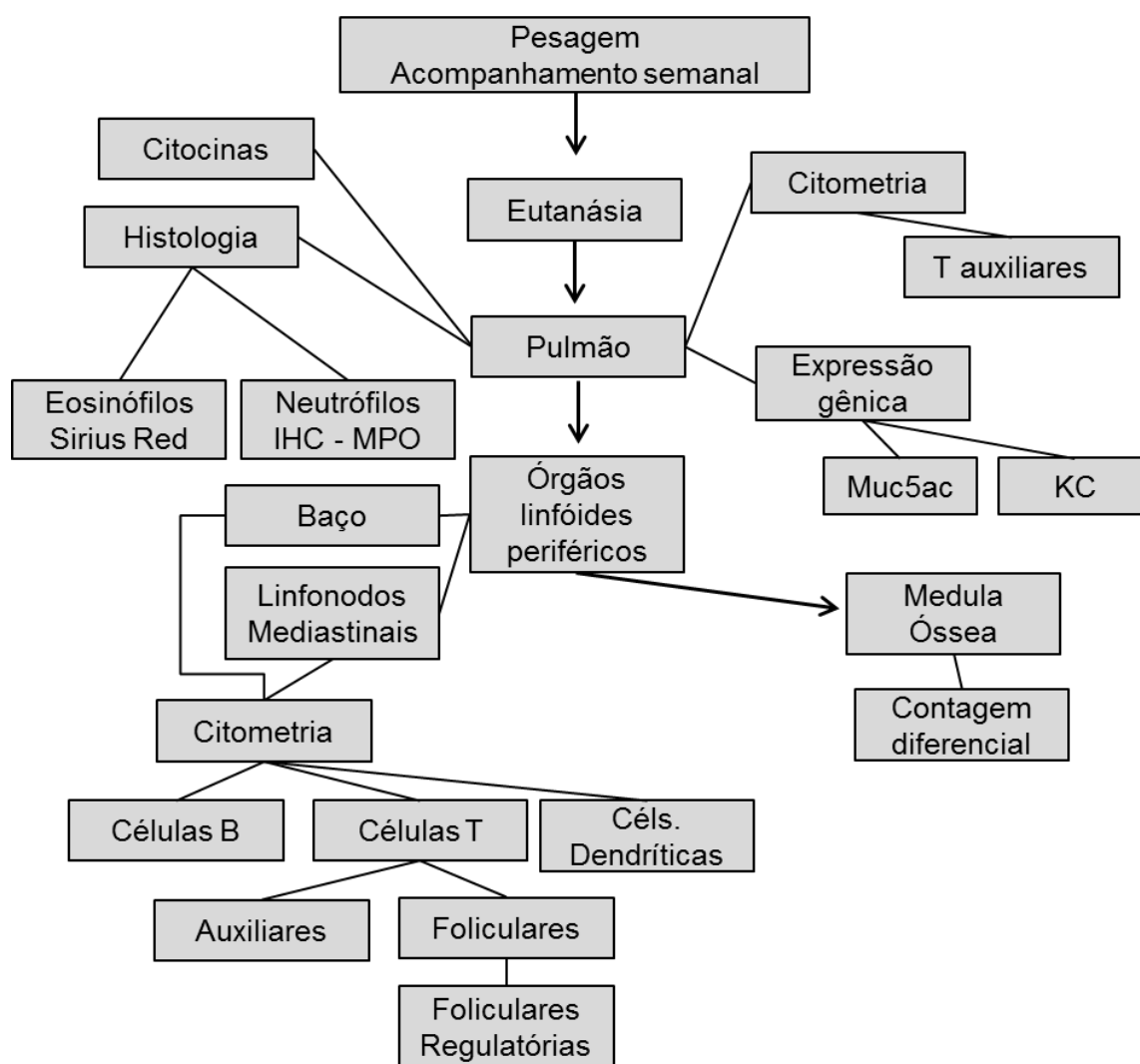
Para a avaliação dos efeitos da azitromicina no modelo de OVA os animais dos grupos OVA AZM e HFD-OVA AZM, receberam tratamento diário de 50 mg/kg por gavagem em volume máximo de 200  $\mu$ L/dia a partir do primeiro dia após o primeiro desafio. Os animais foram eutanasiados 24 horas após o último desafio com a OVA. A figura 6 mostra o delineamento experimental da indução do modelo de alergia pulmonar experimental associada a obesidade e tratamento com azitromicina.



**Figura 6 - Delineamento experimental do protocolo de indução de obesidade e alergia pulmonar experimental induzida por OVA e tratamento com azitromicina.** Animais magros (CN, OVA, OVA AZM) receberam dieta padrão com 10% de calorias provenientes de gordura, ao passo que animais submetidos ao protocolo de obesidade (HFD, HFD-OVA, HFD-OVA AZM) receberam dieta hiperlipídica com 60% de calorias proveniente de gordura. As sensibilizações foram realizadas através de injeção intraperitoneal com 3 $\mu$ g de OVA em hidróxido de alumínio, nos grupos OVA, OVA AZM, HFD-OVA e HFD-OVA AZM. Desafios com 1% de OVA em tampão fosfato salino (PBS), através de nebulização foram realizados no mesmo grupo. Para a avaliação dos efeitos da azitromicina no modelo de OVA os animais dos grupos OVA AZM e HFD-OVA AZM, receberam tratamento diário de 50 mg/kg por gavagem a partir do primeiro dia após o primeiro desafio. A eutanásia ocorreu 24h após último desafio com OVA.

.Para avaliação dos efeitos da azitromicina em modelo de OVA foram realizados os mesmos procedimentos apresentados na validação do modelo, contudo foram adicionaram alguns procedimentos como consta na figura 7. Foi realizada a coleta de lobos pulmonares para a avaliação da expressão gênica, para imunofenotipagem de linfócitos T auxiliares por citometria de fluxo e ainda, foi realizada a marcação por imunohistoquímica, com anticorpo específico para MPO, característica de neutrófilos. Também foi realizado o lavado da medula óssea femural para contagem diferencial.

## Delineamento Experimental Obesidade e alergia pulmonar induzida por OVA + Tratamento com azitromicina (Objetivo 2)

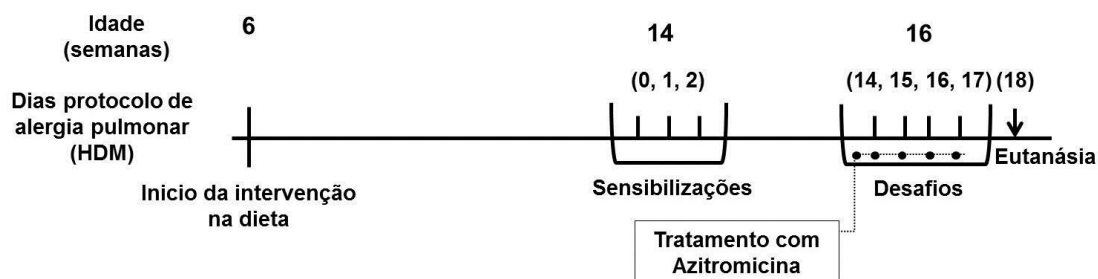


**Figura 7 - Delineamento Experimental - Obesidade e alergia pulmonar induzida por OVA e tratamento com azitromicina (Objetivo 2).** Procedimentos realizados com fêmeas da linhagem Balb/c, após indução de obesidade com dieta hiperlipídica e desenvolvimento de alergia pulmonar experimental utilizando OVA. Antes do dia da eutanásia os animais foram pesados semanalmente; às 24h após o último desafio foi realizado procedimento de anestesia com cetamina e xilaxina, seguido de exsanguinação e rompimento do diafragma. Foram coletados lobos pulmonares para realização de homogenato e dosagem de proteínas no tecido por ELISA; lobos para avaliação histológica (contagem de eosinófilos com Sirius Red e de neutrófilos com marcação de imunohistoquímica específica para MPO); lobos para a avaliação da expressão gênica; lobos para imunofenotipagem, com marcação específica para linfócitos T auxiliares  $T_H1$ ,  $T_H2$  e  $T_H17$ . Os órgãos linfóides periféricos (baço e linfonodos mediastinais) foram removidos para imunofenotipagem, com marcação para células B, células T auxiliares, células T foliculares e células dendríticas. Também foi retirada a medula óssea do fêmur para contagem diferencial.



O protocolo de indução de alergia pulmonar induzida por HDM começou na oitava semana de dieta, de modo que a eutanásia ocorresse na décima semana. Os camundongos foram sensibilizados por três exposições intranasais a 50 µg de extrato de ácaro da poeira doméstica (Greer Laboratories), nos dias 0, 1 e 2, realizados sob anestesia temporária com isoflurano em câmara oxigenada. Seguido por desafios diários com 5 µg do mesmo extrato, durante 4 dias. Do dia 14 ao dia 17 do protocolo de alergia pulmonar. Os animais controle receberam solução de salina ao invés de solução de alérgeno (Figura 5).

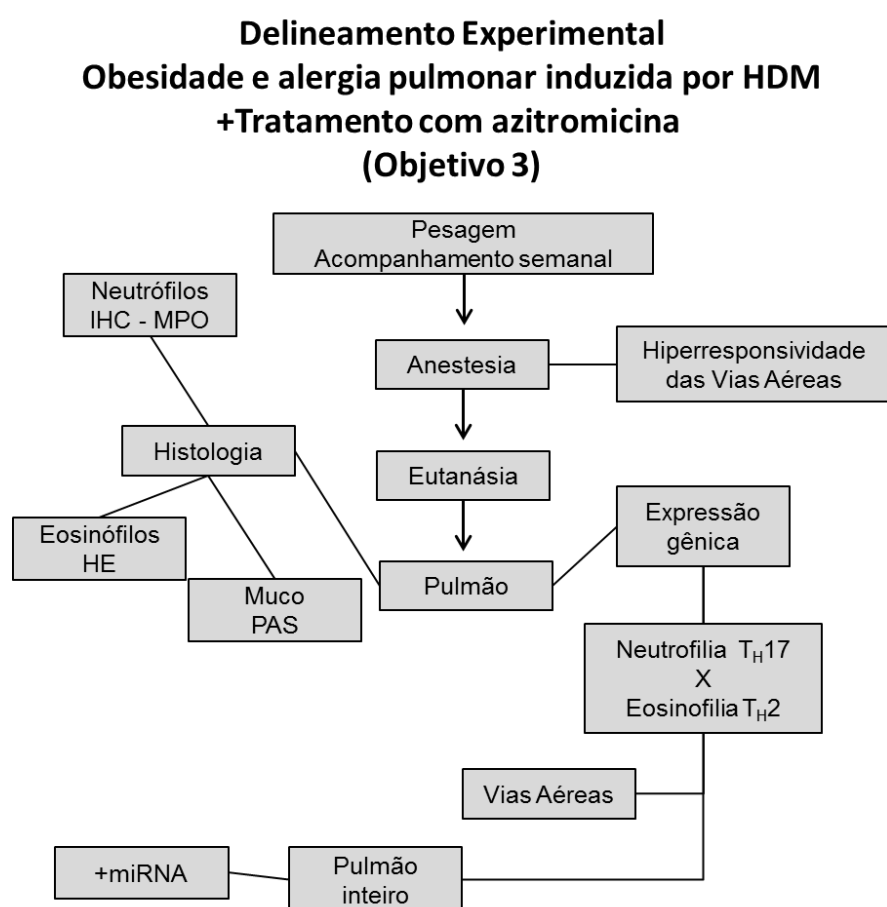
Os animais do Grupo Obeso Alérgico Azitromicina (OB/HDM AZM) receberam, 24 horas antes de cada desafio uma dose intraperitoneal de 25 mg/kg de Azitromicina diluída em salina estéril, equivalendo aos dias 13, 14, 15, 16 e 17 do protocolo de Alergia Pulmonar. Conforme detalhado na figura 8.



**Figura 8 – Delineamento experimental e grupos experimentais divididos por procedimentos. Em modelo concomitante de obesidade e alergia pulmonar induzida por HDM e tratamento com azitromicina.** Camundongos Balb/c receberam dieta padrão, com 10% de calorias proveniente de gordura (grupos CN e HDM) durante todo o protocolo, enquanto os animais dos grupos OB, OB/HDM e OB/HDM+AZM receberam dieta hiperlipídica com 60% de calorias provenientes de gordura. Na oitava semana de dieta, os camundongos foram sensibilizados com aplicação intranasal de 50 µg de extrato de ácaro da poeira doméstica (Greer Laboratories), nos dias 0, 1 e 2. Seguido por desafios diários com 5 µg do mesmo extrato, durante 4 dias, também por via intranasal. Do dia 14 ao dia 17 do protocolo de alergia pulmonar. Os animais do Grupo Obeso Alérgico Azitromicina (OB/HDM AZM) receberam, 24 horas antes de cada desafio uma dose intraperitoneal de 25 mg/kg de Azitromicina diluída em salina estéril, equivalendo aos dias 13, 14, 15, 16 e 17 do protocolo de Alergia Pulmonar

Para avaliação dos efeitos da obesidade e do tratamento da azitromicina em modelo de alergia pulmonar induzida por HDM, foi realizada a avaliação de hiperresponsividade das vias aéreas frente a provocação com metacolina, com animais anestesiados. Posteriormente foi realizada eutanásia com exsanguinação e

rompimento do diafragma. Foram coletados lobos pulmonares para realização dos procedimentos histológicos para quantificação de eosinófilos e avaliação do escore inflamatório frente a coloração de Hematoxilina e Eosina (HE); quantificação de neutrófilos através de marcação específica para MPO; quantificação de células caliciformes produtoras de muco, pela coloração de PAS. Também foram utilizados lobos inteiros ou vias aéreas isoladas por dissecação cega para a avaliação da expressão gênica. A avaliação da expressão de miRNAs foi realizada somente no pulmão inteiro (figura 9).



**Figura 9 - Delineamento Experimental - Obesidade e alergia pulmonar induzida por HDM e tratamento com azitromicina (Objetivo 3).** Procedimentos realizados com fêmeas da linhagem Balb/c, após indução de obesidade com dieta hiperlipídica e desenvolvimento de alergia pulmonar experimental utilizando HDM. Antes do dia da eutanásia os animais foram pesados semanalmente; às 24h após o último desafio foi realizado procedimento de anestesia com cetamina e xilaxina, os animais tiveram suas traqueias canuladas, e foi realizado o teste de hiperresponsividade das vias aéreas. A eutanásia foi realizada pela exsanguinação dos animais anestesiados seguida de rompimento do diafragma. O pulmão foi removido e o lobo esquerdo foi separado para realização de procedimentos histológicos, Imunohistoquímica específica para MPO (enzima característica de neutrófilos); contagem de eosinófilos em coloração de HE; Contagem de células caliciformes produtoras de muco através de coloração com PAS. Os lobos direitos foram separados para avaliação da expressão gênica tanto no lobo inteiro como em via aérea separa do parênquima através de dissecação cega. A avaliação da expressão de miRNA foi realizada somente pulmão inteiro.

### **3.7 Avaliação de hiperresponsividade brônquica**

A avaliação da hiperresponsividade brônquica foi realizado somente nos animais submetidos ao modelo de asma induzida por HDM. Os camundongos foram anestesiados e em seguida traqueomizados, canulados e restritos em uma câmara hermética. Posteriormente, receberam doses crescentes (0,625, 1,25, 2,5, 5, 10 e 20 mg/mL) de metacolina que foram vaporizadas na traqueia. Os resultados de cada concentração foram medidos como percentuais em comparação com a dose 0, ou seja, na ausência de metacolina.

### **3.8 Obtenção do material biológico**

Para o modelo de asma induzida por OVA as amostras biológicas foram obtidas após 14 semanas de dieta, às 24 ou 48 horas após o último desafio. Os animais foram eutanasiados através de dose letal de solução de cetamina (90 mg/Kg, Syntec, Brasil) e xilasina (10 mg/kg, Agener União, Brasil) por via intraperitoneal, seguida de exsanguinação por punção cardíaca e ruptura de diafragma. As amostras e soro foram armazenadas individualmente, e mantidas sob refrigeração em *biofreezer* a -80°C até serem realizadas as análises. Como os animais do modelo de HDM já se encontravam sob anestesia profunda, foram apenas exsanguinados e o diafragma foi rompido para completar a eutanásia.

### **3.9 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 2 minutos à temperatura ambiente (Centrífuga 5410, Eppendorf, Alemanha) para obtenção do soro, que foi armazenado a -80°C. Para análise de IgE anti-OVA, uma alíquota do soro foi acondicionada em ependorf para posterior detecção do anticorpo específico quantificado como

densidade ótica (DO) em leitor de microplacas de ELISA (SpectraMax 190, Molecular Devices, EUA).

### **3.10 Coleta e processamento do pulmão para dosagem de citocinas, EPO e MPO e histologia**

A caixa torácica do animal foi recortada longitudinalmente e o tecido pulmonar foi lavado através de perfusão com 10 mL de PBS gelado, em seguida o lobo esquerdo pulmonar foi coletado e acondicionado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior dosagem citocinas, EPO e MPO. O lobo direito do pulmão foi coletado e fixado durante 24h em solução de formol tamponado 10% durante 24h seguida de fixação em álcool 70% até o processamento para análise histológica. Para a obtenção do homogenato, 100 mg do lobo esquerdo do pulmão foi macerado em 1 mL de PBS contendo inibidores de proteases (0,1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil, 0,1 mM cloreto de benzetonio, 10 mM EDTA e 2  $\mu\text{L}$  de aprotinina A) e 0,05% Tween 20. As amostras foram então centrifugadas a  $440 \times g$ , por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  (CR 312, Thermo Electron Corporation, EUA). Os sobrenadantes foram armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$ , até serem utilizados para dosagem de citocinas e quimiocinas através de ELISA direto.

### **3.11 Coleta do tecido adiposo**

Para coletar o tecido adiposo localizado na região perigonadal, foi realizada uma incisão na região abdominal. Em seguida, o tecido adiposo perigonadal foi pesado e acondicionado em formol tamponado 10% para posterior análise histológica.

### **3.12 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 0,1 mg/mL de OVA (Grade V; Sigma-Aldrich Corp, St Louis, MO, USA) em tampão carbonato (100  $\mu\text{L}$ /poço), a placa foi incubada a  $4^{\circ}\text{C}$  por 18 horas e lavadas a seguir com PBS Tween 20 0,05% (PBST). Após bloqueio com 5% de leite em pó desnatado (Molico) em PBST (200  $\mu\text{L}$ /poço), a

placa foi lavada e as amostras de soro foram adicionadas, seguido de incubação por 1 hora. A seguir, a placa foi novamente lavada e o anticorpo anti-IgE, Anti-IgG1 ou Anti-IgG2A (Pharmingen™, Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) foi adicionado. A estreptavidina marcada com peroxidase (Pharmingen™, Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) foi adicionada após incubação (1 hora a temperatura ambiente) 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 O-phenylenediamine dihydrochloride (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) e os resultados plotados como densidade ótica.

### **3.13 Avaliação histológica do tecido pulmonar**

Para avaliação histológica, o lobo pulmonar esquerdo foram fixados durante 24h em solução de formol tamponado 10%. Após os procedimentos rotineiros de inclusão em parafina, foram realizados cortes semi-seriados de 4 µm de espessura.

### **3.14 Score inflamatório**

Para a determinação do escore inflamatório, as lâminas foram coradas por 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 (GOUVEIA *et al.*, 2013; GOUVEIA *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2017)

- ✓ 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.

### **3.15 Contagem de eosinófilos no tecido pulmonar**

Para a contagem de eosinófilos no tecido pulmonar, após seções rotineiras de desparafinização e desidratação, 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 mm/10) na região peribroncovascular, em aumento de 1000X, a contagem foi expressa por número de eosinófilos por 100  $\mu\text{m}^2$ .

### **3.16 Contagem de células caliciforme produtoras de muco**

A avaliação da produção de muco pelas células caliciformes foi obtida através de coloração do tecido pulmonar com Ácido periódico Shiff (PAS) (Easypath – Erviegas Ltda). Seguida de contagem com retículo Olympus (10mm/10) e expressa pela média da contagem, em 20 campos, de células PAS positivas por 100  $\mu\text{m}^2$ , no aumento de 400X.

### **3.16 Imunohistoquímica para MPO**

A imunohistoquímica foi utilizada para quantificar o número de neutrófilos no pulmão. Através de detecção da enzima mieloperoxidase no tecido pulmonar. A metodologia utilizada foi da Biotina-estreptavidina peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, Inc). Para isso, cortes histológicos de 5  $\mu\text{m}$  de espessura foram colocados em lâmina silanizadas. As lâminas foram desparafinizadas e hidratadas e na sequência, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada 10V (3%). Foi então realizada a lavagem com água e PBS. A recuperação antigênica foi obtida em alta temperatura com tampão Tris-EDTA. Após este período as lâminas foram lavadas em PBS. Finalizada a etapa do bloqueio, os cortes foram incubados a 4°C em solução de anticorpo anti-MPO à 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$  (R&D System). Após esta etapa, as lâminas foram lavadas em PBS. Após esta etapa, os cortes foram incubados por 30 min com o anticorpo secundário a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Santa Cruz

Biotechnology, Inc), em seguida foi adicionada o complexo biotina-estreptavidina por 30 min e seguiu-se a revelação pelo cromógeno 3,3 Diaminobenzidina (DAB) (Santa Cruz Biothecnology, Inc), seguido de contracoloração com hematoxilina. Foram analisados 20 campos, em uma área delimitada por retículo Olympus (10mm/10) na região peribroncovascular, em aumento de 1000X, a contagem foi expressa por número de neutrófilos MPO<sup>+</sup> / 100  $\mu\text{m}^2$ .

### **3.17 Dosagem de citocinas e CCL11/eotaxina no homogenato do tecido pulmonar**

O sobrenadante do homogenato do tecido pulmonar foi utilizado no ensaio enzimático ELISA para as citocinas IL-4, IL-5 e IL-9 (BD OptEIA, BD Biosciences, EUA), IL-13, IL-25, IL-33 e 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 indicadas 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 em temperatura ambiente. Para os kits R&D Systems eBioscience, primeiramente foi adicionado e incubado o anticorpo de captura por 2 horas em temperatura ambiente. As placas foram lavadas e posteriormente foi adicionada streptavidina, seguida de incubação por 1 hora em temperatura ambiente. As placas foram lavadas e foi adicionado substrato 3,3,5,5 Tetrametilbenzidina (TMB). 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).

### 3.18 Avaliação da atividade das enzimas peroxidase eosinofílica (EPO) e mieloperoxidase (MPO)

Para a dosagem da atividade das enzimas EPO e MPO o sedimento do homogenato pulmonar foi processado, após lise das hemácias com tampão de lise, 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 1,9 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 análise da atividade de EPO, 50 µL do sobrenadante do homogenato pulmonar foram colocados em uma placa de 96 poços, juntamente com 50 µL de substrato contendo 1,5 mM de OPD em tampão tris-HCl- 0,075 mM (pH = 8,0), acrescido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 6,6 mM. As amostras foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente (TA), no escuro. A reação foi interrompida com 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M e a leitura foi realizada a 492 nm em leitor de microplacas (SpectraMax<sup>®</sup> 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

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

### 3.19 Citometria de Fluxo

Para análise por citometria de fluxo, baço e linfonodos mediastinais, foram removidos e acondicionados em meio de cultura RPMI até o processamento. Os órgãos foram então macerados com tampão de extração (Meio RPMI suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino e 0,075% de EDTA) em *cell strainer* (70 µm). Os macerados foram centrifugados a 1500 rpm, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante



foi descartado e o precipitado ressuspendido em 1 mL de tampão FACS (PBS com 2% de Soro Fetal Bovino e 0,1% de azida sódica) e 4 mL de tampão de lise (ACK). Após os 10 minutos, as amostras foram centrifugadas e ressuspendidas em 1 mL de tampão FACS.

Uma alíquota das células foi contada em Azul de trypan e foram plaqueadas  $2 \times 10^5$  células por poço em uma placa de fundo U. O bloqueio de receptores Fc foi feito com uma solução de FcBlock na proporção de 1:150. Após centrifugação e remoção do bloqueio as células foram marcadas de acordo com o quadro 1. As marcações intracelulares foram realizadas após permeabilização e fixação com reagente Cytofix/Cytoperm (BD OpTEIA).

**Quadro 1** – Painel de fluorocromos utilizados na fenotipagem por Citometria de Fluxo.

<b>Painel</b>	<b>Marcador</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Clones</b>
Linfócitos T foliculares	CD4	PerCP	MR4-5
	CXCR5	PE	2G8
	PD1	BV421	J43
	Foxp3	AlexaFluor 488	MF23
Linfócitos B	CD19	FITC	1D3
	CD40	APC	3/23
	PDL1	PE	MIH5
	PD1	BV421	J43
Citocinas Intracelulares Linfócitos T	CD3	PercP	145-2011
	CD4	PE	L3T4
	IL17A	AlexaFluor 488	TC11-18H10
	IL4	BV421	11B11
	IFN $\gamma$	PE-Cy7	XMG1.2
Fatores de Transcrição Linfócitos T	CD3	PercP	145-2011
	CD4	PE	L3T4
	GATA3	AlexaFluor 647	L50823
	ROR $\gamma$ T	BV421	Q31878
Células Dendríticas	CD11c	BV510	HL3
	MHCII	APC	AMS321
	CD86	FITC	161001
	PDL1	PE	MIH5

### 3.20 PCR quantitativo

Os pulmões foram removidos, um dos lobos passou por dissecação cega para separação das vias aéreas. As vias aéreas e parênquima foram armazenados separadamente em TRIzol (Ambion; Carlsbad, USA). O outro lobo inteiro foi armazenado na mesma solução. O RNA foi extraído através do protocolo de TRIzol. A transcrição reversa foi realizada com o kit Bioscript (Bioline; Alexandria, Australia), e o cDNA foi utilizado na reação de cadeia da polimerase quantitativo (qPCR)

utilizando SYBR green máster mix (Invitrogen; Mulgrave, Australia). O número de cópias dos diversos transcritos foi normalizado com a expressão de HPRT1 no modelo de alergia induzida por HDM e com a expressão de  $\beta$ -actina para o modelo de asma induzida por OVA, e a expressão foi obtida utilizando-se uma curva padrão para transcritos obtidos de amostras para o experimento de HDM, e em expressão relativa ao controle para o experimento de OVA.

**Tabela 4** – Listagem de primers utilizados para qPCR

<b>Primer</b>		<b>Sequência</b>
$\beta$ -actina	F	GGCACCACACCTTCTACAATG
	R	GGGGTGTGGAAGGTCTCAAAC
HPRT1	F	CATTATGCTGAGGATTTGGAAAGG
	R	CTTGAGCACACAGAGGGCTACA
Muc5ac	F	GCAGTTGTGTCACCATCATCTGTG
	R	GGGGCAGTCTTGACTAACCCTCTT
KC (CXCL1)	F	CAATGAGCTGCGCTGTCAGTG
	R	CTTGGGGACACCTTTTAGCATC
MIP-2	F	CCAAGGGTTGACTTCAAGAAC
	R	AGCGAGGCACATCAGGTACG
MID-1	F	CACTCGCTGAAGGAAAATGACCA
	R	AATCCAAGGCAAAAGTGTCAAACG
TSLP	F	AGGCTACCCTGAAACTGAG
	R	GGAGATTGCATGAAGGAATACC
CCL11	F	CACGGTCACTTCCTTCACG
	R	GGGGATCTTCTTACTGGTA
IL-5	F	TGTTGACAAGCAATGAGACGATGA
	R	AATAGCATTTCACAGTACCCCA
IL-17A	F	ATCCCTCAAAGCTCAGCGTGTC
	R	GGGTCTTCATTGCGGTGGAGAG
CCL20	F	CGACTGTTGCCTCTCGTACA
	R	AGGAGGTTACAGCCCTTTT

### 3.21 Avaliação da expressão de microRNAs

O RNA extraído do pulmão foi submetido a transcrição reversa seguida de PCR quantitativo conforme as indicações do *kit* TaqMan MicroRNA Assay, para os microRNAs mir155 e mir223. Os dados são demonstrados em expressão relativa, em comparação com a expressão de U6.

### 3.22 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se 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, e posteriormente, as análises foram realizadas com teste t de student, 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.

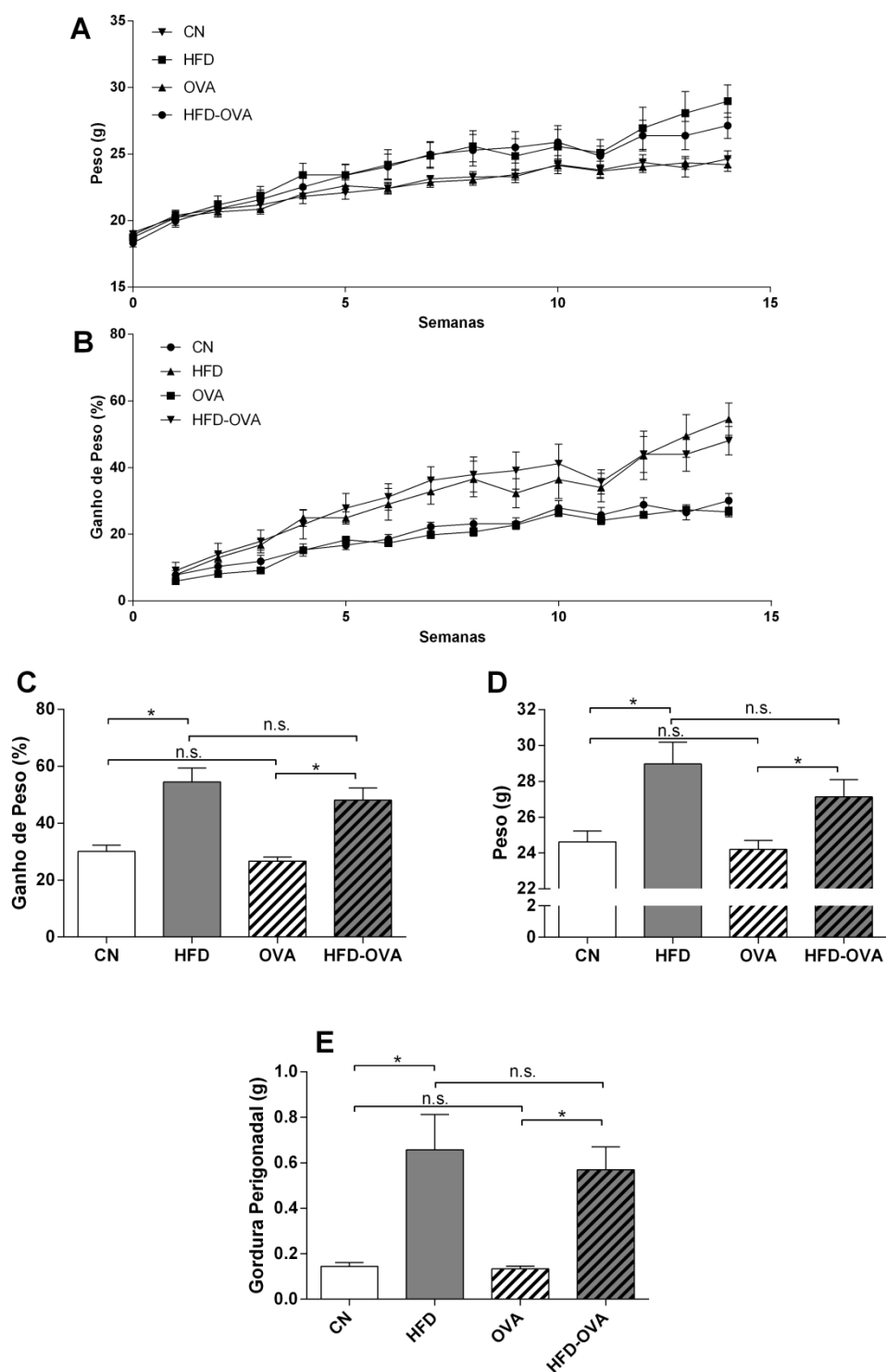
## **4 Resultados**

### **4.1 Modelo de Obesidade e Alergia Pulmonar induzida por Ovalbumina (OVA)**

O modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e alergia pulmonar induzida por OVA aqui apresentado, foi previamente desenvolvido no Centro de Tecnologia Celular e Imunologia Aplicada (Imunocet) (SILVA et al., 2017a). Portanto os primeiros resultados apresentados tem como intuito a validação do modelo, através da verificação de algumas alterações características. A análise de imunofenotipagem por citometria de fluxo foi realizada 48h após o último desafio, tendo em vista que o pico da resposta de animais obesos ocorre nesse tempo (SILVA et al., 2017a).

#### **4.1.1 Dieta hiperlipídica induz aumento de peso e acúmulo de gordura**

Camundongos da linhagem Balb/c são resistentes ao desenvolvimento de obesidade, apresentando menor acúmulo de gordura e ganho de peso que outras linhagens como C57BL/6 (MONTGOMERY et al., 2013). No entanto, o consumo da dieta hiperlipídica, contendo 60% de calorias provenientes de gordura, durante quatorze semanas levou ao aumento significativo de peso, acompanhado pelo maior acúmulo de gordura perigonadal, nos animais dos grupos HFD (OB) e HFD-OVA (OB/AP), em comparação com os grupos CN e OVA (AP). Adicionalmente, esses grupos não apresentaram diferenças entre si quanto ao peso, percentual de ganho de peso (que corresponde ao percentual de peso ganho em relação ao peso inicial do animal) ou acúmulo de gordura perigonadal (Figura 10). Os animais alimentados com a dieta padrão (CN e OVA), contendo 10% de calorias provenientes de gordura, também não apresentaram diferenças significativas entre si em relação aos parâmetros supracitados (Fig. 10).

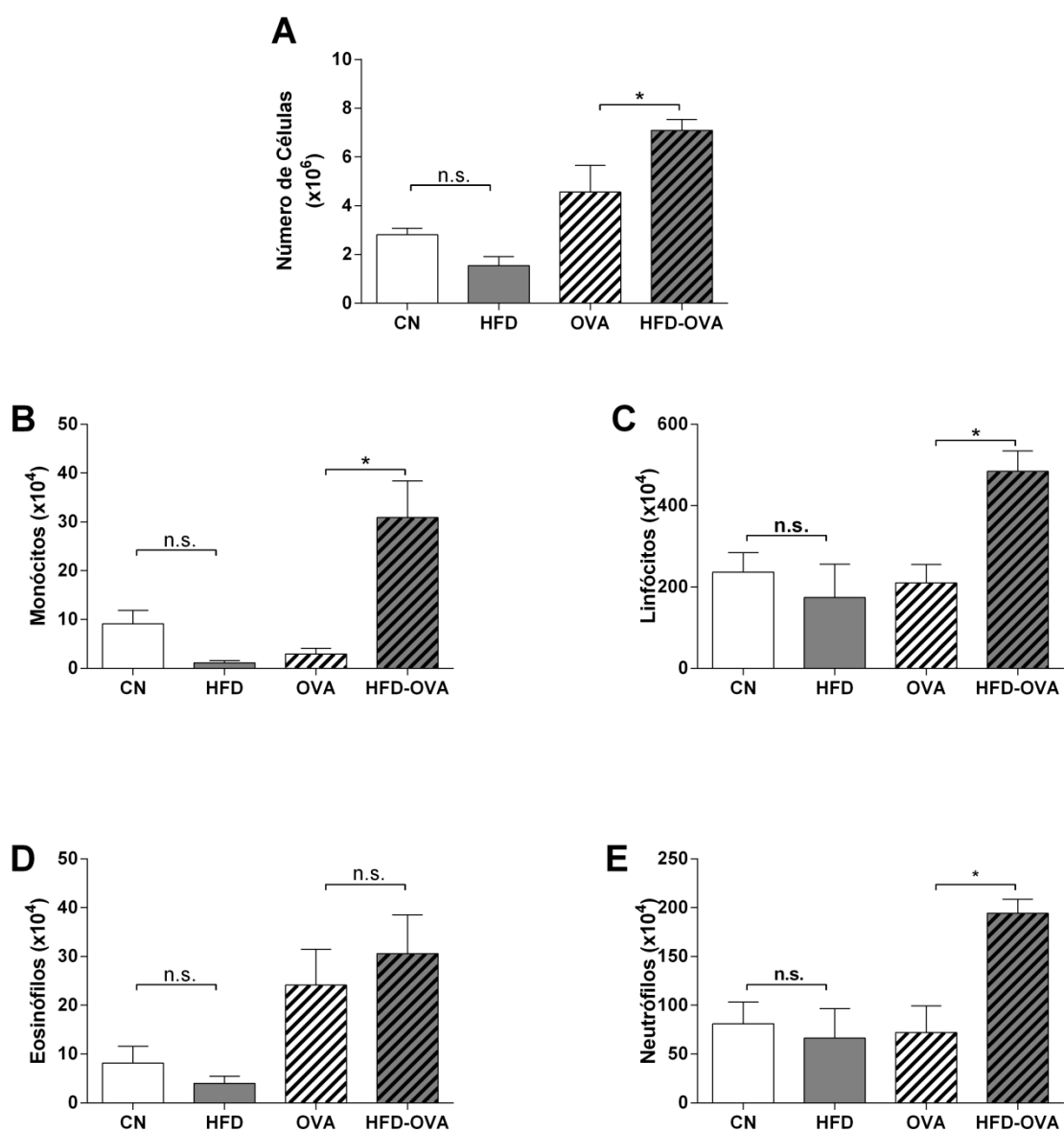


**Figura 10** - Acompanhamento de peso e acúmulo de gordura, em modelo de alergia pulmonar induzida por OVA. Curva de peso de cada grupo experimental (A), curva de percentual de ganho de peso em relação ao peso inicial (B), peso final (C), percentual final de ganho de peso (D), acúmulo de gordura perigonadal (E). Os dados foram analisados através de teste de *t de student*, \* $p < 0.05$ , e expressos como média  $\pm$  EPM, ns - não significativo.  $n = 6$ .

#### **4.1.2 Obesidade induz o aumento no número de leucócitos no sangue durante a resposta alérgica induzida por OVA**

Durante o desenvolvimento de processos inflamatórios nos pulmões, como a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e a asma, ocorre o aumento da contagem de leucócitos sanguíneos, sobretudo na contagem de eosinófilos e neutrófilos (LEWIS et al., 2001). Nesse contexto, animais não alérgicos, magros e obesos (CN e HFD), não diferiram entre si quanto a contagem de leucócitos totais, contudo, após as sensibilizações e desafios com o alérgeno, animais obesos apresentaram um número significativamente maior de leucócitos na circulação em comparação aos animais magros alérgicos 48h após o último desafio com a OVA (Fig. 11A).

A contagem diferencial não indicou nenhuma diferença significativa entre os grupos CN e HFD. Entretanto, a contagem de monócito, linfócitos e neutrófilos foi mais elevada em animais obesos alérgicos (HFD-OVA) em comparação com os alérgicos não obesos (OVA) (Figura 11 B, C e E). Contudo não houve diferença significativa entre os animais alérgicos obesos e magros quanto à contagem de eosinófilos (Fig. 11D).



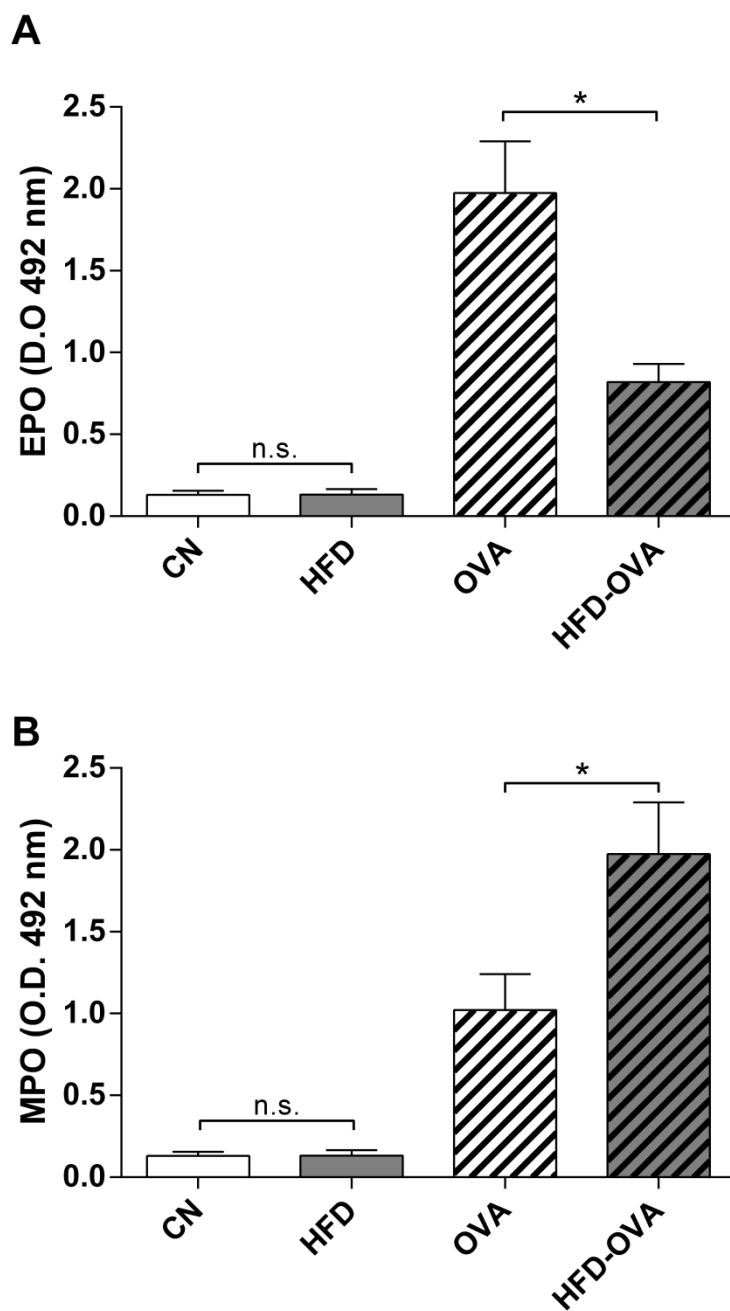
**Figura 11** - Contagem absoluta de células no sangue, em modelo de OVA. Contagem total de leucócitos por mL de sangue (A), contagem diferencial de Monócitos (B), Linfócitos (C), Eosinófilos (D) e Neutrófilos (E), 48h após o último desafio com a OVA. Os dados foram analisados através de teste de *t de student*,  $*p < 0.05$ , e expressos como média  $\pm$  EPM, ns - não significativo.  $n=6$ .



#### **4.1.3 Obesidade reduz peroxidase eosinofílica (EPO) e aumenta mieloperoxidase (MPO) no tecido pulmonar**

Tendo em vista as alterações ocorridas nas contagens de células, foi realizada a avaliação da atividade enzimática das peroxidases características de granulócitos no macerado do tecido pulmonar. A peroxidase eosinofílica (EPO), presente em eosinófilos é uma marca da ativação dessas células, e a avaliação de sua atividade é uma medida indireta de inflamação eosinofílica (SAFFARI et al., 2016). Camundongos não alérgicos, independentemente de seu *status* obeso, não apresentaram diferença significativa de atividade de EPO. No entanto após 48h dos desafios com OVA, os animais obesos (HFD-OVA) apresentaram menor atividade dessa enzima, em relação ao grupo alérgico não obeso (OVA) (Fig. 12A).

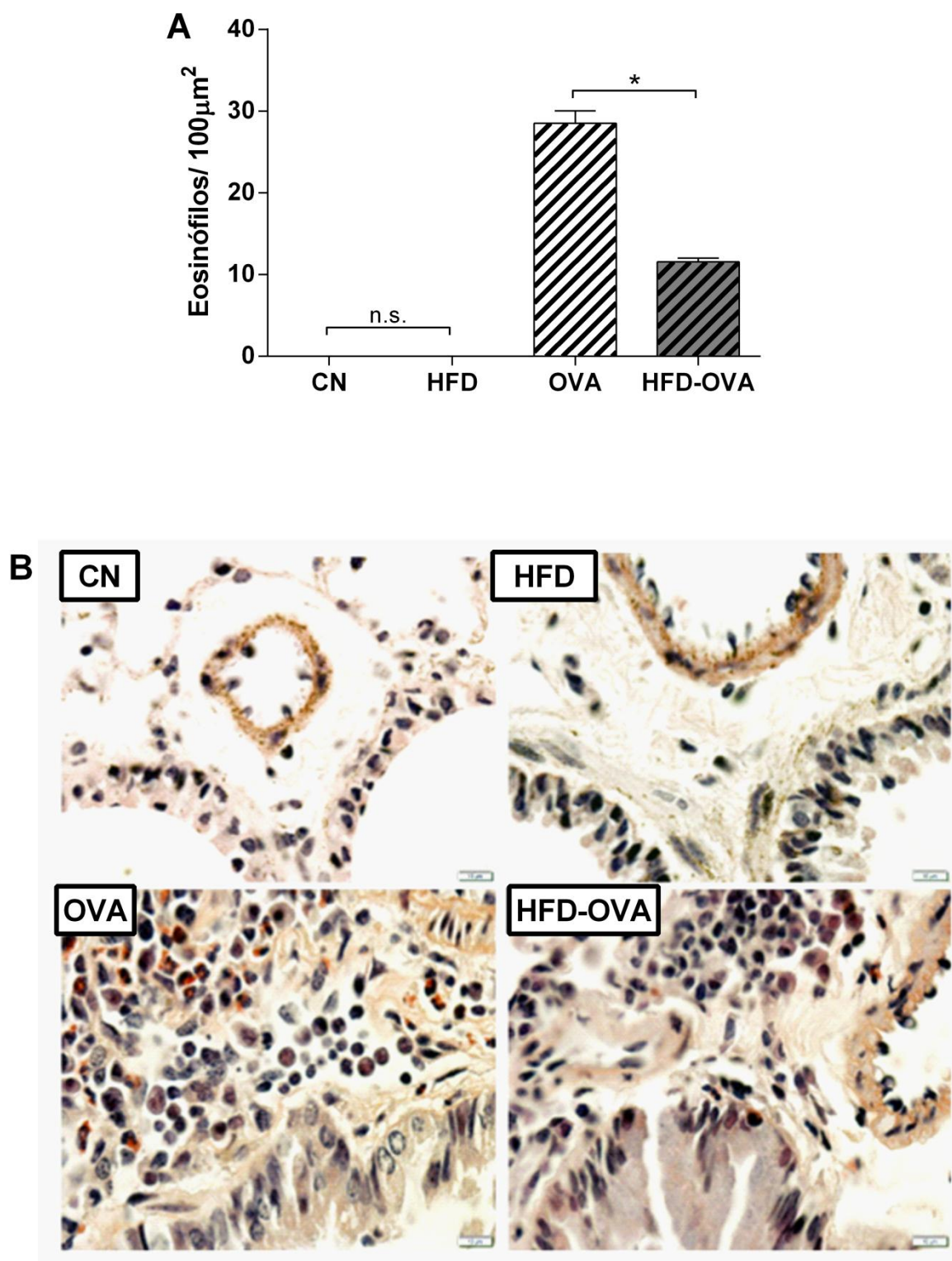
Em contraste a Mieloperoxidase (MPO), produzida principalmente por neutrófilos, é um indicativo de sua atividade e presença. Portanto, sua quantificação pode ser uma medida indireta de neutrofilia (ARATANI, 2018). Os grupos de animais não-alérgicos (CN e HFD) não apresentaram diferença entre si quanto a atividade da MPO. Contudo, os animais alérgicos obesos (HFD-OVA) apresentaram maior atividade de MPO em relação aos alérgicos magros (OVA), indicando uma maior participação de neutrófilos no processo inflamatórios dos pulmões (Fig. 12B).



**Figura 12** - Avaliação das atividades de peroxidases de granulócitos, em homogenato de pulmão, após 48h dos desafios com a OVA. Avaliação da atividade de peroxidase eosinofílica (EPO) (A) e Mieloperoxidase (MPO) (B). Os dados foram analisados através de teste de *t de student*,  $*p < 0.05$ , e expressos como média  $\pm$  EPM, ns - não significativo.  $n=6$ . D.O – densidade ótica.

#### **4.1.4 Obesidade causa redução de infiltrado eosinofílico no tecido pulmonar durante resposta alérgica**

Tendo em vista as diferenças observadas quanto a atividade das peroxidases no tecido pulmonar, foi avaliada a presença de eosinófilos no infiltrado inflamatório na região peribroncovascular. Enquanto animais obesos e não-obesos, não apresentavam eosinófilos em seu tecido pulmonar, ambos os grupos alérgicos, obesos e não-obesos, possuíam infiltrado eosinofílico, contudo animais obesos alérgicos apresentaram menor eosinofilia em comparação com o grupo alérgico magro após 48h do último de desafio com a OVA (Fig. 13).



**Figura 13** - Contagem de eosinófilos no tecido pulmonar corados com Sirius Red (A) e imagem representativa de cada grupo experimental (B), em modelo de OVA. Os dados foram analisados através de teste de *t de student*,  $p < 0,05$  (\*). Os dados foram analisados através de teste de *t de student*,  $*p < 0,05$ , e expressos como média  $\pm$  EPM, ns - não significativo.  $n=6$ .

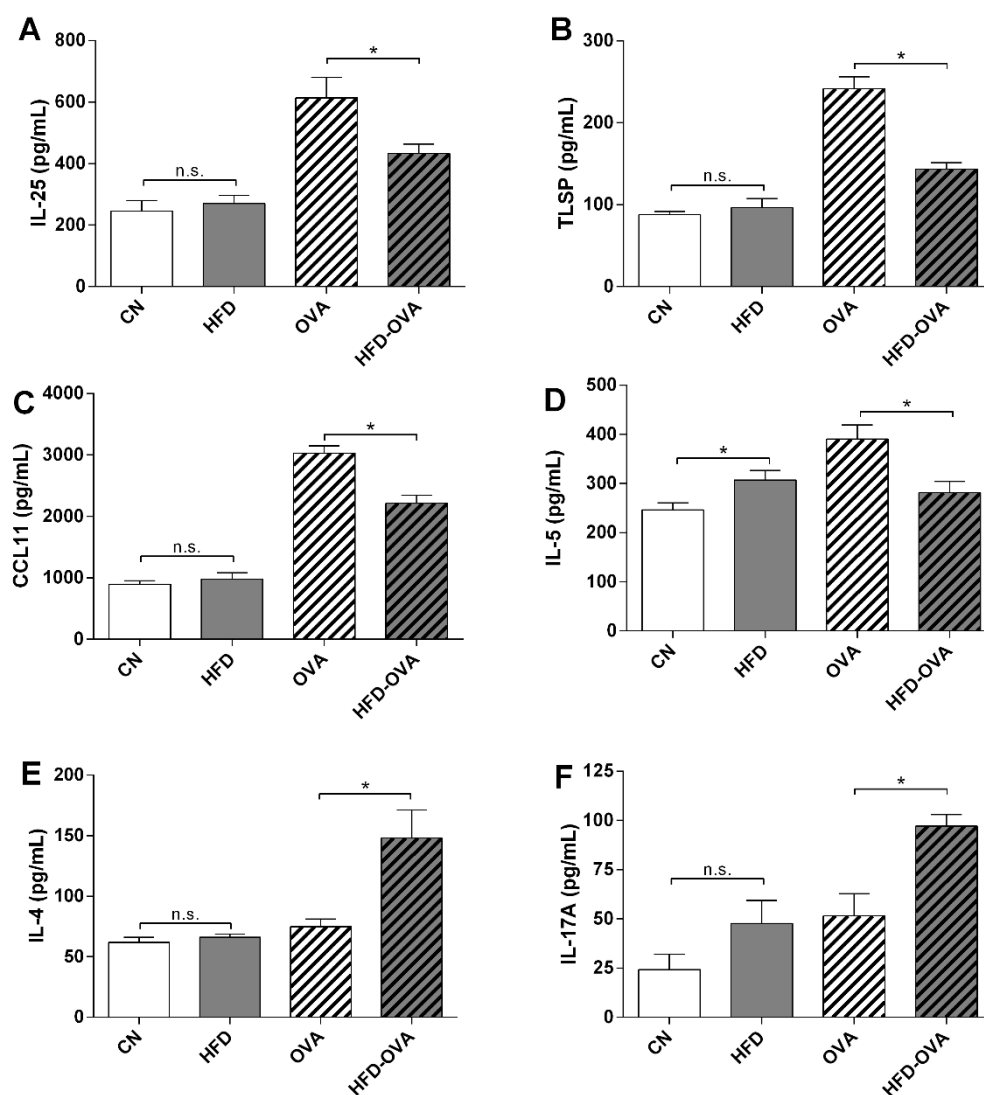
#### 4.1.5 Obesidade modifica o perfil de citocinas produzidas no pulmão

Para a confirmação das modificações características desse modelo foram usados tempos de coleta distintos (24 e 48h) de acordo com a cinética de resposta já avaliada previamente (SILVA et al., 2017). Foram avaliadas citocinas de perfil  $T_H2$  e citocinas epiteliais que contribuem para o estabelecimento da resposta alérgica padrão nos pulmões (MITCHELL; O'BYRNE, 2017). Adicionalmente, foi avaliada a produção de IL17A, principal citocina produzida por linfócitos do subtipo  $T_H17$  e que contribuem para o estabelecimento de respostas de perfil neutrofílico (ZHANG et al., 2018a).

Animais obesos alérgicos (HFD-OVA) apresentaram menor produção das citocinas epiteliais IL-25 (Fig. 14A) e TSLP (Fig. 10B) em comparação com o grupo alérgico não-obeso, 24h após o último desafio com OVA. Contudo, a obesidade por si só não causou modificações na produção dessas citocinas na ausência do alérgeno (Fig. 14A-B). Em relação, a quimiocina CCL11, responsável pelo recrutamento de eosinófilos, também foi menos produzida em animais obesos alérgicos em comparação com os alérgicos magros no mesmo tempo de coleta (Fig. 10C).

As citocinas de perfil  $T_H2$  IL-5 e IL4 apresentaram padrões de produção distintos, enquanto IL-5 se encontrava elevada em animais obesos independente do desafio com o alérgeno, IL-4 não foi alterada pela indução da obesidade. Entretanto às 24h após o último desafio com o alérgeno, os animais do grupo HFD-OVA, apresentaram menor produção de IL-5 que os alérgicos magros, enquanto esses dois grupos não apresentaram diferenças para a produção de IL-4 nesse tempo de coleta (dados não mostrados). Todavia às 48h após o último desafio, a produção de IL-4 foi maior entre os animais do grupo HFD-OVA, em comparação com o grupo OVA (Fig. 14D-E).

Associado a esse atraso na produção de IL-4, houve também aumento na produção de IL-17A, às 48h após o último desafio. Ademais, os grupos não alérgicos não apresentaram diferença entre si quanto a produção de IL-17A (Fig. 14F).



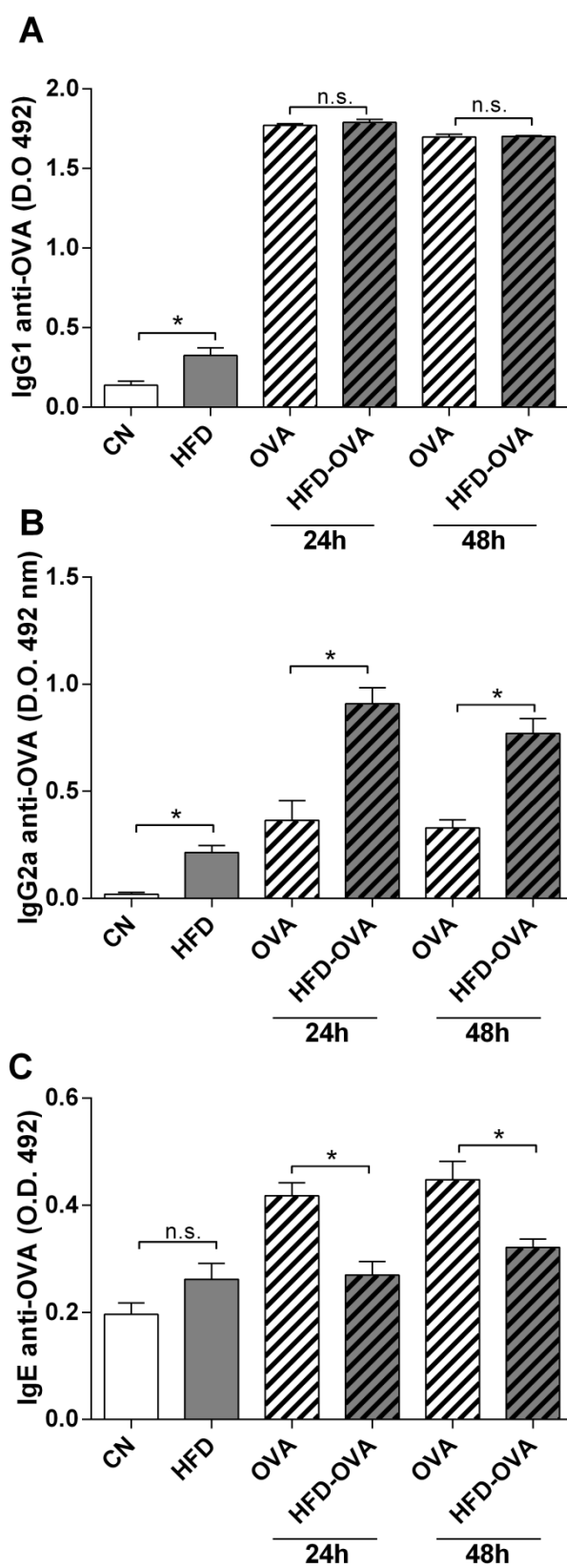
**Figura 14** - Avaliação da produção de citocinas no homogenato de tecido pulmonar, por ELISA direto, em modelo de OVA. Foram quantificadas as seguintes citocinas: IL-25 (A), TSP (B), CCL11 (C), IL-5 (D), às 24h após o último desafio. Além disso foram dosadas as citocinas IL-4 (E) e IL-17A (F), 48h após o último desafio com a OVA. Os dados foram analisados através de teste de *t de student*,  $*p < 0.05$ , e expressos como média  $\pm$  EPM, ns - não significativo.  $n=6$ .

#### **4.1.6 Obesidade intensifica a produção de IgG2a e reduz produção de IgE durante resposta alérgica em animais obesos**

O perfil de citocinas presentes na diferenciação de linfócitos B produtores de anticorpos tem grande influência sobre a determinação dos diferentes isótipos (LIN; FREEMAN; NUTMAN, 2018; MAJEWSKA-SZCZEPANIK et al., 2016). Portanto, com o intuito de avaliar os efeitos que a obesidade poderia ter sobre a produção de anticorpos, foi avaliada a presença dos isótipos IgG2a, IgG1 e IgE, no soro dos animais, tanto às 24h quanto às 48h após o último desafio.

Apesar da maior detecção de IgG1 em animais obesos não alérgicos em comparação com os animais controle, após a indução não houve diferença entre os grupos alérgico e obeso alérgico quanto a produção dessa imunoglobulina (Fig.15A). Nos animais não alérgicos a produção de IgG2a seguiu um padrão semelhante, sendo mais produzida nos animais obesos. No entanto, nos dois tempos analisados, houve uma maior quantificação sérica de IgG2a no grupo obeso alérgico em comparação com o grupo alérgico não obeso (Fig. 15B).

Adicionalmente, a produção de IgE não apresentou diferença entre os grupos não alérgicos (CN e HFD). Porém, os níveis dessa imunoglobulina foram reduzidos nos animais obesos alérgicos em comparação com os alérgicos não-obesos (Fig.15C).

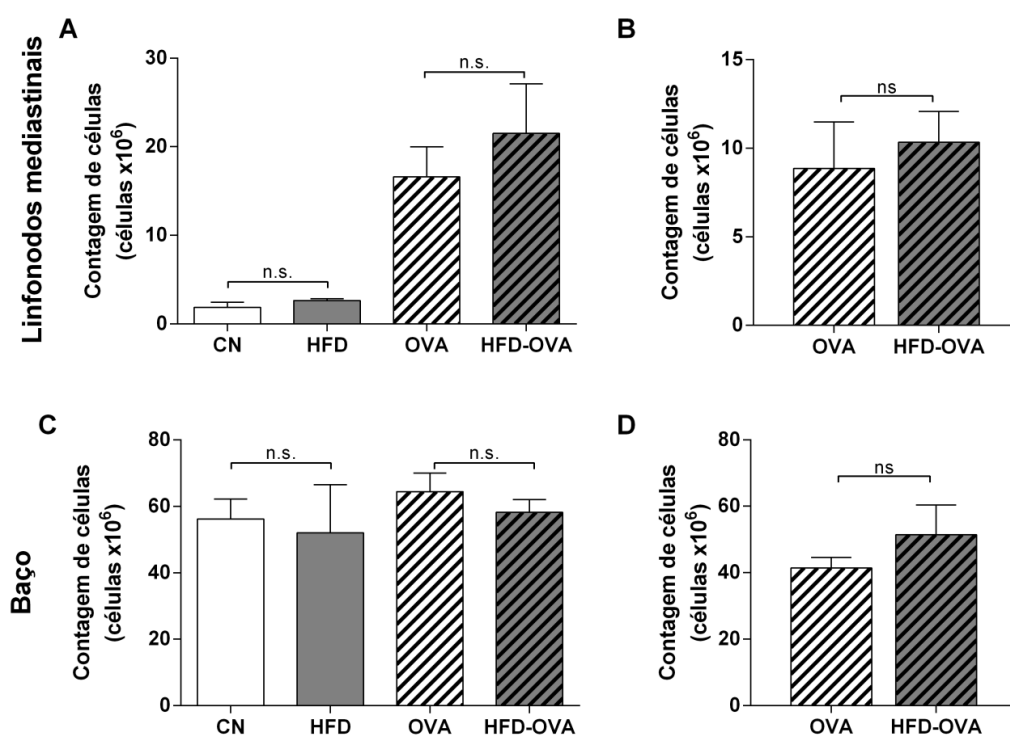


**Figura 15** - Avaliação da produção de anticorpos em modelo de OVA. Avaliação dos níveis séricos de IgG1 (A), IgG2a (B) e IgE (C). Os dados foram analisados através de teste de *t de student*,  $*p < 0.05$ , e expressos como média +/- EPM, ns - não significativo.  $n=6$ .



#### 4.1.7 Obesidade não afeta a contagem total de células nos órgãos linfoides periféricos

Os órgãos linfoides periféricos (baço e linfonodos mediastinais) foram removidos e processados para imunofenotipagem, tanto às 48h após o último desafio, quanto às 72h após a segunda sensibilização, de modo a verificar alterações de respostas que já estivessem estabelecidas antes dos desafios. A contagem total de células nesses órgãos foi semelhante entre o grupo CN e HFD, bem como entre os grupos OVA e HFD-OVA. Além disso animais obesos sensibilizados e desafiados, ou somente sensibilizados, apresentaram contagem de células semelhante à dos animais magros também expostos à OVA (Fig.16).

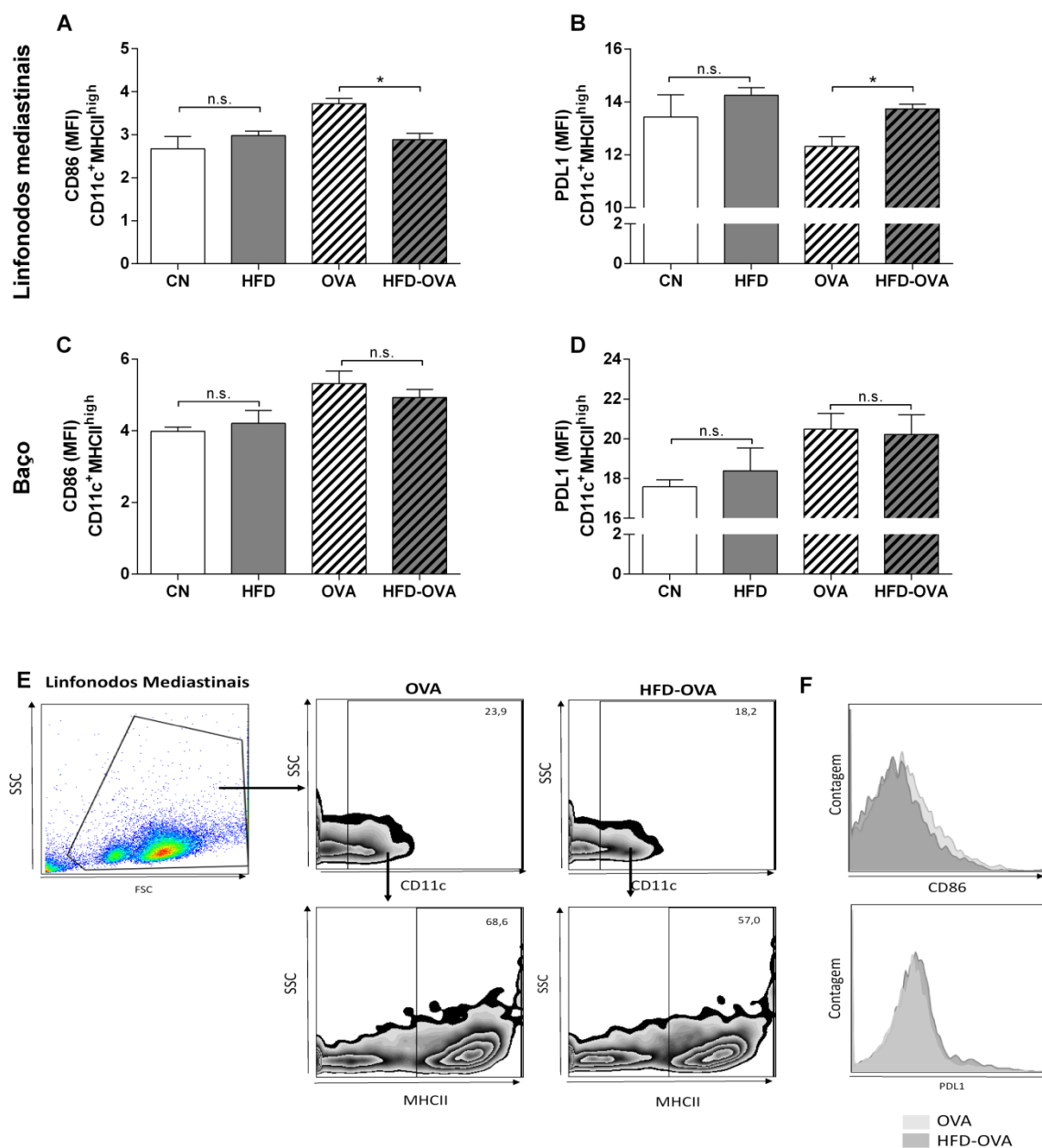


**Figura 16** - Contagem de células nos órgãos linfoides periféricos. Contagem de células nos linfonodos mediastinais 48h após o último desafio com OVA (A) e 72h após a segunda sensibilização (B). Contagem de células no baço, 48h após o último desafio com OVA (C) e 72h após a segunda sensibilização (D). Os dados foram analisados através de teste de *t de student*, \* $p < 0.05$ , e expressos como média +/- EPM, ns - não significativo. n=6.

#### **4.1.8 Ativação de células dendríticas é comprometida pela obesidade durante resposta alérgica à OVA nos linfonodos**

A ativação de células dendríticas é uma etapa essencial para a produção de anticorpos, uma vez que essas irão primar a resposta de células T e B nos órgãos linfoides periféricos (HAMMAD; LAMBRECHT, 2008). Sabendo-se que a resposta alérgica em obesos já se encontra alterada desde a produção de citocinas pelo epitélio, e que essas citocinas são cruciais para a ativação das células dendríticas, investigou-se a ativação dessas células nos órgãos linfoides periféricos. Utilizou-se como parâmetro de ativação de células dendríticas ( $CD11c^+MHC^+$ ) a expressão da molécula co-estimulatória CD86 e o ligante da molécula inibitória (PD1), o PDL1.

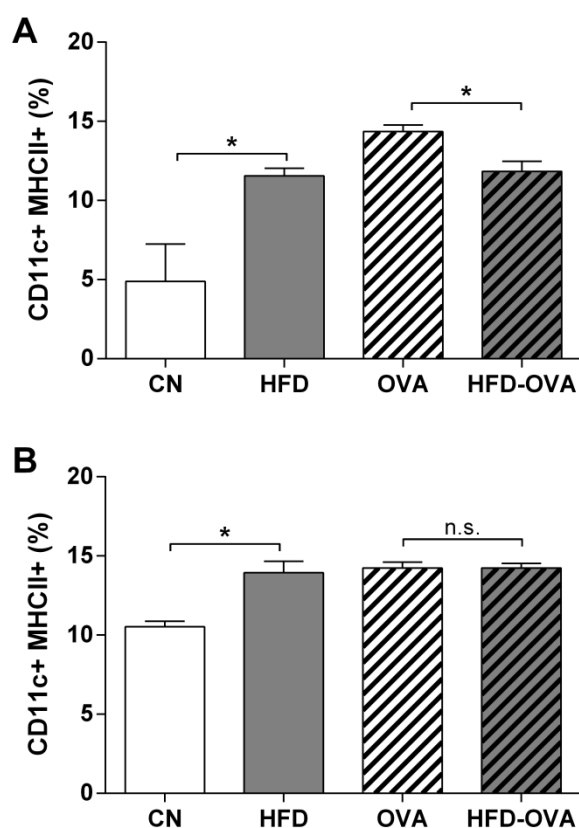
A obesidade por si só não foi capaz de modificar o perfil de ativação das células dendríticas nos órgãos linfoides periféricos. Contudo, 48h após o último desafio, as células dendríticas dos linfonodos mediastinais de animais obesos-alérgicos apresentaram um perfil mais regulatório com menor expressão de CD86 (Fig. 17A) e maior expressão de PDL1 (Fig. 17B), em comparação com os animais alérgicos não-obesos. Já no baço não houve diferença significativa entre os grupos alérgicos, obeso e magro, quanto à expressão de CD86 e PDL1 (Fig. 17C-D).



**Figura 17** - Imunofenotipagem de Células dendríticas CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> nos linfonodos mediastinais e baço. Mediana da intensidade de fluorescência de CD86 (A) e PDL1 (B) no linfonodo. Mediana da intensidade de fluorescência de CD86 (C) e PDL1 (D) no baço. Estratégia de seleção da população de células CD11cMHCII<sup>+</sup> (E). Histograma representativo das marcações de CD86 e PDL1 (F). Os dados foram analisados através de teste de *t de student*, \* $p < 0.05$ , e expressos como média +/- EPM, ns - não significativo. n=6.

#### 4.1.9 Obesidade reduz frequência de células dendríticas no linfonodo de animais obesos alérgicos

Com o intuito de avaliar se a obesidade prejudicou a migração de células para os órgãos linfoides periféricos, foi avaliada a frequência dessas células dentro do total de células. Nos linfonodos mediastinais a obesidade induziu aumento da frequência de células dendríticas CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> em animais não alérgicos, contudo após a indução da alergia animais obesos apresentaram redução na frequência dessas células (Fig. 18A). Em adição, animais não-alérgicos obesos também apresentaram maior frequência de células dendríticas em comparação com os animais magros que não foram expostos ao alérgeno. Entretanto após a indução de alergia, animais magros e obesos não diferiram quanto a frequência dessas células (Fig. 18B).



**Figura 18** - Frequência de células dendríticas CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> nos linfonodos mediastinais (A) e baço (B). Os dados foram analisados através de teste de *t de student*, \* $p < 0.05$ , e expressos como média  $\pm$  EPM, ns - não significativo.  $n=6$ .

#### 4.1.10 Obesidade induz aumento na frequência de linfócitos B e reduz frequência de células regulatórias nos linfonodos

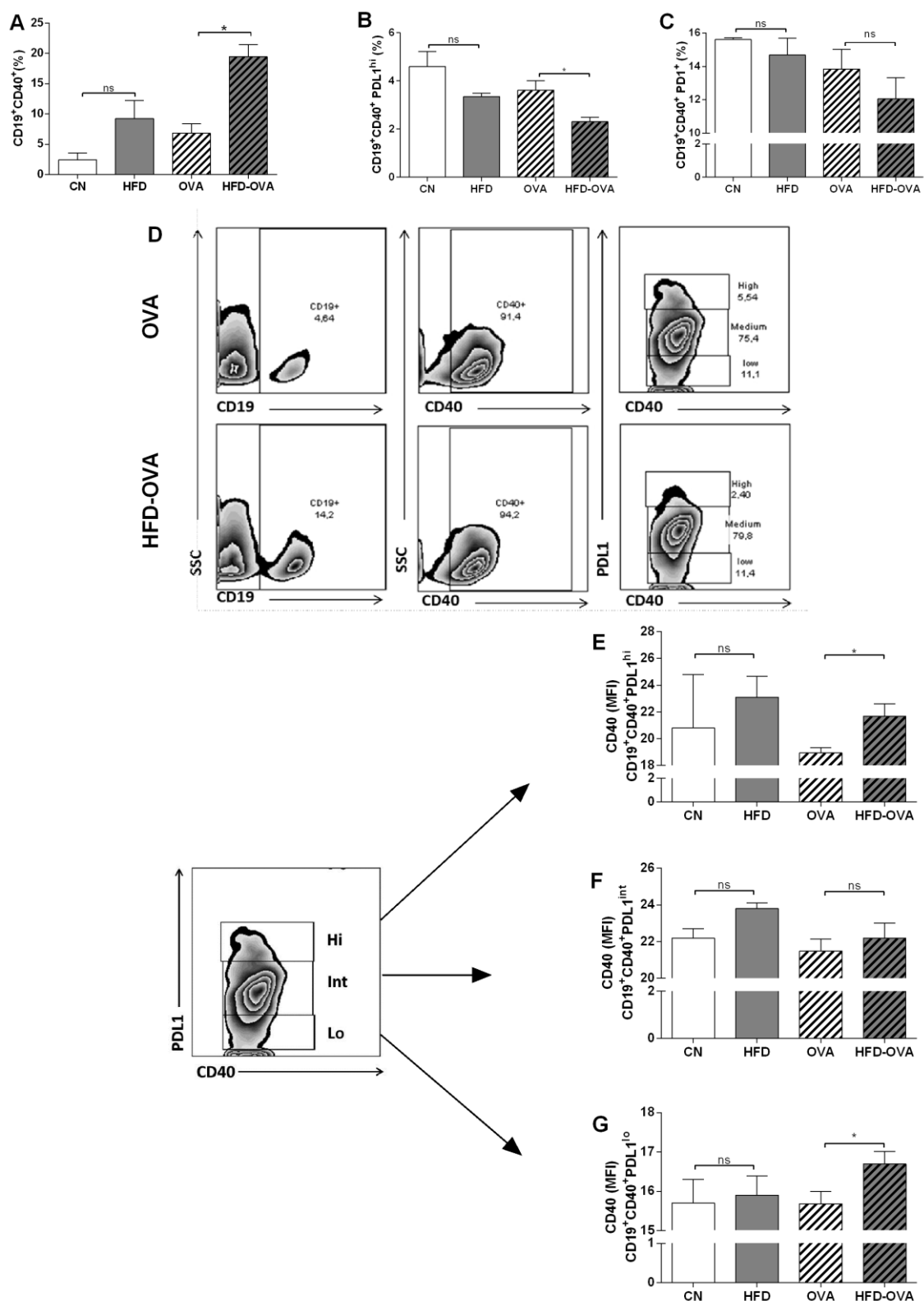
Células dendríticas interagem com linfócitos T e B nos órgãos linfoides periféricos, levando à formação dos centros germinativos onde ocorrerá a diferenciação de células B em plasmócitos secretores de anticorpos (KAPSENBERG, 2003; KRISHNASWAMY et al., 2017; MESIN; ERSCHING; VICTORA, 2016; PATTARINI et al., 2017) Nesse contexto, diversas populações de linfócitos B podem estar presentes, exercendo tanto função regulatória, quanto se portando como células B convencionais (KHAN et al., 2015). A diferenciação desses fenótipos pode ser feita através da expressão de PDL-1, a estratégia de *gating* para a obtenção dessas populações é apresentada na figura 19D. Portanto, tanto a frequência de linfócitos B, quanto seu perfil de ativação foram avaliados nos linfonodos mediastinais, com o intuito de verificar as modificações que a obesidade poderia causar nas diferentes populações dessas células.

Apesar da obesidade, por si só, tender a aumentar a frequência de linfócitos B nos linfonodos, e diminuir a frequência de células B de perfil regulatório ( $CD19^+CD40^+PDL1^{high}$ ) (Fig. 19A-B), não foram encontradas diferenças significativas entre os animais não alérgicos obesos e magros quanto a esses parâmetros. Também não foi encontrada diferença significativa entre esses grupos quanto à frequência de células  $CD19^+CD40^+PD1^+$  (Fig. 19 C), ou quanto à expressão de CD40 nos três níveis de expressão de PDL1 analisados ( $CD19^+CD40^+PDL1^{high/int/low}$ ) (Fig. 19E-G).

Diferentemente do observado em animais não alérgicos, a indução de alergia em animais obesos causou um aumento na frequência total de linfócitos B (Fig. 19A) e a redução da população de linfócitos B regulatórios, com elevada expressão de PDL1 ( $CD19^+CD40^+PDL1^{high}$ ) (Fig. 19B), em relação aos animais alérgicos magros, às 48h após o último desafio. Entretanto a frequência de linfócitos B expressando PD1 ( $CD19^+CD40^+PD1^+$ ) foi semelhante entre os grupos alérgicos (Fig. 19C).

A expressão de CD40 tem grande importância tanto na funcionalidade quanto na proliferação de linfócitos B (LEE et al., 2003; MAURI; MENON, 2017). Apesar de

sua menor frequência, linfócitos B de animais obesos-alérgicos expressando altos níveis de PDL1 apresentaram uma maior expressão de CD40 em relação aos animais alérgicos magros (Fig. 19E). Porém, a população com nível intermediário de expressão de PDL1 ( $CD19^+CD40^+PDL1^{int}$ ), que também apresenta função regulatória, não apresentou diferença quanto a expressão do marcador de ativação CD40 (Fig. 19F), entre os animais alérgicos obesos e magros. Adicionalmente, a população de linfócitos B convencionais de animais obesos-alérgicos, com baixa expressão de PDL1, apresentou maior expressão de CD40 em comparação com os animais alérgicos não-obesos (Fig. 19G).



**Figura 19** - Imunofenotipagem de Linfócitos B CD19<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>, em linfonodos mediastinais. Frequências de linfócitos B CD19<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup> (A); CD19<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>PDL1<sup>high</sup> (B) e CD19<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup> (C). Gráficos representativos da seleção de populações (D). Nível de expressão de CD40 em Linfócitos B PDL1<sup>hi</sup> (E), PDL1<sup>int</sup> (F) e PDL1<sup>low</sup> (G). Dados obtidos 48h após o último desafio. Os dados foram analisados através de teste de *t de student*, \**p*<0.05, e expressos como média +/- EPM, ns - não significativo. n=6.

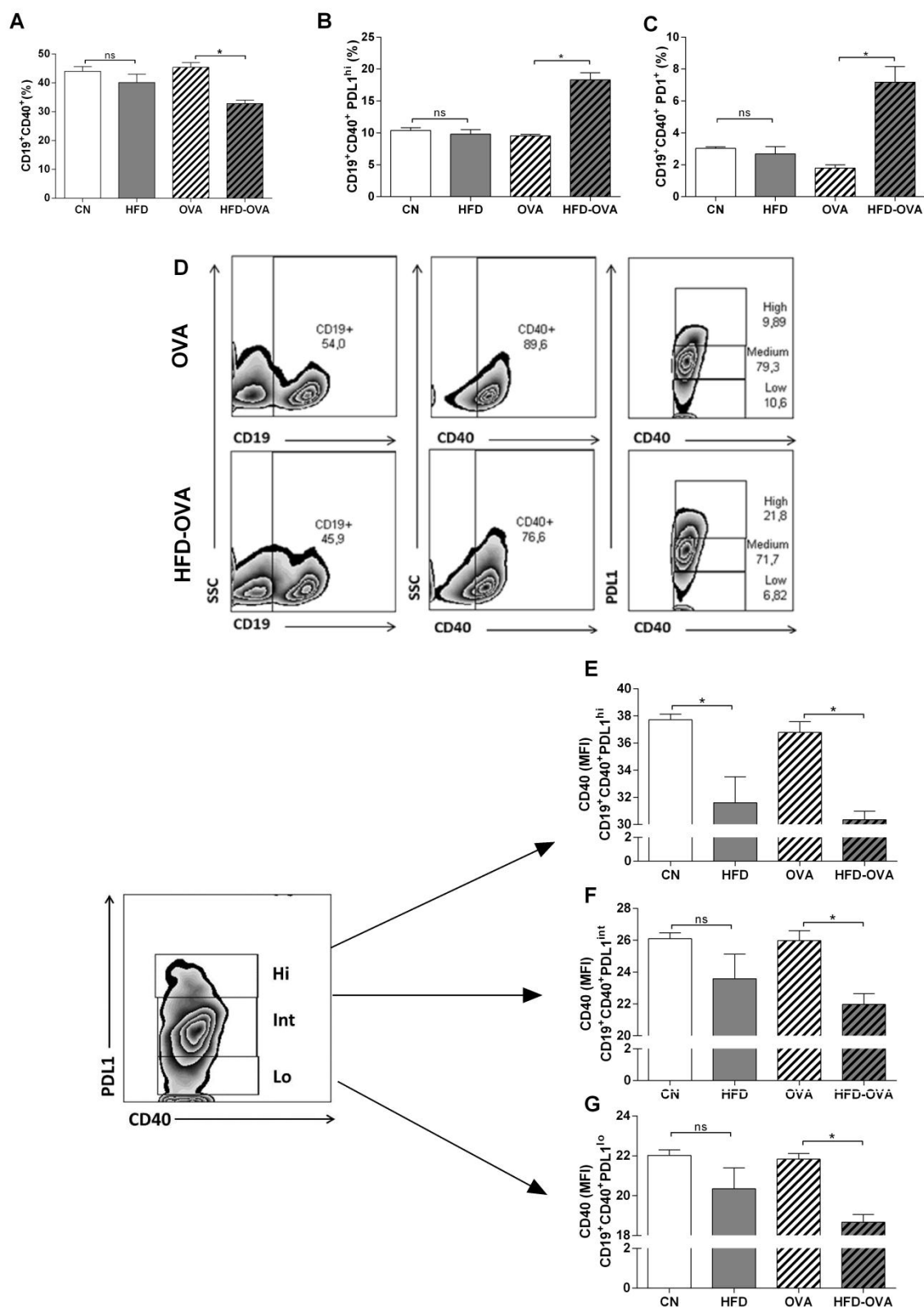
#### 4.1.11 Obesidade reduz frequência total de linfócitos B e aumenta a frequência de células regulatórias, no baço

O baço exerce um importante papel na produção de anticorpos e na proliferação de linfócitos (BRONTE; PITTET, 2013), portanto além da avaliação dos linfonodos mediastinais, que drenam os pulmões; também foi realizada a caracterização da população esplênica de linfócitos B. As análises foram realizadas seguindo a mesma estratégia de *gating* utilizada para os linfonodos; e as imagens representativas são apresentadas na figura (Fig. 20D).

A indução da obesidade não causou alterações na frequência total de linfócitos B no baço, tampouco na frequência desses linfócitos expressando altos níveis de PDL1 (CD19<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>PDL1<sup>high</sup>) ou PD1 (CD19<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>) (Fig. 20A-C). Adicionalmente a obesidade não afetou a expressão de CD40 nas populações de LB expressando níveis intermediários ou baixos de PDL1 (Fig. 20F-G). Entretanto, células B expressando altos níveis PDL1<sup>high</sup>, apresentaram menor expressão de CD40 nos animais obesos, em relação aos animais controle.

Diferentemente do observado entre os animais não alérgicos, animais obesos sensibilizados e desafiados com OVA apresentaram menor frequência de linfócitos B (CD19<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>) (Fig. 20A), ao passo que houve uma maior frequência de células expressando altos níveis de PDL1 (CD19<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>PDL1<sup>high</sup>) em comparação com os animais alérgicos magros (Fig. 20B). Já os animais obesos alérgicos apresentaram um expressivo aumento na população de linfócitos B expressando PD1 (CD19<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>), em comparação com os animais alérgicos não-obesos. Somado a esses resultados, a obesidade induziu a redução da expressão de CD40 em todas as subpopulações de linfócito B analisadas (Fig. 20E-G).





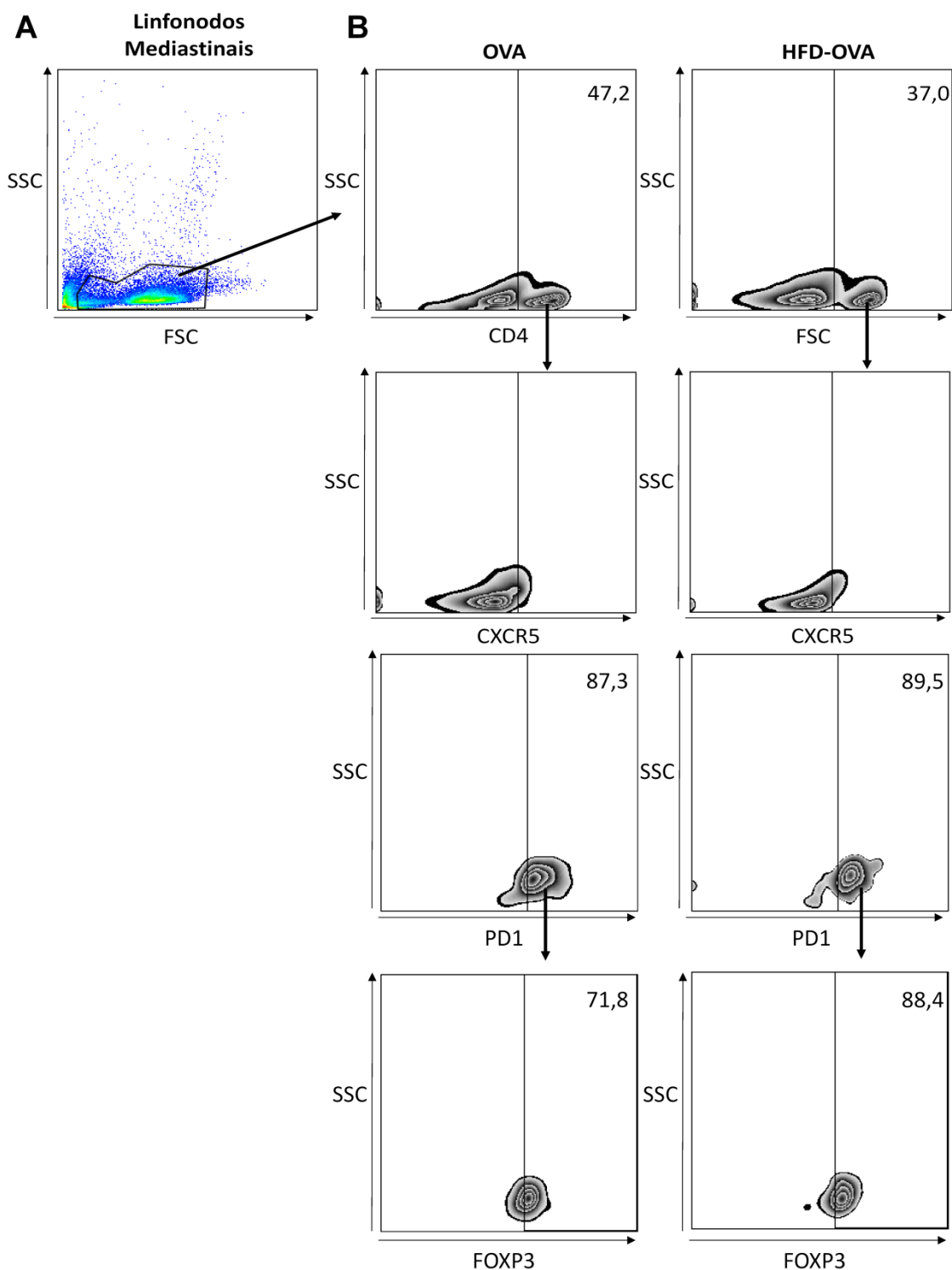
**Figura 20** - Imunofenotipagem de Linfócitos B CD19<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>, no baço. Frequências de linfócitos B CD19<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup> (A); CD19<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>PDL1<sup>high</sup> (B) e CD19<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>PDL1<sup>+</sup> (C). Gráficos representativos da seleção de populações (D). Nível de expressão de CD40 em Linfócitos B PDL1<sup>hi</sup> (E), PDL1<sup>int</sup> (F) e PDL1<sup>low</sup> (G). Dados obtidos 48h após o último desafio. Os dados foram analisados através de teste de *t de student*, \**p*<0.05, e expressos como média +/- EPM, ns - não significativo. n=6.

#### 4.1.12 Obesidade induz diferenciação de células T foliculares em perfil regulatório e diminui expressão de PD1 durante resposta alérgica

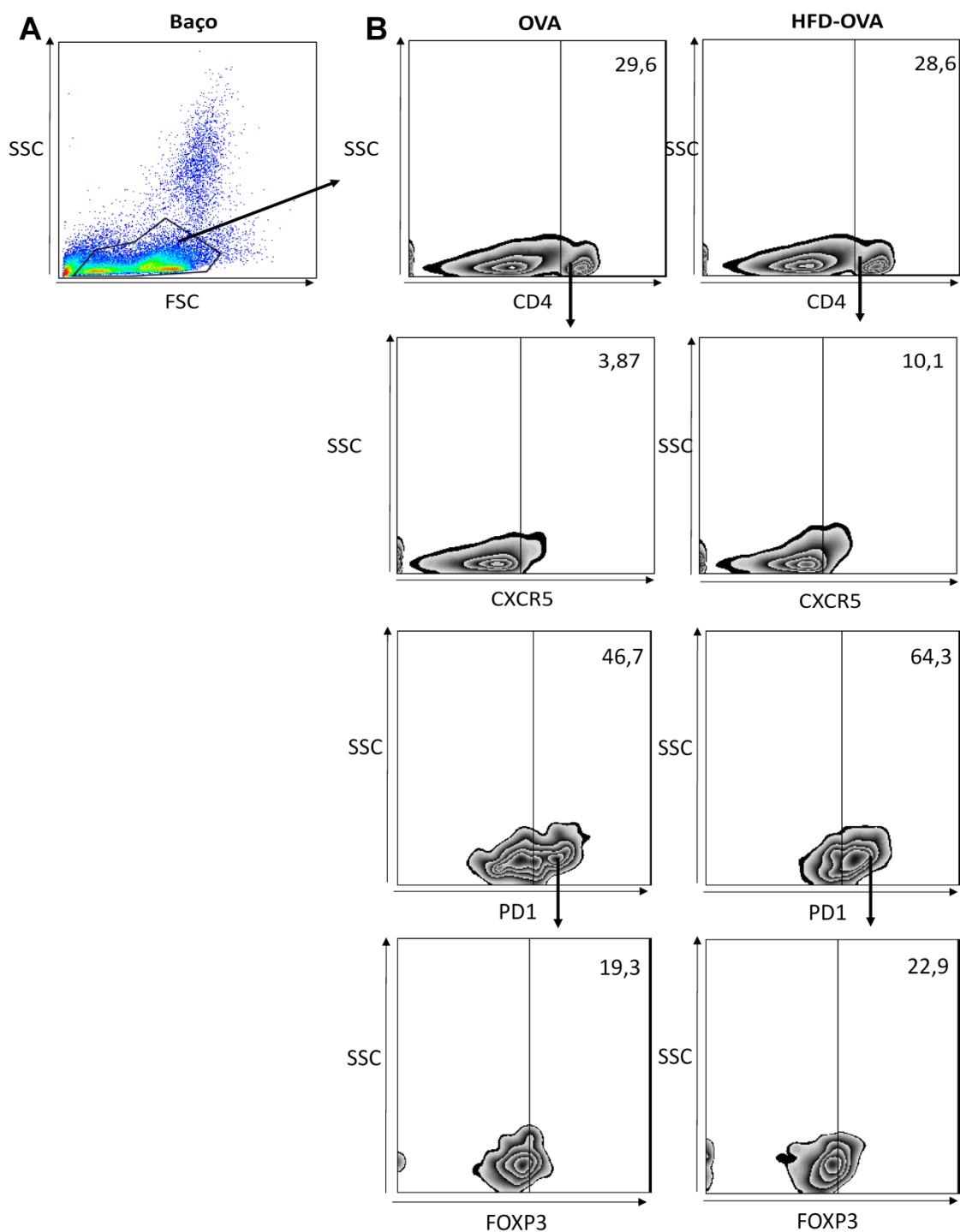
A formação e manutenção dos centros germinativos depende de diversos componentes da resposta imune, dentre eles as células T foliculares ( $T_{FH}$ ) se destacam devido a sua íntima interação com células B, em cooperação com as células dendríticas (WEINSTEIN et al., 2016). Essas células são caracterizadas pela expressão de PD1 e do receptor de quimiocina CXCR5, os quais participam da funcionalidade da mesma (GOOD-JACOBSON et al., 2010a), mas também podem expressar o fator de transcrição Foxp3 e terem um papel regulatório sobre a síntese de anticorpos (LINTERMAN et al., 2011).

Nesse contexto, a obesidade por si só não causou alterações na frequência de células  $T_{FH}$  ( $CD4^+CXCR5^+PD1^+$ ), nos linfonodos mediastinais, mesmo após os desafios com o alérgeno (Fig. 23A). Contudo, a avaliação da mesma população no baço, indicou um aumento na diferenciação de células  $T_{FH}$  em animais obesos-alérgicos, em comparação com os animais alérgicos magros (Fig. 23B).

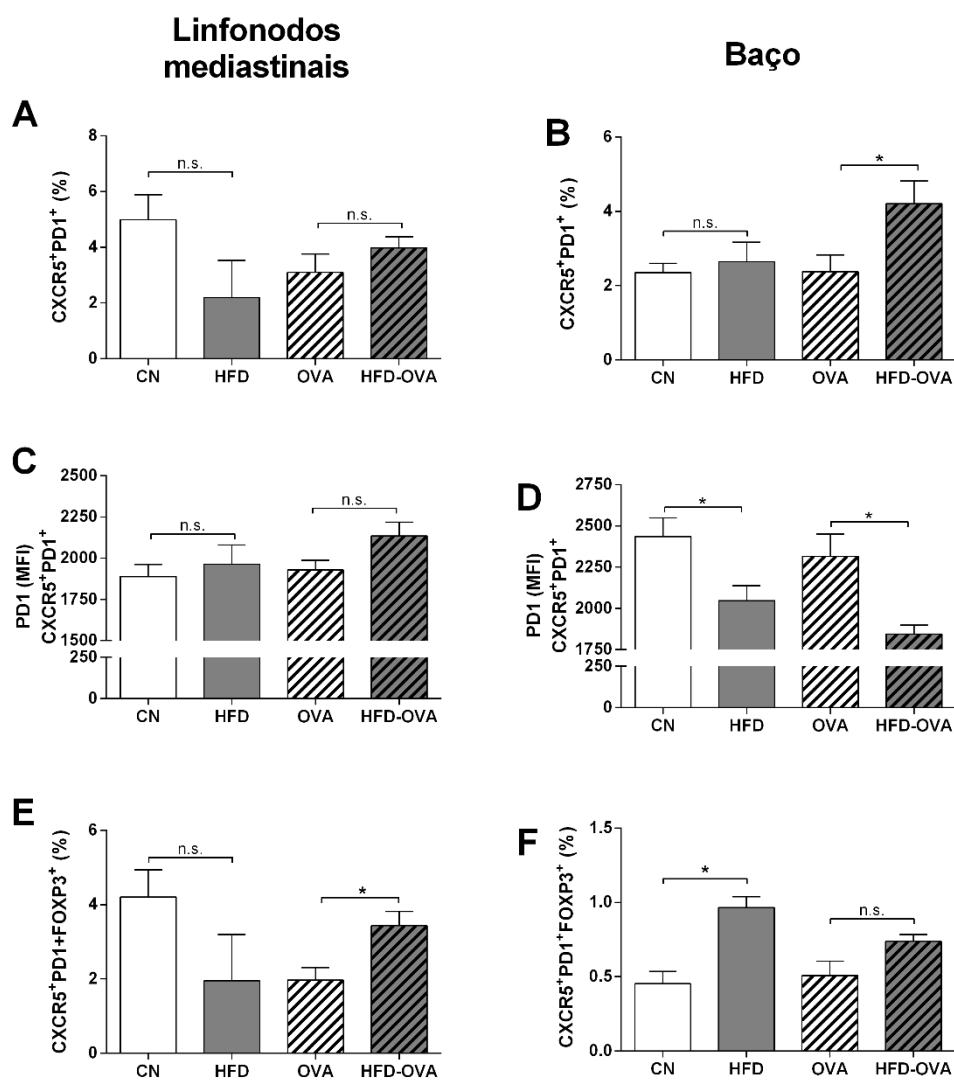
Adicionalmente, a expressão de PD1 em células  $T_{FH}$  é essencial para a manutenção de sua função (GOOD-JACOBSON et al., 2010b). Nesse sentido, a obesidade não alterou a expressão de PD1 em células  $T_{FH}$  nos linfonodos mediastinais, mesmo após as sensibilizações e desafios com OVA (Fig. 23C). No entanto, houve menor expressão dessa molécula no baço de animais obesos, antes e após a exposição ao alérgeno, em comparação com os animais magros (Fig. 19D). Adicionalmente a frequência de células  $T_{FH}$  regulatórias ( $CD4^+CXCR5^+PD1^+Foxp3^+$ ), nos linfonodos mediastinais, foi maior em animais obesos após os desafios com OVA, em comparação com os animais magros alérgicos (Fig. 23E). Além disso, a frequência destas células foi maior no baço de animais obesos não expostos ao alérgeno em comparação com os animais controle, mesmo não havendo diferença entre alérgicos obesos e não obesos (Fig. 23F)



**Figura 21** - Estratégia de *gating* para seleção de linfócito T foliculares  $CD4^+CXCR5^+PD1^+$  nos linfonodos mediastinais. Imagens representativas da seleção das populações. Seleção de células por tamanho e granulosidade (A); seleção de linfócitos T foliculares ( $CD4^+CXCR5^+PD1^+$ ) e T foliculares regulatórias ( $CD4^+CXCR5^+PD1^+FOXP3^+$ ) (B). Os dados foram analisados através de teste de *t* de *student*, \* $p < 0.05$ , e expressos como média  $\pm$  EPM, ns - não significativo.  $n=6$ .



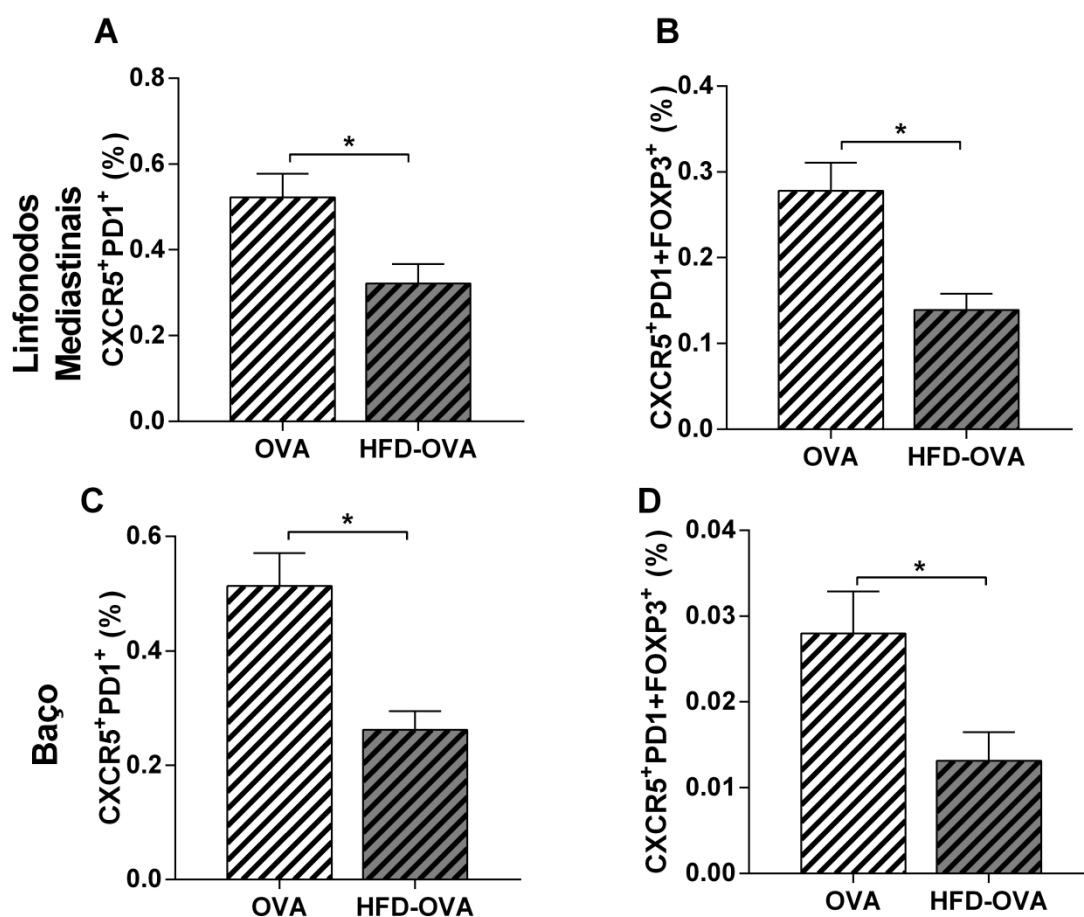
**Figura 22** - Estratégia de *gating* para seleção de linfócito T foliculares  $CD4^+CXCR5^+PD1^+$  no baço. Imagens representativas da seleção das populações. Seleção de células por tamanho e granulosidade (A); seleção de linfócitos T foliculares ( $CD4^+CXCR5^+PD1^+$ ) e T foliculares regulatórias ( $CD4^+CXCR5^+PD1^+Foxp3^+$ ) (B). Os dados foram analisados através de teste de *t de student*,  $*p < 0.05$ , e expressos como média  $\pm$  EPM, ns - não significativo.  $n=6$ .



**Figura 23** - Imunofenotipagem de linfócitos T foliculares nos órgãos linfoides periféricos. Frequência de linfócitos T foliculares (CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>), nos linfonodos mediastinais (A) e no baço (B); intensidade de fluorescência (MFI) de PD1 em células T<sub>FH</sub>, nos linfonodos mediastinais (C) e no baço (D); frequência de linfócitos T folicular regulatórios (T<sub>FR</sub> - CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>). Os dados foram analisados através de teste de *t de student*,  $p < 0,05$  (\*),  $n = 6$ .

#### 4.1.13 Obesidade causa redução na frequência de células T<sub>FR</sub> na sensibilização

Apesar da maior diferenciação de células T<sub>FR</sub> no baço de camundongos obesos alérgicos após os desafios com OVA, tanto o baço quanto os linfonodos de animais obesos apresentaram menor frequência dessa células em relação aos alérgicos não obesos 72h após a segunda sensibilização (Fig. 24A e C). Adicionalmente, células T<sub>FR</sub> também foram menos frequentes nos animais obesos alérgicos em comparação com os animais alérgicos magros (Fig. 24B e D).



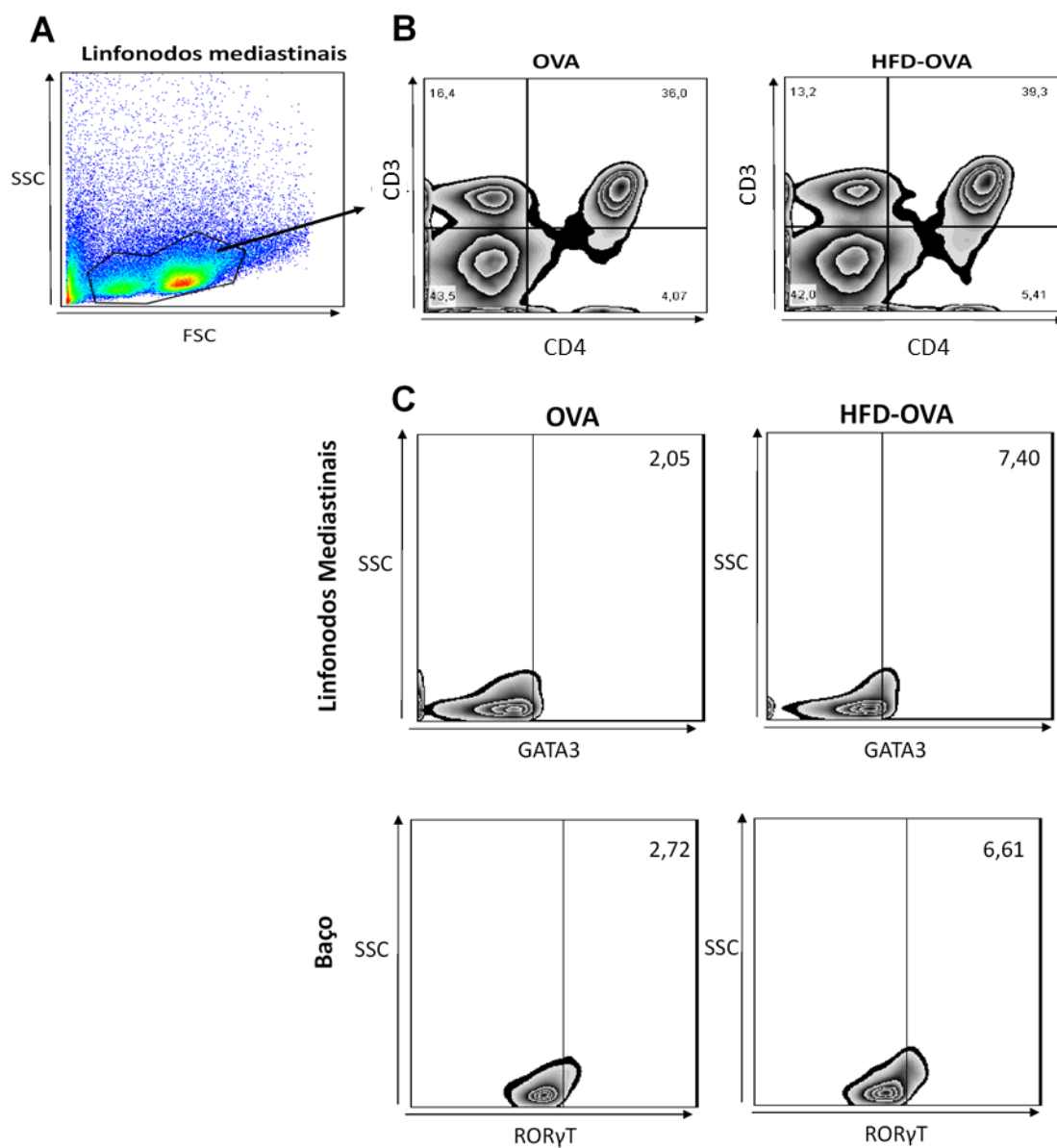
**Figura 24** - Imunofenotipagem de linfócitos T foliculares nos órgãos linfoides periféricos, 72h após a segunda sensibilização. Frequência de linfócitos T foliculares (CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>) (A) e T foliculares regulatórios (T<sub>FR</sub> - CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>) (B) nos linfonodos mediastinais. Frequência de linfócitos T foliculares (CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>) (C) e T foliculares regulatórios (T<sub>FR</sub> - CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>) (D) no baço. Os dados foram analisados através de teste de *t de student*, p<0,05 (\*), n=6.

#### **4.1.14 Obesidade causa aumento de linfócitos de perfil Th2 nos linfonodos e aumenta resposta de perfil Th17 após indução de alergia pulmonar**

Durante o estabelecimento de uma resposta imune alérgica, ocorre a diferenciação de linfócitos T auxiliares ( $T_H$ ) nos órgãos linfoides periféricos. Estas células contribuem para a produção de citocinas, que atuam no local de exposição ao alérgeno, mas também afetam a produção de anticorpos (LIN; FREEMAN; NUTMAN, 2018; MAJEWSKA-SZCZEPANIK et al., 2016). Nesse contexto, os subtipos de células  $T_H$  podem ser identificados pela expressão de diferentes fatores de transcrição, dentre eles GATA3 característico de células  $T_{H2}$ ; e  $ROR\gamma T$  característico de linfócitos  $T_{H17}$  (ZHU; PAUL, 2008). A estratégia de seleção das populações de linfócitos  $T_H$  expressando esses fatores de transcrição é demonstrada na figura 25.

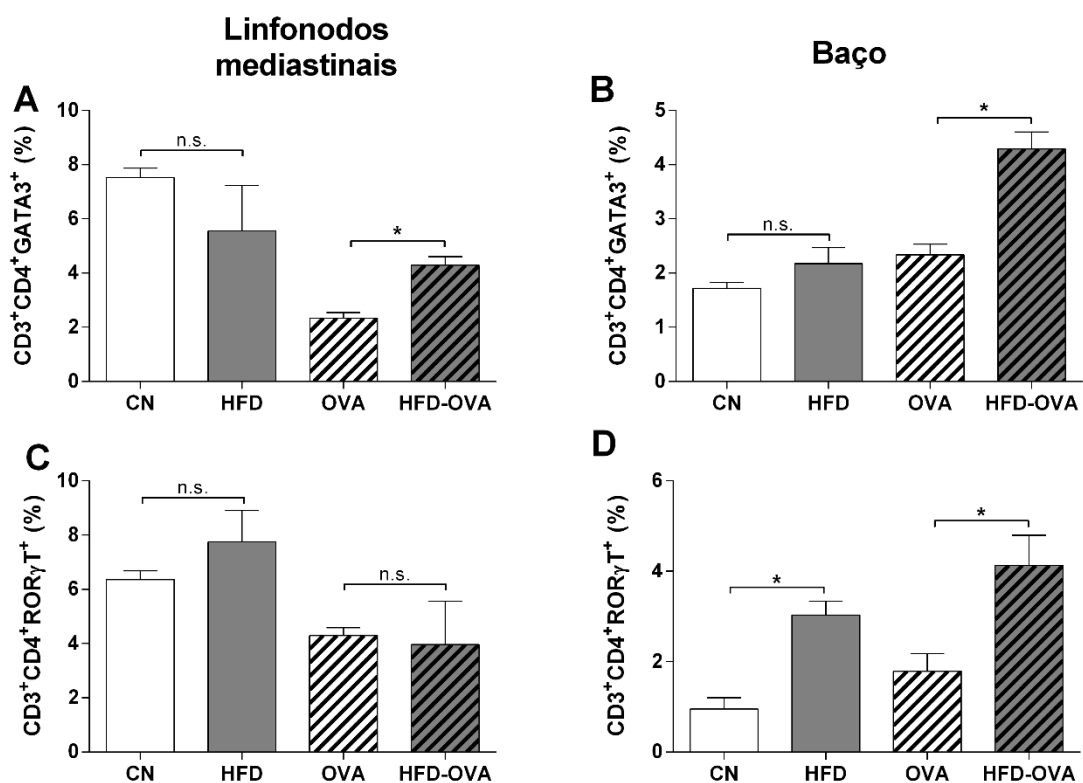
Animais não alérgicos, obesos e magros, não apresentaram diferenças significativas quanto a frequência de células  $T_H$  ( $CD3^+CD4^+$ ) expressando GATA3, tanto nos linfonodos mediastinais quanto no baço. Contudo, animais obesos alérgicos apresentaram uma frequência maior dessas células em comparação com animais alérgicos magros, em ambos os órgãos analisados (Fig. 26A-B).

Quanto as células  $T_H$  expressando  $ROR\gamma T$ , não houve diferença quanto a frequência dessas células entre animais obesos e magros, expostos ou não ao alérgeno, nos linfonodos mediastinais (Fig. 26C). Em contraposição a esses resultados, animais obesos apresentaram maior frequência destas células em comparação aos animais magros, tanto entre os animais expostos ao alérgeno quanto aos não expostos no baço (Fig. 26D).



**Figura 25** - Estratégia de *gating* para seleção de linfócito T auxiliares (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) expressando diferentes fatores de transcrição. Imagens representativas da seleção das populações. Seleção de células por tamanho e granulosidade (A); seleção de linfócitos T auxiliares (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) (B); Seleção de T<sub>H</sub> expressando GATA3 e RORγT (C). Os dados foram analisados através de teste de *t de student*, \**p*<0.05, e expressos como média +/- EPM, ns - não significativo. n=6.





**Figura 26** - Imunofenotipagem de Linfócitos T auxiliares (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) nos linfonodos mediastinais expressando diferentes fatores de transcrição. Frequência de linfócitos T<sub>H</sub> expressando GATA3 nos linfonodos mediastinais (A) e no baço (B). Frequência de linfócitos T<sub>H</sub> expressando RORγT nos linfonodos mediastinais (C) e no baço (D). Os dados foram analisados através de teste de *t de student*, \**p*<0.05, e expressos como média +/- EPM, ns - não significativo. n=6.

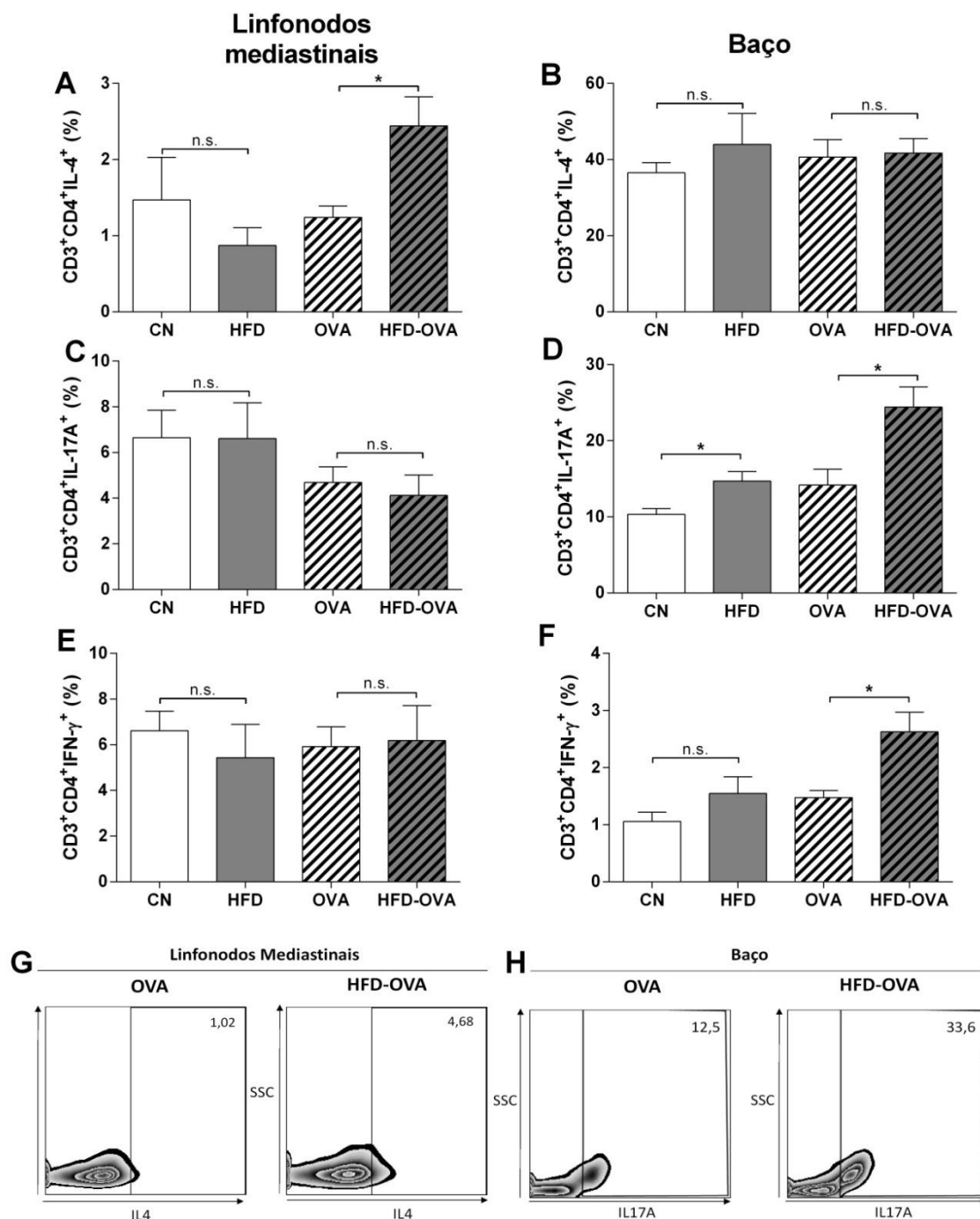
#### **4.1.15 Obesidade aumenta a produção de IL-4 por células T nos linfonodos mediastinais e de IL17A e IFN- $\gamma$ por células do baço, após indução de alergia pulmonar**

Tendo em vista que camundongos obesos e magros apresentaram diferenças na população de células T<sub>H</sub> expressando os fatores de transcrição característicos das resposta T<sub>H2</sub> e T<sub>H17</sub>, também foi avaliada a frequência de células produtoras de IL-4, IL17A e IFN $\gamma$  nos órgãos linfoides periféricos. O gráfico representativo das populações de células T<sub>H</sub> produtoras de IL-4 nos linfonodos e produtoras de IL-17A no baço estão representado nas figuras 27G e 27H, respectivamente.

Animais não expostos ao alérgeno, magros e obesos, apresentaram frequências semelhantes de células T<sub>H</sub> (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) produtoras de IL-4, porém, após as sensibilizações e desafios, animais obesos apresentaram maior frequência dessas células nos linfonodos mediastinais (Fig. 27A). Entretanto, no baço não houve diferença entre animais obesos alérgicos e alérgicos não obesos quanto a frequência dessas células (Fig. 27B), apesar do aumento demonstrado na expressão de GATA3 no grupo alérgico obeso (Fig. 27B).

Em conjunto com o observado quanto à expressão de ROR $\gamma$ T, animais obesos e magros, expostos ou não ao alérgeno não apresentaram diferença entre si quanto à frequência de células produtoras de IL17A nos linfonodos mediastinais (Fig. 27C). No entanto, animais obesos apresentaram maior produção desta citocina no baço, em relação aos animais controles. Adicionalmente essa diferença entre obesos e magros se manteve em animais sensibilizados e desafiados com OVA (Fig. 27D).

A frequência de células T produtoras de IFN- $\gamma$  também não foi alterada pela obesidade nos linfonodos mediastinais, tanto em animais não expostos à OVA, como naqueles sensibilizados e desafiados com o alérgeno (Fig. 27E). Apesar disso, no baço, houve maior frequência de células produtoras de IFN- $\gamma$  em animais obesos-alérgicos quando comparados aos alérgicos não obesos. Contudo, entre os animais não expostos ao alérgeno não houve diferença significativa quanto a frequência dessas células no baço (Fig. 27F).



**Figura 27** - Imunofenotipagem de Linfócitos T auxiliares ( $CD3^+CD4^+$ ) nos linfonodos mediastinais expressando diferentes citocinas. Frequência de linfócitos  $T_H$  expressando IL-4 nos linfonodos mediastinais (A) e no baço (B). Frequência de linfócitos  $T_H$  expressando  $ROR\gamma T$  nos linfonodos mediastinais (C) e no baço (D). Frequência de linfócitos  $T_H$  expressando  $IFN\gamma$  nos linfonodos mediastinais (E) e no baço (F). Imagens representativas das populações de  $CD3^+CD4^+IL-4^+$  nos linfonodos (G) e  $CD3^+CD4^+IL17A^+$  no baço (H). Os dados foram analisados através de teste de *t de student*, \* $p < 0.05$ , e expressos como média  $\pm$  EPM, ns - não significativo.  $n=6$ .

## **4.2 Tratamento com Azitromicina em modelo de Obesidade e Alergia Pulmonar induzida por Ovalbumina (OVA)**

O modelo apresentado anteriormente reflete um fenótipo de asma resistente às terapias padrão, com corticosteróides. Nesse contexto, têm-se investigado alternativas para tratar esses pacientes, e a azitromicina é uma das opções para contornar essa não-responsividade. Contudo os estudos sobre o tratamento com esse macrolídeo na asma ainda são incipientes e os resultados clínicos ainda divergem consideravelmente (GIBSON et al., 2017; KEW et al., 2015). Por isso nesse capítulo foi avaliado o efeito da azitromicina no modelo supracitado, sobretudo seus efeitos na resposta imune desenvolvida nos órgãos linfóides periféricos.

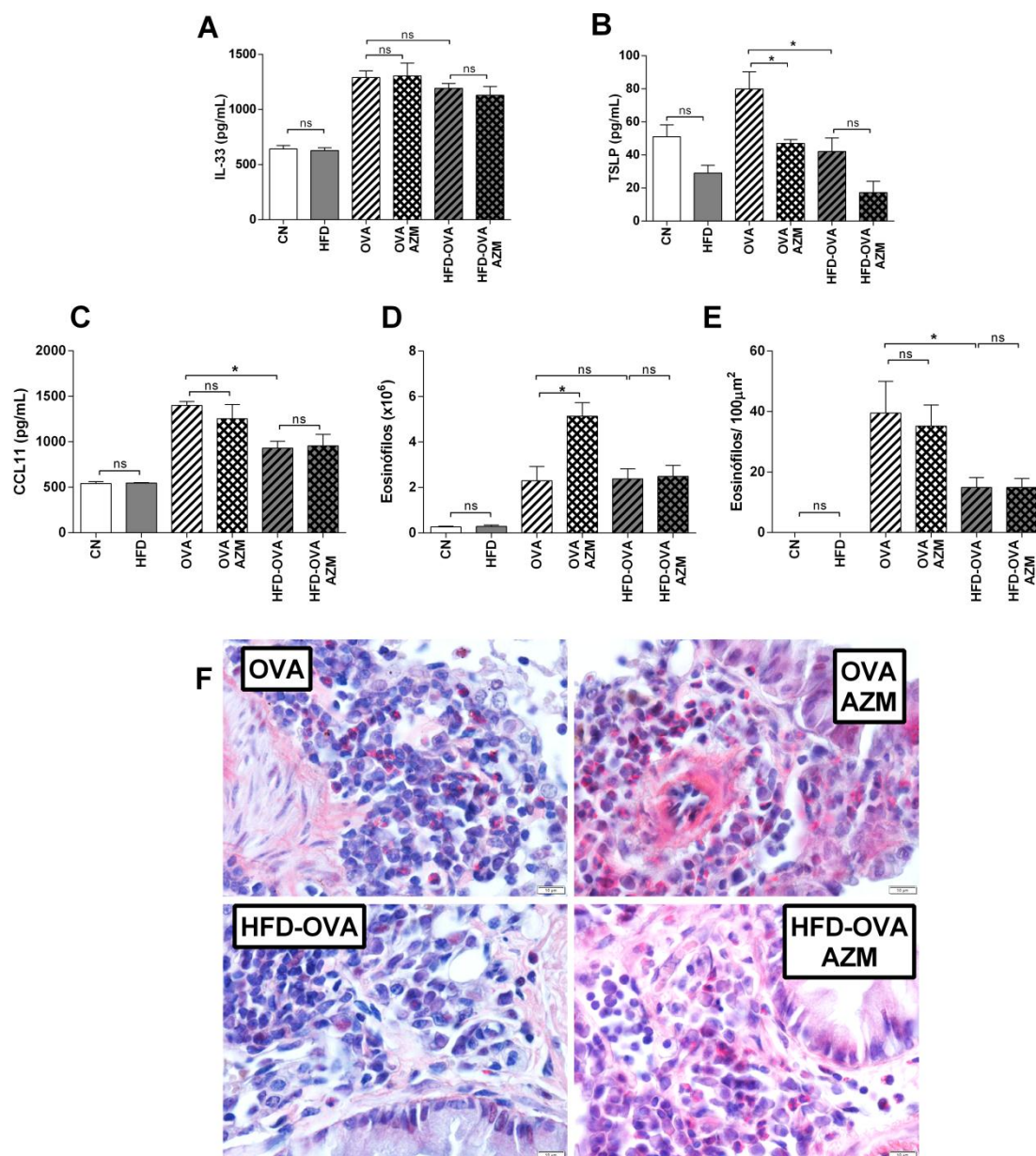
As análises de citometria nesse experimento foram realizadas às 24h após o último desafio com OVA em conjunto com as análises moleculares, contudo parâmetros sabidamente alterados às 48h foram quantificados em experimento a parte.

#### 4.2.1 Azitromicina não afeta fatores relacionados com resposta T<sub>H</sub>2/eosinofílica em animais obesos alérgicos

A resposta alérgica clássica se inicia com a ativação das células epiteliais, e com a liberação de citocinas específicas. Com o intuito de avaliar o efeito da azitromicina nessa resposta inicial, foram quantificadas, através de ELISA direto, as citocinas IL-33 e TSLP. Animais alérgicos apresentaram quantidades semelhantes de IL-33, independente do *status* obeso. Além disso o tratamento com azitromicina não alterou a quantidade dessa citocina, entre animais tratados e não-tratados (Fig. 28A). Diferentemente, obesos alérgicos apresentaram uma quantidade menor de TSLP do que os animais alérgicos magros, somado a isso, o tratamento com azitromicina reduziu a quantidade de TSLP em alérgicos magros, contudo animais alérgicos-obesos tratados, apresentaram tendência a menor produção dessa citocina, contudo sem diferença significativa (Fig. 28B).

Associados ao padrão observado nas citocinas epiteliais, obesos alérgicos também apresentaram uma menor quantidade de CCL11 no tecido pulmonar, entretanto o tratamento com azitromicina não afetou as concentrações dessa quimiocina no tecido pulmonar, na comparação entre os grupos tratados e não tratados, tanto magros quanto obesos (Fig. 28C).

Buscando compreender como essas modificações refletiram no estabelecimento da eosinofilia, foram contados os eosinófilos tanto na medula óssea extraídas de fêmures, como também no tecido pulmonar. Apesar de não haver diferenças quanto a quantidade de eosinófilos na medula óssea, na comparação entre alérgicos magros e obesos; a azitromicina induziu uma maior eosinofilia na medula óssea dos magros alérgicos. Entretanto a quantidade de eosinófilos nos animais alérgicos-obesos não foi alterada pelo tratamento (Fig. 28D). Em oposição aos resultados observados na medula óssea, animais obesos alérgicos apresentaram menor contagem de eosinófilos no tecido pulmonar. Porém a contagem de eosinófilos não foi afetada pelo tratamento tanto nos animais magros, como nos obesos (Fig. 28E-F).



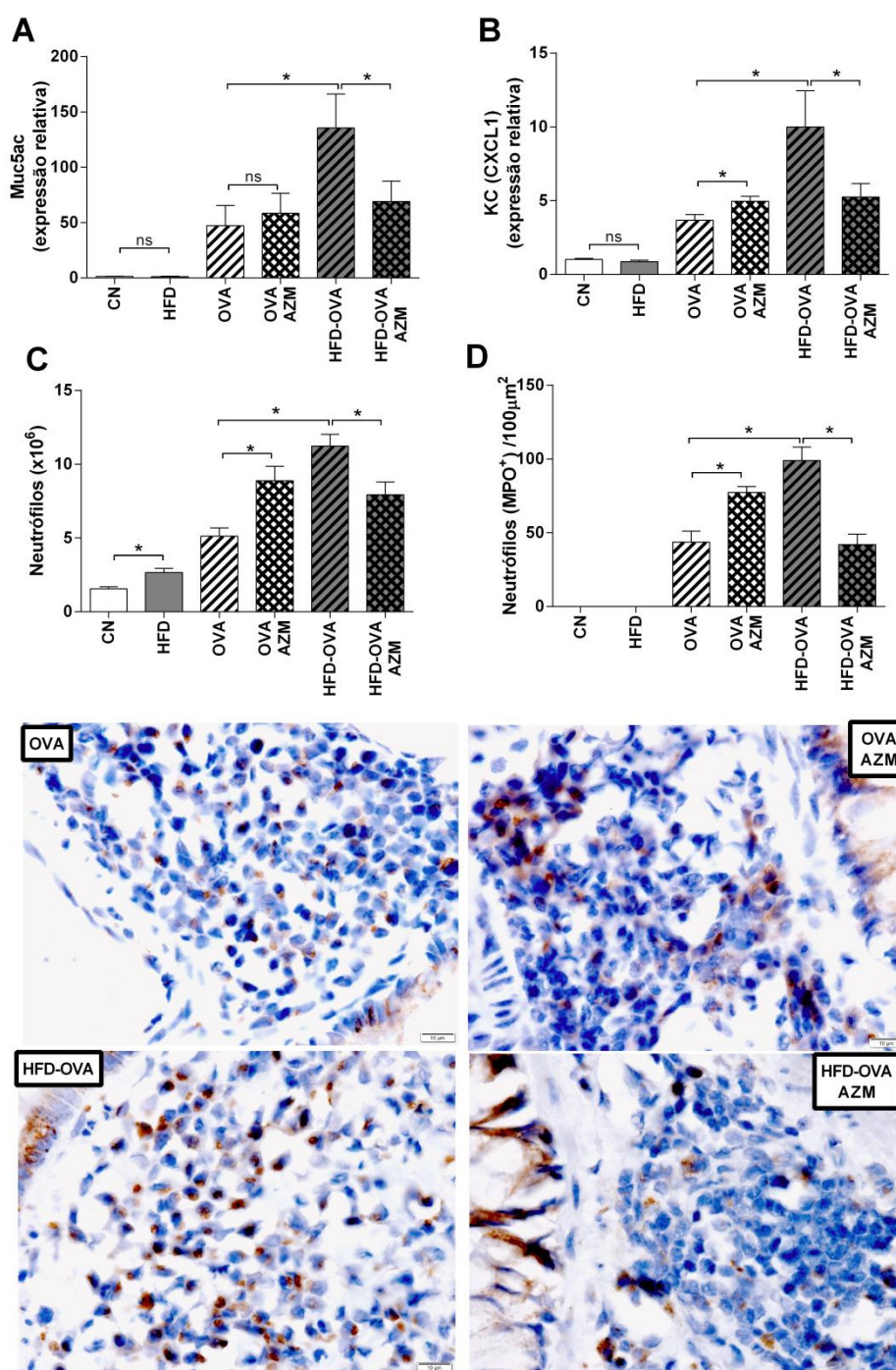
**Figura 28** - Reposta alérgica clássica, eosinofílica em animais tratados com azitromicina. Quantificação por ELISA direto das citocinas epiteliais IL-33 (A) e TSLP (B) e da quimiocina CCL11 (C) no tecido pulmonar. Contagem de eosinófilos no lavado da medula óssea, corado com panótipo rápido (D). Contagem de eosinófilos nos pulmões, análise realizada no infiltrado inflamatório na região peribroncovascular, corada com Sirius Red (E), imagem representativa de cada grupo (F). Os dados foram analisados através de teste de *t de student*, \* $p < 0.05$ , e expressos como média +/- EPM, ns - não significativo. n=6.

#### **4.2.2 Azitromicina reduz expressão de Muc5ac e perfil neutrofílico, causados pela obesidade durante o desenvolvimento da alergia pulmonar**

O aumento da produção de muco e a neutrofilia são importantes marcas da agravamento da asma alérgica. Portanto além de fatores relacionados à neutrofilia, foi avaliada também a expressão de *muc5ac*, gene relacionado com a hipersecreção de muco. Nesse contexto, animais obesos-alérgicos apresentaram uma maior expressão de *muc5ac* em relação aos animais alérgicos magros. Além disso a azitromicina levou a redução da expressão desse gene em animais alérgicos obesos, contudo não afetou a expressão do mesmo entre animais alérgicos magros (Fig. 29A).

A quimiocina KC, também conhecida como CXCL1, participa do recrutamento de neutrófilos, e foi altamente expressa entre os animais alérgicos obesos em relação aos alérgicos magros (Fig.29B). Esse aumento foi revertido pelo tratamento com azitromicina. Somado a isso animais alérgicos-magros tratados apresentaram maior expressão dessa quimiocina em relação aos alérgicos não tratados (Fig. 25B). O aumento de KC nos animais obesos alérgicos foi acompanhado pelo aumento de neutrófilos na medula óssea. Além disso animais obesos alérgicos tratados apresentaram redução dessa neutrofilia na medula, ao passo que nos animais alérgicos magros o tratamento causou o aumento da contagem de neutrófilos (Fig. 29C).

De forma semelhante ao observado na medula óssea, animais obesos alérgicos também apresentaram maior quantidade de neutrófilos no infiltrado inflamatório da região peribroncovascular, em comparação com os alérgicos magros. Adicionalmente, o tratamento com azitromicina reduziu a quantidade de neutrófilos nos pulmões de animais obesos alérgicos, enquanto aumentou o número dessas células entre os alérgicos magros (Fig. 29D-E).



**Figura 29** - Expressão de *muc5ac* e neutrofilia frente ao tratamento com azitromicina. Expressão de gênica, no tecido pulmonar, normalizada com  $\beta$ -actina, em relação ao controle; *muc5ac* (A) e KC (*cxcl1*) (B). Contagem de neutrófilos na medula óssea corada com panótipo rápido (C). Contagem de neutrófilos no infiltrado inflamatório na região peribroncovascular, obtido por marcação por imunohistoquímica com anticorpo anti-MPO (D). Imagem representativa da marcação de MPO. Dados obtidos 24h após o último desafio. Os dados foram analisados através de teste de *t de student*,  $*p < 0.05$ , e expressos como média  $\pm$  EPM, ns - não significativo.  $n=6$ .



### 4.2.3 Tratamento com azitromicina promove recuperação de população de células B regulatórias (PDL1<sup>high</sup>) e diminui a ativação de células B convencionais

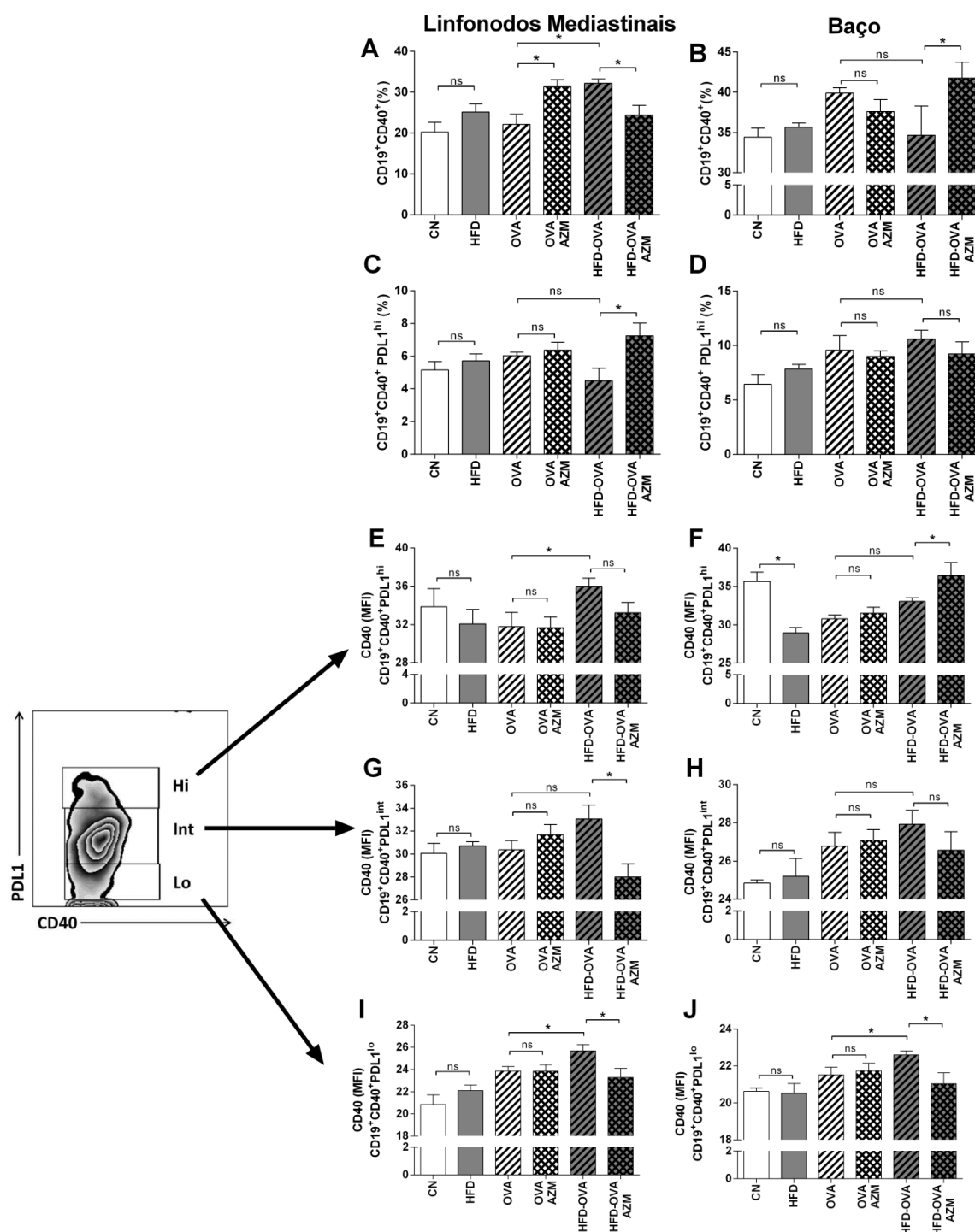
Com o intuito de avaliar os efeitos da azitromicina nas populações de células B, sobretudo na indução de um perfil regulatório, foi feita a imunofenotipagem de células B (CD19<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>) no baço e linfonodo após o tratamento com azitromicina. Às 24h obesos alérgicos apresentam maior frequência de células B nos linfonodos mediastinais do que os animais alérgicos não-obesos (Fig. 30A), ao passo que no baço tendeu a ocorrer o inverso (Fig. 30B). Adicionalmente, após o tratamento a azitromicina exerceu papéis distintos em animais magros e obesos, causando o aumento da população de células B nos linfonodos mediastinais de animais alérgicos magros, e diminuindo a mesma população nos alérgicos obesos (Fig. 26A). Ao passo que, no baço, o medicamento levou ao aumento da população de linfócitos B nos obesos alérgicos (Fig. 30B).

Quanto a população de linfócitos B regulatórios (PDL1<sup>high</sup>), a azitromicina levou ao aumento da frequência dessas células nos linfonodos mediastinais dos animais obesos alérgicos, enquanto não exerceu nenhum efeito sobre a mesma população nos animais alérgicos magros (Fig. 30C). Além disso, animais obesos alérgicos tratados não apresentaram diferença quanto a expressão de CD40 na população de células B PDL1<sup>high</sup> em comparação com o grupo obeso alérgico não tratado (Fig. 30E). Diferentemente, o medicamento não exerceu nenhum efeito sobre essa população no baço, tanto para animais alérgicos magros, como para os obesos (Fig. 30D). Entretanto o tratamento com a azitromicina causou o aumento da expressão de CD40 nos linfócitos B PDL1<sup>high</sup> no baço de em animais obesos alérgicos (Fig. 30F).

Nesse contexto, linfócitos B expressando níveis intermediários de PDL1, que exercem sua função regulatória via produção de IL-10, apresentaram uma menor expressão de CD40 em animais obesos alérgicos tratados em relação aos não tratados. Contudo o medicamento não exerceu o mesmo efeito entre os animais magros (Fig. 30G). Ao passo que o tratamento com azitromicina não afetou a

expressão de CD40 nessa população no baço, tanto de animais magros alérgicos, como entre os obesos (Fig. 30H).

Levando em consideração as alterações causadas nas populações de linfócitos B regulatórios, também foi feita a análise da expressão de CD40 entre as células B convencionais, com baixos níveis de expressão de PDL1. Foi observado que tanto nos linfonodos mediastinais, quanto no baço, houve uma maior expressão de CD40 nessa população de linfócitos B em animais obesos alérgicos em relação aos alérgicos magros, o qual foi revertido pelo tratamento com a azitromicina. Porém, não houve diferença entre os animais magros alérgicos, tratados ou não, quanto a esse parâmetro (Fig. 30I-J)



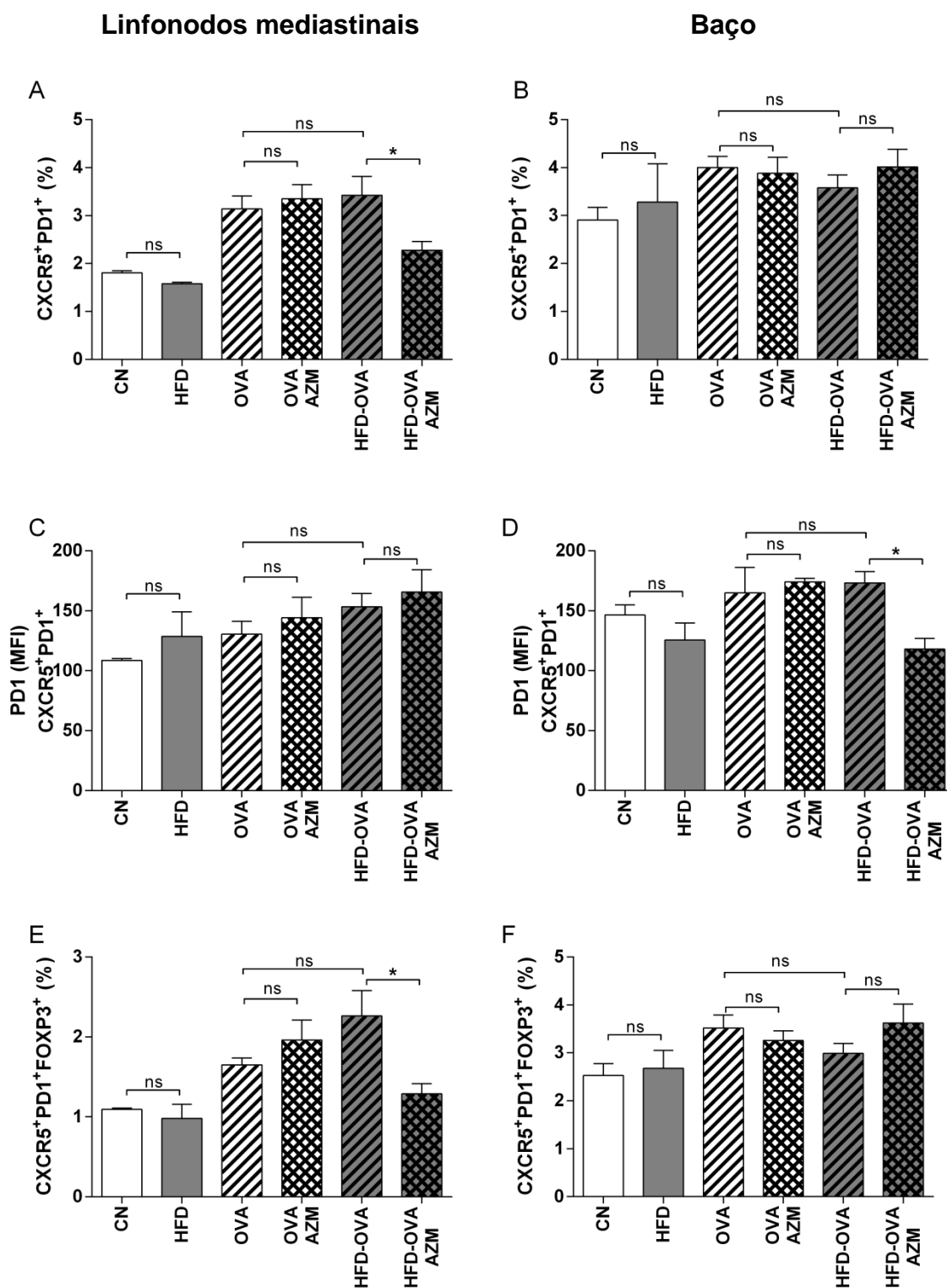
**Figura 30** - Imunofenotipagem de Linfócitos B CD19<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>, em linfonodos mediastinais e baço, em animais tratados com azitromicina. Frequências de linfócitos B CD19<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup> (A, B) e CD19<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>PDL1<sup>high</sup> (C, D) no linfonodo e baço respectivamente. Nível de expressão de CD40 em Linfócitos B PDL1<sup>hi</sup> (E, F), PDL1<sup>int</sup> (G, H) e PDL1<sup>low</sup> (I, J). Dados obtidos 24h após o último desafio. Os dados foram analisados através de teste de *t de student*, \**p*<0.05, e expressos como média +/- EPM, ns - não significativo. n=6.

#### **4.2.4 Azitromicina reduz a frequência de linfócitos $T_{FH}$ nos linfonodos e a expressão de PD1 no baço**

Sabendo-se que o tratamento com a azitromicina é capaz de alterar tanto a frequência quanto a ativação das diferentes populações de linfócitos B, e que essas células interagem com linfócito  $T_{FH}$  nos centros germinativos, foi avaliado o perfil desse subtipo de linfócito T tanto nos linfonodos mediastinais como no baço de animais tratados com a azitromicina. Às 24h após o último desafio, apesar dos grupos alérgicos, magro e obeso, não apresentarem diferença entre si quanto a frequência de linfócitos  $T_{FH}$  ( $CD4^+CXCR5^+PD1^+$ ), o tratamento reduziu a frequência dessas células nos linfonodos de animais obesos alérgicos, sem afetar a mesma população nos animais alérgicos magros (Fig. 31A). Diferentemente, no baço, o tratamento não afetou a frequência dessas células (Fig. 31B).

A expressão de PD1, tem um importante papel na funcionalidade de linfócitos  $T_{FH}$ , contudo a azitromicina não afetou a expressão dessa molécula nos linfonodos mediastinais (Fig. 31C). Porém, animais obesos alérgicos tratados com o medicamento apresentaram uma menor expressão dessa molécula, no baço, em relação aos animais não tratados. Ao passo que animais magros e alérgicos, também tratados não apresentaram diferenças quanto aos seus correspondentes não tratados (Fig. 31D).

Quanto a frequência de linfócitos T foliculares regulatórios ( $T_{FR}$ ), animais obesos alérgicos tratados com azitromicina apresentaram menor frequência destas células em relação aos não-tratados. Contudo, a azitromicina não afetou a mesma população nos animais alérgicos não-obesos (Fig. 31E). Paralelamente, o tratamento não afetou a frequência desses linfócitos no baço (Fig. 31F).

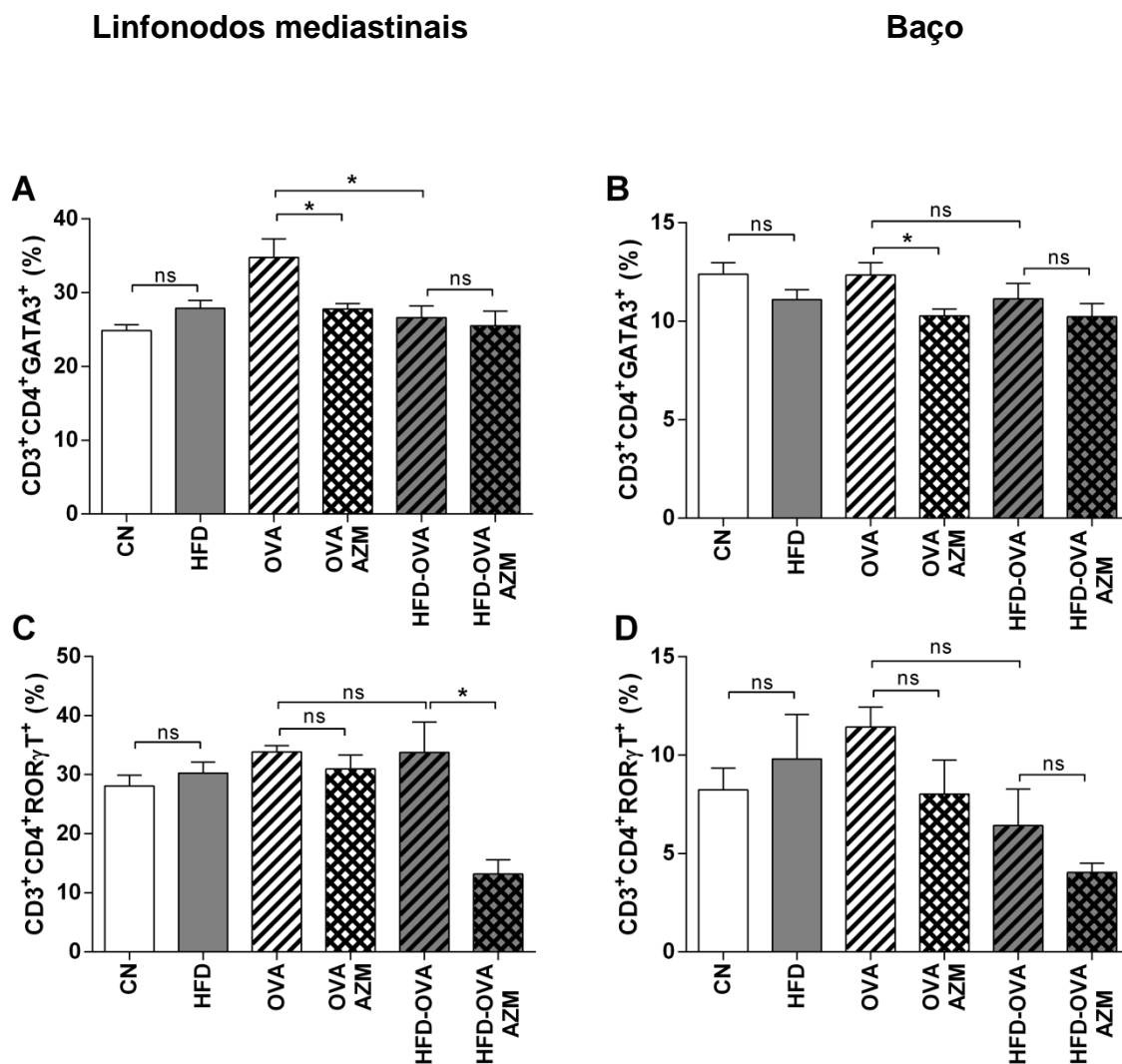


**Figura 31** - Imunofenotipagem de linfócitos T foliculares nos órgãos linfoides periféricos, em animais tratados com azitromicina. Frequência de linfócitos T foliculares (CD4+CXCR5+PD1+), nos linfonodos mediastinais (A) e no baço (B); intensidade de fluorescência (MFI) de PD1 em células  $T_{FH}$ , nos linfonodos mediastinais (C) e no baço (D); frequência de linfócitos T folicular regulatórios ( $T_{FR}$  - CD4+CXCR5+PD1+). Os dados foram analisados através de teste de *t de student*, \* $p < 0.05$ , e expressos como média +/- EPM, ns - não significativo.  $n = 6$ .

#### **4.2.5 Azitromicina reduz tanto a expressão de GATA3 em animais magros alérgicos e de ROR $\gamma$ T em animais obesos alérgicos**

A expressão de GATA3 e ROR $\gamma$ T indicam o comprometimento com os perfis de linfócitos T auxiliares T<sub>H</sub>2 e T<sub>H</sub>17, respectivamente. Portanto, foi avaliada a frequência de células T<sub>H</sub> expressando essas moléculas, após o tratamento com azitromicina, tendo em vista que esses dois perfis tem grande importância no desenvolvimento da alergia pulmonar. Às 24h após o último desafio com a OVA, a frequência de linfócitos T<sub>H</sub> (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) expressando GATA3 foi menor em animais obesos-alérgicos em relação ao animais alérgicos magros. Além disso o tratamento com a azitromicina reduziu a frequência destas células nos animais magros, sem afetar sua frequência nos obesos alérgicos (Fig. 32A). Ao mesmo tempo, apesar de não haver diferença entre alérgicos magros e obesos quanto a frequência de linfócitos T GATA3<sup>+</sup>, no baço, o tratamento com azitromicina diminuiu essa população em animais magros alérgicos, sem afetá-la em animais alérgicos-obesos (Fig. 32B).

No que diz respeito a células T<sub>H</sub> ROR $\gamma$ T<sup>+</sup>, não houve diferença quanto a frequência das mesma entre animais alérgicos obesos e magros, nos linfonodos mediastinais. Entretanto, o tratamento com azitromicina reduziu a frequência dessa população em animais alérgico obesos, sem afetar os animais magros. Em contrapartida, no baço, não houve diferença significativa entre animais tratados ou não, na frequência dessas células.



**Figura 32** - Imunofenotipagem de Linfócitos T auxiliares ( $CD3^+CD4^+$ ) nos linfonodos mediastinais expressando diferentes fatores de transcrição, em animais tratados com azitromicina. Frequência de linfócitos  $T_H$  expressando GATA3 nos linfonodos mediastinais (A) e no baço (B). Frequência de linfócitos  $T_H$  expressando  $ROR\gamma T$  nos linfonodos mediastinais (C) e no baço (D). Os dados foram analisados através de teste de *t de student*,  $*p < 0.05$ , e expressos como média  $\pm$  EPM, ns - não significativo.  $n=6$ .

#### **4.2.6 Azitromicina reduz a frequência de células produtoras de IL-4, IL17A e IFN $\gamma$ no linfonodo, e recupera células produtoras de IL-4 no baço**

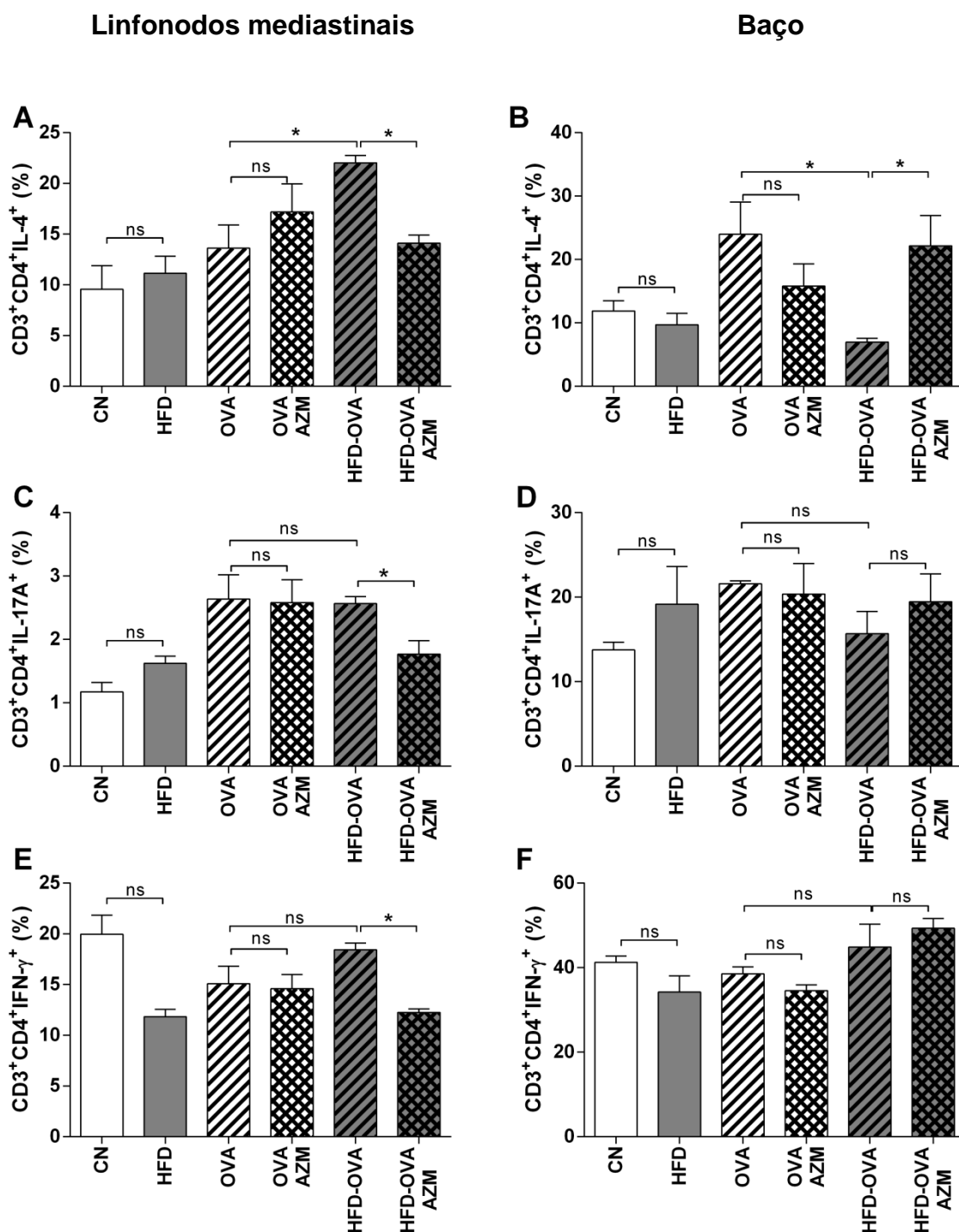
As citocinas IL-4, IL-17A e IFN- $\gamma$  são produzidas dentre outras células, por linfócitos T<sub>H2</sub>, T<sub>H17</sub> e T<sub>H1</sub> respectivamente, e possuem diversas funções, inclusive afetando a produção de anticorpos, que terão grande impacto no desenvolvimento de doenças alérgicas. No presente trabalho foi avaliada a frequência de células produtoras dessas citocinas nos linfonodos mediastinais e no baço.

Nesse contexto foi observado que às 24h, animais obesos alérgicos apresentavam uma maior frequência de células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> produtoras de IL-4, contudo o tratamento com azitromicina reduziu a frequência da mesma nesses animais. Entretanto essas células não foram afetadas pelo tratamento com azitromicina em animais alérgicos magros (Fig. 33A). Ao passo que a população esplênica de linfócitos T produtores de IL-4 se encontrava reduzida em animais obesos alérgicos em comparação com os alérgicos magros, porém essa população foi recuperada pelo tratamento com azitromicina (Fig. 33B).

Apesar de não haver diferenças entre obesos alérgicos e magros quanto a frequência de células T<sub>H</sub> produtoras de IL-17A nos linfonodos mediastinais, o tratamento com a azitromicina reduziu a frequência dessas células nos animais obesos alérgicos, mas sem afetar os animais alérgicos magros (Fig. 33C). Para este tempo, não houve diferença quanto a frequência dessa população no baço, entre alérgicos magros e obesos, tampouco em comparação com os grupos que receberam o tratamento (Fig. 33D).

De forma semelhante às células produtoras de IL-17A, a frequências de células T<sub>H</sub> produtoras de IFN- $\gamma$  não foi diferente entre animais alérgicos, magros e obesos neste tempo de coleta. Todavia, o tratamento com azitromicina diminuiu as mesmas nos animais obesos alérgicos, efeito que não foi observado entre os animais magros (Fig. 33E). Além disso, não houve diferença entre os grupos alérgicos, magros e obesos, quanto a frequência desses linfócitos no baço, e o tratamento com azitromicina também não afetou sua frequência (Fig. 33F).



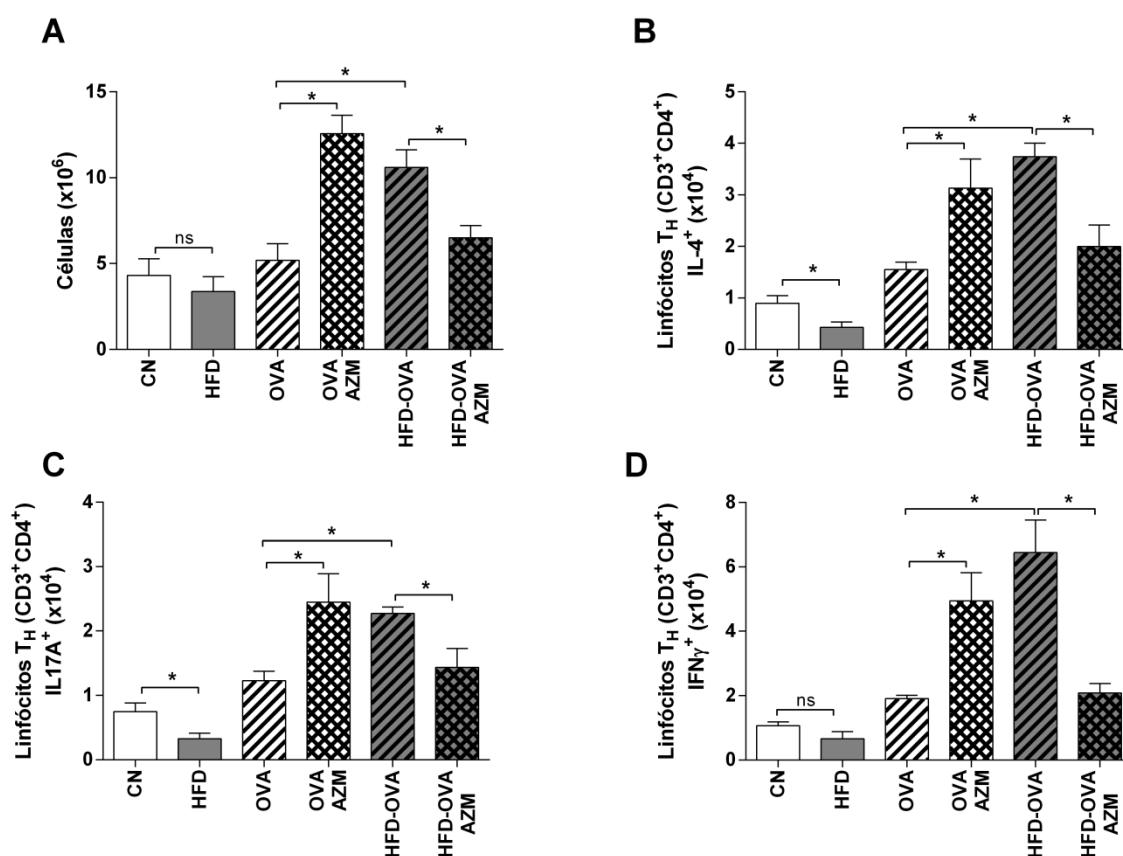


**Figura 33** - Imunofenotipagem de Linfócitos T auxiliares (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) nos linfonodos mediastinais expressando diferentes citocinas, em animais tratados com azitromicina. Frequência de linfócitos T<sub>H</sub> expressando IL-4 (A, B), IL-17A (C, D) e IFN $\gamma$  (E, F), nos linfonodos mediastinais e no baço respectivamente. Os dados foram analisados através de teste de *t de student*, \* $p < 0.05$ , e expressos como média +/- EPM, ns - não significativo. n=6.

#### **4.2.7 Azitromicina reverte aumento no número de células produtoras de IL-4, IL-17A e IFN- $\gamma$**

Enquanto no linfonodo e no baço não houve diferença na contagem de células nas comparações feitas (dados não mostrados), nos pulmões o tratamento causou o aumento do número de células nos animais alérgicos magros, ao passo que reverteu o aumento do número de células causado pela obesidade durante a indução da alergia pulmonar (Fig. 30A). Apesar de não haver diferença entre o número total de células entre os animais não alérgicos obesos e magros (Fig. 34A). Animais obesos apresentaram menor quantidade de células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> produtoras de IL-4 e IL17A (Fig. 34B-C), contudo apresentaram quantidades semelhantes das mesmas células produzindo IFN- $\gamma$ .

Animais obesos alérgicos apresentaram uma maior quantidade de linfócitos T<sub>H</sub> produtores de IL-4, IL-17A e IFN- $\gamma$ , em relação aos alérgicos magros. No entanto, o tratamento com a azitromicina levou ao aumento no número de células produtoras dessas citocinas nos animais alérgicos magros, ao passo que diminuiu o número das mesmas nos animais obesos alérgicos (Fig. 34B-D).

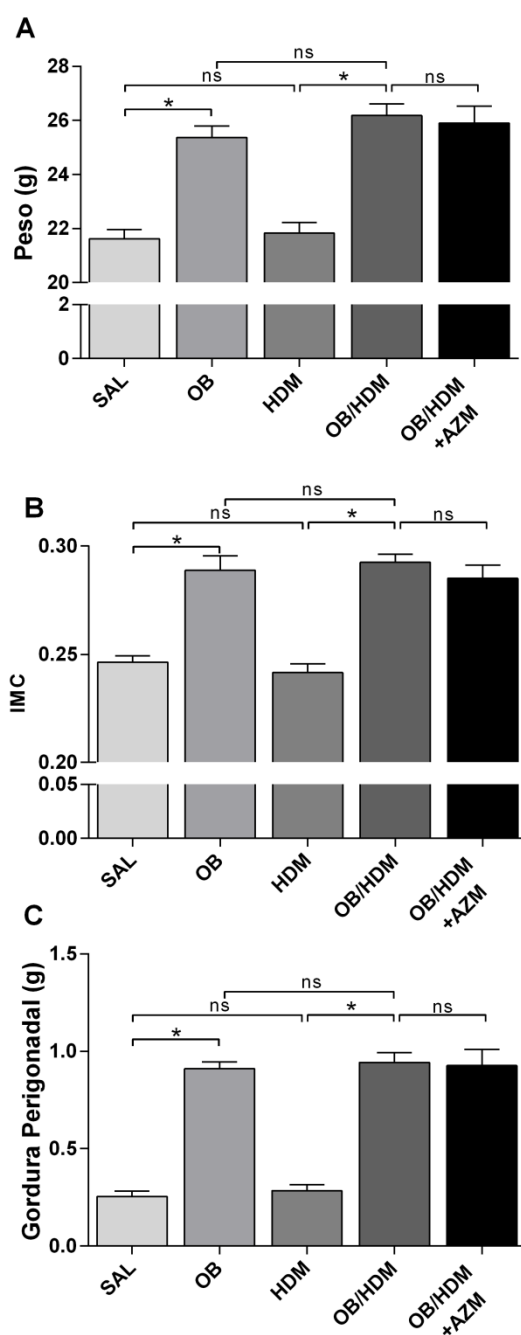


**Figura 34** - Imunofenotipagem de Linfócitos T auxiliares (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) nos pulmões expressando diferentes citocinas, em animais tratados com azitromicina. Contagem total de células no pulmão (A) Número absoluto de linfócitos  $T_H$  expressando IL-4 (B), IL-17A (C) e IFN $\gamma$  (D). Os dados foram analisados através de teste de *t de student*,  $*p < 0.05$ , e expressos como média  $\pm$  EPM, ns - não significativo.  $n=6$ .

### **4.3 Modelo de Obesidade e Alergia Pulmonar com Ácaro da Poeira Doméstica (HDM do inglês: *House Dust Mite*) e tratamento com azitromicina**

#### **4.3.1 Indução de obesidade**

Os camundongos Balb/c alimentados com dieta rica em gordura (HFD – 60% de calorias provenientes de gordura) levou ao aumento do peso ao final do protocolo (Fig. 35A), bem como o aumento do índice de massa corporal - IMC (Fig. 35B). Adicionalmente, os animais obesos apresentaram gordura perigonadal maior que os animais alimentados com a dieta padrão (Fig. 35C). Também é importante observar que os grupos obesos não apresentaram diferença entre si, da mesma forma que os grupos não-obesos também foram estatisticamente semelhantes entre si.

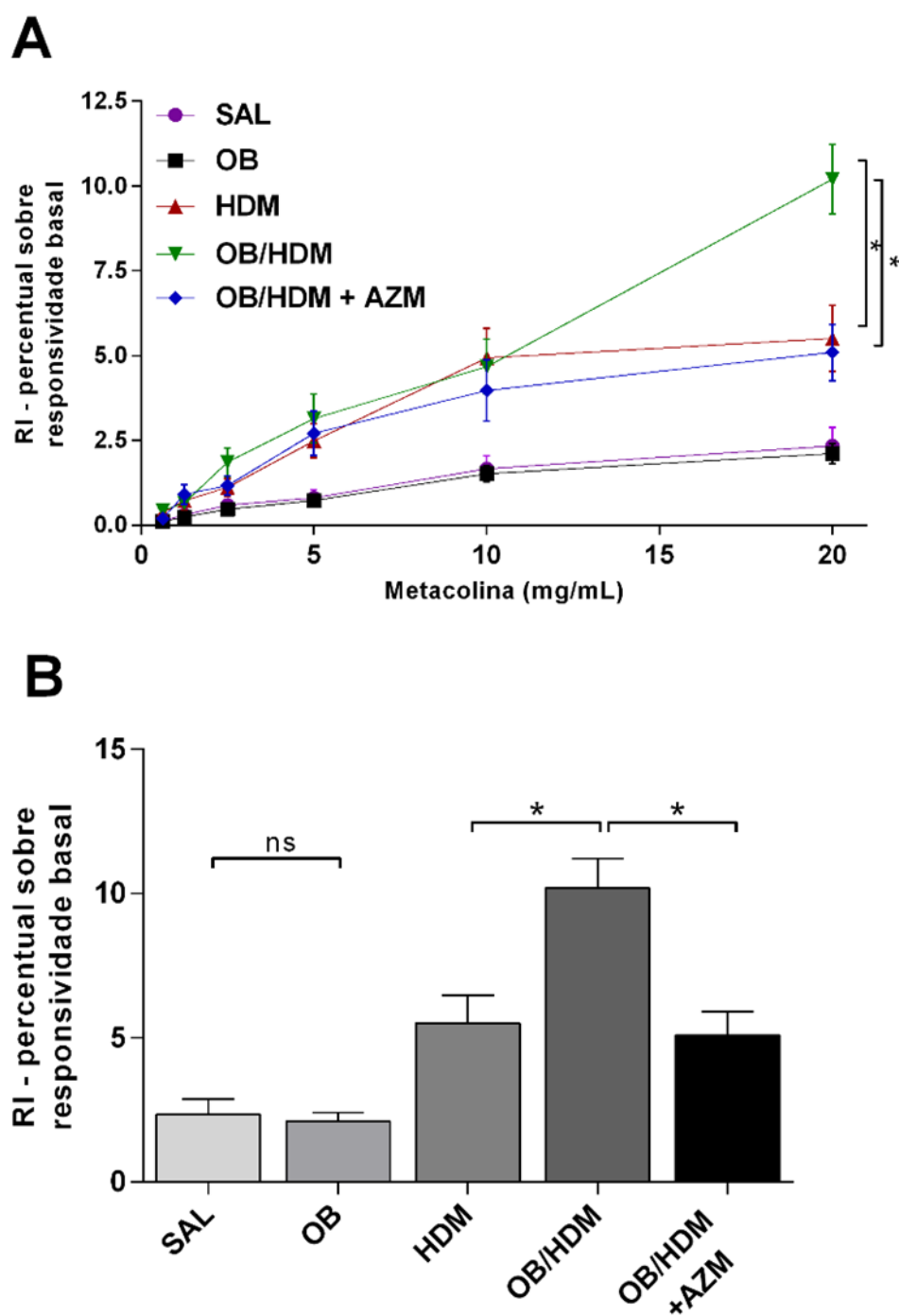


**Figura 35** - Avaliação da obesidade em modelo de HDM. Peso dos animais no dia da eutanásia (A), índice de massa corporal também obtido no momento da eutanásia utilizando as medidas de peso e altura do camundongo  $IMC = \text{peso}/\text{altura}^2$  (B), peso da gordura perigonadal retirada após eutanásia (C). Os dados foram analisados através de teste de *t de student*,  $*p < 0.05$ , e expressos como média  $\pm$  EPM, ns - não significativo.  $n=6$ .

### **4.3.2 Obesidade aumenta a hiperresponsividade brônquica na alergia pulmonar contudo esse efeito é revertido pela azitromicina**

Com o intuito de avaliar as modificações fisiológicas causadas pela obesidade no modelo de asma alérgica, foi feita a avaliação da hiperresponsividade brônquica em crescentes concentrações de metacolina. O aumento deste parâmetro indica a obstrução do fluxo aéreo causada pela contração da musculatura lisa brônquica.

Apesar do aumento contínuo da hiperresponsividade brônquica entre os animais alérgicos, animais obesos alérgicos apresentam responsividade a metacolina semelhante à dos alérgicos magros até a concentração de 10 mg/mL (Fig. 36A). Contudo, na concentração de 20 mg/mL, os animais obesos-alérgicos apresentaram maior responsividade que seus correspondentes magros. O tratamento com azitromicina levou à redução desse parâmetro. Adicionalmente, os grupos não alérgicos não apresentaram diferenças entre si, independente do *status* obeso (Fig. 36B).



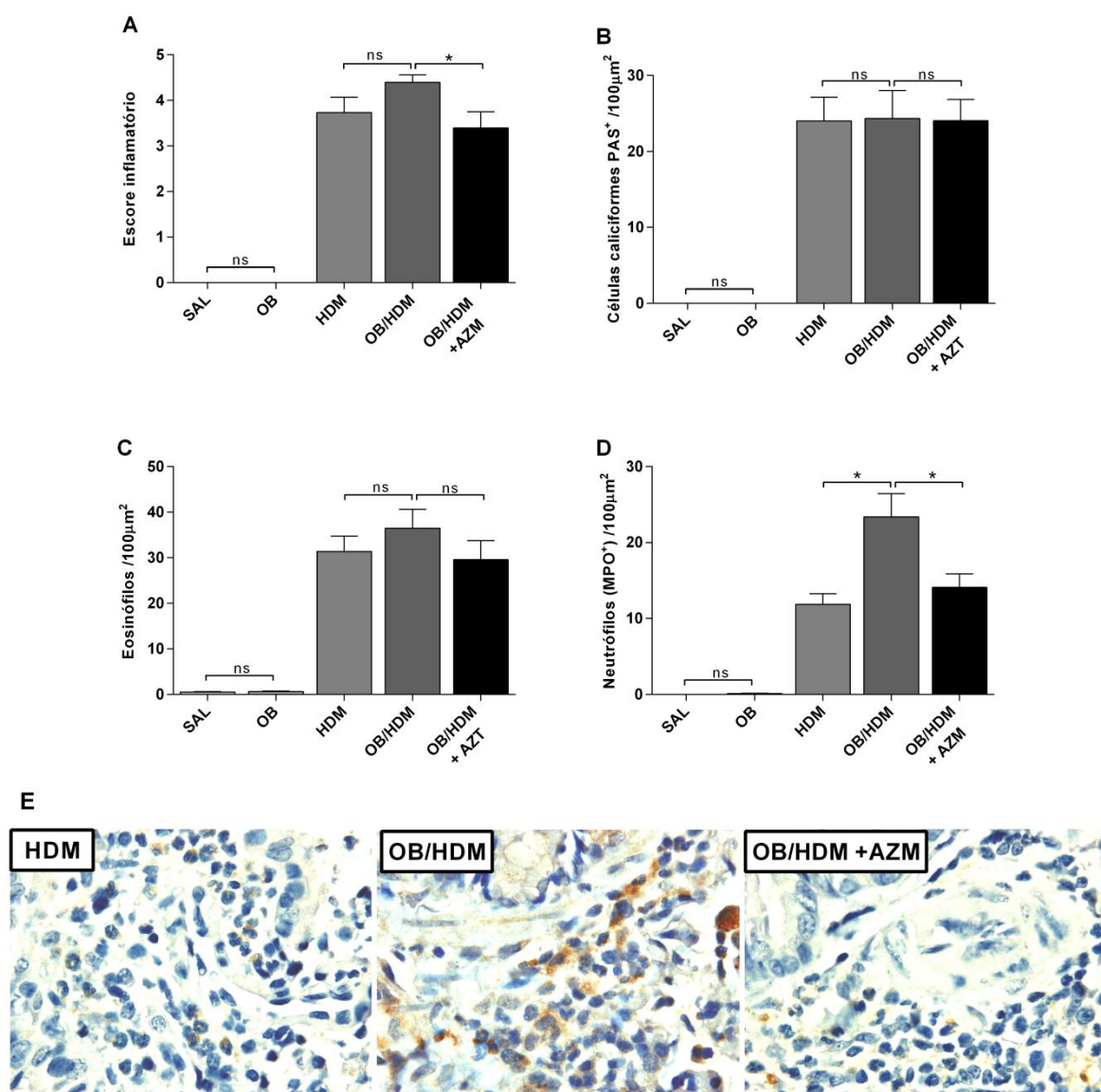
**Figura 36** - Avaliação da função pulmonar em modelo de HDM. Hiperresponsividade brônquica medida mediante exposição a concentrações crescentes de metacolina, de 0 (responsividade base) a 20 mg/mL (A). Resistência brônquica na provocação com 20 mg/mL de metacolina (B). Os dados foram analisados através de teste de *t de student*,  $*p < 0.05$ , e expressos como média  $\pm$  EPM, ns - não significativo.  $n=6$ .

### **4.3.3 Obesidade induz aumento de infiltrado neutrofílico na alergia pulmonar induzida por HDM, que é reduzido pelo tratamento com Azitromicina**

Em todos os parâmetros histológicos avaliados (escore inflamatório, células caliciformes produtoras de muco, infiltrado eosinofílico e infiltrado neutrofílico), não houve diferença entre os grupos controle não-obeso e obeso (SAL e OB) nos quais não foi induzida a alergia pulmonar por HDM (Fig. 37 A-D). Animais obesos-alérgicos não apresentaram diferença em relação aos alérgicos não-obesos quanto ao escore inflamatório, produção de muco e contagem de eosinófilos (Fig. 37A-C). No entanto o infiltrado de neutrófilos foi significativamente maior nos animais obesos alérgicos em comparação com os animais alérgicos e não-obesos.

O tratamento com azitromicina não foi capaz de reduzir a produção de muco ou a contagem de eosinófilos, contudo o escore inflamatório nos animais obesos alérgicos tratados com azitromicina foi significativamente menor que o escore dos animais obesos alérgicos que não receberam tratamento durante os desafios (Fig. 37A). Adicionalmente, o aumento do infiltrado de neutrófilos observado nos animais obesos alérgicos foi revertido com o tratamento com azitromicina, onde a contagem dos mesmos foi significativamente mais baixa (Fig. 37D-E).





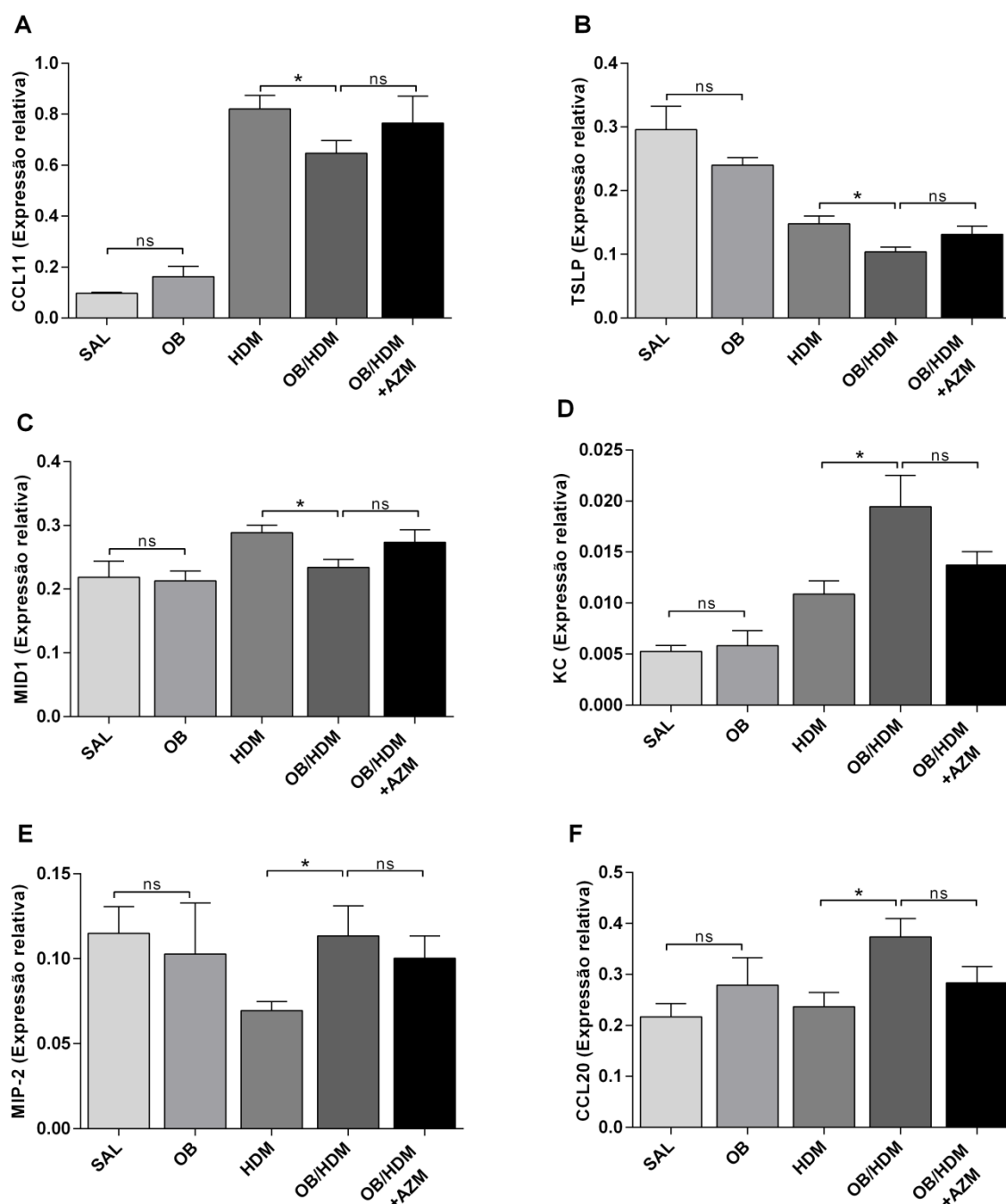
**Figura 37** – Avaliação histológica do pulmão em modelo alergia pulmonar induzida por HDM e obesidade induzida por HFD. Avaliação do escore inflamatório (A) Contagem de células calciformes coradas com Ácido Periódico de Schieff (PAS) (B); quantificação de eosinófilos em coloração de hematoxilina e eosina (HE); Contagem de células marcadas com anticorpos anti-MPO (C). Os dados foram analisados através de teste de *t de student*,  $*p < 0.05$ , e expressos como média +/- EPM, ns - não significativo. n=6.

#### **4.3.4 Obesidade reduz parâmetros relacionados à resposta eosinofílica/T<sub>H</sub>2 aumenta resposta de perfil neutrofílico/T<sub>H</sub>17 nas vias aéreas, e azitromicina não afeta esses parâmetros**

Com o intuito de avaliar a resposta imune nas vias aéreas e células associadas, foi feita a dissecação cega, para remoção do parênquima pulmonar. A avaliação da expressão relativa tanto de fatores relacionados à resposta eosinofílica/T<sub>H</sub>2 quanto à de perfil neutrofílico/T<sub>H</sub>17 não indicou diferença entre os animais não alérgicos, obesos ou magros, para nenhum dos parâmetros avaliados.

Animais obesos alérgicos apresentaram menor expressão da quimiocina CCL11, responsável pelo recrutamento de eosinófilos, em comparação com os animais alérgicos magros (Fig. 38A). Estes animais também apresentaram reduzida expressão da citocina epitelial TSLP e de MID1, proteína altamente expressa durante respostas alérgicas (COLLISON *et al.*, 2013; COLLISON *et al.*, 2015), que diminui a atividade da fosfatase-2A, reguladora da via do NF-κB (Fig. 38B-C). Apesar de haver uma tendência ao aumento na expressão gênica para esses parâmetros, causado pelo tratamento com a azitromicina, não houve diferença significativa entre os animais alérgicos tratados e não-tratados.

A resposta neutrofílica é uma marca importante da piora da asma (RAY; KOLLS, 2017b). No presente estudo, animais obesos alérgicos apresentaram uma maior expressão de KC, MIP-2 e CCL20, fatores quimiotáticos para neutrófilos, em comparação aos animais alérgicos magros. Apesar de haver uma tendência à diminuição da expressão dessas moléculas mediante o tratamento com a azitromicina, as diferenças entre obesos alérgicos tratados e não tratados não foram significativas.

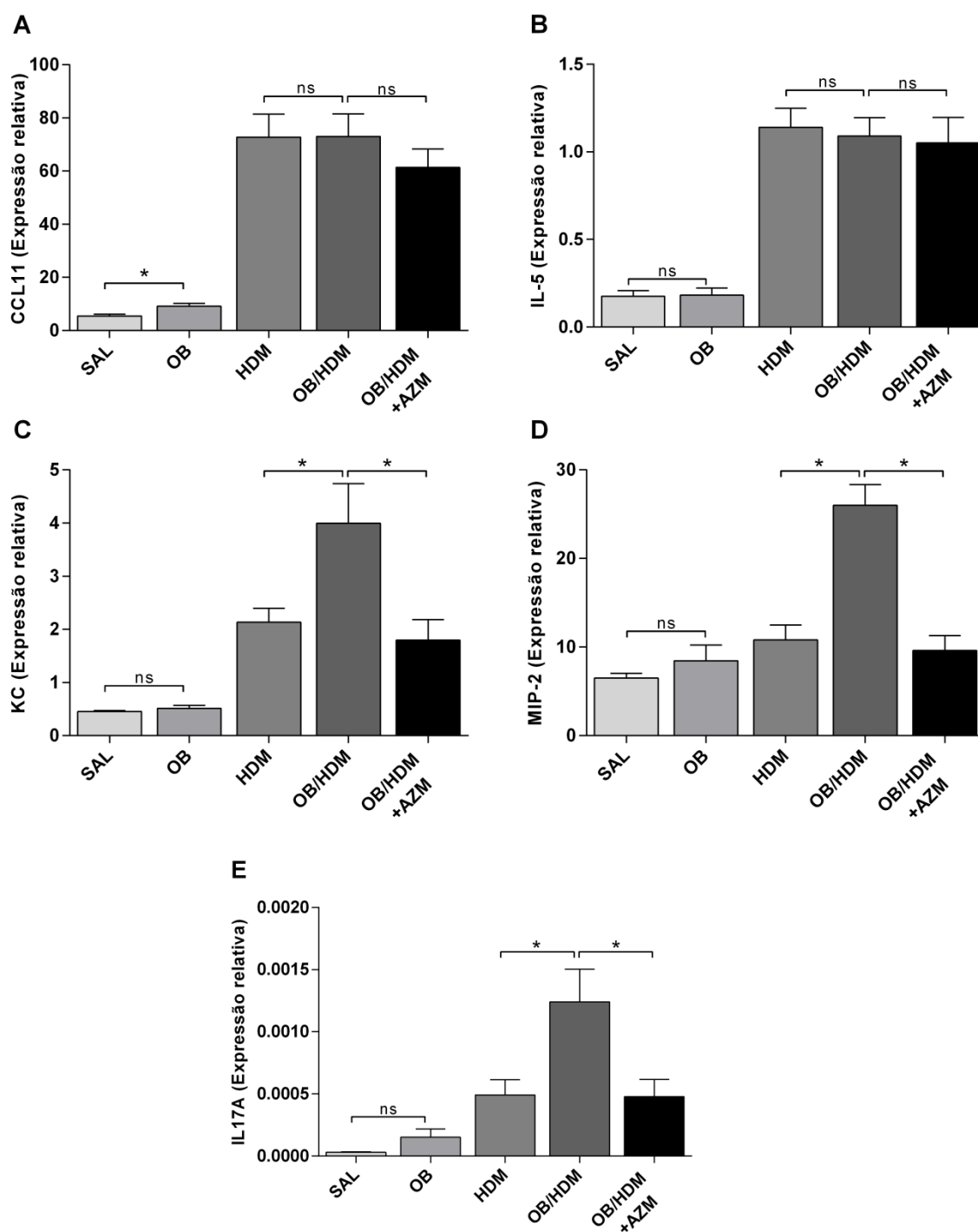


**Figura 38** – Expressão de fatores das respostas  $T_H2$ /eosinofílica e  $T_H17$ /neutrófila, nas vias aéreas. Expressão de mRNA avaliada por qRT-PCR. CCL11 (A), TSLP (B), MID1 (C), KC (D), MIP-2 (E) e CCL20 (F). Os dados foram analisados através de teste de *T de student*,  $p < 0,05$ ,  $n = 6$ .

#### **4.3.5 Azitromicina reverte o aumento na expressão genica de fatores ligados à resposta T<sub>H</sub>17/neutrofílica, causado pela obesidade no pulmão como um todo**

A obesidade por si só, levou ao aumento da expressão de CCL11 nos pulmões de animais obesos não alérgicos em relação aos magros. Contudo, após a indução da alergia pulmonar, não houve diferença entre animais magros e obesos, quanto a expressão dessa quimiocina. Além disso, o tratamento com a azitromicina não afetou a expressão desse fator em animais obesos alérgicos (Fig. 39A). Da mesma forma, a expressão de IL-5 foi semelhante entre animais alérgicos, obesos e magros, e o tratamento com azitromicina não reduziu a expressão dessa citocina (Fig. 39B).

Em contrapartida, a expressão das quimiocinas KC e MIP-2 e de IL-17A foi maior nos pulmões inteiros de animais obesos alérgicos em comparação com os animais alérgicos não obesos. O tratamento com a azitromicina reduziu a expressão desses genes nos animais obesos alérgicos (Fig. 39C-E).

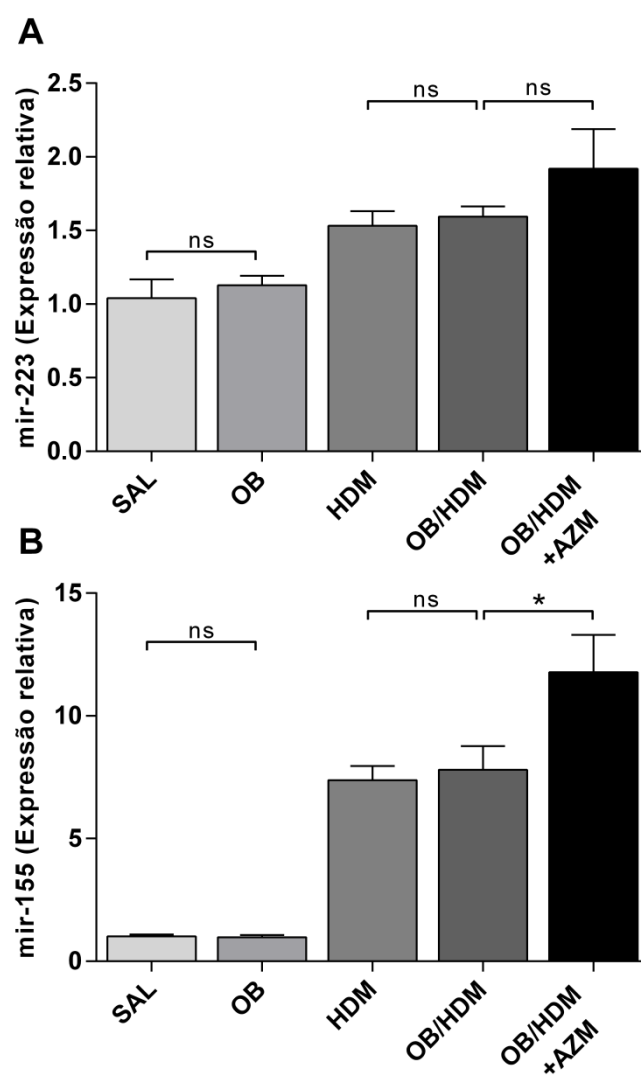


**Figura 39** – Expressão de fatores das respostas  $T_H2$ /eosinofílica e  $T_H17$ /neutrófila, em pulmões inteiros. Expressão de mRNA avaliada por qRT-PCR. CCL11 (A), IL-5 (B), KC (C), MIP-2 (D) e IL-17A (E). Os dados foram analisados através de teste de *t* de student,  $*p < 0.05$ , e expressos como média  $\pm$  EPM, ns - não significativo.  $n=6$ .

#### **4.3.6 Obesos não apresentam expressão diferencial de mir-155, mas azitromicina causou aumento em sua expressão**

MicroRNAs são moléculas reguladoras que exercem um importante papel no desenvolvimento da asma, por isso foi avaliada a expressão de mir-223 e mir-155, miRNAs altamente expressos durante o desenvolvimento de processos alérgicos (LU et al., 2012; PLANK et al., 2015). A avaliação foi feita no pulmão inteiro, tendo em vista que as diferenças entre os grupos foi mais marcante nessas análises do que nas vias aéreas isoladas.

Animais obesos não-alérgicos não apresentaram diferença quanto a expressão de ambos os miRNAs em relação ao grupo controle (magro não-alérgico). Tampouco houve diferença entre os grupos alérgicos magro e obeso (Fig. 40A), contudo animais obesos-alérgicos tratados com azitromicina apresentaram maior expressão de mir-155 em comparação com o grupo não-tratado (Fig. 40B).



**Figura 40** – Expressão de microRNAs no pulmão inteiro, em modelo de HDM. Mir223 (A) and mir-155 (B). Os dados são mostrados como expressão relativa em relação ao grupo salina. Os dados foram analisados através de teste de *t de student*,  $*p < 0.05$ , e expressos como média  $\pm$  EPM, ns - não significativo. n=6.

## 5 Discussão

O aumento concomitante na prevalência da obesidade e da asma é razão da crescente preocupação com a associação dessas duas condições. Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que indivíduos obesos apresentam sintomas mais graves e prolongados (BARROS et al., 2017; CALIXTO et al., 2010; SILVA et al., 2017a; STRUNK et al., 2015). Contudo, tanto a asma como a obesidade são doenças de etiologia complexa e diversa. Essa natureza multifatorial se reflete em modelos animais, onde os resultados são muitas vezes conflitantes.

Um dos fatores que causa certa controvérsia é a escolha da linhagem mais apropriada para implementar um modelo. Os animais da linhagem C57BL/6 são mais propensos ao desenvolvimento da obesidade, por essa razão são muitas vezes escolhidos para estudos que visem promover tal condição, pois desenvolvem eficientemente a inflamação crônica de baixo grau que se espera para o modelo (CHU et al., 2017; JOVICIC et al., 2015). Contudo, esses animais apresentam certa resistência ao desenvolvimento de respostas alérgicas, as quais são melhor induzidas em camundongos BALB/c que são mais propensos a um perfil de resposta Th2, os quais desenvolvem maior hiperresponsividade brônquica e apresentam maior infiltrado inflamatório nas vias aéreas quando expostos ao alérgeno (SAHU et al., 2010b).

No presente trabalho, foi escolhida a linhagem Balb/c como modelo, devido a sua suscetibilidade ao desenvolvimento de respostas alérgicas. E os resultados demonstrados indicam que os animais alimentados com a dieta hiperlipídica (60% de calorias provenientes de gordura) apresentaram tanto ganho de peso, IMC e percentual de ganho de peso (valor calculado tomando como referência o peso inicial do animal) significativamente maiores do que os animais que receberam a dieta padrão. Esses resultados estão de acordo com outros trabalhos que utilizaram a mesma linhagem (MACDONALD et al., 2017; MOORTHY et al., 2016). Também já foi demonstrado que parte dos animais BALB/c não ganham peso e que a produção de citocinas inflamatórias, para manutenção de um baixo grau de inflamação, depende do acúmulo de gordura (BOI et al., 2016). Entretanto o trabalho publicado por Silva e colaboradores, desenvolvido no IMUNOCET-UFJF com as mesma



linhagem e dieta, demonstrou não só o ganho de massa corporal, mas também distúrbios metabólicos associados com aumento nos níveis de leptina e TNF- $\alpha$ , fatores que participam do estabelecimento da inflamação de baixo grau e ajudam na caracterização desse modelo de obesidade (SILVA et al., 2017a). Por essa razão a linhagem BALB/c mesmo sendo mais resistente ao desenvolvimento de obesidade se mostra eficiente em simular os distúrbios metabólicos relatados em humanos.

Por outro lado, os diferentes perfis de resposta imune frente ao estímulo alergênico também interferem na escolha da linhagem para desenvolvimento do modelo concomitante de asma e obesidade. Já foi demonstrado que camundongos C57BL/6 apresentam aumento de eosinofilia durante a resposta alérgica na obesidade, com aumento de fatores relacionados ao recrutamento de eosinófilos, como IL-5 e CCL11 (CALIXTO et al., 2010). Entretanto, também já foi demonstrado que a obesidade pode causar redução da eosinofilia e de fatores associados a esse perfil de resposta na mesma linhagem de camundongos (DE VRIES et al., 2009). Esses resultados estão de acordo com os de Diaz e colaboradores que demonstraram que a redução de eosinofilia foi acompanhada de maior participação de macrófagos no infiltrado inflamatório (DIAZ et al., 2015). Além disso, Manicone e colaboradores (2016), além de notarem a redução de eosinófilos, na obesidade associada a alergia, também registraram maior expressão de moléculas de adesão em neutrófilos e monócitos na circulação (MANICONE et al., 2016). No entanto, os mesmos trabalhos variam em tempo de coleta de dados de 48h a quatro dias após o último desafio, e também em relação ao alérgeno utilizado (OVA ou HDM), o que pode acarretar diferenças nas respostas observadas.

Em trabalhos que utilizaram camundongos BALB/c como modelo, foi observado que a obesidade associada à alergia pulmonar induzida tanto por OVA, como por HDM acarretou um aumento na participação de macrófagos e neutrófilos, bem como a expressão de moléculas relacionadas a essas células e o desenvolvimento de uma resposta de perfil Th17 (SILVA et al., 2017a; TASHIRO et al., 2017). Esse conjunto de características também foi observado no presente trabalho, no qual a obesidade causou a redução da participação de eosinófilos na resposta alérgica à ovalbumina, com redução da contagem de eosinófilos no tecido pulmonar associada à redução da atividade da peroxidase eosinofílica, enzima produzida e liberada por eosinófilos ativados.

Em relação aos resultados obtidos com o modelo de HDM, a coloração de HE não revelou diferenças quanto à quantificação de eosinófilos no tecido pulmonar, entre os grupos sensibilizados e desafiados com HDM. Contudo, a menor expressão do mRNA de CCL11, quimioatraente para eosinófilos, nas vias aéreas sugere uma redução da eosinofilia no pulmão dos obesos. Já foi demonstrado que a coloração de HE se mostra pouco específica na quantificação de eosinófilos, superestimando o número dessas células (MEYERHOLZ et al., 2009).

Estudos clínicos dividem a asma alérgica em obesos, a princípio em dois subtipos, que diferem entre si quanto à idade de estabelecimento e quanto ao tipo de resposta desenvolvida, nos quais indivíduos mais novos apresentam o favorecimento do perfil eosinofílico, ao passo que indivíduos mais velhos exibem uma redução da eosinofilia causada pela obesidade (AMELINK *et al.*, 2013; DESAI *et al.*, 2013; GROTTA *et al.*, 2013; HOLGUIN *et al.*, 2011). No entanto essa relação entre obesidade e asma ainda não é bem compreendida, e os resultados são muitas vezes conflitantes. Corroborando com os resultados encontrados em estudos com pacientes com estabelecimento tardio da asma em associação com a obesidade, os resultados aqui observados demonstram a menor expressão gênica de CCL11 em obesos-alérgicos no modelo com HDM e a menor produção dessa quimiocina no modelo de OVA, já indicando uma menor capacidade de recrutamento de eosinófilos para as vias aéreas.

E ainda, no presente trabalho a obesidade levou à redução da expressão e produção de TSLP nas vias aéreas e no homogenato de pulmão, respectivamente. Essa citocina derivada do epitélio é conhecida por ativar células dendríticas primando-as para um perfil pró- $T_H2$  e contribuindo para que promovam a diferenciação dessas células além de linfócitos T foliculares nos linfonodos (PATTARINI et al., 2017). Além disso, a redução na expressão de TSLP está associada a uma maior diferenciação para o perfil  $T_H17$ , devido à ausência de um mecanismo contra regulação exercido diretamente por essa citocina nesse subtipo de linfócitos auxiliares (YADAVA et al., 2014). Além disso, as principais citocinas de origem epitelial, TSLP, IL-25 e IL-33 parecem cooperar na montagem de uma resposta  $T_H2$  e na promoção de remodelamento (VANNELLA et al., 2016). Nesse sentido também foi observado no presente trabalho a redução da produção de IL-25 em animais obesos alérgicos. Citocina que potencializa respostas de perfil  $T_H2$ ,

atuando em ILC2 promovendo a produção de IL-5 e IL-13 (LEE et al., 2016). De fato, a redução de IL-25 e TSLP observada nos animais obesos alérgicos foi acompanhada por redução na produção de IL-5, indicando o comprometimento da resposta T<sub>H</sub>2.

Interessantemente, não foram notadas diferenças entre os grupos alérgicos, obeso e magro quanto à transcrição de citocinas de perfil T<sub>H</sub>2 na análise de pulmão inteiro, em contraste com os resultados das vias aéreas obtidas por dissecação cega no modelo de asma induzida pelo HDM. Essa diferença está relacionada devido a técnica de obtenção das amostras das vias aéreas, que consiste da remoção do parênquima e eliminação de respostas associadas a essa estrutura (COLLISON et al., 2013a). Nesse contexto, a obesidade impactou negativamente a expressão de TSLP, CCL11 e MID1, fatores relacionados ao perfil T<sub>H</sub>2, de expressão marcante no epitélio. E ainda, a obesidade parece atuar na via de *E3 ubiquitin-protein ligase Midline-1* (MID1), característica de uma resposta Th2 eosinofílica, reduzindo sua expressão em animais obesos alérgicos. O aumento da expressão de MID1 está associado à redução da atividade da enzima PP2A que atua inibindo cascatas pró-inflamatórias, como a via no NFκB (COLLISON et al., 2013).

No presente trabalho, em ambos os modelos utilizados houve (CHOY et al., 2015) aumento nos níveis de IL-17A ou em sua expressão, no pulmão dos animais obesos alérgicos. Essa citocina pode ser produzida por células Th17, por neutrófilos, linfócitos B, linfócitos T<sub>γδ</sub> e ILC3s, e está associada à gravidade da doença e à resistência a corticosteróides e à neutrofilia (BULLENS et al., 2006; CHESNE et al., 2014). De fato, como citado anteriormente o dano à resposta epitelial, observado pela menor produção de TSLP está associada ao desenvolvimento da resposta T<sub>H</sub>17/neutrofílica (YADAVA et al., 2014). Adicionalmente, as respostas T<sub>H</sub>2 e T<sub>H</sub>17 se regulam, e a análise de expressão gênica em pacientes e em modelos animal demonstram uma correlação negativa entre esses tipos de resposta (CHOY et al., 2015).

Obesos asmáticos além de apresentarem um maior número de neutrófilos na medula óssea, sangue e tecido pulmonar, esse foi associado a maior atividade da enzima mieloperoxidase, característica de neutrófilos, e que tem sido estudada como uma forma de avaliação da gravidade da doença no lavado broncoalveolar

(ALAM et al., 2017). Esse aumento do recrutamento/acumulo de neutrófilos nas vias aéreas ocorreu devido elevada expressão das quimiocinas CXCL1 (KC), CXCL2 (MIP-2) e CCL20 (MIP-3) (KOGA et al., 2016; SAWANT et al., 2016; SCAPINI et al., 2001; WOYTSCIAK et al., 2016), além dos mais altos níveis de IL-17A conforme os modelos de asma induzida tanto pela HDM e OVA, respectivamente. Em concordância com o aumento na contagem de neutrófilos na análise histológica, e com autores que demonstram um perfil neutrofílico em detrimento do eosinofílico (MANICONE et al., 2016; SILVA et al., 2017a; TASHIRO et al., 2017).

Somado à alterada composição do infiltrado inflamatório observada entre os obesos asmáticos, estes apresentam maior expressão de *muc5ac* no modelo de OVA, gene relacionado com a produção de muco, fator que causa grande dano à função pulmonar. Além disso, no modelo de HDM aqui apresentado, animais obesos-alérgicos apresentaram maior hiperresponsividade que alérgicos magros. De fato, em ambas as linhagens (C57BL/6 e BALB/c) a obesidade ou alimentação com dieta hiperlipídica exacerba a hiperresponsividade frente ao uso de metacolina (JOHNSTON, RICHARD *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2017). Contudo, animais magros e obesos não expostos ao alérgeno não apresentaram diferenças na função pulmonar. Em contraposição a esse resultado, já foi demonstrado que a dieta hiperlipídica é capaz de aumentar a hiperresponsividade frente a desafios com metacolina, em camundongos C57BL/6 independente da indução da asma (FRICKE *et al.*, 2018; JOHNSTON, RICHARD *et al.*, 2007). Nesse contexto o aumento da neutrofilia pode ter um papel importante nessa maior hiperresponsividade, tendo em vista que o bloqueio desses granulócitos implica em melhoras desse fator (WILSON et al., 2009).

Indivíduos obesos resistentes aos tratamentos convencionais e com uma participação maior de neutrófilos tanto em modelo animal, como na clínica apresentam também níveis séricos de IgE baixos em relação aos indivíduos suscetíveis ao tratamento, ou que possuem uma resposta alérgica clássica (MA et al., 2017; MITO et al., 2002; MUC; MOTA-PINTO; PADEZ, 2016; SILVA et al., 2017a). Em concordância com esse perfil, no presente trabalho obesos alérgicos também apresentaram menores níveis de IgE no soro. Esse é um importante fator que caracteriza esse modelo, tendo em vista que o papel da obesidade é controverso, e

alguns trabalhos demonstram efeitos contrários, com o aumento da atopia em indivíduos alérgicos obesos (SUTHERLAND et al., 2012; VISNESS et al., 2009).

Em contrapartida, foi observado maior produção de IgG2a, anticorpo característico de respostas de perfil  $T_H1$ , em animais obesos alérgicos, em comparação com os alérgicos não-obesos. Já é bem estabelecido que o uso de dieta rica em gordura induz aumento de IgG2a, controlado pelo fator de transcrição T-bet, característicos de respostas  $T_H1$  (WALI; THOMAS; SUTHERLAND, 2014). Nesse contexto, sabe-se que anticorpos do tipo IgG são capazes de mediar a ocorrência de anafilaxia sistêmica independente de eosinófilos, principalmente através da participação de neutrófilos (BEUTIER et al., 2017).

Tendo em vista as alterações locais (pulmão), bem como os efeitos na produção de anticorpos, fez-se necessário avaliar a resposta a nível dos órgãos linfoides periféricos a fim de investigar as possíveis alterações que poderiam estar causando o cenário observado nos pulmões. Sabe-se que a principal ligação entre a resposta imune inata e a adquirida é a apresentação de alérgenos capturados por células dendríticas para os linfócitos T *naïve*, nos órgãos linfoides periféricos, mediante a expressão de moléculas coestimulatórias, como CD86 (HAMMAD; LAMBRECHT, 2008; HUMENIUK; DUBIELA; HOFFMANN-SOMMERGRUBER, 2017; LAMBRECHT; HAMMAD, 2012). No presente estudo, observou-se uma menor expressão de CD86 em células dendríticas ( $CD11c^+MHCII^+$ ), durante a resposta ao alérgeno na obesidade, em comparação com os alérgicos não-obesos. Concomitantemente, células dendríticas de obesos alérgicos também apresentaram maior intensidade de marcação para PDL1. Esses resultados sugerem que essas células estariam comprometidas com um perfil mais regulatório. Sabe-se que o aumento da razão PDL1/CD86 é característica de um perfil regulatório de células dendríticas as quais são resistentes ao processo de maturação (ZAHORCHAK et al., 2017). E ainda, a alta expressão de CD80 e CD86 está associada a uma intensificação da diferenciação de células T para um perfil  $T_H2$ , ao passo que a inibição dessas moléculas coestimulatórias promove uma redução desse perfil e favorecimento dos demais, principalmente  $T_H1$  (LI et al., 2016). Portanto esse perfil de dendríticas pode estar causando uma menor polarização para o perfil  $T_H2$  e favorecendo os perfis  $T_H1$  e  $T_H17$ . Esses dados ressaltam o importante papel da TSLP em promover a ativação e migração de células dendríticas para os órgãos

A menor frequência de células dendríticas nos linfonodos de animais obesos alérgicos, também indica uma incapacidade de promover a migração dessas células, as quais já se encontram menos ativadas desde o pulmão (dados não mostrados), para os linfonodos drenantes. Esses dados ressaltam o importante papel da TSLP em promover a ativação e migração de células dendríticas para os órgãos linfoides periféricos (PATTARINI et al., 2017; SUN et al., 2018), ação que foi comprometida pela sua redução na associação obesidade-asma, no presente trabalho. Nesse sentido já foi demonstrado que a obesidade afeta tanto a circulação linfática como a migração de células dendríticas para os linfonodos (WEITMAN et al., 2013), podendo ser o fator responsável pelos atrasos nas respostas seguintes. Somado a isso, nota-se o efeito da obesidade, mesmo sem a indução da alergia pulmonar, visto que a frequência de células dendríticas totais foi maior em animais obesos tanto no baço quanto nos linfonodos mediastinais. Nesse sentido, sabe-se que a obesidade aumenta a frequência de células dendríticas totais tanto no baço como nos linfonodos, contudo essas células tem uma menor capacidade de desencadear respostas de células T (JAMES et al., 2012).

A migração de células dendríticas para os órgãos linfoides periféricos, é essencial na montagem de uma resposta humoral eficiente, a carência dessas células prejudica a diferenciação de células  $T_{FH}$  que terão um papel imprescindível no amadurecimento e proliferação de linfócitos B nos folículos linfoides (KRISHNASWAMY et al., 2017). Sabe-se que, durante o desenvolvimento da asma alérgica, ocorre a proliferação desses linfócitos T foliculares, bem como a maior expressão de moléculas associadas (ex.: IL-21) que vêm sendo consideradas novos alvos para o tratamento da doença (MA et al., 2017). As células  $T_{FH}$  são capazes de induzir a produção de IgE em linfócitos B, contudo, essas células são reguladas por outro subtipo de linfócitos T foliculares de perfil regulatório, as  $T_{FR}$ . Essas células, que expressam o fator de transcrição Foxp3, além dos demais marcadores de linfócitos T foliculares, são capazes de inibir a proliferação de  $T_{FH}$  e a diferenciação de linfócitos B produtores de anticorpos (LINTERMAN et al., 2011). Além disso, essas células  $T_{FR}$  são capazes de promover a síntese de IgG e alterar a expressão de citocinas nos linfócitos  $T_{FH}$  (WU et al., 2016a). Apesar de não afetar o número de células  $T_{FH}$  nos linfonodos mediastinais, a obesidade induziu a formação de células T foliculares regulatórias ( $T_{FR}$ ). Nesse sentido, o aumento na frequência nessas

células poderia não somente estar inibindo o *switch* para IgE em células B, mas também ser um dos fatores promovendo a maior produção de IgG2a nos animais obesos.

Diferentemente dos linfonodos, animais obesos alérgicos apresentaram uma população maior frequência esplênica de células  $T_{FH}$ , contudo essas células apresentaram menor expressão de PD1. Sabe-se que a expressão dessa molécula é crítica para o funcionamento de células  $T_{FH}$  (GOOD-JACOBSON *et al.*, 2010), e além disso, a alta expressão de PD1, apesar de prevenir o recrutamento de novas células  $T_{FH}$ , é responsável por manter a sua localização nos centros germinativos, através na inibição da expressão do receptor de quimiocina CXCR3 (SHI *et al.*, 2018). Sendo assim, a reduzida expressão de PD1 poderia resultar em uma menor capacidade de manutenção dos centros germinativos e perda da função de células  $T_{FH}$ , dedicadas a promover o *switch* para IgE.

Respostas de linfócitos T no centro germinativo requerem tanto a interação com células dendríticas quanto com LB expressando CD40 (WATANABE *et al.*, 2017). Nesse contexto linfócitos B expressando altos níveis de PDL1 ( $PDL1^{high}$ ), e não de PDL2, são capazes de reduzir a população de linfócitos  $T_{FH}$ , induzindo uma menor taxa de proliferação e maior taxa de apoptose (HAMS *et al.*, 2011; KHAN *et al.*, 2015). No presente estudo a população de linfócitos B de perfil regulatório  $PDL1^{high}$  se encontra diminuída nos linfonodos mediastinais de animais obesos alérgicos em comparação com os alérgicos não obesos, entretanto a obesidade induz maior ativação dessas células, como visto pelo aumento na expressão de CD40. Esse perfil poderia refletir uma regulação de células  $T_{FH}$  desde a sensibilização, contudo o estímulo pelo alérgeno inalado poderia estar promovendo a recuperação da população de células  $T_{FH}$ .

Em contraposição aos resultados observados nos linfonodos, o baço de animais obesos alérgicos apresentou uma maior proporção de células B  $PDL1^{high}$  em comparação com alérgicos magros, contudo, com menor expressão de CD40 em todos os níveis de expressão de PDL1, e menor frequência de células B ( $CD19^+CD40^+$ ) no total de células. Esse cenário poderia ser um reflexo da menor expressão de PD1 em células  $T_{FH}$ , essencial na manutenção estrutural do centro germinativo (SHI *et al.*, 2018). Ao passo que a maior frequência de linfócitos B e

maior expressão de CD40 na população  $PDL1^{low}$ , nos linfonodos poderia resultar em uma maior atividade de linfócitos B não regulatórios (KHAN et al., 2015), o que poderia impactar a produção de anticorpos. Associado a isso, recentemente, têm-se discutido os papéis não regulatórios das células  $T_{FR}$ , as quais seriam capazes de promover a proliferação de células B através da produção de IL10 nos centros germinativos, inclusive potencializando a produção de IgG (WU et al., 2016b; XIE; DENT, 2018). Portanto o maior número células  $T_{FR}$  poderia ser um dos fatores favorecendo a produção de IgG2a em detrimento da produção de IgE.

Somado aos fatores intrínsecos de células B, e de células  $T_{FH}$ , outro tipo celular de grande importância para a produção de anticorpos são as células T auxiliares ( $T_H$ ). No presente trabalho, animais alérgicos-obesos apresentaram maior frequência de linfócitos T ( $CD3^+CD4^+$ ) expressando GATA-3 e  $ROR\gamma T$  em relação aos alérgicos magros, além da maior frequência dos mesmos linfócitos expressando IL-4, IL-17A e  $IFN-\gamma$ , citocinas características dos perfis  $T_H2$ ,  $T_H17$  e  $T_H1$  respectivamente. Entretanto o aumento dessas populações parece ser órgão específico, com uma potencialização da resposta de perfil  $T_H2$  nos linfonodos mediastinais, ao passo que o baço conserva um perfil  $T_H17$ , presente, inclusive na ausência de contato com o alérgeno, o que demonstra a manutenção do efeito sistêmico da obesidade, em contraposição a estímulo intermitente do alérgeno. A menor frequência de células produtoras de IL-4 no baço, em comparação com a alta frequência de células  $GATA-3^+$ , pode ser um indicio de perda da produção de IL-4 por essas células, e até mesmo uma transição para um estágio duplo positivo, onde essas células produziram IL-17A, mesmo na presença de GATA-3. Além disso, o aumento dessas células duplo positivas está associado ao aumento na gravidade da asma (IRVIN et al., 2014; WANG et al., 2010). Além disso um ambiente com maior produção de IL-17A por linfócitos  $CD3^+CD4^+ROR\gamma T$  observado no baço pode ter contribuído pra a maior produção de IgG2a em animais obesos alérgicos, tendo em vista que o bloqueio dessa citocina causa uma diminuição significativa de anticorpos dessa subclasse (MAJEWSKA-SZCZEPANIK et al., 2016). Somado a isso, a maior frequência de células produtoras de  $IFN-\gamma$  poderia contribuir para a inibição da síntese de IgE (PÈNE et al., 2006).



Frente a esse cenário, sabe-se que a produção de IL-4 tem grande importância na diferenciação de células secretoras de IgE, contudo já foi demonstrado que a produção dessa citocina por células  $T_{FH}$  tem maior participação na síntese desse isotipo de anticorpo, do que quando produzida por células  $T_H$ , responsáveis por promover a inflamação eosinofílica (HARADA et al., 2012; KOBAYASHI et al., 2017; WING et al., 2014). Entretanto, uma limitação do presente estudo foi a não distinção entre os subtipos de células T ( $T_{FH}$  e  $T_H$ ) que estariam produzindo IL4.

Ao mesmo tempo que se tenta compreender melhor a formação da resposta imune na asma, também busca-se reduzir essas respostas principalmente em indivíduos resistentes a corticosteroides, e geralmente associados à neutrofilia. Nesse contexto, os antibióticos macrolídeos, principalmente a azitromicina, surgem como uma forma de combate a esse perfil de resposta (PIACENTINI et al., 2007; SIMPSON et al., 2008). Os resultados apresentados no presente estudo, demonstraram que a obesidade causou diminuição de expressão de moléculas associadas à eosinofilia e aumento de moléculas relacionadas à neutrofilia. Contudo a azitromicina atuou recuperando as alterações causadas pela obesidade em ambos os modelos utilizados (OVA e HDM).

A redução da neutrofilia se refletiu em uma melhora na fisiologia pulmonar, como observado no modelo de HDM pela amenização da hiperresponsividade brônquica, frente ao tratamento com azitromicina, que foi acompanhado pela menor expressão de muc5ac. Efeitos semelhantes já foram demonstrados em estudos utilizando azitromicina, no qual o tratamento causou tanto a redução da hiperresponsividade brônquica quanto a redução da neutrofilia, em indivíduos com asma severa não-eosinofílica (BRUSSELLE et al., 2013; EKICI; EKICI; ERDEMOGLU, 2002; PIACENTINI et al., 2007). Redução a qual foi observada tanto na contagem de neutrófilos identificados com anti-MPO, como também na expressão de quimioatraentes para (KC e MIP-2) e na produção de IL-17A.

Em associação com esses resultados, animais obesos alérgicos tratados com azitromicina apresentaram um intensificação da expressão de mir155 e uma tendência a uma maior expressão de mir-223. Esses miRNA são altamente expressos na asma ou em outras doenças alérgicas (LU et al., 2012; PLANK et al.,

2015). Nesse contexto, mir-155 é expresso em diversos tipos celulares, e geralmente está associado ao desenvolvimento de respostas inflamatórias, sobretudo de perfil  $T_H17$ , e ao desenvolvimento de doenças autoimunes (MURUGAIYAN et al., 2011; O'CONNELL et al., 2010b). Entretanto, esse microRNA atua de forma semelhante em células  $T_{REG}$  e  $T_H17$ , nessas últimas promovendo a expressão de IL17A através da degradação de SOCS1 (Supressor of Cytokine Signalling 1) (BERGALLO et al., 2017; YAO et al., 2012), contudo no presente trabalho essa proteína não foi afetada pelo tratamento (dados não mostrados), indicando que provavelmente o aumento desse miRNA não está relacionado à potencialização do perfil  $T_H17$ , até porque esse perfil se encontrava reduzido, como visto pela menor neutrofilia e expressão reduzida de IL-17A, após o tratamento com azitromicinas. Provavelmente, o aumento desse miRNA está associado com a intensificação da atividade de células  $T_{REG}$ , células que expressam o fator de transcrição Foxp3 associado com a maior expressão de mir-155, o qual está ligado à funcionalidade dessas células (GAO et al., 2017; KOHLHAAS et al., 2009; ZHOU et al., 2015) o que estaria de acordo com a regulação da resposta encontrada nos animais obesos-alérgicos tratados com azitromicina no modelo de HDM.

Além disso, o tratamento com azitromicina não parece exercer efeito sobre a produção de citocinas de perfil  $T_H2$  e expressão de fatores relacionados com a eosinofilia em indivíduos obesos asmáticos, o que reflete ineficácia do medicamento em afetar o número de eosinófilos. De fato pacientes com asma não-eosinofílica apresentam uma melhor resposta ao tratamento com azitromicina (GIBSON et al., 2017; TIAN et al., 2019), não somente na asma mas em outras respostas inflamatórias em que o uso de corticoides não é eficaz (MANIAKAS; DESROSIERS, 2014; SIMPSON et al., 2014b). Entretanto estudos que investiguem o efeito da azitromicina em eosinófilos ainda são escassos. Ainda assim, há estudos que demonstram o efeito desse medicamento reduzindo respostas de perfil  $T_H2$  (BEIGELMAN et al., 2009; LIN et al., 2011; PU et al., 2018; RATZINGER et al., 2014), ao passo que outros trabalhos demonstraram a ineficácia da azitromicina em trazer melhoras significativas (JOHNSTON et al., 2016; KEW et al., 2015). Contudo, a asma é uma doença diversa e diversos outros fatores devem ser considerados, sobretudo em estudos clínicos.

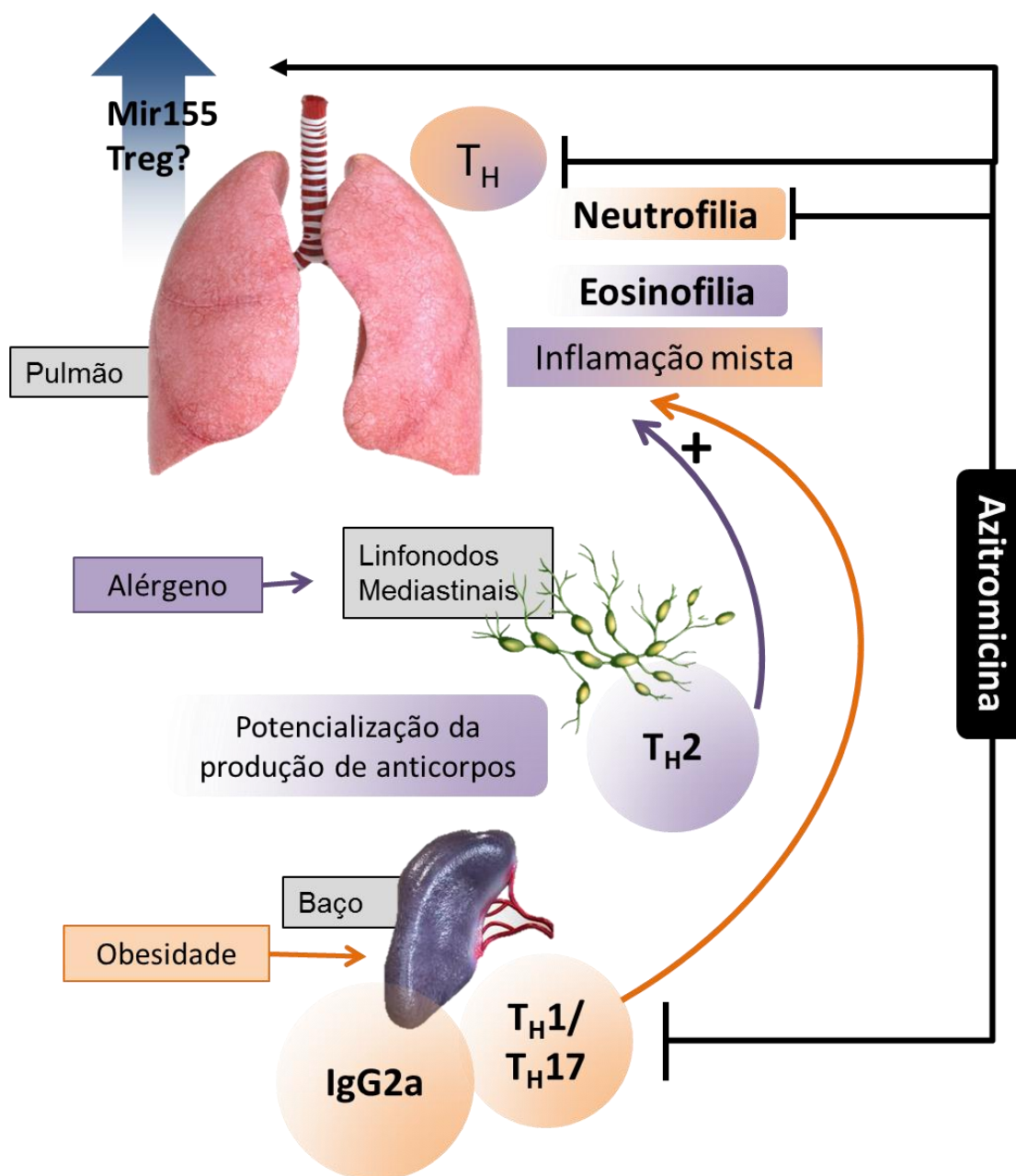
Apesar do efeito reduzido da azitromicina nesses fatores citados acima, a avaliação do perfil de linfócitos T auxiliares nos pulmões, indicou que a azitromicina reduziu o número de células produtoras de IL-4, IL-17A e IFN- $\gamma$ , num efeito generalista que reduz inespecificamente a participação desses três subtipos de células T<sub>H</sub> com grande importância na asma. O mesmo efeito foi observado nos linfonodos dos animais obesos alérgicos tratados com azitromicina. O que está de acordo com um trabalho que indica o efeito desse medicamento inibindo a produção de diversas citocinas oriundas de linfócitos T (RATZINGER et al., 2014). Entretanto o baço de obesos-alérgico apresentou respostas distintas dos demais órgãos analisados, com recuperação da produção de IL-4, esse fator pode estar ligado a supressão da resposta T<sub>H</sub>17, permitindo o crescimento da resposta T<sub>H</sub>2.

Em consonância com a redução de células produtoras de citocinas, nos linfonodos, o tratamento com a azitromicina em animais obesos-alérgicos também resultou em um perfil menos ativado de células B e T<sub>FH</sub>, com redução no número de linfócitos B e aumento da subpopulação com alta expressão de PDL1, que exerce função regulatória (KHAN et al., 2015). Também pode ocorrer a diminuição da expressão de CD40 em todas as populações de células B, indicando uma menor propensão à ativação (KUHN et al., 2018). Adicionalmente, a manutenção esplênica da expressão de IL17A e IFN $\gamma$ , que contribuem para a proliferação de linfócitos B (JACKSON et al., 2016; MITSDOERFFER et al., 1992) associada ao aumento da frequência de células secretoras de IL-4, pode ter propiciado o maior número de linfócitos B (CD19<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>) em camundongos obesos alérgicos tratados com azitromicina. Contudo a menor expressão de PD1 em células T<sub>FH</sub>, demonstrando um fenótipo menos ativado (GOOD-JACOBSON et al., 2010b), pode ter possibilitado a maior ativação do subtipo de células B de perfil regulatório PDL1<sup>high</sup>.

Surpreendentemente, em animais alérgicos magros a azitromicina parece agravar o desenvolvimento da asma, aumento o número de eosinófilos na medula óssea, bem como induzindo um aumento da neutrofilia, num efeito oposto ao encontrado em animais obesos-alérgicos. Em adição, esse grupo de animais também apresentou uma maior quantidade de células produtora de IL-4, IL17A e IFN $\gamma$  nos pulmões. Esse cenário pode ser parcialmente explicado pela redução de TSLP nesses animais magros-alérgicos tratados, tendo em vista o importante papel

da redução dessa citocina no desenvolvimento de respostas de perfil  $T_H17$ /neutrófilico (YADAVA et al., 2014), como já discutido anteriormente. Nesse sentido, sabe-se que a azitromicina tem um importante papel na redução da produção de quimioatraentes de neutrófilos como a IL-8 (MURPHY et al., 2007), e na inibição da produção e TSLP por células epiteliais (ZHU; LEI; HUANG, 2013). Somado a isso, o tratamento induz aumento na frequência de linfócitos B no linfonodo, mesmo sem afetar demais parâmetros ligados a essas células.

Em conjunto (figura 41), esses resultados indicam que a obesidade agrava a asma, polarizando a resposta imune para o perfil  $T_H17$ , localmente no pulmão, em decorrência de alterações ocasionadas nos órgãos linfoides periféricos, impulsionadas por modificações desde a interação inicial entre epitélio e células dendríticas. Nesse contexto, as demais repostas a jusante foram modificadas levando à maior produção de IgG2a, em detrimento de IgE, sustentada pelas alterações ocorridas nos principais componentes dos centros germinativos. Nesse sentido observa-se um maior efeito da obesidade no baço, efeito que acompanha animais obesos até mesmo quando não são sensibilizados e desafiados, demonstrando o efeito que a obesidade tem em promover o perfil  $T_H17$  no baço. Essa modificação acaba por direcionar o perfil de produção de anticorpos para IgG2a. Com a chegada do alérgeno e o aumento da resposta  $T_H2$ , como observado pelo aumento de IL-4 nesses indivíduos obesos alérgicos, ocorre a potencialização da produção de anticorpos, entretanto em animais obesos o cenário apresentado não permite a produção de IgE uma vez que a resposta já está voltada para a produção de IgG2a. Adicionalmente, a azitromicina foi capaz de modificar esse perfil de resposta agravado pela obesidade, contudo sem afetar a resposta  $T_H2$ /eosinofílica. Demonstrando a necessidade de terapias combinadas de azitromicina com corticosteroides, com o intuito de combater tanto o perfil eosinofílico como também o neutrófilico. Entretanto animais magros alérgicos, responderam de forma distinta a esse tratamento, ressaltando a importância da personalização de tratamentos para essa doença.



**Figura 41 - Resumo gráfico.** Observou-se que a obesidade instaura um processo inflamatório crônico, e estabelece um desvio da resposta, principalmente no baço, com desenvolvimento de um perfil  $T_H1/T_H17$ , com estabelecimento de resposta humoral caracterizada pela maior produção de IgG2a em comparação com animais magros. Após o estabelecimento da alergia, com o desenvolvimento de uma resposta  $T_H2$ , ocorre um processo de potencialização da produção de anticorpos, contudo em animais obesos esse cenário já está modificado com um direcionamento para um perfil de IgG2a, o que não ocorre em animais magros onde há maior produção de IgE. Nesse sentido sabe-se que a alta produção de IL-4 atua na promoção da síntese de anticorpos, inclusive intensificando respostas já estabelecidas de outros anticorpos que não a IgE. A combinação dos dois perfis de resposta,  $T_H2$  alavancado pelos linfonodos mediastinais e  $T_H1/T_H17$  impulsionado pelo baço conferem aos pulmões dos animais obesos alérgicos um caráter de inflamação mista, com desenvolvimento de eosinofilia e neutrofilia. Após o tratamento com azitromicina ocorre um bloqueio da resposta  $T_H1/T_H17$  neutrofílica, havendo redução da contagem de neutrófilos no tecido pulmonar e redução das populações de linfócitos T auxiliares. Contudo o tratamento também eleva a expressão do mir155, o que pode indicar uma potencialização da resposta de perfil regulatória, tendo em vista que esse miRNA é necessário para a expressão de FoxP3 e para a funcionalidade de Treg.

## 6 Conclusão

Tendo em vista os resultados apresentados, conclui-se que animais obesos alérgicos apresentam uma mudança em seu perfil de resposta, com favorecimento de um perfil Th17/neutrofílico com baixa produção de IgE e favorecimento de IgG2a. Essa mudança é acompanhada por alterações ocorridas nos órgãos linfoides periféricos, os quais recebem células dendríticas que carregam marcas de uma menor ativação desde o pulmão. Além disso, linfonodos e baço respondem diferentemente durante essa interação, em que os primeiros sofrem maior influência da indução de alergia, enquanto o baço sofre uma influência sinérgica de ambas, obesidade e asma.

O tratamento com a azitromicina foi eficiente em reduzir o perfil neutrofílico de animais obesos-alérgicos, tanto no modelo de OVA, quanto no modelo de HDM; contudo foi ineficaz em reduzir os parâmetros de uma resposta alérgica clássica. Associado a essa resposta, houve uma maior expressão de mir-155 no modelo de HDM. Portanto, o tratamento com azitromicina é capaz de reverter grande parte das alterações causadas pela obesidade, diminuindo a expressão de diversos fatores ligados à gravidade da doença. Entretanto, ainda é necessário um melhor entendimento, sobretudo em termos de vias moleculares envolvidas em seu funcionamento, sobretudo quanto à expressão de microRNAs.

## 7 Referências

- ABELLA, V.; SCOTECE, M.; CONDE, J.; PINO, J.; GONZALEZ-GAY, M. A.; GOMEZ-REINO, J. J.; MERA, A.; LAGO, F.; GOMEZ, R.; GUALILLO, O. Leptin in the interplay of inflammation, metabolism and immune system disorders. **Nat Rev Rheumatol**, v. 13, p. 100–109, 2017.
- AGACHE, I.; AKDIS, C.; JUTEL, M.; VIRCHOW, J. C. Untangling asthma phenotypes and endotypes. **Allergy**, v. 67, p. 835–846, 2012.
- ALAM, R.; GOOD, J.; ROLLINS, D.; VERMA, M.; CHU, H.; PHAM, T. H.; MARTIN, R. J. Airway and serum biochemical correlates of refractory neutrophilic asthma. **J Allergy Clin Immunol**, 2017.
- AMELINK, M.; DE NIJS, S. B.; DE GROOT, J. C.; VAN TILBURG, P. M. B.; VAN SPIEGEL, P. I.; KROUWELS, F. H.; LUTTER, R.; ZWINDERMAN, A. H.; WEERSINK, E. J. M.; TEN BRINKE, A.; STERK, P. J.; BEL, E. H. Three phenotypes of adult-onset asthma. **Allergy**, v. 68, n. 5, p. 674–680, 1 maio 2013a.
- AMELINK, M.; DE GROOT, J. C.; DE NIJS, S. B.; LUTTER, R.; ZWINDERMAN, A. H.; STERK, P. J.; TEN BRINKE, A.; BEL, E. H. Severe adult-onset asthma: A distinct phenotype. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 132, n. 2, p. 336–341, ago. 2013b.
- ANO, S.; MORISHIMA, Y.; ISHII, Y.; YOH, K.; YAGETA, Y.; OHTSUKA, S.; MATSUYAMA, M.; KAWAGUCHI, M.; TAKAHASHI, S.; HIZAWA, N. Transcription factors GATA-3 and ROR $\gamma$ t are important for determining the phenotype of allergic airway inflammation in a murine model of asthma. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 190, n. 3, p. 1056–65, 1 fev. 2013.
- APOVIAN, C. M. Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden. **Am J Manag Care**, v. 22, p. s176-85, 2016.
- ARATANI, Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 640, p. 47–52, 15 fev. 2018.
- AROCA, R.; CHAMORRO, C.; VEGA, A.; VENTURA, I.; GOMEZ, E.; PEREZ-CANO, R.; BLANCA, M.; MONTESEIRIN, J. Immunotherapy reduces allergen-mediated CD66b expression and myeloperoxidase levels on human neutrophils from allergic patients. **PLoS One**, v. 9, p. e94558, 2014.
- ARROYO-JOHNSON, C.; MINCEY, K. D. Obesity Epidemiology Worldwide. **Gastroenterol Clin North Am**, v. 45, p. 571–579, 2016.
- BAFFI, C. W.; WINNICA, D. E.; HOLGUIN, F. Asthma and obesity: mechanisms and clinical implications. **Asthma Res Pract**, v. 1, p. 1, 2015a.
- 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, 2015b.
- BARNES, P. J. Inhaled Corticosteroids. **Pharmaceuticals**, v. 3, p. 514–540, 2010.
- BARROS, R.; MOREIRA, P.; PADRAO, P.; TEIXEIRA, V. H.; CARVALHO, P.;

DELGADO, L.; MOREIRA, A. Obesity increases the prevalence and the incidence of asthma and worsens asthma severity. **Clin Nutr**, v. 36, p. 1068–1074, 2017.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**, v. 136, p. 215–233, 2009.

BEIGELMAN, A.; GUNSTEN, S.; MIKOLS, C. L.; VIDAUSKY, I.; CANNON, C. L.; BRODY, S. L.; WALTER, M. J. Azithromycin Attenuates Airway Inflammation in a Noninfectious Mouse Model of Allergic Asthma. **Chest**, v. 136, n. 2, p. 498–506, 1 ago. 2009.

BERGALLO, M.; ACCORINTI, M.; GALLIANO, I.; COPPO, P.; MONTANARI, P.; QUAGLINO, P.; SAVINO, F. Expression of miRNA 155, FOXP3 and ROR gamma, in children with moderate and severe atopic dermatitis. **Giornale italiano di dermatologia e venereologia : organo ufficiale, Societa italiana di dermatologia e sifilografia**, 2017.

BEUTIER, H.; GILLIS, C. M.; IANNASCOLI, B.; GODON, O.; ENGLAND, P.; SIBILANO, R.; REBER, L. L.; GALLI, S. J.; CRAGG, M. S.; VAN ROOIJEN, N.; MANCARDI, D. A.; BRUHNS, P.; JÖNSSON, F. IgG subclasses determine pathways of anaphylaxis in mice. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 139, n. 1, p. 269–280.e7, 2017.

BOI, S. K.; BUCHTA, C. M.; PEARSON, N. A.; FRANCIS, M. B.; MEYERHOLZ, D. K.; GROBE, J. L.; NORIAN, L. A. Obesity alters immune and metabolic profiles: New insight from obese-resistant mice on high-fat diet. **Obesity (Silver Spring)**, v. 24, p. 2140–2149, 2016.

BRANDT, E. B.; KHURANA HERSHEY, G. K. A combination of dexamethasone and anti-IL-17A treatment can alleviate diesel exhaust particle-induced steroid insensitive asthma. **J Allergy Clin Immunol**, v. 138, p. 924–928 e2, 2016.

BRONTE, V.; PITTET, M. J. The spleen in local and systemic regulation of immunity. **Immunity**, v. 39, n. 5, p. 806–18, 14 nov. 2013.

BRUSSELLE, G. G.; VANDERSTICHELE, C.; JORDENS, P.; DEMAN, R.; SLABBYNCK, H.; RINGOET, V.; VERLEDEN, G.; DEMEDTS, I. K.; VERHAMME, K.; DELPORTE, A.; DEMEYERE, B.; CLAEYS, G.; BOELENS, J.; PADALKO, E.; VERSCHAKELLEN, J.; VAN MAELE, G.; DESCHEPPER, E.; JOOS, G. F. P. Azithromycin for prevention of exacerbations in severe asthma (AZISAST): a multicentre randomised double-blind placebo-controlled trial. **Thorax**, v. 68, n. 4, p. 322–9, 1 abr. 2013.

BRUSSELLE, G. G.; JOOS, G. Is there a role for macrolides in severe asthma? **Curr Opin Pulm Med**, v. 20, p. 95–102, 2014.

BUETTNER, R.; SCHOLMERICH, J.; BOLLHEIMER, L. C. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. **Obesity (Silver Spring)**, v. 15, p. 798–808, 2007.

BULLENS, D. M. A.; TRUYEN, E.; COTEUR, L.; DILISSEN, E.; HELLINGS, P. W.; DUPONT, L. J.; CEUPPENS, J. L. IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? **Respiratory research**, v.



7, n. 1, p. 135, 3 nov. 2006.

BUTLER, A. A.; CONE, R. D. Knockout studies defining different roles for melanocortin receptors in energy homeostasis. **Ann N Y Acad Sci**, v. 994, p. 240–245, 2003.

CALIXTO, M. C.; LINTOMEN, L.; SCHENKA, A.; SAAD, M. J.; ZANESCO, A.; ANTUNES, E. Obesity enhances eosinophilic inflammation in a murine model of allergic asthma. **Br J Pharmacol**, v. 159, p. 617–625, 2010.

CANONICA, G. W.; BAGNASCO, D.; FERRANTINO, G.; FERRANDO, M.; PASSALACQUA, G. Update on immunotherapy for the treatment of asthma. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 22, n. 1, p. 18–24, 2016.

CARPAIJ, O. A.; VAN DEN BERGE, M. The asthma–obesity relationship. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 24, n. 1, p. 42–49, 2018.

CAZZOLA, M.; PAGE, C. P.; ROGLIANI, P.; MATERA, M. G.  $\beta$ 2-Agonist Therapy in Lung Disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 187, n. 7, p. 690–696, 24 abr. 2013.

CHEN, L.; GRABOWSKI, K. A.; XIN, J.-P.; COLEMAN, J.; HUANG, Z.; ESPIRITU, B.; ALKAN, S.; XIE, H. B.; ZHU, Y.; WHITE, F. A.; CLANCY, J.; HUANG, H. IL-4 induces differentiation and expansion of Th2 cytokine-producing eosinophils. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 172, n. 4, p. 2059–66, fev. 2004.

CHEN, Y. P.; ZHANG, J. H.; LI, C. Q.; SUN, Q. X.; JIANG, X. H. Obesity enhances Th2 inflammatory response via natural killer T cells in a murine model of allergic asthma. **Int J Clin Exp Med**, v. 8, p. 15403–15412, 2015.

CHERRY, W. B.; YOON, J.; BARTEMES, K. R.; IJIMA, K.; KITA, H. A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potently activates human eosinophils. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 121, n. 6, p. 1484–1490, jun. 2008.

CHESNE, J.; BRAZA, F.; MAHAY, G.; BROUARD, S.; ARONICA, M.; MAGNAN, A. IL-17 in severe asthma. Where do we stand? **Am J Respir Crit Care Med**, v. 190, p. 1094–1101, 2014.

CHOY, D. F. et al. TH2 and TH17 inflammatory pathways are reciprocally regulated in asthma. **Science translational medicine**, v. 7, n. 301, p. 301ra129, 19 ago. 2015.

CHU, D. T.; MALINOWSKA, E.; JURA, M.; KOZAK, L. P. C57BL/6J mice as a polygenic developmental model of diet-induced obesity. **Physiol Rep**, v. 5, 2017.

CHYLIKOVA, J.; DVORACKOVA, J.; TAUBER, Z.; KAMARAD, V. M1/M2 macrophage polarization in human obese adipose tissue. **Biomedical Papers**, v. 162, n. 2, p. 79–82, 25 jun. 2018.

CI, X.; CHU, X.; XU, X.; LI, H.; DENG, X. Short-term roxithromycin treatment attenuates airway inflammation via MAPK/NF-kappaB activation in a mouse model of allergic asthma. **Inflamm Res**, v. 61, p. 749–758, 2012.

CIEPIELA, O.; OSTAFIN, M.; DEMKOW, U. Neutrophils in asthma--a review. **Respir Physiol Neurobiol**, v. 209, p. 13–16, 2015.

COLLINS, S.; MARTIN, T. L.; SURWIT, R. S.; ROBIDOUX, J. Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. **Physiol Behav**, v. 81, p. 243–248, 2004.

COLLISON, A.; MATTES, J.; PLANK, M.; FOSTER, P. S. Inhibition of house dust mite-induced allergic airways disease by antagonism of microRNA-145 is comparable to glucocorticoid treatment. **J Allergy Clin Immunol**, v. 128, p. 160–167 e4, 2011.

COLLISON, A.; HATCHWELL, L.; VERRILLS, N.; WARK, P. A.; DE SIQUEIRA, A. P.; TOOZE, M.; CARPENTER, H.; DON, A. S.; MORRIS, J. C.; ZIMMERMANN, N.; BARTLETT, N. W.; ROTHENBERG, M. E.; JOHNSTON, S. L.; FOSTER, P. S.; MATTES, J. The E3 ubiquitin ligase midline 1 promotes allergen and rhinovirus-induced asthma by inhibiting protein phosphatase 2A activity. **Nat Med**, v. 19, p. 232–237, 2013a.

COLLISON, A.; HATCHWELL, L.; VERRILLS, N.; WARK, P. A. B.; DE SIQUEIRA, A. P.; TOOZE, M.; CARPENTER, H.; DON, A. S.; MORRIS, J. C.; ZIMMERMANN, N.; BARTLETT, N. W.; ROTHENBERG, M. E.; JOHNSTON, S. L.; FOSTER, P. S.; MATTES, J. The E3 ubiquitin ligase midline 1 promotes allergen and rhinovirus-induced asthma by inhibiting protein phosphatase 2A activity. **Nature Medicine**, v. 19, n. 2, p. 232–237, 20 fev. 2013b.

COLLISON, A. M.; SOKULSKY, L. A.; SHERRILL, J. D.; NIGHTINGALE, S.; HATCHWELL, L.; TALLEY, N. J.; WALKER, M. M.; ROTHENBERG, M. E.; MATTES, J. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) regulates midline-1, thymic stromal lymphopoietin, inflammation, and remodeling in experimental eosinophilic esophagitis. **J Allergy Clin Immunol**, v. 136, p. 971–982, 2015.

DANIEL, E.; ROFF, A.; HSU, M.-H.; PANGANIBAN, R.; LAMBERT, K.; ISHMAEL, F. Effects of allergic stimulation and glucocorticoids on miR-155 in CD4+ T-cells. **American journal of clinical and experimental immunology**, v. 7, n. 4, p. 57–66, 2018.

DE VRIES, A.; HAZLEWOOD, L.; FITCH, P. M.; SECKL, J. R.; FOSTER, P.; HOWIE, S. E. High-fat feeding redirects cytokine responses and decreases allergic airway eosinophilia. **Clin Exp Allergy**, v. 39, p. 731–739, 2009.

DESAI, D. et al. Elevated sputum interleukin-5 and submucosal eosinophilia in obese individuals with severe asthma. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 188, p. 657–663, 2013.

DHAMI, S. et al. Allergen immunotherapy for allergic asthma: A systematic review and meta-analysis. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 72, n. 12, p. 1825–1848, 2017.

DIAZ, J.; WARREN, L.; HELFNER, L.; XUE, X.; CHATTERJEE, P. K.; GUPTA, M.; SOLANKI, M. H.; ESPOSITO, M.; BONAGURA, V.; METZ, C. N. Obesity shifts house dust mite-induced airway cellular infiltration from eosinophils to macrophages: effects of glucocorticoid treatment. **Immunologic Research**, 2015.

DIETZE, J.; BOCKING, C.; HEVERHAGEN, J. T.; VOELKER, M. N.; RENZ, H. Obesity lowers the threshold of allergic sensitization and augments airway eosinophilia in a mouse model of asthma. **Allergy**, v. 67, p. 1519–1529, 2012.

DIXON, A. E.; POYNTER, M. E. Mechanisms of Asthma in Obesity. Pleiotropic Aspects of Obesity Produce Distinct Asthma Phenotypes. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 54, p. 601–608, 2016.

DURRANI, S. R.; MUKKADA, V. A.; GUILBERT, T. W. Eosinophilic Esophagitis: an Important Comorbid Condition of Asthma? 2016.

EKICI, A.; EKICI, M.; ERDEMOGLU, A. K. Effect of azithromycin on the severity of bronchial hyperresponsiveness in patients with mild asthma. **J Asthma**, v. 39, p. 181–185, 2002.

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

FEARNSIDE, J. F.; DUMAS, M. E.; ROTHWELL, A. R.; WILDER, S. P.; CLOAREC, O.; TOYE, A.; BLANCHER, C.; HOLMES, E.; TATOUD, R.; BARTON, R. H.; SCOTT, J.; NICHOLSON, J. K.; GAUGUIER, D. Phylometabonomic patterns of adaptation to high fat diet feeding in inbred mice. **PLoS One**, v. 3, p. e1668, 2008.

FERRANTE, A. W.; JR. The immune cells in adipose tissue. **Diabetes, obesity & metabolism**, v. 15 Suppl 3, n. 0 3, p. 34–8, set. 2013.

FILIPOWICZ, W.; BHATTACHARYYA, S. N.; SONENBERG, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? **Nat Rev Genet**, v. 9, p. 102–114, 2008.

FOGLI, L. K.; SUNDRUD, M. S.; GOEL, S.; BAJWA, S.; JENSEN, K.; DERUDDER, E.; SUN, A.; COFFRE, M.; UYTENHOVE, C.; VAN SNICK, J.; SCHMIDT-SUPPRIAN, M.; RAO, A.; GRUNIG, G.; DURBIN, J.; CASOLA, S. S.; RAJEWSKY, K.; KORALOV, S. B.; KORALOV, S. B. T Cell-Derived IL-17 Mediates Epithelial Changes in the Airway and Drives Pulmonary Neutrophilia. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 6, p. 3100–3111, set. 2013.

FORNO, E.; HAN, Y.-Y.; MUZUMDAR, R. H.; CELEDÓN, J. C. Insulin resistance, metabolic syndrome, and lung function in US adolescents with and without asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 136, n. 2, p. 304–311.e8, 1 ago. 2015.

FOSTER, P. S.; PLANK, M.; COLLISON, A.; TAY, H. L.; KAIKO, G. E.; LI, J.; JOHNSTON, S. L.; HANSBRO, P. M.; KUMAR, R. K.; YANG, M.; MATTES, J. The emerging role of microRNAs in regulating immune and inflammatory responses in the lung. **Immunol Rev**, v. 253, p. 198–215, 2013.

FRICKE, K.; VIEIRA, M.; YOUNAS, H.; SHIN, M.-K.; BEVANS-FONTI, S.; BERGER, S.; LEE, R.; D'ALESSIO, F. R.; ZHONG, Q.; NELSON, A.; LOUBE, J.; SANCHEZ, I.; HANSEL, N. N.; MITZNER, W.; POLOTSKY, V. Y. High fat diet induces airway hyperresponsiveness in mice. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 6404, 23 dez. 2018.

FU, J.; BAINES, K. J.; WOOD, L. G.; GIBSON, P. G. Systemic Inflammation Is Associated with Differential Gene Expression and Airway Neutrophilia in Asthma. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, v. 17, n. 4, p. 187–199, abr. 2013.

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

GAO, S.; WANG, Y.; WANG, M.; LI, Z.; ZHAO, Z.; WANG, R. X.; WU, R.; YUAN, Z.; CUI, R.; JIAO, K.; WANG, L.; OUYANG, L.; LIU, R. MicroRNA-155, induced by FOXP3 through transcriptional repression of BRCA1, is associated with tumor initiation in human breast cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 25, p. 41451–41464, 20 jun. 2017.

GIBSON, P. G.; YANG, I. A.; UPHAM, J. W.; REYNOLDS, P. N.; HODGE, S.; JAMES, A. L.; JENKINS, C.; PETERS, M. J.; MARKS, G. B.; BARAKET, M.; POWELL, H.; TAYLOR, S. L.; LEONG, L. E. X.; ROGERS, G. B.; SIMPSON, J. L. Effect of azithromycin on asthma exacerbations and quality of life in adults with persistent uncontrolled asthma (AMAZES): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **The Lancet**, v. 390, n. 10095, p. 659–668, 2017.

GINA. **Global Strategy for Asthma Management and Prevention**. Disponível em: <<https://ginasthma.org/>>.

GLOBAL ASTHMA NETWORK. The Global Asthma Report. 2018.

GOOD-JACOBSON, K. L.; SZUMILAS, C. G.; CHEN, L.; SHARPE, A. H.; TOMAYKO, M. M.; SHLOMCHIK, M. J. PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. **Nature immunology**, v. 11, n. 6, p. 535–42, jun. 2010a.

GOOD-JACOBSON, K. L.; SZUMILAS, C. G.; CHEN, L.; SHARPE, A. H.; TOMAYKO, M. M.; SHLOMCHIK, M. J. PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. **Nature Immunology**, v. 11, n. 6, p. 535–542, 9 jun. 2010b.

GOUVEIA, A. C.; BRUGIOLO, A. S.; ALVES, C. C.; SILVA, F. M.; MESQUITA, F. P.; GAMEIRO, J.; FERREIRA, A. P. Th2 responses in OVA-sensitized BALB/c mice are down-modulated by Mycobacterium bovis BCG treatment. **J Clin Immunol**, v. 33, p. 235–245, 2013.

GOUVEIA, A. C. C.; BRAGA, F. G.; MOTA, M.; SILVA, F. M. C.; BRUGIOLO, A. S. S.; OLIVEIRA, E. E.; AYUPE, M. C.; TEIXEIRA, H. C.; FERREIRA, A. P. Enhanced expression of PD-L1 and IFN-gamma on dendritic cells is associated with BCG-induced Th2 inhibition. **Cytokine**, v. 99, p. 163–172, 2017.

GROTTA, M. B.; SQUEBOLA-COLA, D. M.; TORO, A. A. D. C.; RIBEIRO, M. A. G. O.; MAZON, S. B.; RIBEIRO, J. D.; ANTUNES, E. Obesity increases eosinophil activity in asthmatic children and adolescents. **BMC pulmonary medicine**, v. 13, p. 39, 18 jun. 2013.

GU, B.-H.; MADISON, M. C.; CORRY, D.; KHERADMAND, F. Matrix remodeling in chronic lung diseases. **Matrix Biology**, v. 73, p. 52–63, 1 nov. 2018.

GUEDERS, M. M.; PAULISSEN, G.; CRAHAY, C.; QUESADA-CALVO, F.; HACHA, J.; VAN HOVE, C.; TOURNOY, K.; LOUIS, R.; FOIDART, J. M.; NOEL, A.; CATALDO, D. D. Mouse models of asthma: a comparison between C57BL/6 and BALB/c strains regarding bronchial responsiveness, inflammation, and cytokine production. **Inflamm Res**, v. 58, p. 845–854, 2009.

GUILHERME, A.; VIRBASIU, J. V.; PURI, V.; CZECH, M. P. Adipocyte dysfunctions

linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 5, p. 367–377, maio 2008.

HAJ-SALEM, I.; FAKHFAKH, R.; BERUBE, J. C.; JACQUES, E.; PLANTE, S.; SIMARD, M. J.; BOSSE, Y.; CHAKIR, J. MicroRNA-19a enhances proliferation of bronchial epithelial cells by targeting TGFbetaR2 gene in severe asthma. **Allergy**, v. 70, p. 212–219, 2015.

HALIM, T. Y. F.; STEER, C. A.; MATHÄ, L.; GOLD, M. J.; MARTINEZ-GONZALEZ, I.; MCNAGNY, K. M.; MCKENZIE, A. N. J.; TAKEI, F. Group 2 innate lymphoid cells are critical for the initiation of adaptive T helper 2 cell-mediated allergic lung inflammation. **Immunity**, v. 40, n. 3, p. 425–35, mar. 2014.

HAMMAD, H.; LAMBRECHT, B. N. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 3, p. 193–204, 1 mar. 2008.

HAMS, E.; MCCARRON, M. J.; AMU, S.; YAGITA, H.; AZUMA, M.; CHEN, L.; FALLON, P. G. Blockade of B7-H1 (programmed death ligand 1) enhances humoral immunity by positively regulating the generation of T follicular helper cells. **J Immunol**, v. 186, p. 5648–5655, 2011.

HARADA, Y.; TANAKA, S.; MOTOMURA, Y.; HARADA, Y.; OHNO, S.; OHNO, S.; YANAGI, Y.; INOUE, H.; KUBO, M. The 3' Enhancer CNS2 Is a Critical Regulator of Interleukin-4-Mediated Humoral Immunity in Follicular Helper T Cells. **Immunity**, v. 36, n. 2, p. 188–200, 24 fev. 2012.

HASEGAWA, K.; TSUGAWA, Y.; LOPEZ, B. L.; SMITHLINE, H. A.; SULLIVAN, A. F.; CAMARGO JR., C. A. Body mass index and risk of hospitalization among adults presenting with asthma exacerbation to the emergency department. **Ann Am Thorac Soc**, v. 11, p. 1439–1444, 2014.

HENDELES, L.; KHAN, Y. R.; SHUSTER, J. J.; CHESROWN, S. E.; ABU-HASAN, M. Omalizumab therapy for asthma patients with poor adherence to inhaled corticosteroid therapy. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 114, n. 1, p. 58–62.e2, jan. 2015.

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

HOLGUIN, F.; BLEECKER, E. R.; BUSSE, W. W.; CALHOUN, W. J.; CASTRO, M.; ERZURUM, S. C.; FITZPATRICK, A. M.; GASTON, B.; ISRAEL, E.; JARJOUR, N. N.; MOORE, W. C.; PETERS, S. P.; YONAS, M.; TEAGUE, W. G.; WENZEL, S. E. Obesity and asthma: an association modified by age of asthma onset. **J Allergy Clin Immunol**, v. 127, p. 1486–93 e2, 2011.

HORAK, F.; DOBERER, D.; EBER, E.; HORAK, E.; POHL, W.; RIEDLER, J.; SZÉPFALUSI, Z.; WANTKE, F.; ZACHARASIEWICZ, A.; STUDNICKA, M.; PRIVLECT HORAK, P. F.; DOBERER, D.; UNIV EBER, P. E.; SENIOR PHYSICIAN MED HORAK, A. E.; UNIV POHL, P. W. Diagnosis and management of asthma-Statement on the 2015 GINA Guidelines. **Wien Klin Wochenschr**, v. 128, p. 541–554, 2016.

HOSOKI, K.; ITAZAWA, T.; BOLDOGH, I.; SUR, S. Neutrophil recruitment by

allergens contribute to allergic sensitization and allergic inflammation. **Current opinion in allergy and clinical immunology**, v. 16, n. 1, p. 45–50, fev. 2016.

HRVACIC, B.; BOSNJAK, B.; BOSNAR, M.; FERENCIC, Z.; GLOJNARIC, I.; ERAKOVIC HABER, V. Clarithromycin suppresses airway hyperresponsiveness and inflammation in mouse models of asthma. **Eur J Pharmacol**, v. 616, p. 236–243, 2009.

HUMENIUUK, P.; DUBIELA, P.; HOFFMANN-SOMMERGRUBER, K. Dendritic Cells and Their Role in Allergy: Uptake, Proteolytic Processing and Presentation of Allergens. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 7, 11 jul. 2017.

IRVIN, C.; ZAFAR, I.; GOOD, J.; ROLLINS, D.; CHRISTIANSON, C.; GORSKA, M. M.; MARTIN, R. J.; ALAM, R. Increased frequency of dual-positive TH2/TH17 cells in bronchoalveolar lavage fluid characterizes a population of patients with severe asthma. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 134, n. 5, p. 1175–1186.e7, nov. 2014.

JACKSON, S. W.; JACOBS, H. M.; ARKATKAR, T.; DAM, E. M.; SCHARPING, N. E.; KOLHATKAR, N. S.; HOU, B.; BUCKNER, J. H.; RAWLINGS, D. J. B cell IFN- $\gamma$  receptor signaling promotes autoimmune germinal centers via cell-intrinsic induction of BCL-6. **Journal of Experimental Medicine**, v. 213, n. 5, p. 733–750, 2 maio 2016.

JAMES, B. R.; TOMANEK-CHALKLEY, A.; ASKELAND, E. J.; KUCABA, T.; GRIFFITH, T. S.; NORIAN, L. A. Diet-induced obesity alters dendritic cell function in the presence and absence of tumor growth. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 189, n. 3, p. 1311–21, 1 ago. 2012.

JATAKANON, A.; UASUF, C.; MAZIAK, W.; LIM, S.; CHUNG, K. F.; BARNES, P. J. Neutrophilic Inflammation in Severe Persistent Asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 160, n. 5, p. 1532–1539, 14 nov. 1999.

JOHNSTON, R. A.; ZHU, M.; RIVERA-SANCHEZ, Y. M.; LU, F. L.; THEMAN, T. A.; FLYNT, L.; SHORE, S. A. Allergic Airway Responses in Obese Mice. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 176, n. 7, p. 650–658, 20 out. 2007.

JOHNSTON, S. L. et al. Azithromycin for Acute Exacerbations of Asthma: The AZALEA Randomized Clinical Trial. **JAMA Intern Med**, v. 176, p. 1630–1637, 2016.

JOVICIC, N.; JEFTIC, I.; JOVANOVIC, I.; RADOSAVLJEVIC, G.; ARSENIJEVIC, N.; LUKIC, M. L.; PEJNOVIC, N. Differential Immunometabolic Phenotype in Th1 and Th2 Dominant Mouse Strains in Response to High-Fat Feeding. **PLoS One**, v. 10, p. e0134089, 2015.

KAINUMA, K.; KOBAYASHI, T.; D'ALESSANDRO-GABAZZA, C. N.; TODA, M.; YASUMA, T.; NISHIHAMA, K.; FUJIMOTO, H.; KUWABARA, Y.; HOSOKI, K.; NAGAO, M.; FUJISAWA, T.; GABAZZA, E. C.  $\beta$ 2 adrenergic agonist suppresses eosinophil-induced epithelial-to-mesenchymal transition of bronchial epithelial cells. **Respiratory Research**, v. 18, n. 1, p. 79, 2 dez. 2017.

KANG, J. Y.; JO, M. R.; KANG, H. H.; KIM, S. K.; KIM, M. S.; KIM, Y. H.; KIM, S. C.;

KWON, S. S.; LEE, S. Y.; KIM, J. W. Long-term azithromycin ameliorates not only airway inflammation but also remodeling in a murine model of chronic asthma. **Pulm Pharmacol Ther**, v. 36, p. 37–45, 2016.

KAPSENBERG, M. L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. **Nat Rev Immunol**, v. 3, p. 984–993, 2003.

KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, p. 2548–2556, 2004.

KEW, K. M.; UNDELA, K.; KOTORTSI, I.; FERRARA, G. Macrolides for chronic asthma. **Cochrane Database Syst Rev**, p. CD002997, 2015.

KHAN, A. R.; HAMS, E.; FLOUDAS, A.; SPARWASSER, T.; WEAVER, C. T.; FALLON, P. G. PD-L1hi B cells are critical regulators of humoral immunity. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 5997, 22 dez. 2015.

KHO, A. T.; MCGEACHIE, M. J.; MOORE, K. G.; SYLVIA, J. M.; WEISS, S. T.; TANTISIRA, K. G. Circulating microRNAs and prediction of asthma exacerbation in childhood asthma. **Respiratory Research**, v. 19, n. 1, 2018.

KIM, H. Y.; LEE, H. J.; CHANG, Y.; PICHAVANT, M.; STEPHANIE, A.; FITZGERALD, K. A.; IWAKURA, Y.; ISRAEL, E.; BOLGER, K.; DEKRUYFF, R. H.; UMETSU, D. T. IL-17 producing innate lymphoid cells and the NLRP3 inflammasome facilitate obesity-associated airway hyperreactivity. v. 20, n. 1, p. 54–61, 2014.

KNOLLE, M. D.; CHIN, S. B.; RANA, B. M. J.; ENGLEZAKIS, A.; NAKAGAWA, R.; FALLON, P. G.; GIT, A.; MCKENZIE, A. N. J. MicroRNA-155 Protects Group 2 Innate Lymphoid Cells From Apoptosis to Promote Type-2 Immunity. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 2232, 2018.

KOBAYASHI, T.; IJIMA, K.; DENT, A. L.; KITA, H. Follicular helper T cells mediate IgE antibody response to airborne allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 139, n. 1, p. 300–313.e7, 1 jan. 2017.

KOGA, T.; OTOMO, K.; MIZUI, M.; YOSHIDA, N.; UMEDA, M.; ICHINOSE, K.; KAWAKAMI, A.; TSOKOS, G. C. Calcium/Calmodulin-Dependent Kinase IV Facilitates the Recruitment of Interleukin-17-Producing Cells to Target Organs Through the CCR6/CCL20 Axis in Th17 Cell-Driven Inflammatory Diseases. **Arthritis Rheumatol**, v. 68, p. 1981–1988, 2016.

KOHLHAAS, S.; GARDEN, O. A.; SCUDAMORE, C.; TURNER, M.; OKKENHAUG, K.; VIGORITO, E. Cutting edge: the Foxp3 target miR-155 contributes to the development of regulatory T cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 182, n. 5, p. 2578–82, 1 mar. 2009.

KOSARAJU, R.; GUESDON, W.; CROUCH, M. J.; TEAGUE, H. L.; SULLIVAN, E. M.; KARLSSON, E. A.; SCHULTZ-CHERRY, S.; GOWDY, K.; BRIDGES, L. C.; REESE, L. R.; NEUFER, P. D.; ARMSTRONG, M.; REISDORPH, N.; MILNER, J. J.; BECK, M.; SHAIKH, S. R. B Cell Activity Is Impaired in Human and Mouse Obesity and Is Responsive to an Essential Fatty Acid upon Murine Influenza Infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 198, n. 12, p. 4738–4752, 2017.

KRISHNAMOORTHY, N. et al. Neutrophil cytoplasmic granules induce TH17 differentiation and

skew inflammation toward neutrophilia in severe asthma. **Science immunology**, v. 3, n. 26, p. eaao4747, 3 ago. 2018.

KRISHNASWAMY, J. K. et al. Migratory CD11b+ conventional dendritic cells induce T follicular helper cell-dependent antibody responses. **Science Immunology**, v. 2, n. 18, p. eaam9169, 1 dez. 2017.

KUHN, L. B.; ZAPF, S.; KRISTINA, D.; STROBL, D. C.; WEIH, F.; BLUM, H.; WEIGERT, O.; STROBL, L. J.; URSULA, Z.-S. The non-canonical NF-kappaB Signaling Pathway Contributes to the Expansion and Lymphomagenesis of CD40-activated B Cells. **Blood**, v. 132, n. Suppl 1, p. 1340–1340, 21 nov. 2018.

LAGO, F.; DIEGUEZ, C.; GOMEZ-REINO, J.; GUALILLO, O. The emerging role of adipokines as mediators of inflammation and immune responses. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 18, p. 313–325, 2007.

LAMBRECHT, B. N.; HAMMAD, H. The airway epithelium in asthma. **Nat Med**, v. 18, p. 684–692, 2012.

LEAL, V. N. C.; GENOV, I. R.; MALLOZI, M. C.; SOLÉ, D.; PONTILLO, A. Polymorphisms in inflammasome genes and risk of asthma in Brazilian children. **Molecular Immunology**, v. 93, p. 64–67, 1 jan. 2018.

LEE, B. O.; JUAN MOYRON-QUIROZ; JAVIER RANGEL-MORENO; KIM L. KUSSER; LOUISE HARTSON; FRANK SPRAGUE; FRANCES E. LUND; TROY D. RANDALL. CD40, but Not CD154, Expression on B Cells Is Necessary for Optimal Primary B Cell Responses. **J Immunol**, v. 171, p. 5707–5717, 2003.

LEE, H. Y.; LEE, H. Y.; CHOI, J. Y.; HUR, J.; KIM, I. K.; KIM, Y. K.; KANG, J. Y.; LEE, S. Y. Inhibition of MicroRNA-21 by an antagomir ameliorates allergic inflammation in a mouse model of asthma. **Exp Lung Res**, v. 43, p. 109–119, 2017a.

LEE, J.-B.; CHEN, C.-Y.; LIU, B.; MUGGE, L.; ANGKASEKWINAI, P.; FACCHINETTI, V.; DONG, C.; LIU, Y.-J.; ROTHENBERG, M. E.; HOGAN, S. P.; FINKELMAN, F. D.; WANG, Y.-H. IL-25 and CD4+ TH2 cells enhance type 2 innate lymphoid cell-derived IL-13 production, which promotes IgE-mediated experimental food allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 137, n. 4, p. 1216–1225.e5, 1 abr. 2016.

LEE, T.-H.; CHANG, H. S.; BAE, D.-J.; SONG, H. J.; KIM, M.-S.; PARK, J. S.; JUN, J. A.; LEE, S. Y.; UH, S. T.; KIM, S. H.; PARK, C.-S. Role of S100A9 in the development of neutrophilic inflammation in asthmatics and in a murine model. **Clinical Immunology**, v. 183, p. 158–166, 1 out. 2017b.

LEWIS, S. A.; PAVORD, I. D.; STRINGER, J. R.; KNOX, A. J.; WEISS, S. T.; BRITTON, J. R. The Relation Between Peripheral Blood Leukocyte Counts and Respiratory Symptoms, Atopy, Lung Function, and Airway Responsiveness in Adults. **Chest**, v. 119, n. 1, p. 105–114, 1 jan. 2001.

LI, J. G.; DU, Y. M.; YAN, Z. D.; YAN, J.; ZHUANSUN, Y. X.; CHEN, R.; ZHANG, W.; FENG, S. L.; RAN, P. X. CD80 and CD86 knockdown in dendritic cells regulates Th1/Th2 cytokine production in asthmatic mice. **Exp Ther Med**, v. 11, p. 878–884, 2016.



LI, J. J.; TAY, H. L.; MALTBY, S.; XIANG, Y.; EYERS, F.; HATCHWELL, L.; ZHOU, H.; TOOP, H. D.; MORRIS, J. C.; NAIR, P.; MATTES, J.; FOSTER, P. S.; YANG, M. MicroRNA-9 regulates steroid-resistant airway hyperresponsiveness by reducing protein phosphatase 2A activity. **J Allergy Clin Immunol**, v. 136, p. 462–473, 2015.

LIN, A. A.; FREEMAN, A. F.; NUTMAN, T. B. IL-10 Indirectly Downregulates IL-4–Induced IgE Production by Human B Cells. **ImmunoHorizons**, v. 2, n. 11, p. 398–406, 1 dez. 2018.

LIN, S.-J.; LEE, W.-J.; LIANG, Y.-W.; YAN, D.-C.; CHENG, P.-J.; KUO, M.-L. Azithromycin Inhibits IL-5 Production of T Helper Type 2 Cells from Asthmatic Children. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 156, n. 2, p. 179–186, 2011.

LINTERMAN, M. A.; PIERSON, W.; LEE, S. K.; KALLIES, A.; KAWAMOTO, S.; RAYNER, T. F.; SRIVASTAVA, M.; DIVEKAR, D. P.; BEATON, L.; HOGAN, J. J.; FAGARASAN, S.; LISTON, A.; SMITH, K. G. C.; VINUESA, C. G. Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. **Nature Medicine**, v. 17, n. 8, p. 975–982, 24 ago. 2011.

LINTERMAN, M. A.; HILL, D. L.; YU, D. Can follicular helper T cells be targeted to improve vaccine efficacy? 2016.

LIU, Y.; PU, Y.; LI, D.; ZHOU, L.; WAN, L. Azithromycin ameliorates airway remodeling via inhibiting airway epithelium apoptosis. **Life Sciences**, v. 170, p. 1–8, 1 fev. 2017.

LOTVALL, J.; AKDIS, C. A.; BACHARIER, L. B.; BJERMER, L.; CASALE, T. B.; CUSTOVIC, A.; LEMANSKE JR., R. F.; WARDLAW, A. J.; WENZEL, S. E.; GREENBERGER, P. A. Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. **J Allergy Clin Immunol**, v. 127, p. 355–360, 2011.

LU, T. X.; SHERRILL, J. D.; WEN, T.; PLASSARD, A. J.; BESSE, J. A.; ABONIA, J. P.; FRANCIOSI, J. P.; PUTNAM, P. E.; EBY, M.; MARTIN, L. J.; ARONOW, B. J.; ROTHENBERG, M. E. MicroRNA signature in patients with eosinophilic esophagitis, reversibility with glucocorticoids, and assessment as disease biomarkers. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 129, n. 4, p. 1064–75.e9, abr. 2012.

LU, T. X.; LIM, E.-J.; BESSE, J. A.; ITSKOVICH, S.; PLASSARD, A. J.; FULKERSON, P. C.; ARONOW, B. J.; ROTHENBERG, M. E. MiR-223 deficiency increases eosinophil progenitor proliferation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 190, n. 4, p. 1576–82, 15 fev. 2013.

LUGOGO, N. et al. Obesity's effect on asthma extends to diagnostic criteria. **J Allergy Clin Immunol**, 2017.

LUO, L.; LIU, M. Adipose tissue in control of metabolism. **Journal of Endocrinology**, v. 231, n. 3, p. R77–R99, dez. 2016.

LUTZ, T. A.; WOODS, S. C. Overview of animal models of obesity. **Curr Protoc Pharmacol**, v. Chapter 5, p. Unit5 61, 2012.

MA, X.; SUN, Z.; ZHAI, P.; YU, W.; WANG, T.; LI, F.; DING, J. Effect of follicular

helper T cells on the pathogenesis of asthma. **Exp Ther Med**, v. 14, p. 967–972, 2017.

MACDONALD, K. D.; MORAN, A. R.; SCHERMAN, A. J.; MCEVOY, C. T.; PLATTEAU, A. S. Maternal high-fat diet in mice leads to innate airway hyperresponsiveness in the adult offspring. **Physiol Rep**, v. 5, 2017.

MAES, T.; COBOS, F. A.; SCHLEICH, F.; SORBELLO, V.; HENKET, M.; DE PRETER, K.; BRACKE, K. R.; CONICKX, G.; MESNIL, C.; VANDESOMPELE, J.; LAHOUSSE, L.; BUREAU, F.; MESTDAGH, P.; JOOS, G. F.; RICCIARDOLO, F. L.; BRUSSELLE, G. G.; LOUIS, R. Asthma inflammatory phenotypes show differential microRNA expression in sputum. **J Allergy Clin Immunol**, v. 137, p. 1433–1446, 2016.

MAJEWSKA-SZCZEPANIK, M.; ASKENASE, P. W.; LOBO, F. M.; MARCIŃSKA, K.; WEN, L.; SZCZEPANIK, M. Epicutaneous immunization with ovalbumin and CpG induces TH1/TH17 cytokines, which regulate IgE and IgG2a production. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 138, n. 1, p. 262–273.e6, 1 jul. 2016.

MAJID, H.; KAO, C. Utility of exhaled nitric oxide in the diagnosis and management of asthma. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 16, n. 1, p. 42–47, jan. 2010.

MALMHÄLL, C.; ALAWIEH, S.; LU, Y.; SJÖSTRAND, M.; BOSSIOS, A.; ELDH, M.; RÅDINGER, M. MicroRNA-155 is essential for TH2-mediated allergen-induced eosinophilic inflammation in the lung. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 133, n. 5, p. 1429–1438.e7, 1 maio 2014.

MALMHÄLL, C.; JOHANSSON, K.; WINKLER, C.; ALAWIEH, S.; EKERLJUNG, L.; RÅDINGER, M. Altered miR-155 Expression in Allergic Asthmatic Airways. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 85, n. 4, p. 300–307, 1 abr. 2017.

MANIAKAS, A.; DESROSIERS, M. Azithromycin Add-On Therapy in High-Risk Postendoscopic Sinus Surgery Patients Failing Corticosteroid Irrigations: A Clinical Practice Audit. **American Journal of Rhinology & Allergy**, v. 28, n. 2, p. 151–155, 1 mar. 2014.

MANICONE, A. M.; GONG, K.; JOHNSTON, L. K.; GIANNANDREA, M. Diet-induced obesity alters myeloid cell populations in naive and injured lung. **Respir Res**, v. 17, p. 24, 2016.

MARTIN PELLETIER; LAURA MAGGI; ALESSANDRA MICHELETTI; ELENA LAZZERI; NICOLA TAMASSIA; CLAUDIO COSTANTINI; LORENZO COSMI; CLAUDIO LUNARDI; FRANCESCO ANNUNZIATO; CASSATELLA, M. A. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. **Blood**, v. 115, n. 2, p. 10, 2010.

MARTIN, R. A.; HODGKINS, S. R.; DIXON, A. E.; POYNTER, M. E. Aligning mouse models of asthma to human endotypes of disease. **Respirology**, v. 19, p. 823–833, 2014.

MATTES, J.; YANG, M.; MAHALINGAM, S.; KUEHR, J.; WEBB, D. C.; SIMSON, L.; HOGAN, S. P.; KOSKINEN, A.; MCKENZIE, A. N. J.; DENT, L. A.; ROTHENBERG,

- M. E.; MATTHAEI, K. I.; YOUNG, I. G.; FOSTER, P. S. Intrinsic defect in T cell production of interleukin (IL)-13 in the absence of both IL-5 and eotaxin precludes the development of eosinophilia and airways hyperreactivity in experimental asthma. **The Journal of experimental medicine**, v. 195, n. 11, p. 1433–44, jun. 2002.
- MATTIOLI, B.; STRAFACE, E.; QUARANTA, M. G.; GIORDANI, L.; VIORA, M. Leptin promotes differentiation and survival of human dendritic cells and licenses them for Th1 priming. **J Immunol**, v. 174, p. 6820–6828, 2005.
- MAURI, C.; MENON, M. Human regulatory B cells in health and disease: therapeutic potential. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 3, p. 772–779, 1 mar. 2017.
- MCCALLISTER, M.; MEDRANO, R.; WOJCICKI, J. Early life obesity increases the risk for asthma in San Francisco born Latina girls. **Allergy and asthma proceedings**, v. 39, n. 4, p. 273–280, 1 jul. 2018.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428–435, 2008.
- MESIN, L.; ERSCHING, J.; VICTORA, G. D. Review Germinal Center B Cell Dynamics. **Immunity**, v. 45, p. 471–482, 2016.
- MEYERHOLZ, D. K.; GRIFFIN, M. A.; CASTILOW, E. M.; VARGA, S. M. Comparison of histochemical methods for murine eosinophil detection in an RSV vaccine-enhanced inflammation model. **Toxicologic pathology**, v. 37, n. 2, p. 249–55, fev. 2009.
- MITCHELL, P. D.; EL-GAMMAL, A. I.; O'BYRNE, P. M. Emerging monoclonal antibodies as targeted innovative therapeutic approaches to asthma. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 99, n. 1, p. 38–48, 2016.
- MITCHELL, P. D.; O'BYRNE, P. M. Epithelial-Derived Cytokines in Asthma. **Chest**, v. 151, n. 6, p. 1338–1344, 1 jun. 2017.
- MITO, N.; KITADA, C.; HOSODA, T.; SATO, K. Effect of diet-induced obesity on ovalbumin-specific immune response in a murine asthma model. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 51, n. 10, p. 1241–6, out. 2002.
- MITSDOERFFER, M.; LEE, Y.; JÄGER, A.; KIM, H.-J.; KORN, T.; KOLLS, J. K.; CANTOR, H.; BETTELLI, E.; KUCHROOA, V. K. Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers. **American Family Physician**, v. 46, n. 4, p. 1060–1062, 1992.
- MIZUTANI, N.; NABE, T.; YOSHINO, S. IL-17A promotes the exacerbation of IL-33-induced airway hyperresponsiveness by enhancing neutrophilic inflammation via CXCR2 signaling in mice. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 192, n. 4, p. 1372–84, 15 fev. 2014.
- MOHANAN, S.; TAPP, H.; MCWILLIAMS, A.; DULIN, M. Obesity and asthma: pathophysiology and implications for diagnosis and management in primary care. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 239, p. 1531–1540, 2014.
- MONTESEIRIN, J. Neutrophils and asthma. **J Investig Allergol Clin Immunol**, v. 19, p. 340–354, 2009.

MONTGOMERY, M. K.; HALLAHAN, N. L.; BROWN, S. H.; LIU, M.; MITCHELL, T. W.; COONEY, G. J.; TURNER, N. Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in response to high-fat feeding. **Diabetologia**, v. 56, n. 5, p. 1129–1139, 20 maio 2013.

MOORE, W. C. et al. Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 181, p. 315–323, 2010.

MOORTHY, A. N.; TAN, K. B.; WANG, S.; NARASARAJU, T.; CHOW, V. T. Effect of High-Fat Diet on the Formation of Pulmonary Neutrophil Extracellular Traps during Influenza Pneumonia in BALB/c Mice. **Front Immunol**, v. 7, p. 289, 2016.

MORI, M. A.; LIU, M.; BEZY, O.; ALMIND, K.; SHAPIRO, H.; KASIF, S.; KAHN, C. R. A systems biology approach identifies inflammatory abnormalities between mouse strains prior to development of metabolic disease. **Diabetes**, v. 59, n. 11, p. 2960–71, nov. 2010.

MORRIS, D. L.; CHO, K. W.; DELPROPOSTO, J. L.; OATMEN, K. E.; GELETKA, L. M.; MARTINEZ-SANTIBANEZ, G.; SINGER, K.; LUMENG, C. N. Adipose tissue macrophages function as antigen-presenting cells and regulate adipose tissue CD4+ T cells in mice. **Diabetes**, v. 62, p. 2762–2772, 2013.

MORTEN, M.; COLLISON, A.; MEREDITH, J.; MURPHY, V.; ROBINSON, P.; GIBSON, P.; MATTES, J. **FeNO-guided management of asthma during pregnancy reduces respiratory symptoms and asthma diagnosis in childhood.** 7.2 Paediatric Asthma and Allergy. **Anais...European Respiratory Society**, 8 set. 2016Disponível em: <<http://erj.ersjournals.com/lookup/doi/10.1183/13993003.congress-2016.PA330>>. Acesso em: 30 jan. 2019

MRAZ, M.; HALUZIK, M. The role of adipose tissue immune cells in obesity and low-grade inflammation. **J Endocrinol**, v. 222, p. R113-27, 2014.

MUC, M.; MOTA-PINTO, A.; PADEZ, C. Association between obesity and asthma - epidemiology, pathophysiology and clinical profile. **Nutr Res Rev**, v. 29, p. 194–201, 2016.

MURPHY, D. M.; FORREST, I. A.; WARD, C.; CORRIS, P. A.; JOHNSON, G. E.; JONES, D.; FISHER, A. J.; EGAN, J. J.; CAWSTON, T. E.; LORDAN, J. L. Effect of azithromycin on primary bronchial epithelial cells derived from stable lung allografts. **Thorax**, v. 62, n. 9, p. 834, set. 2007.

MURUGAIYAN, G.; BEYNON, V.; MITTAL, A.; JOLLER, N.; WEINER, H. L. Silencing microRNA-155 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 187, n. 5, p. 2213–21, 1 set. 2011.

NEWSON, R. B. et al. The association of asthma, nasal allergies, and positive skin prick tests with obesity, leptin, and adiponectin. **Clinical and Experimental Allergy**, 2014.

NOBLE, A.; ZHAO, J. Follicular helper T cells are responsible for IgE responses to Der p 1 following house dust mite sensitization in mice. **Clin Exp Allergy**, v. 46, p.

1075–1082, 2016.

NOTI, M. et al. Thymic stromal lymphopoietin–elicited basophil responses promote eosinophilic esophagitis. **Nature Medicine**, v. 19, n. 8, p. 1005–1013, ago. 2013.

NURMAGAMBETOV, T.; KUWAHARA, R.; GARBE, P. The Economic Burden of Asthma in the United States, 2008–2013. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 15, n. 3, p. 348–356, 1 mar. 2018.

NUSSBAUM, J. C.; VAN DYKEN, S. J.; VON MOLTKE, J.; CHENG, L. E.; MOHAPATRA, A.; MOLOFSKY, A. B.; THORNTON, E. E.; KRUMMEL, M. F.; CHAWLA, A.; LIANG, H.-E.; LOCKSLEY, R. M. Type 2 innate lymphoid cells control eosinophil homeostasis. **Nature**, v. 502, n. 7470, p. 245–8, 10 out. 2013.

O'CONNELL, R. M.; RAO, D. S.; CHAUDHURI, A. A.; BALTIMORE, D. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. **Nat Rev Immunol**, v. 10, p. 111–122, 2010a.

O'CONNELL, R. M.; KAHN, D.; GIBSON, W. S. J.; ROUND, J. L.; SCHOLZ, R. L.; CHAUDHURI, A. A.; KAHN, M. E.; RAO, D. S.; BALTIMORE, D. MicroRNA-155 Promotes Autoimmune Inflammation by Enhancing Inflammatory T Cell Development. **Immunity**, v. 33, n. 4, p. 607–619, 29 out. 2010b.

OBA, Y.; SALZMAN, G. A. Cost-effectiveness analysis of omalizumab in adults and adolescents with moderate-to-severe allergic asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 114, n. 2, p. 265–269, 1 ago. 2004.

OLIPHANT, C. J.; BARLOW, J. L.; MCKENZIE, A. N. J. Insights into the initiation of type 2 immune responses. **Immunology**, v. 134, n. 4, p. 378–85, dez. 2011.

PAPOUTSAKIS, C.; PAPADAKOU, E.; CHONDRONIKOLA, M.; ANTONOGEORGOS, G.; MATZIOU, V.; DRAKOULI, M.; KONSTANTAKI, E.; PRIFTIS, K. N. An obesity-preventive lifestyle score is negatively associated with pediatric asthma. **European Journal of Nutrition**, v. 57, n. 4, p. 1605–1613, 9 jun. 2018.

PASSALACQUA, G.; MATUCCI, A.; VULTAGGIO, A.; BAGNASCO, D.; MINCARINI, M.; MAGGI, E.; CANONICA, G. W. The safety of monoclonal antibodies in asthma. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 15, n. 8, p. 1087–1095, 2 ago. 2016.

PATTARINI, L.; TRICHOT, C.; BOGIATZI, S.; GRANDCLAUDON, M.; MELLER, S.; KEUYLIAN, Z.; DURAND, M.; VOLPE, E.; MADONNA, S.; CAVANI, A.; CHIRICOZZI, A.; ROMANELLI, M.; HORI, T.; HOVNANIAN, A.; HOMEY, B.; SOUMELIS, V. TSLP-activated dendritic cells induce human T follicular helper cell differentiation through OX40-ligand. **The Journal of experimental medicine**, v. 214, n. 5, p. 1529–1546, 1 maio 2017.

PATTERSON, M. F.; BORISH, L.; KENNEDY, J. L. The past, present, and future of monoclonal antibodies to IL-5 and eosinophilic asthma: a review. **Journal of asthma and allergy**, v. 8, p. 125–34, 2015.

PAULMURUGAN, R. MicroRNAs - a new generation molecular targets for treating cellular diseases. **Theranostics**, v. 3, p. 927–929, 2013.

PÈNE, J.; GUGLIELMI, L.; GAUCHAT, J.-F.; HARRER, N.; WOISETSCHLÄGER, M.; BOULAY, V.; FABRE, J.-M.; DEMOLY, P.; YSSEL, H. IFN-gamma-mediated inhibition of human IgE synthesis by IL-21 is associated with a polymorphism in the IL-21R gene. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 177, n. 8, p. 5006–13, 15 out. 2006.

PERRY, M. M.; BAKER, J. E.; GIBEON, D. S.; ADCOCK, I. M.; CHUNG, K. F. Airway smooth muscle hyperproliferation is regulated by microRNA-221 in severe asthma. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 50, p. 7–17, 2014.

PIACENTINI, G. L.; PERONI, D. G.; BODINI, A.; PIGOZZI, R.; COSTELLA, S.; LOIACONO, A.; BONER, A. L. Azithromycin reduces bronchial hyperresponsiveness and neutrophilic airway inflammation in asthmatic children: a preliminary report. **Allergy Asthma Proc**, v. 28, p. 194–198, 2007.

PIZZOLLA, A.; OH, D. Y.; LUONG, S.; PRICKETT, S. R.; HENSTRIDGE, D. C.; FEBBRAIO, M. A.; O'HEHIR, R. E.; ROLLAND, J. M.; HARDY, C. L. 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, 2016.

PLANK, M. W.; MALTBY, S.; TAY, H. L.; STEWART, J.; EYERS, F.; HANSBRO, P. M.; FOSTER, P. S. MicroRNA Expression Is Altered in an Ovalbumin-Induced Asthma Model and Targeting miR-155 with Antagomirs Reveals Cellular Specificity. 2015.

POPE, S. M.; ZIMMERMANN, N.; STRINGER, K. F.; KAROW, M. L.; ROTHENBERG, M. E. The eotaxin chemokines and CCR3 are fundamental regulators of allergen-induced pulmonary eosinophilia. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 175, n. 8, p. 5341–50, out. 2005.

PROCACCINI, C.; DE ROSA, V.; GALGANI, M.; CARBONE, F.; CASSANO, S.; GRECO, D.; QIAN, K.; AUVINEN, P.; CALI, G.; STALLONE, G.; FORMISANO, L.; LA CAVA, A.; MATARESE, G. Leptin-induced mTOR activation defines a specific molecular and transcriptional signature controlling CD4+ effector T cell responses. **J Immunol**, v. 189, p. 2941–2953, 2012.

PROCACCINI, C.; LA ROCCA, C.; CARBONE, F.; DE ROSA, V.; GALGANI, M.; MATARESE, G. Leptin as immune mediator: Interaction between neuroendocrine and immune system. **Dev Comp Immunol**, v. 66, p. 120–129, 2017.

PU, Y.; LIU, Y.; LIAO, S.; MIAO, S.; ZHOU, L.; WAN, L. Azithromycin ameliorates OVA-induced airway remodeling in Balb/c mice via suppression of epithelial-to-mesenchymal transition. **International Immunopharmacology**, v. 58, p. 87–93, 1 maio 2018.

QAYUM, A. A.; PARANJAPE, A.; ABEBAYEHU, D.; KOLAWOLE, E. M.; HAQUE, T. T.; MCLEOD, J. J.; SPENCE, A. J.; CASLIN, H. L.; TARUSELLI, M. T.; CHUMANEVICH, A. P.; BAKER, B.; OSKERITZIAN, C. A.; RYAN, J. J. IL-10-Induced miR-155 Targets SOCS1 To Enhance IgE-Mediated Mast Cell Function. **J Immunol**, v. 196, p. 4457–4467, 2016.

RATZINGER, F.; HASLACHER, H.; POEPPL, W.; HOERMANN, G.; KOVARIK, J. J.; JUTZ, S.; STEINBERGER, P.; BURGMANN, H.; PICKL, W. F.; SCHMETTERER, K.

G. Azithromycin suppresses CD4 + T-cell activation by direct modulation of mTOR activity. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1–10, 2014.

RAY, A.; KOLLS, J. K. Neutrophilic Inflammation in Asthma and Association with Disease Severity. **Trends Immunol**, 2017a.

RAY, A.; KOLLS, J. K. Neutrophilic Inflammation in Asthma and Association with Disease Severity. **Trends in Immunology**, v. 38, n. 12, p. 942–954, 1 dez. 2017b.

REIS, B. S.; LEE, K.; FANOK, M. H.; MASCARAQUE, C.; AMOURY, M.; COHN, L. B.; ROGOZ, A.; DALLNER, O. S.; MORAES-VIEIRA, P. M.; DOMINGOS, A. I.; MUCIDA, D. Leptin receptor signaling in T cells is required for Th17 differentiation. **J Immunol**, v. 194, p. 5253–5260, 2015.

RODRIGO-MUÑOZ, J. M.; CAÑAS, J. A.; SASTRE, B.; REGO, N.; GREIF, G.; RIAL, M.; MÍNGUEZ, P.; MAHÍLLO-FERNÁNDEZ, I.; FERNÁNDEZ-NIETO, M.; MORA, I.; BARRANCO, P.; QUIRCE, S.; SASTRE, J.; DEL POZO, V. Asthma diagnosis using integrated analysis of eosinophil microRNAs. **Allergy**, 11 out. 2018.

RUPANI, H.; MARTINEZ-NUNEZ, R. T.; DENNISON, P.; LAU, L. C.; JAYASEKERA, N.; HAVELOCK, T.; FRANCISCO-GARCIA, A. S.; GRAINGE, C.; HOWARTH, P. H.; SANCHEZ-ELSNER, T. Toll-like Receptor 7 Is Reduced in Severe Asthma and Linked to an Altered MicroRNA Profile. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 194, p. 26–37, 2016.

SAENZ, S. A.; SIRACUSA, M. C.; PERRIGOUE, J. G.; SPENCER, S. P.; URBAN JR, J. F.; TOCKER, J. E.; BUDELSKY, A. L.; KLEINSCHEK, M. A.; KASTELEIN, R. A.; KAMBAYASHI, T.; BHANDoola, A.; ARTIS, D. IL25 elicits a multipotent progenitor cell population that promotes TH2 cytokine responses. **Nature**, v. 464, n. 7293, p. 1362–1366, abr. 2010.

SAFFARI, H.; LEIFERMAN, K. M.; CLAYTON, F.; BAER, K.; PEASE, L. F. I.; GLEICH, G. J.; PETERSON, K. A. Measurement of Inflammation in Eosinophilic Esophagitis Using an Eosinophil Peroxidase Assay. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 111, n. 7, p. 933–939, 24 jul. 2016.

SAGE, P. T.; SHARPE, A. H. T follicular regulatory cells in the regulation of B cell responses. **Trends in immunology**, v. 36, n. 7, p. 410–8, jul. 2015.

SAHU, N.; MORALES, J. L.; FOWELL, D.; AUGUST, A. Modeling susceptibility versus resistance in allergic airway disease reveals regulation by Tec kinase Itk. **PLoS One**, v. 5, p. e11348, 2010a.

SAHU, N.; MORALES, J. L.; FOWELL, D.; AUGUST, A. Modeling susceptibility versus resistance in allergic airway disease reveals regulation by Tec kinase Itk. **PloS one**, v. 5, n. 6, p. e11348, 28 jun. 2010b.

SALAZAR, F.; GHAEMMAGHAMI, A. M. Allergen recognition by innate immune cells: critical role of dendritic and epithelial cells. **Front Immunol**, v. 4, p. 356, 2013.

SAMITAS, K.; ZERVAS, E.; GAGA, M. T2-low asthma: current approach to diagnosis and therapy. **Curr Opin Pulm Med**, v. 23, p. 48–55, 2017.

SANTOS, L. A.; OLIVEIRA, M. A.; FARESIN, S. M.; SANTORO, I. L.; FERNANDES,

A. L. Direct costs of asthma in Brazil: a comparison between controlled and uncontrolled asthmatic patients. **Braz J Med Biol Res**, v. 40, p. 943–948, 2007.

SAWANT, K. V.; POLURI, K. M.; DUTTA, A. K.; SEPURU, K. M.; TROSHKINA, A.; GAROFALO, R. P.; RAJARATHNAM, K. Chemokine CXCL1 mediated neutrophil recruitment: Role of glycosaminoglycan interactions. **Sci Rep**, v. 6, p. 33123, 2016.

SCAPINI, P.; LAUDANNA, C.; PINARDI, C.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; CASSATELLA, M. A. Neutrophils produce biologically active macrophage inflammatory protein-3alpha (MIP-3alpha)/CCL20 and MIP-3beta/CCL19. **Eur J Immunol**, v. 31, p. 1981–1988, 2001.

SCHATZ, M.; HSU, J.-W. Y.; ZEIGER, R. S.; CHEN, W.; DORENBAUM, A.; CHIPPS, B. E.; HASELKORN, T. Phenotypes determined by cluster analysis in severe or difficult-to-treat asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 133, n. 6, p. 1549–1556, 1 jun. 2014.

SCHIPPER, H. S.; PRAKKEN, B.; KALKHOVEN, E.; BOES, M. Adipose tissue-resident immune cells: key players in immunometabolism. **Trends Endocrinol Metab**, v. 23, p. 407–415, 2012.

SCHURMAN, S. H.; BRAVO, M. A.; INNES, C. L.; JACKSON, W. B.; MCGRATH, J. A.; MIRANDA, M. L.; GARANTZIOTIS, S. Toll-like Receptor 4 Pathway Polymorphisms Interact with Pollution to Influence Asthma Diagnosis and Severity. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 12713, 23 dez. 2018.

SCOTT, H. A.; GIBSON, P. G.; GARG, M. L.; WOOD, L. G. Airway inflammation is augmented by obesity and fatty acids in asthma. **Eur Respir J**, v. 38, p. 594–602, 2011a.

SCOTT, H. A.; GIBSON, P. G.; GARG, M. L.; WOOD, L. G. Airway inflammation is augmented by obesity and fatty acids in asthma. **Eur Respir J**, v. 38, p. 594–602, 2011b.

SHAMJI, M. H.; DURHAM, S. R. Mechanisms of allergen immunotherapy for inhaled allergens and predictive biomarkers. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 140, n. 6, p. 1485–1498, 2017.

SHI, J.; HOU, S.; FANG, Q.; LIU, X.; LIU, X.; QI, H. PD-1 Controls Follicular T Helper Cell Positioning and Function. **Immunity**, v. 49, n. 2, p. 264–274.e4, 21 ago. 2018.

SILVA, F. M. C.; OLIVEIRA, E. E.; GOUVEIA, A. C. C.; BRUGIOLO, A. S. S.; ALVES, C. C.; CORREA, J. O. A.; GAMEIRO, J.; MATTES, J.; TEIXEIRA, H. C.; FERREIRA, A. P. 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, 2017a.

SILVA, F. M. C.; OLIVEIRA, E. E.; GOUVEIA, A. C. C.; BRUGIOLO, A. S. S.; ALVES, C. C.; CORREA, J. O. A.; GAMEIRO, J.; MATTES, J.; TEIXEIRA, H. C.; FERREIRA, A. P. Obesity promotes prolonged ovalbumin-induced airway inflammation modulating T helper type 1 (Th1), Th2 and Th17 immune responses in BALB/c mice. **Clin Exp Immunol**, v. 189, p. 47–59, 2017b.



SIMPSON, J. L.; SCOTT, R. J.; BOYLE, M. J.; GIBSON, P. G. Differential proteolytic enzyme activity in eosinophilic and neutrophilic asthma. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 172, p. 559–565, 2005.

SIMPSON, J. L.; POWELL, H.; BOYLE, M. J.; SCOTT, R. J.; GIBSON, P. G. Clarithromycin targets neutrophilic airway inflammation in refractory asthma. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 177, p. 148–155, 2008.

SIMPSON, J. L.; PHIPPS, S.; BAINES, K. J.; OREO, K. M.; GUNAWARDHANA, L.; GIBSON, P. G. Elevated expression of the NLRP3 inflammasome in neutrophilic asthma. **The European respiratory journal**, v. 43, n. 4, p. 1067–76, 1 abr. 2014a.

SIMPSON, J. L.; POWELL, H.; BAINES, K. J.; MILNE, D.; COXSON, H. O.; HANSBRO, P. M.; GIBSON, P. G. The Effect of Azithromycin in Adults with Stable Neutrophilic COPD: A Double Blind Randomised, Placebo Controlled Trial. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e105609, 22 ago. 2014b.

SOCIEDADE-BRASILEIRA-DE-PNEUMOLOGIA. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o Manejo da Asma - 2012. **J Bras Pneumol**, v. 38, 2012.

STIRBULOV, R.; LOPES DA SILVA, N.; MAIA, S. C.; CARVALHO-NETTO, E.; ANGELINI, L. Cost of severe asthma in Brazil-systematic review. **J Asthma**, v. 53, p. 1063–1070, 2016.

STOKES, J. R.; CASALE, T. B. Characterization of asthma endotypes: implications for therapy. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v. 117, p. 121–125, 2016.

STRUNK, R. C.; COLVIN, R.; BACHARIER, L. B.; FUHLBRIGGE, A.; FORNO, E.; ARBELAEZ, A. M.; TANTISIRA, K. G.; CHILDHOOD ASTHMA MANAGEMENT PROGRAM RESEARCH, G. Airway Obstruction Worsens in Young Adults with Asthma Who Become Obese. **J Allergy Clin Immunol Pract**, v. 3, p. 765–71 e2, 2015.

SUN, L.; CHEN, C.; WU, J.; DAI, C.; WU, X. TSLP-activated dendritic cells induce T helper type 2 inflammation in *Aspergillus fumigatus* keratitis. **Experimental Eye Research**, v. 171, p. 120–130, 1 jun. 2018.

SUTHERLAND, E. R.; GOLEVA, E.; KING, T. S.; LEHMAN, E.; STEVENS, A. D.; JACKSON, L. P.; STREAM, A. R.; FAHY, J. V.; LEUNG, D. Y. M.; ASTHMA CLINICAL RESEARCH NETWORK, 4 FOR THE ASTHMA CLINICAL RESEARCH. Cluster analysis of obesity and asthma phenotypes. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e36631, 2012.

TASHIRO, H.; TAKAHASHI, K.; SADAMATSU, H.; KATO, G.; KURATA, K.; KIMURA, S.; SUEOKA-ARAGANE, N. Saturated Fatty Acid Increases Lung Macrophages and Augments House Dust Mite-Induced Airway Inflammation in Mice Fed with High-Fat Diet. **Inflammation**, v. 40, p. 1072–1086, 2017.

TAY, H. L.; PLANK, M.; COLLISON, A.; MATTES, J.; KUMAR, R. K.; FOSTER, P. S. MicroRNA: potential biomarkers and therapeutic targets for allergic asthma? **Ann Med**, v. 46, p. 633–639, 2014.

TAYLOR, D. R.; HANCOX, R. J. Interactions between corticosteroids and beta

agonists. **Thorax**, v. 55, n. 7, p. 595–602, 1 jul. 2000.

TELENGA, E. D.; TIDEMAN, S. W.; KERSTJENS, H. A. M.; HACKEN, N. H. T. T.; TIMENS, W.; POSTMA, D. S.; VAN DEN BERGE, M. Obesity in asthma: More neutrophilic inflammation as a possible explanation for a reduced treatment response. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 67, n. 8, p. 1060–1068, 2012a.

TELENGA, E. D.; TIDEMAN, S. W.; KERSTJENS, H. A. M.; HACKEN, N. H. T. TEN; TIMENS, W.; POSTMA, D. S.; VAN DEN BERGE, M. Obesity in asthma: more neutrophilic inflammation as a possible explanation for a reduced treatment response. **Allergy**, v. 67, n. 8, p. 1060–1068, 1 ago. 2012b.

THOMSEN, M.; NORDESTGAARD, B. G.; SETHI, A. A.; TYBJÆRG-HANSEN, A.; DAHL, M.  $\beta$ 2-adrenergic receptor polymorphisms, asthma and COPD: two large population-based studies. **The European respiratory journal**, v. 39, n. 3, p. 558–66, 1 mar. 2012.

TIAN, B.-P.; XUAN, N.; WANG, Y.; ZHANG, G.; CUI, W. The efficacy and safety of azithromycin in asthma: A systematic review. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, 19 jan. 2019.

TIZAOUI, K.; KAABACHI, W.; HAMZAOUI, K.; HAMZAOUI, A. Association of Single Nucleotide Polymorphisms in Toll-like Receptor Genes With Asthma Risk: a Systematic Review and Meta-analysis. **Allergy, Asthma & Immunology Research**, v. 7, n. 2, p. 130, 1 mar. 2015.

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

VANNELLA, K. M.; RAMALINGAM, T. R.; BORTHWICK, L. A.; BARRON, L.; HART, K. M.; THOMPSON, R. W.; KINDRACHUK, K. N.; CHEEVER, A. W.; WHITE, S.; BUDELSKY, A. L.; COMEAU, M. R.; SMITH, D. E.; WYNN, T. A. Combinatorial targeting of TSLP, IL-25, and IL-33 in type 2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. **Science Translational Medicine**, v. 8, n. 337, p. 337ra65-337ra65, 4 maio 2016.

VAZQUEZ-TELLO, A.; HALWANI, R.; HAMID, Q.; AL-MUHSEN, S. Glucocorticoid receptor-beta up-regulation and steroid resistance induction by IL-17 and IL-23 cytokine stimulation in peripheral mononuclear cells. **J Clin Immunol**, v. 33, p. 466–478, 2013.

VISNESS, C. M.; LONDON, S. J.; DANIELS, J. L.; KAUFMAN, J. S.; YEATTS, K. B.; SIEGA-RIZ, A.-M.; LIU, A. H.; CALATRONI, A.; ZELDIN, D. C. Association of obesity with IgE levels and allergy symptoms in children and adolescents: Results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, n. 5, p. 1163–1169.e4, 1 maio 2009.

WALI, J. A.; THOMAS, H. E.; SUTHERLAND, A. P. Linking obesity with type 2 diabetes: the role of T-bet. **Diabetes Metab Syndr Obes**, v. 7, p. 331–340, 2014.

WANG, F.; HE, X. Y.; BAINES, K. J.; GUNAWARDHANA, L. P.; SIMPSON, J. L.; LI, F.; GIBSON, P. G. Different inflammatory phenotypes in adults and children with

acute asthma. **European Respiratory Journal**, v. 38, n. 3, p. 567–574, 2011.

WANG, J.; CHEN, J.; SEN, S. MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. **J Cell Physiol**, v. 231, p. 25–30, 2016.

WANG, Y.-H.; VOO, K. S.; LIU, B.; CHEN, C.-Y.; UYGUNGIL, B.; SPOEDE, W.; BERNSTEIN, J. A.; HUSTON, D. P.; LIU, Y.-J. A novel subset of CD4(+) T(H)2 memory/effector cells that produce inflammatory IL-17 cytokine and promote the exacerbation of chronic allergic asthma. **The Journal of experimental medicine**, v. 207, n. 11, p. 2479–91, 25 out. 2010.

WATANABE, M.; FUJIHARA, C.; RADTKE, A. J.; CHIANG, Y. J.; BHATIA, S.; GERMAIN, R. N.; HODES, R. J. Co-stimulatory function in primary germinal center responses: CD40 and B7 are required on distinct antigen-presenting cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 214, n. 9, p. 2795–2810, 4 set. 2017.

WEINSTEIN, J. S.; HERMAN, E. I.; LAINEZ, B.; LICONA-LIMÓN, P.; ESPLUGUES, E.; FLAVELL, R.; CRAFT, J. T FH cells progressively differentiate to regulate the germinal center response. **Nature Immunology**, v. 17, n. 10, p. 1197–1205, 2016.

WEITMAN, E. S.; ASCHEN, S. Z.; FARIAS-EISNER, G.; ALBANO, N.; CUZZONE, D. A.; GHANTA, S.; ZAMPELL, J. C.; THOREK, D.; MEHRARA, B. J. Obesity Impairs Lymphatic Fluid Transport and Dendritic Cell Migration to Lymph Nodes. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e70703, 12 ago. 2013.

WENZEL, S. E. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. **Nat Med**, v. 18, p. 716–725, 2012.

WHITEHEAD, G. S.; WALKER, J. K.; BERMAN, K. G.; FOSTER, W. M.; SCHWARTZ, D. A. Allergen-induced airway disease is mouse strain dependent. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 285, p. L32-42, 2003.

WILSON, R. H.; WHITEHEAD, G. S.; NAKANO, H.; FREE, M. E.; KOLLS, J. K.; COOK, D. N. Allergic sensitization through the airway primes Th17-dependent neutrophilia and airway hyperresponsiveness. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 180, n. 8, p. 720–730, 2009.

WING, J. B.; ISE, W.; KUROSAKI, T.; SAKAGUCHI, S. Regulatory T Cells Control Antigen-Specific Expansion of Tfh Cell Number and Humoral Immune Responses via the Coreceptor CTLA-4. **Immunity**, v. 41, n. 6, p. 1013–1025, 18 dez. 2014.

WOYTSCHAK, J.; KELLER, N.; KRIEG, C.; IMPELLIZZIERI, D.; THOMPSON, R. W.; WYNN, T. A.; ZINKERNAGEL, A. S.; BOYMAN, O. Type 2 Interleukin-4 Receptor Signaling in Neutrophils Antagonizes Their Expansion and Migration during Infection and Inflammation. **Immunity**, v. 45, p. 172–184, 2016.

WU, H.; CHEN, Y.; LIU, H.; XU, L.-L.; TEUSCHER, P.; WANG, S.; LU, S.; DENT, A. L. Follicular regulatory T cells repress cytokine production by follicular helper T cells and optimize IgG responses in mice. **European journal of immunology**, v. 46, n. 5, p. 1152–61, 2016a.

WU, H.; CHEN, Y.; LIU, H.; XU, L.-L.; TEUSCHER, P.; WANG, S.; LU, S.; DENT, A. L. Follicular regulatory T cells repress cytokine production by follicular helper T cells and optimize IgG responses in mice. **European Journal of Immunology**, v. 46, n. 5,

p. 1152–1161, 1 maio 2016b.

XIAO, C.; PUDDICOMBE, S. M.; FIELD, S.; HAYWOOD, J.; BROUGHTON-HEAD, V.; PUXEDDU, I.; HAITCHI, H. M.; VERNON-WILSON, E.; SAMMUT, D.; BEDKE, N.; CREMIN, C.; SONES, J.; DJUKANOVIĆ, R.; HOWARTH, P. H.; COLLINS, J. E.; HOLGATE, S. T.; MONK, P.; DAVIES, D. E. Defective epithelial barrier function in asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 128, n. 3, p. 549–556.e12, set. 2011.

XIE, M. M.; DENT, A. L. Unexpected Help: Follicular Regulatory T Cells in the Germinal Center. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1536, 2 jul. 2018.

XU, K. Y.; WISNIVESKY, J. P.; MARTYNENKO, M.; MHANGO, G.; BUSSE, P. J.; WOLF, M. S.; HOLGUIN, F.; FEDERMAN, A. D. Assessing the association of obesity and asthma morbidity in older adults. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v. 117, p. 33–37, 2016.

YADAVA, K.; MASSACAND, J.; MOSCONI, I.; NICOD, L. P.; HARRIS, N. L.; MARSLAND, B. J. Thymic stromal lymphopoietin plays divergent roles in murine models of atopic and nonatopic airway inflammation. **Allergy**, v. 69, n. 10, p. 1333–1342, 1 out. 2014.

YAO, R.; MA, Y. L.; LIANG, W.; LI, H. H.; MA, Z. J.; YU, X.; LIAO, Y. H. MicroRNA-155 modulates Treg and Th17 cells differentiation and Th17 cell function by targeting SOCS1. **PLoS One**, v. 7, p. e46082, 2012.

YASUKAWA, A. et al. Eosinophils promote epithelial to mesenchymal transition of bronchial epithelial cells. **PloS one**, v. 8, n. 5, p. e64281, 2013.

ZAHORCHAK, A. F.; MACEDO, C.; HAMM, D. E.; BUTTERFIELD, L. H.; METES, D. M.; THOMSON, A. W. High PD-L1/CD86 MFI ratio and IL-10 secretion characterize human regulatory dendritic cells generated for clinical testing in organ transplantation. **Cellular Immunology**, 2017.

ZHANG, A.; WANG, K.; ZHOU, C.; GAN, Z.; MA, D.; YE, P.; SUN, Y.; WU, J.; HUANG, X.; REN, L.; DENG, P.; WU, C.; YUE, Z.; DING, X.; CHEN, J.; XIA, J. Knockout of microRNA-155 ameliorates the Th1/Th17 immune response and tissue injury in chronic rejection. **J Heart Lung Transplant**, v. 36, p. 175–184, 2017a.

ZHANG, J.; FULGAR, C. C.; MAR, T.; YOUNG, D. E.; ZHANG, Q.; BEIN, K. J.; CUI, L.; CASTAÑEDA, A.; VOGEL, C. F. A.; SUN, X.; LI, W.; SMILEY-JEWELL, S.; ZHANG, Z.; PINKERTON, K. E. TH17-Induced Neutrophils Enhance the Pulmonary Allergic Response Following BALB/c Exposure to House Dust Mite Allergen and Fine Particulate Matter From California and China. **Toxicological Sciences**, v. 164, n. 2, p. 627–643, 1 ago. 2018a.

ZHANG, J. H.; CHEN, Y. P.; YANG, X.; LI, C. Q. Vitamin D3 levels and NLRP3 expression in murine models of obese asthma: Association with asthma outcomes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 51, n. 1, 2018b.

ZHANG, Y.; SUN, E.; LI, X.; ZHANG, M.; TANG, Z.; HE, L.; LV, K. miR-155 contributes to Df1-induced asthma by increasing the proliferative response of Th cells via CTLA-4 downregulation. **Cell Immunol**, v. 314, p. 1–9, 2017b.

ZHOU, Q.; HAUPT, S.; KREUZER, J. T.; HAMMITZSCH, A.; PROFT, F.; NEUMANN, C.; LEIPE, J.; WITT, M.; SCHULZE-KOOPS, H.; SKAPENKO, A. Decreased expression of miR-146a and miR-155 contributes to an abnormal Treg phenotype in patients with rheumatoid arthritis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 74, n. 6, p. 1265–74, 1 jun. 2015.

ZHU, C.; LEI, W.; HUANG, J. Azithromycin inhibits double-stranded RNA-induced thymic stromal lymphopoietin release from human airway epithelial cells. **Die Pharmazie**, v. 68, n. 11, p. 899–903, nov. 2013.

ZHU, J. T helper 2 (Th2) cell differentiation, type 2 innate lymphoid cell (ILC2) development and regulation of interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production. **Cytokine**, v. 75, n. 1, p. 14–24, set. 2015.

ZHU, J.; PAUL, W. E. CD4 T cells: fates, functions, and faults. **Blood**, v. 112, n. 5, p. 1557–69, 1 set. 2008.

ZISLER, U. M.; ESSER-VON BIEREN, J.; JAKWERTH, C. A.; CHAKER, A. M.; SCHMIDT-WEBER, C. B. Current and future biomarkers in allergic asthma. **Allergy**, v. 71, n. 4, p. 475–494, 1 abr. 2016.

## Anexo

Artigo submetido para a revista "Immunology", de fator de impacto 3,358. O artigo já passou pela revisão inicial, e as repostas para os revisores já estão sendo redigidas.

Immunology



### Obesity affects peripheral lymphoid organs immune response in murine asthma model

Journal:	<i>Immunology</i>
Manuscript ID	IMM-2018-5298
Wiley - Manuscript type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	28-Dec-2018
Complete List of Authors:	DE OLIVEIRA, Erick; Universidade Federal de Juiz de Fora, Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia e Silva, Flávia Márcia; Universidade Federal de Juiz de Fora, Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia Ayupe, Marina; Universidade Federal de Juiz de Fora, Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia Ambrósio, Marcilene; Universidade Federal de Juiz de Fora, Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia de Souza, Viviane; Universidade Federal de Juiz de Fora, Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia Macedo, Gilson; Universidade Federal de Juiz de Fora, Parasitology, Microbiology and Immunology Ferreira, Ana Paula; Universidade Federal de Juiz de Fora, Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia
Key Words:	Allergy, Antibodies, Asthma, B Cell, T follicular helper cell

SCHOLARONE™  
Manuscripts