

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**

**GREGÓRIO GRAMA CAVALCANTE**

**O USO DE ANTIBIÓTICOS E SEU IMPACTO NA MICROBIOTA: efeitos  
na asma alérgica experimental.**

**BELO HORIZONTE**

**2018**

**GREGÓRIO GRAMA CAVALCANTE**

**O USO DE ANTIBIÓTICOS E SEU IMPACTO NA MICROBIOTA: efeitos  
na asma alérgica experimental**

Dissertação apresentada como  
requisito parcial para obtenção do  
título de Mestre em Bioquímica e  
Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Helton da Costa  
Santiago.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Paula  
Prazeres Magalhães.

**BELO HORIZONTE**

**2018**

043 Cavalcante, Gregório Grama.

O uso de antibióticos e seu impacto na microbiota: efeitos na asma alérgica experimental [manuscrito] / Gregório Grama Cavalcante. – 2018.

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

Orientador: Prof. Dr. Helton da Costa Santiago. Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Paula Prazeres Magalhães.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica e Imunologia.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais  
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG  
 Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha  
 31270-901 - Belo Horizonte - MG  
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE GREGÓRIO GRAMA CAVALCANTE.** Aos vinte e oito dias do mês de fevereiro de 2018 às 14h00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado " O uso de antibióticos e seu impacto na microbiota: Efeitos na asma alérgica experimental", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Helton da Costa Santiago, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Laura Maria de Lima Belizario Facury Lasmar (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Angélica Thomaz Vieira (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Paula Prazeres Magalhães - Coorientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Helton da Costa Santiago - Orientador (UFMG), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado:

APROVADO  
 REPROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 28 de fevereiro de 2018.

Dra. Laura Maria de Lima Belizario Facury Lasmar (UFMG)

Dra. Angélica Thomaz Vieira (UFMG)

Dra. Paula Prazeres Magalhães - Coorientadora (UFMG)

Dr. Helton da Costa Santiago - Orientador (UFMG)

Prof. Jader dos Santos Cruz  
 Sub Coordenador de Curso de Pós Graduação  
 em Bioquímica e Imunologia  
 ICB - UFMG

Dedico esta dissertação a mim mesmo por todas as adversidades que eu precisei passar para chegar até aqui. E olhe que não foram poucas.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a mim mesmo por ter tido forças para trilhar este caminho tão difícil. Ninguém sabe 10% dos sacrifícios que precisei passar para chegar até aqui.

Aos meus psicólogos Lucas e Isabella por todo apoio nessa jornada. Não teria conseguido sem vocês.

Aos meus pais e aos meus avós, por serem pessoas incríveis e eu não saber dar o valor que eles merecem. Perdão.

Ao meu orientador Dr. Helton da Costa Santiago por me aceitar em seu laboratório.

A todos os integrantes do laboratório IMPAR: Angélica, Marcela, Camila, Stephanie, Rafa, Laila, Michelle, Sarah, Tertuliano, Neide, Tiffany e Léo pelo convívio e pela ajuda nos experimentos.

À minha coorientadora Dr<sup>a</sup> Paula Prazeres Magalhães por ter aceitado meu convite e fazer-me sentir em casa no MOA.

À Anna Gabriela Guimarães por toda ajuda na parte de metagenômica e bioinformática.

Ao meu amigo Marcus Vinícius por toda ajuda nesse final de mestrado. Você é sempre um porto seguro nas tempestades.

A professora Sílvia Dantas Cangussú por toda ajuda na parte de histologia. Peço desculpas por não ter sido nem metade do colaborador que você merece, mas um dia chegarei lá.

Ao Dr. Remo de Castro Russo por todo auxílio na parte de mecânica pulmonar.

Aos meus amigos FarmaUFES que, mesmo longe, estão sempre no meu coração e nos meus pensamentos.

Aos membros da banca Dr<sup>a</sup> Angélica Thomaz Vieira, Dr<sup>a</sup> Laura Maria de Lima Belizario Facury Lasmar e Dr<sup>a</sup> Maria de Fátima Horta “Patiu”.

A CAPES e a FAPEMIG pelo apoio financeiro.

.

“It is an unfair way to be taught, but it is over.”

**-“I haven’t left my room  
for a year.”**

## RESUMO

A asma é uma doença que afeta cerca de 300 milhões de pessoas. Consiste na obstrução reversível dos brônquios e inflamação do parênquima pulmonar. O uso frequente de antimicrobianos é capaz causar disbiose, podendo estar implicada em alterações na resposta imunológica na doença asmática. Para investigar esse possível impacto, camundongos BALB/cAnNCrI com 21 dias de vida foram tratados com amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina, metronidazol em doses terapêuticas por 3 ciclos de 7 dias (3 dias para azitromicina) com um período de 7 dias para recuperação. Um grupo recebeu apenas água durante todo o experimento como controle não tratado. Paralelamente, os animais foram sensibilizados i.p com OVA+Alum para desenvolverem alergia, enquanto alguns animais receberam apenas Alum como controle não alérgico. Após o término do período de recuperação, os animais foram desafiados com OVA aerosolisada para indução de asma. Quarenta e oito horas depois do último desafio, os animais foram sacrificados e os parâmetros pulmonares foram avaliados e soro, pulmão e BAL coletados para posteriores análises. Fezes coletadas durante diferentes pontos dos tratamentos e o BAL coletado durante o sacrifício tiveram DNA extraído e sequenciados para caracterização da microbiota através do gene bacteriano RNAr 16s. Os animais asmáticos tratados com amoxicilina e trimetoprima/sulfametoxazol apresentaram elevação da hiperreatividade pulmonar, níveis reduzidos de IgG1 no soro e maiores níveis de IL-4 e IL-6 no lavado broncoalveolar quando comparados ao grupo asmático tratado com água. Os animais asmáticos tratados com azitromicina e metronidazol apresentaram o parâmetro FEV-50 preservado e menor nível de inflamação tecidual quando comparados aos animais asmáticos tratados com água. O grupo tratado com metronidazol também apresentou maiores níveis de IgG1 sérica. Em relação ao microbioma, os animais tratados com amoxicilina ou trimetoprima/sulfametoxazol apresentaram uma maior alfa diversidade, diversidade bacteriana no BAL em relação ao grupo controle alérgico. Embora a microbiota intestinal regenere-se a um padrão igual ao grupo controle não tratado (com exceção do grupo azitromicina), nota-se a presença de “cicatrizes” microbiológicas mesmo após o período de recuperação, com destaque para as bactérias *Blautia coccooides* e *Akkermansia muciniphila* para os grupos tratados com azitromicina e metronidazol, respectivamente. Até o presente momento, este é o primeiro trabalho de intervenção realizado com antimicrobianos em doses terapêuticas que demonstra uma alteração da resposta imunológica causada por esses medicamentos na asma alérgica.

**Palavras-chave:** Asma, alergia, antimicrobianos, disbiose, microbiota.



## ABSTRACT

Asthma is a disease that affects about 300 million people. It consists of reversible bronchial obstruction and inflammation of the pulmonary parenchyma. Frequent use of antimicrobials could cause dysbiosis and may be implicated in changes in the immune response in the asthmatic disease. To investigate this potential impact, 21-day old BALB/cAnNCrI mice were treated with amoxicillin, trimethoprim/sulfamethoxazole, azithromycin or metronidazole at therapeutic doses for 3 cycles of 7 days (3 days for azithromycin) with a 7-day recovery period. One group received only water throughout the experiment as untreated control group. In parallel, the mice were sensitized i.p with OVA + Alum to develop allergy, while some animals received only Alum as non-allergic controls. After the end of the recovery period, the mice were challenged with aerosolized OVA for asthma induction. Forty-eight hours after the last challenge, the animals were sacrificed and the lung parameters were evaluated and serum, lung and BAL were collected for further analysis. Feces collected during different treatment points and BAL collected during the sacrifice had their DNA extracted and sequenced to characterize the microbiota targeting the bacterial RNAr 16s gene. Asthmatic mice treated with amoxicillin and trimethoprim/sulfamethoxazole showed increased pulmonary hyperreactivity, reduced levels of serum IgG1 and higher levels of IL-4 and IL-6 in bronchoalveolar lavage compared to the asthmatic group treated with regular water. Asthmatic mice treated with azithromycin and metronidazole had a preserved FEV-50 parameter and a lower level of tissue inflammation when compared to the asthmatic animals treated with water. The metronidazole group also had higher levels of serum IgG1. Regarding the microbiome, the animals treated with amoxicillin or trimethoprim/sulfamethoxazole had a greater bacterial alpha diversity in the BAL when compared to the allergic control group. Although the intestinal microbiota recovers itself and becomes similar to the untreated control group (with the exception of the azithromycin group), the presence of microbiological "scars" are observed even after the recovery period, especially the enrichment of bacteria *Blautia coccooides* and *Akkermansia muciniphila* for the groups treated with azithromycin and metronidazole, respectively. To date, this is the first antimicrobial intervention performed at therapeutic doses demonstrating a change in the immune response caused by these drugs in allergic asthma.

**Keywords:** *Asthma, allergy, antibiotics, dysbiosis, microbiota.*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Apresentação de alérgeno e produção de IgE.....	20
<b>Figura 2.</b> Início da inflamação nas vias aéreas induzida por alérgeno.....	21
<b>Figura 3.</b> Fase tardia da inflamação nas vias aéreas induzida por alérgeno.....	22
<b>Figura 4.</b> Agentes biológicos para o manejo da asma de difícil controle.....	24
<b>Figura 5.</b> A divisão da região da Karelia entre Finlândia e Rússia implicou em mudanças nas respostas alérgicas das duas populações.....	27
<b>Figura 6.</b> Colonização microbiana, desenvolvimento do sistema imunológico e suas perturbações.....	29
<b>Figura 7.</b> Fórmula estrutural da amoxicilina.....	30
<b>Figura 8.</b> Fórmula estrutural da azitromicina.....	31
<b>Figura 9.</b> Fórmula estrutural da trimetoprima (superior) e sulfametoxazol (inferior).....	32
<b>Figura 10.</b> Fórmula estrutural do metronidazol.....	33
<b>Figura 11.</b> Regiões hipervariáveis e conservadas do gene 16s bacteriano.....	35
<b>Figura 12.</b> Desenho experimental dos grupos amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol e metronidazol atópicos e não atópicos.....	36
<b>Figura 13.</b> Desenho experimental do grupo azitromicina atópico e não atópico.....	37
<b>Figura 14.</b> Estratégia de <i>gating</i> para células da imunidade inata (células NK, eosinófilos, macrófagos alveolares e neutrófilos).....	41
<b>Figura 15.</b> Estratégia de <i>gating</i> para células da imunidade inata (monócitos, macrófagos e células dendríticas).....	42
<b>Figura 16.</b> Estratégia de <i>gating</i> para Innate lymphoid cells e suas subpopulações.....	45
<b>Figura 17.</b> Estratégia de <i>gating</i> para linfócitos T CD4+ e suas subpopulações.....	46
<b>Figura 18.</b> O peso dos animais não é alterado pela condição asmática ou pelos tratamentos com antimicrobianos.....	58
<b>Figura 19.</b> O tratamento com azitromicina preservou a capacidade respiratória (relação fluxo/volume de ar expirado) em camundongos BALB/cAnNCrI atópicos após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina.....	56
<b>Figura 20.</b> Os tratamentos com metronidazol e azitromicina foram capazes de preservar parâmetros da mecânica pulmonar FVC e FEV-50 em camundongos BALB/cAnNCrI atópicos após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina.....	58
<b>Figura 21.</b> O tratamento com amoxicilina e trimetoprim/sulfametoxazol elevou a hiperreatividade pulmonar em relação ao grupo controle alérgico.....	59
<b>Figura 22.</b> Os tratamentos com amoxicilina e trimetoprim/sulfametoxazol elevaram os níveis de IL-4 e IL-6 no lavado broncoalveolar em relação ao grupo controle alérgico.....	60
<b>Figura 23.</b> O tratamento com amoxicilina e trimetoprim/sulfametoxazol reduziu a área alveolar dos animais asmáticos tratados com esses antimicrobianos.....	61
<b>Figura 24.</b> Efeitos dos antimicrobianos na inflamação pulmonar e deposição de muco.....	62

<b>Figura 25.</b> Imagens representativa dos cortes de hematoxilina e eosina de animais tratados com amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol e água asmáticos e não asmáticos.....	63
<b>Figura 26.</b> Imagens representativa dos cortes de HE de animais tratados com azitromicina, metronidazol e água asmáticos e não asmáticos.....	63
<b>Figura 27.</b> Celularidade por mL do lavado broncoalveolar (BAL) dos animais tratados com amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol atópicos e não atópicos após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina.....	64
<b>Figura 28.</b> Níveis de IgE provenientes do soro e do lavado broncoalveolar (BAL) dos animais tratados com amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol atópicos e não atópicos após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina.....	65
<b>Figura 29.</b> Níveis de IgA provenientes do soro e do lavado broncoalveolar (BAL) dos animais tratados com amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol atópicos e não atópicos após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina.....	66
<b>Figura 30.</b> Níveis de IgG1 provenientes do soro e do lavado broncoalveolar (BAL) dos animais tratados com amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol atópicos e não atópicos após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina.....	66
<b>Figura 31.</b> Níveis de IgG2a e IgG2b provenientes do soro e do lavado broncoalveolar (BAL) dos animais tratados com amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol atópicos e não atópicos após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina.....	68
<b>Figura 32.</b> ILC1 (Lin-CD45+CD127+Tbet+) provenientes de linfonodos mediastinais e do BAL dos animais tratados com amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol atópicos e não atópicos após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina.....	68
<b>Figura 33.</b> ILC2 (Lin-CD45+CD127+GATA3+) provenientes de linfonodos mediastinais e do BAL dos animais tratados com amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol atópicos e não atópicos após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina.....	69
<b>Figura 34.</b> ILC3 (Lin-CD45+CD127+ROrgT+) provenientes de linfonodos mediastinais e do BAL dos animais tratados com amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol atópicos e não atópicos após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina.....	70
<b>Figura 35.</b> Tregs (CD4+ FOXP3+) provenientes de linfonodos mediastinais e do BAL dos animais tratados com amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol atópicos e não atópicos após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina.....	71

<b>Figura 36.</b> Células Th1 (CD4+ Tbet+) provenientes de linfonodos mediastinais e do BAL dos animais tratados com amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol atópicos e não atópicos após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina.....	72
<b>Figura 37.</b> Células Th2 (CD4+ GATA3+) provenientes de linfonodos mediastinais e do BAL dos animais tratados com amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol atópicos e não atópicos após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina.....	72
<b>Figura 38.</b> Células Th17 (CD4+RORgT+) provenientes de linfonodos mediastinais e do BAL dos animais tratados com amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol atópicos e não atópicos após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina.....	74
<b>Figura 39.</b> Linfócitos B (CD19+) provenientes do BAL dos animais tratados com amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol atópicos e não atópicos após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina.....	74
<b>Figura 40.</b> Basófilos (CD49+FcεR1a+) e Eosinófilos (CD11b <sup>Int</sup> +, SIGLEC-F+, IAIE-) provenientes do BAL dos animais tratados com amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol atópicos e não atópicos após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina.....	76
<b>Figura 41.</b> Basófilos (CD49+FcεR1a+) e Eosinófilos (CD11b <sup>Int</sup> +, SIGLEC-F+, IAIE-) provenientes do BAL dos animais tratados com amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol atópicos e não atópicos após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina.....	77
<b>Figura 42.</b> Macrófagos Alveolares (CD11b <sup>High</sup> +,SIGLEC-F+,LY6G-,LY6C-) e Células Dendríticas (CD11c+, LY6G-,LY6C, IAIE <sup>High</sup> +) provenientes do BAL dos animais tratados com amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol atópicos e não atópicos após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina.....	77
<b>Figura 43.</b> Monócitos (CD11b+,LY6G-,LY6C+) e Macrófagos (CD11b <sup>High</sup> +,SIGLEC-F-,LY6G-,LY6C-) provenientes do BAL dos animais tratados com amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol atópicos e não atópicos após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina.....	78
<b>Figura 44.</b> Neutrófilos (CD11b <sup>High</sup> +,LY6G <sup>High</sup> +) e Células NK (CD49+,FcεR1a-) provenientes do BAL dos animais tratados com amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol atópicos e não atópicos após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina.....	79
<b>Figura 45.</b> Números de <i>reads</i> no lavado broncoalveolar.....	80
<b>Figura 46.</b> Comunidade bacteriana do trato respiratório inferior.....	80
<b>Figura 47.</b> Alfa diversidade das amostras de BAL provenientes de animais asmáticos sob diferentes regimes de antibióticos.....	81

<b>Figura 48.</b> Abundância relativa das OTUs provenientes de lavado broncoalveolar de animais asmáticos sob diferentes regimes de antibióticos.....	82
<b>Figura 49.</b> Abundância relativa do filos provenientes de fezes de animais asmáticos sob tratamento de amoxicilina e não tratados.....	83
<b>Figura 50.</b> Abundância relativa do filos provenientes de fezes de animais asmáticos sob tratamento de Trimetoprima/sulfametoxazol e não tratados.....	84
<b>Figura 51.</b> Abundância relativa do filos provenientes de fezes de animais asmáticos sob tratamento de azitromicina e não tratados.....	85
<b>Figura 52.</b> Abundância relativa do filos provenientes de fezes de animais asmáticos sob tratamento de metronidazol e não tratados.....	86
<b>Figura 53.</b> Alfa diversidade das amostras de fezes provenientes de animais asmáticos sob tratamento com amoxicilina.....	87
<b>Figura 54.</b> Alfa diversidade das amostras de fezes provenientes de animais asmáticos sob tratamento com trimetoprima/sulfametoxazol.....	88
<b>Figura 55.</b> Alfa diversidade das amostras de fezes provenientes de animais asmáticos sob tratamento com azitromicina.....	89
<b>Figura 56.</b> Alfa diversidade das amostras de fezes provenientes de animais asmáticos sob tratamento com metronidazol.....	90
<b>Figura 57.</b> Abundância relativa das OTUs provenientes daz fezes de animais asmáticos sob diferentes regimes de antibióticos.....	92

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Lista de antimicrobianos e posologias.....	38
<b>Tabela 2.</b> Anticorpos/fluorocromos utilizados no painel para detecção de células da imunidade inata e linfócitos B por citometria de fluxo.....	43
<b>Tabela 3.</b> Anticorpos/fluorocromos utilizados no painel para detecção de células da imunidade adaptativa e Innate Lymphoid Cells por citometria de fluxo.....	47

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

**Alum:** Hidróxido de Alumínio.

**Amox:** Amoxicilina.

**Azi:** Azitromicina.

**BAL:** Lavado broncoalveolar.

**BSA:** Bovine Serum Albumine.

**ELISA:** Enzyme-linked immunosorbent assay.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrognio.

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:** cido Sulfúrico.

**HE:** Hematoxilina-eosina.

**IgA:** Imunoglobulina A.

**IgE:** Imunoglobulina E.

**IgG1:**Imunoglobulina G1.

**IgG2a:** Imunoglobulina G2a.

**IgG2b:** Imunoglobulina G2b.

**IL-13:** Interleucina 6

**IL-4:** Interleucina 4

**IL-5:** Interleucina 5.

**IL-6:** Interleucina 6.

**ILC:** Innate Lymphoid Cells.

**I.P:** Intraperitoneal.

**Metro:** Metronidazol.

**N:** Normalidade.

**OPD:** O-fenilenodiamina dicloridrato

**OVA:** Ovalbumina.

**PAS:** Períodio Ácido Schiff.

**PBS:** Phosphate buffered saline.

**RPM:** Revolutions per minute.

**RPMI:** Roswell Park Memorial Institute.

**TMP/SMX:** Trimetoprima/Sulfametoxazol.

**Tregs:** Células T regulatórias.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>20</b>
1.1 A ASMA ATRAVÉS DOS TEMPOS.....	20
1.2 IMUNOPATOLOGIA DA ASMA.....	21
1.3 MANEJO DA ASMA.....	25
1.4 A MICROBIOTA COMO AGENTE IMUNOMODULADOR.....	26
1.5 O DESENVOLVIMENTO DOS ANTIMICROBIANOS E SEU IMPACTO NA MICROBIOTA.....	30
1.5.1 AMOXICILINA.....	32
1.5.2 AZITROMICINA.....	33
1.5.3. TRIMETOPRIMA/SULFAMATOXAZOL.....	34
1.5.4. METRONIDAZOL.....	35
1.6 <i>NEXT GENERATION SEQUENCING</i> E O ESTUDO DA MICROBIOTA.....	36
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>38</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
3.1 Objetivo Geral.....	39
3.2 Objetivos Específicos:.....	39
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
4.1 Animais utilizados.....	40
4.2 Desenho Experimental.....	40
4.2.1 Regimes de tratamento.....	41
4.2.2 Indução da asma alérgica.....	41
4.3 Espirometria e coleta de materiais biológicos.....	43
4.4 Processamento do lavado broncoalveolar.....	43
4.5 Citometria de Fluxo.....	44
4.7 ELISA para IgG1, IgG2a, IgG2b no soro e no BAL.....	52
4.8 ELISA para IgA no soro e no BAL.....	53
4.9 ELISA para IgE no soro e no BAL.....	53
4.10 Cytokine Bead Array Th1/Th2/Th17 do sobrenadante do BAL.....	54
4.11 Extração de DNA e análise da microbiota associada.....	55
4.11.1 Coleta de fezes e extração de DNA.....	55
4.11.2 Extração de DNA do BAL.....	55
4.13 Sequenciamento do gene RNAr 16S e análise de dados.....	56
4.14 Processamento tecidual e análise histopatológica de órgãos.....	57

4.15 Aquisição de imagens.....	57
4.16.1 Análise estereológica.....	58
4.16.2. Densidade da área de muco.....	58
4.17 Análise de dados.....	59
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>60</b>
5.1. O tratamento com antimicrobianos não alterou o peso dos animais.....	60
5.2. O tratamento com antimicrobianos alterou parâmetros da mecânica pulmonar. ..	60
5.3 Os tratamentos com amoxicilina e trimetoprima/sulfametoxazol elevaram os níveis de IL-4 e IL-6 no lavado broncoalveolar nos camundongos alérgicos.....	63
5.4 O tratamento com amoxicilina e trimetoprima/sulfametoxazol reduz o espaço alveolar.....	64
5.5 O tratamento com azitromicina e metronidazol reduziu a inflamação peribronquial e perivascular dos animais asmáticos, incluindo produção de muco.....	65
5.6 Os tratamentos com antimicrobianos não alteraram a celularidade do lavado broncoalveolar.....	68
5.7 Os tratamentos com antimicrobianos não alteram a produção de IgE em animais asmáticos.....	69
5.8 O tratamento com metronidazol foi capaz de elevar as concentrações séricas de IgA em animais asmáticos.....	70
5.9 Os tratamentos com amoxicilina e trimetoprima/sulfametoxazol reduziram os níveis de IgG1 sérica, enquanto o tratamento com metronidazol os elevou.....	71
5.10 Os tratamentos com antimicrobianos não alteraram os níveis de IgG2a e IgG2b nos animais alérgicos.....	72
5.11 O tratamento com trimetoprima/sulfametoxazol reduziu os níveis de ILC1 nos linfonodos mediastinais e no lavado broncoalveolar dos animais alérgicos.....	73
5.12 Os tratamentos com azitromicina e metronidazol reduzem a presença de ILC2 nos linfonodos mediastinais, sendo azitromicina também capaz de reduzi-la no lavado broncoalveolar.....	75
5.13 Os tratamentos com trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol reduzem os níveis de ILC3 nos linfonodos mediastinais, sendo as duas primeiras drogas também são capazes de reduzi-las no lavado broncoalveolar.....	75
5.14 Os tratamentos com amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol e azitromicina são capazes de modular a presença de células T regulatórias em diferentes sítios.....	76
5.15 Os tratamentos com trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol são capazes de modular a presença de células Th1 em diferentes sítios.....	77
5.16 O tratamento com azitromicina reduz os níveis de células Th2 nos linfonodos mediastinais e no lavado broncoalveolar dos animais asmáticos.....	78
5.17 Os tratamentos com trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol modulam a presença de células Th17 em diferentes sítios de animais alérgicos.....	79

5.18 O tratamento com trimetoprima/sulfametoxazol eleva a presença de linfócitos B no BAL enquanto o tratamento com azitromicina a reduzem camundongos asmáticos.....	80
5.19 Os tratamentos com amoxicilina, azitromicina e trimetoprima/sulfametoxazol modulam a presença de basófilos e eosinófilos no lavado broncoalveolar de camundongos asmáticos. ....	81
5.20 Os tratamentos com trimetoprima/sulfametoxazol e azitromicina modulam a presença de macrófagos alveolares e células dendríticas no lavado broncoalveolar de animais asmáticos. ....	82
5.21 Os tratamentos com trimetoprima/sulfametoxazol e azitromicina modulam a presença de monócitos e macrófagos no BAL de animais asmáticos. ....	83
5.22 Os tratamentos com azitromicina e trimetoprima/sulfametoxazol modulam a presença de neutrófilos e células NK no lavado broncoalveolar de animais alérgicos.....	84
5.23 O caráter asmático é determinante para a presença da microbiota no trato respiratório inferior e a natureza desta microbiota é modulada pelo espectro de ação de cada antimicrobiano. ....	85
5.24 O tratamento com antibióticos foi capaz de alterar a composição da microbiota do trato respiratório inferior em níveis de OTUs.....	88
5.25 Os antimicrobianos foram capazes de alterar a composição da microbiota intestinal em diferentes pontos de tratamento. ....	89
5.26. Alfa diversidade da microbiota das fezes dos animais tratados e não tratados com antibióticos.....	92
5.27 Os tratamentos com antibióticos foram capazes de alterar a composição da microbiota das fezes em níveis de OTUs. ....	96
<b>6. DISCUSSÃO.</b> ....	<b>99</b>
<b>8. CONCLUSÃO</b> .....	<b>107</b>
<b>9. REFERÊNCIAS.</b> ....	<b>108</b>

## 1. INTRODUÇÃO.

### 1.1 A ASMA ATRAVÉS DOS TEMPOS.

A asma é uma doença muito antiga e conhecida pela humanidade. O termo “asma” (*ασθμα*) apareceu primeiramente na epopéia grega “A Ilíada” em 800 A.C (Marketos e Ballas, 1982). Hipócrates (460-377 A.C) descrevia os sintomas asmáticos como um desequilíbrio dos quatro humores corporais: sangue, fleuma, bile amarela e bile preta. No entanto, foi o médico grego Aretaeus da Capadócia no século 2 A.C que primeiro descreveu os sintomas referentes à asma, como conhecidos hoje, ainda na antiguidade ocidental (Cserhádi, 2004).

Na China antiga, os primeiros registros sobre asma datam 2000 AC. O Imperador Amarelo apocrifamente caracterizou em seu *Cânion de Medicina Interna* a asma como um ‘sibilo’ cujo sintoma era afetado pela sazonalidade das estações. O Imperador Vermelho, considerado o pai da medicina tradicional chinesa, foi o primeiro a catalogar os usos da planta efedra – contendo efedrina - para remediar sintomas pulmonares semelhantes à asma (Lee, 2011).

Registros datados a cerca de 1500 A.C. no Egito antigo mostram que a população da época também possuía formas como combater sintomas asmáticos: o *Eber Papyrus*, compêndio medicinal e astronômico, descreve receitas de remédios inalatórios para tratar doenças pulmonares utilizando incenso, uvas e minerais (Cohen,1992). Na Índia, a medicina Ayurveda relatava no *Susruta Samhita*, publicado em 600 A.C, o uso de ervas como *Datura stramonium* para o conforto de sintomas asmáticos. Hoje sabe-se que esta planta contém alcalóides como atropina e escopolamina que possuem ação anticolinérgica (Cserhádi, 2004; Pretorius e Marx, 2006).

Foi o pesquisador inglês Sir John Floyer que registrou em 1698 o primeiro tratado da medicina moderna sobre asma, *A Treatise of the Asthma*. Embora ainda predominante alquímico, o tratado estabeleceu como principio cardeal para a asma a constrição dos brônquios (Gauthier, Ray e Zenzel, 2015). No final do século XIX,

Stewart e Gibson descreveram no compêndio *Stedman's Twentieth century practice* as primeiras anotações da medicina moderna sobre agentes externos como fonte desencadeadora para ataques asmáticos (Chu e Drazen, 2005).

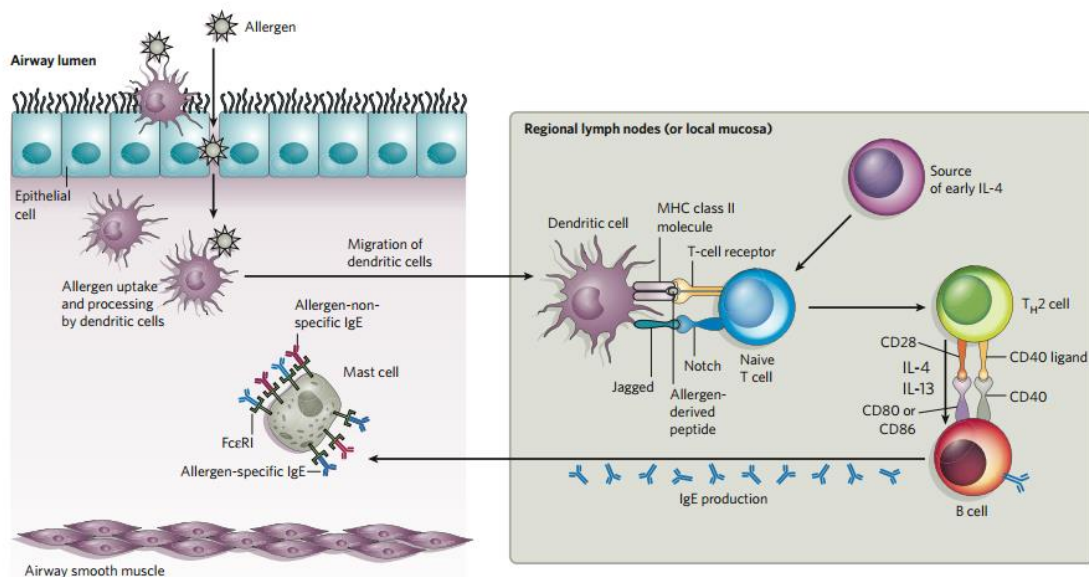
## 1.2 IMUNOPATOLOGIA DA ASMA.

A asma é uma doença crônica de origem multifatorial que afeta cerca de 300 milhões de pessoas no planeta (Masoli *et al.*, 2004). Consiste na obstrução reversível dos brônquios e inflamação do parênquima pulmonar, geralmente devido à hipersensibilidade da musculatura lisa frente a estímulos, tendo como principais sintomas a dificuldade para respirar, sibilância e tosse (NHLBI, 2007). Devido a essa obstrução, pacientes asmáticos sofrem com falta de ar que, em casos graves, pode levar à morte. Nos Estados Unidos da América, a asma acomete 8.4% das crianças e 7,6% dos adultos (Kochanek *et al.*, 2014).

A asma foi dividida inicialmente por Rackemann (1947) em dois grandes grupos: asma extrínseca e asma intrínseca. A asma extrínseca, também conhecida como asma atópica, é definida quando os sinais e sintomas característicos da doença asmática estão atrelados a produção de anticorpos específicos a um alérgeno, sendo esta reação detectada em testes de sensibilidade cutânea ou por sorologia. A asma intrínseca, ou não-atópica, carece de um gatilho específico, sendo deflagrada por uma miríade de estímulos como a realização de exercícios ou pela inalação de ar gelado (Rackemann, 1947).

A asma atópica, por ser uma alergia, é classificada como uma hipersensibilidade do tipo I, sendo mediada pela produção de imunoglobulina E. As alergias são respostas do sistema imunológico frente a moléculas inócuas, mas que estimulam uma resposta inflamatória. Desta forma, o sistema imunológico utiliza-se de componentes celulares e humorais com o intuito de combater o agente invasor (Charles A Janeway *et al.*, 2001). A exposição prévia ao alérgeno, isto é, contato prévio com a substância alergênica é *sine qua non* para que a resposta ocorra, sendo a alergia deflagrada apenas em contatos posteriores (Igea, 2013).

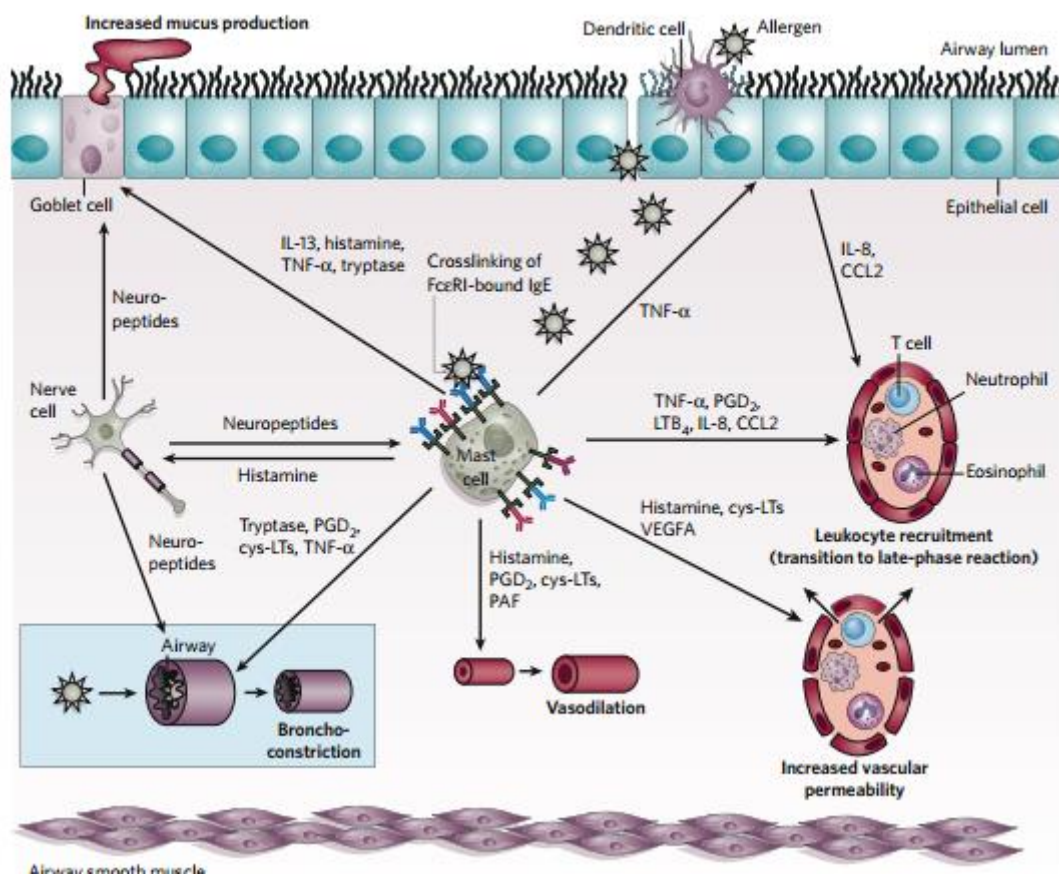
Durante a sensibilização, o alérgeno é captado e processado por células dendríticas presentes nos alvéolos. Estas células em seguida migram para os linfonodos mediastinais e o apresentam para linfócitos T CD4+ específicos. Estas células iniciam então a produção de citocinas clássicas do fenótipo Th2 como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. Os linfócitos B, após também reconhecerem o alérgeno e serem ativados, convertem-se em células plasmáticas responsáveis pela produção de imunoglobulinas. O ambiente bioquímico e a sinapse imunológica entre os linfócitos T e B, principalmente pela produção e reconhecimento de IL-4, estimula o mecanismo de troca de classe de imunoglobulinas para IgE (Figura 1) (Galli, Tsai e Piliponsky, 2008).



**Figura 1.** Apresentação de alérgeno e produção de IgE. **Fonte:** GALLI; TSAI; PILIPONSKY, Insight Review. 2008.

A produção de IgE específica contra um alérgeno pelo organismo permite que estes anticorpos sejam ancorados na superfície de células que apresentem receptores FcεRI (receptor de alta afinidade para IgE), como mastócitos e basófilos. A ligação entre alérgeno-anticorpo promove mudanças conformacionais do receptor, promovendo sinalização intracelular iniciada pela proteína tirosina cinase Lyn. Lyn é capaz de fosforilar ITAMs acopladas no receptor FcεRI, tornando este complexo favorável ao acoplamento da proteína tirosina cinase SYK, ativando-a. SYK é capaz

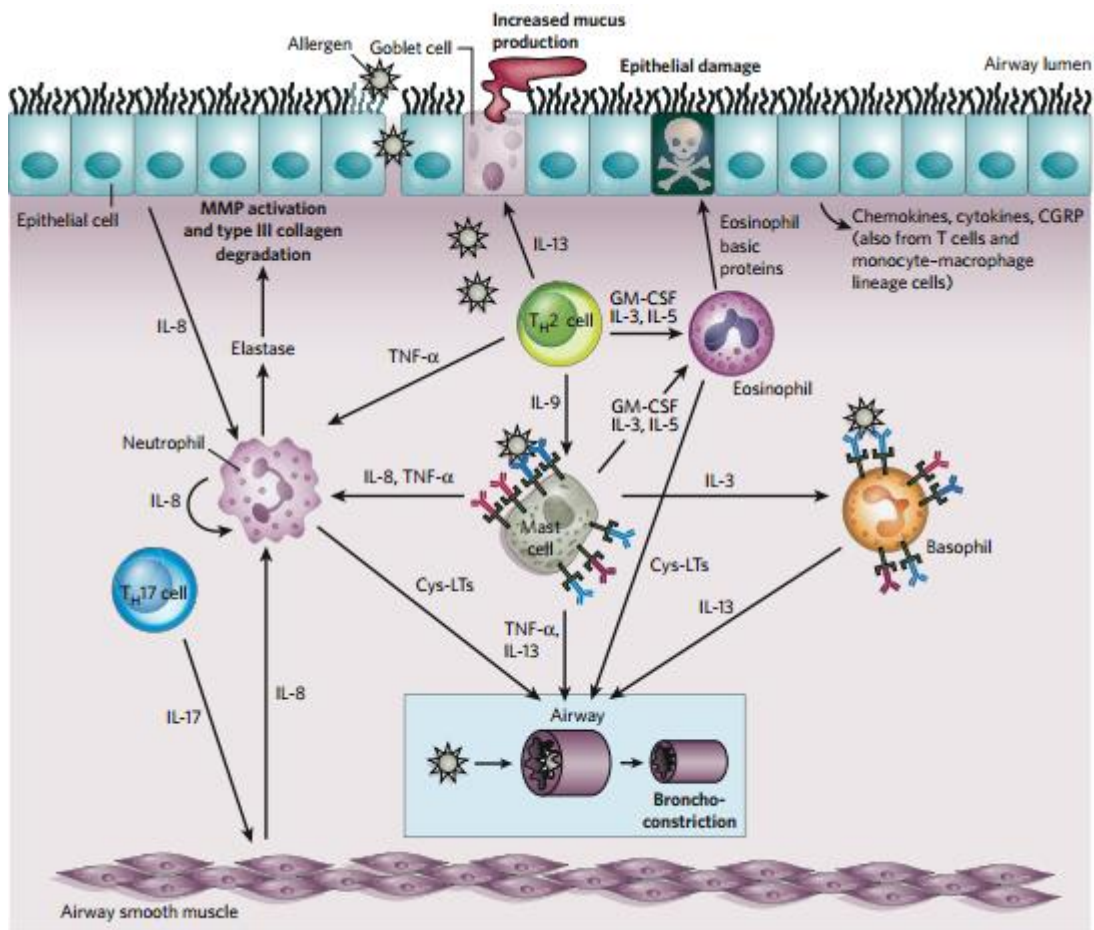
de ativar a fosfolipase C- $\gamma$ , que por sua vez hidroliza moléculas de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato na membrana plasmática, produzindo diacilglicerol e inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). Diacilglicerol é capaz de promover ativação da proteína cinase C e o IP3 é capaz de elevar a concentração de cálcio intracelular. Essas alterações são capazes de estimular a síntese de mediadores pro-inflamatórios como leucotrienos, prostaglandinas e quimiocinas, e promover a fusão de vesículas pré-formadas com a membrana celular para degranular seu conteúdo para o meio extracelular. Estas vesículas contêm agentes bioquímicos como histamina, fator de necrose tumoral, heparina, proteases, serotonina e outros capazes de provocar broncoconstrição e inflamação tecidual (Figura 2) (Galli, Tsai e Piliponsky, 2008; Siraganian *et al.*, 2010)



**Figura 2.** Início da inflamação nas vias aéreas induzida por alérgeno. **Fonte:** GALLI; TSAI; PILIPONSKY, Insight Review. 2008.

Basófilos e mastócitos ativados são capazes de produzir quimiocinas que mobilizam células da imunidade adaptativa – linfócitos T e B – e células da imunidade inata como eosinófilos, neutrófilos (e incluindo mais basófilos e mastócitos) para o sítio

da inflamação. Os efeitos exercidos pela asma alérgica no parênquima pulmonar são orquestrados por uma clássica resposta inflamatória do tipo 2 decorrente dos produtos secretados por estas células (Figura 3) (Stone, Prussin e Metcalfe, 2010). Exposições repetidas ao alérgeno levam à perpetuação da inflamação e consequentemente dano tecidual ao parênquima pulmonar, ocorrendo depósito de colágeno do tipo III e redução da capacidade de expandir dos pulmões (Galli, Tsai e Piliponsky, 2008).



**Figura 3.** Fase tardia da inflamação nas vias aéreas induzida por alérgeno. **Fonte:** GALLI; TSAI; PILIPONSKY, Insight Review. 2008.

Embora a inflamação do tipo 2 seja referente ao componente alérgico da doença, alguns autores como Humbert e colaboradores (1996) mostram que receptores FcεRI estão aumentados em todos os pacientes asmáticos, independente se estes são atópicos ou não. Mouthuy e colaboradores (2011), na mesma linha, identificaram a produção de IgE total e IgE específica contra *Dermatophagoides pteronyssinus* no escarro de pacientes com asma não-atópica, levantando a



possibilidade de todo fenótipo asmático ter um componente de fundo alérgico. Esta hipótese é reforçada pelo fato que o anticorpo anti-IgE Omalizumab, utilizado para o tratamento de alergias de difícil controle, possui ação em pacientes com asma não-atópica (Lommatzsch *et al.*, 2014; Pekkanen *et al.*, 2012).

### **1.3 MANEJO DA ASMA.**

O tratamento para a asma baseia-se em afastar o agente desencadeador do paciente e iniciar terapias de suporte que auxiliem a broncodilatação - reduzindo a obstrução da passagem de ar - e utilização de corticóides para reduzir e prevenir a inflamação local. As diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o manejo da asma estabelecem o uso de um corticóide inalatório com um agonista beta 2 adrenérgico por demanda como tratamento inicial da asma (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2012).

O arsenal terapêutico para o manejo das crises asmáticas bem como a asma crônica é relativamente amplo. Anticolinérgicos, corticóides, inibidores de leucotrienos, agonistas  $\beta_2$  adrenérgicos e cromolins são as principais classes farmacológicas utilizadas. O uso oral de corticóides, embora inicialmente empregado na década de 50 e 60, caiu em desuso, cedendo espaço para as versões inalatórias com menos efeitos colaterais. Em casos mais graves, no entanto, as versões sistêmicas são essenciais para um sucesso terapêutico em asma responsivas a essa classe farmacológica (Gauthier, Ray e Zenzel, 2015).

Em casos de asma refratária aos tratamentos convencionais, o uso de agentes biológicos tem sido de grande importância na preservação da saúde pulmonar dos pacientes. Anticorpos monoclonais contra as principais citocinas da resposta Th2, como IL-4, IL-13 e IL-5 estão disponíveis desde o início da década de 2000 e podem ser um arsenal terapêutico importante para a reprogramação da resposta imunológica de base da asma. O anticorpo anti-IgE Omalizumab, lançado no mercado americano em 2003, liga-se na região Fc da molécula de IgE impedindo que a mesma seja ancorada em receptores Fc $\epsilon$ RI de mastócitos e basófilos. A falta do complexo IgE-

FcεRI na superfície destas células impede que a cascata intracelular ocorra, bloqueando assim a degranulação destas células e reduzindo o fenótipo asmático (Strunk e Bloomberg, 2006). Os agentes biológicos têm uma maior probabilidade de eficácia em pacientes com fenótipos asmáticos elevados para um padrão de inflamação do tipo 2. (Figura 4). (Gauthier, Ray e Wenzel, 2015).

Pathway	Biologic Agents Approved or in Trials	Biomarkers Predicting Response to Therapy	Biomarkers Modulated by Therapy
IgE	Omalizumab	F <sub>ENO</sub> Blood eosinophils Periostin	F <sub>ENO</sub> Sputum eosinophils
IL-4/IL-13	Pitrakinra (competitive antagonist) Dupilumab (receptor antibody)	F <sub>ENO</sub> Sputum eosinophils Blood eosinophils Periostin	F <sub>ENO</sub>
IL-13	Lebrikizumab Tralokinomab	F <sub>ENO</sub> Eosinophils Sputum IL-13 (periostin surrogate)	F <sub>ENO</sub>
IL-5	Mepolizumab Reslizumab Benralizumab	Sputum eosinophils Blood eosinophils	Sputum eosinophils Blood eosinophils

Definition of abbreviation: F<sub>ENO</sub> = fractional exhaled nitric oxide.

**Figura 4.** Agentes biológicos para o manejo da asma de difícil controle. **Fonte:** Gauthier, Ray e Zenzel (2015). Adaptado.

Uma outra abordagem é a terapia de dessensibilização. Esta terapia foi utilizada pela primeira vez em 1911 por Leonard Noon no Reino Unido (Krishna e Huissoon, 2011). Ela consiste em administrar por via sublingual ou subcutânea o próprio alérgeno com o objetivo de reduzir a produção de IgE, além de inibir resposta imune orquestrada por basófilos e mastócitos, direcionando um perfil de inflamação do tipo 2 para um perfil antiinflamatório, aumentando as células T CD4+ regulatórias, a produção de IL10 e IgG anti-alérgeno (Burks *et al.*, 2013).

#### 1.4 A MICROBIOTA COMO AGENTE IMUNOMODULADOR.

A microbiota consiste em diferentes ecossistemas bacterianos e fúngicos que vivem de maneira simbiote com seu hospedeiro (Antonopoulos *et al.*, 2009; Marchesi *et al.*, 2016). A microbiota atua de forma mutualista: em troca de alimento e proteção,

fornece metabólitos úteis à saúde do hospedeiro. Um grupo importante destes metabólitos são os ácidos graxos de cadeia curta, como acetato, propionato e butirato. Estas moléculas, produzidas majoritariamente pela fermentação de fibras insolúveis e possuem um importante papel antiinflamatório, sendo sua administração em seres humanos relacionada a um melhor controle da obesidade, doença de Crohn e síndrome metabólica (Koh *et al.*, 2016; LeBlanc *et al.*, 2013; Vernocchi, Chierico, Del e Putignani, 2016).

A microbiota é essencial para a maturação saudável do sistema imunológico. Estudos utilizando camundongos isentos de germes demonstram que estes animais apresentam uma resposta imune disfuncional: são mais vulneráveis a patógenos, dispõem de menos células plasmáticas produtoras de IgA em sítios de mucosa, possuem placas de Payer pouco desenvolvidas e apresentam elevados títulos de IgE sérica total (Belkaid e Hand, 2014; Cahenzli *et al.*, 2013; Ivanov *et al.*, 2009). Por outro lado, a microbiota é um componente essencial para o desenvolvimento de certas doenças autoimunes, fato corroborado já que que animais isentos de germes são refratários a modelos de doenças como artrite e lúpus (Carding *et al.*, 2015).

A importância da microbiota e seu papel no desenvolvimento do sistema imunológico têm sido relatada por diversos autores (Ivanov *et al.*, 2009b; McLoughlin e Mills, 2011; Ostman *et al.*, 2006; Riiser, 2015; Roock, De *et al.*, 2010). A colonização inicial possui um grande impacto no perfil da microbiota das crianças, com implicações até a vida adulta. Crianças nascidas de parto normal são primeiramente colonizadas pelos microrganismos presentes no canal vaginal, enquanto crianças nascidas por cesariana são colonizadas com a microbiota presente na pele da equipe de saúde (Rodriguez *et al.*, 2015). Embora essa diferença possa ser sutil do ponto de vista biológico, uma meta-análise de estudos sobre crianças nascidas de cesariana encontrou um aumento de 20% no risco de desenvolver asma (Thavagnanam *et al.*, 2008).

Estudos com comunidades isoladas são de grande valia para explorar a microbiota como agente imunomodulador. Quatro comunidades são exemplos

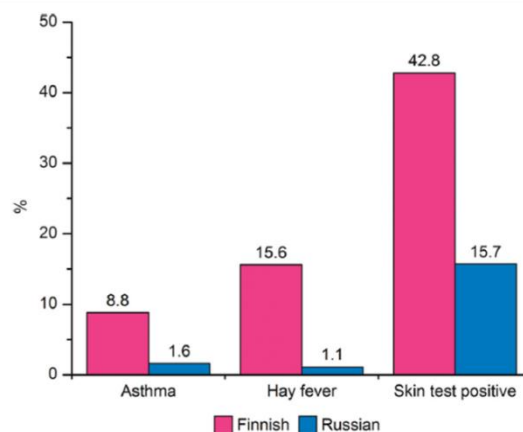
clássicos no estudo desta hipótese: os Amish, os Huteritas, os karelianos finlandeses e os karelianos russos (Cahenzli *et al.*, 2013; Ege *et al.*, 2011; Gozdz *et al.*, 2016; Okada, H *et al.*, 2010). Em relação aos dois primeiros, ambos são grupos etnoreligiosos fundados após a reforma protestante na Alemanha no século XVI. Por serem anabatistas, isto é, rejeitar o batismo de crianças recém-nascidas, foram perseguidos e mortos pelo movimento de contra-reforma da Igreja Católica (Payne *et al.*, 2011). Estas comunidades posteriormente se estabeleceram nos Estados Unidos da América e Canadá e adotam um estilo de vida pautado na rejeição da mecanização e da maior parte da tecnologia contemporânea. Os Huteritas, no entanto, divergem dos Amish neste quesito: são mais permissivos em relação ao desenvolvimento tecnológico e isto possui profundas implicações no desenvolvimento de atopias (Stein *et al.*, 2016).

Um estudo por Ober e colaboradores (2017) demonstra uma menor prevalência de alergias e atopias em comunidades Amish quando comparados a população geral nos Estados Unidos da América. As comunidades Amish são quase completamente fechadas, isto é, não ocorre entrada de não membros em suas instalações, e a manutenção de suas populações ocorre principalmente pela endogamia – da mesma forma que os huteritas (Payne *et al.*, 2011). Embora uma suposta perda de diversidade microbiana pudesse ocasionar uma maior prevalência de alergias, ocorre justamente o contrário: os Amish possuem um dos menores índices de doenças atópicas já registradas, mesmo em comparação aos Huteritas (Ober *et al.*, 2017).

Os ambientes rurais não são feitos iguais: análises do conteúdo bacteriano em aspirados de poeira nas fazendas Amish e Huteritas mostram uma maior presença de endotoxina e bactérias do filo *Proteobacteria* em detrimento de *Bacteroidetes* e *Firmicutes* nas fazendas Amish quando comparado ao Huteritas. Análises de poeira de fazendas suíças – ambientes não restritos – relatam um perfil mais próximo aos huteritas. Não surpreendentemente, em uma comunidade amish do estado de Indiana nos EUA as crianças apresentaram uma incidência de 5,2% de asma em comparação a 21,3% de crianças huteritas (Motika *et al.*, 2011; Ober *et al.*, 2017; Stein *et al.*, 2016).

Uma hipótese para este fenômeno, cunhada por Strachan (1989) como “hipótese da higiene”, postula que o contato com diversos microrganismos durante a infância é capaz de modular e desenvolver o sistema imunológico, favorecendo um perfil imunológico menos propenso a alergias. Nesta mesma linha, Strachan propôs que o número de filhos em uma família é inversamente proporcional ao desenvolvimento de rinite alérgica nos filhos mais novos, possivelmente devido ao contato precoce com os microrganismos carregados pelos irmãos mais velhos.

A hipótese da higiene também é fortalecida pelo caso da Karelia, região entre a Finlândia e a Rússia que, embora habitada pelo mesmo povo, foram separadas por cerca de 80 anos devido à criação da União das Repúblicas Socialistas Soviéticas (URSS). Após a independência da Finlândia do Império Russo em 1917, parte da região ficou restrita e isolada à Rússia, fato intensificado após a Segunda Guerra Mundial e o surgimento da Guerra Fria entre as nações capitalistas e comunistas. A região da Karelia do lado finlandês desenvolveu-se, enquanto a Karelia russa sofreu com a falta de desenvolvimento, mantendo-se majoritariamente rural. Após o colapso do comunismo no início da década de 90, estudos populacionais demonstram um maior índice de sensibilização atópica, asma e doenças alérgicas no lado finlandês (Figura 5). O estilo de vida, condições sanitárias se mostram como fontes majoritárias na indução de fenótipos asmáticos (Haahtela *et al.*, 2015).



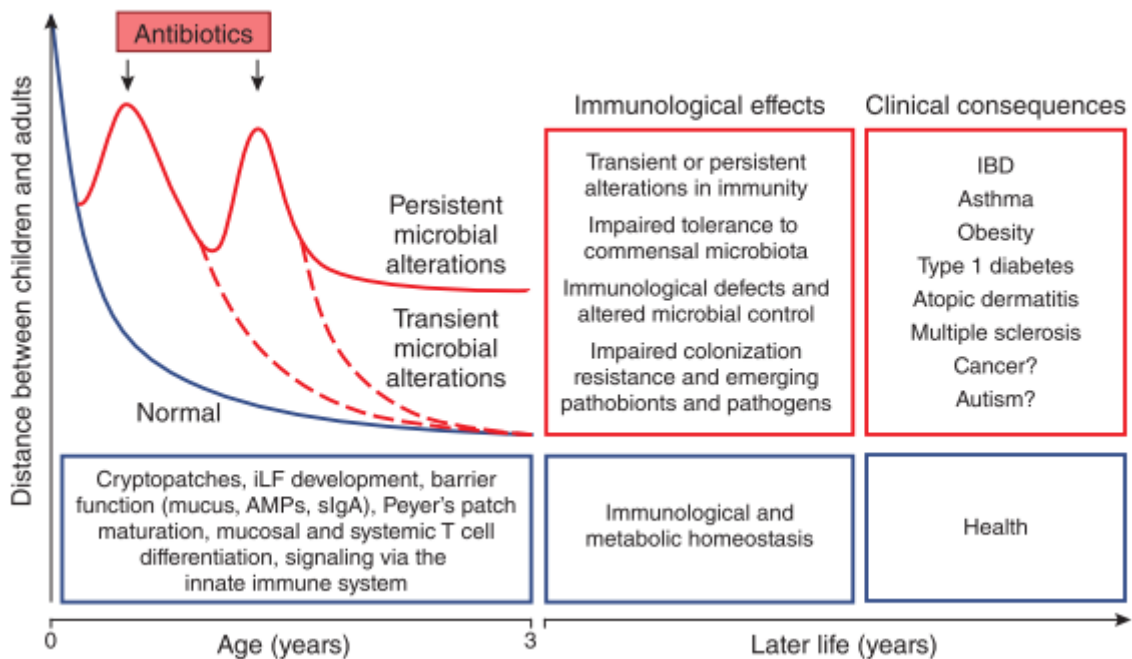
**Figura 5.** A divisão da região da Karelia entre Finlândia e Rússia implicou em mudanças nas respostas alérgicas das duas populações. **Fonte:** Von Hertzen et al. *J Allergy Clin Immunology*. 2006. Adaptado.

## 1.5 O DESENVOLVIMENTO DOS ANTIMICROBIANOS E SEU IMPACTO NA MICROBIOTA.

Após o fim da Segunda Guerra Mundial, a elevação dos padrões sanitários, a popularização da vacinação e o surgimento de vários antibióticos nas décadas seguintes aumentou consideravelmente a expectativa de vida ao nascer nos Estados Unidos da América e na Europa Ocidental (Acemoglu e Johnson, 2006; Gottfried, 2005). O pós-guerra foi marcado por profundas modificações no tecido social, científico e cultural. A forte política de implementação do saneamento básico fez que as infecções por helmintos na Europa Ocidental fossem virtualmente eliminadas (Okada, H. *et al.*, 2010). A penicilina, produzida pela primeira vez em larga escala durante a guerra, teve seu uso doméstico amplamente difundido, fazendo com que infecções outrora letais passassem a ter tratamento. Entretanto, o acesso aos antimicrobianos em regiões socioeconomicamente vulneráveis, como a África e a Ásia, foi restrita aos mais abastados. A falta de acesso em geral aos serviços de saúde impediu que as populações de países pobres se beneficiassem do desenvolvimento médico-científico na mesma velocidade das nações desenvolvidas (Donnell, 2007; Hart e Kariuki, 1998; Orach, 2009; Pécoul *et al.*, 1999; Peters *et al.*, 2008).

No entanto, alguns estudos demonstram uma associação entre o uso de antimicrobianos durante a infância e a prevalência de asma e alergias nessas populações (Hoskin-Parr *et al.*, 2013; Marra *et al.*, 2006; McKeever *et al.*, 2002). O uso frequente de antimicrobianos - principalmente por longos períodos - é capaz de causar um desbalanço na composição da microbiota intestinal, sendo esse fenômeno conhecido como disbiose (Jernberg *et al.*, 2007; McLoughlin e Mills, 2011). A disbiose pode ser transitória, isto é, a microbiota indígena é capaz de se recuperar ao estado original, ou permanente, quando ocorre redução da diversidade microbológica e diferentes espécies aumentam ou reduzem de número em comparação ao estado

normobiótico (Blumstein *et al.*, 2014; Casén *et al.*, 2015). A microbiota intestinal infantil é diferente da microbiota encontrada em adultos, estando em início de desenvolvimento e possivelmente mais vulnerável a disbiose permanente (Figura 6) (Rodriguez *et al.*, 2015).



**Figura 6.** Colonização microbiana, desenvolvimento do sistema imunológico e suas perturbações.  
**Fonte:** Zeissig e Blumberg. *Nature Immunology*, 2014.

O uso indiscriminado de antibióticos em crianças, até pouco tempo presente no Brasil (Bricks, 2003), BRASIL, 2011), é preocupante pela emergência de cepas de bactérias multi-resistentes e também devido as alterações na microbiota e sua possível implicação no surgimento ou exacerbação de doenças alérgicas e inflamatórias. Nas últimas duas décadas, estudos vêm demonstrado que terapias curtas de antimicrobianos em crianças com infecções não complicadas podem ser tão efetivas quanto as de duração convencional (Dimopoulos e Matthaïou, 2016; Park *et al.*, 2014; Tran, Muchant e Aronoff, 2001). Desta forma, essas terapias podem ter um impacto menor sobre a microbiota intestinal indígena e, conseqüentemente, menores chances de acarretarem em disbiose permanente que, por sua vez, possa estar relacionada com prognósticos ruins na asma alérgica.

Embora vários estudos associem o uso de antibióticos com aumento de alergias (Ahn *et al.*, 2005; Foliaki *et al.*, 2009; Kozyrskyj, Ernst e Becker, 2007; Risnes *et al.*, 2011; Wjst *et al.*, 2001), outros estudos questionam essa associação, levantando a hipótese de que pessoas atópicas já seriam mais propensas a um maior uso de antibióticos por maior frequência de infecções do trato respiratório (Kusel *et al.*, 2008; Örtqvist *et al.*, 2015; Rantala, Jaakkola e Jaakkola, 2013).

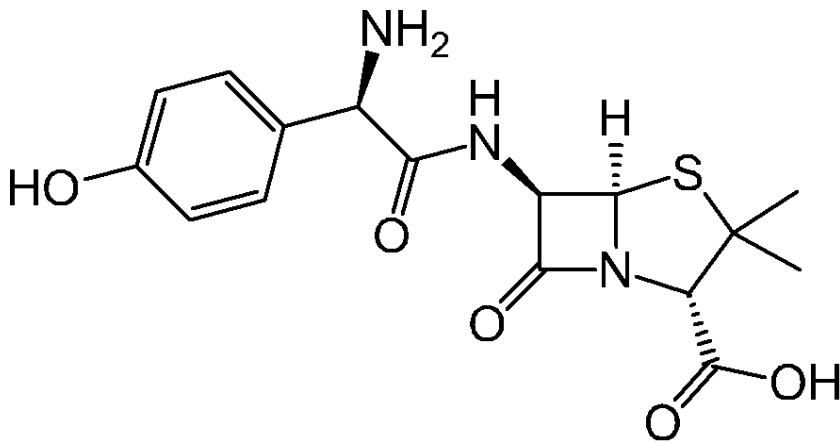
Embora não existam dados sobre a prescrição de antimicrobianos no Brasil, dados coletados pela *European Centre for Disease Prevention and Control*, através do programa *European Surveillance of Antimicrobial Consumption Network* (ECDC, 2014), mostram que os antimicrobianos das classes dos beta-lactâmicos, macrolídeos e sulfas correspondem a 82%, 63,4%, 78.3% e 67% do uso de antimicrobianos de uso sistêmico para cuidado primário na Espanha, Estônia, França e no Reino Unido, respectivamente. Os Estados Unidos da América possuem perfil semelhante: os beta-lactâmicos, macrolídeos e anti-folato/sulfas compõem 82% de uso em crianças com menos de 20 anos (Hicks *et al.*, 2015). Para investigar esta discrepância de dados na literatura em relação ao uso de antimicrobianos e seu impacto na asma alérgica selecionamos quatro antimicrobianos baseado em na frequência de prescrição e tempo de uso na prática clínica pediátrica.

### **1.5.1 AMOXICILINA.**

Amoxicilina é um antimicrobiano bactericida descoberto na década de 50 de amplo espectro de ação. Membro da família das penicilinas e, em macro, dos beta-lactâmicos, é um dos antibióticos mais prescritos em todo mundo. Seu mecanismo de ação baseia-se na ligação com a PBP – *Penicillin binding protein* – enzima bacteriana que liga os resíduos de ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglicosamina para a síntese do peptídeoglicano que reveste as células das bactérias gram-positivas. Com essa enzima inibida, a bactéria não consegue formar seu peptídeoglicano de maneira satisfatória, ocorrendo a lise da célula, matando-a (Waxman e Strominger, 1983).



A amoxicilina apresenta ação contra *Streptococcus* spp., agente etiológico de várias doenças nos seres humanos, especialmente em crianças. A amoxicilina, muitas vezes associada com um inibidor de beta-lactamase, é o medicamento de primeira escolha para infecções orofaríngeas de origem bacteriana (Kalra, Higgins e Perez, 2016). É comercializado no Brasil sob o nome Amoxil®.



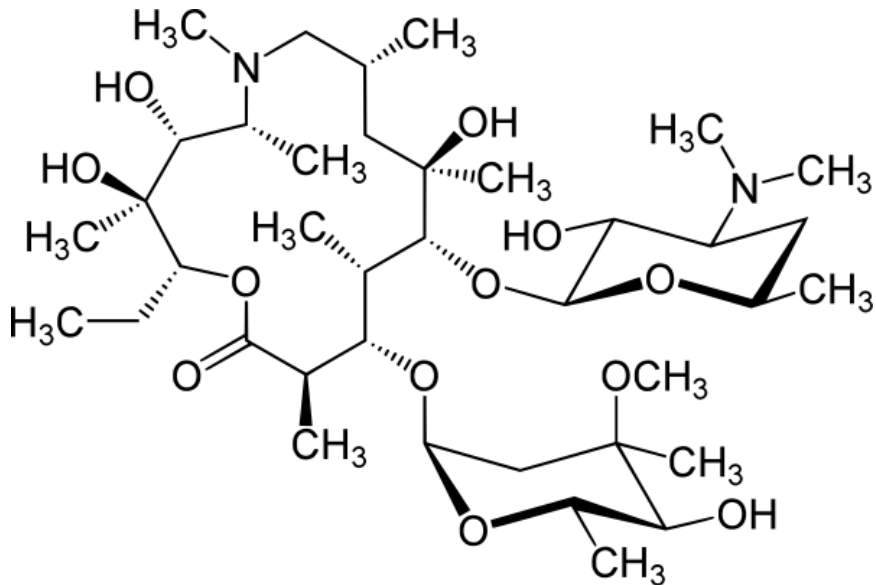
**Figura 7.** Fórmula estrutural da amoxicilina. **Fonte:** Fvasconcellos (2010).

### 1.5.2 AZITROMICINA.

A azitromicina é um antibiótico bacteriostático da classe dos macrolídeos de amplo espectro de ação. Possui ação contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. Sua elevada meia-vida de eliminação – cerca de 60 horas em humanos – possibilita tratamentos por apenas 3 ou 5 dias. A azitromicina atua ligando-se na subunidade 50s do ribossomo bacteriano, impedindo a síntese protéica (McMullan e Mostaghim, 2015). É utilizada principalmente em casos de sinusite e otite média, sendo um dos medicamentos mais prescritos nos Estados Unidos (Hicks e Taylor, 2013; Parnham *et al.*, 2014). É comercializado no Brasil sob o nome de Zitromax®.

Alguns macrolídeos, devido seu esqueleto carbônico composto pelos blocos macrocíclicos de lactonas, também apresentam atividade imunomoduladora. Atuam principalmente em células T CD4+ reduzindo sua atividade e inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (Bulska e Orszulak-Michalak, 2014; Ratzinger *et al.*, 2014). Macrolídeos como Tacrolimo e Sirolimo são utilizados como imunossuppressores em

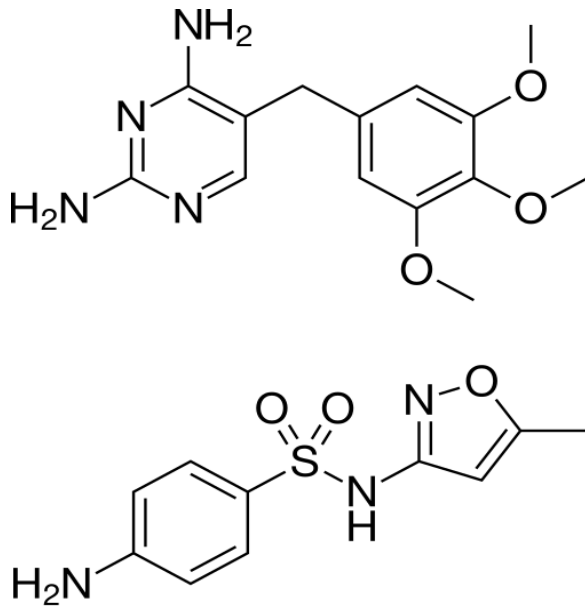
pacientes transplantados a fim de evitar rejeição de órgãos (Dalal *et al.*, 2010; Rely *et al.*, 2012).



**Figura 8.** Fórmula estrutural da azitromicina. **Fonte:** Yrazuul (2008).

### 1.5.3. TRIMETOPRIMA/SULFAMATOXAZOL.

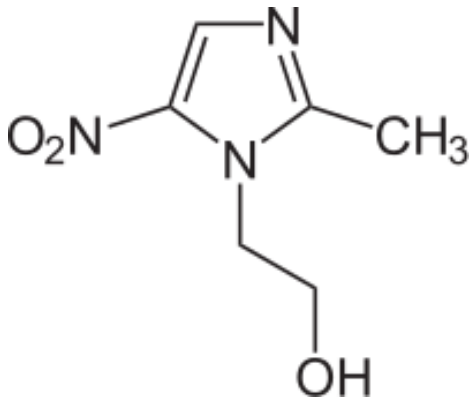
Trimetoprima e sulfametoxazol são antimicrobianos de natureza bacteriostática de amplo espectro de ação. São empregados em conjunto devido a sua atuação sinérgica: O sulfametoxazol é um inibidor competitivo da enzima diidropteroato sintetase, enzima que converte o ácido para-aminobenzóico (PABA) em diidrofolato, desta forma inibindo sua síntese. Já a trimetoprima inibe a enzima diidrofolato redutase, inibindo a conversão de diidrofolato em tetraidrofolato, importante co-fator para a síntese de DNA. Essa associação é utilizada em infecções de natureza gastrointestinal, orofaríngea, genito-urinário e infecções cutâneas causadas por *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Moraxella Catharrallis* e *Streptococcus pneumoniae*. Trimetoprima/sulfametoxazol é um dos poucos medicamentos capazes de tratar infecções causadas por bactérias oportunistas como *Stenotrophomonas maltophilia* (MASTERS *et al.*, 2003; ROCHE, 2016). Um uso recorrente desta combinação é contra o fungo *Pneumocystis jiroveci* em pacientes com sorologia positiva para o HIV (Castro e Morrison-Bryant, 2010). É comercializado sob o nome Bactrim® e Bactrim F® no Brasil.



**Figura 9.** Fórmula estrutural da trimetoprima (superior) e sulfametoxazol (inferior). **Fonte:** Vaccinationist (2015).

#### 1.5.4. METRONIDAZOL.

Metronidazol é um antibiótico da classe dos nitroimidazólicos – compostos que possuem um anel imidazólico e um radical nitro substituído como grupo farmacofórico. Descoberto na década de 60, o metronidazol é utilizado principalmente contra infecções por bactérias anaeróbias. Seu modo de ação constitui na ligação covalente no DNA de células capazes de reduzir o radical nitro em sua molécula (Mukherjee e Boshoff, 2011). É o medicamento de primeira escolha em casos de diarreia de origem nosocomial por *Clostridium difficile* (Löfmark, Edlund e Nord, 2010). Embora seu mecanismo de ação teoricamente limite sua ação a bactérias de metabolismo anaeróbio, estudos apontam uma ação carcinogênica do metronidazol em células humanas (Bendesky, Menéndez e Ostrosky-Wegman, 2002). É comercializado com o nome de Flagyl® no Brasil.



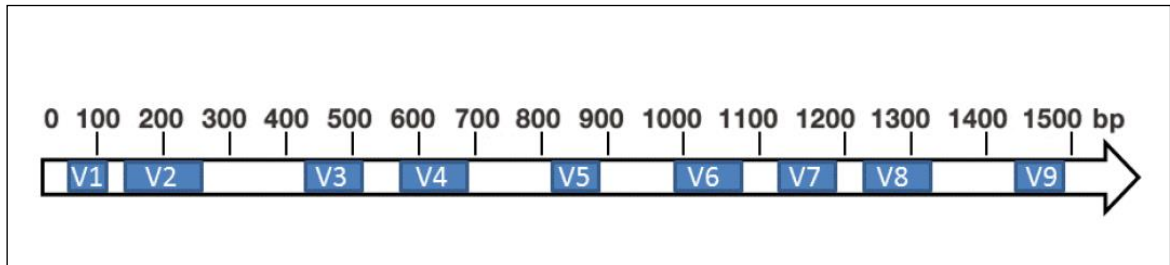
**Figura 10.** Fórmula estrutural do metronidazol. **Fonte:** NEUROtiker (2008).

### **1.6 NEXT GENERATION SEQUENCING E O ESTUDO DA MICROBIOTA.**

Estudos sobre a importância da microbiota na manutenção da saúde vem evoluindo nos últimos anos (Forbes, Domselaar, Van e Bernstein, 2016; Guinane e Cotter, 2013; Wang *et al.*, 2017). O estudo da microbiota e suas implicações na saúde humana possui um importante revés: a maior parte dos micro-organismos existentes não são cultiváveis em laboratório (Rappé e Giovannoni, 2003), levando a perda de identificação de espécies presentes em determinado nicho ecológico. O número elevado de bactérias presentes no trato intestinal humano também dificulta o isolamento das unidades formadoras de colônia em placas convencionais de ágar.

A metagenômica surge como uma ferramenta para superar esta limitação. Essa abordagem permite a identificação de micro-organismos a partir de seus ambientes originais, sendo completamente independente de cultivo (Sleator, Shortall e Hill, 2008). No entanto, o sequenciamento de todo o metagenoma, denominado análise *shotgun*, é caro e laboroso. Dessa forma, técnicas de sequenciamento direcionado, baseado em genes alvos, se fazem de extrema importância no estudo dessas comunidades (Thomas *et al.*, 2012). O gene bacteriano que codifica a porção 16s do RNA ribossômico (RNAr) é bastante utilizado, pois possui elevada taxa de conservação quando comparado a outros organismos (WANG e QIAN, 2009). No entanto, este gene possui regiões hipervariáveis características de certos filos,

classes, gêneros e espécies. O gene bacteriano 16s possui 9 dessas regiões (Figura 11).



**Figura 11.** Regiões hipervariáveis e conservadas do gene 16s bacteriano. **Fonte:** Brosius *et al.*, 1981.

Com o advento de tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) na primeira metade da década de 2000, regiões hipervariáveis do gene bacteriano codificante da porção 16s do RNA ribossomal puderam ser amplificadas e sequenciadas, sendo essas informações alimentadas e comparadas em banco de dados alimentados por outros pesquisadores, como o SILVA (Quast *et al.*, 2013). Existem diversas regiões hipervariáveis disponíveis para sequenciamento, como V1-V5, V2-V3, V3-4, V6-V8, V5-V8 e V1-V3 (Chakravorty *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2011). No entanto uma das regiões mais utilizadas pela comunidade científica no estudo do microbioma são regiões V3-V4 (Illumina, 2013) .

## **2. JUSTIFICATIVA.**

Considerando que as alergias vêm aumentando com a industrialização e desenvolvimento dos países, e esse fato pode estar relacionado a um maior uso de antibióticos, este trabalho teve como objetivo induzir disbiose utilizando estes 4 antimicrobianos e analisar seus impactos na asma alérgica e na composição da microbiota intestinal.

### **3. OBJETIVOS.**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar o impacto da antibioticoterapia na microbiota de camundongos e sua relação com a asma alérgica experimental.

#### **3.2 Objetivos Específicos:**

- Induzir disbiose através do uso de antibióticos de classes distintas (amoxicilina, azitromicina, trimetoprima/sulfametoxazol e metronidazol) e verificar seu efeito na asma experimental;
- Avaliar o papel da disbiose na frequência e no papel nas células T efetoras, células T regulatórias e ILCs no lavado bronco-alveolar em camundongos asmáticos;
- Analisar o perfil celular e de citocinas do lavado bronco-alveolar de camundongos asmáticos tratados e não tratados com antimicrobianos;
- Analisar o perfil sorológico de imunoglobulinas de camundongos asmáticos tratados e não tratados com antimicrobianos;
- Analisar a composição da microbiota intestinal após diferentes períodos de tratamento;
- Analisar a composição da microbiota do trato respiratório inferior de camundongos asmáticos tratados e não tratados com antimicrobianos.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS.

### 4.1 Animais utilizados.

Camundongos BALB/cAnNCrI fêmeas com 21 dias de idade foram obtidas no Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais e mantidas em nosso biotério com controle de temperatura e ciclo claro/escuro de 12 horas. Os animais tiveram oferta *ad libitum* de água filtrada e comida autoclavada. Após serem removidos do Biotério Central, os animais ficaram em estado de *co-house* por 4 horas a fim de normalizar a composição das microbiotas.

### 4.2 Desenho Experimental.

Os camundongos foram divididos em 10 grupos de 5 animais por gaiola: 5 grupos alérgicos e 5 grupos não-alérgicos, sendo que cada par de grupo alérgico e não-alérgico recebeu um determinado antimicrobiano de acordo com a posologia adequada para roedores (Tabela 1). O grupo controle recebeu apenas água durante todo o experimento. A administração dos medicamentos foi realizada através das garrafas de água com um volume final de 250 mL. Os cálculos foram feitos a partir da média de peso de cada gaiola, considerando um consumo médio de água por animal.

**Tabela 1.** Lista de antimicrobianos e posologias.

Antimicrobiano	Posologia
Amoxicilina	50mg/kg
Azitromicina	50mg/Kg
Trimetoprima/Sulfametoxazol	120mg/Kg (considerar a sulfa)
Metronidazol	40 mg/Kg

**Fonte:** Altholtz, DuBray La Perle e Quimby, 2006; Azoulay-Dupuis *et al.*, 1991; Böhmer, 2015; Marx *et al.*, 2014). Adaptado.

Para aumentar a palatabilidade dos antimicrobianos, as garrafas foram suplementadas com adoçante sucralose e essência de framboesa, agentes eficazes



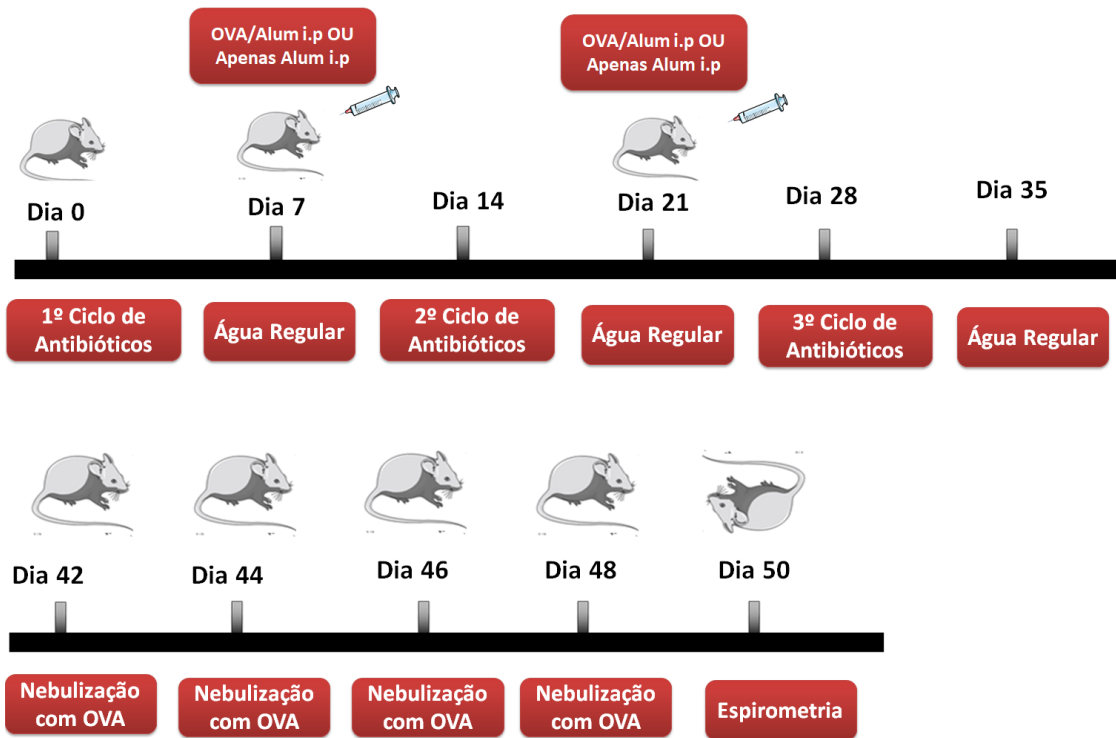
em mascarar o sabor amargo de medicamentos (ABRAHAM, J e MATHEW, 2014). Os animais do grupo controle também receberam receberam esta adição nas garrafas de água.

#### **4.2.1 Regimes de tratamento.**

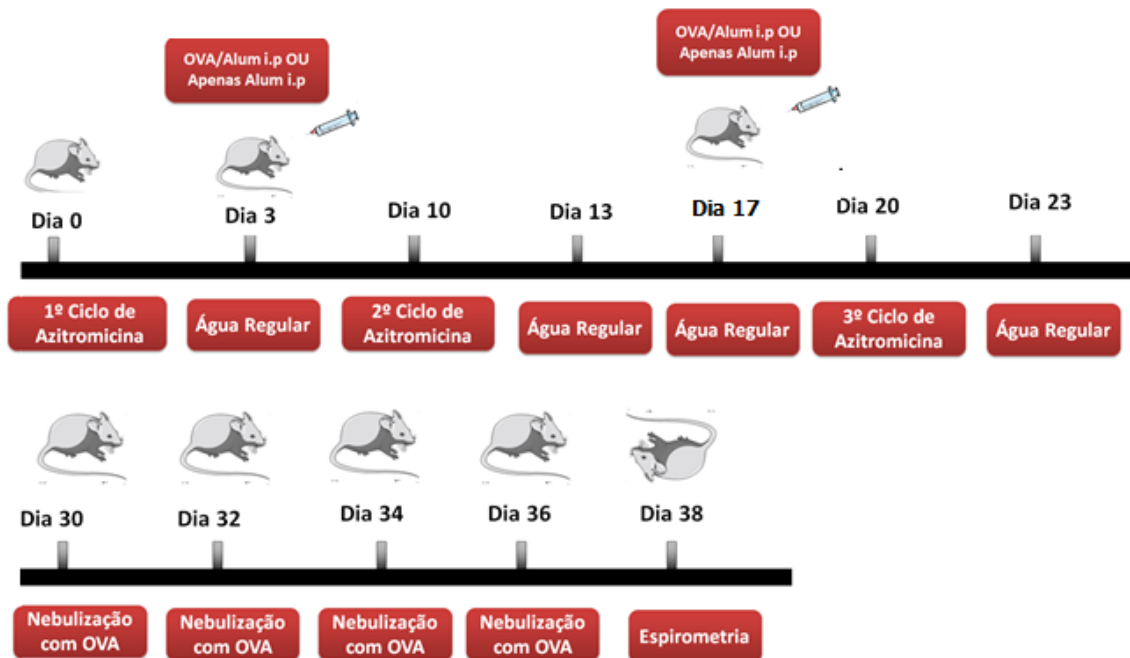
Os animais iniciaram o tratamento com antibióticos no primeiro dia em nosso biotério. Os regimes consistiram em 3 ciclos de 7 dias de tratamento, com um intervalo de 7 dias entre eles para amoxicilina, metronidazol e sulfametoxazol/trimetoprima. Os animais tratados com azitromicina receberam 3 ciclos de tratamento de 3 dias, com um intervalo de 7 dias entre os ciclos. Após o último ciclo, os animais voltaram a receber água normal por um período de 7 dias como um período de recuperação (Figuras 12 e 13).

#### **4.2.2 Indução da asma alérgica.**

A indução da asma alérgica foi realizada de acordo com uma adaptação do protocolo proposto por Henderson e colaboradores (1996). Os camundongos dos grupos alérgicos receberam intra-peritonealmente uma injeção com 10µg de ovalbumina grau II (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) com adjuvante hidróxido de alumínio ao término do primeiro ciclo de antibióticos. Após 14 dias, ocorreu uma nova sensibilização da mesma forma como a anterior. Os animais dos grupos não-alérgicos receberam injeções com apenas hidróxido de alumínio. Ao término da última recuperação dos tratamentos com antimicrobianos, os animais foram desafiados em uma câmara de nebulização com uma suspensão de ovalbumina 1% aerosolizada por 4 dias alternados por 20 minutos (Figuras 12 e 13).



**Figura 12.** Desenho experimental dos grupos amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol e metronidazol atópicos e não atópicos.



**Figura 13.** Desenho experimental do grupo azitromicina atópico e não atópico.

### **4.3 Espirometria e coleta de materiais biológicos.**

Quarenta e oito horas após o último desafio, os camundongos foram anestesiados com uma associação de xilazina (8,5mg/Kg) e cetamina (130mg/kg) por via subcutânea, traqueostomizados, canulados e ligados a um espirômetro invasivo. A espirometria foi realizada utilizando o equipamento *Forced Pulmonary Maneuver* (Buxco Research Systems©, EUA) para a determinação dos seguintes parâmetros: FEV 50, FVC, RI e FV Loop.

Após a realização do primeiro ciclo de provas pulmonares, os animais receberam via intravenosa 1 mg/Kg de metacolina. Após 20 segundos, uma nova leitura espirométrica foi realizada. A metacolina, um composto análogo a acetilcolina, liga-se nos receptores muscarínicos M<sub>3</sub>, promovendo a contração da musculatura lisa que envolve os brônquios, promovendo broncoconstrição. Este ensaio detecta a hiperreatividade pulmonar, pois os animais alérgicos apresentam uma diferença elevada entre o valor de resistência pré e pós-desafio com metacolina.

Após esta etapa, os camundongos foram novamente canulados por um catéter e tiveram os pulmões lavados com 2mL de PBS 1X estéril por duas vezes para coleta de lavado broncoalveolar (BAL). Em seguida, os animais foram sacrificados em fluxo laminar estéril para coleta de linfonodos mediastinais e coleta de sangue para a obtenção de soro. Posteriormente, os animais tiveram os pulmões perfundidos via injeção intraventricular com PBS1X e o pulmão esquerdo removido para análises histopatológicas.

### **4.4 Processamento do lavado broncoalveolar.**

Após a coleta do BAL, uma alíquota de 100 µL foi retirada e congelada em freezer -80°C para posterior extração de DNA. Em seguida o material foi centrifugado em 2.000 RPM por 10 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante congelado a -80°C para análises posteriores. O sedimento então foi ressuspenso em 100 µL de PBS1X suplementando com 3% de BSA. Em seguida, uma alíquota foi diluída 10X em solução

de Turk para contagem de células por câmara de Neubauer para análise quantitativa. Uma alíquota correspondente a cerca de  $1 \times 10^6$  células foi plaqueada em uma placa de fundo em U para marcação com anticorpos para citometria de fluxo. Foram realizados 2 painéis: um para a caracterização de células da imunidade inata e linfócitos B e outro para identificação de células da imunidade adaptativa e ILCs (*Innate Lymphoid Cells*). Os dados foram adquiridos no citômetro BD LSRFortessa utilizando o software BD FACSDiva e as análises realizadas com auxílio do programa FlowJo V10.1.

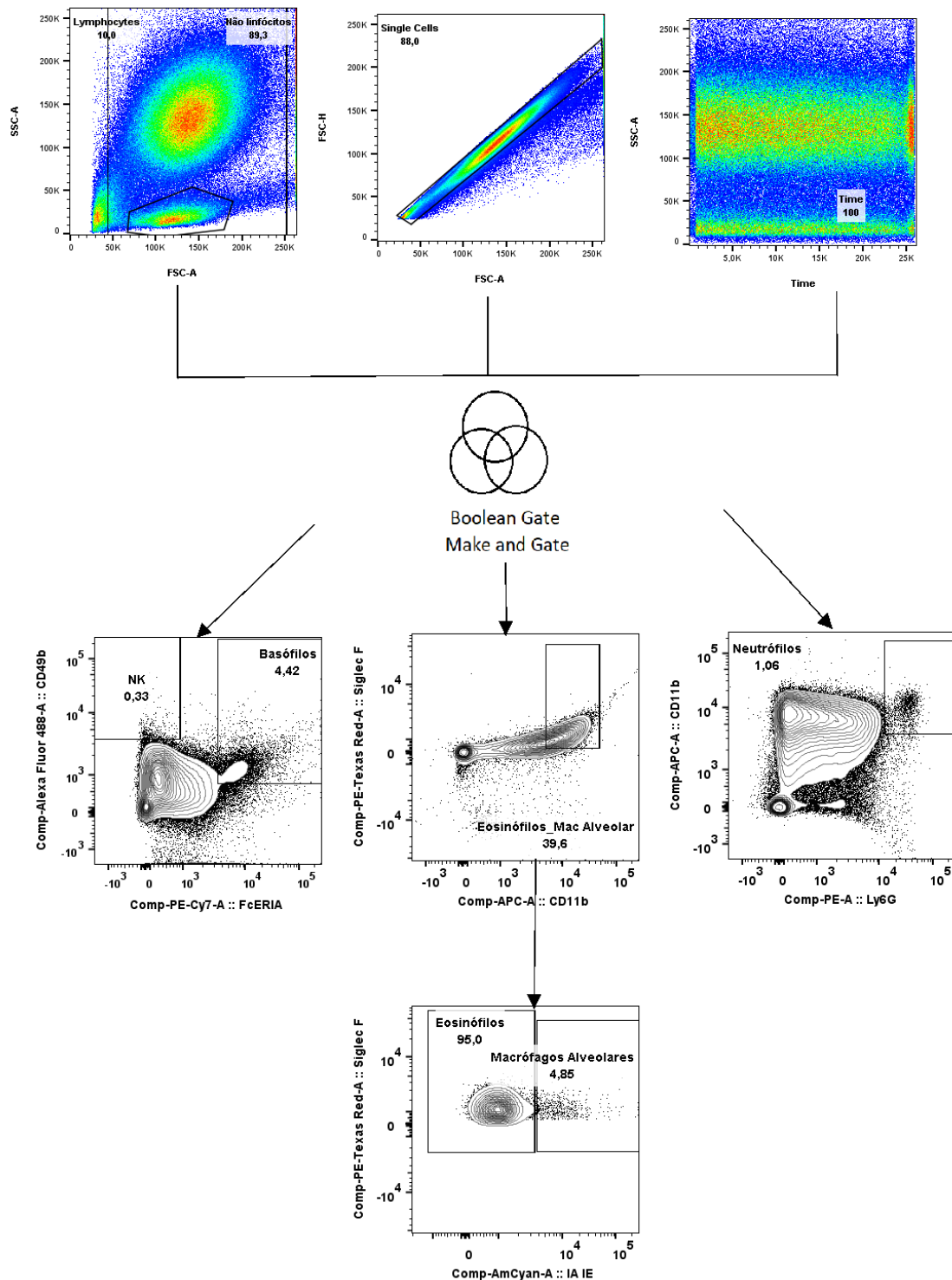
#### **4.5 Citometria de Fluxo.**

##### **4.5.1 Painel para células da imunidade inata e linfócitos B.**

Os anticorpos para este painel são capazes de discriminar populações que fazem parte da imunidade inata (NK, eosinófilos, monócitos, neutrófilos, células dendríticas, macrófagos, basófilos, macrófagos alveolares) e linfócitos B. Para a confecção deste painel, as células foram pipetadas em placa de poliestireno em fundo em U ( $1 \times 10^6$  células por poço), seguidas pelo mix de anticorpos extracelulares (50  $\mu$ L), cuja quantidade é descrita na Tabela 2. Após incubação de 30 minutos, ao abrigo da luz, as células foram lavadas com 100  $\mu$ L de tampão FACS (0,5% de albumina bovina sérica diluída em PBS), centrifugadas a 1.500 rpm, por 10 minutos, e fixadas com 100  $\mu$ L de paraformaldeído em incubação de 20 minutos. Após uma nova lavagem as células foram ressuspensas em 200  $\mu$ L de tampão FACS para a realização da aquisição. As estratégias de *gating* para análise deste painel estão descritas nas figuras 14, 15 e 16.

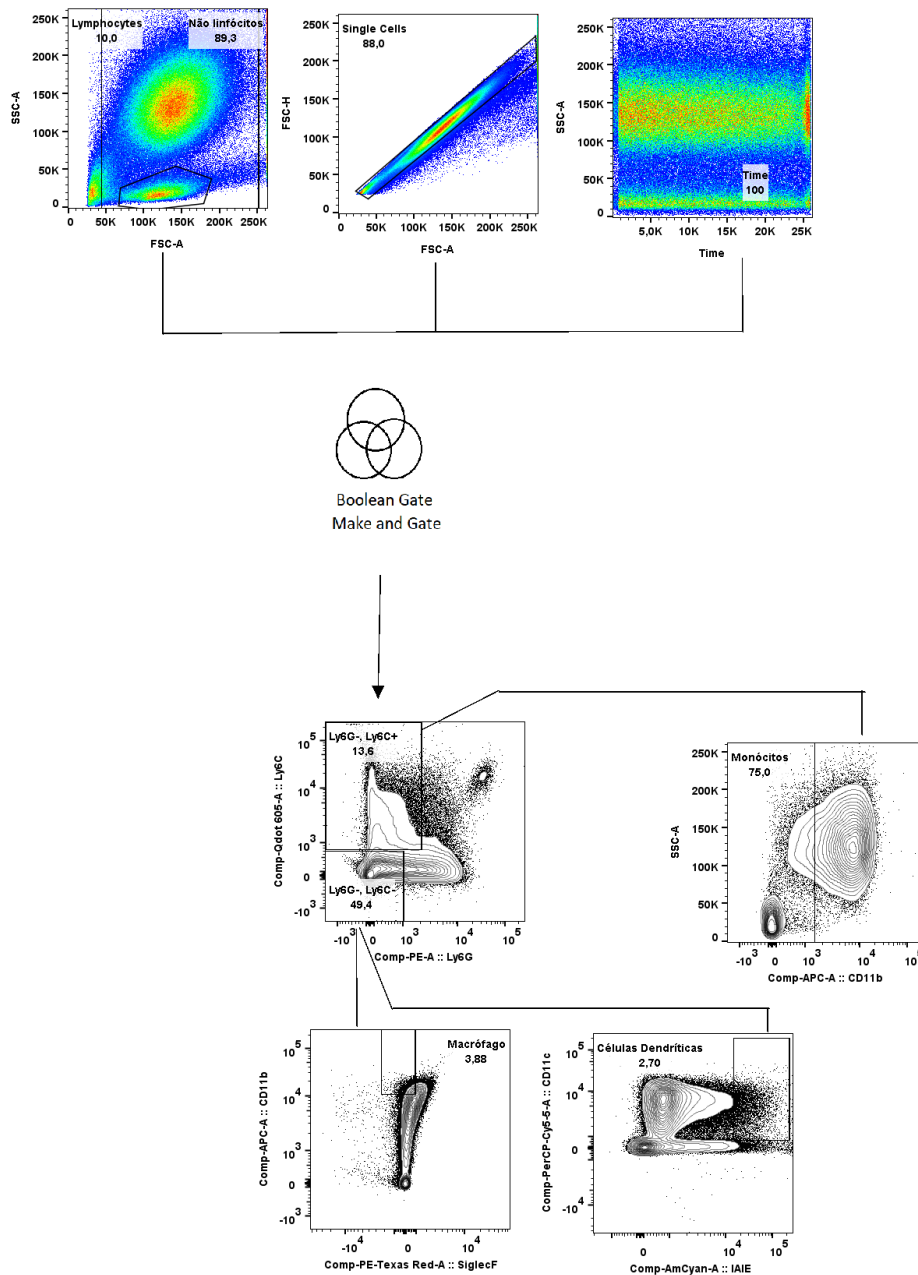
**Tabela 2.** Anticorpos/fluorocromos utilizados no painel para detecção de células da imunidade inata e linfócitos B por citometria de fluxo.

<b>Anticorpo</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Quantidade (µL)</b>
CD11b	APC	0,01
CD11c	PerCP Cy5.5	0,03
CD19	Alexa Fluor 700	0,06
CD49	Alexa Fluor 488	0,25
FcεR1a	PE-Cy7	1,25
IAIE	AmCyan	0,31
Ly6C	Qdot 605	0,15
Ly6G	PE	0,03
Siglec-F	PE-Texas Red	0,01



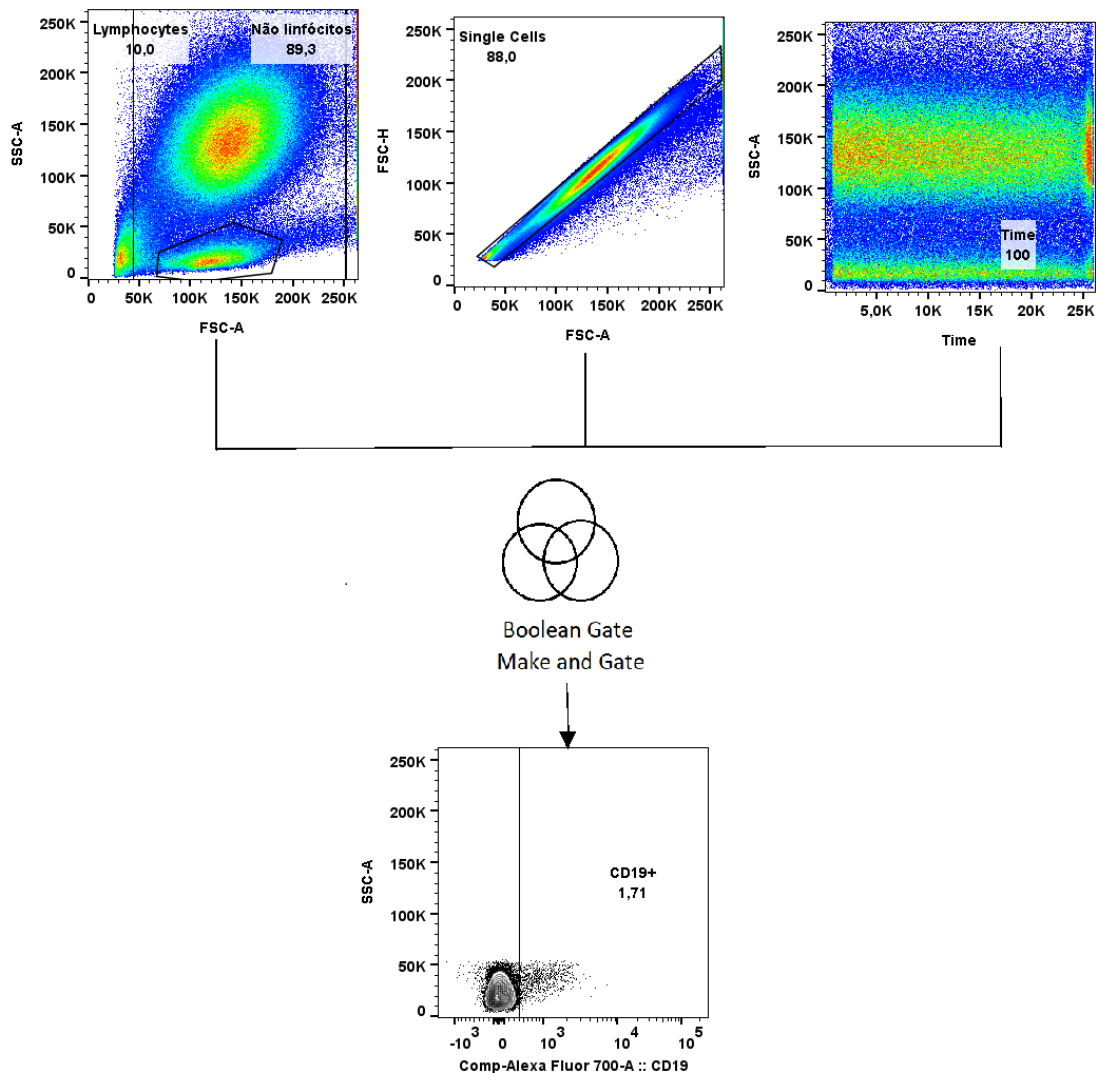
**Figura 14.** Estratégia de *gating* para células da imunidade inata (células NK, eosinófilos, macrófagos alveolares e neutrófilos). A partir dos gates de não linfócitos (SSC-A x FSC-A), singlets (FSC-H x FSC-A) e time (SSCA x Time) foi criado um gate com a intersecção dos três. A partir dessa intersecção foram determinadas as populações de NKs (CD49<sup>+</sup> FcεR1a<sup>-</sup>), basófilos (CD49<sup>+</sup> FcεR1a<sup>+</sup>) e neutrófilos (CD11b<sup>HIGH</sup>+ Ly6G<sup>HIGH</sup>+). A partir do gate para eosinófilos e macrófagos alveolares (Siglec-F+ CD11b+),

essas populações foram caracterizadas da seguinte maneira: eosinófilos (Siglec-F+ IAIE-) e macrófagos alveolares (SiglecF+ IAIE+)



**Figura 15.** Estratégia de *gating* para células da imunidade inata (monócitos, macrófagos e células Dendríticas). A partir do gates de não linfócitos (SSC-A x FSC-A), singlets (FSC-H x FSC-A) e time (SSCA x Time) foi criado um gate com a intersecção dos três. A partir do gate de Ly6C+ Ly6G-, foram

caracterizados os monócitos (SSC-A x CD11b). Considerando Ly6C- x Ly6G- foram caracterizadas as populações de macrófagos (CD11b<sup>high+</sup>, SiglecF-) e células dendríticas (CD11c+ IAIE<sup>HIGH+</sup>).



**Figura 16.** Estratégia de *gating* para linfócitos B. A partir do gates de linfócitos (SSC-A x FSC-A), singlets (FSC-H x FSC-A) e time (SSCA x Time) foi criado um gate com a intersecção dos três. A população resultante foi analisada para detecção de células CD19+ (SSC-A X CD19+).

#### 4.5.1 Painel para células da imunidade adaptativa e *Innate Lymphoid Cells*.

Os anticorpos utilizados para este painel são capazes de discriminar populações celulares da imunidade adaptativa (especialmente CD4 e suas subpopulações) e células linfóides inatas. As células foram pipetadas em placa

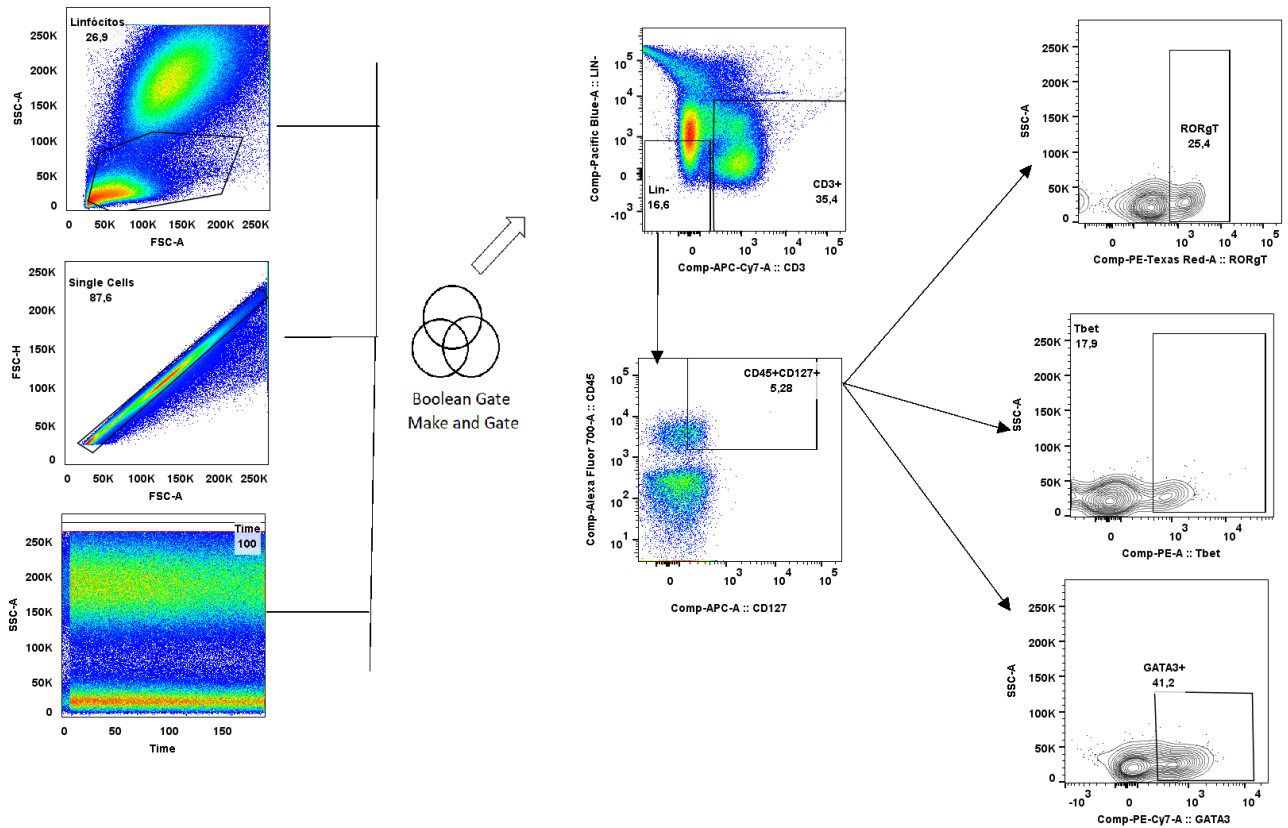


específica ( $1 \times 10^6$  células por poço), seguidas pelo mix de anticorpos extracelulares (50  $\mu$ L) que permaneceu em incubação por 30 minutos. Depois da primeira lavagem, com tampão FACS, as células foram fixadas e permeabilizadas com 100  $\mu$ L de FixPerm. Após incubação de 20 minutos, as células foram novamente lavadas com 100  $\mu$ L de PermWash e centrifugadas a 1.500 rpm por 10 minutos. Em seguida ocorreu a marcação intracelular (50  $\mu$ L de mix de anticorpos) por 45 minutos, ao abrigo da luz e sob refrigeração a 4°C. Após três lavagens consecutivas, com PermWash, as células foram enfim ressuspensas em 200  $\mu$ L de tampão FACS para serem adquiridas no citômetro. A quantidade dos anticorpos extra e intracelulares utilizados neste painel estão descritas na tabela 3. As estratégias de *gating* para análise deste painel estão descritas nas figuras 17 e 18.

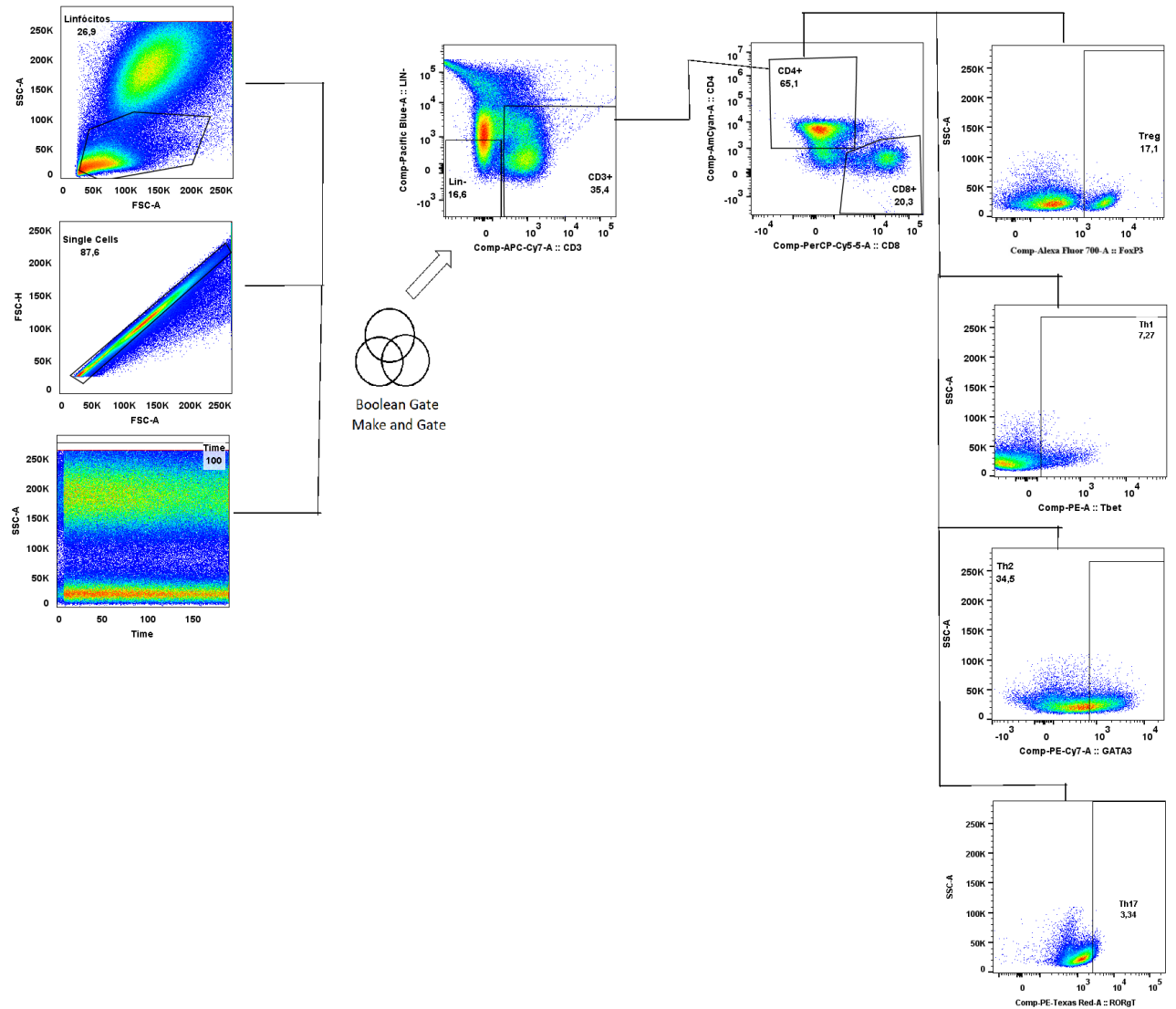
**Tabela 3.** Anticorpos/fluorocromos utilizados no painel para detecção de células da imunidade adaptativa e Innate Lymphoid Cells por citometria de fluxo.

Anticorpo	Fluorocromo	Quantidade ( $\mu$ L)
CD45	Alexa Fluor 700	0,01
CD4	AmCyan	0,03
RORgT	PE-Texas Red	0,06
FoxP3	Alexa Fluor 488	0,25
CD3	APC-Cy7	0,06
Tbet	PE	0,31
Lin*	Pacific Blue	3,02
CD8	PerCP Cy5.5	0,625
CD127	APC	0,625
GATA3	PE-Cy7	0,625

\* Lin = CD16 (0,01  $\mu$ L), CD19 (0,01  $\mu$ L), CD11b (0,25  $\mu$ L), CD11c (0,25  $\mu$ L) e Fc $\epsilon$ R1a (2,5  $\mu$ L).



**Figura 17.** Estratégia de *gating* para Innate lymphoid cells e suas subpopulações. A partir dos gates de linfócitos (SSC-A x FSC-A), singlets (FSC-H x FSC-A) e time (SSCA x Time) foi criado um gate com a intersecção dos três. A população resultante foi analisada nos canais de linhagem negativa (CD16, CD19, CD11b, CD11c e FcεR1a) por CD3+ (Lin- X CD3), selecionando a população Lin-. A partir dessa população, uma nova divisão foi realizada para marcar as células CD45+CD127+ (CD45+ x CD127+). Dentro da população ILCs os fatores de transcrição RORγT, Tbet e GATA3 foram analisados frente a SSC-A para a determinação das populações de ILC3, ILC1 e ILC2, respectivamente.



**Figura 18.** Estratégia de *gating* para linfócitos T CD4+ e suas subpopulações. A partir do gates de linfócitos (SSC-A x FSC-A), singlets (FSC-H x FSC-A) e time (SSCA x Time) foi criado um gate com a intersecção dos três. A população resultante foi analisada nos canais de linhagem negativa (CD16, CD19, CD11b, CD11c e FcεR1a) por CD3+ (Lin- X CD3), selecionando a população CD3+. A partir dessa população, uma nova divisão foi realizada para diferenciar os linfócitos T CD4+ e T CD8+ (CD4+ x CD8+). Dentro da população de linfócitos T CD4+ os fatores de transcrição FOXP3, Tbet, GATA3 e RorγT foram analisados frente a SSC-A para a determinação das populações de Tregs, Th1, Th2 e Th17, respectivamente.

#### 4.7 ELISA para IgG1, IgG2a, IgG2b no soro e no BAL.

Inicialmente, placas de 96 poços de poliestireno foram sensibilizadas com 100 µL por poço com uma solução de ovalbumina na concentração de 5 µg/mL *overnight* à 8°C. No dia seguinte, o conteúdo foi descartado e as placas lavadas com solução de lavagem (PBS1X + 0,05% Tween® 20) por 5 vezes. Em seguida, as placas foram bloqueadas por 200 µL/poço com um tampão de bloqueio (PBS1X + caseína 0,25%) em temperatura ambiente por 2 horas. Posteriormente, o conteúdo foi descartado e as placas foram lavadas por 5 vezes com tampão de lavagem. As placas foram batidas em superfície rígida amortecida com uma cama de papel para a remoção de excesso de líquido nos poços (secagem). Por fim, as amostras de soro foram pipetadas na proporção 1:100, enquanto as amostras de BAL foram pipetadas na proporção 1:20 (todas diluídas em solução de bloqueio e em duplicata), seladas e armazenadas em 4°C *overnight*. No dia seguinte, o sobrenadante foi descartado e as placas lavadas por 5 vezes com tampão de lavagem e secadas. Em seguida, soluções contendo anticorpos biotinizados anti-IgG1, anti-IgG2a ou anti-IgG2b de camundongo (Thermo-Scientific, EUA) foram pipetadas nas amostras, dependendo da pesquisa da subclasse de imunoglobulina G em questão, na quantidade de 100 µL/poço na proporção 1:1000, sendo as placas incubadas por 1 hora à 37°C. Após este período, o sobrenadante foi descartado e as placas lavadas por 5 vezes e secadas. Por fim, uma solução de streptavidina conjugada com peroxidase foi pipetada nos poços (100 µL/poço) na proporção 1:200, sendo as placas incubadas por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as placas lavadas por 10 vezes com tampão de lavagem e secadas. A revelação do ELISA se deu utilizando uma solução reveladora (4 mg de OPD, 20 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tampão citrato q.s.p 10mL) na quantidade 100 µL/poço. As placas foram cobertas e observadas para a formação de cor e a reação foi interrompida por ácido sulfúrico 2N na quantidade 20 µL/poço. As absorbâncias foram medidas utilizando leitor de microplaca Varioskan (ThermoFisher, Massachusetts) no comprimento de onda de 492 nm.

#### 4.8 ELISA para IgA no soro e no BAL.

Inicialmente, placas de 96 poços de poliestireno foram sensibilizadas com 100  $\mu\text{L}$  por poço com uma solução de ovalbumina na concentração de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  *overnight* à 8°C. No dia seguinte, o conteúdo foi descartado e as placas lavadas com solução de lavagem (PBS1X + 0,05% Tween® 20) por 5 vezes e secadas. Em seguida, as placas foram bloqueadas por 200  $\mu\text{L}/\text{poço}$  com um tampão de bloqueio (PBS1X + caseína 0,25%) em temperatura ambiente por 2 horas. Posteriormente, o conteúdo foi descartado e as placas foram lavadas por 5 vezes com tampão de lavagem e secadas. As amostras de soro foram pipetadas na proporção 1:10, enquanto as amostras de BAL foram pipetadas na proporção 1:20 (todas diluídas em solução de bloqueio e em duplicata), seladas e armazenadas a 4°C *overnight*. No dia seguinte, o sobrenadante foi descartado e as placas lavadas por 5 vezes com tampão de lavagem e secadas. Em seguida, uma solução contendo anticorpo biotinilado anti-IgA de camundongo (eBioscience, EUA) foi pipetada nas amostras (100  $\mu\text{L}/\text{poço}$ ) na proporção 1:1000, sendo as placas incubadas por 1 hora à 37°C. Após este período, o sobrenadante foi descartado e as placas lavadas por 5 vezes e secadas. Por fim, uma solução de streptavidina conjugada com peroxidase foi pipetada nos poços (100  $\mu\text{L}/\text{poço}$ ) na proporção 1:200, sendo as placas incubadas por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as placas lavadas por 10 vezes com tampão de lavagem e secadas. A revelação do ELISA se deu utilizando uma solução reveladora (4 mg de OPD, 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em tampão citrato q.s.p 10mL) na quantidade 100  $\mu\text{L}/\text{poço}$ . As placas foram cobertas e observadas para a formação de cor e a reação foi interrompida por ácido sulfúrico 2N na quantidade 20  $\mu\text{L}/\text{poço}$ . As absorbâncias foram medidas utilizando leitor de microplaca Varioskan (ThermoFisher, Massachusetts) no comprimento de onda de 492 nm.

#### 4.9 ELISA para IgE no soro e no BAL.

Inicialmente, placas de 96 poços de poliestireno foram sensibilizadas com 100  $\mu\text{L}$  por poço com uma solução de ovalbumina na concentração de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  *overnight* à 4°C. No dia seguinte, o conteúdo foi descartado e as placas lavadas com solução

de lavagem (PBS1X + 0,05% Tween® 20) por 5 vezes e secadas. Em seguida, as placas foram bloqueadas por 200 µL/poço com uma tampão de bloqueio (PBS1X + caseína 0,25%) em temperatura ambiente por 2 horas. Posteriormente, o conteúdo foi descartado e as placas foram lavadas por 5 vezes com tampão de lavagem e secadas. As amostras de soro e BAL foram pipetadas na proporção 1:20 (todas diluídas em solução de bloqueio e em duplicata), seladas e armazenadas a 4°C *overnight*. No dia seguinte, o sobrenadante foi descartado e as placas lavadas por 5 vezes com tampão de lavagem e secadas. Em seguida, uma solução contendo anticorpo IgG de cabra anti-IgE de camundongo (Abcam, EUA) foi pipetada nas amostras (100 µL/poço) na proporção 1:1000, sendo as placas incubadas por 1 hora em temperatura ambiente. Após este período, o sobrenadante foi descartado e as placas lavadas por 5 vezes. Por fim, uma solução de anticorpo anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich) foi pipetada nos poços (100 µL/poço) na proporção 1:40000, sendo as placas incubadas por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as placas lavadas por 10 vezes com tampão de lavagem e secadas. A revelação do ELISA se deu utilizando uma solução reveladora (4 mg de OPD, 20 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tampão citrato q.s.p 10mL) na quantidade 100 µL/poço. As placas foram cobertas e observadas para a formação de cor e a reação foi interrompida por ácido sulfúrico 2N na quantidade 20 µL/poço. As absorbâncias foram medidas utilizando leitor de microplaca Varioskan (ThermoFisher, Massachusetts) no comprimento de onda de 492 nm.

#### **4.10 Cytokine Bead Array Th1/Th2/Th17 do sobrenadante do BAL.**

O ensaio para detecção das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF, IL-17A e IL-10 através de citometria de fluxo foi realizado nos sobrenadantes de BAL. O teste foi realizado segundo as instruções do fabricante (BD Biosciences, San Jose).

## **4.11 Extração de DNA e análise da microbiota associada.**

### **4.11.1 Coleta de fezes e extração de DNA.**

As fezes dos camundongos foram coletadas em 4 pontos: antes do início do tratamento (ponto 0), após o término do primeiro ciclo (ponto 1), após o término do terceiro ciclo (ponto 3) e após 7 dias do fim do terceiro ciclo (ponto 4). A coleta baseou-se em um pool de fezes de todos os animais de cada gaiola (2 pellets de cada animal). As fezes foram imediatamente congeladas em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior extração de DNA bacteriano. O DNA das amostras foi extraído pelo Kit QIAamp DNA stool mini kit (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante.

### **4.11.2 Extração de DNA do BAL.**

A extração de DNA do lavado broncoalveolar foi baseada em um protocolo adaptado por Teixeira (2016). O método baseia-se na extração pela mistura de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico nas proporções 25:24:1, respectivamente. Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  de cada BAL foi adicionada em 100  $\mu\text{L}$  de uma mistura de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico microtubos de 1,5mL. Em seguida, os microtubos foram agitados por inversão em *shaker* na velocidade de 1.500 RPM por 1 hora. Posteriormente os tubos foram centrifugados à 14.000 RPM por 5 minutos, sendo as fases aquosas (superior) transferidas para novos tubos. Em seguida, foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  de etanol P.A em cada tubo, seguido de armazenamento em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$  por 1 hora. Os tubos foram invertidos até a formação de precipitado, sendo centrifugados à 14.000 RPM por 5 minutos na temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ . Os sobrenadantes foram descartados e os pellets resultantes receberam 200  $\mu\text{L}$  de etanol 70% gelado. Os tubos foram mais uma vez centrifugados à 14.000 RPM por 5 minutos na temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ , incluindo descarte do novo sobrenadante. Os tubos foram deixados invertidos até o etanol evaporar e os sedimentos resultantes foram ressuspensos cada um com 30  $\mu\text{L}$  de água miliQ livre de DNase/RNase.

#### 4.13 Sequenciamento do gene RNAr 16S e análise de dados.

Esta etapa foi realizada pela empresa Neopropecta (Florianópolis, Santa Catarina, Brasil) de acordo com os protocolos da empresa.

O sequenciamento foi realizado utilizando os iniciadores 314F-806R, que têm como alvo as regiões hipervariáveis V3-V4, que possibilita a detecção de microrganismos dos domínios Bacteria e Archaea (amplicon de tamanho de 283 pb) (Klindworth et al., 2013). Os *primers* F e R foram marcados com as sequências adaptadoras necessárias para o sequenciamento na plataforma Miseq Illumina. A reação de amplificação foi conduzida utilizando a *Platinum Taq* (Invitrogen, USA). O protocolo da reação foi: 95 °C/5 min; 95 °C/45 s, 66 °C/30 s, 72 °C/45 s - 25 x; e 72 °C/2 min. A construção da biblioteca foi realizada seguindo os procedimentos do protocolo 16S Sample Preparation Guide (Illumina, USA) e o sequenciamento foi realizado empregando-se a plataforma Miseq Illumina. Os *amplicons* foram quantificados pela KAPA Library Quantification Kit (KAPA Biosystems, USA) e seu tamanho foi estimado pelo Picogreen dsDNA assays (Invitrogen, USA).

As sequências geradas pelo Illumina Miseq foram analisadas por meio de um pipeline patenteado da própria empresa. As sequências de DNA resultantes do sequenciamento passaram, individualmente, por um filtro de qualidade, permitindo no máximo 1% de erro acumulado. As sequências que aprovadas pelo processo de triagem foram agrupadas em clusters e foram utilizadas para identificação taxonômica por comparação com banco de dados (NeoRef, Neopropecta) através do software BLAST (NIH).

As análises de alfa diversidade e abundância relativa foram realizadas pelo programa R (<https://www.r-project.org-R>, Core Team 2014), utilizando os pacotes Phyloseq (McMURDIE; HOLMES, 2013), Vegan (DIXON, 2003) e ggplot2 (WICKHAM, 2009). A alfa diversidade foi mensurada por meio dos índices de diversidade Shannon, Simpson (SHANNON; WEAVER, 1963) e de riqueza Chao1 (CHAO, 1984), ACE e OTUs observadas.



#### **4.14 Processamento tecidual e análise histopatológica de órgãos.**

Os pulmões recuperados foram armazenados em formalina tamponada 4% (pH 7,4) por 24 horas, sendo lavados em água corrente após este período. Em seguida, os órgãos foram submersos em etanol 70%. Noventa e seis horas depois, os pulmões foram alocados em cassetes de plásticos e receberam banhos de parafina para a formação de blocos. Posteriormente, foram feitos cortes com 4 micrômetros de espessura, os quais foram corados com hematoxilina-eosina (HE) e pelo método de Periodic Acid Schiff (PAS) para as análises morfométricas.

#### **4.15 Aquisição de imagens.**

As lâminas coradas com HE e PAS foram fotografadas em objetiva de 40X utilizando o microscópio ABX 35 OLIMPUS® localizado no Núcleo de Imunopatologia Experimental (NIPE) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. As imagens obtidas foram capturadas com resolução de 1392x1040 pixels e transferidas via câmera de vídeo colorida Cool SNAP-Proof Color (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA) para um sistema de vídeo acoplado a computador por meio do programa Image-Pro Express versão 4.0 para Windows (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA).

#### **4.16.0 Determinação da área ocupada por células inflamatórias.**

Para avaliar comparativamente a área ocupada por células inflamatórias presentes no tecido pulmonar, foram utilizadas lâminas coradas pela técnica de H&E. Foram escolhidos aleatoriamente de 8 campos na periferia de brônquios intrapulmonares e de vasos sanguíneos, onde há concentração de células inflamatórias. Os cortes foram fotografados em aumento de objetiva de 20X perfazendo uma área total por imagem de 75910,81  $\mu\text{m}^2$ . As imagens digitalizadas foram analisadas quantitativamente para medição da área ocupada pelo processo inflamatório, utilizando-se o software de morfometria ImageJ 2 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Para a análise morfométrica foi feita leitura cega, isto é, o

pesquisador não sabia a que grupo experimental a lâmina pertencia. Os resultados foram expressos como área ocupada pelo infiltrado inflamatório/área total de tecido.

#### **4.16.1 Análise estereológica.**

A análise da densidade volumétrica dos espaços alveolares ( $V_v[a]$ ) e dos septos alveolares foi realizada através de estereologia, isto é, em um sistema composto por 16 pontos e em uma área-teste conhecida (STARCKER, 2000) onde a linha proibida foi considerada como delimitação, a fim de evitar uma superestimação no número de estruturas. O sistema teste foi acoplado a um monitor ligado a um microscópio. O número de pontos (PP) que atingiram os septos alveolares ( $V_v[sa]$ ) e os espaços alveolares ( $V_v[a]$ ) foram avaliados de acordo com o número total de pontos de um sistema teste (Pt). Então temos que  $V_v = PP/Pt$ . Para se obter amostras uniformes e proporcionais do pulmão, foram analisados aleatoriamente 20 campos e um sistema ciclóide de ensaio sobreposto sobre a tela do monitor. O volume de referência foi estimado pela contagem de pontos de utilização dos sistemas de ponto de teste (PT). Uma área total de  $1,94 \text{ mm}^2$  foi analisada para determinar as densidades de volumes dos septos alveolares ( $V_v[sa]$ ) e dos espaços alveolares ( $V_v[a]$ ) em cortes corados em HE.

#### **4.16.2. Densidade da área de muco.**

A avaliação da presença da área ocupada por muco nas células caliciformes foi feita através do método de coloração por PAS (Periodic Acid Schiff). Neste método, os cortes de  $4 \mu\text{m}$  de espessura foram desparafinados, hidratados, banhados na solução de ácido periódico durante 5 minutos e então mergulhados no Reativo de Schiff durante 10 minutos ou mais, até que atingissem uma tonalidade rosa pálida. As células caliciformes foram evidenciadas em um tom rosa escuro.

Foram capturadas de 18 imagens por animal das vias aéreas condutoras intrapulmonares que apresentaram epitélio mucociliar com diâmetros semelhantes. Esses epitélios secretores foram analisados com a utilização do software de morfometria ImageJ 2 de acordo com Livraghi et al. (2009), com modificações. Foi

utilizado o software de processamento de imagens Fiji (em formato Java, desenvolvido pelo U. S. National Institutes of Health (NIH)). As imagens foram avaliadas pelo mesmo patologista, sem acesso a qualquer informação em relação aos tratamentos, que delimitou a área do epitélio mucociliar manualmente em cada imagem com base apenas em critérios morfológicos, sendo cada área calculada pelo programa. As áreas reveladas pelo PAS nas lâminas dos animais foram selecionadas automaticamente pelo programa, ajustadas pelo operador, e quantificadas. A área positiva para PAS foi medida e dividida pela área epitelial total, para dar a densidade volumétrica das mucosubstâncias armazenadas nas células caliciformes.

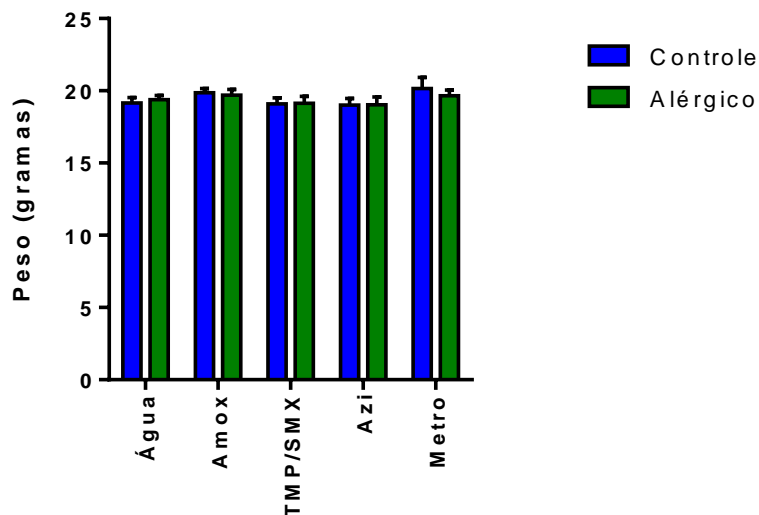
#### **4.17 Análise de dados.**

Os dados obtidos com os experimentos foram analisados pelo programa GraphPadPrism 6 (La Jolla, EUA). Inicialmente os testes *Kolmogorov-Smirnov*, *D'Agostino* e *Pearson* foram realizados para a determinação de normalidade dos dados. Caso a distribuição fosse paramétrica, o teste-t de student foi utilizado para a comparação das médias dos grupos em relação aos grupos controles. Caso os dados fossem não-paramétricos, o teste Mann-Whitney foi realizado em seu lugar. O teste de análises múltiplas de variância (ANOVA) foi utilizado para comparação entre todos os grupos quando necessário. Para efeitos de significância estatística foi considerando  $p < 0.05$ . Os dados de citometria de fluxo foram analisados pelo software FlowJo™.

## 5. RESULTADOS.

### 5.1. O tratamento com antimicrobianos não alterou o peso dos animais.

O peso final dos animais antes das provas espirométricas é relativamente bem semelhante entre todos os grupos (Figura 19). Diferenças da função respiratória podem ser explicadas pela diferença de peso e desenvolvimento pulmonar, o que não ocorreu nos animais analisados.

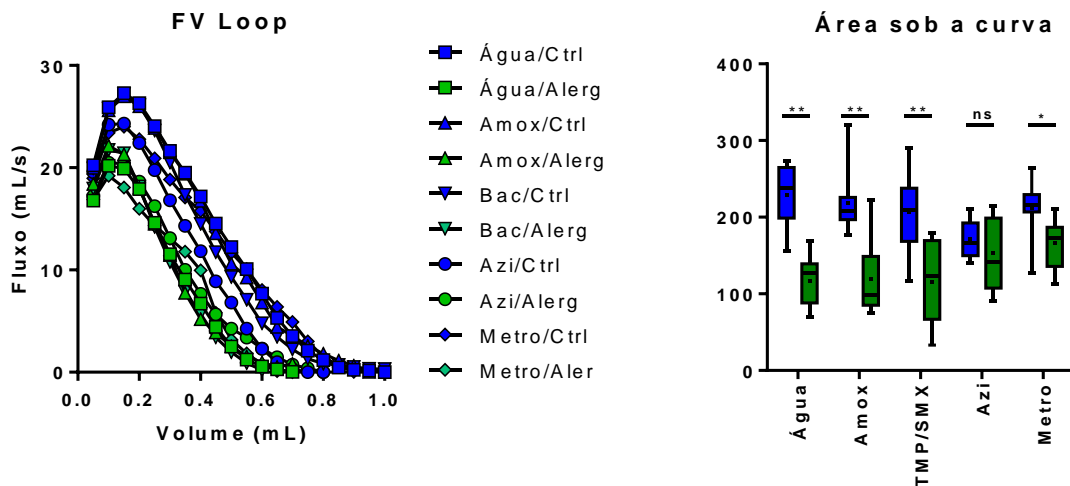


**Figura 19.** O peso dos animais não é alterado pela condição asmática ou pelos tratamentos com antimicrobianos. Peso aferido na véspera das provas espirométricas. n=8-10. Análise múltipla de variância (ANOVA). Valores apresentados em média  $\pm$  SEM.

### 5.2. O tratamento com antimicrobianos alterou parâmetros da mecânica pulmonar.

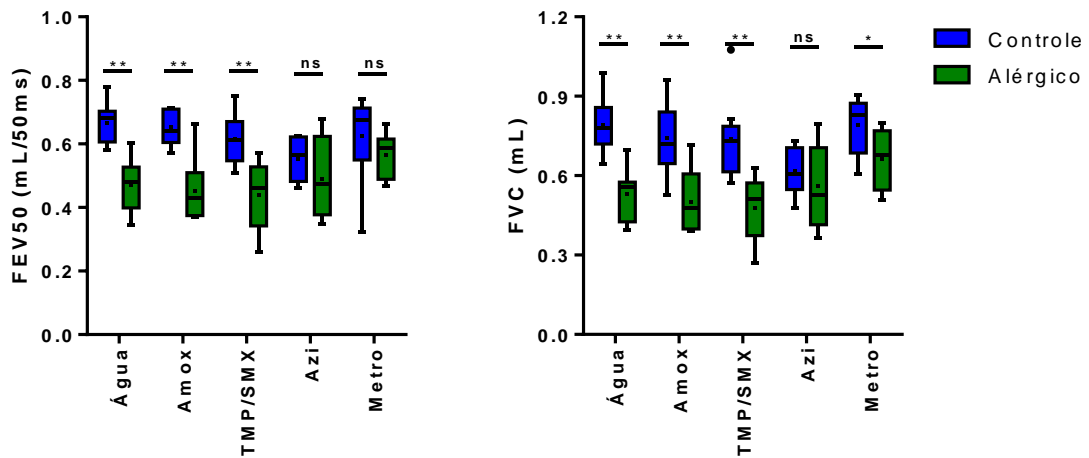
O modelo experimental demonstrou-se efetivo em causar alterações nos parâmetros respiratórios clássicos da asma alérgica: redução do pico de fluxo respiratório e perda da capacidade pulmonar, demonstrado por uma redução da área sob a curva da relação fluxo-volume. No entanto, o tratamento com azitromicina

preservou este último parâmetro nos animais asmáticos quando comparados com os animais do grupo azitromicina controle (Figura 20).



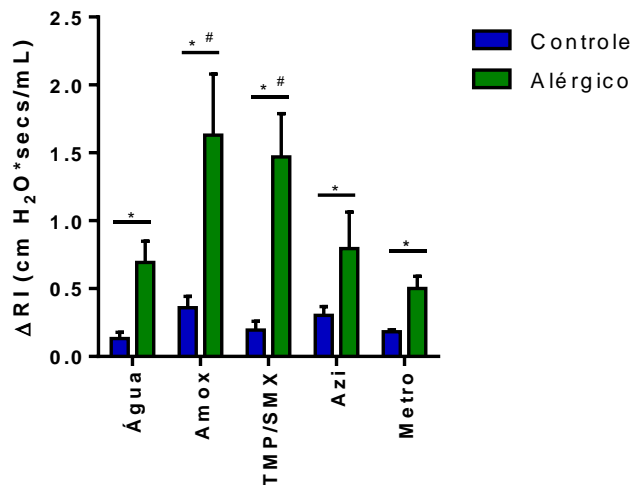
**Figura 20.** O tratamento com azitromicina preservou a capacidade respiratória (relação fluxo/volume de ar expirado) em camundongos BALB/cAnNCrl atópicos após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina. n=7-10. Teste-t de student.  $p < 0.05$  (\*).

Parâmetros importantes na avaliação da doença asmática como FVC e FEV-50 (FEV em 50 ms que para camundongos é o parâmetro mais próximo ao FEV1 em humanos) também foram preservados nos animais asmáticos tratados com azitromicina relação aos seus respectivos controles. Os animais asmáticos tratados com metronidazol também apresentaram uma preservação de FEV-50 (Figura 21).



**Figura 21.** Os tratamentos com metronidazol e azitromicina foram capazes de preservar parâmetros da mecânica pulmonar FVC e FEV-50 em camundongos BALB/cAnNCrI atópicos após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina (n=5-10). Teste-t de student.  $p < 0.05$  (\*)

O padrão-ouro para a caracterização da doença asmática, a hiperresponsividade brônquica, foi observada após o desafio com metacolina em todos os animais alérgicos. Observamos que os tratamentos com amoxicilina e trimetoprima/sulfametoxazol elevaram a resistência pulmonar quando comparados ao grupo controle alérgico (Figura 22).

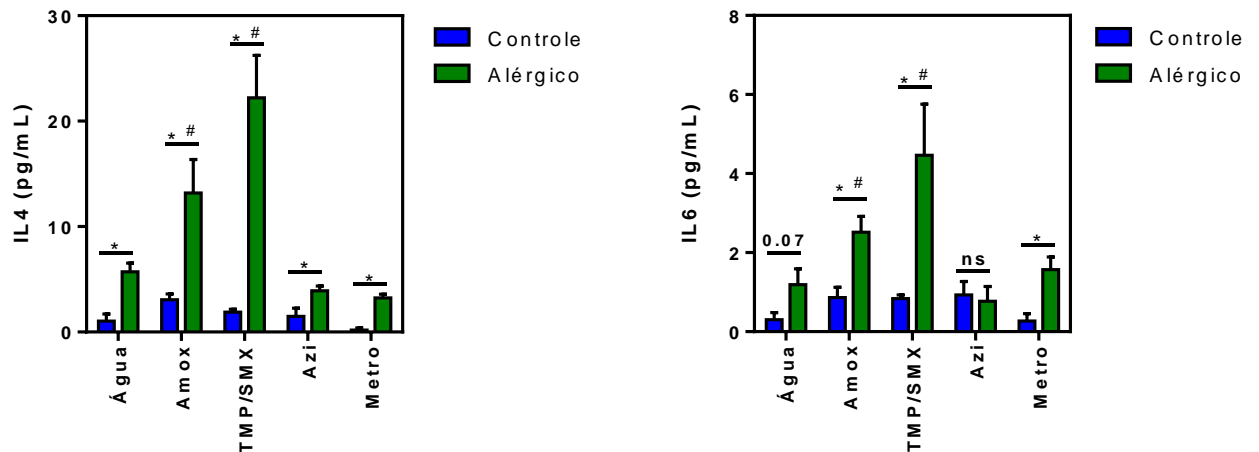


**Figura 22.** O tratamento com amoxicilina e trimetoprim/sulfametoxazol elevou a hiperreatividade pulmonar em relação ao grupo controle alérgico.  $\Delta$ RI corresponde a diferença entre o valor da resistência pulmonar pós-metacolina subtraído pelo valor pré-metacolina. Teste realizado em camundongos BALB/cAnNCrI após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina. n=6-10. Teste-t de student.  $p < 0.05$  (\*), (#) diferença entre o grupo água alérgico. Valores apresentados em média  $\pm$  SEM.

### 5.3. Os tratamentos com amoxicilina e trimetoprima/sulfametoxazol elevaram os níveis de IL-4 e IL-6 no lavado broncoalveolar nos camundongos alérgicos.

Através da aferição de citocinas por citometria de fluxo, foi detectado uma elevação nos níveis de IL-4 e IL-6 no BAL dos animais alérgicos tratados com amoxicilina e trimetoprima/sulfametoxazol quando comparados com o grupo controle, denotando pior padrão inflamatório (Figura 23). IL-4 é a citocina-chave da inflamação do tipo 2 e necessária para ativação de linfócitos T CD4+ Th2. Este fenótipo é o predominante nas doenças alérgicas, incluindo asma. IL-6 é uma citocina envolvida na produção mediadores inflamatórios como a prostaglandina E2 e proteína C reativa. Níveis elevados de IL-6 já foram reportados no BAL de pacientes asmáticos, sendo muitas vezes um fator preditivo da deterioração de FEV<sub>1</sub> em humanos (Rincon e Irvin, 2012). Consonante com esses dados, o grupo alérgico tratado com azitromicina apresentou uma preservação dos níveis de FEV<sub>1</sub> (padrão correspondente a camundongos) e níveis reduzidos de IL-6 no lavado broncoalveolar (Figura 17). Não

foram encontradas diferenças em nenhuma das outras citocinas analisadas (IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF, IL-17A e IL-10).

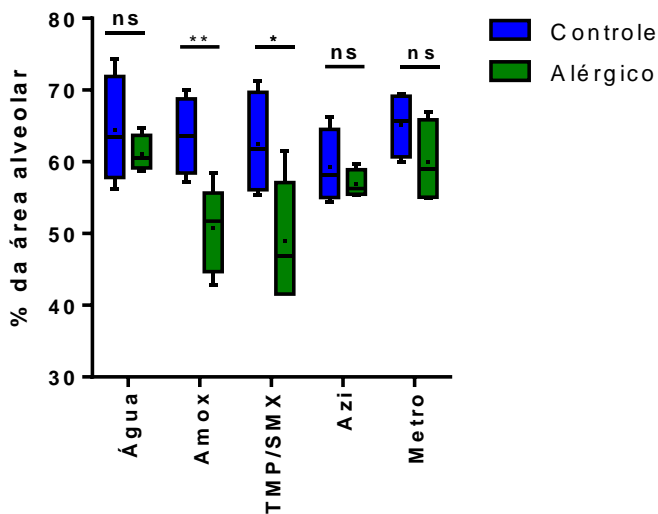


**Figura 23.** Os tratamentos com amoxicilina e trimetoprima/sulfametoxazol elevaram os níveis de IL-4 e Il-6 no lavado broncoalveolar em relação ao grupo controle alérgico. Teste realizado em camundongos BALB/cAnNCrI após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina. n=6-10. Teste-t de student.  $p < 0.05$  (\*), (#) diferença entre o grupo controle alérgico. Valores apresentados em média  $\pm$  SEM.

#### 5.4 O tratamento com amoxicilina e trimetoprima/sulfametoxazol reduz o espaço alveolar.

Através das análises estereológicas, observamos uma redução do volume alveolar dos animais alérgicos tratados com amoxicilina e trimetoprima/sulfametoxazol em relação aos controles, demonstrando uma perda da área livre para trocas gasosas (Figura 24). Por outro lado, o tratamento com azitromicina e metronidazol preservaram melhor as áreas alveolares durante a asma (Figura 24).

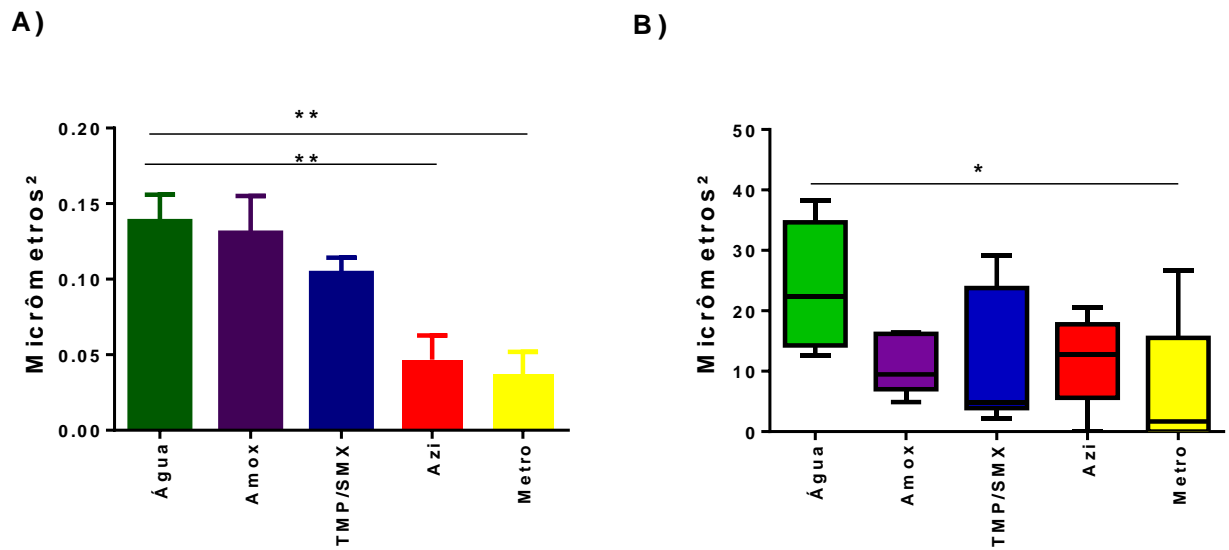




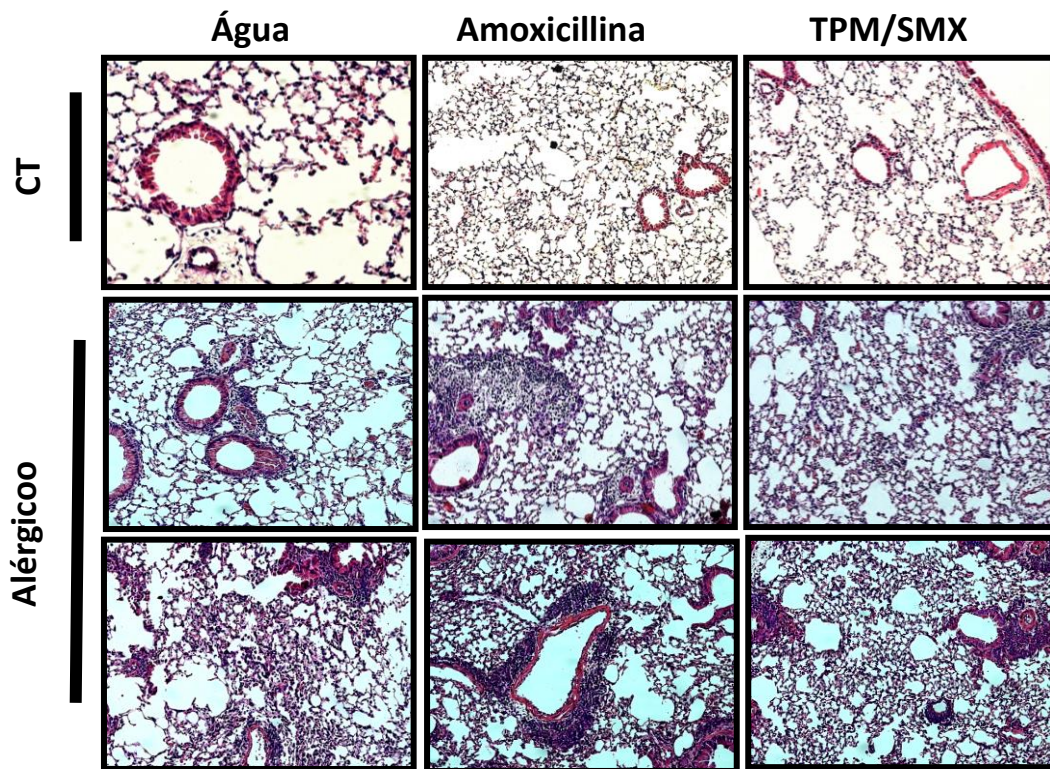
**Figura 24.** O tratamento com amoxicilina e trimetoprim/sulfametoxazol reduziu a área alveolar dos animais asmáticos tratados com esses antimicrobianos. Análise dos espaços alveolares a partir de lâminas de pulmões coradas com hematoxilina e eosina observadas em objetiva de 40x através da técnica de estereologia n=6-10. Teste-t de student.  $p < 0.05$  (\*), ns= não significativo.

### 5.5 O tratamento com azitromicina e metronidazol reduziu a inflamação peribronquial e perivascular dos animais asmáticos, incluindo produção de muco.

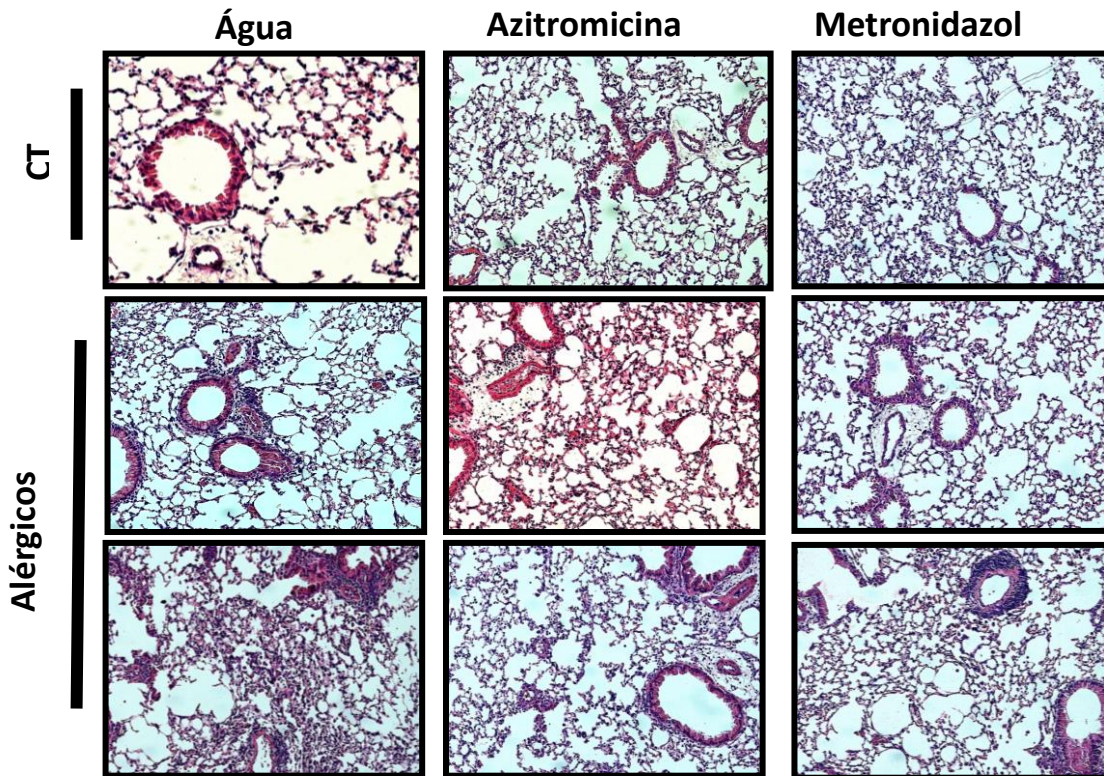
Os animais alérgicos tratados com azitromicina e metronidazol apresentaram um escore inflamatório das regiões peribronquial e perivascular menor quando comparados aos outros grupos alérgicos (Figura 25A e Figura 26) Não há diferença no infiltrado inflamatório entre os grupos amoxicilina e TMP/SMX (Figura 27). Surpreendentemente, todos os tratamentos com antimicrobianos apresentaram uma tendência na redução da produção de muco pelas células caliciformes, sendo o grupo azitromicina alérgico o único a apresentar essa redução de modo estatisticamente significativo (Figura 25B).



**Figura 25.** Efeitos dos antimicrobianos na inflamação pulmonar e deposição de muco. **A)** Os tratamentos com azitromicina e metronidazol reduziram o infiltrado inflamatório perivascular e peribronquial dos camundongos BALB/cAnNCrI atópicos após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina. n=5-6. Teste-t de student.  $p < 0.01$  (\*\*). **B)** Os tratamentos com todos os antimicrobianos reduziram as áreas marcadas com PAS em lâminas de tecido pulmonar de camundongos BALB/cAnNCrI atópicos após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina. n=6-7. Teste Mann-Whitney.  $p < 0.05$  (\*). Valores apresentados em média  $\pm$  SEM.



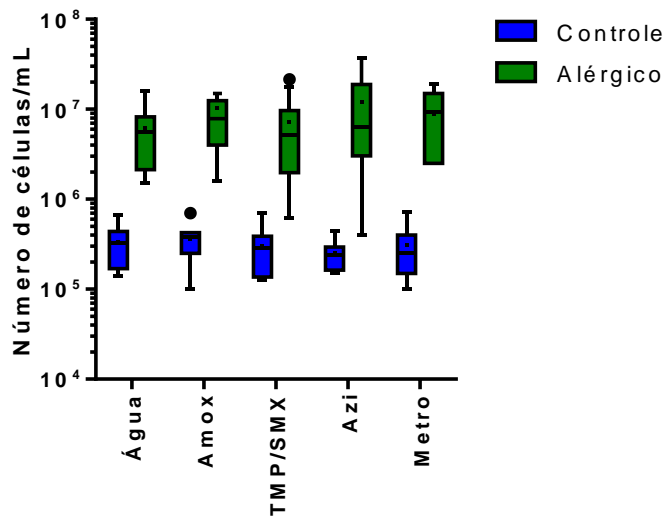
**Figura 26.** Imagens representativa dos cortes de hematoxilina e eosina de animais tratados com amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol e água asmáticos e não asmáticos. Lâminas observadas em objetiva de 20x.



**Figura 27.** Imagens representativa dos cortes de HE de animais tratados com azitromicina, metronidazol e água asmáticos e não asmáticos. Lâminas observadas em objetiva de 20x.

### 5.6 Os tratamentos com antimicrobianos não alteraram a celularidade do lavado broncoalveolar.

Observamos um aumento na celularidade dos animais asmáticos em relação aos seus controles não asmáticos, sinal característico de inflamação pulmonar. No entanto, não há diferenças significativas dos grupos asmáticos em diferentes tratamentos entre si (Figura 28).

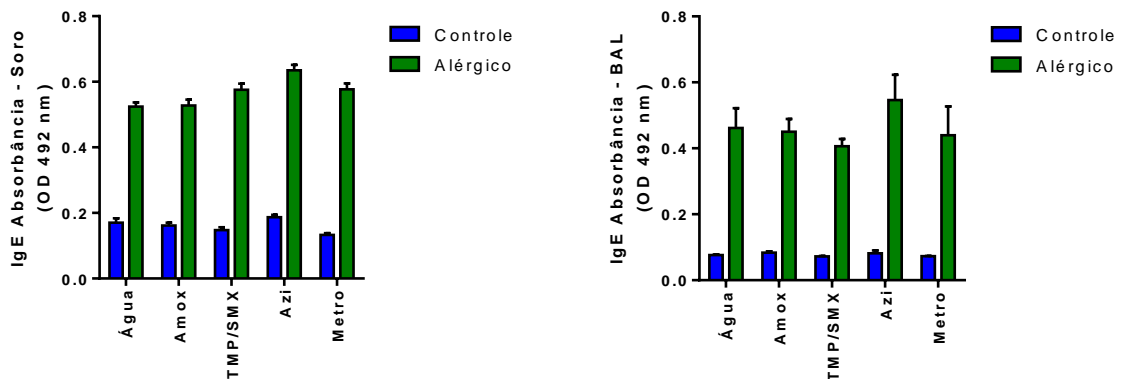


**Figura 28.** Celularidade por mL do lavado broncoalveolar (BAL) dos animais tratados com amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol atópicos e não atópicos após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina. n =7-10.

### 5.7. Os tratamentos com antimicrobianos não alteram a produção de IgE em animais asmáticos.

A IgE é a componente principal para a deflagração das alergias devido a ligação aos receptores para essa classe de imunoglobulinas em mastócitos e basófilos, promovendo degranulação. A atopia foi bem estabelecida em todos os grupos alérgicos, observada através da elevada produção de IgE anti-OVA. No entanto, não se observa diferença entre os níveis destes grupos em relação ao grupo que não foi tratado com nenhum antimicrobiano (Figura 29).

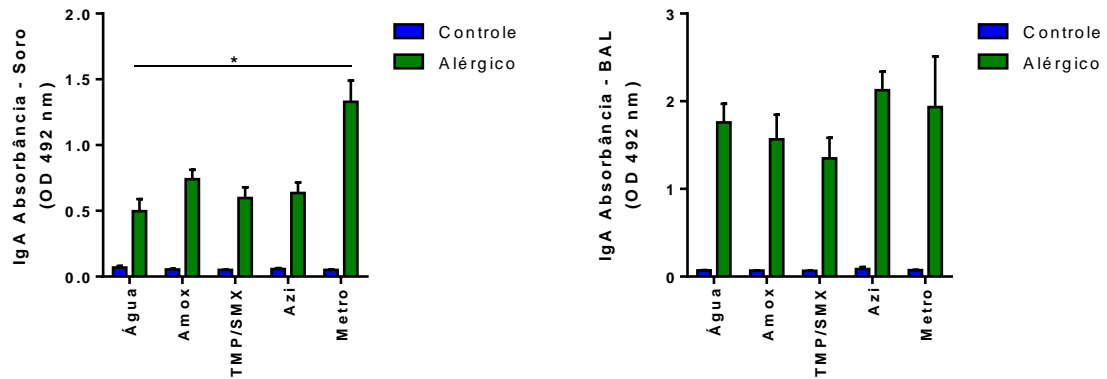




**Figura 29.** Níveis de IgE provenientes do soro e do lavado broncoalveolar (BAL) dos animais tratados com amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol atópicos e não atópicos após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina. n =7-10.

### 5.8 O tratamento com metronidazol foi capaz de elevar as concentrações séricas de IgA em animais asmáticos.

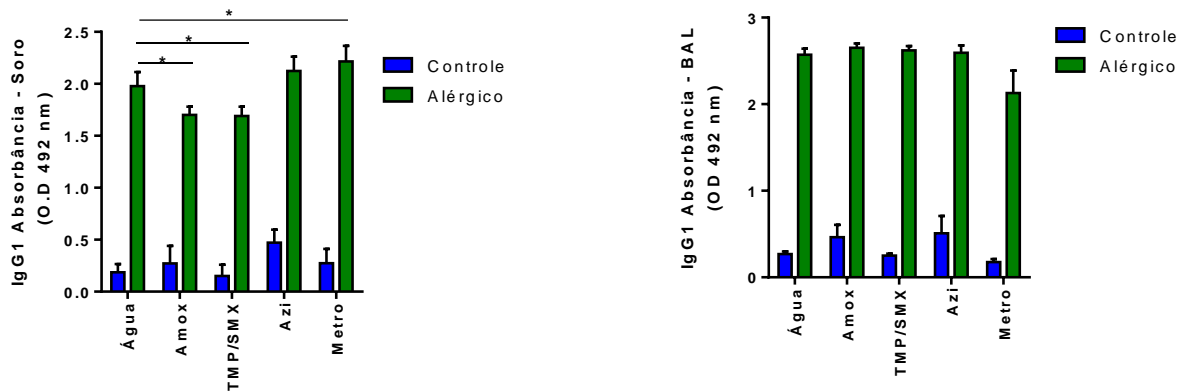
A IgA anti-OVA é capaz de competir com os epítomos do alérgeno com a IgE, desta forma, reduzindo a deflagração da doença alérgica. Os animais tratados com metronidazol apresentaram níveis mais elevados dessa imunoglobulina no soro quando comparado ao grupo controle. Sendo assim, uma razão para uma forma branda da doença nesses animais pode ser explicada pelos níveis de IgA. Essa diferença não foi encontrada no lavado broncoalveolar dos animais (Figura 30).



**Figura 30.** Níveis de IgA provenientes do soro e do lavado broncoalveolar (BAL) dos animais tratados com amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol atópicos e não atópicos após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina. n =7-10. Teste t-de student. \*p<(0.05)

### 5.9. Os tratamentos com amoxicilina e trimetoprima/sulfametoxazol reduziram os níveis de IgG1 sérica, enquanto o tratamento com metronidazol os elevou.

Como a IgA, a IgG1 anti-OVA pode competir com os epítomos do alérgeno, reduzindo a ligação pela IgE e reduzindo a doença alérgica. Nos animais com maior hiperratividade pulmonar e perda de volume alveolar (amoxicilina e trimetoprima/sulfametoxazol), os níveis dessa imunoglobulina estão reduzidos, trazendo como uma possível explicação para a piora da doença asmática nesses grupos. Por outro lado, o grupo tratado com metronidazol, que teve uma maior preservação dos parâmetros de mecânica pulmonar, apresentou níveis elevados em relação ao controle, ajudando a corroborar nossa hipótese do importante papel da IgG1 nesse processo fisiopatológico (Figura 31).

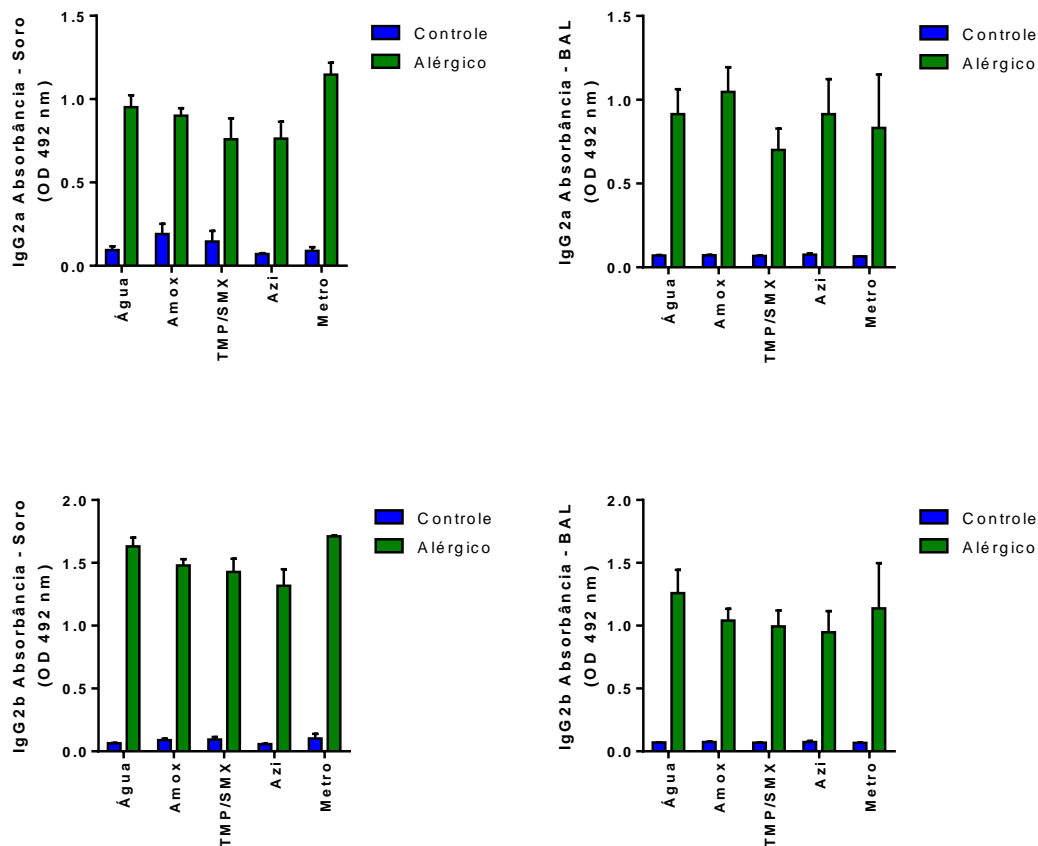


**Figura 31.** Níveis de IgG1 provenientes do soro e do lavado broncoalveolar (BAL) dos animais tratados com amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol atópicos e não atópicos após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina. n =7-10. Teste t-de student. \*p<(0.05)

#### 5.10. Os tratamentos com antimicrobianos não alteraram os níveis de IgG2a e IgG2b nos animais alérgicos.

Os níveis de IgG2a e IgG2b anti-OVA mantiveram-se elevados nos animais alérgicos sem quaisquer diferenças estatisticamente significantes entre eles. Esses isotipos de imunoglobulinas estão relacionados com atividade citotóxica dependente de anticorpos e ativação do sistema do complemento, mas também são capazes de competir pelo epítipo do alérgeno e diminuir a resposta inflamatória (Figura 32).

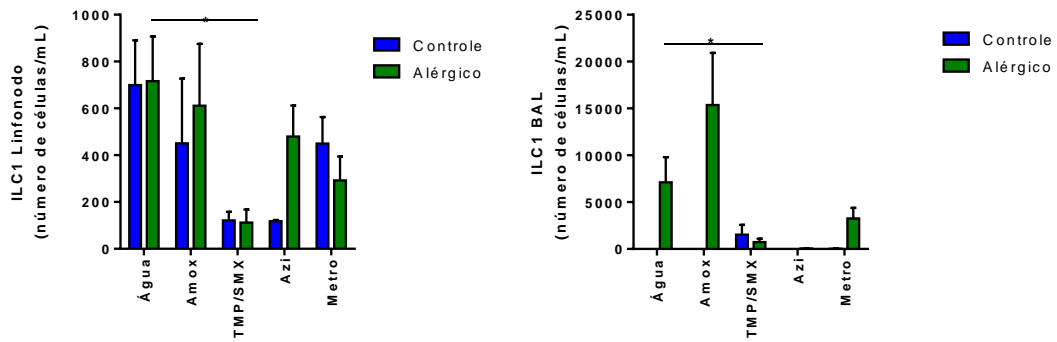




**Figura 32.** Níveis de IgG2a e IgG2b provenientes do soro e do lavado broncoalveolar (BAL) dos animais tratados com amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol atópicos e não atópicos após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina. n =7-10.

### 5.11 O tratamento com trimetoprima/sulfametoxazol reduziu os níveis de ILC1 nos linfonodos mediastinais e no lavado broncoalveolar dos animais alérgicos.

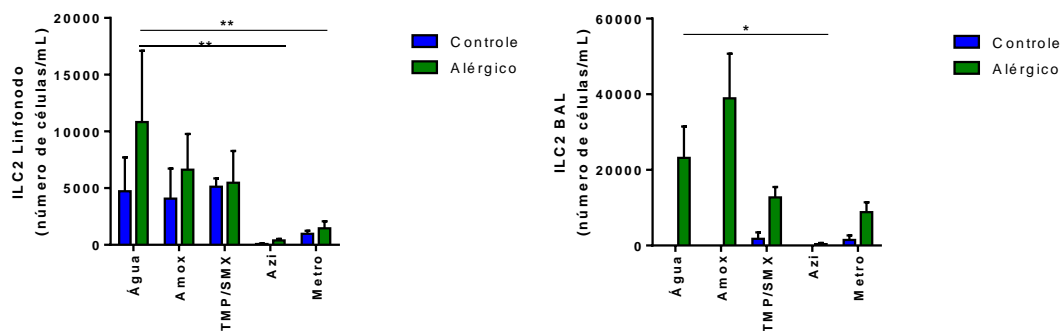
A ILC1 não é a célula linfóide inata mais abundante no tecido pulmonar, sendo elevada apenas infecções, principalmente de origens virais. Possui uma ação citotóxica e não está relacionada com doenças alérgicas. No entanto, o tratamento com trimetoprima/sulfametoxazol foi capaz de modular a presença desse tipo de célula tanto no linfonodo quanto no BAL (Figura 33). Nos outros grupos, não foram observadas diferenças significativas quando comparados ao grupo que recebeu água.



**Figura 33.** ILC1 (Lin-CD45+CD127+Tbet+) provenientes de linfonodos mediastinais e do BAL dos animais tratados com amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol atópicos e não atópicos após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina. n =3-5. Teste Mann-Whitney. \*p<0.05.

### 5.12 Os tratamentos com azitromicina e metronidazol reduzem a presença de ILC2 nos linfonodos mediastinais, sendo azitromicina também capaz de reduzi-las no lavado broncoalveolar.

As ILC2 são as células linfóides inatas mais presentes do parênquima pulmonar. Estas células produzem citocinas relacionadas a inflamação do tipo 2. Como não possuem receptor de células T ou B, ou seja, são inespecíficas, reagem a padrões de estímulos do ambiente bioquímico. Pacientes asmáticos apresentam níveis elevados dessas ILCs nos pulmões, e uma possível redução delas pode estar relacionada com um decorrer mais branda da doença (Li e Hendriks, 2013). Os tratamentos com azitromicina e metronidazol foram capazes de reduzir essas populações nos linfonodos e, no caso da azitromicina, também no BAL (Figura 34).

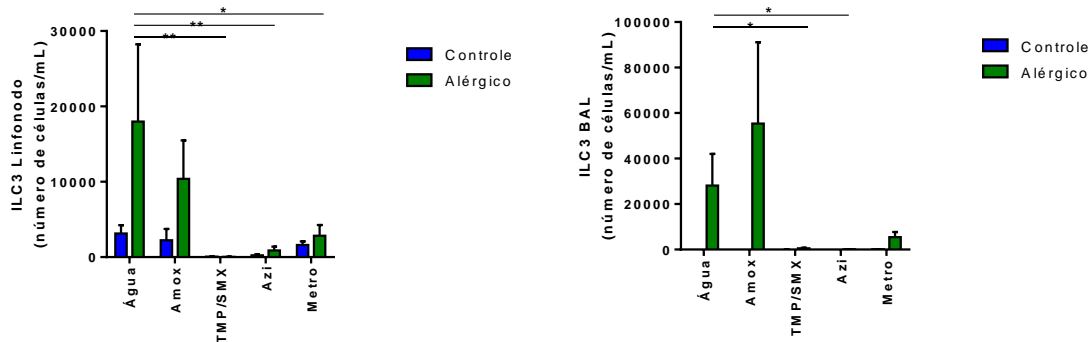


**Figura 34.** ILC2 (Lin-CD45+CD127+GATA3+) provenientes de linfonodos mediastinais e do BAL dos animais tratados com amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol atópicos e não atópicos após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina. n =3-5. Teste Mann-Whitney. \*p<0.05. \*\* p<0.01.

### 5.13. Os tratamentos com trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol reduzem os níveis de ILC3 nos linfonodos mediastinais, sendo as duas primeiras drogas também são capazes de reduzi-las no lavado broncoalveolar.

As ILC3 são células da imunidade inata presentes principalmente em sítios de mucosa, com atividade contra bactérias e fungos. Essas células são produtoras de IL-

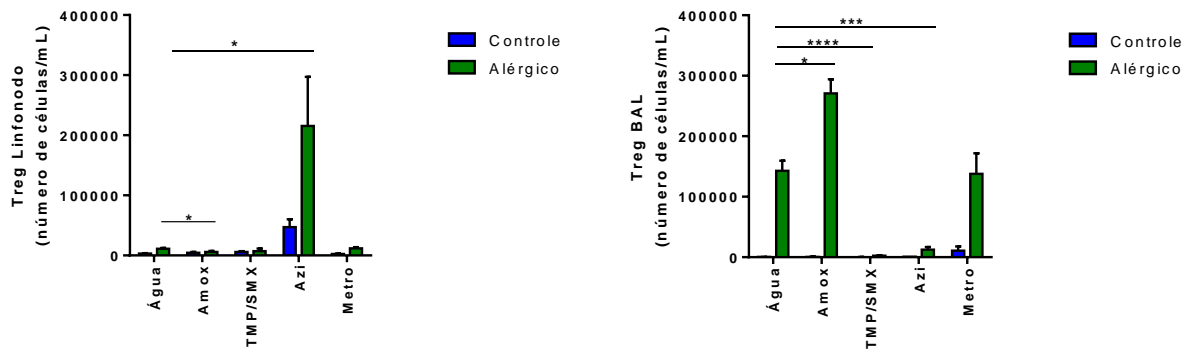
17 e estão relacionadas principalmente na fisiologia de asma neutrofílica. Trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol reduziram os níveis dessas células nos linfonodos mediastinais (Figura 35). Uma possibilidade para este fenômeno é a atividade antimicrobiana inerente dessas drogas, tornando uma resposta robusta celular antibacteriana desnecessária.



**Figura 35.** ILC3 (Lin-CD45+CD127+ROR $\gamma$ T+) provenientes de linfonodos mediastinais e do BAL dos animais tratados com amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol atópicos e não atópicos após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina. n =3-5. Teste Mann-Whitney. \*p<0.05. \*\* p<0.01.

#### 5.14. Os tratamentos com amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol e azitromicina são capazes de modular a presença de células T regulatórias em diferentes sítios.

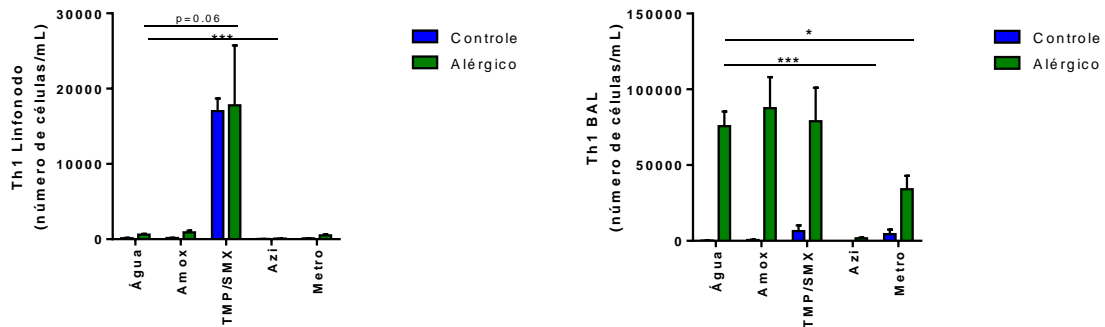
O tratamento com amoxicilina reduziu os níveis de Tregs nos linfonodos mediastinais, enquanto o tratamento com azitromicina os elevou. No caso do lavado broncoalveolar, o tratamento com amoxicilina elevou a presença dessas células. De forma contrária, os tratamentos com trimetoprima/sulfametoxazol e azitromicina reduziram a presença de Tregs no BAL (Figura 36).



**Figura 36.** Tregs (CD4+ FOXP3+) provenientes de linfonodos mediastinais e do BAL dos animais tratados com amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol atópicos e não atópicos após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina. n =3-5. Teste Mann-Whitney. \*p<0.05. \*\* p<0.01. \*\*\*p<0.001.

### 5.15. Os tratamentos com trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol são capazes de modular a presença de células Th1 em diferentes sítios.

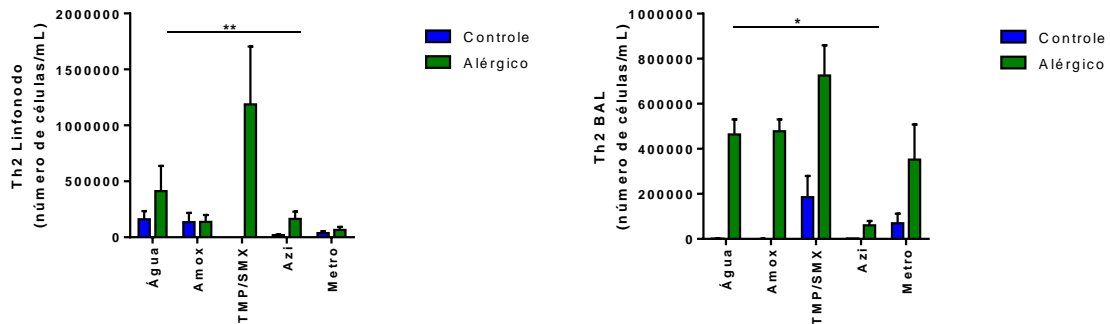
As células Th1 estão, da mesma forma como as ILC1, presentes nos pulmões frente à patógenos virais e/ou intracelulares. Não são conhecidas por exercer efeitos alérgicos, inclusive produzem citocinas que inibem a inflamação do tipo 2. O tratamento com azitromicina reduziu a presença de células Th1 nos linfonodos mediastinais, enquanto o tratamento com trimetoprim/sulfametoxazol apresentou uma tendência a elevação. Os tratamentos com azitromicina e metronidazol reduziram a presença dessas células no lavado broncoalveolar (Figura 37).



**Figura 37.** Células Th1 (CD4+ Tbet+) provenientes de linfonodos mediastinais e do BAL dos animais tratados com amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol atópicos e não atópicos após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina. n =3-5. Teste Mann-Whitney. \*p<0.05. \*\* p<0.01. \*\*\*p<0.001.

### 5.16 O tratamento com azitromicina reduz os níveis de células Th2 nos linfonodos mediastinais e no lavado broncoalveolar dos animais asmáticos.

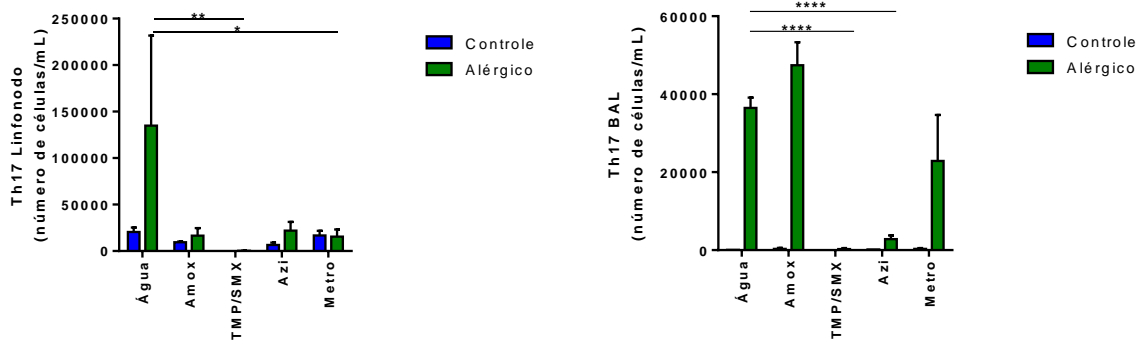
As células Th2 são peças-chave na orquestra das respostas alérgicas. São responsáveis pela síntese e liberação de citocinas características deste fenótipo como IL-4, IL-5 e IL-13, além de promoverem o recrutamento de eosinófilos ao sítio de inflamação. O tratamento com azitromicina foi capaz de reduzir a presença dessas células no lavado broncoalveolar em relação ao grupo alérgico tratado com água (Figura 38). Por outro lado, o tratamento com TMP/SMX aumentou o número de células Th2 tanto no linfonodo quanto no BAL (Figura 38).



**Figura 38.** Células Th2 (CD4+ GATA3+) provenientes de linfonodos mediastinais e do BAL dos animais tratados com amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol atópicos e não atópicos após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina. n =3-5. Teste Mann-Whitney. \*p<0.05. \*\* p<0.01.

### 5.17. Os tratamentos com trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol modulam a presença de células Th17 em diferentes sítios de animais alérgicos.

As células Th17, assim como as ILC3, são responsáveis por orquestrar uma resposta inflamatória contra bactérias e fungos, estando relacionadas com asmas de origem neutrofílica. Azitromicina e trimetoprima/sulfametoxazol foram capazes de reduzir a presença dessas células no BAL, enquanto metronidazol e TMP/SMX foram capazes de reduzi-la nos linfonodos mediastinais (Figura 39).

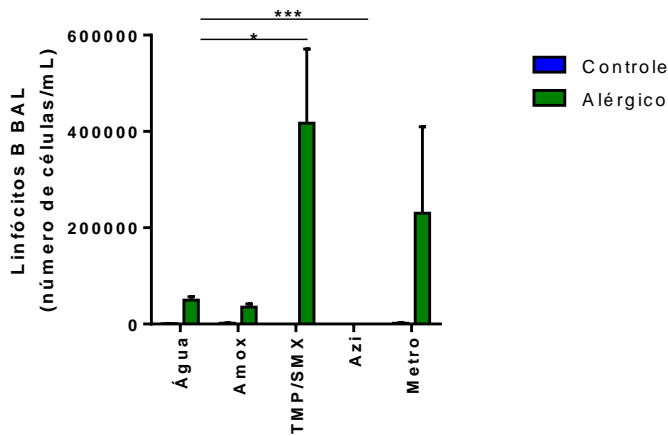


**Figura 39.** Células Th17 (CD4+RORgT+) provenientes de linfonodos mediastinais e do BAL dos animais tratados com amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol atópicos e não atópicos após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina. n=3-5. Teste Mann-Whitney. \*p<0.05. \*\* p<0.01. \*\*\*p<0.001. \*\*\*\*p<0.0001.

### 5.18 O tratamento com trimetoprima/sulfametoxazol eleva a presença de linfócitos B no BAL enquanto o tratamento com azitromicina a reduzem camundongos asmáticos.

Os linfócitos B são as células responsáveis pela produção das imunoglobulinas quando ativados e transformados em células plasmáticas. O tratamento com trimetoprim/sulfametoxazol foi capaz de elevar a presença desses linfócitos no lavado, sugerindo uma forte resposta humoral nos pulmões. Por outro lado, o tratamento com azitromicina reduziu esse infiltrado linfocitário, sugerindo um componente que ocasiona uma doença menos grave nos animais alérgicos tratados com azitromicina (Figura 40).



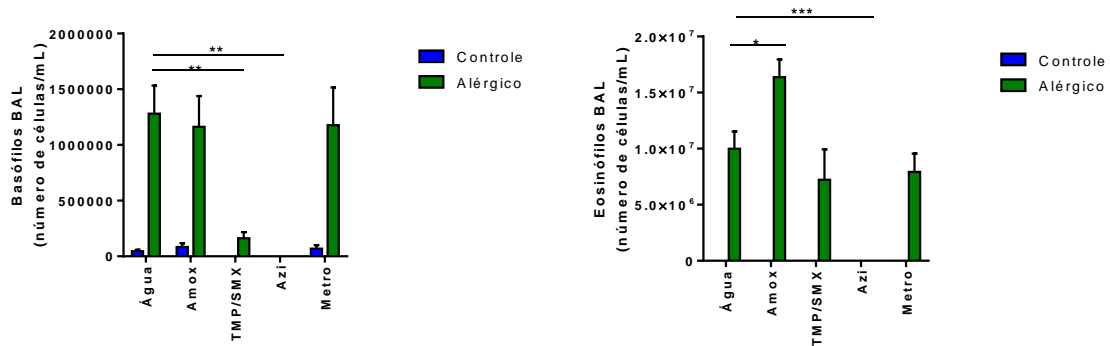


**Figura 40.** Linfócitos B (CD19+) provenientes do BAL dos animais tratados com amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol atópicos e não atópicos após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina. n=3-5. Teste Mann-Whitney. \*p<0.05. \*\* p<0.01.\*\*\*p<0.001.

### 5.19. Os tratamentos com amoxicilina, azitromicina e trimetoprima/sulfametoxazol modulam a presença de basófilos e eosinófilos no lavado broncoalveolar de camundongos asmáticos.

Os basófilos e os eosinófilos, são células do sistema imune inato responsáveis pela ativação e cronicidade das doenças alérgicas. Os basófilos possuem receptores FcεR1a de alta afinidade para IgE, podendo deflagrar uma resposta inflamatória pouco tempo após o contato com o alérgeno. Os eosinófilos, embora careçam desse receptor, são peças importantes nas alergias, pois são quimioatraídos para o sítio onde há o agente invasor e liberam proteínas que causam dano tecidual.

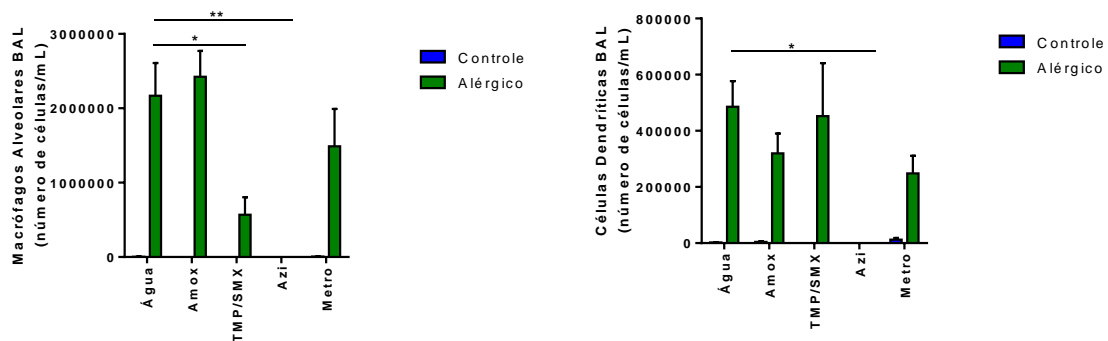
Os animais alérgicos tratados com trimetoprima/sulfametoxazol e azitromicina apresentam uma menor presença de basófilos no BAL quando comparados ao grupo controle. Os animais tratados com amoxicilina apresentam um maior nível de eosinófilos no lavado quando comparados ao controle, indicando uma severidade asmática maior, incluindo uma maior hipereatividade pulmonar (Figura 41).



**Figura 41.** Basófilos (CD49+FcεR1a+) e Eosinófilos (CD11b<sup>Int+</sup>, SIGLEC-F+, IAIE-) provenientes do BAL dos animais tratados com amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol atópicos e não atópicos após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina. n=3-5. Teste Mann-Whitney. \*p<0.05. \*\* p<0.01.\*\*\*p<0.001.

## 5.20. Os tratamentos com trimetoprima/sulfametoxazol e azitromicina modulam a presença de macrófagos alveolares e células dendríticas no lavado broncoalveolar de animais asmáticos.

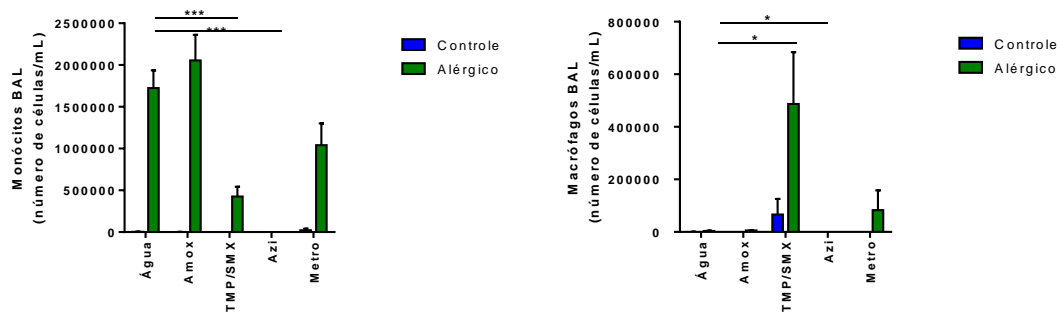
Os macrófagos alveolares compõem a celularidade normal dos pulmões, sendo a principal fonte imediata de defesa frente a agentes externos. Em estado normal, apresentam pouca atividade inflamatória intrínseca. Os tratamentos com trimetoprima/sulfametoxazol e azitromicina reduziram os níveis dessas células no lavado bronco alveolar. As células dendríticas, apresentadoras de antígeno profissionais, estão extremamente reduzidas no lavado broncoalveolar de animais asmáticos tratados com azitromicina (Figura 42).



**Figura 42.** Macrófagos Alveolares (CD11b<sup>High+</sup>, SIGLEC-F<sup>+</sup>, LY6G<sup>-</sup>, LY6C<sup>-</sup>) e Células Dendríticas (CD11c<sup>+</sup>, LY6G<sup>-</sup>, LY6C<sup>+</sup>, IAIE<sup>High+</sup>) provenientes do BAL dos animais tratados com amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol atópicos e não atópicos após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina. n=3-5. Teste Mann-Whitney. \*p<0.05. \*\* p<0.01. \*\*\*p<0.001..

### 5.21. Os tratamentos com trimetoprima/sulfametoxazol e azitromicina modulam a presença de monócitos e macrófagos no BAL de animais asmáticos.

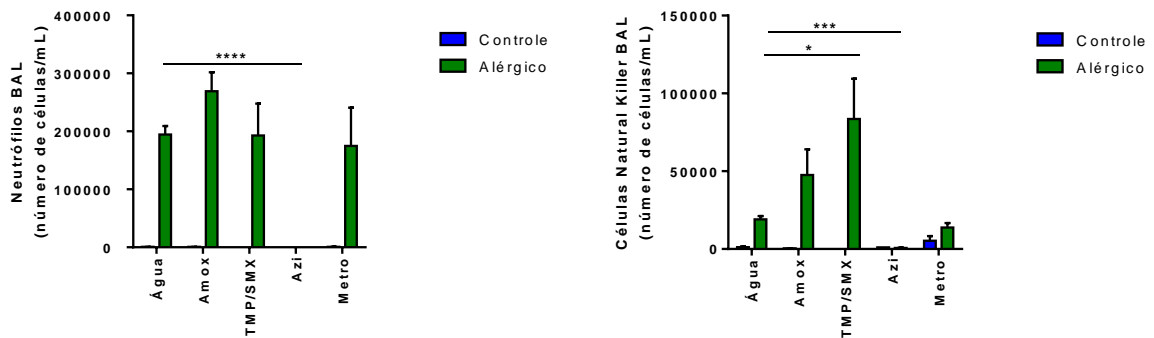
Os animais alérgicos tratados com trimetoprima/sulfametoxazol apresentaram um número reduzido de monócitos no BAL quando comparados animais alérgicos tratados com água (Figura 43). No entanto, esses mesmos animais apresentaram níveis elevados de macrófagos inflamatórios no lavado. Fato que pode contribuir para maiores danos teciduais e um prognóstico ruim da asma alérgica. O grupo alérgico tratado com azitromicina, no entanto, apresentou valores reduzidos de monócitos no BAL quando comparado com grupo alérgico tratado com água, demonstrando o efeito terapêutico desse macrolídeo na doença asmática (Figura 43).



**Figura 43.** Monócitos (CD11b<sup>+</sup>,LY6G<sup>-</sup>,LY6C<sup>+</sup>) e Macrófagos (CD11b<sup>High</sup>+,SIGLEC-F<sup>-</sup>,LY6G<sup>-</sup>,LY6C<sup>-</sup>) provenientes do BAL dos animais tratados com amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol atópicos e não atópicos após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina. n=3-5. Teste Mann-Whitney. \*p<0.05. \*\* p<0.01. \*\*\*p<0.001..

## 5.22. Os tratamentos com azitromicina e trimetoprima/sulfametoxazol modulam a presença de neutrófilos e células NK no lavado broncoalveolar de animais alérgicos.

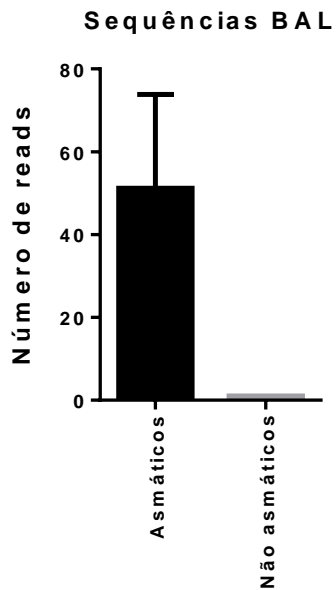
Neutrófilos, membros da imunidade inata, geralmente estão elevados em asma não atópica e pouco responsivas a tratamento com corticosteróides. As células NK estão relacionadas com defesa anti-tumoral e anti-viral e não normalmente com alergias. O tratamento com azitromicina reduziu o número de neutrófilos e células NK no lavado broncoalveolar quando comparados ao grupo água-alérgico. Interessantemente, o tratamento com trimetoprima/sulfametoxazol elevou a presença de células NK no BAL dos animais alérgicos (Figura 44).



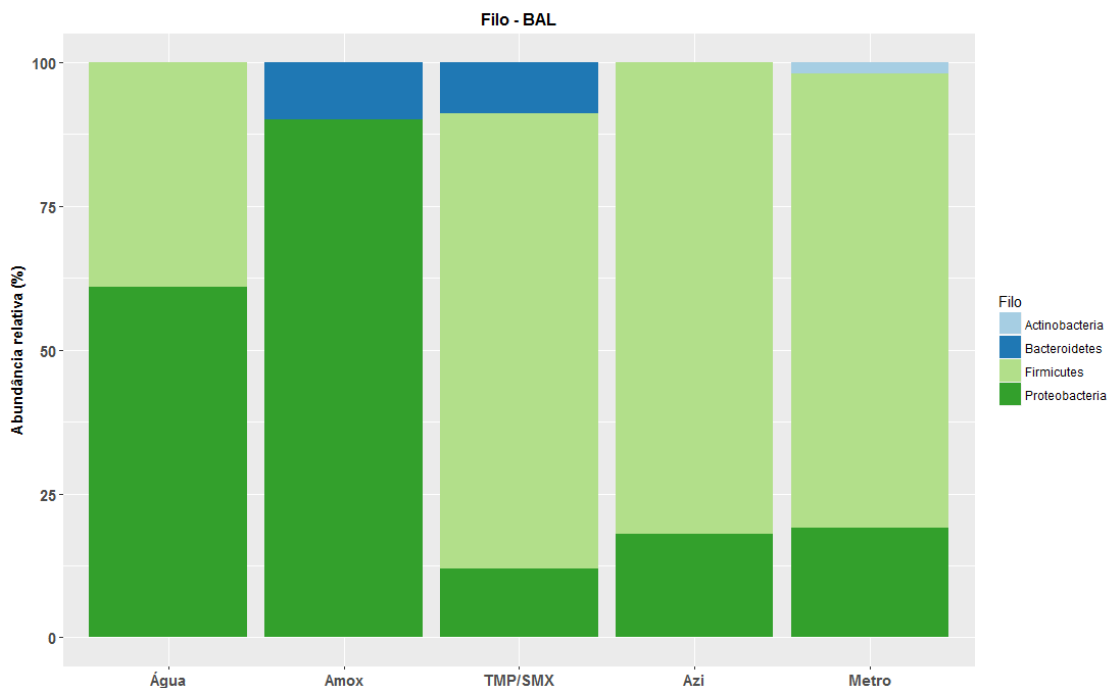
**Figura 44.** Neutrófilos (CD11b<sup>High</sup>+LY6G<sup>High</sup>) e Células NK (CD49+FcεR1a-) provenientes do BAL dos animais tratados com amoxicilina, trimetoprima/sulfametoxazol, azitromicina e metronidazol atópicos e não atópicos após indução de asma por 4 dias alternados através de nebulização com ovalbumina. n=3-5. Teste Mann-Whitney. \*p<0.05. \*\* p<0.01. \*\*\*p<0.001.

### 5.23 O caráter asmático é determinante para a presença da microbiota no trato respiratório inferior e a natureza desta microbiota é modulada pelo espectro de ação de cada antimicrobiano.

O sequenciamento da microbiota do BAL revelou que a presença de sequências amplificadas do gene RNAr 16s nos animais depende do caráter asmático e não do regime de tratamento (Figura 45). Os animais não asmáticos apresentaram apenas uma sequência cada, sendo as mesmas não identificáveis. Os animais asmáticos apresentaram uma microbiota predominada pelos filos *Proteobacteria* e *Firmicutes*, sendo o grupo tratado com metronidazol apresentou o filo *Actinobacteria* e os grupos amoxicilina e trimetoprima/sulfametoxazol apresentou o filo *Bacteroidetes* (Figura 46).



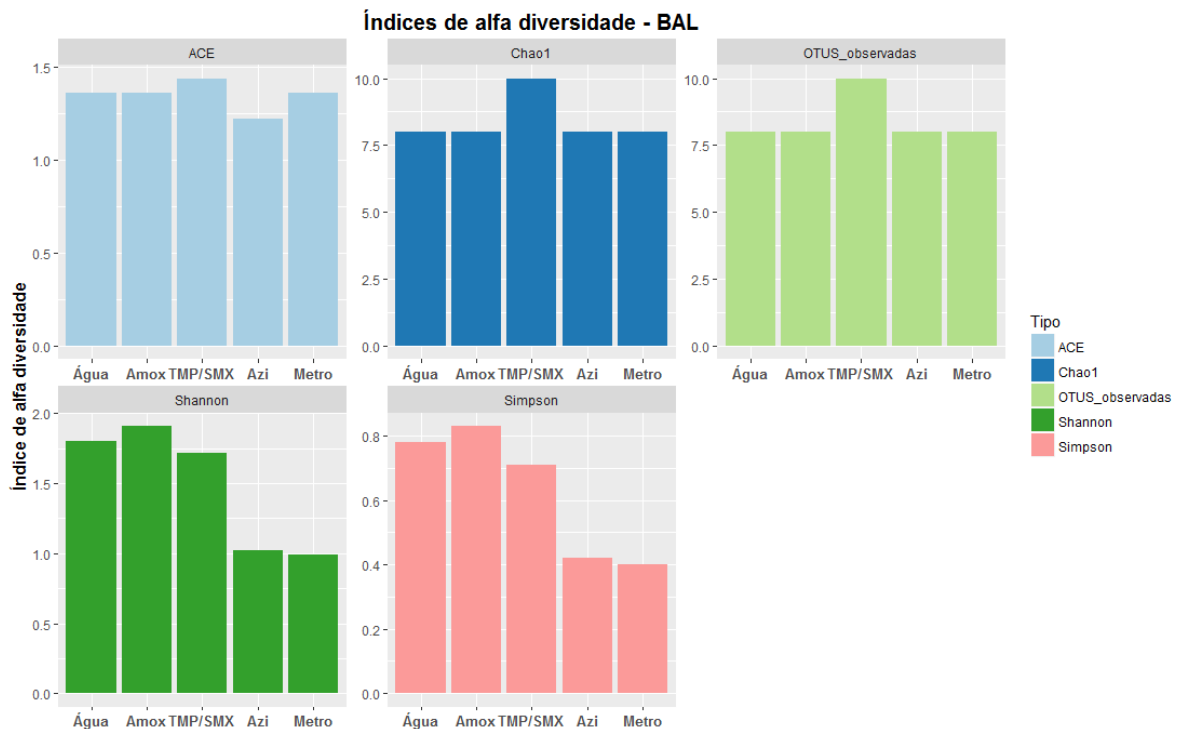
**Figura 45.** Números de *reads* no lavado broncoalveolar. Animais BALB/c foram sensibilizados e desafiados conforme descrito em métodos. Um dia após o último desafio, os animais foram eutanaziados e o BAL recolhido para extração de DNA e sequenciamento do gene RNAr 16S. n=3-5



**Figura 46.** Comunidade bacteriana do trato respiratório inferior. Animais BALB/c foram sensibilizados e desafiados conforme descrito em métodos. Um dia após o último desafio, os animais foram eutanaziados e o BAL recolhido para extração de DNA e sequenciamento de 16S. Caracterização de filós taxonômicos da microbiota dos animais alérgicos em cada regime de tratamento (pool de 5 animais/grupo).

Em relação à alfa diversidade, componente que inclui riqueza e diversidade, observamos um aumento na riqueza no BAL do grupo tratado com trimetoprima/sulfametoxazol em relação aos outros grupos, incluindo OTUs observadas e Chao1. No entanto, o parâmetro ACE (*abundance-based coverage estimator*) demonstra uma perda de riqueza do grupo tratado com azitromicina em relação aos demais grupos.

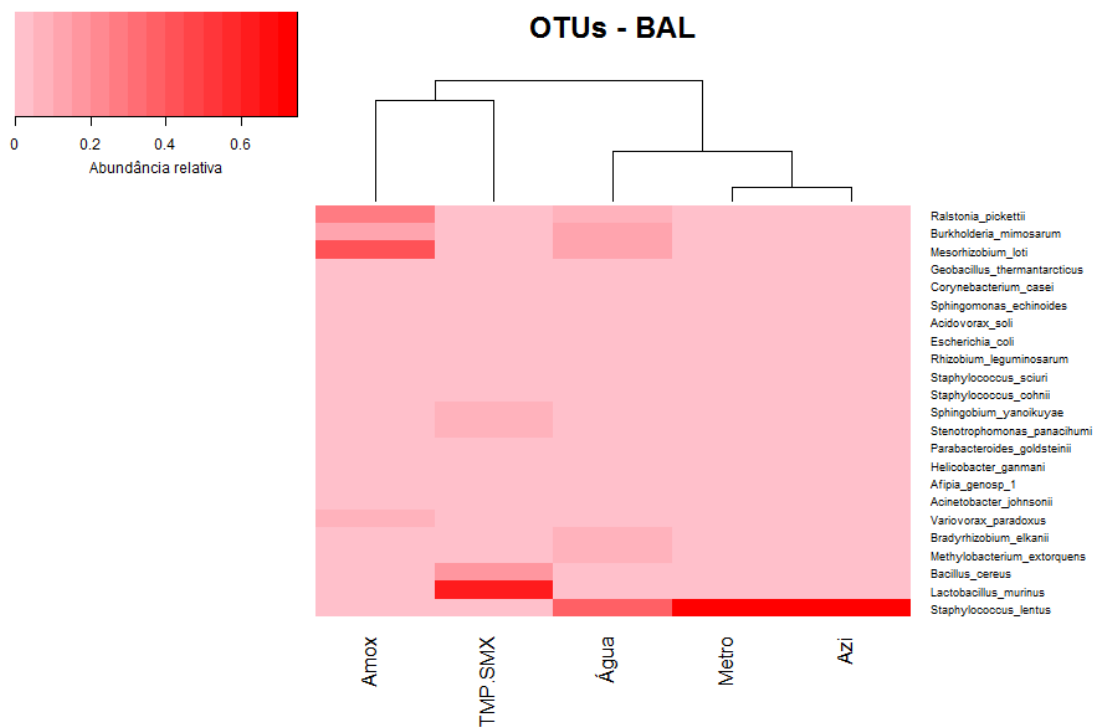
A diversidade bacteriana no BAL, determinada pelos índices de Shannon e Simpson, demonstra um maior índice do grupo amoxicilina em relação ao controle. Em contrapartida, os grupos azitromicina e metronidazol apresentaram um menor índice de diversidade quando comparados ao controle (Figura 47).



**Figura 47.** Alfa diversidade das amostras de BAL provenientes de animais asmáticos sob diferentes regimes de antibióticos (*pool* 5 animais/grupo).

## 5.24 O tratamento com antibióticos foi capaz de alterar a composição da microbiota do trato respiratório inferior em níveis de OTUs.

Os regimes de antibioticoterapia alteraram a composição de espécies da microbiota do BAL. O grupo tratado com amoxicilina apresentou uma maior abundância relativa das bactérias *Mesorhizobium ioti* e *Ralstonia picketti* em relação ao controle e o grupo tratado com TMP/SMX, uma maior abundância das espécies *Bacillus cereus* e *Lactobacillus murinus* em relação ao controle. Os grupos tratados com metronidazol e azitromicina apresentaram uma abundância relativa elevada para a espécie *Staphylococcus lentus* (Figura 48).



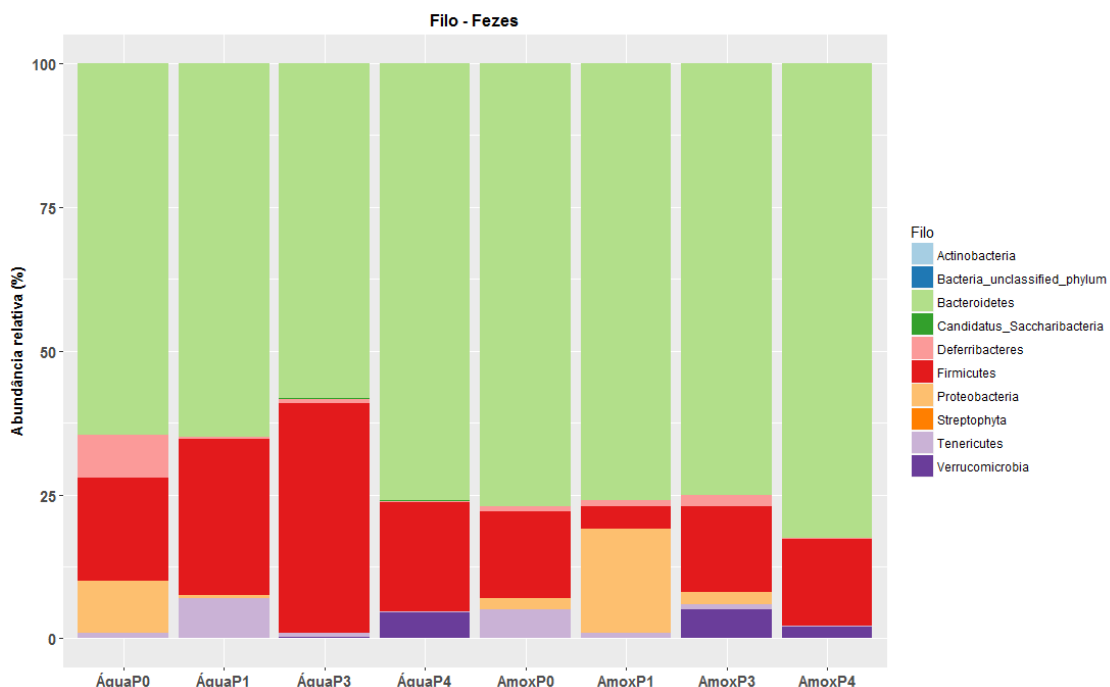
**Figura 48.** Abundância relativa das OTUs provenientes de lavado broncoalveolar de animais asmáticos sob diferentes regimes de antibióticos (*pool*/ 5 animais/grupo).



## 5.25. Os antimicrobianos foram capazes de alterar a composição da microbiota intestinal em diferentes pontos de tratamento.

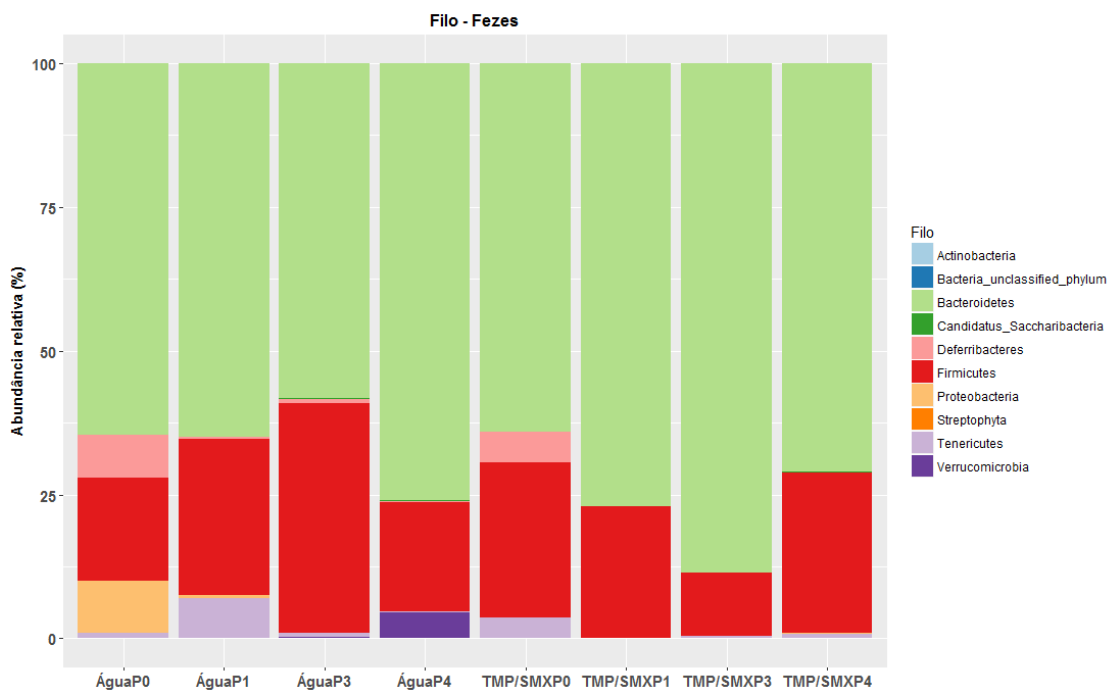
As fezes dos camundongos foram coletadas em 4 pontos para avaliar o comportamento da microbiota: antes do início do tratamento (ponto 0), após o término do primeiro ciclo (ponto 1), após o término do terceiro ciclo (ponto 3) e após 7 dias do fim do terceiro ciclo (ponto 4).

O tratamento com amoxicilina alterou a abundância de *Firmicutes* e *Tenericutes* quando comparado ao controle no Ponto 1. Em relação ao Ponto 3, o tratamento com amoxicilina manteve uma abundância maior dos filos *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* e *Deferribacteres*, enquanto o grupo controle apresentou majoritariamente apenas *Firmicutes* e *Bacteroidetes*. O ponto 4, correspondente a pós-recuperação apresentou-se o mesmo para os dois grupos (Figura 49).



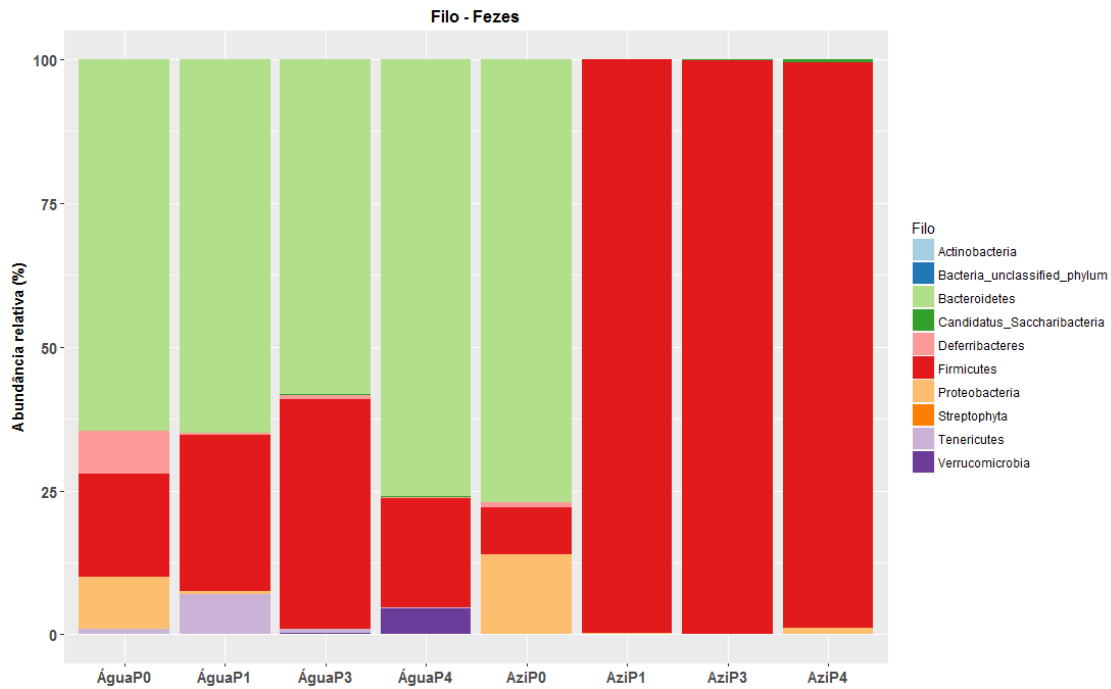
**Figura 49.** Abundância relativa dos filos provenientes de fezes de animais asmáticos sob tratamento de amoxicilina e não tratados (*pool* 5 animais/grupo).

O tratamento com trimetoprima/sulfametoxazol eliminou a presença do filo *Tenericutes* no ponto 1 e no ponto 3 quando comparado ao grupo controle. No ponto 3 houve ainda uma redução significativa na abundância do filo *Firmicutes* quando comparado ao grupo controle no mesmo ponto. Após o período de recuperação (Ponto 4), o grupo tratado com trimetoprima/sulfametoxazol não apresentou crescimento do filo *Verrucomicrobia* quando comparado ao controle (Figura 50).



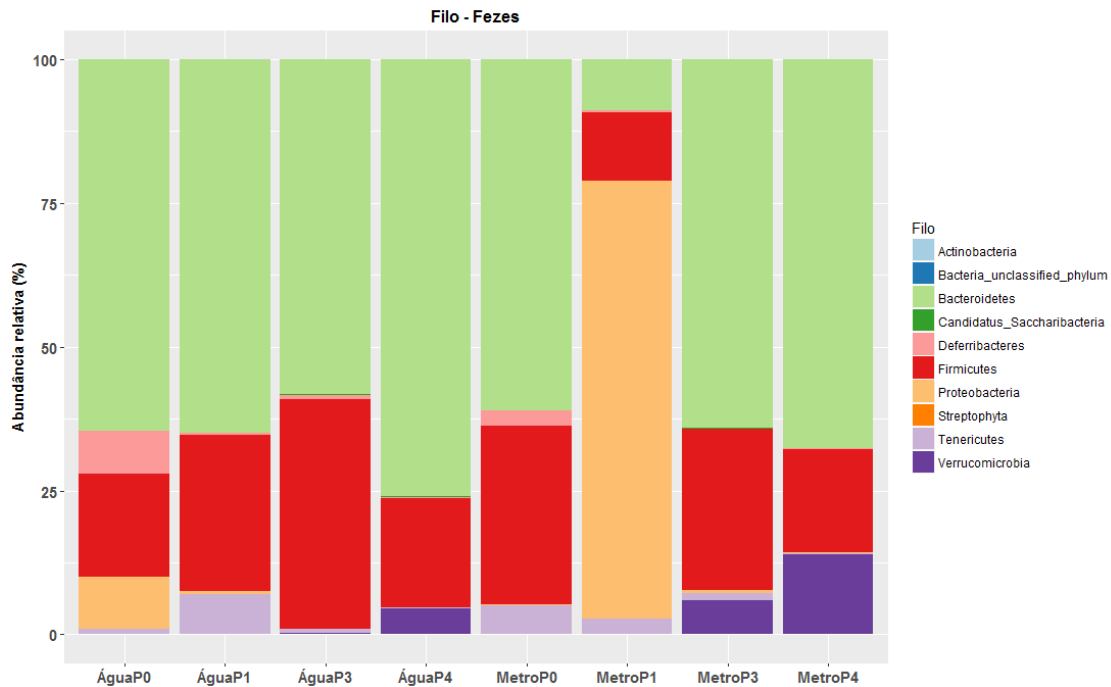
**Figura 50.** Abundância relativa dos filos provenientes de fezes de animais asmáticos sob tratamento de Trimetoprima/sulfametoxazol e não tratados (*pool* 5 animais/grupo).

O tratamento com azitromicina proporcionou uma alteração drástica da microbiota em todos os pontos de tratamento em relação ao grupo controle, com uma abundância do filo *Firmicutes* e eliminação do filo *Bacteroidetes*. Esta alteração foi mantida mesmo após o período de recuperação (ponto 4), com ligeiro crescimento dos filos de *Proteobacteria* e *Candidatus Saccharibacteria* (Figura 51).



**Figura 51.** Abundância relativa dos filos provenientes de fezes de animais asmáticos sob tratamento de azitromicina e não tratados (*pool*/5 animais/grupo).

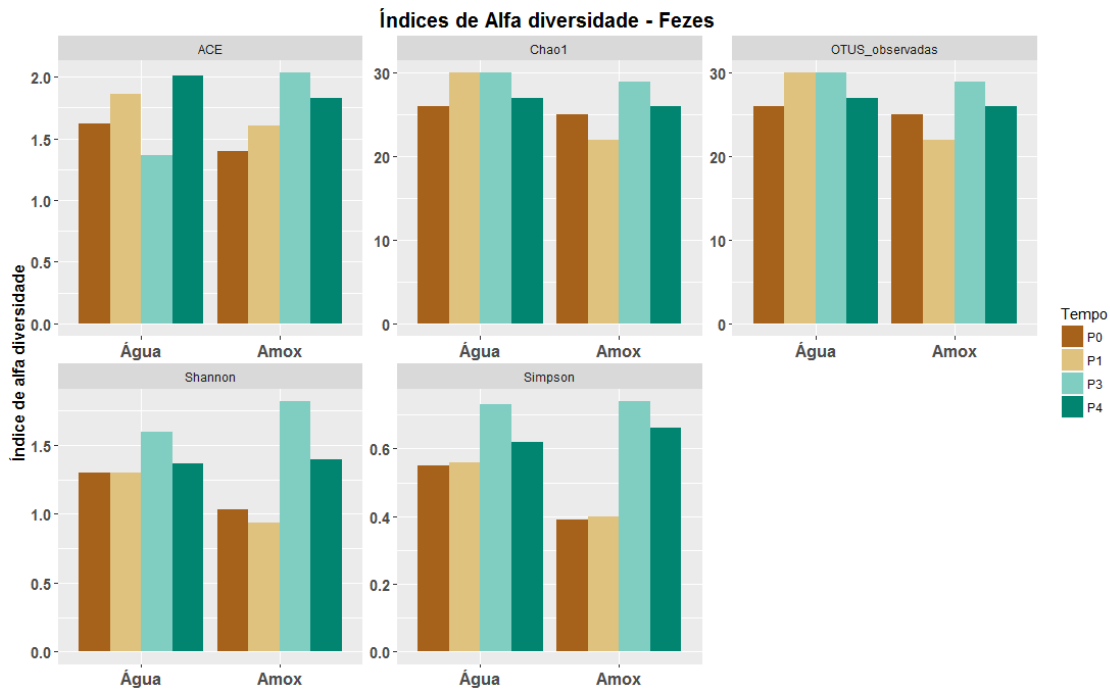
O tratamento com metronidazol alterou drasticamente a microbiota fecal no ponto 1 em relação ao controle, com uma maior abundância do filo *Proteobacteria* em relação ao grupo controle no mesmo ponto. No ponto 3, o grupo tratado apresentou uma maior abundância do filo *Verrocomicrobia* e *Tenericutes* quando comparado ao controle. Após o período de recuperação (ponto 4), a abundância do filo *Verrucomicrobia* ficou levemente aumentado quando comparado ao mesmo ponto do grupo controle (Figura 52).



**Figura 52.** Abundância relativa dos filos provenientes de fezes de animais asmáticos sob tratamento de metronidazol e não tratados (*pool* 5 animais/grupo).

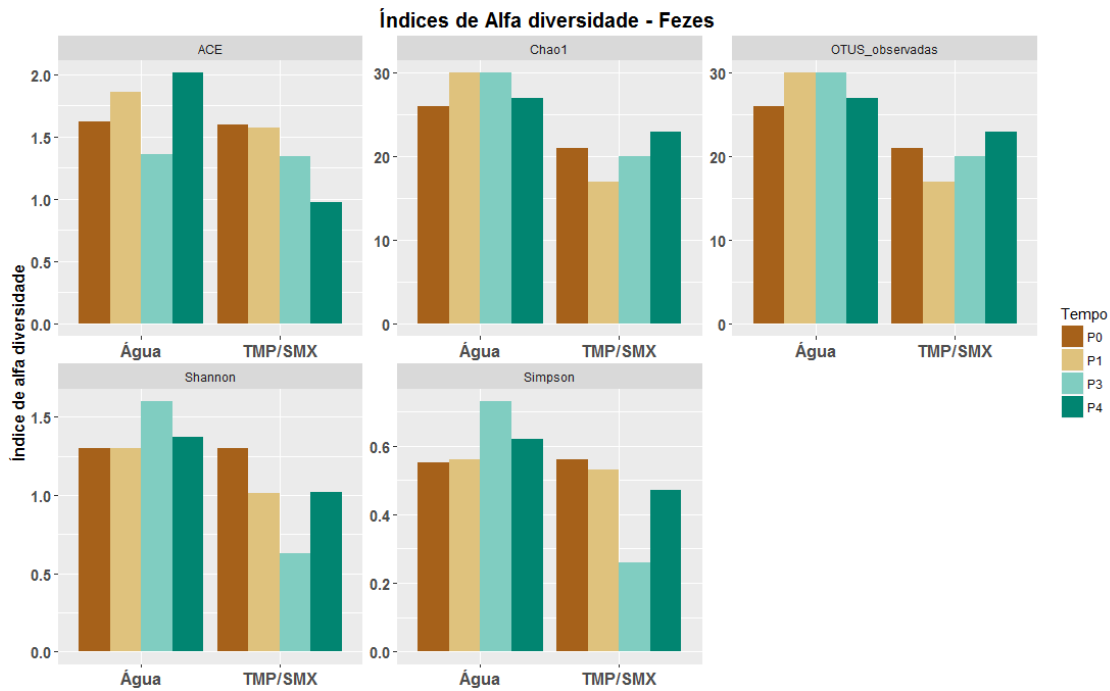
### 5.26. Alfa diversidade da microbiota das fezes dos animais tratados e não tratados com antibióticos.

O tratamento com amoxicilina foi capaz de reduzir a riqueza bacteriana do ponto 1 quando comparado ao controle pela análise do parâmetro ACE, fato que não se repetiu nos outros pontos avaliados. Os parâmetros Chao1 e OTUs observadas demonstram a mesma tendência. Os índices de Shannon e Simpson para diversidade apontam para uma redução no ponto 1 e uma ligeira elevação no ponto 3 quando comparados ao grupo controle (Figura 53).



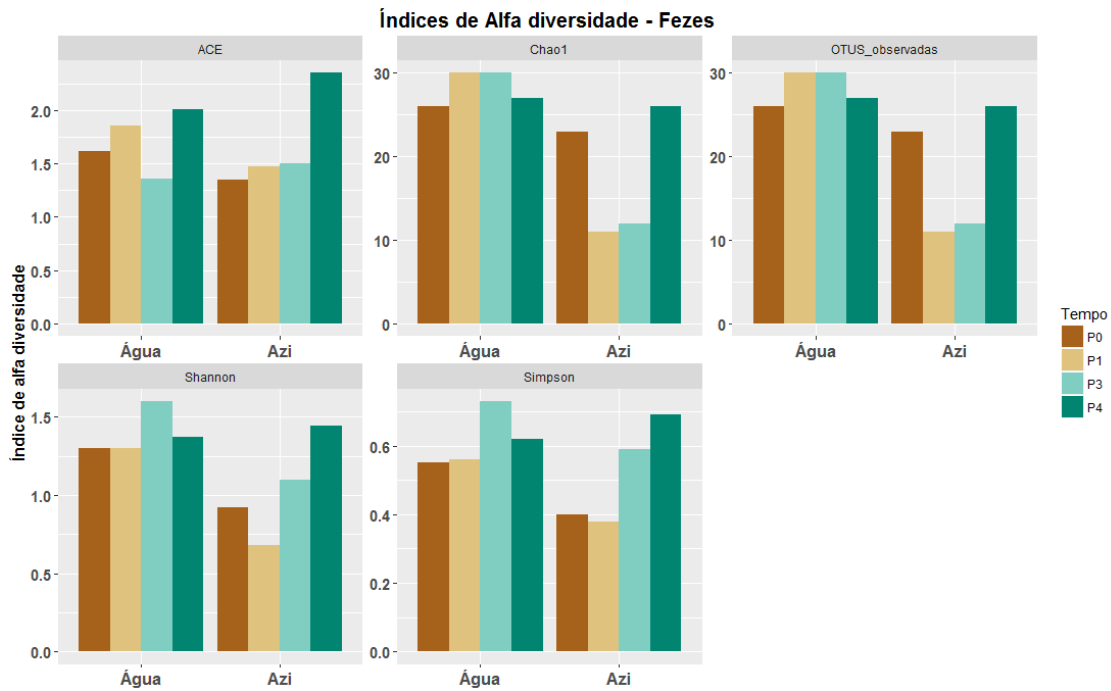
**Figura 53.** Alfa diversidade das amostras de fezes provenientes de animais asmáticos sob tratamento com amoxicilina (*pool* 5 animais/grupo).

O tratamento com trimetoprima/sulfametoxazol reduziu os índices de riqueza em todos os pontos quando comparados ao grupo controle. A riqueza determinada por ACE apresentou um caráter decrescente em relação aos pontos analisados, já Chao1 e OTUs observadas, nota-se uma ligeira recuperação neste atributo em relação ao controle. Analisando os índices de Shannon e Simpson, nota-se uma redução profunda na diversidade bacteriana nos pontos 1, 3 e 4 em relação controle (Figura 54).



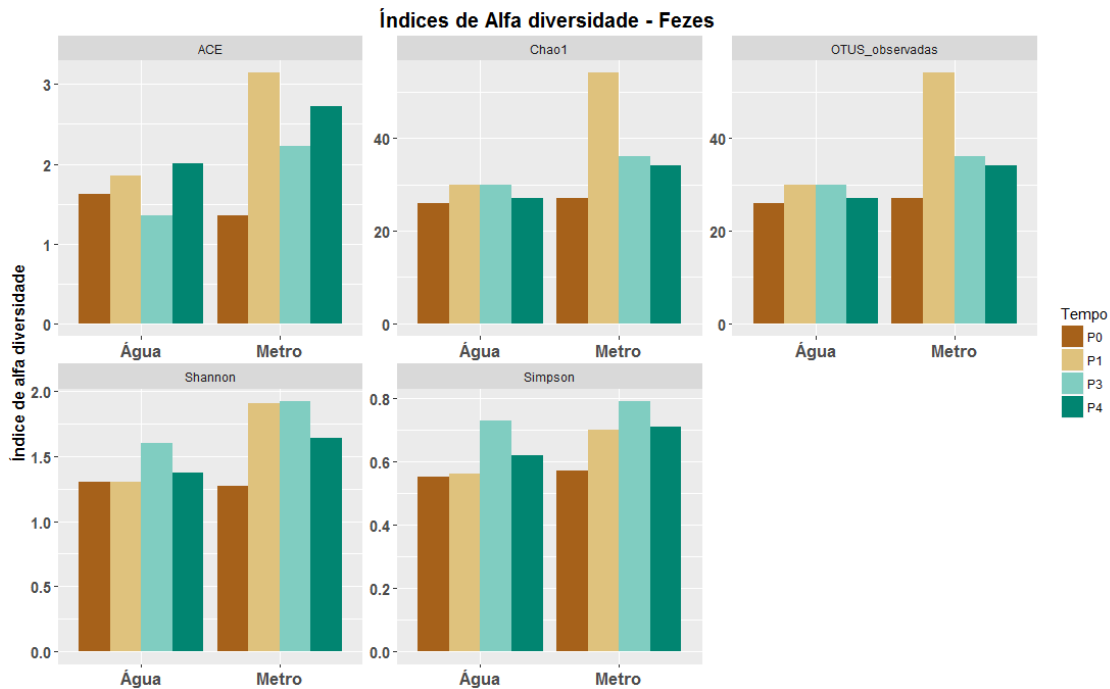
**Figura 54.** Alfa diversidade das amostras de fezes provenientes de animais asmáticos sob tratamento com trimetoprima/sulfametoxazol (*pool* 5 animais/grupo).

O tratamento com azitromicina reduziu a riqueza nos pontos 1 e 3 de tratamento em relação ao controle, tendo o grupo apresentando aumento nos índices de Chao1 e OTUs observadas. No entanto, apresentam valores maiores do que o grupo controle no parâmetro ACE. Em relação aos índices de diversidade (Simpson e Shannon), o tratamento com azitromicina foi capaz de reduzi-los nos pontos 1 e 3, ocorrendo uma elevação após o período de recuperação (ponto 4) quando comparado ao grupo controle (Figura 55).



**Figura 55.** Alfa diversidade das amostras de fezes provenientes de animais asmáticos sob tratamento com azitromicina (*pool* 5 animais/grupo).

O tratamento com metronidazol foi capaz de alterar todos os parâmetros de alfa diversidade em relação ao controle. A microbiota proveniente do grupo tratado com azitromicina elevou a diversidade e a riqueza (ACE, Chao1, OTUs, Shannon e Simpson) em todos os pontos analisados em relação ao grupo controle (Figura 56).



**Figura 56.** Alfa diversidade das amostras de fezes provenientes de animais asmáticos sob tratamento com metronidazol (*pool* 5 animais/grupo).

### 5.27. Os tratamentos com antibióticos foram capazes de alterar a composição da microbiota das fezes em níveis de OTUs.

O tratamento com amoxicilina reduziu ligeiramente a abundância relativa de *Parabacteroides goldsteinii* no ponto 1 quando comparado ao grupo controle. No entanto, o padrão de OTUs manteve-se semelhante em todos os outros pontos (Figura 57).

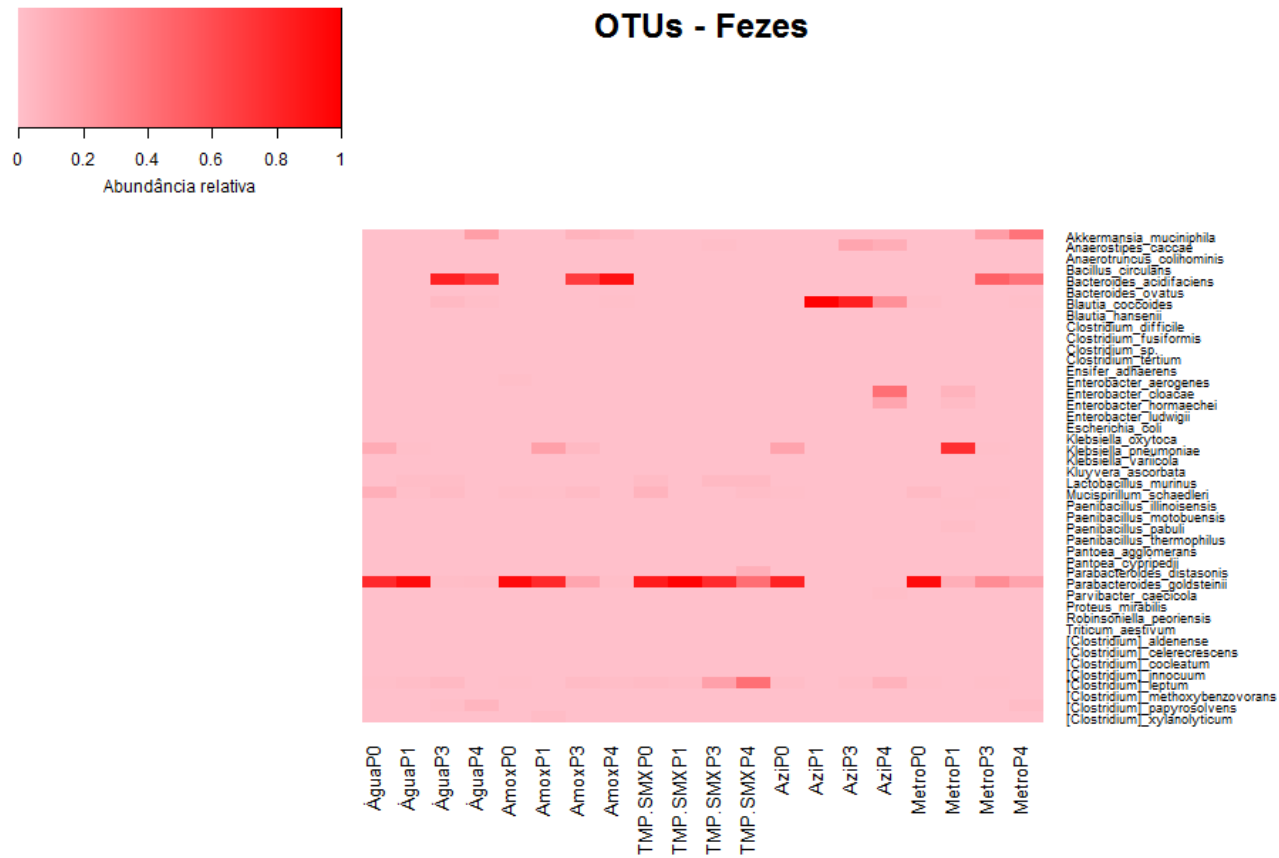
O tratamento com metronidazol aumentou a abundância relativa de *Klebsiella pneumoniae* no ponto 1 de tratamento. A abundância de *Parabacteroides goldsteinii* foi reduzida nos pontos 1 e 3, sendo a abundância de *Bacteroides acidifaciens* reduzida nos pontos 3 e 4. Por fim, a abundância relativa de *Akkermansia municipihila* foi elevada nos pontos 3 e 4 quando comparada ao grupo controle (Figura 57).

O tratamento com azitromicina reduziu a abundância relativa de *Parabacteroides goldsteinii* no ponto 1 e de *Bacteroides acidifaciens* nos pontos 3 e



4. O regime de azitromicina elevou a presença de *Blautia coccooides* nos pontos 1, 3 e 4. No entanto, *Enterobacter cloacae* foi elevada no ponto 4 quando comparada ao controle (Figura 57).

O tratamento com trimetoprima/sulfametoxazol reduziu a abundância relativa de *Bacteroides acidifaciens* nos pontos 3 e 4. Podemos observar que o tratamento impediu a maturação da microbiota quanto a abundância de *Parabacteroides goldsteinii*: inicialmente elevada em todos os grupos, sendo reduzida com o passar das - como observado no grupo controle. No entanto, o grupo tratado com trimetoprima/sulfametoxazol manteve uma abundância relativa desta espécie durante todos os pontos analisados. Paralelamente, a espécie *Clostridium leptum* foi elevada no ponto 4 quando comparada ao controle (Figura 57).



**Figura 57.** Abundância relativa das OTUs provenientes das fezes de animais asmáticos sob diferentes regimes de antibióticos (*pool* 5 animais/grupo).

## 6. DISCUSSÃO.

A asma é uma doença que reduz a qualidade e expectativa de vida dos pacientes (Jia, Zack e Thompson, 2013) O impacto financeiro nas famílias principalmente as mais pobre também é elevado, principalmente nos casos de asma grave (Franco *et al.*, 2009). A industrialização e desenvolvimento dos países está relacionada com melhorias no saneamento básico e ao maior acesso a medicamentos – incluindo antibióticos - pela população. No entanto, é observada uma maior incidência de doenças alérgicas atrelada a esse desenvolvimento (Okada, H *et al.*, 2010).

A hipótese da higiene cunhada por Strachan (1989) postula que uma maior exposição a micro-organismos está relacionada a um perfil menos propenso à alergias. O uso frequente de antibióticos, principalmente na infância, é capaz de reduzir a diversidade microbiológica nos indivíduos e, conseqüentemente, promover um desenvolvimento não saudável do sistema imunológico (Zeissig e Blumberg, 2014). A avaliação do impacto desses medicamentos nas doenças auto-imunes é estudado por vários grupos de pesquisa no mundo (Huffnagle, 2010; Livanos *et al.*, 2016; Marsland e Salami, 2015).

Em relação a asma alérgica, os resultados encontrados na literatura são conflitantes sobre o efeito da administração de antimicrobianos na infância e sua associação no surgimento de asma (Wjst *et al.*, 2001; Kozyrskyj *et al.*, 2007; Foliaki *et al.*, 2009; Ahn *et al.*; 2005; Risnes *et al.* 2011, Kusel *et al.*, 2008; Örtqvist *et al.*, 2015; Rantala, Jaakkola e Jaakkola, 2013). O fato de que os pacientes asmáticos serem mais propensos à infecções respiratórias e necessitarem de terapia antimicrobiana é um fator que contribui para casos causalidade inversa na literatura (Juhn, 2014). O viés protopático também pode dificultar essa associação, pois clínicos podem prescrever antimicrobianos frente aos primeiros sintomas asmáticos, os quais podem ser inicialmente confundidos com infecções respiratórias (Kuo *et al.*, 2013). A variação genética e ambiental dessas crianças pode servir como viés nesse tipo de análise. Desta forma, o nosso trabalho

estabelece um ambiente controlado onde essas diferenças podem ser praticamente eliminadas.

Embora outros autores já tenham testado o efeito de antimicrobianos na asma alérgica experimental em modelo murino (Russell *et al.*, 2012), até o presente momento nenhum trabalho utilizou-se de doses e períodos considerados terapêuticos. Esse fator é importante para tentar mimetizar a administração desses medicamentos em crianças nos camundongos, auxiliando a transpor esses resultados para a clínica médica.

Observamos que a administração de antimicrobianos altera parâmetros de pulmonares, imunológicos e microbiológicos em animais asmáticos por até 15 dias após o término dos tratamentos, demonstrando possíveis efeitos perenes da fisiologia desses animais. Os animais alérgicos tratados com amoxicilina e TMP/SMX que apresentaram elevação na hiperreatividade pulmonar, considerado padrão-ouro no diagnóstico de asma. Esses animais também apresentaram redução do volume alveolar quando comparados aos animais alérgicos que não receberam qualquer tratamento. Esses dois grupos apresentam de forma geral uma perda mais acentuada da capacidade pulmonar quando comparados aos não tratados. Essas alterações foram acompanhadas de modificações na resposta imune de forma importante. O tratamento com TMP/SMX aumentou a presença de IL4, citocina central na resposta alérgica em ambos esses grupos. A IL4 esteve acompanhada de aumento de células Th2 no BAL (grupo TMP/SMX) ou eosinófilos (grupo amoxicilina) quando comparados ao grupo tratado com água. Esse achado implica que o tratamento com diferentes regimes de antibiótico que pioram o curso da asma, podem disparar diferentes mecanismos imunopatológicos. De forma interessante, o grupo amoxicilina apresentou os maiores níveis observados de Tregs no BAL, provavelmente como resultado de um processo inflamatório mais robusto. Por outro lado, a quase ausência dessas células no grupo TMP/SMX, associado a um aumento do perfil inflamatório, pode prejudicar a evolução da asma.

Os animais alérgicos tratados com metronidazol e azitromicina apresentaram alterações profundas em vários parâmetros analisados, incluindo

manutenção nos níveis de FEV-50 e FVC, sugerindo uma preservação da capacidade pulmonar. No escore histopatológico, apresentaram uma redução significativa da inflamação perivascular e peribronquial quando comparados ao grupo controle alérgico. A identificação das células do sistema imune, principalmente referente à imunidade inata, mostra níveis reduzidos de basófilos e eosinófilos no grupo tratado com azitromicina e de ILC2 nos linfonodos mediastinais que se manteve menor no BAL de camundongos alérgicos tratados com azitromicina. Esses grupos apresentaram ainda redução de células Th1 e Th2 (grupo azitromicina alérgico) quando comparados ao grupo água alérgico. O nível de células Tregs no linfonodo do grupo tratado com azitromicina foi impressionantemente alto, mas tal efeito se deve exclusivamente ao tratamento e possivelmente a alteração no balanço da microbiota indígena, uma vez que o grupo não alérgico apresentou a mesma alteração. De forma interessante, os grupos azitromicina e metronidazol ainda apresentaram menores níveis de células NK no BAL. Embora células NK seja associadas a resposta citotóxica, elas são frequentemente encontradas em processos alérgicos como asma, dermatite atópica e rinite alérgica (Deniz, Veen, van de e Akdis, 2013). Além disso, essas células podem secretar citocinas do tipo 2, mas sua contribuição nas alergias ainda é uma incógnita (Deniz, Veen, van de e Akdis, 2013). Observamos que os tratamentos que aliviaram a asma também reduziram os níveis de células NK, mas o significado desse achado ainda demanda maiores estudos.

Os níveis de IgG1 também se associaram de forma muito interessante ao fenótipo observado para cada tipo de tratamento. Embora os níveis de IgE não tenham apresentado diferenças entre os grupos, a regulação da alergia pode ocorrer por aumento dos níveis de IgG. A IgG pode regular os efeitos da IgE por competição de epítopos, ao se ligar ao antígeno e impedir a ligação da IgE no mesmo e por dessensibilizar mastócitos e basófilos ao promover o recrutamento de FcγRIIb para o agrupamento de FcεRI, que levaria a ativação das células (Ishikawa *et al.*, 2011; Strait, Morris e Finkelman, 2006). Diferentes componentes podem interferir na ativação de linfócitos B e na produção de anticorpos. Nossos dados sugerem que amoxicilina e TPM/SMX podem modular a microbiota de modo a diminuir a produção de IgG1.

A condição asmática mostrou-se imprescindível para a detecção de material genético bacteriano no BAL. Uma possível razão para este fato é que pacientes asmáticos produzem mais muco nas vias aéreas quando desafiados com alérgenos e a natureza carbo-proteica deste muco funciona como meio de cultura para o crescimento e desenvolvimento de bactérias. Outra possibilidade é que a polarização Th2 nos pacientes asmáticos, majoritariamente humoral, não corresponde a resposta mais eficaz na eliminação bacteriana.

Classicamente, o trato respiratório inferior é considerado estéril. No entanto, estudos de metagenômica, utilizando osequenciamento do gene 16s DNAr, demonstram a presença de material genético em sítios normalmente considerados livres de microorganismos, como líquido amniótico, sangue e incluindo o trato respiratório inferior (Païssé *et al.*, 2016). Em seres humanos, Huang e colaboradores (2011) mencionam um aumento na colonização bacteriana no BAL de pacientes asmáticos quando comparados a pacientes saudáveis.

A maior parte dos trabalhos publicados é orientada no sequenciamento apenas do DNA das fezes. Nossa escolha por sequenciar o metagenoma encontrado no BAL foi a investigação de possíveis comunidades bacterianas que estão no sítio da doença e podem interagir com as células do sistema imunológico frente a resposta ao alérgeno. A análise microbiológica do lavado broncoalveolar, dessa forma, é uma excelente ferramenta para a avaliação da saúde dos pulmões.

Pacientes asmáticos apresentam naturalmente uma maior abundância do filo *Proteobacteria* no BAL quando comparados a pacientes não asmáticos (Huang, Nelson, Brodie, Desantis, *et al.*, 2011). Nossos dados mostram que o tratamento com amoxicilina aumentou a abundância deste filo no BAL em comparação ao grupo controle alérgico, guiando nossa hipótese que a amoxicilina piora os quadros de asma.

Uma bactéria deste filo, *Ralstonia picketti*, foi encontrada com uma abundância cerca de 5 vezes maior no grupo amoxicilina alérgico em relação ao

controle alérgico. *Ralstonia picketti* é uma bactéria de natureza ubíqua: encontrada na cavidade oral de seres humanos, também é isolada a partir de amostras de rios e solos (Stelzmueller *et al.*, 2006). Muito resistente a processos de descontaminação, *Ralstonia picketti* pode contaminar a água utilizada em ambientes de saúde. De fato, *R. picketti* é encontrada em bacteremias em pacientes em uso de serviços de hemodiálise (Ryan e Adley, 2014). Infecções nosocomiais dessa bactéria em pacientes em uso de dispositivos para ventilação mecânica também são reportadas nos Estados Unidos (Waugh, Granger e Gaggar, 2010). Um caso de pneumonia obtida na comunidade por *Ralstonia picketti* foi relatado na China (Pan, Zhao e Dong, 2011) .

O grupo tratado com amoxicilina também apresentou, com 40% de abundância relativa no BAL a bactéria *Mesorhizobium ioti*. *M. ioti* é uma bactéria de vida livre e fixadora de nitrogênio (Kaneko *et al.*, 2000). Ainda não há relatos da sua participação em infecções animais. Entretanto, uma bactéria do mesmo gênero, *Mesorhizobium hominis* já foi descrita em casos de infecção pulmonar (Lo *et al.*, 2013). Sendo assim, este trabalho é o primeiro a relatar a presença de *M. ioti* nos pulmões.

O tratamento com trimetoprima/sulfametoxazol (Bactrim®) elevou a abundância das espécies *Bacillus cereus* e *Lactobacillus murinus* no lavado broncoalveolar em relação aos animais do grupo controle. *Bacillus cereus* é uma bactéria gram-positiva de vida livre. É um patógeno clássico de infecções alimentares, principalmente no arroz mal armazenado. Produz toxina emética que, quando ingerida a partir de alimentos contaminados, provoca fortes vômitos. Seus fatores de virulência incluem fosfolipases, hemolisinas e enterotoxinas, sendo capazes de provocar dano tecidual (Bottone, 2010). Formadora de esporos, *B. cereus* pode ser inalada e se instalar nos pulmões. Casos de pneumonia cujo agente etiológico foi *B.cereus* já foram reportados (Miller *et al.*, 1997). Várias cepas de *Bacillus cereus* são resistentes a trimetoprima/sulfametoxazol (Luna *et al.*, 2007), e a disbiose causada por este antimicrobiano pode ter possibilitado que esta bactéria tenha se desenvolvido nos pulmões dos animais e, desta forma, causado maior dano tecidual além da própria inflamação promovida pela asma alérgica.

Os grupos tratados com metronidazol e azitromicina apresentaram uma alta abundância relativa para a espécie *Staphylococcus lentus* no lavado broncoalveolar. Anteriormente esta bactéria era classificada como *Staphylococcus sciuri* sub. *lentus*. Algumas cepas de *Staphylococcus sciuri* possuem caráter probiótico em modelos murinos de asma alérgica induzida por ovalbumina quando administradas de forma intranasal (Hagner *et al.*, 2013).

A riqueza da microbiota do BAL indicada pelo índice ACE mostra um maior valor para o grupo tratado com trimetoprima/sulfametoxazol e um menor para o grupo tratado com azitromicina. Ao contrário do que é geralmente estabelecido para a microbiota intestinal, nossos dados concordam com outros trabalhos que concluíram que uma riqueza e diversidade elevadas na microbiota do trato respiratório inferior está relacionada a prognósticos ruins da doença asmática experimental em modelo murino (Huang, Nelson, Brodie, DeSantis, *et al.*, 2011; Riiser, 2015).

O sequenciamento do DNA bacteriano das fezes, ao contrário do BAL, já é bem estabelecido no estudo da interação microbiota-hospedeiro em doenças inflamatórias (Forbes, Domselaar, Van e Bernstein, 2016). Uma microbiota intestinal saudável estabelece um ambiente favorável à homeostase do hospedeiro. Perturbações na microbiota estão relacionadas com depressão, esquizofrenia, câncer, alergias dentre outras (Evrensel e Ceylan, 2015; Russell *et al.*, 2012; Zitvogel *et al.*, 2015). A microbiota é essencial para a maturação e atividade do sistema imunológico e está relacionada com alterações na inflamação na doença asmática: experimentos do nosso grupo de pesquisa mostram um maior infiltrado celular nos pulmões em animais isentos de germes (dados não publicados) quando comparados a animais saudáveis.

O tratamento com amoxicilina não foi capaz de alterar a microbiota intestinal dos animais de maneira profunda. Há uma alteração nas proporções de filos nos pontos 1 e 3 (logo após os ciclos de antibióticos), mas essa diferença é praticamente inexistente no ponto 4 (pós-recuperação) em relação ao grupo controle. No entanto, os pontos 1 e 3 são os dois momentos onde a



sensibilização ao alérgeno ocorre. Desta forma, o desbalanço na composição da microbiota nesse "período crítico" pode ser importante na geração da resposta imune, incluindo a formação de anticorpos.

O tratamento com azitromicina alterou de maneira impactante a microbiota intestinal dos animais tratados, com domínio completo do filo *Firmicutes*. Esta alteração foi perene mesmo após o período de recuperação. Uma espécie em particular, *Blautia coccooides*, dominou a microbiota analisada em todos os 3 pontos. *Blautia coccooides*, antigamente classificada como membro do cluster *Clostridium* cluster XIVa, é uma bactéria produtora de acetato – um ácido graxo de cadeia curta (Kumari, Ahuja e Paul, 2013; Kurakawa *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2008; Tanaka *et al.*, 2016). Os ácidos graxos são conhecidos pelo seu papel imunomodulador sistêmico, reduzindo a inflamação. Este fato é corroborado pela suplementação *in natura* destes ácidos graxos também ser capaz de reduzir processos inflamatórios (Trompette *et al.*, 2014). O fato desta bactéria estar aumentada neste grupo pode indicar uma maior produção desse metabólito.

O tratamento com metronidazol modificou a microbiota intestinal em todos os pontos analisados, com tendência maior do filo *Verrucomicrobia* em relação ao controle nos pontos 3 e 4. É importante frisar que *Akkermansia muciniphila* é a única representante do filo *Verrucomicrobia* na microbiota intestinal. *Akkermansia muciniphila* é uma bactéria Gram-negativa anaeróbia estrita com grande potencial probiótico, principalmente por produzir ácidos graxos de cadeia curta como acetato e propionato (Fujio-Vejar *et al.*, 2017). Sua abundância reduzida está relacionada a doenças como síndrome metabólica, obesidade, diabetes e doenças atópicas. *Akkermansia muciniphila* é capaz de modular a resposta imune e reduzir marcadores pró-inflamatórios na obesidade, assim como induzir células T FoxP3 regulatórias no tecido adiposo. A suplementação desta bactéria pode funcionar como linha auxiliar no tratamento dessas doenças (Everard *et al.*, 2013; Gómez-Gallego *et al.*, 2016). O metronidazol também aumentou a riqueza e a diversidade bacteriana nas fezes em todos os pontos em relação ao grupo controle. Um estudo por Abrahamsson e colaboradores, (2014) demonstra que uma baixa diversidade microbiana na microbiota intestinal

está relacionada a maiores chances de desenvolver asma em crianças em idade escolar na Suécia (Abrahamsson *et al.*, 2014).

O grupo tratado com metronidazol apresentou maiores níveis de IgA específicos contra OVA no sangue do que o grupo controle. A interação microbiota-sistema imune é importante para a geração da resposta humoral (Liu e Rhoads, 2013; Nguyen *et al.*, 2016). Como mencionado anteriormente, a disbiose ocasionada nos períodos de sensibilização ao alérgeno pode ter direcionado a um perfil mais voltado para a produção desta classe de imunoglobulinas. A IgA, como a IgG, é capaz de competir pelos epítopos de OVA, dificultando sua ligação com anticorpos IgE essenciais para a deflagração da doença alérgica.

O tratamento com trimetoprima/sulfametoxazol reduziu a proporção do filo *Firmicutes* no ponto 3 em relação ao controle. Uma razão elevada de *Firmicutes/Bacteroidetes* é relatada na infância e reduzida na velhice, sendo relacionada à doenças metabólicas (Ley, Peterson e Gordon, 2006; Mariat *et al.*, 2009). Embora após o período de recuperação o cluster *Clostridium leptum* tenha aumentando em relação ao controle, o filo *Verrucomicrobia* não foi estabelecido, demonstrando uma perda da bactéria *Akkermansia muciniphila* neste grupo. Como esperado, o tratamento com o antibiótico reduziu os índices de riqueza e diversidade, mesmo após o período de recuperação. Desta forma, podemos afirmar a permanência de uma “cicatriz” ou “assinatura” na composição da microbiota destes animais em relação ao grupo controle.

## 8. CONCLUSÃO.

O uso de antimicrobianos, sobretudo nas primeiras semanas de vida, é capaz de alterar a forma como animais respondem à asma alérgica mesmo semanas após o fim dos tratamentos. O uso irracional desses medicamentos é muito comum no mundo todo. Prescritores devem utilizá-los com cautela pois além da seleção de clones resistentes bacterianos, os antibióticos podem reverberar na saúde dos pacientes possivelmente por muitos anos através “cicatrizes” disbióticas na microbiota.

O uso dos fármacos descritos nesse trabalho resultou em variações nos parâmetros de avaliação da asma alérgica: piorando-os, comportando-se de forma neutra ou melhorando-os, embora cada um apresente uma tendência geral para um desses atributos. É evidente que o modelo murino não representa de forma fidedigna a fisiologia dos seres humanos, contudo, cada parâmetro é diferente no tocante à influência no universo da fisiopatologia asmática, contribuindo de forma diversa para o estado geral da doença observada clinicamente.

Até o presente momento, este é o primeiro trabalho de intervenção realizado com antimicrobianos das classes mais utilizadas na prática clínica em doses terapêuticas e suas possíveis influências na asma alérgica. Embora parte da literatura científica afirme apenas um efeito deletério dos antimicrobianos, a azitromicina e o metronidazol demonstraram ser bons candidatos para testes em seres humanos para o reposicionamento destinado a reduzir a severidade dos sintomas da asma alérgica, possivelmente devido a seleção positiva das bactérias *Blautia coccooides* e *Akkermansia muciniphila* na microbiota intestinal.

## 9. REFERÊNCIAS.

ABRAHAM, J AND MATHEW, F. Taste masking of paediatric formulations: a review on technologies, recent trends and regulatory aspects. **Int J Pharm Pharm Sci**, v. 6, n. 1, p. 12–19, 2014.

ABRAHAMSSON, T. R.; JAKOBSSON, H. E.; ANDERSSON, A. F.; BJÖRKSTÉN, B.; ENGSTRAND, L.; JENMALM, M. C. Low gut microbiota diversity in early infancy precedes asthma at school age. **Clinical and Experimental Allergy**, 2014.

ACEMOGLU, D.; JOHNSON, S. Disease and development: the effect of life expectancy on economic growth. **Journal of Political Economy**, v. 115, n. 6, p. 925–985, 2006.

AHN, K.-M.; LEE, M.-S.; HONG, S.-J.; LIM, D.-H.; AHN, Y.-M.; LEE, H.-R.; LEE, M.-I.; LEE, M.-H.; SHIN, Y.-K.; KIM, K.-E. Fever, Use of Antibiotics, and Acute Gastroenteritis During Infancy as Risk Factors for the Development of Asthma in Korean School-Age Children. **Journal of Asthma**, v. 42, n. 9, p. 745–750, 2 jan. 2005.

ALTHOLTZ, L. Y.; DUBRAY LA PERLE, K. M.; QUIMBY, F. W. Dose-dependant hypothyroidism in mice induced by commercial trimethoprim-sulfamethoxazole rodent feed. **Comparative Medicine**, v. 56, n. 5, p. 395–401, 2006.

ANTONOPOULOS, D. A.; HUSE, S. M.; MORRISON, H. G.; SCHMIDT, T. M.; SOGIN, M. L.; YOUNG, V. B. Reproducible community dynamics of the gastrointestinal microbiota following antibiotic perturbation. **Infection and Immunity**, 2009.

AZOULAY-DUPUIS, E.; VALLÉE, E.; BEDOS, J. P.; MUFFAT-JOLY, M.; POCIDALO, J. J. Prophylactic and therapeutic activities of azithromycin in a mouse model of pneumococcal pneumonia. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 35, n. 6, p. 1024–8, jun. 1991.

BELKAID, Y.; HAND, T. W. Role of the microbiota in immunity and inflammation. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 121–141, 2014.

BENDESKY, A.; MENÉNDEZ, D.; OSTROSKY-WEGMAN, P. Is metronidazole

carcinogenic? **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 511, n. 2, p. 133–144, 2002.

BLUMSTEIN, D. T.; LEVY, K.; MAYER, E.; HARTE, J. Gastrointestinal Dysbiosis. p. 2014, 2014.

BÖHMER, E. **Dentistry in rabbits and rodents**. [s.l: s.n.].

BOTTONE, E. J. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. **Clinical microbiology reviews**, v. 23, n. 2, p. 382–98, abr. 2010.

BRICKS, L. F. Uso judicioso de medicamentos em crianças Judicious use of medication in children. v. 79, p. 107–114, 2003.

BULSKA, M.; ORSZULAK-MICHALAK, D. Immunomodulatory and anti-inflammatory properties of macrolides. **Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences**, 2014.

BURKS, A. W.; CALDERON, M. A.; CASALE, T.; COX, L.; DEMOLY, P.; JUTEL, M.; NELSON, H.; AKDIS, C. A. Update on allergy immunotherapy: American Academy of Allergy, Asthma & Immunology/European Academy of Allergy and Clinical Immunology/PRACTALL consensus report. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 131, n. 5, p. 1288–1296.e3, 2013.

CAHENZLI, J.; KÖLLER, Y.; WYSS, M.; GEUKING, M. B.; MCCOY, K. D. Intestinal microbial diversity during early-life colonization shapes long-term IgE levels. **Cell host & microbe**, v. 14, n. 5, p. 559–70, 13 nov. 2013.

CARDING, S.; VERBEKE, K.; VIPOND, D. T.; CORFE, B. M.; OWEN, L. J. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. **Microbial ecology in health and disease**, v. 26, p. 26191, 2015.

CASÉN, C. *et al.* Deviations in human gut microbiota: A novel diagnostic test for determining dysbiosis in patients with IBS or IBD. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 42, n. 1, p. 71–83, 2015.

CASTRO, J. G.; MORRISON-BRYANT, M. Management of pneumocystis jirovecii pneumonia in HIV infected patients: Current options, challenges and future directions. **HIV/AIDS - Research and Palliative Care**, v. 2, p. 123–134, 2010.

CHAKRAVORTY, S.; HELB, D.; BURDAY, M.; CONNELL, N.; ALLAND, D. A

detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. **Journal of microbiological methods**, v. 69, n. 2, p. 330–9, maio 2007.

CHARLES A JANEWAY, J.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. J. Effector mechanisms in allergic reactions. 2001.

CHU, E. K.; DRAZEN, J. M. Asthma one hundred years of treatment and onward. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 171, n. 11, p. 1202–1208, 2005.

COHEN, S. G. Asthma in antiquity: The Ebers papyrus. **Allergy Proc**, v. 13, n. 3, p. 147–154, 1992.

CSERHÁTI, E. The history of bronchial asthma from the ancient times till the Middle Ages. **Acta physiologica Hungarica**, v. 91, n. 3–4, p. 243–61, nov. 2004.

DALAL, P.; SHAH, G.; CHHABRA, D.; GALLON, L. Role of tacrolimus combination therapy with mycophenolate mofetil in the prevention of organ rejection in kidney transplant patients. **International Journal of Nephrology and Renovascular Disease**, v. 3, p. 107–115, 2010.

DENIZ, G.; VEEN, W. VAN DE; AKDIS, M. Natural killer cells in patients with allergic diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 132, n. 3, p. 527–535, set. 2013.

DIMOPOULOS, G.; MATTHAIYOU, D. K. Duration of therapy of ventilator-associated pneumonia. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 29, n. 2, p. 1, 2016.

DONNELL, O. O. Access to health care in developing countries : breaking down demand side barriers. **Cad Saude Publica.**, v. 23, n. 12, p. 2820–2834, 2007.

ECDC. Distribution of Antibacterials For Systemic Use (ATC group J01) in the community (primary care sector) in Austria, reporting year 2014. p. 19–20, 2014.

EGE, M. J.; MAYER, M.; NORMAND, A.-C.; GENUNEIT, J.; COOKSON, W. O. C. M.; BRAUN-FAHRLÄNDER, C.; HEEDERIK, D.; PIARROUX, R.; MUTIUS, E. VON. Exposure to Environmental Microorganisms and Childhood Asthma. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 8, p. 701–709, 24 fev. 2011.

EVERARD, A.; BELZER, C.; GEURTS, L.; OUWERKERK, J. P.; DRUART, C.;

BINDELS, L. B.; GUIOT, Y. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 110, n. 22, p. 9066–9071, 2013.

EVRENSEL, A.; CEYLAN, M. E. The Gut-Brain Axis: The Missing Link in Depression. **Clinical psychopharmacology and neuroscience : the official scientific journal of the Korean College of Neuropsychopharmacology**, v. 13, n. 3, p. 239–44, 31 dez. 2015.

FOLIAKI, S.; PEARCE, N.; BJÖRKSTÉN, B.; MALLOL, J.; MONTEFORT, S.; MUTIUS, E. VON. Antibiotic use in infancy and symptoms of asthma, rhinoconjunctivitis, and eczema in children 6 and 7 years old: International Study of Asthma and Allergies in Childhood Phase III. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2009.

FORBES, J. D.; DOMSELAAR, G. VAN; BERNSTEIN, C. N. The Gut Microbiota in Immune-Mediated Inflammatory Diseases. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1081, 2016.

FRANCO, R.; NASCIMENTO, H. F.; CRUZ, A. A.; SANTOS, A. C.; SOUZA-MACHADO, C.; PONTE, E. V.; SOUZA-MACHADO, A.; RODRIGUES, L. C.; BARRETO, M. L. The economic impact of severe asthma to low-income families. **Allergy**, v. 64, n. 3, p. 478–483, 2009.

FUJIO-VEJAR, S.; VASQUEZ, Y.; MORALES, P.; MAGNE, F.; VERA-WOLF, P.; UGALDE, J. A.; NAVARRETE, P.; GOTTELAND, M. The gut microbiota of healthy Chilean subjects reveals a high abundance of the phylum Verrucomicrobia. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUN, p. 1–11, 2017.

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

GAUTHIER, M.; RAY, A.; WENZEL, S. E. Evolving concepts of asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 192, n. 6, p. 660–668, 2015.

GÓMEZ-GALLEGO, C.; POHL, S.; SALMINEN, S.; VOS, W. M. DE; KNEIFEL, W. *Akkermansia muciniphila*: A novel functional microbe with probiotic properties. **Beneficial Microbes**, v. 7, n. 4, p. 571–584, 2016.

GOTTFRIED, J. History Repeating ? Avoiding a Return to the Pre-Antibiotic Age  
The Harvard community has made this article openly available . Please share  
how this access benefits you . Your story matters . Accessed Citable Link Terms  
of Use History Repeating ? Avoiding. p. 1–73, 2005.

GOZDZ, J.; HOLBREICH, M.; METWALI, N.; THORNE, P. S.; SPERLING, A. I.;  
MARTINEZ, F. D.; OBER, C.; MUTIUS, E. VON; VERCELLI, D. Amish and  
Hutterite Environmental Farm Products Have Opposite Effects on Experimental  
Models of Asthma. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 13 Suppl 1, p.  
S99, mar. 2016.

GUINANE, C. M.; COTTER, P. D. Role of the gut microbiota in health and chronic  
gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. **Therapeutic  
advances in gastroenterology**, v. 6, n. 4, p. 295–308, jul. 2013.

HAAHTELA, T. *et al.* Hunt for the origin of allergy - comparing the Finnish and  
Russian Karelia. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 45, n. 5, p. 891–901, 1  
maio 2015.

HAGNER, S. *et al.* Farm-derived Gram-positive bacterium *Staphylococcus sciuri*  
W620 prevents asthma phenotype in HDM- and OVA-exposed mice. **Allergy:  
European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 68, n. 3, p. 322–  
329, mar. 2013.

HART, C. A.; KARIUKI, S. Antimicrobial resistance in developing countries. **BMJ  
(Clinical research ed.)**, v. 317, n. 7159, p. 647–50, 5 set. 1998.

HICKS, L. A.; BARTOCES, M. G.; ROBERTS, R. M.; SUDA, K. J.; HUNKLER, R.  
J.; TAYLOR, T. H.; SCHRAG, S. J. US outpatient antibiotic prescribing variation  
according to geography, patient population, and provider specialty in 2011.  
**Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 9, p. 1308–1316, 2015.

HICKS, L.; TAYLOR, T. Understanding the Core Result of the National Lung  
Screening Trial. **New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 15, p. 1460–1461,  
2013.

HOSKIN-PARR, L.; TEYHAN, A.; BLOCKER, A.; HENDERSON, A. J. W.  
Antibiotic exposure in the first two years of life and development of asthma and  
other allergic diseases by 7.5 yr: A dose-dependent relationship. **Pediatric  
Allergy and Immunology**, v. 24, n. 8, p. 762–771, 2013.



HUANG, Y. J.; NELSON, C. E.; BRODIE, E. L.; DESANTIS, T. Z.; *et al.* Airway microbiota and bronchial hyperresponsiveness in patients with suboptimally controlled asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 127, n. 2, p. 372–381.e3, 2011.

HUANG, Y. J.; NELSON, C. E.; BRODIE, E. L.; DESANTIS, T. Z.; BAEK, M. S.; LIU, J.; WOYKE, T.; ALLGAIER, M.; BRISTOW, J.; WIENER-KRONISH, J. P. Airway microbiota and bronchial hyperresponsiveness in patients with suboptimally controlled asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 127, n. 2, p. 372–381.e3, fev. 2011.

HUFFNAGLE, G. B. The microbiota and Allergies/Asthma. **PLoS Pathogens**, 2010.

IGEA, J. M. The history of the idea of allergy. **Allergy**, v. 68, n. 8, p. 966–973, ago. 2013.

ILLUMINA. 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation. **Illumina.com**, n. B, p. 1–28, 2013.

ISHIKAWA, Y.; KOBAYASHI, K.; YAMAMOTO, M.; NAKATA, K.; TAKAGAWA, T.; FUNADA, Y.; KOTANI, Y.; KARASUYAMA, H.; YOSHIDA, M.; NISHIMURA, Y. Antigen-Specific IgG ameliorates allergic airway inflammation via Fc $\gamma$  receptor IIB on dendritic cells. **Respiratory Research**, 2011.

IVANOV, I. I. *et al.* Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria. **Cell**, v. 139, n. 3, p. 485–498, 2009a.

\_\_\_\_\_. Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria. **Cell**, v. 139, n. 3, p. 485–498, 30 out. 2009b.

JERNBERG, C.; LOFMARK, S.; EDLUND, C.; JANSSON, J. K. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. **Isme.J.**, v. 1, n. 1751–7362 (Print), p. 56–66, 2007.

JIA, H.; ZACK, M. M.; THOMPSON, W. W. The effects of diabetes, hypertension, asthma, heart disease, and stroke on quality-adjusted life expectancy. **Value in Health**, v. 16, n. 1, p. 140–147, 2013.

JUHN, Y. J. Risks for infection in patients with asthma (or other atopic conditions): is asthma more than a chronic airway disease? **The Journal of allergy and**

**clinical immunology**, v. 134, n. 2, p. 247-57–9, ago. 2014.

KALRA, M. G.; HIGGINS, K. E.; PEREZ, E. D. Common Questions About Streptococcal Pharyngitis. **American Family Physician**, v. 94, n. 1, p. 24–31, 2016.

KANEKO, T. *et al.* Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. **DNA research: an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes**, v. 7, n. 6, p. 331–8, 31 dez. 2000.

KOCHANEK, K. D.; MURPHY, S. L.; XU, J.; TEJADA-VERA, B. National Vital Statistics Reports, Volume 65, Number 4, (06/30/2016). 2014.

KOH, A.; VADDER, F. DE; KOVATCHEVA-DATCHARY, P.; BÄCKHED, F. From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. **Cell**, v. 165, n. 6, p. 1332–1345, 2016.

KOZYRSKYJ, A. L.; ERNST, P.; BECKER, A. B. Increased risk of childhood asthma from antibiotic use in early life. **Chest**, v. 131, n. 6, p. 1753–1759, 2007.

KRISHNA, M. T.; HUISSOON, A. P. Clinical immunology review series: An approach to desensitization. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 163, n. 2, p. 131–146, 2011.

KUMAR, P. S.; BROOKER, M. R.; DOWD, S. E.; CAMERLENGO, T. Target region selection is a critical determinant of community fingerprints generated by 16S pyrosequencing. **PloS one**, v. 6, n. 6, p. e20956, 2011.

KUMARI, R.; AHUJA, V.; PAUL, J. Fluctuations in butyrate-producing bacteria in ulcerative colitis patients of North India. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 22, p. 3404–3414, 2013.

KUO, C.-H.; KUO, H.-F.; HUANG, C.-H.; YANG, S.-N.; LEE, M.-S.; HUNG, C.-H. Early life exposure to antibiotics and the risk of childhood allergic diseases: An update from the perspective of the hygiene hypothesis. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 46, n. 5, p. 320–329, out. 2013.

KURAKAWA, T.; OGATA, K.; MATSUDA, K.; TSUJI, H.; KUBOTA, H.; TAKADA, T.; KADO, Y.; ASAHARA, T.; TAKAHASHI, T.; NOMOTO, K. Diversity of Intestinal *Clostridium coccoides* Group in the Japanese Population, as

Demonstrated by Reverse Transcription-Quantitative PCR. **PloS one**, v. 10, n. 5, p. e0126226, 2015.

KUSEL, M. M. H.; KLERK, N. DE; HOLT, P. G.; SLY, P. D.; KUSEL, M. M. H. Antibiotic use in the first year of life and risk of atopic disease in early childhood Clinical and Experimental Allergy. **Clinical and Experimental Allergy**, n. 38, p. 1921–1928, 2008.

LEBLANC, J. G.; MILANI, C.; GIORI, G. S. DE; SESMA, F.; SINDEREN, D. VAN; VENTURA, M. Bacteria as vitamin suppliers to their host: A gut microbiota perspective. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 160–168, 2013.

LEE, M. R. The history of Ephedra (ma-huang). **Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh**, v. 41, n. 1, p. 78–84, 2011.

LEY, R. E.; PETERSON, D. A.; GORDON, J. I. Ecological and Evolutionary Forces Shaping Microbial Diversity in the Human Intestine. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 837–848, 24 fev. 2006.

LI, B. W. S.; HENDRIKS, R. W. Group 2 innate lymphoid cells in lung inflammation. **Immunology**, v. 140, n. 3, p. 281–7, nov. 2013.

LIU, C.; FINEGOLD, S. M.; SONG, Y.; LAWSON, P. A. Reclassification of *Clostridium coccoides*, *Ruminococcus hansenii*, *Ruminococcus hydrogenotrophicus*, *Ruminococcus luti*, *Ruminococcus productus* and *Ruminococcus schinkii* as *Blautia coccoides* gen. nov., comb. nov., *Blautia hansenii* comb. nov., *Blautia hydrogenotrophica* comb. nov., *Blautia luti* comb. nov., *Blautia producta* comb. nov., *Blautia schinkii* comb. nov. and description of *Blautia wexlerae* ... **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2008.

LIU, Y.; RHOADS, J. Communication between B-Cells and Microbiota for the Maintenance of Intestinal Homeostasis. **Antibodies**, v. 2, n. 4, p. 535–553, 2013.

LIVANOS, A. E. *et al.* Antibiotic-mediated gut microbiome perturbation accelerates development of type 1 diabetes in mice. **Nature Microbiology**, 2016.

LO, S.-C.; LI, B.; HUNG, G.-C.; LEI, H.; LI, T.; ZHANG, J.; NAGAMINE, K.; TSAI, S.; ZUCKER, M. J.; OLESNICKY, L. Isolation and Characterization of Two Novel Bacteria *Afipia cberi* and *Mesorhizobium hominis* from Blood of a Patient Afflicted

- with Fatal Pulmonary Illness. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. e82673, 18 dez. 2013.
- LÖFMARK, S.; EDLUND, C.; NORD, C. E. Metronidazole Is Still the Drug of Choice for Treatment of Anaerobic Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. s1, p. S16–S23, 2010.
- LOMMATZSCH, M.; KORN, S.; BUHL, R.; VIRCHOW, J. C. Against all odds: Anti-IgE for intrinsic asthma? **Thorax**, v. 69, n. 1, p. 94–96, 2014.
- LUNA, V. A.; KING, D. S.; GULLEDGE, J.; CANNONS, A. C.; AMUSO, P. T.; CATTANI, J. Susceptibility of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides* and *Bacillus thuringiensis* to 24 antimicrobials using Sensititre(R) automated microbroth dilution and Etest(R) agar gradient diffusion methods. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 3, p. 555–567, 23 jul. 2007.
- MARCHESI, J. R. *et al.* The gut microbiota and host health: A new clinical frontier. **Gut**, v. 65, n. 2, p. 330–339, 2016.
- MARIAT, D.; FIRMESSSE, O.; LEVENEZ, F.; GUIMARÃES, V. D.; SOKOL, H.; DORÉ, J.; CORTHER, G.; FURET, J. P. The firmicutes/bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 123, 9 jun. 2009.
- MARKETOS, S. G.; BALLAS, C. N. Bronchial asthma in the medical literature of greek antiquity. **Journal of Asthma**, v. 19, n. 4, p. 263–269, 1982.
- MARRA, F.; LYND, L.; COOMBES, M.; RICHARDSON, K.; LEGAL, M.; FITZGERALD, J. M.; MARRA, C. A. Does antibiotic exposure during infancy lead to development of asthma? A systematic review and metaanalysis. **Chest**, v. 129, n. 3, p. 610–618, 2006.
- MARSLAND, B. J.; SALAMI, O. **Microbiome influences on allergy in mice and humans** *Current Opinion in Immunology*, 2015.
- MARX, J. O.; VUDATHALA, D.; MURPHY, L.; RANKIN, S.; HANKENSON, F. C. Antibiotic administration in the drinking water of mice. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS**, v. 53, n. 3, p. 301–6, 2014.
- MASOLI, M.; FABIAN, D.; HOLT, S.; BEASLEY, R. **The global burden of**

**asthma: Executive summary of the GINA Dissemination Committee Report***Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, maio 2004. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1398-9995.2004.00526.x>>.

Acesso em: 15 fev. 2018

MASTERS, P. A.; O'BRYAN, T. A.; ZURLO, J.; MILLER, D. Q.; JOSHI, N. Trimethoprim-Sulfamethoxazole Revisited. v. 163, p. 402–410, 2003.

MCKEEVER, T. M.; LEWIS, S. A.; SMITH, C.; COLLINS, J.; HEATLIE, H.; FRISCHER, M.; HUBBARD, R. Early exposure to infections and antibiotics and the incidence of allergic disease: a birth cohort study with the West Midlands General Practice Research Database. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 109, n. 1, p. 43–50, 2002.

MCLOUGHLIN, R. M.; MILLS, K. H. G. Influence of gastrointestinal commensal bacteria on the immune responses that mediate allergy and asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 127, n. 5, p. 1097–1107, 2011.

MCMULLAN, B. J.; MOSTAGHIM, M. Prescribing azithromycin. **Australian Prescriber**, v. 38, n. 3, p. 87–90, 2015.

MILLER, J. M.; HAIR, J. G.; HEBERT, M.; HEBERT, L.; ROBERTS, F. J. Fulminating Bacteremia and Pneumonia Due to *Bacillus cereus*. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, v. 35, n. 2, p. 504–507, 1997.

MOTIKA, C. A.; PAPACHRISTOU, C.; ABNEY, M.; LESTER, L. A.; OBER, C. Rising prevalence of asthma is sex-specific in a US farming population. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 128, n. 4, p. 774–779, 1 out. 2011.

MUKHERJEE, T.; BOSHOFF, H. Nitroimidazoles for the treatment of TB: past, present and future. **Future medicinal chemistry**, v. 3, n. 11, p. 1427–54, 2011.

NATIONAL HEART LUNG AND BLOOD INSTITUTE (NHLBI). **Expert Panel Report 3: Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma Full Report 2007**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <[https://www.nhlbi.nih.gov/sites/default/files/media/docs/asthgdln\\_1.pdf](https://www.nhlbi.nih.gov/sites/default/files/media/docs/asthgdln_1.pdf)>.

Acesso em: 15 fev. 2018.

NGUYEN, Q. N.; HIMES, J. E.; MARTINEZ, D. R.; PERMAR, S. R. The Impact of the Gut Microbiota on Humoral Immunity to Pathogens and Vaccination in Early

Infancy. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 12, p. 1–6, 2016.

OBER, C.; SPERLING, A. I.; MUTIUS, E. VON; VERCELLI, D. Immune development and environment: lessons from Amish and Hutterite children. **Current Opinion in Immunology**, v. 48, p. 51–60, 2017.

OKADA, H.; KUHN, C.; FEILLET, H.; BACH, J.-F. The “hygiene hypothesis” for autoimmune and allergic diseases: an update. **Clinical and experimental immunology**, v. 160, n. 1, p. 1–9, abr. 2010.

OKADA, H.; KUHN, C.; FEILLET, H.; BACH, J. F. The “hygiene hypothesis” for autoimmune and allergic diseases: An update. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 160, n. 1, p. 1–9, 2010.

ORACH, C. G. Health equity: challenges in low income countries. **African health sciences**, v. 9 Suppl 2, p. S49-51, 2009.

ÖRTQVIST, A. K.; LUNDHOLM, C.; KIELER, H.; LUDVIGSSON, J. F.; FALL, T.; YE, W.; ALMQVIST, C. Antibiotics in fetal and early life and subsequent childhood asthma: Nationwide population-based study with sibling analysis. **Obstetrical and Gynecological Survey**, v. 70, n. 4, p. 229–231, 2015.

OSTMAN, S.; RASK, C.; WOLD, A. E.; HULTKRANTZ, S.; TELEMO, E. Impaired regulatory T cell function in germ-free mice. **European journal of immunology**, v. 36, p. 2336–2346, 2006.

PAÏSSÉ, S.; VALLE, C.; SERVANT, F.; COURTNEY, M.; BURCELIN, R.; AMAR, J.; LELOUVIER, B. Comprehensive description of blood microbiome from healthy donors assessed by 16S targeted metagenomic sequencing. **Transfusion**, v. 56, n. 5, p. 1138–1147, 1 maio 2016.

PAN, W.; ZHAO, Z.; DONG, M. Lobar pneumonia caused by *Ralstonia pickettii* in a sixty-five-year-old Han Chinese man: a case report. **Journal of medical case reports**, v. 5, p. 377, 15 ago. 2011.

PARK, S. H.; MILSTONE, A. M.; DIENER-WEST, M.; NUSSENBLATT, V.; COSGROVE, S. E.; TAMMA, P. D. Short versus prolonged courses of antibiotic therapy for children with uncomplicated gram-negative bacteraemia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 3, p. 779–785, 2014.

PARNHAM, M. J.; HABER, V. E.; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J.;

PERLETTI, G.; VERLEDEN, G. M.; VOS, R. Azithromycin: Mechanisms of action and their relevance for clinical applications. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 143, n. 2, p. 225–245, 2014.

PAYNE, M.; RUPAR, C. A.; SIU, G. M.; SIU, V. M. Amish, mennonite, and hutterite genetic disorder database. **Paediatrics & child health**, v. 16, n. 3, p. e23-4, mar. 2011.

PÉCOUL, B.; CHIRAC, P.; TROUILLER, P.; PINEL, J. Access to essential drugs in poor countries: A lost battle? **Journal of the American Medical Association**, v. 281, n. 4, p. 361–367, 1999.

PEKKANEN, J.; LAMPI, J.; GENUNEIT, J.; HARTIKAINEN, A. L.; JÄRVELIN, M. R. Analyzing atopic and non-atopic asthma. **European Journal of Epidemiology**, v. 27, n. 4, p. 281–286, 2012.

PETERS, D. H.; GARG, A.; BLOOM, G.; WALKER, D. G.; BRIEGER, W. R.; HAFIZUR RAHMAN, M. Poverty and access to health care in developing countries. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1136, p. 161–171, 2008.

PRETORIUS, E.; MARX, J. Datura stramonium in asthma treatment and possible effects on prenatal development. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 21, n. 3, p. 331–337, 1 maio 2006.

QU, P. R. Bactrim / ® Bactrim F. [s.d.].

QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F. O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic acids research**, v. 41, n. Database issue, p. D590-6, jan. 2013.

RACKEMANN, F. M. A working classification of asthma. **The American Journal of Medicine**, v. 3, n. 5, p. 601–606, 1947.

RANTALA, A.; JAAKKOLA, J. J. K.; JAAKKOLA, M. S. Respiratory infections in adults with atopic disease and IgE antibodies to common aeroallergens. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e68582, 2013.

RAPPÉ, M. S.; GIOVANNONI, S. J. The Uncultured Microbial Majority. **Annual Review of Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 369–394, out. 2003.

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.

RELY, K.; GALINDO-SUÁREZ, R. M.; ALEXANDRE, P. K.; GARCÍA-GARCÍA, E. G.; MUCIÑO-ORTEGA, E.; SALINAS-ESCUADERO, G.; MARTÍNEZ-VALVERDE, S. Cost Utility of Sirolimus versus Tacrolimus for the Primary Prevention of Graft Rejection in Renal Transplant Recipients in Mexico. **Value in Health Regional Issues**, v. 1, n. 2, p. 211–217, 2012.

RIISER, A. The human microbiome, asthma, and allergy. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, v. 11, p. 1–7, 2015.

RINCON, M.; IRVIN, C. G. Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases. **International journal of biological sciences**, v. 8, n. 9, p. 1281–90, 2012.

RISNES, K. R.; BELANGER, K.; MURK, W.; BRACKEN, M. B. Antibiotic exposure by 6 months and asthma and allergy at 6 years: Findings in a cohort of 1,401 US children. **American Journal of Epidemiology**, 2011.

RODRIGUEZ, J. M. *et al.* The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. **Microb Ecol Health Dis**, v. 26, p. 26050, 2015.

ROOCK, S. DE; ELK, M. VAN; DIJK, M. E. A. VAN; TIMMERMAN, H. M.; RIJKERS, G. T.; PRAKKEN, B. J.; HOEKSTRA, M. O.; KLEER, I. M. DE. Lactic acid bacteria differ in their ability to induce functional regulatory T cells in humans. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 40, n. 1, p. 103–110, 2010.

RUSSELL, S. L.; GOLD, M. J.; HARTMANN, M.; WILLING, B. P.; THORSON, L.; WLODARSKA, M.; GILL, N.; BLANCHET, M. R.; MOHN, W. W.; MCNAGNY, K. M.; FINLAY, B. B. Early life antibiotic-driven changes in microbiota enhance susceptibility to allergic asthma. **EMBO Reports**, v. 13, n. 5, p. 440–447, 2012.

RYAN, M. P.; ADLEY, C. C. *Ralstonia* spp.: Emerging global opportunistic pathogens. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 33, n. 3, p. 291–304, 2014.

SIRAGANIAN, R. P.; CASTRO, R. O. DE; BARBU, E. A.; ZHANG, J. Mast cell



signaling: The role of protein tyrosine kinase Syk, its activation and screening methods for new pathway participants. **FEBS Letters**, v. 584, n. 24, p. 4933–4940, 2010.

SLEATOR, R. D.; SHORTALL, C.; HILL, C. Metagenomics. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 361–366, 1 nov. 2008.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DE PENUMOLOGIA E TISIOLOGIA. PUBLICAÇÃO OFICIAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o Manejo da Asma -2012. **J Bras Pneumol. v. Jornal Brasileiro de Pneumologia Abril**, v. 38, n. 1, p. 1–46, 2012.

STEIN, M. M. *et al.* Innate Immunity and Asthma Risk in Amish and Hutterite Farm Children. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 5, p. 411–421, 2016.

STELZMUELLER, I.; BIEBL, M.; WIESMAYR, S.; ELLER, M.; HOELLER, E.; FILLE, M.; WEISS, G.; LASS-FLOERL, C.; BONATTI, H. *Ralstonia pickettii*-innocent bystander or a potential threat? **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 12, n. 2, p. 99–101, 2006.

STONE, K. D.; PRUSSIN, C.; METCALFE, D. D. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2 SUPPL. 2, p. S73–S80, 2010.

STRACHAN, D. P. Household Size. **BMJ : British Medical Journal**, v. 299, n. November, p. 1259–1260, 1989.

STRAIT, R. T.; MORRIS, S. C.; FINKELMAN, F. D. IgG-blocking antibodies inhibit IgE-mediated anaphylaxis in vivo through both antigen interception and Fc gamma RIIb cross-linking. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n. 3, p. 833–41, mar. 2006.

STRUNK, R. C.; BLOOMBERG, G. R. Omalizumab for Asthma. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 25, p. 2689–2695, 22 jun. 2006.

TANAKA, S.; YAMAMOTO, K.; YAMADA, K.; FURUYA, K.; UYENO, Y. Relationship of enhanced butyrate production by colonic butyrate-producing

bacteria to immunomodulatory effects in normal mice fed an insoluble fraction of *Brassica rapa* L. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 9, p. 2693–2699, 2016.

THAVAGNANAM, S.; FLEMING, J.; BROMLEY, A.; SHIELDS, M. D.; CARDWELL, C. R. A meta-analysis of the association between Caesarean section and childhood asthma. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 38, n. 4, p. 629–633, 2008.

TRAN, D.; MUCHANT, D. G.; ARONOFF, S. C. Short-course versus conventional length antimicrobial therapy for uncomplicated lower urinary tract infections in children: A meta-analysis of 1279 patients. **Journal of Pediatrics**, v. 139, n. 1, p. 93–99, 2001.

TROMPETTE, A.; GOLLWITZER, E. S.; YADAVA, K.; SICHELSTIEL, A. K.; SPRENGER, N.; NGOM-BRU, C.; BLANCHARD, C.; JUNT, T.; NICOD, L. P.; HARRIS, N. L.; MARSLAND, B. J. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. **Nature Medicine**, v. 20, n. 2, p. 159–166, 5 fev. 2014.

VERNOCCHI, P.; CHIERICO, F. DEL; PUTIGNANI, L. Gut microbiota profiling: Metabolomics based approach to unravel compounds affecting human health. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JUL, 2016.

WANG, B.; YAO, M.; LV, L.; LING, Z.; LI, L. The Human Microbiota in Health and Disease. **Engineering**, v. 3, n. 1, p. 71–82, 1 fev. 2017.

WAUGH, J. B.; GRANGER, W. M.; GAGGAR, A. Incidence, relevance and response for *Ralsfonia* respiratory infections. **Clinical laboratory science: journal of the American Society for Medical Technology**, v. 23, n. 2, p. 99–106, 2010.

WAXMAN, D. J.; STROMINGER, J. L. Penicillin-Binding Proteins and the Mechanism of Action of Beta-Lactam Antibiotics<sup>1</sup>. **Annual Review of Biochemistry**, v. 52, n. 1, p. 825–869, 1983.

WJST, M.; HOELSCHER, B.; FRYE, C.; WICHMANN, H. E.; DOLD, S.; HEINRICH, J. Early antibiotic treatment and later asthma. **European journal of medical research**, v. 6, n. 6, p. 263–71, 28 jun. 2001.

ZEISSIG, S.; BLUMBERG, R. S. **Life at the beginning: Perturbation of the microbiota by antibiotics in early life and its role in health and disease** *Nature Immunology*, 2014.

ZITVOGEL, L.; GALLUZZI, L.; VIAUD, S.; VÉTIZOU, M.; DAILLÈRE, R.; MERAD, M.; KROEMER, G. Cancer and the gut microbiota: an unexpected link. **Science translational medicine**, v. 7, n. 271, p. 271ps1, 21 jan. 2015.