



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

TALITA FERREIRA COSTA DA SILVA

**INVESTIGAÇÃO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE MICROBIOMA
DA PELE E FENÓTIPOS DE ASMA EM CRIANÇAS E
ADOLESCENTES DO MUNICÍPIO DE SALVADOR, BAHIA**

Salvador

2015

TALITA FERREIRA COSTA DA SILVA

**INVESTIGAÇÃO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE MICROBIOMA
DA PELE E FENÓTIPOS DE ASMA EM CRIANÇAS E
ADOLESCENTES DO MUNICÍPIO DE SALVADOR, BAHIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia como requisito para à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

Orientadora: Dr^a Carina da Silva Pinheiro
Co-orientadora: Dr^a Neuza Maria Alcântara-Neves

Salvador

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Processamento Técnico, Biblioteca Universitária de Saúde,
Sistema de Bibliotecas da UFBA

S586 Silva, Talita Ferreira Costa da.

Investigação de associação entre microbioma da pele e fenótipos de asma em crianças e adolescentes do município de Salvador, Bahia / Talita Ferreira Costa da Silva. - Salvador, 2015.

84 f. ; il.

Orientadora: Profa. Dra. Carina da Silva Pinheiro.

Co-orientadora: Profa. Dra. Neuza Maria Alcântara Neves.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2015.

1. Microbiota. 2. Pele. 3. Bactérias. 4. Imunomodulação. 5. Asma. I. Pinheiro, Carina da Silva. II. Neves, Neuza Maria Alcântara. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 606

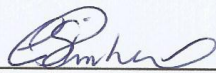
TALITA FERREIRA COSTA


**Investigação de associação entre microbioma da pele e
fenótipos de asma em crianças e adolescentes do
município de Salvador, Bahia**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia pelo Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 30 de outubro de 2015.

BANCA EXAMINADORA:

Carina da Silva Pinheiro – Orientadora 
Doutorado em Biomedicina pelo Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte, Brasil.
Universidade Federal da Bahia.

Suzana Telles da Cunha Lima 
Doutorado em Biologia Vegetal pela Universidade Estadual de Campinas, Brasil
Universidade Federal da Bahia.

Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil 
Doutorado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasil

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pelas oportunidades que me foram concedidas, tornando este momento possível.

À minha família e incluindo meus queridos sogros, Aline, Rogério e pequeno Arthur, pela força, mesmo à distância. Em especial agradeço à minha mãe Márcia, irmã Sábata e Dinda Marga, pelo apoio as minhas decisões, por sempre estarem presentes nas minhas lutas, e serem meu porto seguro.

Ao meu noivo, Rafael, pelo incentivo e cuidado diários, e por ser exemplo de persistência na busca daquilo que almejamos.

Aos colegas do LAA: pelo acolhimento das meninas do SCAALA, Alana, Flávia e Emília; pelo auxílio de bancada do pessoal da biologia molecular, Samara, Leonardo Nascimento, Eduardo e Cíntia. Aos demais colegas, pela companhia do dia-a-dia, em especial aos meus “irmãos científicos” Camile e Leonardo Santiago.

Jamais me esqueceria do grande auxílio dos meus ICs: Daniele, que me acompanhou no início do SCAALA 2013; José e Genazio, com a coleta da microbiota; e a querida Thainah, me ajudando nas extrações e PCRs. Muito obrigada!

Aos professores da minha banca de qualificação, pelas correções e sugestões pertinentes, Dr. Milton Roque e Dr. Luís Pacheco. Ao auxílio das orientadas do Dr. Milton: Aldinéia, Jamile, Brena, Diana e Carla.

Finalmente, agradeço à minha orientadora Dra. Carina da Silva Pinheiro, pela dedicação, flexibilidade, acessibilidade, por acreditar na minha capacidade, e fazer parte desse título. Sua orientação foi riquíssima para meu aprendizado científico. À co-orientadora Dra. Neuza Maria Alcântara-Neves, por abrir as portas de seu laboratório e confiar na execução deste projeto.

Obrigada às agências de fomento, FAPESB, CAPES, pelo financiamento deste projeto e ao grupo SCAALA. Enfim, agradeço a todos aqueles que torceram por mim. Muito obrigada!

“O homem precisa entender, que de sua boa convivência com a natureza, depende sua subsistência e que a destruição da natureza é sua própria destruição, pois a sua essência é a natureza, a sua origem e o seu fim.”

(Elizabeth Jhin)

Silva, Talita Ferreira Costa da. Investigação de associação entre microbioma da pele e fenótipos de asma em crianças e adolescentes do município de Salvador, Bahia. 84 f.; il. 2015. Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências e Saúde. Universidade Federal da Bahia, Salvador 2015.

RESUMO

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas associada a remodelamento destas vias, levando a hiperatividade brônquica e hipersecreção mucosa. Fatores relacionados ao ambiente, como sensibilização alérgica a moléculas proteicas de diversos organismos e produtos químicos, e indivíduos com susceptibilidade genética para responder a estes estímulos com produção de IgE, podem desencadear a doença. Diferentes fenótipos de asma predominam em diferentes configurações e estão associados a distintas etiologias e mecanismos causais. O papel do sistema imune inato no desenvolvimento de doenças alérgicas tem sido investigado e se observou que moléculas de patógenos e comensais podem modular o sistema imune adaptativo via interação com componentes do sistema imune inato. Baseando-se na hipótese da higiene, supõe-se que crianças que crescem em ambiente com abundância de microrganismos, protegem-se da sensibilização alérgica. Corroborando esta hipótese, um estudo, realizado na Finlândia, detectou em uma maior frequência a bactéria *Acinetobacter* sp. na microbiota da pele de adolescentes que viviam perto das florestas e que apresentavam uma maior produção de IL-10, quando comparados a adolescentes alérgicos de áreas urbanas no mesmo país. Diante disso, o presente estudo tem como objetivo avaliar a microbiota cultivável da pele, de 50 indivíduos do município de Salvador-Bahia, pertencentes a um estudo prospectivo sobre alergias respiratórias através de metagenômica. Esses indivíduos foram divididos em cinco grupos (saudáveis, atópicos, asmáticos atópicos, asmáticos não atópicos e asmáticos remissivos) e subdivididos por sexo. Para a divisão dos pacientes dentro de cada grupo foi utilizado um inquérito epidemiológico para doenças alérgicas, e o diagnóstico de atopia foi realizado por teste cutâneo, e dosagem de IgE específica anti-aeroalérgenos regionais. A microbiota da pele foi coletada do antebraço, cultivada em meio BHI, e o DNA bacteriano extraído utilizando kit de extração comercial. Foram efetuados PCR com iniciadores universais para a região 16S do rRNA, e sequenciamento do DNA de cada grupo, na plataforma 454 GS-FLX *Titanium*, por empresa especializada. O resultado do sequenciamento do DNA das bactérias cultiváveis da pele resultou na identificação de 27 gêneros bacterianos na microbiota de pele dos grupos em estudo. 5 gêneros predominaram, sendo altamente presentes na natureza: *Bacillus*, *Enterobacter*, e *Staphylococcus*, gêneros oportunistas patogênicos; e *Acinetobacter* e *Pseudomonas*, espécies que apresentam ação anti-inflamatória. Foi encontrada uma microbiota diferente entre os sexos masculino e feminino, dos quais se sobressaíram *Enterobacter* e *Klebsiella* no sexo feminino, gêneros comuns de infecções do trato urinogenital feminino; e algumas espécies do gênero *Staphylococcus*, no sexo masculino, que são bactérias que comumente habitam ambientes com suor e sebo. Nos indivíduos asmáticos ressaltaram-se gêneros bacterianos de característica oportunista: *Streptococcus*, *Aerococcus* e a espécie *Streptococcus thermophilus*. No grupo atópico do sexo masculino se obteve a bactéria *Clostridium*, a qual já foi identificada em indivíduos atópicos do meio rural. Em indivíduos saudáveis, sendo eles não atópicos não

asmáticos e asmáticos remissivos, identificou-se em comum, com maior número de leituras de OTUs (*operational taxonomic units*), a bactéria *Acinetobacter* que está associada à expressão de moléculas anti-inflamatórias contra doenças alérgicas. Separando os grupos, o grupo asmático remissivo teve a maior diversidade de bactérias, com uma espécie bacteriana de ação antimicrobiana, o *Bacillus pumilus*, que também está presente no grupo de saudáveis. O grupo dos saudáveis por sua vez apresentou 3 espécies com potencial modulatório: *Leuconostoc pseudomesenteroides* com propriedades de ação modulatória para finalidade terapêutica de doenças relacionadas com obesidade; *Pantoea agglomerans* que contem a substância IP-PA1 que já foi descrita na literatura como ativadora de macrófagos levando a um equilíbrio da respostas imune Th1/Th2; e *Acinetobacter* spp. A identificação de espécies de bactérias nos grupos de indivíduos saudáveis e remissivos, nesse trabalho, corrobora a hipótese de que a microbiota do indivíduo pode influenciar no desenvolvimento ou remissão da asma. A identificação das moléculas presentes nessas espécies que estão envolvidas no processo de imunomodulação e suas expressões na forma recombinante poderão ter utilidade no desenvolvimento de novos arsenais terapêuticos e profiláticos para a asma e outras doenças inflamatórias.

Palavras-chave: Microbiota, Pele, Bactérias, Imunomodulação, Asma e Atopia.

Silva, Talita Ferreira Costa da. Association research between skin microbiome and phenotypes of asthma in children and adolescents of the city of Salvador, Bahia. 84 pp. ill. 2015. Master Dissertation. Instituto de Ciências e Saúde. Universidade Federal da Bahia, Salvador 2015.

ABSTRACT

Asthma is a chronic inflammatory disease of the airways associated with airway remodeling leading to bronchial hyperactivity and mucus hypersecretion. Factors related to the environment can trigger the disease such as allergic sensitization to proteins of various organisms, chemicals and individuals with genetic susceptibility to respond to these stimuli with production of IgE. Different asthma phenotypes predominate in different configurations and are associated with distinct etiologies and causal mechanisms. The role of the innate immune system in the development of allergic diseases has been investigated and it was observed that pathogens and commensals molecules can modulate the adaptive immune system through interaction with components of the innate immune system. Based on the hygiene hypothesis assumed that children who grow up in an environment with a high number of microorganisms protects themselves from allergic sensitization. Corroborating this hypothesis, a study conducted in Finland found at a higher frequency the *Acinetobacter* sp. bacterium in microbiota skin of teenagers living near forests which has higher levels of IL-10 when compared to allergic teenagers from urban areas in the same country. Thus, the present study aims to evaluate the skin cultivable microbiota of 50 individuals in Salvador city/Bahia, belonging to a prospective study of respiratory allergies with metagenomics assays. These individuals were divided into five groups (healthy, atopic, atopic asthma, atopic non asthma and remissive asthma) and divided by gender. For the patients division in each group, it was used an epidemiological survey for allergic diseases, and the atopy diagnosis was conducted by skin test, and measurement of regional anti-allergens IgE specific. The skin bacterial flora was collected from the forearm, cultivated in BHI medium, and bacterial DNA extracted using a commercial extraction kit. PCR were performed using universal primers for the 16S rRNA region, and DNA sequencing from each group was conducted in 454 GS-FLX Titanium platform by a specialized company. The result of the DNA sequencing of cultivable skin bacteria resulted in the identification of 27 bacterial genera in the skin microbiota of the studied groups. In the groups we observed five genus predominated: *Bacillus*, *Enterobacter*, and *Staphylococcus*, opportunistic pathogenic genus; and *Acinetobacter* and *Pseudomonas* species with anti-inflammatory action. A different microbiota was found between male and female, which stood out *Enterobacter* and *Klebsiella* in females, common genus of female urinogenital tract infections; and some species of *Staphylococcus* genus, in males, which are bacteria that commonly inhabit environments with sweat and sebum. In asthmatic subjects stressed up bacteria genus with opportunist feature: *Streptococcus*, *Aerococcus* and *Streptococcus thermophilus*. In the atopic group male was obtained *Clostridium* bacteria, which has been identified in atopic individuals in rural areas. In healthy individuals, the groups non-atopic non-asthmatic and remissives asthma, were identified in common a more reading numbers OTUs (operational taxonomic units) of the *Acinetobacter* bacteria that is associated with the expression of anti-inflammatory molecules against allergic diseases. Separating the groups, the remissive asthmatic group had the greater

diversity of bacteria, where *Bacillus pumilus*, which is present in the healthy group with antimicrobial action of bacterial species. The healthy group presented three species potentially modulatory: *Leuconostoc pseudomesenteroides* with modulatory action properties for therapeutic purposes of diseases related to obesity; *Pantoea agglomerans* contains the IP PA1-substance which has been described in the literature as activating macrophages leading to a balance on immune responses Th1 /Th2; and *Acinetobacter* spp. The identification of species of bacteria in the groups of healthy individuals and remissive confirm the hypothesis that the individual's microbiota can influence the development or remission of asthma. The identification of the molecules in these species which are involved in immunomodulation process and their expression in recombinant form may have utility to the development of new prophylactic and therapeutic arsenals to asthma and other inflammatory diseases.

Keywords: Microbiota, Skin, Bacteria, Immunomodulation, Asthma and Atopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Resposta Imunológica do tipo Th2.....	23
Figura 2 - Modelo esquemático da hipótese de tolerância a antígenos.	23
Figura 3 - Modelo esquemático da histologia da pele visto em secção transversal mostrando onde os microrganismos podem habitar os anexos cutâneos.....	29
Figura 4 - Amplificação do DNA genômico de cada grupo, utilizando iniciadores universais bacterianos modificados nas regiões V1-V3 do gene 16S do rRNA, resultando em sequência de 400pb.	39
Figura 5 - Distribuição da frequência do número de leituras de OTUs de classes bacterianas encontradas na microbiota cultivável da pele em grupos com diferentes desfechos de atopia e asma.....	41
Figura 6 - Abundância relativa dos gêneros das bactérias encontradas nas amostras de microbiota cultivável da pele.	41
Figura 7 - Comparação dos gêneros encontrados na microbiota da pele do antebraço com bancos de OTUs presentes na literatura atual de microbiota da pele do antebraço, e microbiota da pele	42
Figura 8 - Índices de diversidade de Shannon e Simpson das espécies de bactérias identificadas nos diferentes grupos de atopia e asma.....	42
Figura 9 - Diagrama de Venn com distribuição de todas as espécies identificadas na microbiota cultivável da pele, agrupadas por perfil.....	43
Figura 10 - OTU HeatMap das espécies bacterianas que apresentaram mais de 300 leituras entre os grupos analisados.....	44
Figura 11 - Espécies bacterianas encontradas na microbiota da pele de todos os grupos de diferentes desfechos de atopia e asma.	45
Figura 12 - Distribuição dos gêneros bacterianos identificados nos indivíduos com diferentes perfis de asma e atopia, divididos em sexo Feminino e sexo Masculino..	46
Figura 13 - Diagrama de Venn das bactérias distribuídas entre os grupos não atópico Asmático e Atópico asmático não Remissivo.	48
Figura 14 - Diagrama de Venn com distribuição dos gêneros de bactéria encontrados na microbiota da pele de indivíduos com asma e saudáveis.	48
Figura 15 - Diagrama de Venn com distribuição das bactérias encontradas na microbiota da pele de indivíduos com atopia e saudáveis..	50
Figura 16 - Diagrama de Venn com distribuição dos gêneros de bactéria encontrados na microbiota da pele de indivíduos com atopia e saudáveis	51
Figura 17 - Diagrama de Venn com distribuição de gêneros bacterianos entre os grupos Saudáveis e Não Atópicos Asmáticos	51
Figura 18 - Bactérias encontradas na microbiota da pele de indivíduos sem asma..	53
Figura 19 - Diagrama de Venn com distribuição dos gêneros bacterianos entre os grupos Atópico Asmático Remissivo e Atópico não Asmático.....	54
Figura 20 - Diagrama de Venn com distribuição de todas as espécies identificadas na microbiota da pele agrupadas por perfil	54
Figura 21 - Aprovação do Comitê de Ética do Instituto de Saúde Coletiva da UFBA e do Comitê Nacional de Pesquisa	76
Figura 22 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE	77

Figura 23 - Modelo de asma do questionário padrão do <i>International Study of Asthma and Allergies and Childhood</i> e notas utilizadas para o cálculo de escore global	78
Figura 24 – Abundância relativa das espécies bacterianas encontradas nas amostras de microbiota da pele.	80
Figura 25 - Distribuição das espécies bacterianas identificados em indivíduos com diferentes perfis de asma e atopia, divididos em sexo Feminino e sexo Masculino..	81
Figura 26 - Diagrama de Venn com distribuição das bactérias encontradas nos grupos Atópico Asmático Remissivo e Atópico Asmático não Remissivo.	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação fenótipo de asma.....	34
Tabela 2 - Concentração de reagentes utilizados para amplificação do DNA extraído	36
Tabela 3 - Diferentes perfis de atopia e asma e suas respectivas abreviações.....	38
Tabela 4 - Resultados dos Clusters e Pré-Processamento do sequenciamento do DNA das bactérias presentes na pele de indivíduos com diferentes perfis de asma e atopia	40
Tabela 5 - Lista de gêneros bacterianos encontrados na microbiota da pele agrupados por grupos AtAsmnR, NAtAsm e Saud.....	49
Tabela 6 - Lista de e gêneros bacterianos encontrados na microbiota da pele agrupados por grupos AtAsmnR, AtnAsm e Saud.	51

ANEXOS

Tabela 7 – Concentração (ug/ml) e Razão 260/280nm do DNA genômico extraído das amostras de cultivo de swab da pele de pacientes de diferentes perfis de asma e atopia, obtidas pela utilização de espectrofotômetro.....	78
Tabela 8 - Lista das espécies bacterianas identificadas na microbiota da pele agrupadas por grupo	79
Tabela 9 - Lista de espécies bacterianas encontradas na microbiota da pele agrupadas por grupos Atópicos Asmático não Remissivo (AtAsmnR) e Não Atópico Asmático (NAtAsm)	79
Tabela 10 - Lista de espécies bacterianas encontradas em comum na microbiota da pele nos grupos Não Atópico Asmático e Atópico Asmático não remissivo, agrupadas sexo Feminino e Masculino.	80
Tabela 11 - Lista de espécies bacterianas encontrados na microbiota da pele agrupados por grupos AtAsmnR e AtnAsm.....	82
Tabela 12 - Lista de espécies bacterianas encontradas na microbiota da pele agrupadas por grupos Atópicos Asmático Remissivo (AtAsmR) e Saudáveis (Saud)..	82
Tabela 13 - Lista de espécies encontradas nos grupos Atópico asmático Remissivo (AtAsmR) e Atópico Asmático não Remissivo (AtAsmnR)	83
Tabela 14- Lista das gêneros bacterianos identificadas na microbiota da pele agrupadas por grupo de atopia e asma.....	84
Tabela 15 - Gêneros e Espécies identificados por grupo	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ahr	Receptor de aril hidrocarboneto
AtAsmnR0	Grupo Atópico Asmático não Remissivo Feminino
AtAsmnR1	Grupo Atópico Asmático não Remissivo Masculino
AtAsmR0	Grupo Atópico Asmático Remissivo Feminino
AtAsmR1	Grupo Atópico Asmático Remissivo Masculino
AtnAsm0	Grupo Atópico não Asmático Feminino
AtnAsm1	Grupo Atópico não Asmático Masculino
BHI	Brain Heart Infusion
DNA	Ácido desoxirribonucleico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Ig	Imunoglobulinas
IL	Interleucina
IFN- γ	Interferon gama
ISAAC	International Study of Asthma and Allergies in Childhood
LPS	Lipossacarídeos
NAtAsm0	Grupo Não Atópico Asmático Feminino
NAtasm1	Grupo Não Atópico Asmático Masculino
OTU	Do inglês <i>operational taxonomic units</i> que significa Unidades taxonômicas operacionais
PAMP	Padrão molecular reconhecedor de patógeno
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PCR	Do inglês <i>Polymerase Reaction Chain</i> que significa reação em cadeia da polimerase
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribossomal
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
Saud0	Grupo Saudável Feminino (Não Atópico não Asmático)
Saud1	Grupo Saudável Masculino (Não Atópico não Asmático)
SCAALA	Social Changes, Asthma and Allergy in America Latina
TLR	Toll like receptor
TNF- β 1	Fator de necrose tumoral beta 1
TPC	Testes de punctura cutânea
Treg	Célula T regulatória
UFBA	Universidade Federal da Bahia

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
2.	OBJETIVOS	19
2.1	Geral	19
2.2	Específicos	19
3.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
3.1	Asma.....	19
3.1.1	Como as citocinas se associam a atopia e asma	21
3.1.2	Asma em países em desenvolvimento	24
3.2	Hipótese da Higiene.....	24
3.3	Biodiversidade da microbiota humana e sua correlação com a defesa contra patógenos.....	26
3.3.1	Microbiota da pele	28
3.3.2	Bactérias com ação imunorregulatória para doenças alérgicas	30
3.4	Identificação bacteriana através da metagenômica	31
4.	METODOLOGIA	32
4.1	Caracterização da população de estudo	32
4.2	Parâmetros para inclusão de pacientes	34
4.3	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE.....	35
4.4	Coleta do material para análise da biodiversidade da pele	35
4.5	Extração, amplificação do DNA bacteriano	35
4.6	Sequenciamento do DNA bacteriano	36
4.7	Dosagem de imunoglobulinas e citocinas	37
4.8	Análise dos dados.....	37
5.	RESULTADOS.....	37
5.1	Definição da População	37
5.2	Análise do DNA.....	38
5.3	Abundância e Diversidade da Microbiota	39
5.4	Taxonomia dos microrganismos	42
5.5	Identificação das bactérias por grupo.....	45
5.5.1	Diferenciação das bactérias cultiváveis identificadas nos sexos feminino e masculino	45
5.5.2	Identificação das bactérias cultiváveis em indivíduos atópicos	47
5.5.3	Identificação das bactérias cultiváveis em indivíduos asmáticos.....	49
5.5.4	Comparação entre grupos Remissivos e Saudáveis	52
6.	DISCUSSÃO	54
6.1	População do estudo.....	54
6.2	Abundância e Diversidade das bactérias cultiváveis identificadas na microbiota da pele de diferentes perfis de atopia e asma.....	55
6.3	Gêneros identificados na microbiota da pele relacionados à asma e atopia.....	56
6.4	Espécies mais encontradas na microbiota da pele da população em estudo.....	57
6.5	Diversidade de bactérias cultiváveis no sexo feminino e sexo masculino....	59
6.6	Diversidade de bactérias nos indivíduos atópicos.....	60
6.7	Bactérias da microbiota de asmáticos.....	61
6.8	Diversidade de bactérias cultiváveis nos indivíduos remissivos e saudáveis.....	62
7.	CONCLUSÃO	65
8.	PERSPECTIVAS.....	66

REFERÊNCIAS.....	67
ANEXO A	76
ANEXO B	77
ANEXO C	78
ANEXO D	79
ANEXO E	80
ANEXO F.....	81
ANEXO G.....	82
ANEXO H	83
ANEXO I.....	84

1. INTRODUÇÃO

A asma alérgica e outras alergias estão aumentando em prevalência e gravidade em todo o mundo (ASHER et al., 2006). Em 2050, podemos prever que dois terços da população humana global viverão em áreas urbanas com pouco espaço verde e pouco contato com a natureza e biodiversidade. E ao mesmo tempo, uma fração cada vez maior da população urbana sofrerá de desordens inflamatórias crônicas (HANSKI et al., 2012). Atualmente os medicamentos disponíveis, como anti-histamínicos e corticosteroides (GROOT KORMELINK et al., 2009), ainda que gratuitos, são dispensados de forma irregular pelas farmácias públicas, não são suficientes para toda a população afetada, e são acompanhados de efeitos secundários indesejáveis (DE SOUZA-MACHADO; SOUZA-MACHADO; CRUZ, 2012), que podem ser locais como disfonia e candidíase, e/ou sistêmicos como hipertensão arterial, osteoporose, catarata, adelgação da pele (GEDDES, 1992). Os fatores que levam a elas podem ser divididos em dois. O primeiro é o contínuo declínio da biodiversidade causado por ações humanas (VON HERTZEN; HANSKI; HAAHTELA, 2011), como o alto consumo de recursos naturais, inserção de espécies exóticas invasoras, ou ainda a superexploração (BUTCHART et al., 2010). E o outro fator é o rápido aumento das doenças crônicas associadas à inflamação - função fundamental na asma, doenças alérgicas e doenças autoimunes (VON HERTZEN et al., 2011). Os processos que interligam a saúde humana e as mudanças ambientais, as quais atualmente estão levando a uma diminuição do número e diversidade da microbiota, são multifacetados, complexos e difíceis para serem examinados experimentalmente, mas estudos prévios tem mostrado o papel fundamental dos microrganismos comensais do corpo humano (HANSKI et al., 2012), como é observado na microbiota do intestino, trato respiratório e, recentemente, na pele. Esse comensalismo é resultado de uma coevolução de milênios, do qual aprimorou a relação entre as espécies, notando-se que os microrganismos não provocam a resposta imune, e sim induzem circuitos imunorregulatórios (VON HERTZEN et al., 2011). O entendimento atual é que a exposição a microrganismos ou produtos microbianos no início da vida pode estimular o sistema imune, resultando em alta regulação de células do tipo Th-1 (células responsáveis pelo reconhecimento de antígenos microbianos e ativação de fagócitos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012))

e em contrapartida, uma baixa regulação de células do tipo Th-2 (células responsáveis pela produção de anticorpos imunoglobulinas do tipo E (IgE) e ativação de eosinófilos (WILLS-KARP; SANTELIZ; KARP, 2001), reduzindo assim a propensão de desenvolver doenças atópicas mediadas por IgE (WONG; CHOW, 2008) (a atopia é definida como propensão genética, geralmente na infância ou adolescência, do indivíduo ser susceptível a produzir em excesso anticorpos IgE, em resposta a antígenos ambientais comuns, denominados alérgenos de modo geral inócuos para os indivíduos não-atópicos (JOHANSSON et al., 2003)). Portanto identificar quem são estes microrganismos que auxiliam na defesa contra doenças e participam da ontogenia do sistema imunológico é crucial para avanços clínicos em direção ao tratamento de doenças auto-imunes e inflamatórias (LEE; MAZMANIAN, 2010).

Em um estudo realizado na Finlândia para avaliar a relação entre infecções e alergia em 118 indivíduos, foi observado que a prevalência de *Acinetobacter* sp. (pertencente à classe Gammaproteobacteria) na microbiota da pele, era maior nos adolescentes que viviam próximos às florestas, e estes apresentaram maior produção da interleucina 10 (IL-10) (inibidor de macrófagos e células dendríticas ativadas, envolvido no controle de reações da imunidade inata e na imunidade mediada por células (ABBAS et al., 2012)) do que adolescentes alérgicos de áreas urbanas (HANSKI et al., 2012). Estes dados apesar de interessantes compararam indivíduos saudáveis (controles) da área rural com indivíduos atópicos (alvos) de área urbana, isto é, indivíduos de fenótipos distintos em ambientes diferentes, conduzindo a um resultado de melhor resposta a alergia em indivíduos que moravam próximo às florestas. Além disso, os dados foram obtidos na Europa, portanto dados provenientes de países desenvolvidos e foi estudado apenas o fenótipo de predisposição a doença que é a atopia. Diante disso, o presente estudo tem como objetivo avaliar a microbiota cultivável da pele de 50 indivíduos do município de Salvador-Bahia, subdivididos em cinco grupos com diferentes fenótipos de atopia e asma. Este estudo é um estudo inovador, pois foi realizado em uma população de um país em desenvolvimento, além do mais se investigará a associação entre a microbiota de pele com os desfechos de atopia, asma atópica e não atópica.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Identificar a microbiota cultivável da pele do antebraço de indivíduos com diferentes fenótipos de asma e atopia provenientes do município de Salvador-Ba, pertencentes à um estudo prospectivo sobre alergias respiratórias (SCAALA – *Social Changes, Asthma and Allergy in America Latina*).

2.2 Específicos

- Coleta de amostra de 240 indivíduos participantes do SCAALA da microbiota da pele do antebraço por meio de esfregaço utilizando *swab*.
- Dosagem de IgE total e de IgE anti-aeroalérgenos e contagem de eosinófilos de 240 indivíduos participantes do SCAALA.
- Classificar os indivíduos em 5 grupos de diferentes fenótipos de asma e atopia utilizando os valores de IgE e inquérito epidemiológico em cinco grupos.
- Extrair o DNA (ácido desoxirribonucleico) bacteriano pós cultivo em meio BHI, utilizando kit comercial.
- Identificar a microbiota da pele por meio de sequenciamento de parte do gene 16S do rRNA de bactérias, utilizando iniciadores para as regiões V1 e V3 do rRNA.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Asma

A asma é definida como uma doença inflamatória crônica que apresenta desordens nas vias aéreas, com hiper-reatividade brônquica, devido à hipertrofia do músculo liso levando ao espessamento da parede brônquica, bem como aumento da vascularização; e hipersecreção mucosa, causada pela infiltração da submucosa e epitélio brônquico com eosinófilos, monócitos e linfócitos (BUTCHART et al., 2010).

Em um perfil imunológico asmático alérgico, o que ocorre é a produção de citocinas Th-2, como interleucinas IL-4 e IL-13, que regulam a mudança de classe de anticorpos IgE (WILLS-KARP; SANTELIZ; KARP, 2001), que por sua vez, promovem a diferenciação e crescimento de mastócitos e eosinófilos, e ainda a inibição da ação dos fagócitos (ROMAGNANI, 2004). A IL-5 leva também a diferenciação, recrutamento e ativação de eosinófilos (WILLS-KARP et al., 2001).

Clinicamente, a asma é caracterizada pela falta de ar, chiados, aperto no peito e tosse. Diversos fatores podem influenciar a chance de o indivíduo desencadear a doença, assim como fatores relacionados ao ambiente, como a sensibilização alérgica a agentes físicos, químicos, à poluição do ar, infecções respiratórias, e ainda propensão genética (WELTE; GRONEGERG, 2006). No estudo ISAAC (*International Study of Asthma and Allergies in Childhood*) a asma foi associada positivamente à alta exposição de tráfego, exposição à fumaça do tabaco, umidade em casas, uso de paracetamol, uso de antibióticos, consumo de *fast food*, e obesidade, por outro lado, a doença foi associada inversamente ao consumo de vegetais e frutas frescas (ASHER; PEARCE, 2014). Diferentes fenótipos de asma podem predominar em diferentes configurações e estar associados a fatores etiológicos distintos e mecanismos causais (SOUZA DA CUNHA et al., 2010). Na maioria dos casos a asma é considerada alérgica, onde os casos de asma não alérgica não são bem definidos, porém as alterações inflamatórias são similares em ambos os casos (JOHANSSON et al., 2003), com pequenas variações como alto número de neutrófilos em asmáticos alérgicos não-atópicos (GROOT KORMELINK et al., 2009). Além do mais, a asma alérgica ainda pode ser ou não mediada por IgE (JOHANSSON et al., 2003), onde casos de asma não mediada por IgE podem ser mediadas por IgG, por exemplo, ou acompanhar outras doenças como obesidade (BLANKESTIJN et al., 2014) e esofagite eosinofílica (CIANFERONI; SPERGEL, 2015).

Na asma atopia, ocorre uma predisposição genética, que geralmente, é expressa durante a infância ou adolescência, do qual o indivíduo responde a exposição à alérgenos com alta produção de IgE, conseqüentemente, estas pessoas podem desenvolver sintomas típicos da doença (JOHANSSON et al., 2003). Em particular, os casos de asma atribuível à atopia tem se mostrado altamente variáveis e as evidências existentes, sugerem que, nos países latino-americanos a maioria

dos casos de asma em crianças parece não ser associados com atopia (SOUZA DA CUNHA et al., 2010).

3.1.1 Como as citocinas se associam a atopia e asma

Na asma atópica, a polarização de células Th2 estimula as respostas mediadas por anticorpos IgE, ativa mastócitos, promove a eosinofilia tecidual e a hiper-reatividade brônquica. As IgEs circulantes se ligam aos receptores de alta afinidade presentes na superfície de mastócitos, que ativados liberam mediadores e citocinas. Os mediadores produzidos e liberados causam uma lesão tecidual, caracterizando e modulando o processo inflamatório. Após a exposição ao alérgeno e a subsequente sensibilização, ocorre à liberação de um grupo de citocinas: IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL13 e GM-CSF, produzidas por células Th2 e que apesar de não serem exclusivas deste perfil celular, promovem a ativação e proliferação de células do sistema imunológico assim como o recrutamento destas células para as vias aéreas (FINKELMAN et al., 2010). As citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 interagem com receptores para estimular a produção de IgE e aumentar o número de eosinófilos e mastócitos, sendo estes componentes capazes de precipitar a inflamação no trato respiratório (YAZDANBAKHSH, KREMSNER, VAN REE, 2002). A IL-13, por sua vez, também induz as características patofisiológicas da asma de uma maneira que é independente de IgE e eosinófilos, aumentando o teor do muco das vias aéreas, causando a hiper-reatividade brônquica (WILLS-KARP et al., 1998), enquanto, a IL-5 estimula, não somente, o desenvolvimento de eosinófilos, como a sobrevivência, ativação, e resposta a outras citocinas (FINKELMAN et al., 2010) (Figura 1).

O controle das respostas de antígenos diante de doenças alérgicas pelo sistema imunológico se dá através de diferentes subtipos de células regulatórias e supressoras que desempenham papel importante na tolerância periférica, e sua biologia tem sido objeto de intensa investigação. As células T regulatórias (Treg): CD4⁺, CD25⁺ e FOXP3⁺ são as células de maior destaque que suprimem respostas imunológicas, como proliferação e produção de citocinas (MOTTET; GOLSHAYAN, 2007), que do mesmo modo, podem ser inibidas pela ação de IL-10. Esta interleucina tem demonstrado suprimir a inflamação das vias aéreas (WILLS-KARP et al., 2001) (Figura 2).

Todos os mecanismos descritos estão relacionados à asma atópica, entretanto a grande parte da asma na população em estudo é de cunho não atópico (SOUZA DA CUNHA et al., 2010). Resultados preliminares evidenciam o perfil de citocinas Th1 na asma atópica e apontam para um envolvimento do IFN- γ e IL-10 na imunopatologia da asma não atópica, de acordo com estudo na população deste trabalho (FIGUEIREDO et al., 2013).

Outro aspecto que tem sido investigado é o papel do sistema imune inato no desenvolvimento de doenças alérgicas. Onde vem sendo observada a capacidade de moléculas derivadas de patógenos e comensais de modularem o sistema imune adaptativo via interação com componentes da imunidade inata, tais quais os TLRs (BAUER; HANGEL; YU, 2007), e receptores celulares da resposta imune inata tais como: CD14 e colectinas (BEUTLER, 2004). Os TLRs iniciam a resposta imune através do desencadeamento de eventos bioquímicos que induzem padrões moleculares reconhecedores de patógenos – os PAMPs, estes detectam, primeiramente, os patógenos dentro do microambiente de modo a permitir a interdição da infecção. Esta resposta adaptativa depende de citocinas produzidas e reguladas pelo sistema imune inato. Este sistema regula o tipo de células T que serão diferenciadas quando encontrar alérgenos e organismos, derivando um subconjunto de células T (BAUER et al., 2007). Como por exemplo, o TLR2 pode ser considerado como um possível indutor de desvio imune que resulta na asma em humanos (REDECKE et al., 2004). Em contrapartida, o TLR7 é um importante inibidor da asma atópica aguda por meio da inibição da produção de citocinas, e cessando a infiltração celular que conduz a redução na hiper-reatividade das vias aéreas (MOISAN et al., 2006). A estimulação de TLRs pode afetar vários aspectos dos fenótipos da asma, demonstrando serem potentes precursores no tratamento contra a doença.

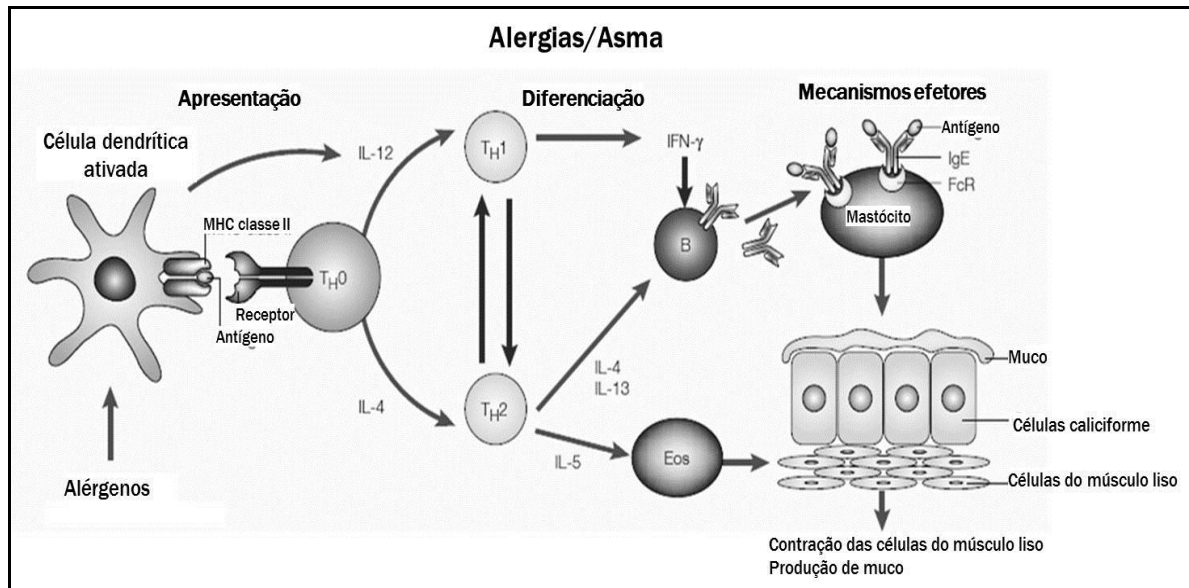


Figura 1 - Resposta Imunológica do tipo Th2. Estimulação de células T por peptídeos derivados de alérgenos, apresentado por células dendríticas por meio de moléculas MHC classe II, resulta na diferenciação de células T CD4 em células produtoras de citocinas Th2. As células Th2 produzem IL-4, IL-13 e IL-5, que regulam a resposta alérgica. IL-4 dirige a diferenciação das células T no sentido de um perfil de citocinas Th2 e atua como um fator de crescimento para a expressão destas células. IL-4 e IL-13 regulam a síntese de IgE por células B. IL-5 regula a diferenciação e a saída dos eosinófilos da medula óssea para o sangue. B= células B; Eos= eosinófilos; FcR= receptor de Fc; IFN- γ = interferon- γ ; MHC classe II= Complexo de histocompatibilidade principal de classe II; TCR= receptor de células T; TH= de célula T Helper. (Fonte: Adaptado de Wills-Karp et al., 2001).

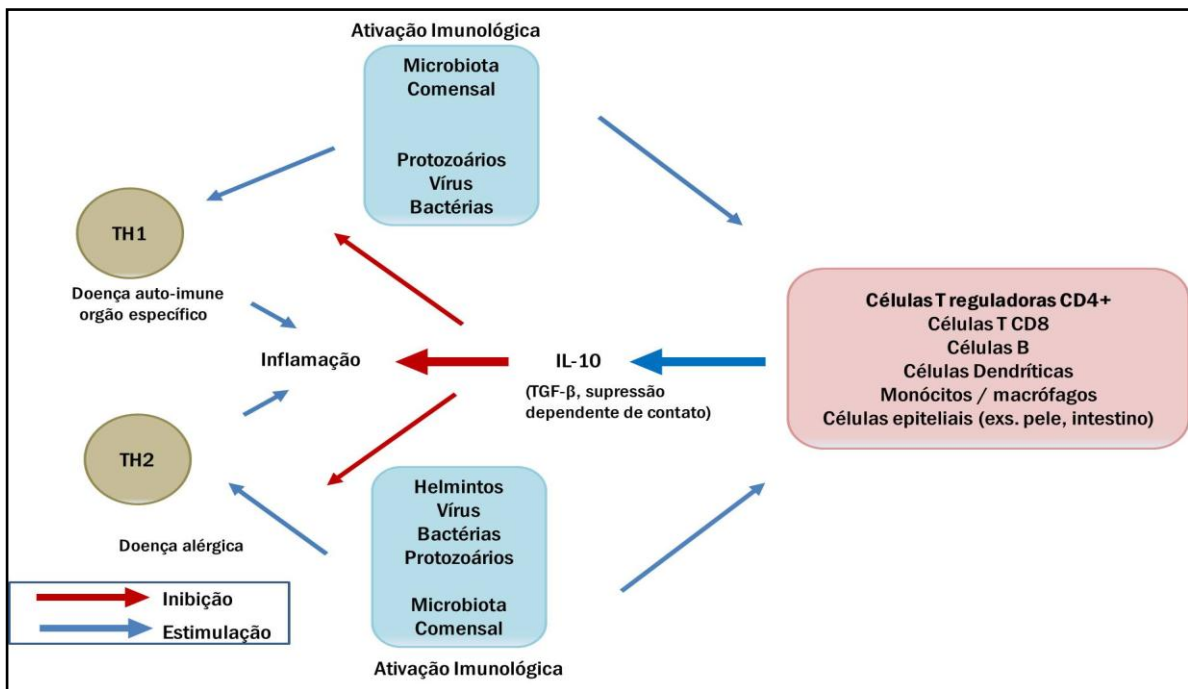


Figura 2 - Modelo esquemático da hipótese de tolerância a antígenos. Interleucina-10 (IL-10) tem um papel homeostático fundamental no controlo de processos inflamatórios. Infecção crônica ou colonização com vários agentes microbianos leva à sobre-regulação da

produção de IL-10, secundariamente, suprimindo alergias e doenças autoimunes. (Fonte: Adaptado de Wills-Karp et al., 2001).

3.1.2 Asma em países em desenvolvimento

Nas sociedades modernas, as doenças respiratórias alérgicas, incluindo asma e rinite, constituem um dos principais problemas de saúde pública e a sua prevalência vem aumentando, desde a década de 70, em todos os lugares do mundo, sem total conhecimento de causa (MARTINEZ, 2008). Estatísticas da Organização Mundial da Saúde (OMS) estimam que 235 milhões de pessoas em todo o mundo sofrem de asma, não sendo apenas um problema de saúde pública para os países de alta renda, como observado na Austrália, Finlândia e Reino Unido, ocorrendo também em países de média-baixa e baixa renda, como Índia, Equador e Brasil, onde ocorre mais de 80% das mortes por asma. A asma e as demais enfermidades atópicas destacam-se como sendo as doenças crônicas mais comuns na infância, afetando também adultos de todas as idades e de todos os grupos étnicos, nos últimos 30 anos (WONG; CHOW, 2008).

O Brasil está entre os países de maior prevalência de sintomas de asma, rinoconjuntivite alérgica e eczema do mundo, de acordo com ISAAC fase II (SEMBAJWE et al., 2010), promovendo a terceira causa de hospitalização e quarta causa de morte por doenças respiratórias no país. Por conseguinte, a região do nordeste brasileiro vem apresentando um aumento no índice de mortalidade por asma (DE SOUZA-MACHADO et al., 2012), onde o município de Salvador emerge como a cidade que possui os maiores riscos para sintomas de asma, entre outros 16 grandes centros da América Latina (COOPER et al., 2009).

3.2 Hipótese da Higiene

Evidências recentes sugerem que a prevalência de doenças alérgicas atópicas aumentou nas últimas décadas, com a expansão da ocidentalização nas populações. Estudos têm revelado variações consideráveis na prevalência de rinite alérgica, eczema e asma em adolescentes e adultos. Estes resultados apontam a importância do papel de fatores ambientais na etiologia da atopia, como a poluição do ar, a exposição à alérgenos, dieta e infecções (SHEIKH; STRACHAN, 2004).

Este conjunto de fatores foi denominado “Hipótese da Higiene”, que postula que as mudanças sociais e culturais associados ao chamado estilo de vida ocidental têm alterado a microbiota humana, especialmente no início da vida, modificando o processo de maturação normal do sistema imune e tornando esse sistema mais susceptível à resposta aos alérgenos, vírus e auto-antígenos (MARTINEZ, 2008).

Strachan, em 1997, foi o primeiro pesquisador a propor esta hipótese, postulando que as novas práticas de higiene e saúde levariam a uma esterilização relativa do ambiente, reduzindo a exposição a componentes bacterianos, virais ou fúngicos, conseqüentemente, reduzindo a capacidade de proporcionar uma prevenção às alergias, estabelecida pelos comensais da microbiota. No decorrer dos anos, vários estudos epidemiológicos vieram sustentar esta hipótese, através de publicações que demonstraram um aumento significativo de doenças alérgicas ao longo das últimas décadas (ASHER et al., 2006), acompanhada por uma enorme diminuição na incidência e prevalência de doenças infecciosas bacterianas e virais, no mesmo período de tempo (BACH, 2002).

Em um estudo realizado na Suíça, foi possível observar que uma constante exposição ao ambiente rural, rico em componentes microbianos, reduz o risco do desenvolvimento de doenças alérgicas em crianças no início da vida (BRAUN-FAHRLANDER et al., 1999), resultado similar ao observado por Hanski e seus colaboradores (2012) na Finlândia. A compreensão dos fatores que estão associados à modulação do sistema imune na primeira infância é muito importante, uma vez que é durante a infância que ocorre a colonização dos microrganismos. Assim, Ege e seus colaboradores (2006) fizeram uma análise da exposição materna a ambientes de riqueza microbiana, onde foi avaliado o contato da grávida ao ambiente rural (contato direto com os animais de fazenda e o consumo de leite orgânico), e durante o período de amamentação, verificando que as exposições contribuíram para a menor prevalência de sensibilização atópica, sintomas e diagnóstico de rinoconjutivite, chiados e diagnóstico de asma em crianças comparado com crianças que não foram expostas aos mesmos estímulos.

Outros fatores também mostraram ser fundamentais para a composição da microbiota natural, por exemplo, a exposição a animais domésticos (gato, cachorro) que reduziram a ocorrência de rinite alérgica e asma em crianças (HESSELMAR et al., 1999), bem como a presença e o número de irmãos pode influenciar a

diversidade e composição da microbiota intestinal infantil, com implicações potenciais para o desenvolvimento de atopia e prevalência de doenças alérgicas (AZAD et al., 2013; WILLS-KARP et al., 2001).

Portanto, diante destas variabilidades, é importante compreender os fatores (fenótipo afetado, tempo, o meio ambiente e a suscetibilidade genética do indivíduo) que estão relacionadas com desenvolvimento e ou proteção para as doenças alérgicas (SCHAUB; LAUENER; VON MUTIUS, 2006).

3.3 Biodiversidade da microbiota humana e sua correlação com a defesa contra patógenos

A microbiota é considerada, por alguns autores, um órgão metabólico, pois executa funções que o organismo humano não desenvolveu, como a capacidade de processar componentes não digeríveis da dieta, devido à ampla presença desses microrganismos no nosso intestino (BACKHED et al., 2004). Existe em torno de 100 trilhões de bactérias por indivíduo, dez vezes o número de células humanas. Em uma amostra de 124 europeus foi identificada em média 1.000 a 1.150 espécies bacterianas. Dados recentes de metagenômica indicam que cada ser humano possui pelo menos 160 espécies de bactérias, que são parcialmente compartilhadas com outros indivíduos (QIN et al., 2010).

Os microrganismos comensais que habitam a superfície interna e externa do corpo humano são participantes ativos no desenvolvimento da tolerância imunológica nos seres humanos, e está cada vez mais claro que a saúde humana depende de ambos os microrganismos comensais e ambientais, incluindo bactérias, fungos, vírus e protozoários microscópicos, embora quase não existam dados disponíveis sobre o papel deste último (VON HERTZEN et al., 2011).

A microbiota estimula o sistema imunológico (INGRAHAM J.; INGRAHAM C., 2011) e esse estímulo, durante a colonização, é essencial para o desenvolvimento de linfócitos e células do sistema imunológico, como *natural killer* e células T e B (LEGATZKI; ROSLER; VON MUTIUS, 2014). Pode-se observar essa ação, em estudos sobre comensais presentes no trato respiratório (BIESBROEK et al., 2014), canal vaginal (RAVEL et al., 2011), intestino (SJOGREN et al., 2009) e na pele (GRICE; SEGRE, 2011).

A principal resposta da microbiota do trato respiratório é a competição contra patógenos, mas quando ocorre o desequilíbrio os comensais residentes atuam como oportunistas (causam doenças que a “oportunidade” adequada fornece, por exemplo, um colapso no sistema imunológico ou tratamento com antibióticos (INGRAHAM J.; INGRAHAM C., 2011)). Esta atuação oportunista foi observada em pandemias de gripe nos anos de 1918, 1919, 1957 e 1968, as quais resultaram em pneumonias bacterianas secundárias causadas por microrganismos residentes do trato respiratório (HILTY et al., 2010), como o *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* e *Staphylococcus aureus* (BOGAERT et al., 2011). A árvore brônquica contém uma barreira de mucosa que pode ser colonizada por microrganismos, Hilty e seus colaboradores (2010) perceberam que entre indivíduos saudáveis e doentes existem microrganismos distintos, e estes podem auxiliar ou não na proteção contra patógenos, portanto é crucial estabelecer uma relação entre hospedeiro e microbiota no início da vida para manutenção da saúde do indivíduo (BIESBROEK et al., 2014).

A microbiota vaginal, também, desempenha um papel fundamental na prevenção de uma série de doenças urogenitais, tais como as vaginoses bacterianas, infecções fúngicas e infecções do trato urinário. Os grandes promotores desta proteção parecem ser, principalmente, *Lactobacillus* sp., que normalmente reduzem o pH do meio ambiente através da produção de ácido láctico, ou produzindo bacteriostáticos e bactericidas, ou ainda através da exclusão competitiva (RAVEL et al., 2011). Estudos já mostraram diferenças entre a microbiota vaginal de mulheres de diferentes grupos raciais/ étnicos em termos das espécies e subespécies bacterianas (ZHOU et al., 2010), mas além de fatores genéticos, hábitos e as práticas humanas, incluindo higiene pessoal, métodos de controle de natalidade, comportamentos sexuais, também podem exercer fortes influências para caracterizar a microbiota da vagina humana (RAVEL et al., 2011). Enquanto a microbiota da vagina é predominada por uma espécie, a comunidade microbiana do intestino consiste em bactérias anaeróbias com 500-1000 espécies, com pelo menos, 10^{13} indivíduos (BACKHED et al., 2004), onde contribuem para obtenção de energia a partir da degradação de polissacarídeos complexos, síntese de ácidos graxos de cadeia curta, aminoácidos e vitaminas indispensáveis. As mudanças da microbiota intestinal podem ser associadas a doenças intestinais ou obesidade (QIN

et al., 2010), por outro lado, tem se analisado que podem prevenir o desenvolvimento de alergias (SJOGREN et al., 2009).

3.3.1 Microbiota da pele

A pele humana possui diversos microambientes, estruturalmente, com uma barreira física, resistindo à penetração de microrganismos e toxinas, mas existe uma camada superior da epiderme constituída por queratinócitos (escamas), que consistem em fibrilas, envolvidas por camadas lipídicas. Ainda possui apêndices, incluindo glândulas sudoríparas écrinas (e apócrinas), glândulas sebáceas e folículos pilosos, favoráveis à adesão de alguns microrganismos (GRICE; SEGRE, 2011) (Figura 3). Deste modo, podemos observar que o ser humano carrega uma impressão digital microbiana, onde pode ser refletida a partir do local que vive, por exemplo (MEADOW et al., 2013), e assim conseqüentemente apresentando respostas diferentes ao encontro com patógenos.

A microbiota da pele tem um papel importante no sistema imune (GRICE et al., 2009), induzindo diversos mecanismos de defesa, como a inibição do crescimento de patógenos através da competição por nutrientes e espaço, que impacta significativamente o potencial de crescimento quando os agentes são introduzidos na superfície da pele (SANFORD; GALLO, 2013).

As bactérias comensais podem produzir proteínas com ação antibiotica, ou seja, possuem um efeito antagonista aos outros microrganismos. As substâncias produzidas por bactérias gram- negativas, por exemplo, geralmente têm uma ampla gama de atividade antibacteriana, e aquelas produzidas por organismos gram-positivos são geralmente eficazes somente contra cepas da mesma espécie ou intimamente relacionadas (bacteriocinas) (ROTH; JAMES, 1988). Grice e seus colaboradores (2011) observaram que *Staphylococcus epidermidis*, um dos membros mais abundantes da microbiota da pele, quando foi introduzido na cavidade nasal de portadores de *S. aureus* resultou na eliminação do patógeno.

A pele, por sua vez, possui anticorpos antibacterianos nas secreções do indivíduo saudável, como anticorpos do tipo IgA que são levados para a superfície por meio do sistema da glândula sudorípara écrina, que pode prevenir infecções.

Mecanismos de apresentação de antígeno, também ocorrem na pele, promovendo a ativação/ diferenciação de células T (ROTH; JAMES, 1988).

Alguns fatores ambientais como a temperatura, umidade e a exposição ao sol, aliados a fatores genéticos como o tipo de pele (seca ou oleosa) irão definir os microrganismos que irão colonizar a pele de cada indivíduo (GAO et al., 2007). Pele oleosa, por exemplo, pode propiciar o crescimento de microrganismos lipofílicos, como o *Propionibacterium* spp. (ROTH; JAMES, 1988), esta espécie de bactéria está presente principalmente em ambientes cutâneos masculinos, devido a maior presença de suor e sebo. A idade é outro fator importante, pois o nascimento, a puberdade ou estado gravídico produzirão diferentes hormônios e em quantidades diferentes (GRICE; SEGRE, 2011). Produtos de higiene pessoal, como sabonete, desodorantes e cosméticos podem eliminar ou selecionar certas bactérias (MCBRIDE; DUNCAN; KNOX, 1977).

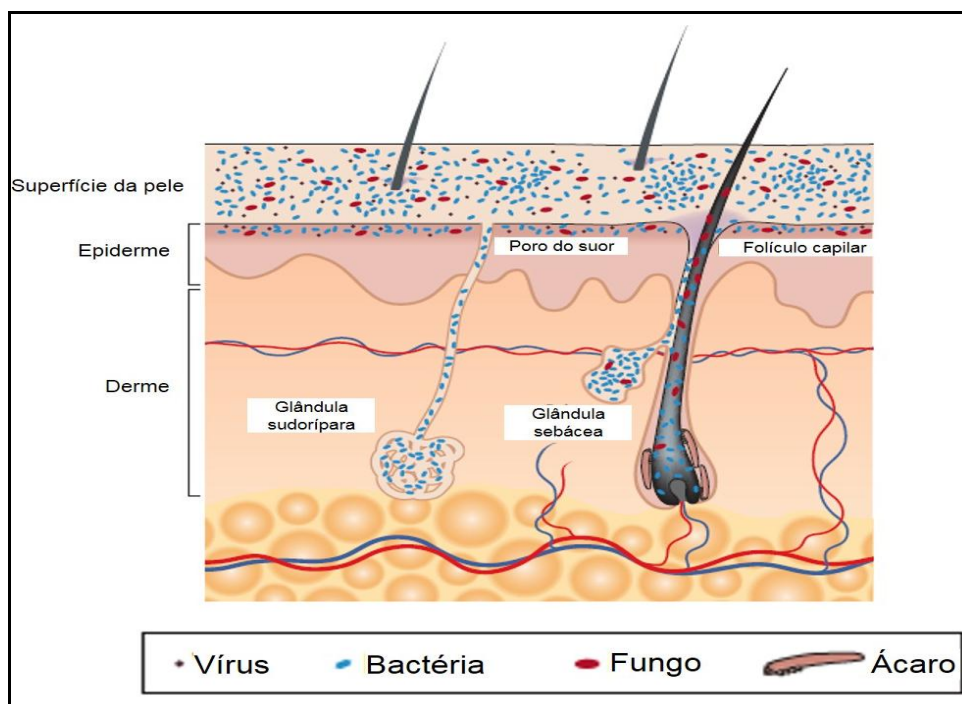


Figura 3 - Modelo esquemático da histologia da pele visto em secção transversal mostrando onde os microrganismos podem habitar os anexos cutâneos. Microrganismos: bactérias, vírus, fungos e ácaros. Anexos da pele incluem folículos capilares, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas. (Fonte: Adaptado de Grice et al., 2011)

3.3.2 Bactérias com ação imunorregulatória para doenças alérgicas

Componentes bacterianos são reconhecidos pelo sistema imune inato na ausência de infecção evidente, e induzem uma resposta inflamatória, levando uma tolerância ao microrganismo (BRAUN-FAHRLÄNDER et al., 2002). Quando indivíduos são expostos, no período pré-natal, ao lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina que compõe a membrana das bactérias, de acordo com Blumer e seus colaboradores (2005), esta endotoxina pode agir como um potente imunomodulador, capaz de inibir o desenvolvimento de doenças alérgicas respiratórias na infância, evitando o desenvolvimento destas no decorrer da vida. Concordando com este exemplo do componente bacteriano, pesquisadores analisaram algumas bactérias que vêm demonstrando esta ação imunorregulatória em doenças alérgicas, como a asma.

A *Acinetobacter*, uma bactéria gram negativa, do grupo das Gammaproteobactérias, é muito abundante da microbiota da pele, de acordo com Hanski e seus colaboradores (2012). Esta bactéria está associada ao estímulo de secreção da IL-10 no PBMC, uma interleucina envolvida no controle de reações da imunidade inata, e Fyhrquist e seus colaboradores (2014) também observaram que a *Acinetobacter* desencadeia uma resposta imune anti-inflamatória do tipo Th1 em queratinócitos humanos e células dendríticas, inibindo o desenvolvimento da inflamação nas vias aéreas em camundongos alérgicos. A espécie *A. Iwoffii* F78 apresentou um efeito protetivo às alergias em humanos (DEBARRY et al., 2010) e na sensibilização pré-natal em camundongos (CONRAD et al., 2009). Essa proteção foi observada devido à polarização da resposta imune para o tipo Th1 realizada pelo LPS (DEBARRY et al., 2010). Outra espécie, a *A. baumannii* possui uma característica oportunista, porém quando tratada com formalina pode inibir significativamente a eosinofilia nas vias aéreas em camundongos (QIU et al., 2011).

Várias pesquisas têm registrado que doenças alérgicas podem ser amenizadas pela ingestão de bactérias ácido lácticas (também denominadas heterofermentativas, bactérias que produzem ácido lático como principal ou único produto do metabolismo fermentativo) ou bifidobactérias, as quais não são patogênicas e são usualmente processadas em alimentos, como no iogurte (HASEGAWA et al., 2009).

O gênero *Lactobacillus* também parece ser um gênero promissor de bactérias imunomodulatórias, ácido-láticas presentes na microbiota intestinal humana. Existem algumas espécies que promovem a diminuição de infecções alérgicas, como a *L. delbrueckii bulgaricus* OLL1073R-1 que diminui a severidade de dermatites alérgicas ou promovem a diminuição de inflamações na pele, atuando na inibição da IL-6, uma citocina pró-inflamatória (KANO et al., 2013). A *L. acidophilus* é uma bactéria utilizada para fermentação de iogurte, e pode gerar um aumento do IFN- γ (interferon gama) e diminuição da eosinofilia (WHEELER et al., 1997). *L. rhamnosus* GG age nos mediadores pró-inflamatórios, induzindo a produção de citocinas de perfil Th1, levando a um aumento da produção de IFN- γ no PBMC em lactentes e crianças com dermatite, diminuindo a frequência da doença (POHJAVUORI et al., 2004). E dentre as bifidobacterias pode-se citar sobre a espécie *Bifidobacterium animalis animalis* IM386 que de acordo com Citar e seus colaboradores (2014) exibiu uma forte regulação negativa das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-12 e maior produção de IL-10.

Entre outras espécies com capacidade de proteção contra doenças alérgicas, a *Lactococcus lactis*, uma bactéria encontrada no ambiente rural, conduz a um desenvolvimento equilibrado das respostas Th1 e Th2, através da maturação de células dendríticas na presença de PAMPs, (DEBARRY et al., 2007). A *Bacillus licheniformis* pode promover a diminuição da eosinofilia e a produção exacerbada de muco, após administração de esporos via intranasal (VOGEL et al., 2008). E a *Pantoea agglomerans*, uma bactéria gram-negativa, simbiótica de vários alimentos, possui uma substância IP-PA1 advinda do LPS, esta sigla IP-PA1 significa *immuno potentiator from P.agglomerans* (imunopotenciador da *P. agglomerans*) pelo fato desta substância ter a capacidade de ativação inicial de macrófagos, proporcionando o equilíbrio das células imune Th1/Th2, consequentemente prevenindo ou recuperando o tecido de infecções, como alergias de pele (KOHCHI et al., 2006; NAKATA; INAGAWA; SOMA, 2011; YOSHIDA et al., 2009).

3.4 Identificação bacteriana através da metagenômica

Metagenômica é uma área da biologia molecular que permite o estudo genômico de microrganismos. Através do uso dessa tecnologia é possível a

identificação de microrganismos diretamente do seu habitat sem a necessidade de cultivo, em um curto intervalo de tempo, e grande precisão. Estas tecnologias estão se expandindo e desvendando o mundo microbiano (WOOLEY; GODZIK; FRIEDBERG, 2010). Avanços tecnológicos fomentaram a revolução no pensamento sobre o mundo microbiológico, uma vez que, acreditava-se que o mundo microbiano já havia sido conquistado, constatado pelo fato de que, a maioria dos microrganismos, já havia sido cultivada em cultura pura (HANDELSMAN, 2004). Foram abordagens como a de Pace e seus colaboradores (1986):

A simples morfologia da maioria dos microrganismos fornece algumas pistas para sua identificação e características fisiológicas são muitas vezes ambíguas. Então, o microbiologista torna-se impossibilitado por essas restrições, uma vez que muitos organismos resistem ao cultivo,

que possibilitaram conceber a necessidade de técnicas não tradicionais de microbiologia para identificação destes organismos. Uma maneira pela qual a metagenômica consegue identificar diferentes microrganismos, é através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando iniciadores universais que reconhecem regiões conservadas do DNA ribossomal (rDNA) como por exemplo, a região 16S em bactérias. Para análises filogenéticas e identificação de clones que pertencem a microrganismos específicos, o DNA é amplificado utilizando iniciadores universais e então sequenciado, para obter informações sobre a diversidade e evolução das populações microbianas.

A metagenômica tem possibilitado uma nova área de descoberta de drogas investigando bactérias simbióticas, uma das principais fontes naturais de produtos terapêuticos e que haviam resistido a análises por meio de técnicas de cultura pura e testes bioquímicos (STEELE; STREIT, 2005). A extração do DNA proveniente da amostra diretamente sem técnicas de cultivo seria a metodologia mais indicada para a identificação de todos os microrganismos na amostra, contudo vários trabalhos mostraram que a metagenômica também pode ser utilizada para a identificação mais precisa de bactérias cultiváveis (FUKUI et al., 2015).

4. METODOLOGIA

4.1 Caracterização da população de estudo

Este estudo foi realizado em crianças que vivem na cidade de Salvador com população de aproximadamente 2,7 milhões de habitantes (IBGE, 2010). Trata-se de um estudo prospectivo conduzido em crianças que participam de dois estudos do Instituto de Saúde Coletiva da UFBA (Universidade Federal da Bahia), coordenados pelo Dr. Maurício L Barreto: A população inicial incluiu 1.445 crianças recrutadas na primeira infância, com 0 a 4 anos, para um estudo prospectivo que visava investigar o impacto de um programa de saneamento realizado em bairros classificados no censo como e, f e g (onde as famílias recebem menos de um salário mínimo com condições sanitárias adversas) (TEIXEIRA MD MDA et al., 2002), na cidade de Salvador, o estudo abordava sobre parasitoses intestinais e diarreia infantil (1998-2002). Questionários padronizados foram aplicados ao responsável legal de cada criança para coletar dados sobre as variáveis demográficas e sociais, bem como sobre dados ambientais (STRINA et al., 2003). Em 2004, as crianças foram convidadas para participar do Programa SCAALA (2005-2010), em 2005, quando as crianças tinham 4-11 anos, foi realizado um inquérito epidemiológico para investigar doenças alérgicas, utilizando questionário do ISAAC fase II, traduzido para português e adaptado (Figura 23 – ANEXO C). Foram feitos testes de punctura cutânea (TPC) para sete aeroalérgenos e coletadas amostras de fezes, sangue e poeira para os seguintes exames: diagnóstico de parasitoses intestinais, sorodiagnóstico de oito infecções, dosagem de IgE específicas para 4 aeroalérgenos mais encontrados no TPC, dosagem de citocinas produzidas por células do sangue periférico estimuladas ou não por antígenos de *Blomia tropicalis*, *Dermatophagoides peronyssinus* e *Ascaris lumbricoides*. As poeiras dos leitos das crianças foram analisadas para a presença de 5 alérgenos (BARRETO et al., 2010).

Para obter dados prospectivos dessa população foi feito inquérito epidemiológico, obtenção de dados de alergia e asma e exames sorológicos para detecção de IgEs específicas desse projeto que foi iniciado no segundo semestre de 2013. Este estudo prospectivo compõe um cenário ideal para o estudo das questões levantadas neste trabalho, permitindo entender como estas exposições, a variedade e quantidade de patógenos associados à pele pode modular a resposta imune produzindo um quadro inflamatório ou alérgico ao longo da infância.

Este trabalho possui aprovação do Comitê de Ética do Instituto de Saúde Coletiva da UFBA e do Comitê Nacional de Pesquisa (CEP/ISC 060-12), e o termo

de consentimento livre e esclarecido foi apropriadamente obtido do responsável legal de cada criança e adolescentes para o inquérito atual (Figura 21 – ANEXO A).

4.2 Parâmetros para inclusão de pacientes

As 1445 crianças e adolescentes do SCAALA foram recontatadas e o questionário do ISAAC fase III foi aplicado. Um inquérito sorológico foi realizado no segundo semestre de 2013, no qual foi coletado sangue para detecção de IgE total e de IgE anti-aeroalérgenos, dosagem de citocinas e quimiocinas e contagem de eosinófilos. Nesta oportunidade, também foi coletado o material de pele para estudo da microbiota de 240 adolescentes subdivididos em 4 grupos de 60 indivíduos cada: não atópico não asmático, não atópico asmático, atópico não asmático e atópico asmático. Para a separação dos fenótipos foram admitidos os seguintes critérios de acordo com: apresentação de nenhum sintoma de asma é considerado não asmático, por conseguinte, se não apresentou sensibilização para IgE e teste negativo para teste cutâneo (TPC) foi classificado como não atópico, sendo identificado no final como não atópico não asmático; o indivíduo que apresentou chiado no peito nos últimos 12 meses e/ou sintomas de asma foi considerado asmático, e sem sensibilização para IgE e TPC negativo, foi identificado como não atópico asmático; o indivíduo que não apresentou sintomas da doença e apresentou sensibilização de IgE para pelo menos um dos 4 aeroalérgenos mais o teste positivo de TPC, foi identificado atópico não asmático; e o indivíduo que apresentou sintomas de asma, sensibilização de IgE e teste positivo de TPC, identificou-se como atópico asmático (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação fenótipo de asma

Fenótipos de asma	Sintoma de asma (questionário ISAAC)	Sensibilização para IgE (2013)	Teste cutâneo (2005)
Atópico asmático	positivo	positivo	positivo
Atópico não asmático	negativo	positivo	positivo
Não atópico asmático	positivo	negativo	negativo
Não atópico não asmático	negativo	negativo	Negativo

4.3 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

Este projeto do SCAALA 2013 foi aprovado pelo comitê de ética do Instituto de Saúde Coletiva da UFBA, e um adendo foi submetido e aprovado, referente ao estudo da microbiota de pele com termo de consentimento para coleta do material para o trabalho (Figura 22 – ANEXO B).

4.4 Coleta do material para análise da biodiversidade da pele

Foram coletadas amostras de 240 indivíduos, sendo 4 grupos com 60 indivíduos cada, com os perfis descritos anteriormente. As amostras da microbiota foram retiradas do antebraço, uma área de fácil acesso e não invasiva, sendo um local do corpo humano que revelou ser muito abundante em espécies bacterianas (OH et al., 2014), e também o local utilizado por outros autores para análise da microbiota da pele de indivíduos atópicos (HANSKI et al, 2012). As amostras foram coletadas da região interna do antebraço, abaixo da fossa cubital, em uma área de 5x5 cm. A região foi friccionada com o *swab* embebido em solução de soro fisiológico estéril e posteriormente cultivadas em meio de cultura BHI (*Brain Heart Infusion* – meio de cultura composto de peptona, dextrose e nutrientes de cérebro e coração de gado) por 24h em agitador orbital a 150 rpm 37°C. Após o cultivo, a amostra foi transferida para microtubo, contendo 30% de glicerol estéril, e posteriormente armazenado em freezer -80°C. Também foi coletada amostra da microbiota do outro antebraço, com *swab* embebido em solução de soro fisiológico e solução estéril de 0,1% de tween 20, para extração de DNA bacteriano do *swab* sem cultivo, do qual não se obteve sucesso.

4.5 Extração, amplificação do DNA bacteriano

A extração do DNA total foi feita a partir dos cultivos dos *swabs* coletados, utilizando um kit comercial da Promega - o *Wizard Genomic DNA Purification Kit*, segundo protocolo disponibilizado pelo fabricante. Para a análise da viabilidade do DNA extraído foram realizados: quantificação do material obtido através de espectrofotômetro (NanoDrop da Thermo Scientific), e amplificação através da

reação em cadeia da polimerase (PCR) em termociclador (Veriti Thermal Cycler), onde se utilizou iniciadores universais bacterianos para as regiões V1 e V3 do gene 16S do rRNA denominados pA (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) e Pd (GTATTACCGCGGCTGCTG), estes iniciadores amplificam um fragmento de aproximadamente 400pb (EDWARDS et al., 1989). A DNA polimerase utilizada para a PCR foi a Taq *platinum* da Invitrogen (Tabela 2), com a seguinte ciclagem: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos: de desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 59°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, finalizando com um ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos.

Tabela 2 - Concentração de reagentes utilizados para amplificação do DNA extraído

Reagentes	Concentração
PCR Buffer 10x	1x
MgSO ₄	50mM
pA	10µM
Pd	10µM
dNTP	10mM
Taq <i>Platinum</i>	0,04U

4.6 Sequenciamento do DNA bacteriano

O DNA referente a cada grupo do estudo foi enviado para o sequenciamento metagenômico em empresa especializada – MacroGen (<http://www.macrogen.com/>). O sequenciamento foi realizado na plataforma 454 GS - FLX *Titanium* (Roche Diagnostics Corporation). Esta plataforma aplica o método de detecção dos nucleotídeos por quimioluminescência, gerando sinais que são analisados na forma de gráficos, estes são convertidos utilizando *softwares* específicos da plataforma gerando as sequências (dados crus). As sequências de um comprimento médio de 330pb são separadas utilizando códigos de barra, e aquelas sequências que ficaram curtas são primeiramente tratadas com o *software* FLASH e após separadas. Para identificação das sequências obtidas foi utilizado um banco de pequenas sequências denominado SILVA (<http://www.arb-silva.de/>), que é um banco on-line, atualizado periodicamente, comparando pequenas sequências de rRNA de 16S e 18S, resultando na identificação dos microrganismos - nas OTUs (OTUs – do inglês “*operational taxonomic unit*”, que denomina Unidades taxonômicas operacionais).

4.7 Dosagem de imunoglobulinas e citocinas

A Dosagem de IgEs específicas para ácaros e baratas, foram estimuladas com antígenos (*Dermatophagoides pteronysinus*, *Blomia tropicalis*, *Blatella germanica*, *Periplaneta americanae*, agonistas de TLR 1 ao 9) para determinação de citocinas e quimiocinas em células do sangue e a mensuração de eosinofilia (hemograma) foi realizada dentro do projeto “Investigação sobre possíveis mecanismos imunológicos associados com o desenvolvimento de atopia e asma em crianças e adolescentes provenientes de Salvador, Bahia, participantes de um estudo prospectivo sobre alergias respiratórias” (BARRETO, et al., 2006)

4.8 Análise dos dados

Distribuição de frequências e estatísticas descritivas foram utilizadas para definição da população e análise do material obtido. Para análise de diversidade foram utilizados os índices de Shannon e Simpson. Para diversidade e abundância foi realizado *heat map*, um mapa com escala de cores para diferenciar em que frequências as sequências de OTUs foram observadas, quanto mais forte a cor maior o número de sequências obtidas, possibilitando a fácil visualização da abundância das bactérias encontradas por grupo (WILKINSON; FRIENDLY, 2009). Para a investigação da interação da microbiota cultivável com a associação entre os desfechos estudados (atopia, asma, asma atópica e asma não atópica) foram utilizadas dois tipos de análises: o Diagrama de Venn, que utiliza círculos para delimitar agrupamentos, sendo possível aplicar diversas combinações (HEBERLE, 2014) e análise de distribuição de frequência.

5. RESULTADOS

5.1 Definição da População

Ao total foram coletadas as amostras de microbiota da pele de 240 indivíduos. Os pacientes inclusos foram os mesmos que foram submetidos ao imunoensaios de

sensibilização dos TLRs, em outro projeto que está sendo realizado em paralelo. Como a população estudada possui perfil de infecções parasitárias causadas por helmintos, quadro que resultaria em um resultado falso positivo de sensibilização de IgE (NEVES, 1991) foi adicionado o parâmetro de mensuração de eosinofilia (ABBAS et al., 2012). Sendo que todos os pacientes que apresentaram grau de eosinofilia superior a 700mm³ foram descartados. A remissão da asma também foi um fator analisado, assim utilizando-se os questionários de ISAAC fase II, e quantificação de IgE do estudo prospectivo de 2005, em conjunto com os resultados de 2013, comparou-se o quadro de melhora dos pacientes, possibilitando a classificação de indivíduos remissivos e não remissivos no grupo de atópicos asmáticos. Após a análise de todos os parâmetros mantiveram-se 50 indivíduos, entre 12-18 anos de idade, com 5 pessoas em cada perfil (Tabela 3).

Tabela 3 - Diferentes perfis de atopia e asma e suas respectivas abreviações.

Grupo	Perfil	Abreviação
1	Atópico Asmático Remissivo Feminino	AtAsmR0
2	Atópico Asmático Remissivo Masculino	AtAsmR1
3	Atópico Asmático não Remissivo Feminino	AtAtsmnR0
4	Atópico Asmático não Remissivo Masculino	AtAsmnR1
5	Atópico não Asmático Feminino	AtnAsm0
6	Atópico não Asmático Masculino	AtnAsm1
7	Não Atópico Asmático Feminino	NAtAsm0
8	Não Atópico Asmático Masculino	NatAsm1
9	Não Atópico não Asmático Feminino	Saud0
10	Não Atópico não Asmático Masculino	Saud1

5.2 Análise do DNA

Através de espectrofotometria foi possível avaliar a quantidade e qualidade do DNA genômico extraído das amostras dos 50 indivíduos incluídos no estudo (Tabela 7 – ANEXO C). Houve uma variação na concentração de DNA extraído entre cada amostra variando de 0,3-1210 ug/ml, e uma média da razão 260/280nm de 1,8. Para análise da presença e qualidade do DNA, todas as 50 amostras foram amplificadas através de PCR, utilizando iniciadores universais bacterianos para as regiões V1 e V3 do gene 16S do rRNA denominados pA (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) e Pd

(GTATTACCGCGGCTGCTG) (EDWARDS et al., 1989), resultando na amplificação de uma sequência aproximada de 400pb. Cada grupo analisado nesse trabalho (10 perfis) foi composto pelo DNA da microbiota cultivável de 5 indivíduos, sendo que o DNA de cada indivíduo foi diluído para a concentração de 0,012 ug/ml. Desta forma, após a junção das amostras por perfil (5 indivíduos dentro de cada grupo), obtivemos uma concentração final de DNA de 0,06ug/ml. Estas amostras foram amplificadas, por método de PCR, e o produto foi visualizado com 400pb (Figura 4) em gel de agarose 2%. Após confirmado a amplificação por PCR o material foi enviado para sequenciamento, para empresa especializada.

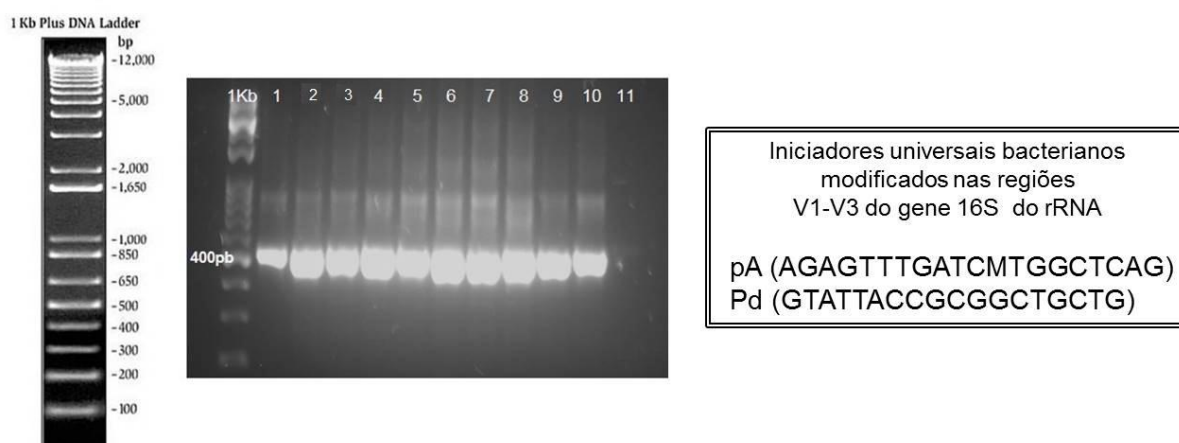


Figura 4 - Amplificação do DNA genômico de cada grupo, utilizando iniciadores universais bacterianos modificados nas regiões V1-V3 do gene 16S do rRNA, resultando em sequência de 400pb. (1Kb) Marcador de pares de base de 1 Kilobase; (1) Grupo de Atópicos Asmáticos Remissivos do sexo Feminino; (2) Grupo de Atópicos Asmáticos Remissivos do sexo Masculino; (3) Grupo de Atópicos Asmáticos não Remissivos do sexo Feminino ; (4) Grupo de Atópicos Asmáticos não Remissivos do sexo Masculino; (5) Grupo de Atópicos não Asmáticos do sexo Feminino; (6) Grupo de Atópicos não Asmáticos do sexo Masculino; (7) Grupo de Não Atópicos Asmáticos do sexo Feminino; (8) Grupo de Não Atópicos Asmáticos do sexo Masculino; (9) Grupo de Saudáveis do sexo Feminino; (10) Grupo de Saudáveis do sexo Masculino e (11) Controle Negativo.

5.3 Abundância e Diversidade da Microbiota

A partir do sequenciamento dos 10 grupos foi obtido um total de 84.398 leituras de sequências bacterianas, tendo-se uma média de 8.439 leituras por grupo. Ao total foram identificadas 11 classes: Alphaproteobacteria, Bacilli, Bacteroidia, Betaproteobacteria, Clostridia, Corynebacteriales, Fusobacteriales,

Gammaproteobacteria, Micrococcales, Propionibacteriales e Sphingobacteriia (Figura 5), 27 gêneros (Figura 6) e 96 espécies distintas de OTUs e 2 sequências sem identificação, baseadas em um *cut-off* de 97% (Tabela 4). Comparando com o banco de dados disponível do Projeto Microbioma Humano, que possui 313 espécies e 66 gêneros de bactérias encontradas na pele, neste estudo foram também foram identificadas bactérias deste banco, porém em outras localizações do corpo humano. Os gêneros identificados também foram encontrados nos bancos de Leung e seus colaboradores (2015) com 390 gêneros e no banco de Oh e seus colaboradores (2014) com 354 gêneros (Figura 8), publicados recentemente na literatura em que se referem à microbiota da pele do antebraço. Segundo a diversidade de Shannon e Simpson o grupo que apresentou maior número de espécies distintas foi o Atópico Asmático Remissivo, tanto do sexo masculino quanto feminino (Figura 8), demonstrando uma pequena discrepância entre os índices em relação ao sexo do grupo citado, pois o índice de Shannon mensura principalmente o número total de espécies encontradas, e o índice de Simpson prioriza a diversidade.

Tabela 4 - Resultados dos Clusters e Pré-Processamento do sequenciamento do DNA das bactérias presentes na pele de indivíduos com diferentes perfis de asma e atopia. Leituras: sequências identificadas. Diversidade Gama: número total de espécies observadas nas amostras.

Resultados dos Clusters (cutoff: 97%)		Resultado do Pré-processamento	
Perfil	Contagem de Leituras	Total de amostras:	10
Atópico Asmático Remissivo Feminino	8.246	Total de leituras	84.398
Atópico Asmático Remissivo Masculino	7.171	Diversidade Gama	96
Atópico Asmático não Remissivo Feminino	9.239	Resumo da contagem das amostras	
Atópico Asmático não Remissivo Masculino	7.837	Min - 7.171	
Atópico não Asmático Feminino	7.756	Max - 9.987	
Atópico não Asmático Masculino	7.502	Mediana - 8.373	
Não Atópico Asmático Feminino	8.501	Média - 8.439	
Não Atópico Asmático Masculino	9.897		
Saudável Feminino	8.826		
Saudável Masculino	9.423		

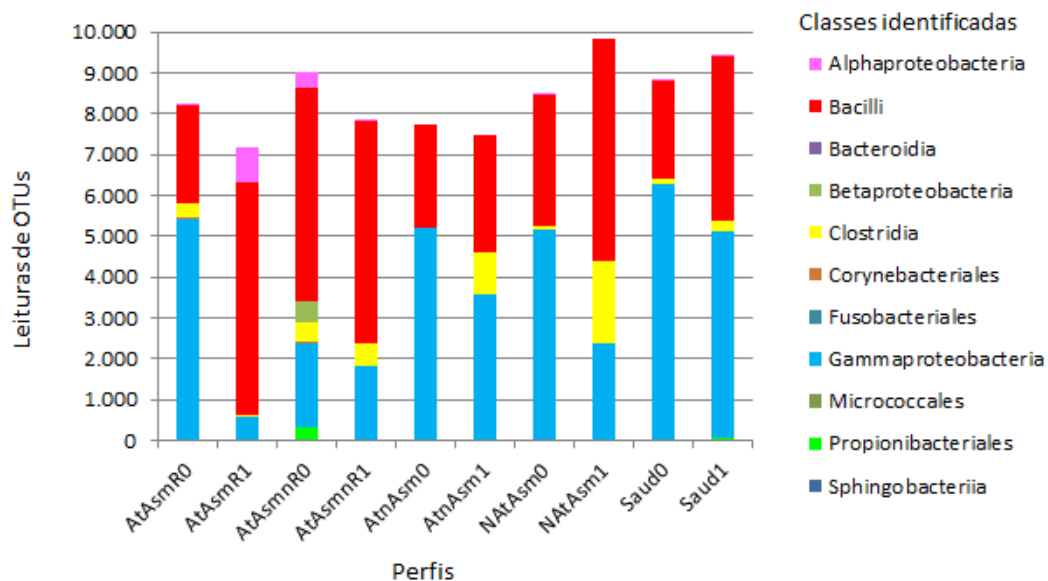


Figura 5 - Distribuição da frequência do número de leituras de OTUs de classes bacterianas encontradas na microbiota cultivável da pele em grupos com diferentes desfechos de atopia e asma. (AtAsmR0) Grupo de Atópicos Asmáticos Remissivos do sexo Feminino; (AtAsmR1) Grupo de Atópicos Asmáticos Remissivos do sexo Masculino; (AtAsmR0) Grupo de Atópicos Asmáticos não Remissivos do sexo Feminino; (AtAsmR1) Grupo de Atópicos Asmáticos não Remissivos do sexo Masculino; (AtnAsm0) Grupo de Atópicos não Asmáticos do sexo Feminino; (AtnAsm1) Grupo de Atópicos não Asmáticos do sexo Masculino; (NAtAsm0) Grupo de Não Atópicos Asmáticos do sexo Feminino; (NAtAsm1) Grupo de Não Atópicos Asmáticos do sexo Masculino; (Saud0) Grupo de Saudáveis do sexo Feminino; (Saud1) Grupo de Saudáveis do sexo Masculino.

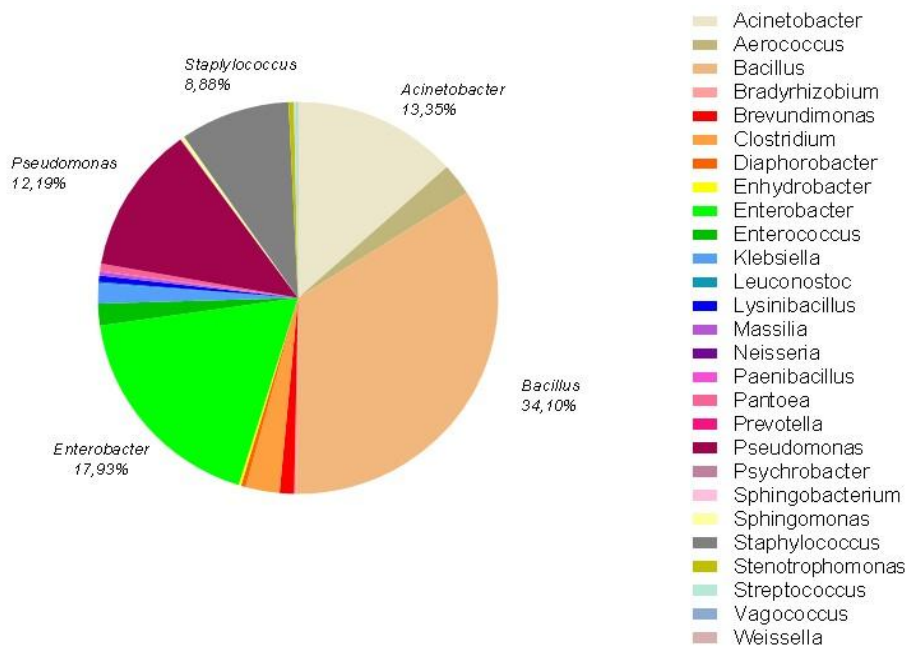


Figura 6 - Abundância relativa dos gêneros das bactérias encontradas nas amostras de microbiota cultivável da pele.



Figura 7 - Comparação dos gêneros encontrados na microbiota da pele do antebraço com bancos de OTUs presentes na literatura atual de microbiota da pele do antebraço (Oh, 2014 e Leung, 2015), e microbiota da pele (Peterson, 2009)

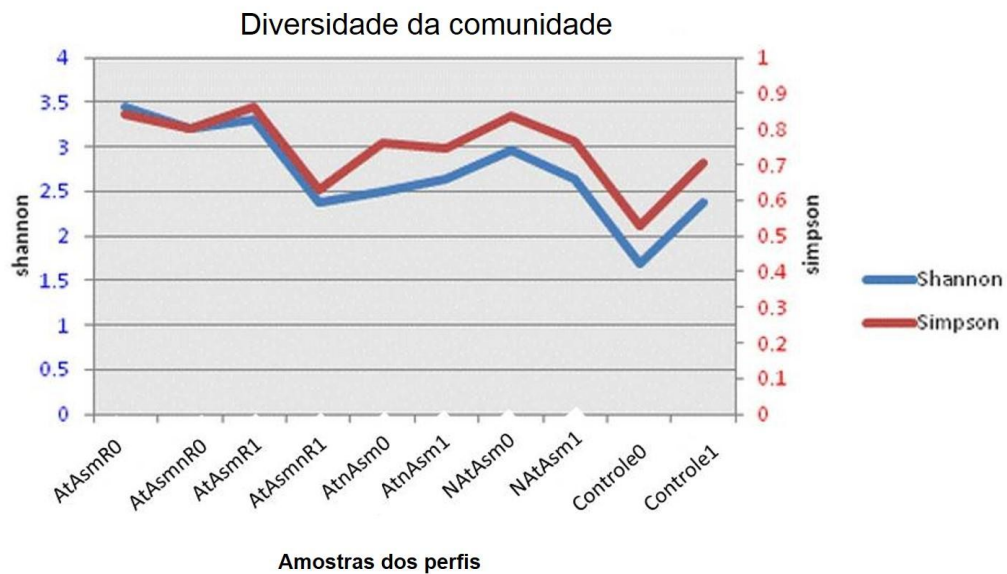


Figura 8 - Índices de diversidade de Shannon e Simpson das espécies de bactérias identificadas nos diferentes grupos de atopia e asma. Índice de Shannon considera igual peso entre espécies raras e abundantes. Índice de Simpson mede a probabilidade de 2 (dois) indivíduos, selecionados ao acaso na amostra, pertencer à mesma espécie.

5.4 Taxonomia dos microrganismos

A partir do sequenciamento pela plataforma 454 GS-FLX *Titanium* se obteve as OTUs, das quais se identificaram algumas bactérias até a classificação de subespécie, e outras foram caracterizadas identificadas com seu número de acesso.

Dos 27 gêneros encontrados 5 gêneros demonstraram predominância nesta população, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus*, ou seja, estes são comuns entre os grupos analisados, onde o gênero *Bacillus* apresentar a maior abundância relativa com 34,1% e *Enterobacter* com 17,93% (Figura 6). Entre as 96 espécies bacterianas identificadas pela empresa Macrogen, 46 espécies foram encontradas exclusivamente em determinados grupos (24 sp. em AtAsmR, 12 sp. em AtAsmnR, 4 sp. em AtnAsm, 3 sp. em NAtAsm e 3 sp. em Saud), 35 espécies foram encontradas em combinações diferentes entre os grupos e 15 espécies foram identificadas em todos os grupos (Figura 9), ocorrendo uma maior abundância das espécies *Acinetobacter* JN669248, *Bacillus anthracis* AY138304, *Bacillus megaterium* GU252122, *Enterobacter* HM557239 e *Pseudomonas* DQ227339 (Figura 10) (Figura 24 – ANEXO E). Quando analisadas estas espécies por grupo se obteve números distintos de leituras de OTUs, onde *Acinetobacter* JN669248 foi encontrada com maior número de leituras de OTUs no grupo AtnAsm, assim como houve maior número de leituras de OTUs da espécie *Bacillus megaterium* GU252122 no grupo AtAsmnR (Figura 11a), de acordo com a distribuição de frequências.

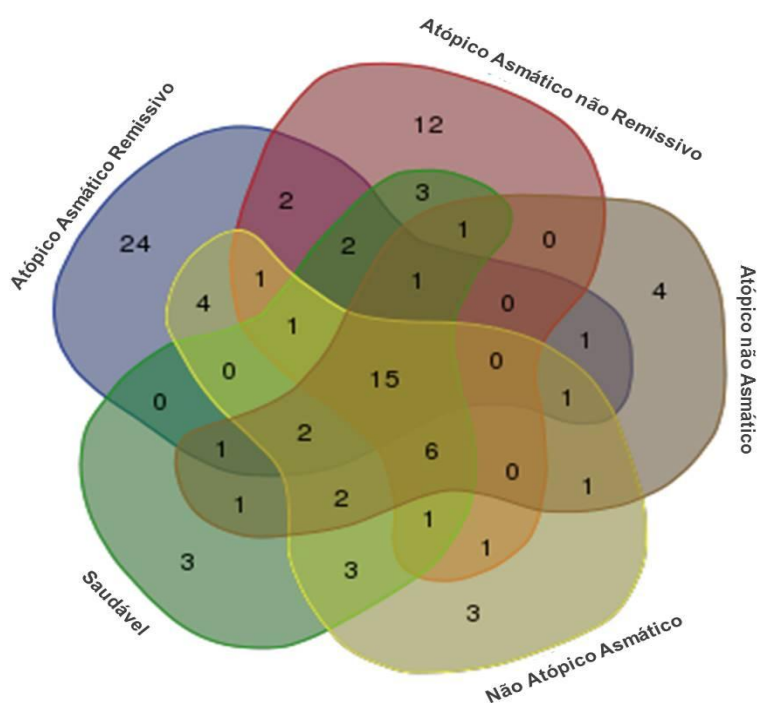


Figura 9 - Diagrama de Venn com distribuição de todas as espécies identificadas na microbiota cultivável da pele, agrupadas por perfil (Dados complementares na Tabela 8 – ANEXO D).

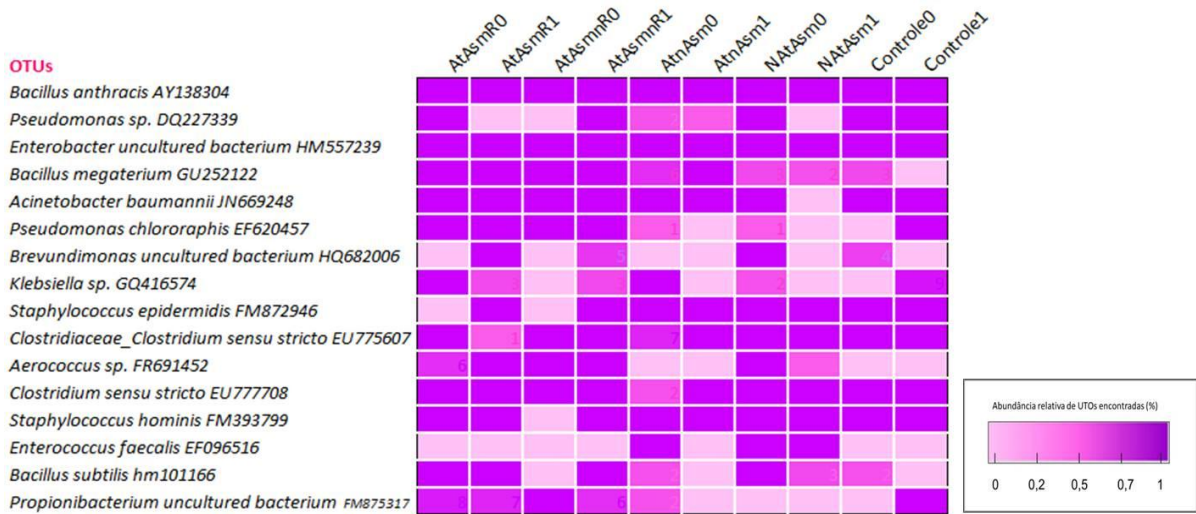


Figura 10 - OTU HeatMap das espécies bacterianas que apresentaram mais de 300 leituras entre os grupos analisados. Através da intensidade da cor pode-se visualizar a abundância da espécie em determinado grupo de acordo com escala. (AtAsmR0) Grupo de Atópicos Asmáticos Remissivos do sexo Feminino; (AtAsmR1) Grupo de Atópicos Asmáticos Remissivos do sexo Masculino; (AtAsmnR0) Grupo de Atópicos Asmáticos não Remissivos do sexo Feminino; (AtAsmnR1) Grupo de Atópicos Asmáticos não Remissivos do sexo Masculino; (AtnAsm0) Grupo de Atópicos não Asmáticos do sexo Feminino; (AtnAsm1) Grupo de Atópicos não Asmáticos do sexo Masculino; (NAtAsm0) Grupo de Não Atópicos Asmáticos do sexo Feminino; (NAtAsm1) Grupo de Não Atópicos Asmáticos do sexo Masculino; (Controle0) Grupo dos Controles do sexo Feminino; (Controle1) Grupo dos Controles do sexo Masculino.

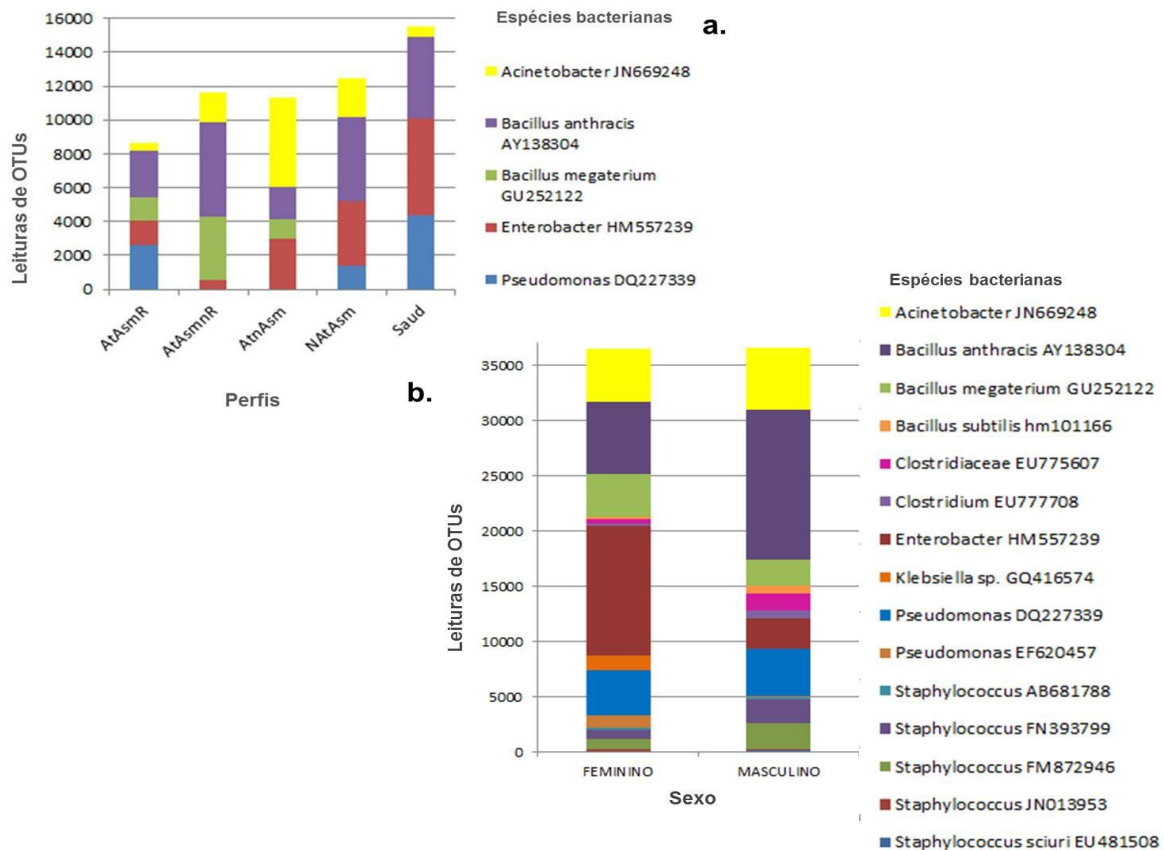


Figura 11 - Espécies bacterianas encontradas na microbiota da pele de todos os grupos de diferentes desfechos de atopia e asma. a) Distribuição por grupo das 5 espécies mais abundantes da população. (AtAsmR) Grupo de Atópicos Asmáticos Remissivos; (AtAsmnr) Grupo de Atópicos Asmáticos não Remissivos; (AtnAsm) Grupo de Atópicos não Asmáticos; (NatAsm) Grupo de Não Atópicos Asmáticos; (Saud) Grupo dos Saudáveis. b) Distribuição das espécies por sexo.

5.5 Identificação das bactérias por grupo

5.5.1 Diferenciação das bactérias cultiváveis identificadas nos sexos feminino e masculino

Analisando separadamente os gêneros bacterianos encontrados na subdivisão dos grupos do sexo masculino e feminino, percebe-se que o sexo feminino prevalece com maior diversidade, com um total de 9 gêneros encontrados neste grupo, e somente 2 gêneros de exclusividade do sexo masculino. Entre os sexos, há o compartilhamento de 16 gêneros (Figura 12a), onde a abundância de sequências lidas é maior também no sexo feminino (37.778 leituras de OTUs) do que no sexo masculino (34.190 leituras de OTUs), ainda percebe-se uma maior abundância do

gênero *Bacillus* no sexo masculino, enquanto que no sexo feminino o gênero *Enterobacter* apresentou maior número de leituras de OTUs (Figura 12b).

Ao analisar a distribuição dos 27 gêneros identificados através de diagrama de Venn, observamos que 16 gêneros são compartilhados entre os sexos masculino e feminino. A espécie identificada com o maior número de leituras de OTUs foi *Bacillus anthracis* AY138304 no sexo masculino, e *Enterobacter* HM557239 e *Klebsiella* sp. GQ416574 no sexo feminino (Figura 11b). Dentro dos 16 gêneros compartilhados entre os sexos podemos identificar 42 espécies. Das 42 bactérias compartilhadas entre o sexo feminino e o sexo masculino, além das espécies citadas anteriormente com maior número de leituras de OTUs, se observou um maior número de leituras de OTUs das bactérias *Staphylococcus* EF510614 e *Staphylococcus* FN393799 no sexo masculino também (Figura 25b – ANEXO F).

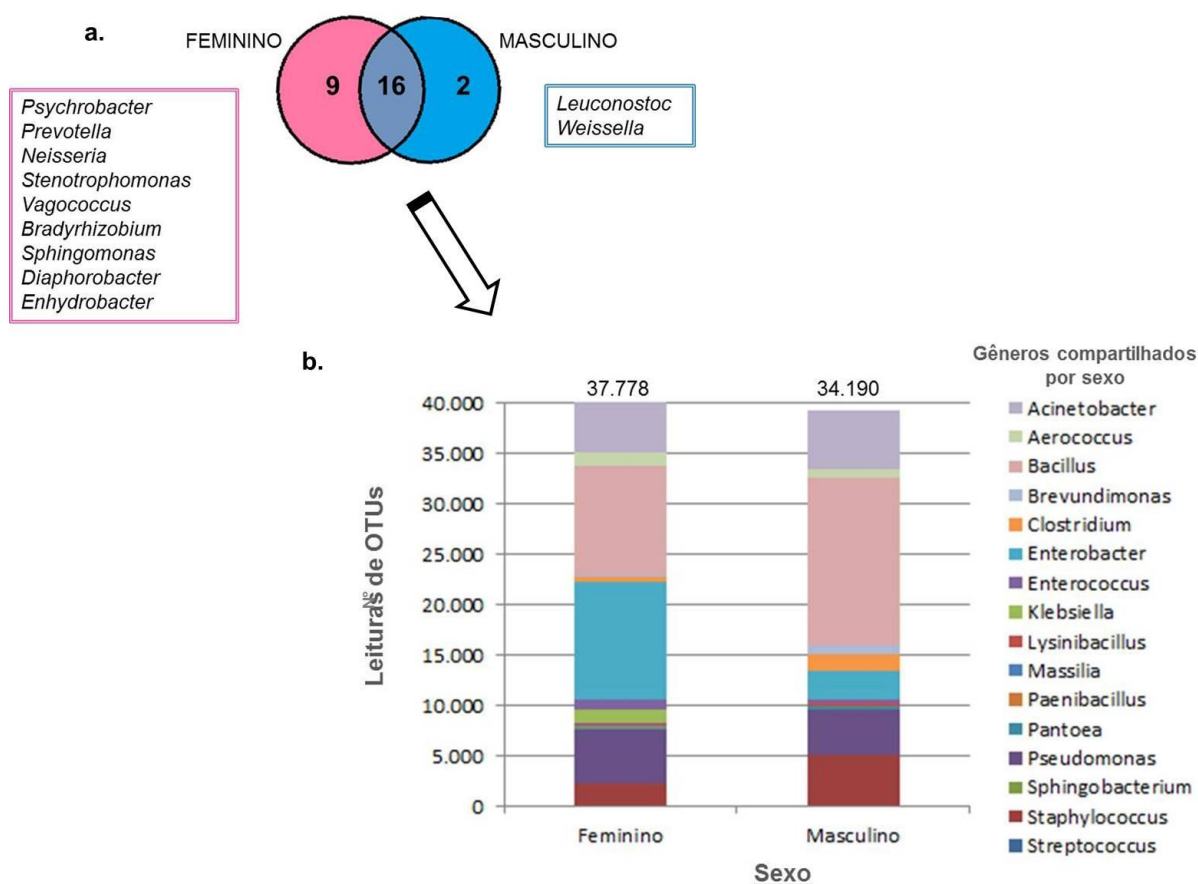


Figura 12 - Distribuição dos gêneros bacterianos identificados nos indivíduos com diferentes perfis de asma e atopia, divididos em sexo Feminino e sexo Masculino. a) Diagrama de Venn e b) Distribuição do nº de leituras de OTUs encontradas nos 16 gêneros identificados em ambos os sexos.

5.5.2 Identificação das bactérias cultiváveis em indivíduos atópicos

Para avaliar as bactérias que podem estar relacionadas à atopia foram realizados dois tipos de comparações. Primeiramente a atopia foi avaliada no grupo de indivíduos asmáticos, sendo os grupos 3 e 4 (AtAsmnR0 e 1) e 7 e 8 (NAtAsm0 e 1). Através da análise da distribuição através de diagrama de Venn observamos a presença de 10 gêneros em comum, enquanto que separadamente os grupos de indivíduos não atópico asmático (NAtAsm0 e 1) apresentaram 2 gêneros e os grupos de indivíduos atópico asmático não remissivo (AtAsmnR0 e 1) apresentaram 9 gêneros (Figura 13a). A descrição das espécies referentes a cada grupo está identificada na Figura 13b. Se analisado estes grupos em uma subdivisão por sexo, observando as 25 espécies em comum, pode-se identificar 4 espécies presentes somente no sexo masculino: *Bacillus cereus* G9241 AAEK01000013, *Streptococcus salivarius thermophilus* FJ749349, *Bacillus* HQ156459 e *Clostridium* DQ129392 (Figura 13c). Já se os grupos de asmáticos 3, 4, 7 e 8 forem equiparados com o grupo dos indivíduos saudáveis (grupos 9 e 10), o número total de gêneros relacionados a atopia e asma reduz para 2 gêneros: *Streptococcus* e *Aerococcus* (Figura 14), dentro desses dois gêneros é possível identificar uma espécie - *Streptococcus salivarius thermophilus* FJ749349. Na análise entre os grupos de indivíduos atópicos com asma (grupos 3 e 4) com o grupo de indivíduos asmáticos sem atopia (grupos 7 e 8) observamos a presença de 5 gêneros, sendo dois deles já descritos na literatura com atividade imunomoduladora: *Diaphorobacter* e *Enhydrobacter* (Figura 14).

Na segunda análise a atopia foi avaliada no grupo de indivíduos não asmáticos, sendo os grupos 5 e 6 (AtnAsm) e grupo dos indivíduos saudáveis 9 e 10. Porém não se obteve nenhum gênero no grupo dos indivíduos atópicos não asmáticos (resultado não mostrado).

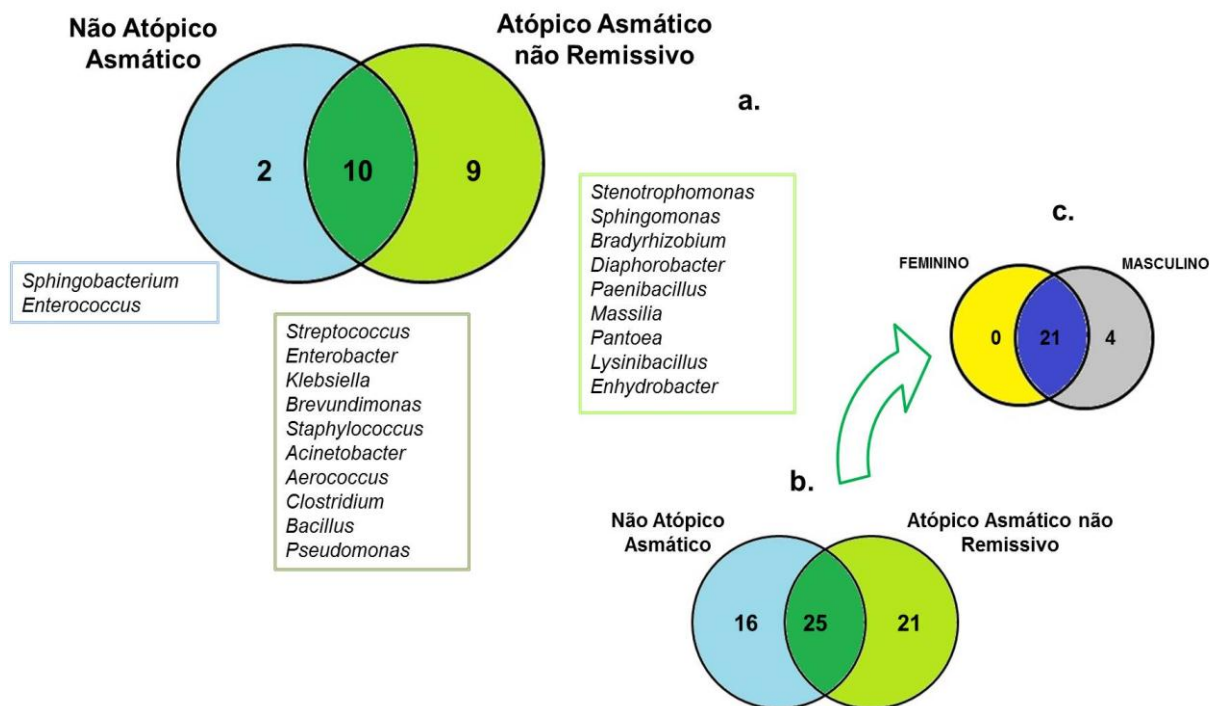


Figura 13 - Diagrama de Venn das bactérias distribuídas entre os grupos Não atópico Asmático e Atópico asmático não Remissivo. a) Gêneros bacterianos. b) Espécies bacterianas (Dados complementares Tabela 9 – ANEXO D). c) Espécies bacterianas encontradas em comum nos grupos: Não Atópico Asmático e Atópico Asmático não remissivo distribuídas por sexo (Dados complementares Tabela 10 – ANEXO E)

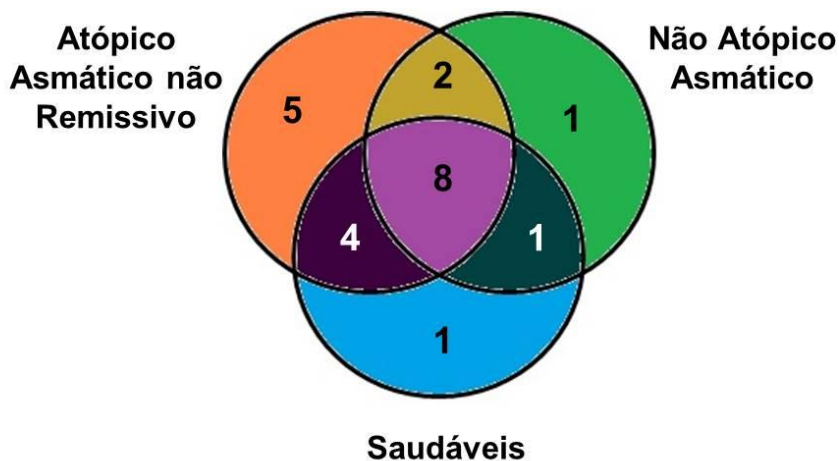


Figura 14 - Diagrama de Venn com distribuição dos gêneros de bactéria encontrados na microbiota da pele de indivíduos com asma e saudáveis (Atópico asmático remissivo e não atópico asmático) (Dados complementares na Tabela 5).

Tabela 5 - Lista de gêneros bacterianos encontrados na microbiota da pele agrupados por grupos AtAsmnR, NAtAsm e Saud. Entre parênteses o número de bactérias encontradas no agrupamento.

AtAsmnR, NAtAsm e Saud (8)	AtAsmnR e NAtAsm (2)	AtAsmnR e Saud (4)
<i>Acinetobacter</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Massilia</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Pantoea</i>
<i>Brevundimonas</i>	NAtAsm e Saud (1)	<i>Sphingomonas</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Stenotrophomonas</i>
<i>Enterobacter</i>	AtAsmnR (5)	NAtAsm (1)
<i>Klebsiella</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Sphingobacterium</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Diaphorobacter</i>	Saud (1)
<i>Staphylococcus</i>	<i>Enhydrobacter</i>	<i>Leuconostoc</i>
	<i>Lysinibacillus</i>	
	<i>Paenibacillus</i>	

5.5.3 Identificação das bactérias cultiváveis em indivíduos asmáticos

Para a identificação das bactérias relacionadas ao perfil da asma, os pacientes asmáticos foram subdivididos em atópicos e não atópicos, e a microbiota encontrada foi comparada. Para avaliação foram considerados atópicos os grupos 3 e 4 (AtAsmnR0 e 1) e grupos 5 e 6 (AtnAsm0 e 1). Ao total esses grupos apresentaram 8 gêneros em comum, 11 gêneros pertencentes ao grupo AtAsmnR e 1 gênero no grupo AtnAsm (Figura 15a). Em relação às espécies, foram encontradas 23 espécies em comum entre os dois grupos, 23 espécies somente no grupo AtAsmnR e 13 espécies no grupo AtnAsm (Figura 15b). Subdividindo estes grupos em sexo feminino e sexo masculino, dos 8 gêneros em comum encontra-se 1 gênero, o *Stenotrophomonas*, somente no sexo feminino (Figura 15c). Das 23 espécies distribuídas entre os dois grupos, 20 espécies foram identificadas em comum nos grupos do sexo feminino e masculino, 1 espécie somente no grupo feminino, a *Stenotrophomonas* GQ443097, e 2 espécies no sexo masculino: *Bacillus* HQ156459 e *Clostridium* EU777697 (Figura 15d).

Quando se confronta o grupo dos indivíduos atópicos asmáticos (grupos 3 e 4, 5 e 6) com o grupo dos indivíduos saudáveis (grupo 9 e 10) não se encontra nenhum gênero ou espécie de especificidade do grupo de atopia (Figura 16).

Na segunda avaliação foram comparados os grupos dos indivíduos sem atopia, grupos NAtAsm (grupos 7 e 8) e saudáveis (grupos 9 e 10), os indivíduos saudáveis

possuem 5 gêneros, os asmáticos sem atopia apresentam 3 gêneros, e em comum os grupos compartilham 9 gêneros (Figura 17). Além disso, o grupo dos indivíduos asmáticos sem atopia possuem 3 espécies que não apareceram em nenhum outro grupo, duas espécies de *Clostridium* FJ375877 e JN977328, e *Staphylococcus* AY897994.

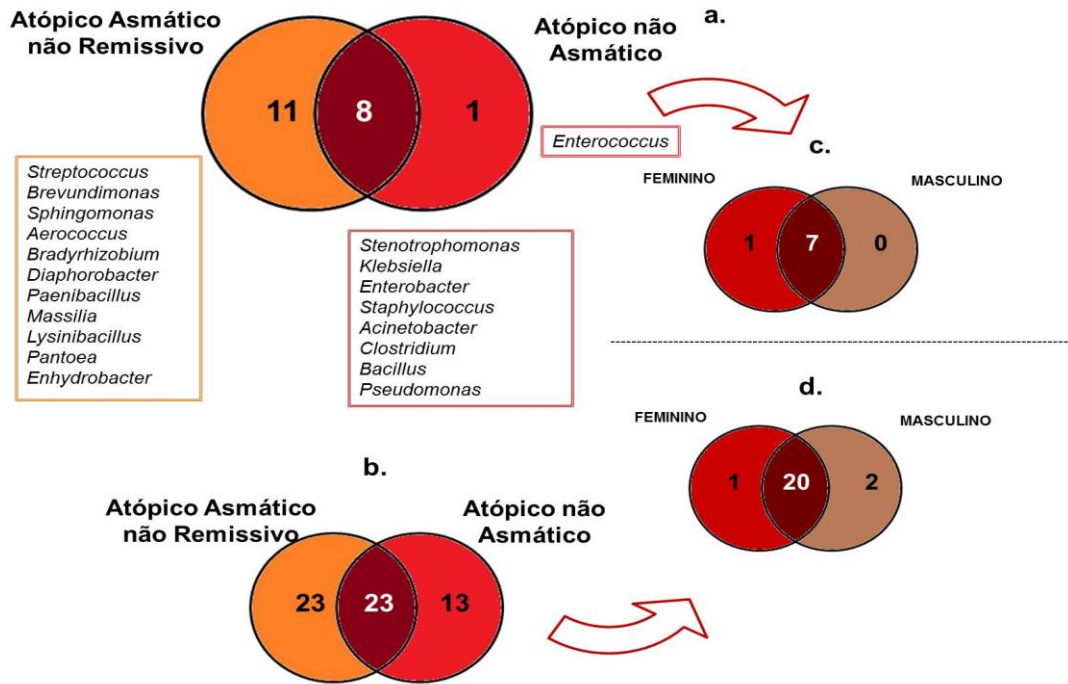


Figura 15 - Diagrama de Venn com distribuição das bactérias encontradas na microbiota da pele de indivíduos com atopia e saudáveis. a) Gêneros bacterianos. b) Espécies bacterianas (Dados complementares Tabela 11 – ANEXO G). c) Gêneros bacterianos distribuídos por sexo feminino e sexo masculino d) Espécies bacterianas distribuídas por sexo feminino e sexo masculino.

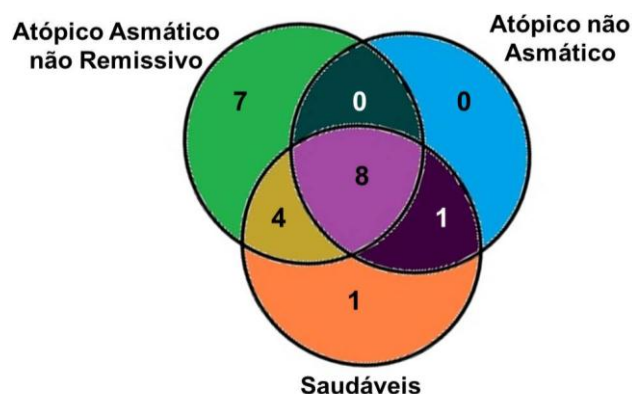


Figura 16 - Diagrama de Venn com distribuição dos gêneros de bactéria encontrados na microbiota da pele de indivíduos com atopia e saudáveis (Dados complementares na Tabela 6).

Tabela 6 - Lista de e gêneros bacterianos encontrados na microbiota da pele agrupados por grupos AtAsmnR, AtnAsm e Saud. Entre parênteses o número de bactérias encontradas no agrupamento.

AtAsmnR, AtnAsm e Saud (8)	AtnAsm e Saud (1)
<i>Acinetobacter</i>	<i>Enterococcus</i>
<i>Bacillus</i>	AtAsmnR (7)
<i>Clostridium</i>	<i>Aerococcus</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>Bradyrhizobium</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>Diaphorobacter</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Enhydrobacter</i>
<i>Staphylococcus</i>	<i>Lysinibacillus</i>
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Paenibacillus</i>
AtAsmnR e Saud (4)	<i>Streptococcus</i>
<i>Brevundimonas</i>	Saud (1)
<i>Massilia</i>	<i>Leuconostoc</i>
<i>Pantoea</i>	
<i>Sphingomonas</i>	

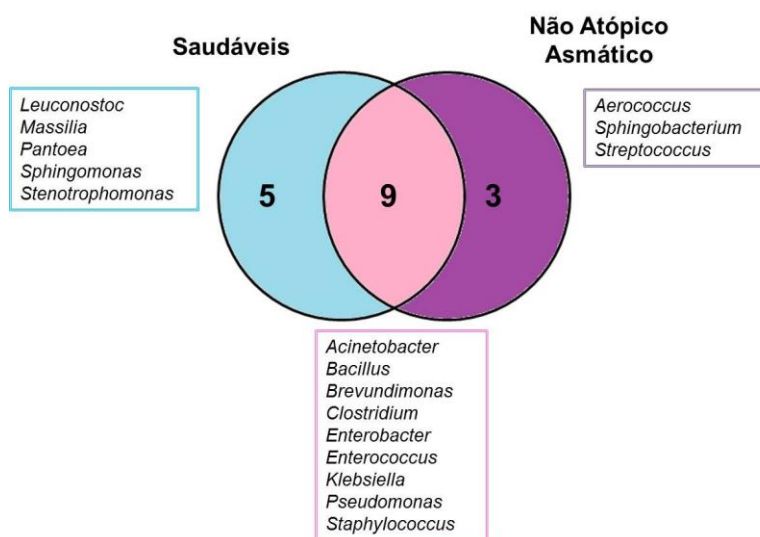


Figura 17 - Diagrama de Venn com distribuição de gêneros bacterianos entre os grupos Saudáveis e Não Atópicos Asmáticos

5.5.4 Comparação entre grupos Remissivos e Saudáveis

Ao analisar os grupos de indivíduos sem os sintomas clínicos de asma pertencentes os grupos 1 e 2 (AtAsmR0 e 1) e grupos 9 e 10 (Saudáveis 0 e 1), verifica-se 12 gêneros em comum, 10 gêneros no grupo AtAsmR e 2 gêneros no grupo saudável. Destes 12 gêneros compartilhados entre os grupos, o gênero *Massilia* é específico do sexo masculino (Figura 18a e b). Comparando-se as espécies, encontra-se 22 espécies nos dois grupos, 33 espécies somente no AtAsmR e 20 espécies somente no grupo Saud (Figura 18c), onde 3 espécies são únicas para esse grupo: *Leuconostoc pseudomesenteroides* AF515228, *Pantoea* GU566350 e *Acinetobacter* DQ911549 (Figura 9). Podemos observar nas Figuras 9 e 18 um maior número de espécies no grupo AtAsmR, demonstrando a maior diversidade entre todos os grupos estudados, dados também evidenciados quando analisado os índices de Shannon e Simpson (Figura 8). Ao avaliar a abundância das espécies encontradas nos grupos de indivíduos sem asma, a espécie bacteriana *Acinetobacter* HQ143283 apresentou um maior número de leituras de OTUs nos grupos AtAsmR (1 e 2) e Saud (9 e 10) (Figura 18d).

Analisando os indivíduos que apresentaram melhora do quadro asmático, grupos 1 e 2 (AtAsmR) com os indivíduos que nunca apresentaram asma dos grupos 5 e 6 (AtnAsm), foi encontrado 8 gêneros em comum e uma espécie, a *Bacillus pumilus* GU471751 (Figura 9), com uma maior diversidade nos indivíduos remissivos (AtAsmR) (Figura 19).

Ainda, se for comparado o grupo dos remissivos para asma (grupos 1 e 2) e não remissivos para asma (grupo 3 e 4), são encontrados 15 gêneros e 22 espécies em comum nos dois grupos. 7 gêneros e 33 espécies somente no grupo dos indivíduos remissivos para asma, e 4 gêneros e 24 espécies no grupo dos indivíduos não remissivos para asma (Figura 26 – ANEXO H). Comparando os gêneros bacterianos encontrados na microbiota da pele de todos os grupos analisados neste estudo, analisou-se os gêneros encontrados somente no grupo dos indivíduos remissivos (AtAsmR0 e 1) e não remissivos para asma (AtAsmRnR0 e 1), encontrando 5 gêneros no grupo Atópico Asmático Remissivo e 3 gêneros no grupo Atópico Asmático não Remissivo (Figura 20).

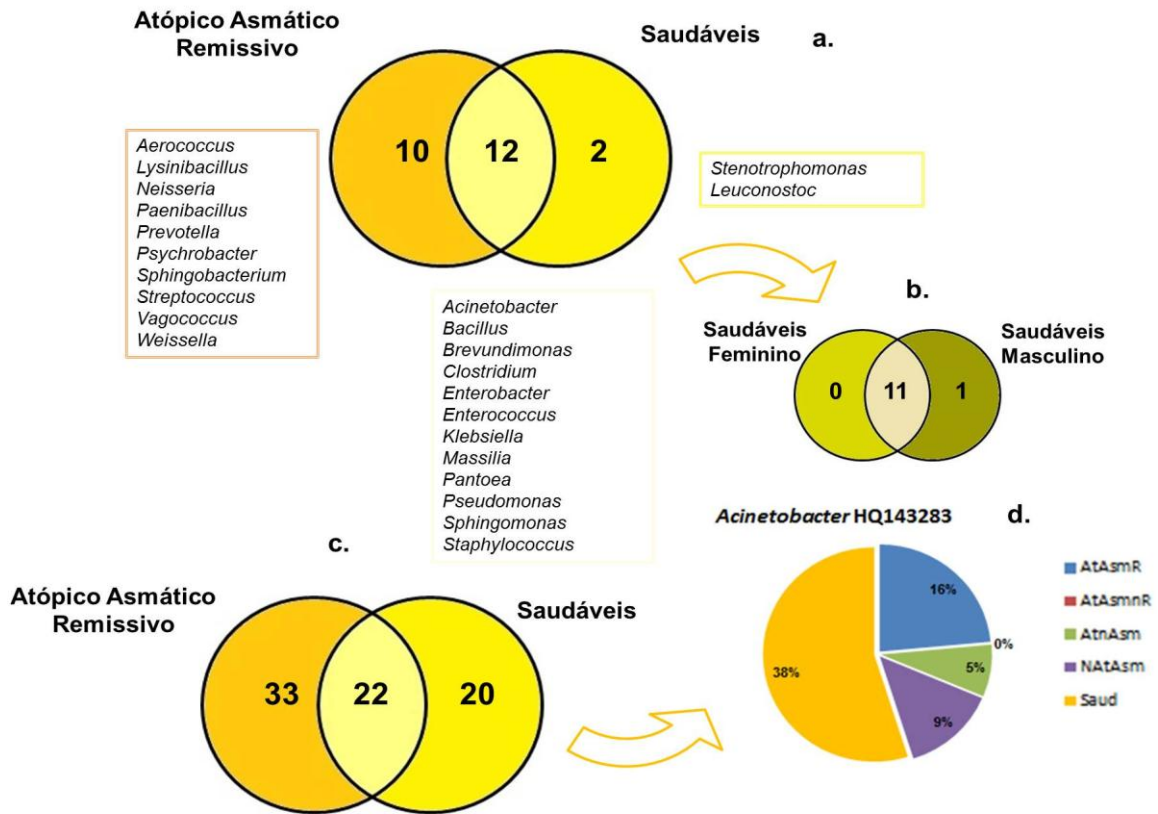


Figura 18 - Bactérias encontradas na microbiota da pele de indivíduos sem asma. a) Diagrama de Venn com distribuição dos gêneros bacterianos encontrados nos grupos Atópico Asmático Remissivo e Saudáveis. b) Diagrama de Venn dos gêneros encontrados em indivíduos Saudáveis distribuídos por sexo masculino e feminino. c) Diagrama de Venn com distribuição das espécies bacterianas encontradas nos grupos Atópico Asmático Remissivo e Saudáveis (Dados complementares na Tabela 12 – **Erro! Fonte de referência não encontrada.**). d) Abundância relativa da espécie *Acinetobacter* HQ143283 nos grupos estudados. (AtAsmR) Grupo dos Atópicos Asmáticos Remissivos; (AtAsmnr) Grupo dos Atópicos Asmáticos não Remissivos; (AtnAsm) Grupo dos Atópicos não Asmáticos; (NAtAsm) Grupo dos Não Atópicos Asmáticos e; (Saud) Grupo dos Saudáveis.

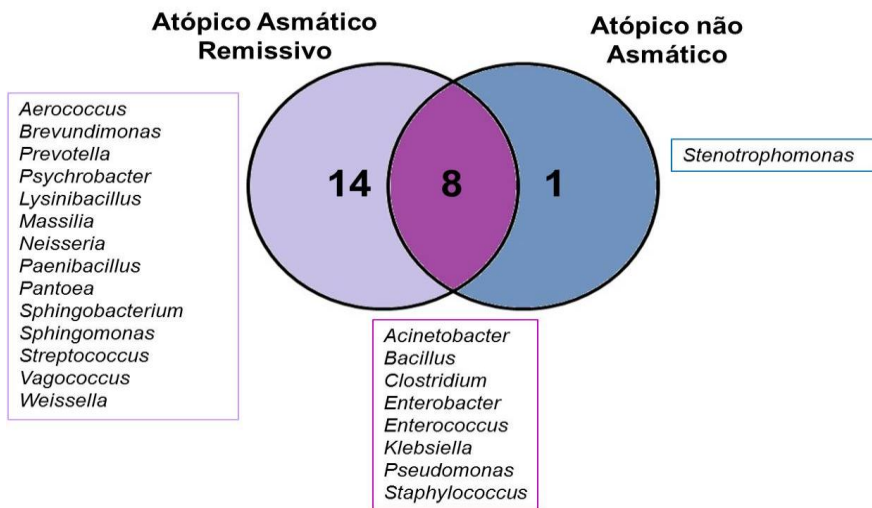


Figura 19 - Diagrama de Venn com distribuição dos gêneros bacterianos entre os grupos Atópico Asmático Remissivo e Atópico não Asmático

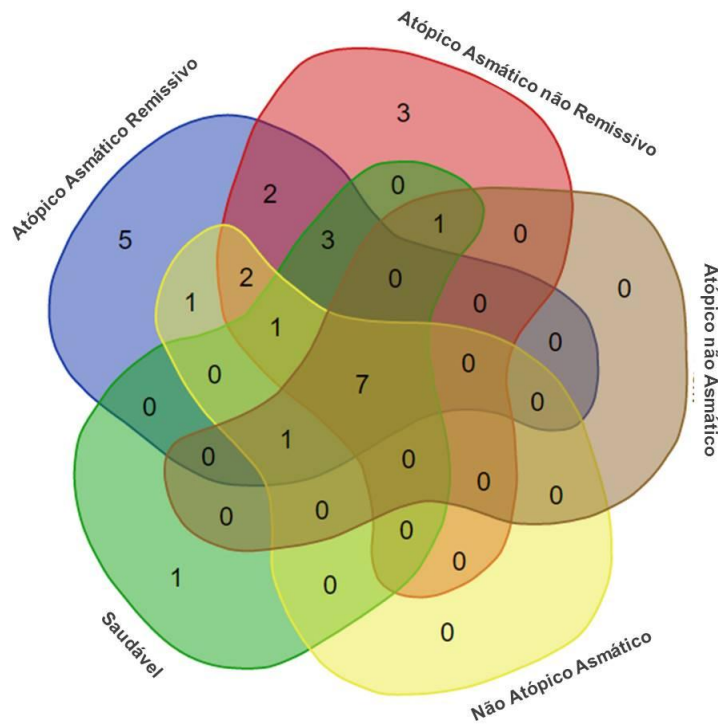


Figura 20 - Diagrama de Venn com distribuição de todas os gêneros identificadas na microbiota da pele agrupadas por perfil (Dados complementares na Tabela 14 – ANEXO I)

6. DISCUSSÃO

6.1 População do estudo

Foi importante a definição criteriosa de cada grupo, visto que foi utilizada uma mistura dos DNAs para o sequenciamento. No total foram inseridos 50 indivíduos na população de estudo depois da padronização dos perfis com a utilização de todos os parâmetros necessários. O número final de 5 indivíduos por grupo é considerável comparado a outros estudos de análise de microbiota da pele, e somente da pele do antebraço, que utilizaram de 5-15 indivíduos para amostragem (GAO et al., 2007; GRICE et al., 2009; OH et al., 2014). O resultado de 96 espécies bacterianas identificadas é considerável (Tabela 4), pois são bactérias cultiváveis, assim como no estudo de Belt e seus colaboradores (2007) que obtiveram 78 espécies com sequenciamento do gene 16S do rRNA a partir dos DNAs de 528 colônias cultivadas em ágar. Estudos de microbiota da pele como os realizados por de Oh e seus colaboradores (2014) e Leung e seus colaboradores (2015) encontraram mais de 300 gêneros (Figura 7). O número elevado de gêneros pode ser explicado devido à identificação de bactérias não cultiváveis e também pela forma de extração do DNA diretamente do *swab*. Além do mais, estes estudos utilizaram critérios prévios adotados pelos indivíduos amostrados antes da coleta, como por exemplo, ficar 24h sem banho. Neste trabalho não foi possível utilizar estes critérios, pois os pacientes já estavam vinculados a outro estudo, e outros tipos de coletas foram realizadas ao mesmo momento, inviabilizando o monitoramento desses indivíduos antes da coleta. Assim sendo, a utilização de hidratantes e sabonetes, podem ter alterado a microbiota da pele reduzindo o número de espécimes (GRICE; SEGRE, 2011). Além disso, também podemos ter encontrado espécies de colonização transitória devido ao contato com outras pessoas no dia da coleta, que de acordo com Meadow e seus colaboradores (2013) o contato entre os indivíduos, mesmo que rapidamente, pode modificar a microbiota transiente do indivíduo. Esse fato foi demonstrado durante uma partida de *roller derby*, no qual foi possível identificar após o jogo a presença da microbiota da pele de um time nos jogadores do time adversário.

6.2 Abundância e Diversidade das bactérias cultiváveis identificadas na microbiota da pele de diferentes perfis de atopia e asma

A diversidade identificada no estudo demonstrou condizer com outros bancos de sequências de bactérias na microbiota da pele do antebraço (LEUNG; WILKINS;

LEE, 2015; OH et al., 2014; PETERSON et al., 2009), pois muitas bactérias identificadas também foram encontradas nos outros bancos de dados do mesmo local coletado (Figura 7).

Neste trabalho foram identificadas 11 classes bacterianas cultiváveis na microbiota da pele (Figura 5). No estudo de Hanski e seus colaboradores (2012), que coletaram amostras de indivíduos com perfil semelhante aos dos indivíduos deste trabalho, eles identificaram 43 classes, contudo baseado na literatura consideraram importantes para futuras análises 6 classes: Actinobacteria, Alphaproteobacteria, Bacilli, Betaproteobacteria, Clostridi e Gammaproteobacteria, das quais 5 classes, exceto a classe Actinobacteria, foram encontradas entre as 11 classes identificadas no presente estudo. Como visto na Figura 7, diversos gêneros encontrados no estudo atual foram encontrados nos bancos de OTUs de microbiota da pele do antebraço nos estudos de Oh e seus colaboradores (2014) e Leung e seus colaboradores (2015), demonstrando que são gêneros bacterianos que realmente habitam a pele, como *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Pseudomonas* (COGEN; NIZET; GALLO, 2008), porém a atuação do microrganismo como comensal ou patogênico para o hospedeiro será determinada por diversos fatores como por exemplo o período de exposição (EGE et al., 2006). Além disso, muitos dos gêneros identificados já foram localizados, além da pele, em outras partes do corpo humano, como cavidades oral e nasal e tratos gastrointestinal e urogenital de acordo com o banco de OTUs de Peterson e seus colaboradores (2009).

6.3 Gêneros identificados na microbiota da pele relacionados à asma e atopia

Dos 27 gêneros encontrados nos grupos deste estudo 5 gêneros se destacaram em maior abundância (Figura 6): *Acinetobacter*, uma bactéria gram negativa, do grupo Gammaproteobacteria, a qual é muito abundante na microbiota da pele (HANSKI et al., 2012). Dentro desse gênero várias espécies estão associadas com a expressão de moléculas anti-inflamatórias contra doenças alérgicas (FYHRQUIST et al., 2014), como a *A. Iwoffii* F78 (DEBARRY et al., 2010) e *A. baumannii* (QIU et al., 2011). O gênero *Bacillus*, considerado como gênero ubíquo na natureza, inclui o *B. subtilis*, um agente patogênico humano clinicamente significativo, *B. anthracis*, o agente causador do antraz e *B. cereus*, que pode provocar envenenamento alimentar (NELSON; LEHNINGER; COX, 2008). Em

relação à asma, este gênero possui os representantes *B. licheniformis*, que tem a ação de diminuir alguns dos sintomas da asma (VOGEL et al., 2008), e *B. Calmette-Guérin* o qual demonstrou atenuar a inflamação alérgica (KIM et al., 2014).

O gênero *Pseudomonas* possui espécies como a *P. aeruginosa*, que quando inativada é utilizada como medicamento, em estudos recentes apresentou uma ação de diminuição da inflamação das vias aéreas (TAN et al., 2013). Já os outros gêneros encontrados com predominância nos grupos estudados, *Enterobacter* e *Staphylococcus*, em relação à asma têm papel somente como patogênico, como exemplos, *E. cancerogenus* (TSAI et al., 2015) e *S. aureus* (DAVIS et al., 2015).

Os gêneros citados foram encontrados com maior número de leituras de OTUs nos 10 grupos estudados. De acordo com a descrição das bactérias identificadas nota-se que são bactérias presentes na natureza, de fácil acesso ao ser humano, portanto a possível exposição no início da vida e uma posterior adaptação e colonização na microbiota humana ocorre facilmente, justificando a grande presença destas bactérias em todos os grupos analisados no estudo atual (MEADOW et al., 2013). Além disso, algumas bactérias encontradas não são facilmente cultiváveis, o que poderia ser um sinal de contaminação, contudo é importante ressaltar que mesmo estas bactérias não tendo sido cultivadas o DNA das mesmas foi eluído na cultura e devido a técnica de sequenciamento utilizada ser de alta sensibilidade foi possível identificar esses microrganismos.

6.4 Espécies mais encontradas na microbiota da pele da população em estudo.

As espécies bacterianas cultiváveis identificadas com maior número de OTUs foram *Acinetobacter* JN669248, *Bacillus anthracis* AY138304, *Bacillus megaterium* GU252122, *Enterobacter* HM557239 e *Pseudomonas* DQ227339 (Figuras 10 e 23). A bactéria *Acinetobacter* com número de acesso JN669248, no banco de pequenas sequências SILVA, refere-se a *A. baumannii*, uma bactéria gram negativa, altamente presente na natureza, com uma abundância relativa de 12,33% nos grupos analisados, principalmente nos indivíduos atópicos não asmáticos. A *A. baumannii* possui uma característica oportunista, causando infecções hospitalares e adquiridas comumente, levando a pneumonia, infecção cutânea, infecção urinária e bacteremia. Esta espécie quando tratada com formalina pode inibir significativamente eosinofilia nas vias aéreas em camundongos, em estudos experimentais (QIU et al., 2011).

A *Bacillus anthracis* AY138304 apresentou 23,85% de abundância relativa, trata-se do agente causador do antraz, como citado anteriormente, muito utilizada no bioterrorismo no ano de 2002. No entanto, a identificação das espécies, dentro do grupo das *Bacillus cereus* (um grupo que compõe 6 bactérias gram-positivas, formadoras de esporos: *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. mycooides*, *B. pseudomycooides*, *B. thuringiensis* e *B. weihenstephanensis* (MARTINEZ-BLANCH et al., 2009) não é possível apenas por sequenciamento da 16S rRNA (SPENCER, 2003), é necessário a utilização de outras técnicas de identificação, como por exemplo, a utilização de genes constitutivos (LIU, Y. et al., 2015). Desta forma, *Bacillus anthracis* AY138304, pode se enquadrar como pertencente ao grupo *Bacillus cereus*, que tem alta ocorrência no ambiente por serem formadoras de esporos, alguns membros deste grupo têm uma importância industrial, por estarem presentes em alimentos e rações, e por serem causadores de contaminação alimentar (HENDRIKSEN; HANSEN; JOHANSEN, 2006).

A *Bacillus megaterium* GU252122 aparece com 7,43% de abundância relativa, esta espécie é caracterizada com um microrganismo de solo, porém também encontrada em diversos ambientes como arrozais, alimentos, água do mar, peixes, e até mel de abelha, portanto com ampla distribuição ecológica, pela sua capacidade de esporulação, e tem importância econômica devido à sua enzimas comercialmente importantes, tal como a penicilina amidase, sendo ainda a principal bactéria aeróbia produtora de vitamina B (VARY, 1994).

Outra espécie com grande número de leituras de OTUs foi a *Enterobacter* HM557239, com 17,19% de abundância relativa, a qual foi identificada até o gênero, são bacilos gram negativos, facultativos anaeróbios, que podem ser encontrados, principalmente, nas fezes de humanos e animais, mas também na água, plantas, insetos e em produtos de laticínios, como leite e queijos. Algumas espécies deste gênero são patogênicas e podem causar infecções oportunistas, dos quais, na maior parte, são relatadas em hospitais, dificilmente causam doenças em indivíduos saudáveis (SANDERS; SANDERS, 1997).

E a espécie *Pseudomonas* DQ227339, com 9,88% de abundância relativa na população de estudo, tem como características do gênero uma ampla distribuição em todos os principais ambientes naturais (terrestre, água doce e marinha) e são capazes de se associar intimamente com plantas e animais, sugerindo então, um

grau notável de adaptabilidade genética e fisiológica (SPIERS; BUCKLING; RAINEY, 2000).

Assim como nos gêneros encontrados na microbiota estudada, todas as espécies identificadas com maior abundância relativa nos grupos do estudo são encontradas na microbiota pela alta frequência no meio ambiente, e algumas podem causar infecções, provavelmente, por ação oportunista devido a alguma redução da imunidade do hospedeiro. Todos os trabalhos que fizeram a identificação da microbiota da pele através de metagenômica, como o estudo de Oh e seus colaboradores (2014), avaliaram a microbiota residente na pele de indivíduos saudáveis, sendo assim o encontro de bactérias já descritas em outras partes do corpo na pele desses indivíduos pode estar relacionado ao quadro patológico, como é o caso do gênero *Stenotrophomonas* que não foi encontrado em um dos bancos comparados, mas foi encontrado em maior frequência nos indivíduos atópicos no estudo de Hanski e seus colaboradores (2012), todavia 70% dos gêneros encontrados no grupo de estudo foi compatível com o resultados já descritos na literatura (Figura 7).

6.5 Diversidade de bactérias cultiváveis no sexo feminino e sexo masculino

Quando analisadas as bactérias cultiváveis encontradas na microbiota da população, separando-as por sexo, claramente foi identificada uma maior diversidade de bactérias no sexo feminino (Figura 12a). Os locais do corpo habitados pelas bactérias são bem diferenciados entre o sexo masculino e sexo feminino, devido às diferenças físicas e fisiológicas entre os sexos, como a presença de pêlos e produção de hormônios e secreções, podem influenciar o tipo de microbiota (GRICE; SEGRE, 2011). É comum encontrarmos uma microbiota diferente entre os sexos, hipótese que pode ser observada nos resultados encontrados em nosso estudo, no qual foi possível observar uma diferença entre as espécies encontradas em todos os grupos estudados quando separados por sexo. Esse fato pode ser explicado devido à produção de hormônios, visto que os grupos analisados, no período da coleta, se encontravam no período de puberdade, com a faixa etária variando de 12-18 anos de idade.

As duas espécies bacterianas mais encontradas em indivíduos do sexo feminino em relação ao sexo masculino foram a *Enterobacter* HM557239 e *Klebsiella* sp. GQ416574 (Figura 12b), bactérias que têm um histórico de causar doenças no trato urogenital feminino, como cistite por ação oportunista (DEMIRBAG; KÖKSAL; KAYA, 2013; GUPTA et al., 1999). As bactérias encontradas com o maior número de leituras de OTUs no sexo masculino foram a *Staphylococcus* EF510614 e a *Staphylococcus* FN393799 (Figura 12b), que são bactérias geralmente encontradas no suor (TROCCAZ et al., 2015), sendo compreensível identifica-las em maior número no sexo masculino, afinal neste sexo ocorre uma maior produção das glândulas sudoríparas (GRICE; SEGRE, 2011). A bactéria *Staphylococcus* FN393799, quando acessada no banco de pequenas sequências SILVA é identificada como *S. hominis*, uma bactéria que degrada precursores do suor causando os típicos odores (TROCCAZ et al., 2015).

6.6 Diversidade de bactérias nos indivíduos atópicos

Os grupos 3 e 4 (AtAsmnR) e 7 e 8 (NAtAsm) foram comparados para analisar a microbiota associada a atopia em indivíduos asmáticos. Quando os gêneros foram analisados foi possível identificar dois em comum nesses indivíduos, *Streptococcus* e *Aerococcus*, e uma espécie, *Streptococcus salivarius thermophilus* FJ749349 (Figura 14). O gênero *Streptococcus* é comumente encontrado em amostras de microbiota do trato respiratório de asmáticos (CASTRO-NALLAR et al., 2015), são conhecidos, clinicamente, por causar dermatites atópicas em indivíduos saudáveis (DEKIO et al., 2007), e podem causar infecções nas vias aéreas, como por exemplo, o agente *S. pneumoniae* que pode induzir o quadro de asma (BISGAARD et al., 2007).

O gênero *Aerococcus*, é uma bactéria oportunista, a *Aerococcus urinae* e a *A. viridans*, por exemplo, acometem principalmente indivíduos imunossuprimidos (RAZEQ; THOMAS; ALEXANDER, 1999) causando infecções no trato urogenital (CHEN et al., 2012; ZHANG et al., 2000). Mas não há relatos da associação deste gênero com inflamação respiratória ou causador de asma.

A espécie bacteriana encontrada nestes grupos, a *Streptococcus salivarius thermophilus* FJ749349, conhecida como *S. thermophilus* pode ser encontrada na

saliva, e vem sendo estudada por demonstrar uma ação imunomodulatória quando presente no intestino humano, diminuindo doenças intestinais, como a diarreia aguda (ISOLAURI, 2001), e até mesmo suprimindo rinites em indivíduos atópicos (CHARNG; LIN; HSU, 2006). Quando associada à pele, a *S. thermophilus* pode auxiliar no tratamento de dermatites atópicas (DI MARZIO et al., 2003).

A microbiota de indivíduos com atopia e asma é composta por gêneros bacterianos que não estão presentes nos indivíduos sem atopia (NAtasm0 e 1) e em indivíduos saudáveis. Fazendo-se a comparação desses 3 grupos, resulta-se em 5 gêneros, o gênero *Diaphorobacter* possui espécies que são encontradas no seio maxilar de pacientes com rinite crônica (HAMILLOS, 2014). O outro gênero que é interessante entre os 5 gêneros encontrados, é o gênero *Enhydrobacter* que foi encontrado com maior frequência nos indivíduos atópicos no estudo de Hanski e seus colaboradores (2012).

6.7 Bactérias da microbiota de asmáticos

A bactéria *Stenotrophomonas* GQ443097 foi encontrada somente nos grupos 3 e 5 (Figura 9), está associada a asma em indivíduos atópicos do sexo feminino, uma bactéria bacilar gram-negativa, aeróbica, que habita o solo, água e plantas, e também pode ser encontrada na poeira das casas, principalmente em casas mais úmidas (KETTLESON et al., 2013) portanto, tornando-se facilmente participante da microbiota humana, como observado nestes indivíduos, mas a *Stenotrophomonas* pode agir de forma oportunista, como a *S. maltophilia*, encontrada no esputo de pacientes com fibrose cística (MUHLEBACH; NOAH, 2002), ou co-infectando pacientes asmáticos (ZUGHAIER; RYLEY; JACKSON, 1999).

Na microbiota da pele dos grupos 4 e 6, grupos de indivíduos do sexo masculino, foram encontradas a *Bacillus* HQ156459 e a *Clostridium* EU777697 (Figura 15d). A *Bacillus* HQ156459, quando acessada no banco de pequenas seqüências SILVA identifica-se como *B. cereus*, uma bactéria gram-positiva que vive em solos, e como citado anteriormente, possui algumas cepas que podem causar intoxicações alimentares (MARTINEZ-BLANCH et al., 2009), portanto na microbiota destes indivíduos é possível encontrar a *B. cereus* nestes grupos, devido a sua ampla distribuição no ambiente, fazendo com que o indivíduo tenha fácil contato. Por outro lado, a outra espécie identificada, a *Clostridium* EU777697 é uma bactéria em

forma de bastão, gram-positiva, do qual já existem estudos feitos em indivíduos com atopia, revelando a presença desta bactéria na poeira de casas de ambiente rural, onde os indivíduos não apresentaram o desenvolvimento de alergias (VALKONEN et al., 2015), porém duas espécies deste gênero também foram encontradas nos indivíduos com atopia e asma (Figura 9), a outra espécie encontrada nestes grupos foi a *Staphylococcus* AY897994, um gênero normalmente oportunista patogênico, que possui um membro muito presente na pele, a *S. epidermidis*.

6.8 Diversidade de bactérias cultiváveis nos indivíduos remissivos e saudáveis

Nesse trabalho foi observada uma diversidade de espécies bacterianas cultiváveis encontradas na microbiota da pele dos indivíduos atópico remissivos a asma (AtAsmR) e saudáveis. Foram encontradas 24 espécies no grupo AtAsmR, demonstrando a maior diversidade entre todos os grupos estudados (Figura 9), postulando a hipótese que quanto maior a diversidade da microbiota maior a possibilidade de proteção ou menor persistência da asma, visto que estes indivíduos, apesar de desenvolverem asma na infância, com o decorrer dos anos apresentaram uma melhora do quadro asmático.

No grupo dos indivíduos saudáveis foram identificadas 3 espécies (Figura 9): *Leuconostoc pseudomesenteroides* AF515228, *Pantoea* GU566350 e *Acinetobacter* DQ911549.

Leuconostoc pseudomesenteroides AF515228 é uma bactéria gram-positiva heterofermentativa, por esta característica, a espécie é empregada no ramo alimentício, na fermentação de sucos, por exemplo, juntamente com outros microrganismos (SAGDIC et al., 2014), ou ainda fermentação do leite. Além dessas características essa bactéria combinada com outras bactérias heterofermentativas apresentou propriedades de ação modulatória para a prevenção ou tratamento de doenças relacionadas com a obesidade, modulando a atividade biológica de células Th17 (BEAULIEU et al., 2008).

De acordo com Gagliani et al. (2015), células Th17 podem se transdiferenciar para células imunes do tipo Th1 na presença de TGF- β 1 e com a ativação de Ahr, durante uma resposta imune, sugerindo que esta plasticidade de células Th17 podem ser exploradas para possíveis terapêuticas na restauração de tolerância

imunológica a doenças inflamatórias. Desse modo, é possível que essa bactéria possa agir na prevenção de outras doenças inflamatórias, como a asma, sendo possível que esta bactéria tenha estimulado o sistema destes indivíduos proporcionando o não desenvolvimento do quadro asmático.

A bactéria *Pantoea* GU566350, quando acessada no banco de pequenas sequências SILVA, identifica-se como *P. agglomerans*, uma bactéria gram-negativa, simbiótica de vários alimentos como frutas, batatas, e principalmente no trigo, por exemplo na farinha – um alimento muito consumido na região nordeste do Brasil. *P. agglomerans* possui uma substância IP-PA1 advinda do LPS, que apresenta a capacidade de ativação inicial de macrófagos, o que pode levar a um equilíbrio entre a resposta do sistema imune Th1/Th2. Alguns estudos mostram a ação da IP-PA1 contra infecções por *Toxoplasma gondii*, *Bordetella pertussis* e *Escherichia coli*, contra hiperlipidemias, alergias e ainda apresentando atividade antitumoral (KOHCHI et al., 2006; NAKATA et al., 2011; YOSHIDA et al., 2009). A IP-PA1 também é utilizada em ingredientes ativos em rações para a pecuária e aquicultura, atuando na defesa contra a infecção e, em produtos para a pele, para manter a pele saudável, melhorando dermatites atópica e atuando na resistência ao envelhecimento. (KOHCHI et al., 2006), esse efeito similar pode ocorrer no início da vida, com o estímulo pela *P. agglomerans* modulando esta rápida resposta dos macrófagos, auxiliando na defesa diante de infecções, como a asma.

A *Acinetobacter* DQ911549 foi encontrada somente no grupo dos indivíduos saudáveis, e uma espécie de *Acinetobacter*, com número de acesso HQ143283, também foi encontrada com maior abundância em todos os indivíduos sem asma (AtAsmR e Saud), lembrando o que já foi citado anteriormente, este gênero está associado com a expressão de moléculas anti-inflamatórias contra doenças alérgicas (FYHRQUIST et al., 2014; QIU et al., 2011), sendo interessante este achado de bactérias justamente nos indivíduos sem o quadro de inflamação, como Hanski e seus colaboradores (2012) também observaram nos indivíduos sem asma que moravam em ambientes rurais. Porém, quando a *Acinetobacter* DQ911549 é acessada no banco de pequenas sequências SILVA identifica-se como *A. johnnii*, uma bactéria encontrada comumente na pele, mas pode agir como oportunista causando infecções em indivíduos imunocomprometidos (SEIFERT et al., 1993). Portanto, a *Acinetobacter* pode ser encontrada facilmente na natureza, podendo

colonizar a microbiota humana, como já foi visto na microbiota da pele, porém será a adaptação ao hospedeiro e fatores físicos e fisiológicos que determinarão a ação desta bactéria, como imunomodulatória na infância ou como oportunista no decorrer da vida.

Entre os indivíduos atópicos com melhora da asma (AtAsmR) e indivíduos atópicos que não tiveram asma (AtnAsm) foram encontrados 8 gêneros em comum (Figura 19) e uma espécie (Figura 9). Sugerindo-se que estas bactérias podem estar atuando como agentes protetores contra a doença, até mesmo causando uma proteção tardia, onde estas bactérias vieram atuar no decorrer dos anos. A espécie bacteriana identificada apenas nestes grupos, a *Bacillus pumilus*, possui grande importância na agroindústria, pois produzem proteases com ação antibiótica em pesticidas (LIU; HUANG; FENG, 2015), e em um estudo recente, de Luan e seus colaboradores (2015), revelou a ação dessa bactéria na diminuição de cetose clínica em vacas leiteiras suplementadas com *Bacillus pumilus*, demonstrando ainda uma maior imunidade do que vacas tratadas com o antibiótico habitual, e conseqüentemente maior produção de leite. Dessa forma, a ação antibiótica de *B. pumilus* é clara, podendo evitar a permanência de patógenos nos indivíduos sem asma, levando a proteção. Com a comparação entre indivíduos remissivos (AtAsmR) e não remissivos para asma (AtAsmnr) (Figura 19), mais uma vez notamos a maior diversidade no grupo de remissivos, assim como visto no índice de diversidade de Shannon e Simpson (Figura 8), reforçando a hipótese de que o maior contato com microrganismos aumenta a diversidade da microbiota residente podendo auxiliar na melhora da doença asmática. Entre os gêneros encontrados nesta diversidade, o gênero *Psychrobacter* também foi encontrado no banco de dados de Oh e seus colaboradores (2014) e Leung e seus colaboradores (2015), ambos bancos de bactérias da microbiota de indivíduos saudáveis (Figura 7). Outro gênero relevante encontrado foi o *Weissella*, gênero que foi considerado por Collins e seus colaboradores (1993) pertencente ao grupo *Leuconostoc paramesenteroides*, um grupo de bactérias heterofermentativas que juntamente com *Leuconostoc pseudomesenteroides* e outros microrganismos agem na fermentação de alimentos, atuando como probióticos e têm mostrado ação modulatória para prevenção ou tratamento de doença relacionadas a obesidade (BEAULIEU et al., 2008), portanto

uma bactéria bem similar à encontrada na microbiota de indivíduos saudáveis deste estudo.

7. CONCLUSÃO

A identificação das bactérias encontradas na microbiota da pele destes indivíduos com diferentes quadros de atopia e asma, trouxe uma ampla visão do quanto estas bactérias, amplamente distribuídas no ambiente, podem auxiliar na defesa contra doenças e participar da ontogenia do sistema imunológico, como apresentado nos grupos AtAsmR e Saudáveis com bactérias presentes de ação imunomodulatória. Por outro lado, a microbiota também podem se aproveitar do estado do organismo do hospedeiro, agindo oportunamente, e afetar a saúde do indivíduo, causando diversas infecções, assim como foi observado nas características das bactérias encontradas nos diversos grupos AtAsmR, AtnAsm e NAtAsm (Tabela 15 – ANEXO I). No geral pode-se compreender que qualquer bactéria somente crescerá e se adaptará naquele ambiente que lhe favorecer mais, bem como observado na diferença da microbiota entre os sexos e em cada grupo.

Desta forma, a exposição ao ambiente rico em microrganismos ou produtos microbianos pode estimular sim o sistema imune inato, principalmente no início da vida, quando ocorre a colonização da microbiota humana. Essa diferenciação pode prevenir ou melhorar algumas doenças que ocorrem no decorrer da vida, dependendo dos microrganismos do indivíduo, que agem, muitas vezes, competindo com o invasor. Sendo assim, quanto maior a diversidade maior a proteção, como postula a hipótese da higiene, e foi observado no grupo dos indivíduos remissivos deste estudo, que além de apresentar a maior diversidade de bactérias dentre todos os grupos, apresentou no decorrer dos anos, de 2005 a 2013, uma melhora da asma.

8. PERSPECTIVAS

- Quantificar as imunoglobulinas e citocinas no PBMC dos 50 indivíduos avaliados nesse estudo.
- Realizar a identificação através de PCR com iniciadores específicos dos gêneros e/ou espécies selecionados nesse trabalho no DNA extraído diretamente da pele em um número maior de indivíduos.
- Isolar e cultivar as espécies identificadas nesse trabalho utilizando meios de cultura seletivos.
- Utilizar extrato bruto e frações dessas bactérias isoladas para avaliar o potencial imunomodulador em PBMC de indivíduos asmáticos.
- Identificação através de gel bidimensional e espectrometria de massa das proteínas presentes nas frações protéicas estudadas com ação imunomoduladora.
- Síntese dos genes e clonagem no vetor de expressão, referentes às proteínas mais promissoras identificadas, expressão e purificação das proteínas recombinantes.
- Avaliação do potencial imunomodulador das proteínas recombinantes em PBMC humano e em modelo murino de asma induzida com o ácaro *Blomia Tropicalis*.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Revinter, 2012.

ASHER, I.; PEARCE, N. **Global burden of asthma among children**. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, v. 18, n. 11, p. 1269-1278, 2014.

AZAD, M. B. et al. **Infant gut microbiota and the hygiene hypothesis of allergic disease**: impact of household pets and siblings on microbiota composition and diversity. Allergy Asthma Clin Immunol, v. 9, n. 1, p. 15, 2013.

BACH, J. F. **The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases**. N Engl J Med, v. 347, n. 12, p. 911-20, Sep 19 2002.

BACKHED, F. et al. **The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage**. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 101, n. 44, p. 15718-23, Nov 2 2004.

BARRETO, M. et al. **Poverty, dirt, infections and non-atopic wheezing in children from a Brazilian urban center**. Respiratory Research, v. 11, n. 1, p. 167, 2010.

BARRETO, M. et al. **Risk factors and immunological pathways for asthma and other allergic diseases in children**: background and methodology of a longitudinal study in a large urban center in Northeastern Brazil (Salvador-SCAALA study). BMC Pulmonary Medicine, v. 6:15, 2006.

BAUER, S.; HANGEL, D.; YU, P. **Immunobiology of toll-like receptors in allergic disease**. Immunobiology, v. 212, n. 6, p. 521-33, 2007.

BEAULIEU, J. et al. **Method of regulating the th17 pathway and its associated metabolic impact**: Google Patents 2008.

BELT, K. et al. **Identification of culturable stream water bacteria from urban, agricultural, and forested watersheds using 16S rRNA gene sequencing**. Journal of water and health, v. 5, n. 3, p. 395-406, 2007.

BEUTLER, B. **Innate immunity**: an overview. Mol Immunol, v. 40, n. 12, p. 845-59, Feb 2004.

BIESBROEK, G. et al. **Early Respiratory Microbiota Composition Determines Bacterial Succession Patterns and Respiratory Health in Children**. Am J Respir Crit Care Med, Oct 20 2014.

BISGAARD, H. et al. **Childhood asthma after bacterial colonization of the airway in neonates**. New England Journal of Medicine, v. 357, n. 15, p. 1487-1495, 2007.

BLANKESTIJN, M. et al. **Developments in the field of allergy in 2013 through the eyes of Clinical and Experimental Allergy.** Clinical & Experimental Allergy, v. 44, n. 12, p. 1436-1457, 2014.

BOGAERT, D. et al. **Variability and diversity of nasopharyngeal microbiota in children: a metagenomic analysis.** PLoS One, v. 6, n. 2, p. e17035, 2011.

BRAUN-FAHRLANDER, C. et al. **Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community.** SCARPOL team. Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution. Clin Exp Allergy, v. 29, n. 1, p. 28-34, Jan 1999.

BRAUN-FAHRLÄNDER, C. et al. **Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children.** New England Journal of Medicine, v. 347, n. 12, p. 869-877, 2002.

BUTCHART, S. H. M. et al. **Global Biodiversity: Indicators of Recent Declines.** Science, v. 328, n. 5982, p. 1164-1168, May 28, 2010 2010.

CASTRO-NALLAR, E. et al. **Integrating microbial and host transcriptomics to characterize asthma-associated microbial communities.** BMC medical genomics, v. 8, n. 1, p. 50, 2015.

CHARNG, Y.-C.; LIN, C.-C.; HSU, C.-H. **Inhibition of allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity by recombinant lactic-acid bacteria.** Vaccine, v. 24, n. 33, p. 5931-5936, 2006.

CHEN, L.-Y. et al. **Successful treatment of Aerococcus viridans endocarditis in a patient allergic to penicillin.** Journal of Microbiology, Immunology and Infection, v. 45, n. 2, p. 158-160, 2012.

CIANFERONI, A.; SPERGEL, J. **Eosinophilic Esophagitis: A Comprehensive Review.** Clinical reviews in allergy & immunology, p. 1-16, 2015.

ČITAR, M. et al. **Human intestinal mucosa-associated Lactobacillus and Bifidobacterium strains with probiotic properties modulate IL-10, IL-6 and IL-12 gene expression in THP-1 cells.** Beneficial microbes, v. 6, n. 3, p. 325-336, 2014.

COGEN, A.; NIZET, V.; GALLO, R. **Skin microbiota: a source of disease or defence?** British Journal of Dermatology, v. 158, n. 3, p. 442-455, 2008.

COLLINS, M. et al. **Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus Weissella for the Leuconostoc paramesenteroides group of species.** Journal of Applied Bacteriology, v. 75, n. 6, p. 595-603, 1993.

CONRAD, M. L. et al. **Maternal TLR signaling is required for prenatal asthma protection by the nonpathogenic microbe Acinetobacter Iwoffii F78.** J Exp Med, v. 206, n. 13, p. 2869-77, Dec 21 2009.

COOPER, P. J. et al. **Asthma in Latin America: a public health challenge and research opportunity.** *Allergy*, v. 64, n. 1, p. 5-17, 2009.

DAVIS, M. F. et al. **Staphylococcus aureus colonization is associated with wheeze and asthma among US children and young adults.** *J Allergy Clin Immunol*, v. 135, n. 3, p. 811-3 e5, Mar 2015.

DE SOUZA-MACHADO, C.; SOUZA-MACHADO, A.; CRUZ, A. A. **Asthma mortality inequalities in Brazil: tolerating the unbearable.** *ScientificWorldJournal*, v. 2012, p. 625829, 2012.

DEBARRY, J. et al. **Acinetobacter Iwoffii and Lactococcus lactis strains isolated from farm cowsheds possess strong allergy-protective properties.** *J Allergy Clin Immunol*, v. 119, n. 6, p. 1514-21, Jun 2007.

DEBARRY, J. et al. **The allergy-protective properties of Acinetobacter Iwoffii F78 are imparted by its lipopolysaccharide.** *Allergy*, v. 65, n. 6, p. 690-7, Jun 1 2010.

DEKIO, I. et al. **Characterization of skin microbiota in patients with atopic dermatitis and in normal subjects using 16S rRNA gene-based comprehensive analysis.** *Journal of Medical Microbiology*, v. 56, n. 12, p. 1675-1683, 2007.

DEMIRBAG, B. C.; KÖKSAL, I.; KAYA, S. **Genitourinary infection prevalence among women who used an intrauterine device or oral contraceptives.** *Archives of gynecology and obstetrics*, v. 288, n. 4, p. 911-916, 2013.

DI MARZIO, L. et al. **Effect of the lactic acid bacterium Streptococcus thermophilus on stratum corneum ceramide levels and signs and symptoms of atopic dermatitis patients.** *Experimental dermatology*, v. 12, n. 5, p. 615-620, 2003.

EDWARDS, U. et al. **Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes.** Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res*, v. 17, n. 19, p. 7843-53, Oct 11 1989.

EGE, M. J. et al. **Prenatal farm exposure is related to the expression of receptors of the innate immunity and to atopic sensitization in school-age children.** *J Allergy Clin Immunol*, v. 117, n. 4, p. 817-23, Apr 2006.

FIGUEIREDO, C. A. et al. **Environmental conditions, immunologic phenotypes, atopy, and asthma: new evidence of how the hygiene hypothesis operates in Latin America.** *J Allergy Clin Immunol*, v. 131, n. 4, p. 1064-8, 1068.e1, Apr 2013.

FINKELMAN, F. D. et al. **Importance of cytokines in murine allergic airway disease and human asthma.** *J Immunol*, v. 184, n. 4, p. 1663-74, Feb 15 2010.

FUKUI, Y. et al. **Metagenomic analysis for detecting pathogens in culture-negative infective endocarditis.** *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2015.

FYHRQUIST, N. et al. **Acinetobacter species in the skin microbiota protects from allergic sensitization and inflammation.** J Allergy Clin Immunol, Sep 24 2014.

GAGLIANI, N. et al. **Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation.** Nature, 2015.

GAO, Z. et al. **Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 104, n. 8, p. 2927-2932, February 20, 2007 2007.

GEDDES, D. M. **Inhaled corticosteroids: benefits and risks.** Thorax, v. 47, n. 6, p. 404-407, 1992.

GRICE, E. A. et al. **Topographical and Temporal Diversity of the Human Skin Microbiome.** Science, v. 324, n. 5931, p. 1190-1192, May 29, 2009 2009.

GROOT KORMELINK, T. et al. **Atopic and non-atopic allergic disorders: current insights into the possible involvement of free immunoglobulin light chains.** Clinical & Experimental Allergy, v. 39, n. 1, p. 33-42, 2009.

GUPTA, K. et al. **The prevalence of antimicrobial resistance among uropathogens causing acute uncomplicated cystitis in young women.** International journal of antimicrobial agents, v. 11, n. 3, p. 305-308, 1999.

HAMILOS, D. L. **Host-microbial interactions in patients with chronic rhinosinusitis.** Journal of Allergy and Clinical Immunology, v. 133, n. 3, p. 640-653. e4, 2014.

HANDELSMAN, J. **Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms.** Microbiol Mol Biol Rev, v. 68, n. 4, p. 669-85, Dec 2004.

HANSKI, I. et al. **Environmental biodiversity, human microbiota, and allergy are interrelated.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 109, n. 21, p. 8334-8339, May 22, 2012 2012.

HASEGAWA, T. et al. **Efficacy of Lactobacillus plantarum strain HSK201 in relief from Japanese cedar pollinosis.** Bioscience, biotechnology, and biochemistry, v. 73, n. 12, p. 2626-2631, 2009.

HENDRIKSEN, N. B.; HANSEN, B. M.; JOHANSEN, J. E. **Occurrence and pathogenic potential of Bacillus cereus group bacteria in a sandy loam.** Antonie Van Leeuwenhoek, v. 89, n. 2, p. 239-49, Feb 2006.

HESSELMAR, B. et al. **Does early exposure to cat or dog protect against later allergy development?** Clin Exp Allergy, v. 29, n. 5, p. 611-7, May 1999.

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

INGRAHAM, J. L.; INGRAHAM, C. A. **Introdução a Microbiologia: Uma abordagem baseada em estudos de casos.** CENGAGE, 2011. ISBN 9788522107872.

ISOLAURI, E. **Probiotics in human disease.** The American journal of clinical nutrition, v. 73, n. 6, p. 1142S-1146S, 2001.

JOHANSSON, S. G. O. et al. **Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003.** Journal Allergy Clinic Immunology, v. 113, p. 832-836, 2003.

KANO, H. et al. **Oral administration of Lactobacillus delbrueckii subspecies bulgaricus OLL1073R-1 suppresses inflammation by decreasing interleukin-6 responses in a murine model of atopic dermatitis.** Journal of dairy science, v. 96, n. 6, p. 3525-3534, 2013.

KETTLESON, E. et al. **Stenotrophomonas, Mycobacterium, and Streptomyces in home dust and air: associations with moldiness and other home/family characteristics.** Indoor air, v. 23, n. 5, p. 387-396, 2013.

KIM, Y.-J. et al. **Bacillus Calmette-Guérin Suppresses Asthmatic Responses via CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells and Dendritic Cells.** Allergy Asthma Immunol Res, v. 6, n. 3, p. 201-207, 5/ 2014.

KOHCHI, C. et al. **Applications of lipopolysaccharide derived from Pantoea agglomerans (IP-PA1) for health care based on macrophage network theory.** Journal of bioscience and bioengineering, v. 102, n. 6, p. 485-496, 2006.

LEE, Y. K.; MAZMANIAN, S. K. **Has the Microbiota Played a Critical Role in the Evolution of the Adaptive Immune System?** Science, v. 330, n. 6012, p. 1768-1773, December 24, 2010 2010.

LEGATZKI, A.; RÖSLER, B.; VON MUTIUS, E. **Microbiome diversity and asthma and allergy risk.** Current allergy and asthma reports, v. 14, n. 10, p. 1-9, 2014.

LEUNG, M. H.; WILKINS, D.; LEE, P. K. **Insights into the pan-microbiome: skin microbial communities of Chinese individuals differ from other racial groups.** Sci Rep, v. 5, p. 11845, 2015.

LIU, R.; HUANG, C.; FENG, H. **Salt stress represses production of extracellular proteases in Bacillus pumilus.** Genetics and molecular research: GMR, v. 14, n. 2, p. 4939, 2015.

LIU, Y. et al. **Genomic insights into the taxonomic status of the Bacillus cereus group.** Scientific reports, v. 5, 2015.

LUAN, S. et al. **Effects of direct-fed Bacillus pumilus 8G-134 on feed intake, milk yield, milk composition, feed conversion, and health condition of pre-and**

postpartum Holstein cows. Journal of dairy science, v. 98, n. 9, p. 6423-6432, 2015.

MARTINEZ-BLANCH, J. F. et al. **Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of enterotoxigenic members of Bacillus cereus group in food samples.** Int J Food Microbiol, v. 135, n. 1, p. 15-21, Sep 30 2009.

MARTINEZ, F. D. **Trends in Asthma Prevalence, Admission Rates, and Asthma Deaths.** Respiratory Care, v. 53, p. 561-565, Maio 2008.

MCBRIDE, M. E.; DUNCAN, W. C.; KNOX, J. M. **The Environment and the Microbial Ecology of Human Skin.** Applied and Environmental Microbiology, v. 33, n. 3, p. 603-608, 1977.

MEADOW, J. F. et al. **Significant changes in the skin microbiome mediated by the sport of roller derby.** PeerJ, v. 1, p. e53, 2013.

MOISAN, J. et al. **TLR7 ligand prevents allergen-induced airway hyperresponsiveness and eosinophilia in allergic asthma by a MYD88-dependent and MK2-independent pathway.** Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v. 290, n. 5, p. L987-95, May 2006.

MOTTET, C.; GOLSHAYAN, D. **CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells: from basic research to potential therapeutic use.** Swiss Med Wkly, v. 137, n. 45-46, p. 625-34, Nov 17 2007.

MUHLEBACH, M. S.; NOAH, T. L. **Endotoxin activity and inflammatory markers in the airways of young patients with cystic fibrosis.** American journal of respiratory and critical care medicine, v. 165, n. 7, p. 911-915, 2002.

NAKATA, K.; INAGAWA, H.; SOMA, G.-I. **Lipopolysaccharide IP-PA1 from Pantoea agglomerans prevents suppression of macrophage function in stress-induced diseases.** Anticancer research, v. 31, n. 7, p. 2437-2440, 2011.

NELSON, D. L.; LEHNINGER, A. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry.** W. H. Freeman, 2008. ISBN 9780716771081.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana.** Atheneu, 1991.

OH, J. et al. **Biogeography and individuality shape function in the human skin metagenome.** Nature, v. 514, n. 7520, p. 59-64, Oct 2 2014.

PETERSON, J. et al. **The NIH Human Microbiome Project.** Genome Res, v. 19, n. 12, p. 2317-23, Dec 2009.

POHJAVUORI, E. et al. **Lactobacillus GG effect in increasing IFN- γ production in infants with cow's milk allergy.** Journal of allergy and clinical immunology, v. 114, n. 1, p. 131-136, 2004.

QIN, J. et al. **A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing.** Nature, v. 464, n. 7285, p. 59-65, 03/04/print 2010.

QIU, H. et al. **Acinetobacter baumannii infection inhibits airway eosinophilia and lung pathology in a mouse model of allergic asthma.** PLoS One, v. 6, n. 7, p. e22004, 2011.

RAVEL, J. et al. **Vaginal microbiome of reproductive-age women.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 108, n. Supplement 1, p. 4680-4687, March 15, 2011 2011.

RAZEQ, J. H.; THOMAS, G. M.; ALEXANDER, D. **The first reported case of Aerococcus bacteremia in a patient with HIV infection.** Emerging infectious diseases, v. 5, n. 6, p. 838, 1999.

REDECKE, V. et al. **Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma.** J Immunol, v. 172, n. 5, p. 2739-43, Mar 1 2004.

ROMAGNANI, S. **The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both?** Immunology, v. 112, n. 3, p. 352-363, 2004.

ROTH, R. R.; JAMES, W. D. **Microbial ecology of the skin.** Annu Rev Microbiol, v. 42, p. 441-64, 1988.

SAGDIC, O. et al. **Diversity and probiotic potentials of lactic acid bacteria isolated from gilaburu, a traditional Turkish fermented European cranberrybush (Viburnum opulus L.) fruit drink.** Food Research International, v. 64, p. 537-545, 2014.

SANDERS, W. E., JR.; SANDERS, C. C. **Enterobacter spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century.** Clin Microbiol Rev, v. 10, n. 2, p. 220-41, Apr 1997.

SANFORD, J. A.; GALLO, R. L. **Functions of the skin microbiota in health and disease.** Semin Immunol, v. 25, n. 5, p. 370-7, Nov 30 2013.

SCHAUB, B.; LAUENER, R.; VON MUTIUS, E. **The many faces of the hygiene hypothesis.** J Allergy Clin Immunol, v. 117, n. 5, p. 969-77; quiz 978, May 2006.

SEIFERT, H. et al. **Vascular Catheter—Related Bloodstream Infection Due to Acinetobacter johnsonii (Formerly Acinetobacter calcoaceticus var. Iwoffii): Report of 13 Cases.** Clinical infectious diseases, v. 17, n. 4, p. 632-636, 1993.

SEMBAJWE, G. et al. **National income, self-reported wheezing and asthma diagnosis from the World Health Survey.** Eur Respir J, v. 35, n. 2, p. 279-86, Feb 2010.

SHEIKH, A.; STRACHAN, D. P. **The hygiene theory: fact or fiction?** *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, v. 12, n. 3, p. 232-6, Jun 2004.

SJOGREN, Y. M. et al. **Altered early infant gut microbiota in children developing allergy up to 5 years of age.** *Clin Exp Allergy*, v. 39, n. 4, p. 518-26, Apr 2009.

SOUZA DA CUNHA, S. et al. **Asthma cases in childhood attributed to atopy in tropical area in Brazil.** *Rev Panam Salud Publica*, v. 28, n. 6, p. 405-11, Dec 2010.

SPENCER, R. C. **Bacillus anthracis.** *J Clin Pathol*, v. 56, n. 3, p. 182-7, Mar 2003.

SPIERS, A. J.; BUCKLING, A.; RAINEY, P. B. **The causes of Pseudomonas diversity.** *Microbiology*, v. 146, n. 10, p. 2345-2350, 2000.

STEELE, H. L.; STREIT, W. R. **Metagenomics: advances in ecology and biotechnology.** *FEMS Microbiol Lett*, v. 247, n. 2, p. 105-11, Jun 15 2005.

STRACHAN, D. P. **Allergy and family size: a riddle worth solving.** *Clin Exp Allergy*, v. 27, n. 3, p. 235-6, Mar 1997.

STRINA, A. et al. **Childhood diarrhea and observed hygiene behavior in Salvador, Brazil.** *Am J Epidemiol*, v. 157, n. 11, p. 1032-8, Jun 1 2003.

TAN, Y. et al. **An inactivated Pseudomonas aeruginosa medicament inhibits airway allergic inflammation and improves epithelial functions.** *J Physiol Sci*, v. 63, n. 1, p. 63-9, Jan 2013.

TEIXEIRA MD MDA, G. et al. **Sentinel areas: a monitoring strategy in public health.** *Cad Saude Publica*, v. 18, n. 5, p. 1189-95, Sep-Oct 2002.

TROCCAZ, M. et al. **Mapping axillary microbiota responsible for body odours using a culture-independent approach.** *steroids*, v. 20, n. 22, p. 26, 2015.

TSAI, M.-H. et al. **Pathogenic Bacterial Nasopharyngeal Colonization and Its Impact on Respiratory Diseases in the First Year of Life: The PATCH Birth Cohort Study.** *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 34, n. 6, p. 652-658, 2015.

VALKONEN, M. et al. **Bacterial Exposures and Associations with Atopy and Asthma in Children.** *PloS one*, v. 10, n. 6, 2015.

VARY, P. S. **Prime time for Bacillus megaterium.** *Microbiology*, v. 140 (Pt 5), p. 1001-13, May 1994.

VOGEL, K. et al. **Animal shed Bacillus licheniformis spores possess allergy-protective as well as inflammatory properties.** *J Allergy Clin Immunol*, v. 122, n. 2, p. 307-12, 312.e1-8, Aug 2008.

VON HERTZEN, L.; HANSKI, I.; HAAHTELA, T. **Natural immunity.** Biodiversity loss and inflammatory diseases are two global megatrends that might be related. *EMBO Rep*, v. 12, n. 11, p. 1089-93, Nov 2011.

WANDALSEN, N. F. et al. **Avaliação de critérios para o diagnóstico de asma através de um questionário epidemiológico.** *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 35, p. 199-205, 2009.

WELTE, T.; GRONEBERG, D. A. **Asthma and COPD.** *Experimental and Toxicologic Pathology*, v. 57, Supplement 2, n. 0, p. 35-40, 6/15/ 2006.

WHEELER, J. G. et al. **Immune and clinical impact of *Lactobacillus acidophilus* on asthma.** *Ann Allergy Asthma Immunol*, v. 79, n. 3, p. 229-33, Sep 1997.

WILKINSON, L.; FRIENDLY, M. **The history of the cluster heat map.** *The American Statistician*, v. 63, n. 2, 2009.

WILLS-KARP, M. et al. **Interleukin-13:** central mediator of allergic asthma. *Science*, v. 282, n. 5397, p. 2258-61, Dec 18 1998.

WILLS-KARP, M.; SANTELIZ, J.; KARP, C. L. The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. **Nat Rev Immunol**, v. 1, n. 1, p. 69-75, Oct 2001.

WONG, G. W. K.; CHOW, C. M. **Childhood Asthma Epidemiology:** Insights From Comparative Studies of Rural and Urban Populations. *Pediatric Pulmonology*, v. 43, p. 107–116., 2008.

WOOLEY, J. C.; GODZIK, A.; FRIEDBERG, I. **A primer on metagenomics.** *PLoS Comput Biol*, v. 6, n. 2, p. e1000667, Feb 2010.

YAZDANBAKHSH, M.; KREMSNER, P. G.; VAN REE, R. **Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis.** *Science*, v. 296, n. 5567, p. 490-4, Apr 19 2002.

YOSHIDA, A. et al. **Improvement of allergic dermatitis via regulation of the Th1/Th2 immune system balance by macrophages activated with lipopolysaccharide derived from *Pantoea agglomerans* (IP-PA1).** *Anticancer research*, v. 29, n. 11, p. 4867-4870, 2009.

ZHANG, Q. et al. **Aerococcus urinae in urinary tract infections.** *Journal of clinical microbiology*, v. 38, n. 4, p. 1703-1705, 2000.

ZHOU, X. et al. **The vaginal bacterial communities of Japanese women resemble those of women in other racial groups.** *FEMS Immunol Med Microbiol*, v. 58, n. 2, p. 169-81, Mar 2010.

ZUGHAIER, S. M.; RYLEY, H. C.; JACKSON, S. K. **Lipopolysaccharide (LPS) from *Burkholderia cepacia* is more active than LPS from *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* in stimulating tumor necrosis factor alpha from human monocytes.** *Infection and immunity*, v. 67, n. 3, p. 1505-1507, 1999.

ANEXO A

INSTITUTO DE SAÚDE
COLETIVA / UFBA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Fatores de risco para persistência, aquisição e remissão de sintomas de asma e marcadores de alergia em crianças na cidade de Salvador: Coorte SCAALA

Pesquisador: Mauricio Lima Barreto

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 07017212.6.0000.5030

Instituição Proponente: Instituto de Saúde Coletiva / UFBA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 120.616

Data da Relatoria: 25/09/2012

Apresentação do Projeto:

Título do Projeto: Fatores de risco para persistência, aquisição e remissão de sintomas de asma e marcadores de alergia em crianças na cidade de Salvador: Coorte SCAALA

Pesquisador Responsável: prof. Mauricio Lima Barreto-Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal de Bahia

Nome dos pesquisadores--Instituições

Coordenador

Álvaro Cruz - Centro de Enfermidades Respiratórias, HUPES - Faculdade de Medicina da UFBA

Darci Neve dos Santos - Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia

Neuza Maria Alcântara Neves-Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia

Laura Cunha Rodrigues - London School of Hygiene and Tropical Medicine, Inglaterra

Lain Pontes de Carvalho - Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - FIOCRUZ, Bahia

Bernd Genser - Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia

Registro CEP/ISC 060-12 em 23/08/2012

Endereço: Rua Basílio da Gama s/n

Bairro: Canela

CEP: 40.110-040

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3283-7441

Fax: (71)3283-7460

E-mail: cepisc@ufba.br

Figura 21 - Aprovação do Comitê de Ética do Instituto de Saúde Coletiva da UFBA e do Comitê Nacional de Pesquisa (CEP/ISC 060-12)

ANEXO B



Instituto de Saúde Coletiva - ISC
Universidade Federal da Bahia - UFBA

PROJETO: Fatores de risco para persistência, aquisição e remissão de asma e marcadores de alergia em crianças na cidade de Salvador: Coorte SCAALA

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

Nome da criança/adolescente: _____ . REG: _____

Pesquisadores da Universidade Federal da Bahia estão realizando um estudo adicional sobre ASMA na cidade de Salvador intitulado “**Avaliação da biodiversidade da microbiota da pele em indivíduos atópicos e asmáticos**”. Esse estudo tem como objetivos: Avaliação dos micróbios da pele em indivíduos. Seu(sua) filho(a) acima mencionado(a) já participou das etapas anteriores dessa pesquisa, em 2005, 2006, 2007, e das entrevistas em 2013. No momento atual, é necessário que o(a) senhor(a), como responsável pela criança/adolescente acima, dê o seu consentimento para que a seguinte atividade seja realizada:

- Uma coleta dos micróbios da pele do braço utilizando um algodão molhado.

Não haverá riscos de qualquer natureza relacionada à sua participação, o procedimento não é invasivo e todo o material será descartado após o trabalho. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra, do pesquisador responsável. Toda informação obtida através do questionário ou dos exames é estritamente confidencial e o seu nome, ou o do seu filho, não aparecerá em nenhuma parte do relatório, publicação desse estudo, ou no compartilhamento dos dados com outros investigadores. Os dados coletados serão utilizados apenas NESTA pesquisa. Não haverá riscos de qualquer natureza relacionada a sua participação. O benefício relacionado à sua participação será de aumentar o conhecimento científico para a área Biológica e para Asma. Desde já agradecemos!

Em caso de dúvida ou problema, você deve procurar o pesquisador responsável pela pesquisa no Instituto de Ciências da Saúde - UFBA, na Av. Av. Reitor Miguel Calmon, s/n, Vale do Canela, 40110-902, Salvador, telefone: (71) 3283-8932 — falar com Neuza Maria Alcântara Neves.

Declaro estar ciente do que se trata a pesquisa: “**Avaliação da biodiversidade da microbiota da pele em indivíduos atópicos e asmáticos**”

Salvador, ____ de ____ de 2013,

Assinatura do responsável

Salvador, ____ de ____ de _____, _____ (entrevistador/coletador)

Figura 22 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

ANEXO C

<p>1. Alguma vez no passado seu(sua) filho(a) teve sibilos (chiado no peito)? (2) Sim (0) Não</p> <p>Se você respondeu não, passe para a questão número 6.</p> <p>2. Nos últimos 12 meses, seu(sua) filho(a) teve sibilos (chiado no peito)? (2) Sim (0) Não</p> <p>3. Nos últimos 12 meses, quantas crises de sibilos (chiado no peito) seu(sua) filho(a) teve? Nenhuma crise (0) 1 a 3 crises (1) 4 a 12 crises (2) mais de 12 crises (2)</p> <p>4. Nos últimos 12 meses, com que frequência seu(sua) filho(a) teve seu sono perturbado por chiado no peito? Nunca acordou com chiado (0) Menos de 1 noite por semana (1) Uma ou mais noites por semana (2)</p> <p>5. Nos últimos 12 meses, seu chiado foi tão forte a ponto de impedir que seu(sua) filho(a) conseguisse dizer mais de 2 palavras entre cada respiração? (1) Sim (0) Não</p> <p>6. Alguma vez na vida seu(sua) filho(a) teve asma? (1) Sim (0) Não</p> <p>7. Nos últimos 12 meses, teve chiado no peito após exercícios físicos? (2) Sim (0) Não</p> <p>8. Nos últimos 12 meses, seu(sua) filho(a) teve tosse seca à noite, sem estar gripado ou com infecção respiratória? (2) Sim (0) Não</p>
--

Figura 23 - Modelo de asma do questionário padrão do *International Study of Asthma and Allergies and Childhood* e notas utilizadas para o cálculo de escore global (entre parênteses). (Fonte: Wandalsen et al, 2009).

Tabela 7 – Concentração (ug/ml) e Razão 260/280nm do DNA genômico extraído das amostras de cultivo de swab da pele de pacientes de diferentes perfis de asma e atopia, obtidas pela utilização de espectrofotômetro.

Amostra	Concentração (ug/ml)	Razão 260/280nm	Amostra	Concentração (ug/ml)	Razão 260/280nm	Amostra	Concentração (ug/ml)	Razão 260/280nm
Grupo 1			Grupo 5			Grupo 9		
1	21,9	1,6	21	22,7	1,4	41	381,9	2
2	57,2	1,9	22	23,1	1,6	42	17,9	2,3
3	63,5	1,9	23	40,5	2,2	43	15,8	1,8
4	7	1,5	24	22,5	2,1	44	14	1,2
5	504	1,4	25	16,7	1,8	45	16,8	2
Grupo 2			Grupo 6			Grupo 10		
6	5,2	1,9	26	3,7	2,2	46	77,6	1,9
7	292	1	27	30	1,8	47	4,9	1,7
8	86,6	2	28	9,4	2,1	48	35	1,1
9	6,2	2	29	4,3	1,7	49	33	1,2
10	3	1,9	30	3,3	1,9	50	0,8	2,6
Grupo 3			Grupo 7					
11	5,8	1,9	31	15,1	2,5			
12	1210	1,5	32	98,9	1,6			
13	7,8	1	33	885	1,2			
14	5	1,9	34	14,9	2,4			
15	3	1,9	35	6,9	1,3			
Grupo 4			Grupo 8					
16	47,5	2	36	49,2	1,9			
17	5,5	2	37	27,9	1,9			
18	52	2	38	9,6	2,1			
19	5	1,3	39	14	1,2			
20	0,3	2,6	40	16,8	2			

ANEXO D

Tabela 8 - Lista das espécies bacterianas identificadas na microbiota da pele agrupadas por grupo de atopia e asma. Entre parênteses o número de bactérias encontradas no agrupamento.

Todos os grupos (15)		AtAsmR, AtAsmR, AtnAsm e Saud (1)	AtAsmR, AtAsmR e Saud (2)	AtAsmR e AtAsmR (2)
<i>Acinetobacter</i> JN669248	<i>Pseudomonas</i> DQ227339	<i>Propionibacterium</i> FM875317	Chloroplast Pinus JN854184	<i>Brevundimonas diminuta</i> EU352761
<i>Bacillus anthracis</i> AY138304	<i>Pseudomonas</i> EF620457	AtAsmR, AtAsmR, NATAsm e Saud (1)	<i>Naxibacter</i> HQ323424	<i>Pantoea</i> HM556241
<i>Bacillus megaterium</i> GU252122	<i>Staphylococcus</i> AB681788	<i>Brevundimonas</i> HQ682006	AtAsmR e Saud (3)	AtAsmR e AtnAsm (1)
<i>Bacillus subtilis</i> HM101166	<i>Staphylococcus</i> EU536826	AtAsmR, AtAsmR e NATAsm (1)	<i>Clostridium baratii</i> CU919549	<i>Bacillus pumilus</i> GU471751
Clostridiaceae EU775607	<i>Staphylococcus</i> FM872946	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i> HM755627	<i>Sphingomonas</i> FJ893702	AtAsmR, AtnAsm, NATAsm e Saud (6)
<i>Clostridium</i> EU777708	<i>Staphylococcus</i> JN013953	AtAsmR, AtnAsm e Saud (1)	<i>Sphingomonas</i> GQ389073	<i>Bacillus cereus</i> G9241 AAEK01000013
<i>Enterobacter</i> HM557239	<i>Staphylococcus sciuri</i> EU481508	<i>Corynebacterium</i> FM874623	AtAsmR, NATAsm e Saud (2)	<i>Bacillus</i> HQ156459
<i>Klebsiella</i> sp. GQ416574	NATAsm e Saud (3)	AtAsmR, AtnAsm e Saud (1)	<i>Acinetobacter</i> JF891390	<i>Clostridium</i> EU468420
AtAsmR, AtnAsm, NATAsm e Saud (2)	<i>Acinetobacter</i> sp. GQ853365	<i>Stenotrophomonas</i> GQ443097	<i>Enterococcus faecium</i> GU968165	<i>Clostridium</i> EU777697
<i>Acinetobacter</i> HQ143283	<i>Acinetobacter</i> sp. JN082539	AtAsmR, NATAsm e Saud (1)	AtAsmR e NATAsm (1)	<i>Clostridium</i> JN559512
<i>Clostridium</i> JN559477	<i>Clostridium tertium</i> FJ507067	<i>Clostridium</i> DQ129392	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> FJ749349	<i>Gammaproteobacteria</i> EU776012
AtnAsm e Saud (1)	AtAsmR (24)		AtAsmR (12)	AtnAsm (4)
<i>Bacillus megaterium</i> GU125638	<i>Acinetobacter</i> HM186935	<i>Lysinibacillus</i> JN703635	<i>Bradyrhizobium</i> sp. FJ193293	<i>Bacillus megaterium</i> EF690396
AtAsmR, AtAsmR, NATAsm e Saud (1)	Alcaligenaceae AY548937	<i>Neisseria</i> FJ983025	<i>Clostridium</i> HQ827821	<i>Incertae sedis</i> EU725456
<i>Aerococcus</i> FR691452	<i>Bacillus</i> EU935236	<i>Paenibacillus</i> sp. H3029 AY728023	<i>Corynebacteriaceae</i> EU540469	<i>Staphylococcus</i> EF510614
AtAsm e NATAsm (1)	<i>Bacillus</i> GQ903414	<i>Prevotella tanneriae</i> GU413057	<i>Desulfotomaculum</i> AB194944	<i>Staphylococcus</i> FM874628
<i>Enterococcus</i> EF096516	<i>Bacillus thermoamylovorans</i> AB306507	<i>Psychrobacter</i> AJ430829	<i>Diaphorobacter</i> AB076855	NATAsm (3)
AtAsmR e NATAsm (4)	Chloroplast HQ664600	<i>Sphingomonas</i> AM900781	<i>Enhydrobacter</i> HQ860666	<i>Clostridium</i> FJ375877
<i>Acinetobacter</i> AM183113	<i>Clostridium</i> AB610569	<i>Staphylococcus</i> FM874252	<i>Lysinibacillus</i> GQ284494	<i>Clostridium</i> JN977328
<i>Acinetobacter</i> GQ409505	<i>Clostridium</i> EU773900	<i>Streptococcus</i> FM873168	<i>Paenibacillus dendritiformis</i> AY359885	<i>Staphylococcus</i> AY897994
<i>Acinetobacter</i> HM559107	<i>Corynebacterium</i> JQ085721	<i>Tessaracoccus</i> HM099640	<i>Sinobacteraceae</i> JF733397	Saud (3)
<i>Sphingobacterium</i> EU540592	<i>Enterococcus</i> EU459393	<i>Vagococcus</i> AM183107	<i>Sphingomonas</i> AB202193	<i>Acinetobacter</i> DQ911549
	<i>Enterococcus gallinarum</i> JF915769	<i>Weissella viridescens</i> AB682516	<i>Sphingomonas</i> AB202211	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> AF515228
	<i>Fusobacterium</i> FJ558131	<i>Zimmermannella</i> EU086820	<i>Streptococcus</i> AM697395	<i>Pantoea</i> GU566350

Tabela 9 - Lista de espécies bacterianas encontradas na microbiota da pele agrupadas por grupos Atópicos Asmático não Remissivo (AtAsmR) e Não Atópico Asmático (NATAsm). Entre parênteses o número de bactérias encontradas no agrupamento.

AtAsmR e NATAsm (25)	NATAsm (16)	AtAsmR (21)
<i>Acinetobacter</i> JN669248	<i>Acinetobacter</i> JF891390	<i>Bradyrhizobium</i> sp. FJ193293
<i>Aerococcus</i> FR691452	<i>Acinetobacter</i> AM183113	<i>Brevundimonas diminuta</i> EU352761
<i>Bacillus anthracis</i> AY138304	<i>Acinetobacter</i> GQ409505	Chloroplast Pinus JN854184
<i>Bacillus cereus</i> G9241 AAEK01000013	<i>Acinetobacter</i> HM559107	<i>Clostridium baratii</i> CU919549
<i>Bacillus megaterium</i> GU252122	<i>Acinetobacter</i> HQ143283	<i>Clostridium</i> HQ827821
<i>Bacillus subtilis</i> HM101166	<i>Acinetobacter</i> sp. GQ853365	<i>Corynebacteriaceae</i> EU540469
<i>Brevundimonas</i> HQ682006	<i>Acinetobacter</i> sp. JN082539	<i>Desulfotomaculum</i> AB194944
Clostridiaceae EU775607	<i>Clostridium</i> FJ375877	<i>Diaphorobacter</i> AB076855
<i>Clostridium</i> DQ129392	<i>Clostridium</i> JN559477	<i>Enhydrobacter</i> HQ860666
<i>Clostridium</i> EU468420	<i>Clostridium</i> JN977328	<i>Lysinibacillus</i> GQ284494
<i>Clostridium</i> EU777697	<i>Clostridium tertium</i> FJ507067	<i>Naxibacter</i> HQ323424
<i>Clostridium</i> EU777708	<i>Enterococcus</i> EF096516	<i>Paenibacillus dendritiformis</i> AY359885
<i>Clostridium</i> JN559512	<i>Enterococcus faecium</i> GU968165	<i>Propionibacterium</i> FM875317
<i>Enterobacter</i> HM557239	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i> HM755627	<i>Sinobacteraceae</i> JF733397
<i>Gammaproteobacteria</i> EU776012	<i>Sphingobacterium</i> EU540592	<i>Sphingomonas</i> AB202193
<i>Klebsiella</i> sp. GQ416574	<i>Staphylococcus</i> AY897994	<i>Sphingomonas</i> AB202211
<i>Pseudomonas</i> DQ227339		<i>Sphingomonas</i> FJ893702
<i>Pseudomonas</i> EF620457		<i>Sphingomonas</i> GQ389073
<i>Staphylococcus</i> AB681788		<i>Stenotrophomonas</i> GQ443097
<i>Staphylococcus</i> EU536826		<i>Streptococcus</i> AM697395
<i>Staphylococcus</i> FM872946		
<i>Staphylococcus</i> JN013953		
<i>Staphylococcus sciuri</i> EU481508		
<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> FJ749349		

ANEXO E

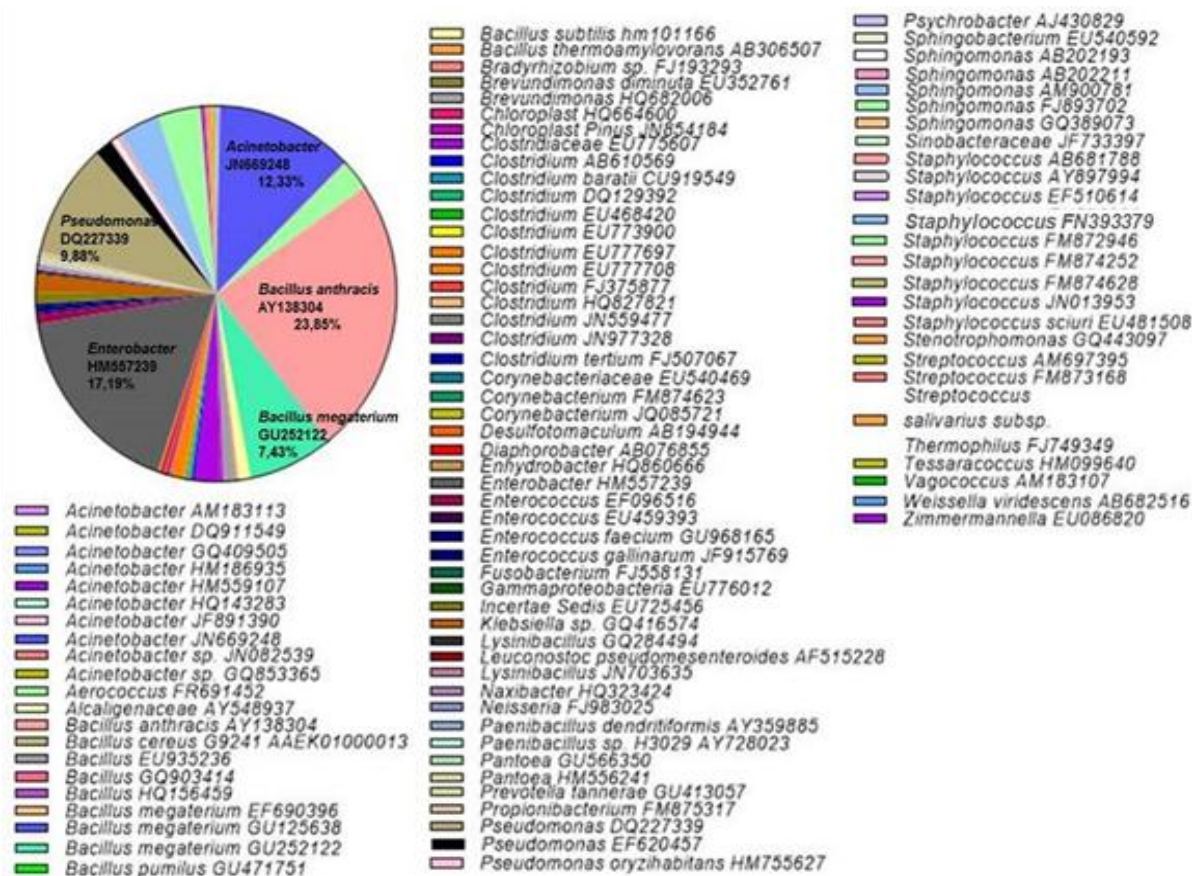


Figura 24 – Abundância relativa das espécies bacterianas encontradas nas amostras de microbiota da pele.

Tabela 10 - Lista de espécies bacterianas encontradas em comum na microbiota da pele nos grupos Não Atópico Asmático e Atópico Asmático não remissivo, agrupadas sexo Feminino e Masculino. Entre parênteses o número de bactérias encontradas no agrupamento.

Masculino e Feminino (21)		Masculino (4)
<i>Acinetobacter</i> JN669248	<i>Enterobacter</i> HM557239	<i>Bacillus cereus</i> G9241 AAEK01000013
<i>Aerococcus</i> FR691452	<i>Gammaproteobacteria</i> EU776012	<i>Streptococcus salivarius thermophilus</i> FJ749349
<i>Bacillus anthracis</i> AY138304	<i>Klebsiella</i> sp. GQ416574	<i>Bacillus</i> HQ156459
<i>Bacillus megaterium</i> GU252122	<i>Pseudomonas</i> DQ227339	<i>Clostridium</i> DQ129392
<i>Bacillus subtilis</i> hm101166	<i>Pseudomonas</i> EF620457	
<i>Brevundimonas</i> HQ682006	<i>Staphylococcus</i> AB681788	
<i>Clostridiaceae</i> EU775607	<i>Staphylococcus</i> FM872946	
<i>Clostridium</i> EU468420	<i>Staphylococcus</i> FN393799	
<i>Clostridium</i> EU777697	<i>Staphylococcus</i> JN013953	
<i>Clostridium</i> EU777708	<i>Staphylococcus sciuri</i> EU481508	
<i>Clostridium</i> JN559512		

ANEXO F

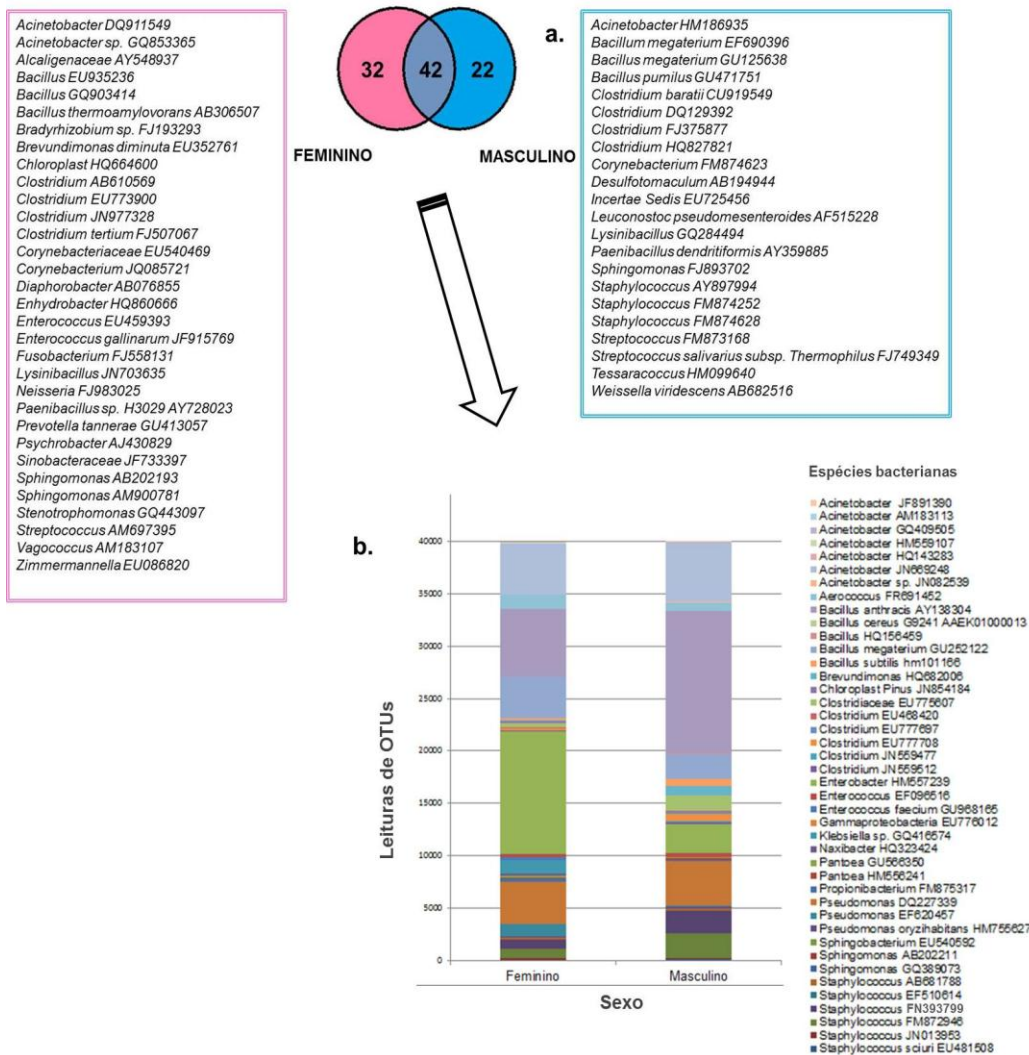


Figura 25 - Distribuição das espécies bacterianas identificados em indivíduos com diferentes perfis de asma e atopia, divididos em sexo Feminino e sexo Masculino. a) Diagrama de Venn e b) Distribuição do n° de leituras.

ANEXO G

Tabela 11 - Lista de espécies bacterianas encontrados na microbiota da pele agrupados por grupos AtAsmnR e AtnAsm. Entre parênteses o número de bactérias encontradas no agrupamento.

AtAsmnR e AtnAsm (23)		AtnAsm (13)
<i>Acinetobacter</i> JN669248	<i>Gammaproteobacteria</i> EU776012	<i>Acinetobacter</i> HQ143283
<i>Bacillus anthracis</i> AY138304	<i>Klebsiella</i> sp. GQ416574	<i>Bacillus pumilus</i> GU471751
<i>Bacillus cereus</i> G9241 AAEK01000013	<i>Propionibacterium</i> FM875317	<i>Staphylococcus</i> FM874628
<i>Bacillus</i> HQ156459	<i>Pseudomonas</i> DQ227339	<i>Clostridium</i> JN559477
<i>Bacillus megaterium</i> GU252122	<i>Pseudomonas</i> EF620457	<i>Bacillus megaterium</i> GU125638
<i>Bacillus subtilis</i> HM101166	<i>Staphylococcus</i> AB681788	<i>Acinetobacter</i> JF891390
Clostridiaceae EU775607	<i>Staphylococcus</i> FM872946	<i>Corynebacterium</i> FM874623
<i>Clostridium</i> EU468420	<i>Staphylococcus</i> FN393799	<i>Staphylococcus</i> EF510614
<i>Clostridium</i> EU777697	<i>Staphylococcus</i> JN013953	<i>Incertae Sedis</i> EU725456
<i>Clostridium</i> EU777708	<i>Staphylococcus sciuri</i> EU481508	<i>Enterococcus</i> EF096516
<i>Clostridium</i> JN559512	<i>Stenotrophomonas</i> GQ443097	<i>Enterococcus faecium</i> GU968165
<i>Enterobacter</i> HM557239		<i>Bacillus megaterium</i> EF690396
		<i>Pseudomonas oryzihabitans</i> HM755627
AtAsmnR (23)		
<i>Aerococcus</i> FR691452	<i>Lysinibacillus</i> GQ284494	
<i>Bradyrhizobium</i> sp. FJ193293	<i>Naxibacter</i> HQ323424	
<i>Brevundimonas diminuta</i> EU352761	<i>Paenibacillus dendritiformis</i> AY359885	
<i>Brevundimonas</i> HQ682006	<i>Pantoea</i> HM556241	
<i>Chloroplast Pinus</i> JN854184	<i>Sinobacteraceae</i> JF733397	
<i>Clostridium baratii</i> CU919549	<i>Sphingomonas</i> AB202193	
<i>Clostridium</i> DQ129392	<i>Sphingomonas</i> AB202211	
<i>Clostridium</i> HQ827821	<i>Sphingomonas</i> FJ893702	
<i>Corynebacteriaceae</i> EU540469	<i>Sphingomonas</i> GQ389073	
<i>Desulfotomaculum</i> AB194944	<i>Streptococcus</i> AM697395	
<i>Diaphorobacter</i> AB076855	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> FJ749349	
<i>Enhydrobacter</i> HQ860666		

Tabela 12 - Lista de espécies bacterianas encontradas na microbiota da pele agrupadas por grupos Atópicos Asmático Remissivo (AtAsmR) e Saudáveis (Saud). Entre parênteses o número de bactérias encontradas no agrupamento.

AtAsmR e Saud (22)		AtAsmR (33)
<i>Acinetobacter</i> HQ143283	<i>Enterobacter</i> HM557239	<i>Acinetobacter</i> AM183113
<i>Acinetobacter</i> JN669248	<i>Klebsiella</i> sp. GQ416574	<i>Acinetobacter</i> GQ409505
<i>Bacillus anthracis</i> AY138304	<i>Naxibacter</i> HQ323424	<i>Acinetobacter</i> HM186935
<i>Bacillus megaterium</i> GU252122	<i>Propionibacterium</i> FM875317	<i>Acinetobacter</i> HM559107
<i>Bacillus subtilis</i> HM101166	<i>Pseudomonas</i> DQ227339	<i>Aerococcus</i> FR691452
<i>Brevundimonas</i> HQ682006	<i>Pseudomonas</i> EF620457	<i>Alcaligenaceae</i> AY548937
<i>Chloroplast Pinus</i> JN854184	<i>Staphylococcus</i> AB681788	<i>Bacillus</i> EU935236
Clostridiaceae EU775607	<i>Staphylococcus</i> FM872946	<i>Bacillus</i> GQ903414
<i>Clostridium</i> EU777708	<i>Staphylococcus</i> FN393799	<i>Bacillus pumilus</i> GU471751
<i>Clostridium</i> JN559477	<i>Staphylococcus</i> JN013953	<i>Bacillus thermoamylovorans</i> AB306507
<i>Corynebacterium</i> FM874623	<i>Staphylococcus sciuri</i> EU481508	<i>Brevundimonas diminuta</i> EU352761
		<i>Chloroplast</i> HQ664600
		<i>Clostridium</i> AB610569
		<i>Clostridium</i> EU773900
		<i>Corynebacterium</i> JQ085721
		<i>Enterococcus</i> EU459393
		<i>Enterococcus gallinarum</i> JF915769
		<i>Fusobacterium</i> FJ558131
		<i>Lysinibacillus</i> JN703635
		<i>Neisseria</i> FJ983025
		<i>Paenibacillus</i> sp. H3029 AY728023
		<i>Pantoea</i> HM556241
		<i>Prevotella tannerae</i> GU413057
		<i>Pseudomonas oryzihabitans</i> HM755627
		<i>Psychrobacter</i> AJ430829
		<i>Sphingobacterium</i> EU540592
		<i>Sphingomonas</i> AM900781
		<i>Staphylococcus</i> FM874252
		<i>Streptococcus</i> FM873168
		<i>Tessaracoccus</i> HM099640
		<i>Vagococcus</i> AM183107
		<i>Weissella viridescens</i> AB682516
		<i>Zimmermannella</i> EU086820
Saud (20)		
<i>Acinetobacter</i> JF891390	<i>Clostridium</i> EU777697	
<i>Acinetobacter</i> DQ911549	<i>Clostridium</i> JN559512	
<i>Acinetobacter</i> sp. GQ853365	<i>Clostridium tertium</i> FJ507067	
<i>Acinetobacter</i> sp. JN082539	<i>Enterococcus faecium</i> GU968165	
<i>Bacillus cereus</i> G9241 AAEK01000013	<i>Gammaproteobacteria</i> EU776012	
<i>Bacillus</i> HQ156459	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> AF515228	
<i>Bacillus megaterium</i> GU125638	<i>Pantoea</i> GU566350	
<i>Clostridium baratii</i> CU919549	<i>Sphingomonas</i> FJ893702	
<i>Clostridium</i> DQ129392	<i>Sphingomonas</i> GQ389073	
<i>Clostridium</i> EU468420	<i>Stenotrophomonas</i> GQ443097	

ANEXO H

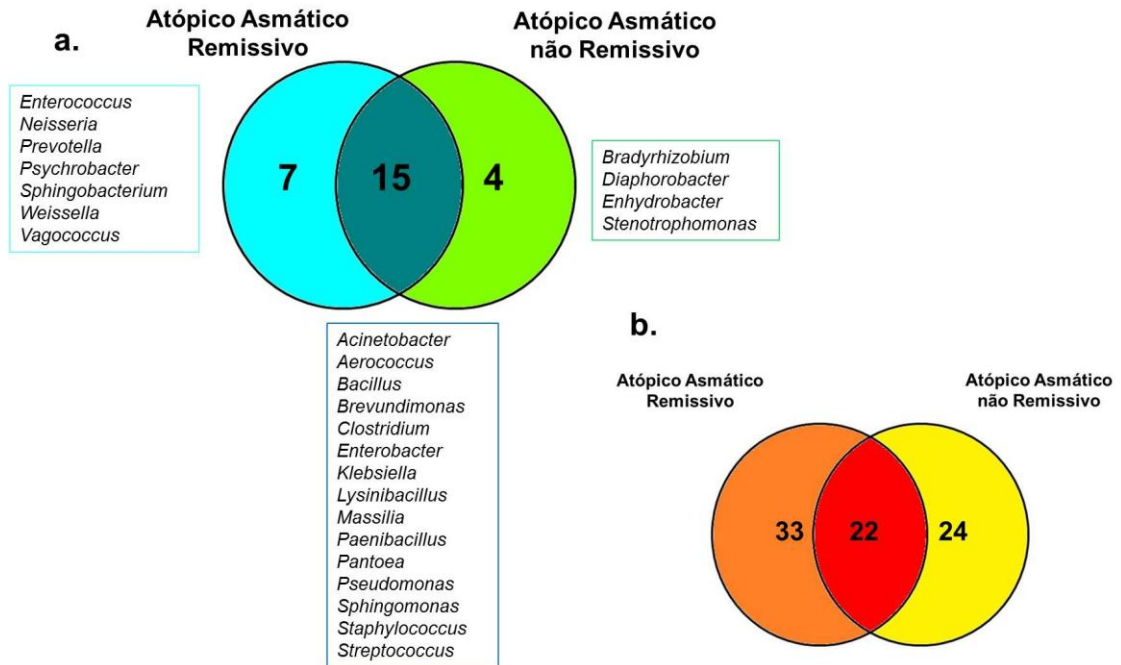


Figura 26 - Diagrama de Venn com distribuição das bactérias encontradas nos grupos Atópico Asmático Remissivo e Atópico Asmático não Remissivo: a) Distribuição dos gêneros bacterianos. b) Distribuição das espécies bacterianas (Dados complementares na Tabela 13).

Tabela 13 - Lista de espécies encontradas nos grupos Atópico asmático Remissivo (AtAsmR) e Atópico Asmático não Remissivo (AtAsmnr)

AtAsmR e AtAsmnr		AtAsmR	
<i>Acinetobacter</i> JN669248	<i>Klebsiella</i> sp. GQ416574	<i>Acinetobacter</i> AM183113	<i>Enterococcus gallinarum</i>
<i>Aerococcus</i> FR691452	<i>Naxibacter</i> HQ323424	<i>Acinetobacter</i> GQ409505	<i>Fusobacterium</i> FJ558131
<i>Bacillus anthracis</i> AY138304	<i>Pantoea</i> HM556241	<i>Acinetobacter</i> HM186935	<i>Lysinibacillus</i> JN703635
<i>Bacillus megaterium</i> GU252122	<i>Propionibacterium</i> FM875317	<i>Acinetobacter</i> HM559107	<i>Neisseria</i> FJ983025
<i>Bacillus subtilis</i> HM101166	<i>Pseudomonas</i> DQ227339	<i>Acinetobacter</i> HQ143283	<i>Paenibacillus</i> sp. H3029 AY728023
<i>Brevundimonas diminuta</i>	<i>Pseudomonas</i> EF620457	<i>Alcaligenaceae</i> AY548937	<i>Prevotella tanneriae</i> GU413057
<i>Brevundimonas</i> HQ682006	<i>Staphylococcus</i> AB681788	<i>Bacillus</i> EU935236	<i>Pseudomonas oryzae</i> H3029 AY728023
<i>Chloroplast Pinus</i> JN854184	<i>Staphylococcus</i> EU536826	<i>Bacillus</i> GQ903414	<i>Psychrobacter</i> AJ430829
<i>Clostridiaceae</i> EU775607	<i>Staphylococcus</i> FM872946	<i>Bacillus pumilus</i> GU471751	<i>Sphingobacterium</i> EU540592
<i>Clostridium</i> EU777708	<i>Staphylococcus sciuri</i>	<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	<i>Sphingomonas</i> AM900781
<i>Enterobacter</i> HM557239	<i>Staphylococcus</i> JN013953	<i>Chloroplast</i> HQ664600	<i>Staphylococcus</i> FM874252
AtAsmnr		<i>Clostridium</i> AB610569	<i>Streptococcus</i> FM873168
<i>Bacillus cereus</i> G9241 AAEK01000013	<i>Enhydrobacter</i> HQ860666	<i>Clostridium</i> EU773900	<i>Tessaracoccus</i> HM099640
<i>Bacillus</i> HQ156459	<i>Gammaproteobacteria</i> EU77802	<i>Clostridium</i> JN559477	<i>Vagococcus</i> AM183107
<i>Bradyrhizobium</i> sp. FJ193293	<i>Lysinibacillus</i> GQ284494	<i>Corynebacterium</i> FM874623	<i>Weissella viridescens</i> AB682516
<i>Clostridium baratii</i> CU919549	<i>Paenibacillus dendritiformis</i>	<i>Corynebacterium</i> JQ085721	<i>Zimmermannella</i> EU086820
<i>Clostridium</i> DQ129392	<i>Sinobacteraceae</i> JF733397	<i>Enterococcus</i> EU459393	
<i>Clostridium</i> EU468420	<i>Sphingomonas</i> AB202193		
<i>Clostridium</i> EU777697	<i>Sphingomonas</i> AB202211		
<i>Clostridium</i> HQ827821	<i>Sphingomonas</i> FJ893702		
<i>Clostridium</i> JN559512	<i>Sphingomonas</i> GQ389073		
<i>Corynebacteriaceae</i> EU540469	<i>Stenotrophomonas</i> GQ443097		
<i>Desulfotomaculum</i> AB194944	<i>Streptococcus</i> AM697395		
<i>Diaphorobacter</i> AB076855	<i>Streptococcus salivarius thermophilus</i>		

ANEXO I

Tabela 14- Lista das gêneros bacterianos identificadas na microbiota da pele agrupadas por grupo de atopia e asma. Entre parênteses o número de bactérias encontradas no agrupamento

Todos os grupos (7)	AtAsmR, AtAsmRnR, NAtAsm e Saud (1)	AtAsmR, AtAsmRnR e NAtAsm (2)	AtAsmR AtAsmRnR (2)	AtAsmR (5)
<i>Acinetobacter</i>			<i>Lysinibacillus</i>	<i>Psychrobacter</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Brevundimonas</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Paenibacillus</i>	<i>Prevotella</i>
<i>Clostridium</i>	AtAsmR, AtnAsm, NAtAsm e Saud (1)	<i>Streptococcus</i>	AtAsmR e NAtAsm (1)	<i>Neisseria</i>
<i>Enterobacter</i>		AtAsmR, AtAsmRnR e Saud (3)	<i>Sphingobacterium</i>	<i>Vagococcus</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>Enterococcus</i>		AtAsmRnR (3)	<i>Weissella</i>
<i>Pseudomonas</i>	AtAsmRnR, AtnAsm e Saud (1)	<i>Massilia</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	Saud (1)
<i>Staphylococcus</i>		<i>Pantoea</i>	<i>Diaphorobacter</i>	<i>Leuconostoc</i>
	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Sphingomonas</i>	<i>Enhydrobacter</i>	

Tabela 15 - Gêneros e Espécies identificados por grupo

Grupos	Perfil	Gêneros	Espécies
1 e 2	Atópico Asmático Remissivo	<i>Acinetobacter</i> <i>Psychrobacter</i> <i>Weissella</i>	<i>Acinetobacter</i> sp. HQ143283 <i>Bacillus pumilus</i> GU471751
3 e 4	Atópico Asmático não Remissivo	<i>Aerococcus</i> <i>Diaphorobacter</i> <i>Enhydrobacter</i> <i>Streptococcus</i>	<i>Bacillus</i> HQ156459 <i>Clostridium</i> EU777697 <i>Streptococcus salivarius thermophilus</i> FJ749349 <i>Stenotrophomonas</i> GQ443097
5 e 6	Atópico não Asmático		<i>Bacillus pumilus</i> GU471751 <i>Stenotrophomonas</i> GQ443097
7 e 8	Não Atópico Asmático	<i>Aerococcus</i> <i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus salivarius thermophilus</i> FJ749349
9 e 10	Não Atópico não Asmático	<i>Acinetobacter</i> <i>Leuconostoc</i>	<i>Acinetobacter johnnii</i> DQ911549 <i>Acinetobacter</i> sp. HQ143283 <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> AF515228 <i>Pantoea agglomerans</i> GU566350
Feminino	Todos grupos do sexo Feminino		<i>Enterobacter</i> uncultured bacterium HM557239 <i>Klebsiella</i> sp. GQ416574
Masculino	Todos grupos do sexo Masculino	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus hominis</i> FN393799 <i>Staphylococcus</i> sp. EF510614