

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

LAURA MACHADO MENEGATI

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA DIETA MATERNA EM MODELO
EXPERIMENTAL MURINO DE ASMA ALÉRGICA**

JUIZ DE FORA

2022

Laura Machado Menegati

**Avaliação da Influência da Dieta Materna em Modelo Experimental Murino de
Asma Alérgica**

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Flávia Márcia de Castro e Silva

Coorientador: Dr. Erick Esteves de Oliveira

Juiz de Fora

2022

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Menegati, Laura Machado.

Avaliação da influência da dieta materna em modelo experimental murino de asma alérgica / Laura Machado Menegati. -- 2022.
102 p. : il.

Orientadora: Flávia Márcia de Castro e Silva

Coorientador: Erick Esteves de Oliveira

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, 2022.

1. Dieta materna. 2. Asma alérgica. 3. Microbiota pulmonar. 4. Imunologia básica. I. Silva, Flávia Márcia de Castro e, orient. II. Oliveira, Erick Esteves de, coorient. III. Título.

Laura Machado Menegati

Avaliação da influência da dieta materna em modelo experimental murino de asma alérgica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Saúde. Área de concentração: Saúde Brasileira

Aprovada em 16 de setembro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Flavia Marcia de Castro e Silva -
Orientadora
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Erick Esteves de Oliveira -
Coorientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a. Dra. Alessandra Mattos Saliba
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Juiz de Fora, 16/09/2022.



Documento assinado eletronicamente por Alessandra Mattos Saliba, Usuário Externo, em 16/09/2022, às 16:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Erick Esteves de Oliveira, Usuário Externo, em 16/09/2022, às 16:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Flavia Marcia de Castro e Silva, Usuário Externo, em 16/09/2022, às 16:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Claudio Galuppo Diniz, Professor(a), em 16/09/2022, às 16:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador 0952396 e o código CRC 006C28AB.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que participaram de alguma forma para este trabalho, e em especial:

Aos meus pais, Leandro e Eliana, por todo apoio e carinho.

Ao meu companheiro, Nicolás, por toda dedicação e pela ajuda com a parte estatística, além de me presentear com uma segunda família.

Aos meus queridos orientadores Flávia e Erick, que estiveram lado a lado nas trincheiras comigo, pela confiança em mim e pela maravilhosa amizade. Me sinto privilegiada por trabalhar com vocês.

Aos colegas de laboratório, Maria Clara, Mariana, Mateus e Júlio por toda ajuda nos experimentos e por fazerem a rotina diária mais leve.

À querida Leidiana que foi essencial para a realização dos experimentos.

Aos professores Gilson e Henrique, por abrirem as portas do seu laboratório para mim e por toda ajuda.

À professora Vera Peters e toda a equipe do centro da biologia da reprodução da UFJF, por abrigarem os animais e me auxiliarem com os cruzamentos.

Ao professor Cláudio e sua aluna Camila, pela ajuda com as análises de PCR.

À Marcilene, por gentilmente fazer as análises bioquímicas.

À belíssima Amanda, que me incentivou a escrever esta monografia.

À minha terapeuta, Suzana, que me ajuda a perceber o tamanho do meu potencial.

Às agências de fomento, pela ajuda financeira.

Ao programa de Pós-graduação em Saúde, pela excelência.

E finalmente, aos animais que deram suas vidas para a realização deste trabalho.

“A pesquisa básica é como atirar uma flecha para o ar e, onde ela cair, pintar um alvo”. (Homer Adkins Burton)

RESUMO

A obesidade materna e o consumo de dietas ricas em gordura aumentam o risco de diversas complicações na prole, incluindo o desenvolvimento de asma em qualquer idade, por mecanismos não totalmente esclarecidos. A concomitância de ambas as doenças promove fenótipos distintos, os quais podem ser caracterizados por um fenótipo Th2 agravado e eosinofilia, ou até mesmo uma mistura de respostas Th1 e Th2 na infância. Enquanto na fase adulta, ocorre um aumento da resposta de perfil Th17 e inflamação neutrofílica. Independentemente do perfil, na maioria dos casos, os sintomas são exacerbados e resistentes ao tratamento com corticosteroides. A obesidade e dietas obesogênicas maternas podem ainda influenciar na colonização da progênie, favorecendo a formação de uma microbiota intestinal prejudicial. Porém, ainda não há estudos que avaliem o impacto da dieta materna na composição da microbiota pulmonar da prole. O objetivo deste estudo foi explorar as modificações imunológicas pelas quais a dieta materna pode afetar o risco de asma e/ou agravar seus sintomas, bem como, modificar a colonização pulmonar. Para isso, matrizes de camundongos BALB/c alimentadas com dieta (HFD) ou padrão (SD) por 8 semanas foram acasaladas e sua prole foi utilizada no experimento. A asma foi induzida por sensibilização à Ovalbumina no 7º e 14º dias de vida, seguida de três desafios intranasais no 21º-23º dias, os camundongos foram eutanasiados no 24º dia. Os animais foram pesados, pulmão, cólon, baço, linfonodos e medula óssea foram coletados para análise histológica e imunofenotipagem. Uma análise preliminar da microbiota pulmonar foi realizada por Rep-PCR. O sangue foi coletado para análise metabólica e dos níveis de anticorpos antígenos-específicos. Os resultados demonstraram que as matrizes HFD não apresentaram ganho de peso significativo, porém houve um aumento nos níveis de leptina e colesterol LDL. Ao avaliar os efeitos da dieta materna na prole independentemente do estado de asma, os filhotes de fêmeas HFD apresentaram maior massa corporal, maiores níveis de glicose, menores níveis de colesterol HDL e maior expressão de CD86 e PDL1 em células pulmonares e esplênicas. Houve uma maior expressão de GATA3 no baço e pulmão. Já o ROR γ T apresentou uma expressão aumentada no baço, porém reduzida nos linfonodos mediastinais e no pulmão, quando comparados aos filhotes de matrizes SD. A dieta hiperlipídica materna também diminuiu a expressão de CD80 em células dendríticas derivadas da medula óssea estimuladas com LPS e aumentou a expressão de PDL1 nas mesmas células não estimuladas. Após a indução da asma, os filhotes asmáticos de mães HFD apresentaram maior contagem de eosinófilos e mastócitos no tecido pulmonar, maiores títulos de IgG2a e menores títulos de IgG1 e IgE, em comparação com filhotes asmáticos de matrizes SD. Além disso, a asma causou impacto mais significativo na composição bacteriana do pulmão quando comparado com a dieta materna. Em conjunto, os resultados demonstram que o consumo de uma dieta rica em gorduras antes e durante período gestacional pode afetar a resposta imune da prole, um efeito mediado em parte por ativação inadequada de células dendríticas, o que ocorreu antes mesmo da indução da asma. Esse evento pode contribuir para o aumento da inflamação eosinofílica, porém uma redução na atopia.

Palavras-chave: Asma, obesidade materna, eosinofilia, microbiota pulmonar

ABSTRACT

Maternal obesity and the consumption of high-fat diets increase the risk of several complications in the offspring, including the development of asthma at any age, through mechanisms that are not fully understood. The concomitance of both diseases promotes distinct phenotypes, which can be characterized by an aggravated Th2 phenotype and eosinophilia, or even a mixture of Th1 and Th2 responses in childhood. While in adulthood, there is an increase in the Th17 profile response and neutrophilic inflammation. Regardless of the profile, in most cases, symptoms are exacerbated and resistant to corticosteroid treatment. Obesity and maternal obesogenic diets can also influence the colonization of the progeny, favoring the formation of a harmful intestinal microbiota. However, there are still no studies that evaluate the impact of maternal diet on the composition of the lung microbiota of the offspring. The aim of this study was to explore the immunological modifications by which maternal diet may affect asthma risk and/or worsen asthma symptoms, as well as modify lung colonization. For this, matrices of BALB/c mice fed with diet (HFD) or standard (SD) for 8 weeks were mated and their offspring were used in the experiment. Asthma was induced by sensitization to Ovalbumin on the 7th and 14th days of life, followed by three intranasal challenges on the 21st-23rd days, the mice were euthanized on the 24th day. The animals were weighed, lung, colon, spleen, lymph nodes and bone marrow were collected for histological analysis and immunophenotyping. A preliminary analysis of the lung microbiota was performed by Rep-PCR. Blood was collected for metabolic analysis and dosage of antigen-specific antibody levels. The results showed that the HFD dams did not show significant weight gain, but there was an increase in leptin and LDL cholesterol levels. When evaluating the effects of maternal diet on offspring regardless of asthma status, offspring of HFD females had higher body mass, higher glucose levels, lower HDL cholesterol levels and higher expression of CD86 and PDL1 in lung and splenic cells. There was an increased expression of GATA3 in the spleen and lung. On the other hand, ROR γ T showed an increased expression in the spleen, but reduced in the mediastinal lymph nodes and in the lung, when compared to offspring from SD dams. The maternal high-fat diet also decreased CD80 expression on LPS-stimulated bone marrow-derived dendritic cells and increased PDL1 expression on the same unstimulated cells. After asthma induction, asthmatic pups from HFD dams had higher eosinophil and mast cell counts in lung tissue, higher IgG2a titers, and lower IgG1 and IgE titers compared to asthmatic pups from SD dams. In addition, asthma had a more significant impact on lung bacterial composition when compared to maternal diet. Taken together, the results demonstrate that consumption of a high-fat diet before and during pregnancy can affect the immune response of the offspring, an effect mediated in part by inappropriate activation of dendritic cells, which occurred even before the induction of asthma. This event may contribute to an increase in eosinophilic inflammation, but a reduction in atopy.

Keywords: Asthma, maternal obesity, eosinophilia, lung microbiota

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Esquema representativo da resposta imune na asma alérgica. | 19 |
| Figura 2 – Prevalência mundial de Asma em 2019. | 20 |
| Figura 3 – Prevalência mundial de sobrepeso e obesidade em adultos em 2016. ... | 22 |
| Figura 4 – Prevalência mundial de sobrepeso e obesidade em crianças menores de 5 anos em 2016..... | 23 |
| Figura 5 – Impacto da obesidade/dieta materna em células imunes circulantes e residentes..... | 31 |
| Figura 6 – Efeitos da dieta e obesidade sob a progênie no contexto da asma. | 39 |
| Figura 7 – Delineamento experimental do protocolo experimental desenvolvido em camundongos BALB/c..... | 44 |
| Figura 8 – Efeito da dieta hiperlipídica na massa corporal das matrizes..... | 53 |
| Figura 9 – Efeitos da dieta hiperlipídica sobre o metabolismo das matrizes. | 54 |
| Figura 10 – Parâmetros métricos da prole..... | 55 |
| Figura 11 – Parâmetros bioquímicos da prole..... | 56 |
| Figura 12 – Avaliação da expressão de marcadores de inibição e ativação em células MHC ^{hi} | 57 |
| Figura 13 – Perfil de ativação de células dendríticas derivadas da medula óssea.... | 58 |
| Figura 14 – Marcadores imunológicos no baço..... | 59 |
| Figura 15 – Marcadores imunológicos nos linfonodos mediastinais..... | 59 |
| Figura 16 – Marcadores imunológicos no pulmão. | 60 |
| Figura 17 – Expressão de fatores de transcrição no baço.. | 61 |
| Figura 18 – Expressão de fatores de transcrição em linfonodos mediastinais.. | 61 |
| Figura 19 – Expressão de fatores de transcrição no pulmão.. | 62 |
| Figura 20 – Infiltrado eosinofílico do intestino..... | 63 |
| Figura 21 –Infiltrado eosinofílico do pulmão.. | 65 |
| Figura 22 – Contagem de células do lavado medular. | 67 |
| Figura 23 – Títulos de isotipos de anticorpos séricos anti-ovalbumina..... | 68 |
| Figura 24 – Avaliação da microbiota pulmonar por rep-PCR..... | 70 |
| Figura 25 – Dendograma gerado a partir dos dados obtidos do rep-PCR..... | 71 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 –Divisão dos grupos experimentais das matrizes | 41 |
| Tabela 2 –Composição das dietas padrão e hiperlipídica..... | 42 |
| Tabela 3 – Divisão dos grupos experimentais da prole | 43 |
| Tabela 4 – Especificações dos marcadores utilizados na Citometria de Fluxo..... | 50 |

LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS

| | |
|-------|--|
| µL | Microlitros |
| µm | Micrômetro |
| AGCC | Ácidos graxos de cadeia curta |
| AP | Alergia pulmonar |
| BAL | Lavado Bronco alveolar |
| CD | <i>Cluster of Differentiation</i> (grupamento de diferenciação) |
| CI | Corticoide inalatório |
| CPT | Capacidade pulmonar total |
| CVF | Capacidade Vital Forçada |
| CXCR2 | <i>CXC chemokine receptor 2</i> (receptor de quimiocinas CXC 2) |
| DAMP | Padrões moleculares associados ao dano |
| DC | Célula dendrítica |
| DO | Densidade ótica |
| EDN | Neurotoxina derivada de eosinófilos |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| ELISA | <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ensaio imunoenzimático) |
| EPC | Proteína catiônica eosinofílica |
| EPO | Peroxidase eosinofílica |
| FABP | <i>Fatty acid binding protein</i> (proteína de ligação de ácidos graxos) |
| FcεRI | <i>High-affinity IgE receptor</i> (receptor de alta afinidade para IgE) |
| FFAR | <i>Free fatty acid receptor</i> (receptor de ácidos graxos livres) |
| FOLR2 | <i>Folate receptor beta</i> (receptor beta de folato) |
| FOXA3 | <i>Forkhead box protein A3</i> |
| FOXP3 | Forkhead box P3 |
| g | Gramas |
| GATA3 | <i>GATA binding protein 3</i> (proteína de ligação gata 3) |

| | |
|----------------------|--|
| GM-CSF | <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> (Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos) |
| h | Horas |
| HDAC9 | <i>Histone deacetylase 9</i> (histona desacetilase 9) |
| HDL | <i>High density lipoprotein</i> (lipoproteína de alta densidade) |
| HFD | Dieta hiperlipídica |
| HFD _o | Prole de fêmeas alimentadas com dieta hiperlipídica |
| HFD _o /AP | Prole de fêmeas alimentadas com dieta hiperlipídica com alergia pulmonar |
| Ig | Imunoglobulina |
| Th | Linfócito T auxiliar |
| IL | Interleucina |
| ILC | Célula linfoide inata |
| IMC | Índice de massa corporal |
| TNF- α | Tumor Necrosis Factor- α (Fator de Necrose Tumoral- α) |
| INF- γ | Interferon gama |
| iNKT | <i>Invariant natural killer T cell</i> (células T natural killer invariantes) |
| ITGAX | <i>Integrin alpha X</i> (Integrina alfa X) |
| LDL | <i>Low density lipoprotein</i> (lipoproteína de baixa densidade) |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| M | Molaridade |
| MAPK | <i>Mitogen-activated protein kinase</i> (Proteína quinase ativada por mitógeno) |
| MFI | Mediam fluorescence intensity (mediana de intensidade de fluorescência) |
| MHC | <i>Major Histocompatibility Complex</i> (complexo principal de histocompatibilidade) |
| mL | Mililitros |

| | |
|-----------------|---|
| mm | Milímetros |
| N | Normalidade |
| ng | Nanogramas |
| NLRP3 | <i>Nucleotide-binding and oligomerization domain like receptor family pyrin domain containing 3 (Domínio de ligação a nucleotídeos e oligomerização como domínio de pirina da família de receptores contendo 3)</i> |
| nm | Nanômetros |
| °C | Graus Celsius |
| OVA | Ovalbumina |
| PAMP | Padrões moleculares associados à patógenos |
| PBS | <i>Phosphate saline buffer</i> (tampão fosfato salino) |
| PCR | <i>Polimerase chain reaction</i> (cadeia de reação da polimerase) |
| PDL1 | <i>Programmed death-ligant 1</i> |
| PPARG | <i>Peroxisome proliferator- activated receptor gamma</i> (Receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma) |
| PRR | Receptores de reconhecimento de padrões |
| REP-PCR | Reação da cadeia da polimerase (PCR) utilizando sequências palindrômicas extragênicas repetidas |
| ROR γ T | <i>Retinoic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor gamma</i> (Receptor nuclear órfão relacionado ao receptor de ácido retinóico gama) |
| rpm | Rotações por minuto |
| RPMI | <i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i> |
| SD | Dieta padrão |
| SD ₀ | Prole de fêmeas alimentadas com dieta padrão |
| sICAM | intercellular adhesion molecules-soluble (molécula de adesão intracelular solúvel) |
| SMAD3 | <i>Mothers against decapentaplegic homolog 3</i> |
| SPF | <i>Specific pathogen free</i> (livre de patógenos específicos) |

| | |
|--------------|---|
| STAT3 | <i>Signal transducer and activator of transcription 3</i> (Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3) |
| SUS | Sistema único de saúde |
| TA | |
| TGF- β | <i>Transforming growth factor beta</i> (Fator de transformação e crescimento beta) |
| TGI | Trato gastrointestinal |
| TLR | Receptores do tipo Toll |
| CCL2 | <i>chemokine (C-C motif) ligand 2</i> (ligante 2 de quimiocina motivo C-C) |
| Treg | Linfócito T regulatório |
| TRIS | 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol |
| TSLP | Linfopoietina estromal tímica |
| VEF-1 | Volume expiratório forçado no primeiro segundo |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1 ASMA | 16 |
| 1.1.1 Epidemiologia da asma | 19 |
| 1.2 OBESIDADE | 22 |
| 1.3 INTERAÇÃO OBESIDADE E ASMA | 24 |
| 1.3.1 Obesidade materna e asma | 28 |
| 1.4 OBESIDADE, MICROBIOTA E ASMA | 33 |
| 1.4.1 Microbiota e asma | 33 |
| 1.4.2 Microbiota e obesidade | 34 |
| 1.4.3 Microbiota pulmonar | 35 |
| 1.4.1 Obesidade Materna e Microbiota | 37 |
| 2 OBJETIVOS | 40 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 40 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 40 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 41 |
| 3.1 ANIMAIS..... | 41 |
| 3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS..... | 41 |
| 3.3 INDUÇÃO DO MODELO DE ALERGIA PULMONAR EXPERIMENTAL | 43 |
| 3.4 AVALIAÇÃO DA PORCENTAGEM DE GANHO DE MASSA CORPORAL..... | 45 |
| 3.5 OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO | 45 |
| 3.5.1 Coleta do soro | 45 |
| 3.5.2 Coleta do Pulmão | 45 |
| 3.5.3 Coleta da medula óssea | 46 |
| 3.5.4 Coleta do intestino | 46 |
| 3.6 DOSAGEM DE GLICEMIA, TRIGLICÉRIDES, COLESTEROL TOTAL E FRAÇÕES | 46 |

| | |
|---|-----------|
| 3.7 DOSAGEM DOS NÍVEIS SÉRICOS DE LEPTINA..... | 46 |
| 3.8 DOSAGEM SÉRICA DE ANTICORPOS ANTI-OVA..... | 47 |
| 3.9 CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE GRANULÓCITOS NA MEDULA ÓSSEA..... | 48 |
| 3.10 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO PULMÃO E CÓLON..... | 48 |
| 3.10.1 Número de eosinófilos no tecido pulmonar e do colônico..... | 48 |
| 3.10.2 Número de mastócitos no tecido pulmonar..... | 48 |
| 3.11 IMUNOFENOTIPAGEM DAS CÉLULAS IMUNES NO PULMÃO E BAÇO E LINFONODOS..... | 49 |
| 3.12 CULTURA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA | 50 |
| 3.13 EXTRAÇÃO DE DNA BACTERIANO DO TECIDO PULMONAR..... | 51 |
| 3.14 ANÁLISE DA MICROBIOTA PULMONAR..... | 52 |
| 3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 52 |
| 4 RESULTADOS..... | 53 |
| 4.1 DIETA HIPERLIPÍDICA ELEVOU NÍVEIS DE LEPTINA E COLESTEROL LDL EM FÊMEAS BALB/C..... | 53 |
| 4.2 DIETA MATERNA ALTEROU PARÂMETROS MÉTRICOS E BIOQUÍMICOS DA PROLE..... | 55 |
| 4.3 DIETA HIPERLIPÍDICA MATERNA REDUZIU ATIVAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DIFERENCIADAS <i>EX VIVO</i> | 56 |
| 4.4 DIETA MATERNA PROMOVEU ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS COESTIMULATÓRIAS NO BAÇO E PULMÃO..... | 58 |
| 4.5 DIETA MATERNA PROMOVEU ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO NO BAÇO, PULMÃO E LINFONODOS MEDIASTINAIS..... | 60 |
| 4.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA OBESIDADE MATERNA NA RESPOSTA IMUNE NA ASMA NA PROLE..... | 62 |
| 4.6.1 População de eosinófilos e mastócitos da prole foram afetados pela dieta materna e indução da alergia, em tecidos periféricos..... | 62 |

| | |
|---|------------|
| 4.6.2 Prole de fêmeas alimentadas com HFD apresentaram alterações na proporção de leucócitos na medula óssea | 66 |
| 4.6.3 Padrões alimentares maternos alteraram títulos de anticorpos alérgico específicos..... | 68 |
| 4.7 ASMA ALÉRGICA PROMOVEU ALTERAÇÕES NA MICROBIOTA PULMONAR DA PROLE | 69 |
| 5 DISCUSSÃO | 72 |
| 6 CONCLUSÃO | 79 |
| REFERÊNCIAS..... | 80 |
| ANEXO A – APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA PROTOCOLO Nº33/2020 | 102 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASMA

A asma é uma doença inflamatória das vias respiratórias, clinicamente definida por sintomas como dispneia, sibilância e tosse. Tais sintomas se originam pela hiperresponsividade brônquica, remodelamento das vias aéreas e secreção excessiva de muco. É uma síndrome crônica que promove alterações como hipertrofia e hiperplasia da musculatura lisa, bem como aumento no número de células caliciformes e fibrose do órgão. Estas alterações levam ao declínio da função pulmonar e ao agravamento dos sintomas (HOLGATE *et al.*, 2015; PAVORD *et al.*, 2018).

O termo asma é genericamente utilizado para designar um conjunto de sintomas parecidos que podem ter etiologias fisiopatológicas dramaticamente diferentes. Devido à alta heterogeneidade da doença utiliza-se a classificação dos pacientes em diferentes fenótipos, os quais são determinados a partir de características clínicas, demográficas e patofisiológicas (DHARMAGE *et al.*, 2019). Dentre os diversos fenótipos a asma alérgica é o mais facilmente reconhecido, geralmente se inicia na infância e está associado ao histórico de outras doenças alérgicas como eczemas, rinite ou alergias alimentares. Apresenta boa resposta ao tratamento com corticoides inalatórios (CI). Outro fenótipo bastante prevalente é a asma não alérgica, estes pacientes podem ter uma predominância de eosinófilos ou neutrófilos no escarro, ou apresentar uma contagem baixa de células inflamatórias, não tendo uma boa resposta a curto prazo ao tratamento com CI. Este fenótipo afeta principalmente mulheres na fase adulta (BATEMAN *et al.*, 2008). Porém, é menos frequente, uma vez que, cerca de 80% das crianças e 50% dos adultos portadores da síndrome apresentam um componente alérgico (JOHANSSON *et al.*, 2008). O fenótipo alérgico é identificado por testes de hipersensibilidade cutânea e níveis séricos elevados de Imunoglobulina-E (IgE) específicos para antígenos ambientais inócuos, denominados alérgenos, como pelo de animais, ácaro da poeira doméstica, pólen e mofo (HOLGATE *et al.*, 2015).

Ainda não é plenamente entendido o porquê um antígeno ambiental não patogênico poder despertar a resposta imune, porém estudos mostram que diversos antígenos apresentam propriedades adjuvantes intrínsecas como atividade proteolítica, ou ligações à lipídios que podem interagir com componentes do sistema imune inato e adaptativo (SCHEURER; TODA; VIETHS, 2015). Curiosamente,

proteases derivadas de ácaros demonstram atividade adjuvante para a polarização da resposta imune adaptativa de perfil T auxiliar 2 (Th2– do inglês *T-helper-2*) (CHAPMAN; WÜNSCHMANN; POMÉS, 2007).

O desenvolvimento da asma alérgica ou atópica pode ser dividida nas fases de sensibilização e efetora. Em indivíduos geneticamente susceptíveis, na primeira fase, o antígeno inalado passa pelo epitélio danificado, interagindo com as células imunes e estabelecendo uma resposta primária, ainda assintomática. Enquanto a fase efetora é uma resposta secundária onde o contato com o antígeno rapidamente desencadeia o processo inflamatório com sintomas e dano tecidual (MAK; SAUNDERS; JETT, 2014).

Durante a fase de sensibilização o antígeno chega ao epitélio das vias aéreas composto de células caliciformes e células ciliadas, que em conjunto agem para remover partículas suspensas no ar que se depositam nos pulmões, bem como formam uma barreira contra a entrada de microrganismos. Os alérgenos podem penetrar no epitélio por transcitose, transporte para-celular ou ainda por ruptura de moléculas de adesão. Independentemente, podem ativar receptores de reconhecimento de padrões (PRRs – do inglês *pattern recognition receptors*), os quais se ligam em padrões moleculares associados à patógenos e a danos (PAMPS e DAMPS respectivamente – do inglês *pathogen associated molecular patterns* e *damage associated molecular pattern*) (JOHNSTON *et al.*, 2021). Essa interação se dá por diversos mecanismos, como ativação de receptores Toll do tipo-4 e receptores de lecitinas do tipo C (SCHEURER; TODA; VIETHS, 2015). Células epiteliais ativadas secretam quimiocinas como a CCL20 que atraem células dendríticas imaturas para o local de contato com o alérgeno, além das alarminas como a interleucina (IL)-25, IL-33 e linfopietina estromal tímica (TSLP– do inglês *Thimic stromal lymphopoietin*) (GRAS *et al.*, 2017). Estas potencializam a ativação e maturação de células dendríticas (DCs), bem como ativam células linfoides inatas do tipo 2 (ILCs– *innate lymphoid cells*), que por sua vez produzem IL-5, IL-9 e IL-13 (HALIM *et al.*, 2014). Importantes citocinas para a sobrevivência e recrutamento de eosinófilos produção de muco pelas células caliciformes (HOLGATE, 2012).

As DCs fagocitam o antígeno e o processam, de modo a apresentá-lo a linfócitos T do *cluster* de diferenciação 4 (CD4– do inglês– *Cluster of Differentiation 4*) virgens presentes nos linfonodos drenantes. A apresentação ocorre via complexo principal de histocompatibilidade II (MHC II– do inglês *Major histocompatibility*

complex II) induzindo a ativação de linfócitos T e sua diferenciação em linfócitos Th2, (caracterizados pela expressão do fator de transcrição GATA3) e em linfócitos T foliculares (Tfh). Estes últimos migram para áreas de contato com células B e em conjunto com a IL-4 proveniente da ativação de células Th2 promovem a mudança de classe de anticorpo de IgM para IgE, em linfócitos B alérgeno-específicos. A IgE secretada se liga nos receptores de alta afinidade para a porção Fc dessa imunoglobulina (FcεRI), presentes na superfície de mastócitos, basófilos e eosinófilos, determinando assim a sensibilização ao antígeno (FAHY, 2014; GALLI; TSAI, 2012; HOLGATE *et al.*, 2015).

A fase de desafios, ou efetora, ocorre por subseqüentes contatos com os alérgenos, promovendo a ativação de mastócitos e basófilos sensibilizados com IgE, provocando sua degranulação, e liberação de histamina, leucotrienos, prostaglandinas, citocinas e outros mediadores inflamatórios. Estes levam ao aumento da permeabilidade vascular, o recrutamento de mais células inflamatórias, a contração da musculatura brônquica e o aumento na produção de muco, que em conjunto resultam nos sinais clássicos da crise asmática: falta de ar, sibilância e tosse (GALLI; TSAI, 2012).

Uma das principais células recrutadas para as vias aéreas são os eosinófilos, estes quando ativados liberam mediadores como a Proteína Catiônica Eosinofílica (ECP), a Neurotoxina Derivada de Eosinófilos (EDN) e a Peroxidase Eosinofílica (EPO). A exposição prolongada a estas enzimas leva a danos no epitélio e endotélio, causando fibrose e remodelamento tecidual, caracterizando a cronificação da doença (YASUKAWA *et al.*, 2013). Logo, a intensidade do infiltrado eosinofílico pulmonar se correlaciona com a severidade da asma (CASCIANO *et al.*, 2016; TRAN *et al.*, 2014). A patogênese da asma Th2 está resumida na figura 1.

Apesar da ubiquidade dos alérgenos, nem todas as pessoas desenvolvem alergia. Em alguns casos nem mesmo a predisposição genética é um determinante para o desenvolvimento da asma. Nestes casos a tolerância imune a estes antígenos se deve em parte a células T regulatórias (Tregs), um subtipo de linfócitos TCD4+ capaz de controlar as respostas imunes e induzir tolerância a antígenos inócuos e próprios (NOVAL RIVAS; CHATILA, 2016). São células caracterizadas pela expressão elevada de CD25, e pelo fator de transcrição FOXP-3 (do inglês - *intracellular forkhead winged helix transcription factor forkhead box*) (FONTENOT; GAVIN; RUDENSKY, 2017). No entanto, estudos demonstram que pacientes asmáticos tem um número

reduzido, ou defeitos funcionais nestas células (HARTL *et al.*, 2007; HUANG, FEI *et al.*, 2017). Corroborando isso, a depleção dessas células em modelo experimental agrava o quadro inflamatório e a hiperresponsividade aérea (BARU *et al.*, 2010), demonstrando seu papel fundamental para a manutenção da tolerância e redução da resposta Th2 pulmonar (HUANG, FEI *et al.*, 2017).

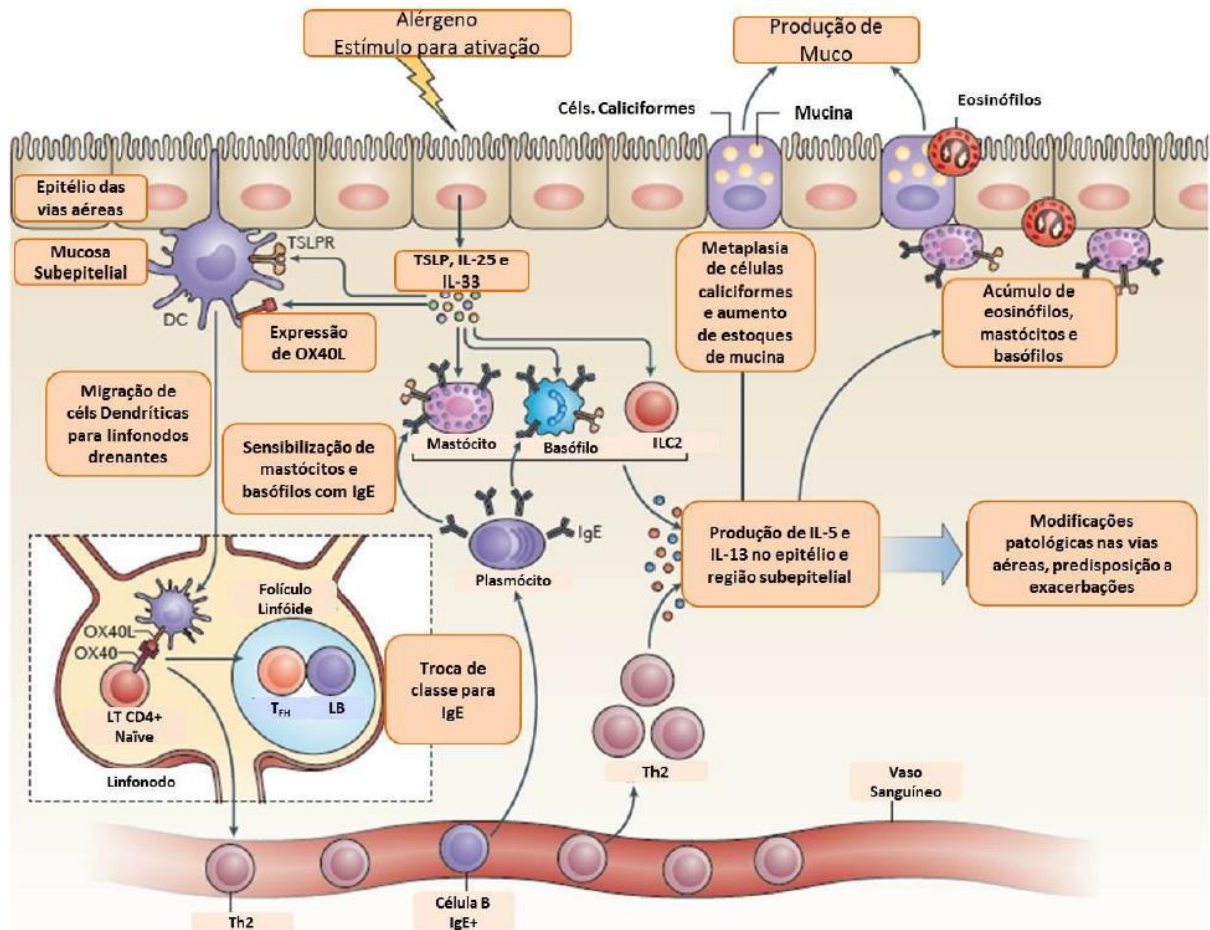


Figura 1– Esquema representativo da resposta imune na asma alérgica. Os alérgenos penetram através da barreira epitelial do pulmão ou são capturados pelas DCs no lúmen. Alarminas (TSLP, IL-25, IL-33) liberadas por células epiteliais ativam DCs e ILC2, mastócitos e basófilos. As DCs migram para órgãos linfoides secundários e ativam células T virgens em células em Th2 e Tfh. Estes últimos migram para o centro germinativo, interagem com células B promovendo a troca de classe de anticorpos de IgM para IgE, que por sua vez sensibilizam os mastócitos. Em contatos subsequentes com o alérgenos, mastócitos degranulam promovendo aumento da permeabilidade vascular, contração da musculatura lisa e hipersecreção de muco. A permeabilidade vascular aumentada facilita a migração dos eosinófilos, que também degranulam quando expostos à IL-5; A IL-13, atua no epitélio aumentando a produção de muco. A degranulação de eosinófilos leva a maior dano tecidual, levando ao remodelamento do tecido das vias aéreas e à progressiva perda da função pulmonar. Adaptado de: FAHY, 2014.

1.1.1 Epidemiologia da asma

Apesar da maioria das pessoas tolerarem antígenos ambientais e não desenvolverem asma, dados da Organização Mundial de Saúde mostram uma

incidência crescente da doença, afetando cerca de 262 milhões de pessoas (Figura 2) correspondendo a cerca de 7 a 10% da população mundial. Além disso, causou cerca de 461 mil mortes em 2019 (WHO, 2021). Estudos transversais realizados globalmente desde a década de 1960 demonstram que a asma é uma das doenças crônicas mais prevalentes do mundo, acometendo todas as faixas etárias, porém com uma distribuição inequívoca entre países, sendo os de maior renda os mais afetados quando comparados a países de baixa e média renda. Porém, nos últimos anos, a incidência da doença tem aumentado também nestas regiões (DHARMAGE *et al.*, 2019).

No Brasil, dados do DATASUS mostram que cerca de 20 milhões de brasileiros são asmáticos, causando 350.000 internações anuais, correspondendo a 2,3% de todas as hospitalizações pelo SUS (SILVA, *et al.*, 2022). O que acarreta um custo financeiro considerável para os sistemas de saúde e para os pacientes, além de afetar sua qualidade de vida. (COSTA *et al.*, 2018).

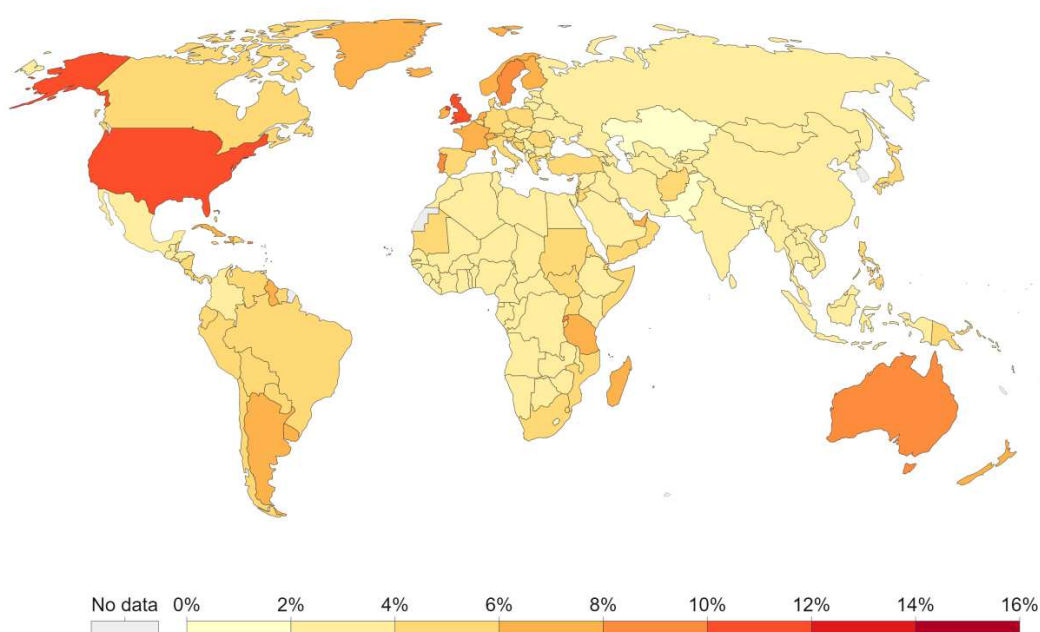


Figura 2– Prevalência mundial de Asma em 2019. Fonte: GLOBAL BURDEN OF DISEASE COLLABORATIVE NETWORK, 2021. Adaptado de <https://ourworldindata.org/> Acesso em 25 de maio de 2022.

Levantou-se como possível explicação para o aumento na incidência da asma em países desenvolvidos e em desenvolvimento, a hipótese da higiene, esta propõe que as mudanças no estilo de vida moderno como: redução no tamanho das famílias;

melhorias no saneamento básico; uso de vacinas, antibióticos e hábitos de higiene, levam a uma menor exposição à patógenos. Essa redução polariza a resposta imune para um perfil Th2 em detrimento ao perfil Th1, favorecendo o desenvolvimento de doenças alérgicas (HASPELAGH *et al.*, 2018; STRACHAN, 1989). Além disso, o ambiente rural representa uma proteção contra alergia, em que uma maior exposição de mulheres grávidas a endotoxinas e menor contato com animais promove a ubiquitinação da enzima A20, suprimindo a ativação de DCs na mucosa das vias aéreas e mediada por uma insensibilidade aos ligantes dos TLRs. Esses eventos estão associados a uma maior indução de tolerância nas mães e seus filhos (EGE, MARKUS J., 2017). No entanto, esta hipótese não explica a estreita relação de algumas infecções virais (como Rinovírus, e Vírus Sincicial Respiratório) com o desenvolvimento da asma e sua exacerbação (IIKURA *et al.*, 2015).

Mais recentemente, foram postuladas duas hipóteses para suprir as lacunas da hipótese da higiene, uma proposta por Rook e Brunet (2005) denominada “A hipótese dos velhos amigos” (do inglês –*The Old friends-hypothesis*) na qual os autores argumentam que microrganismos e helmintos que coevoluíram com os humanos despertam imunorregulação. Ao passo que, níveis apropriados de exposição (o que ocorre em ambiente rurais) protegem contra o desenvolvimento de doenças alérgicas. Outra hipótese relevante proposta por Ege e colaboradores (2006), postula que existe uma janela de oportunidade na qual exposições a um ambiente rural durante a vida intrauterina modula o sistema imune a apresentar menor sensibilidade a antígenos inócuos.

Embora a hipótese da higiene tenha sido essencial para o entendimento do papel dos microrganismos na saúde humana, ela não é uma explicação universal e tem passado por diversas adaptações, e é improvável que uma única teoria possa explicar um fenômeno tão complexo com personagens tão diversos (EGE, MARKUS J., 2017). Outros fatores ambientais e intrínsecos podem atuar em conjunto para explicar o aumento recente na incidência de asma, dentre os quais está a obesidade, cuja incidência e prevalência se encontram aumentadas, sendo considerada um importante fator modificador da asma (WOOD, 2017).

1.2 OBESIDADE

A obesidade é um problema de saúde pública de ordem global que afeta mais de 650 milhões de adultos (Figura 3) e 124 milhões de crianças (Figura 4) (VAAMONDE; ÁLVAREZ-MÓN, 2020). É uma doença crônica e sistêmica desencadeada por fatores hereditários, ambientais, socioeconômicos e culturais. Além disso, está associada ao consumo de dietas ricas em gorduras, açúcares e com baixo teor de nutrientes, bem como sedentarismo e estresse (GONZÁLEZ-MUNIESA *et al.*, 2017). É usualmente caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal e diagnosticada pelo índice de massa corpórea (IMC), razão entre massa corporal pelo quadrado da altura. Sendo considerados obesos indivíduos com IMC maior ou igual a 30 kg/m² (VAAMONDE; ÁLVAREZ-MÓN, 2020).

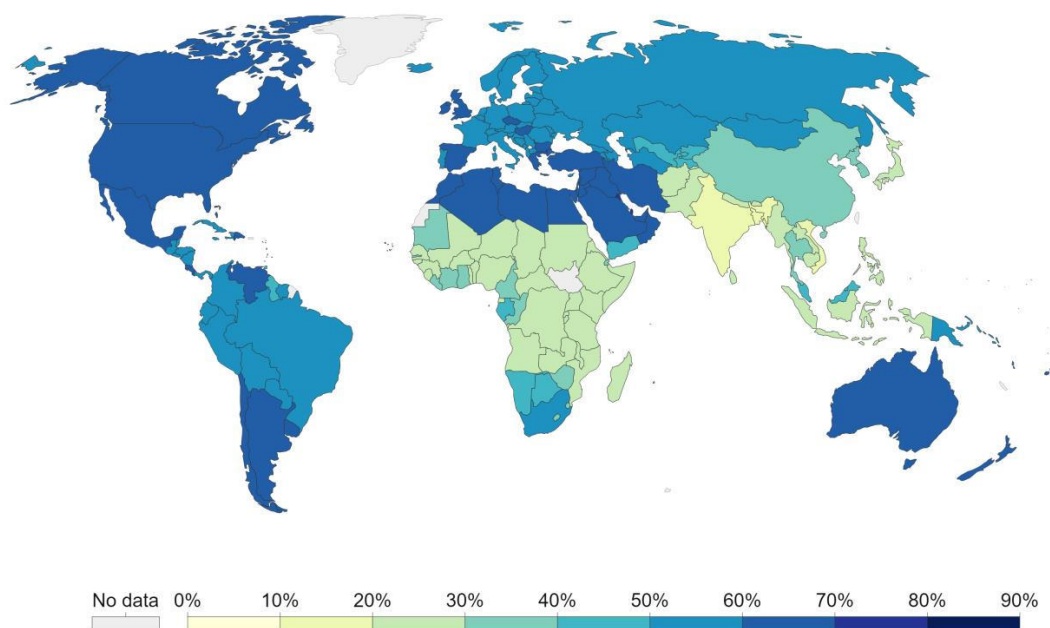


Figura 3– Prevalência mundial de sobrepeso e obesidade em adultos em 2016. Fonte: VAAMONDE; ÁLVAREZ-MÓN, 2020. Adaptado de <https://ourworldindata.org/> Acesso em 25 de maio de 2022.

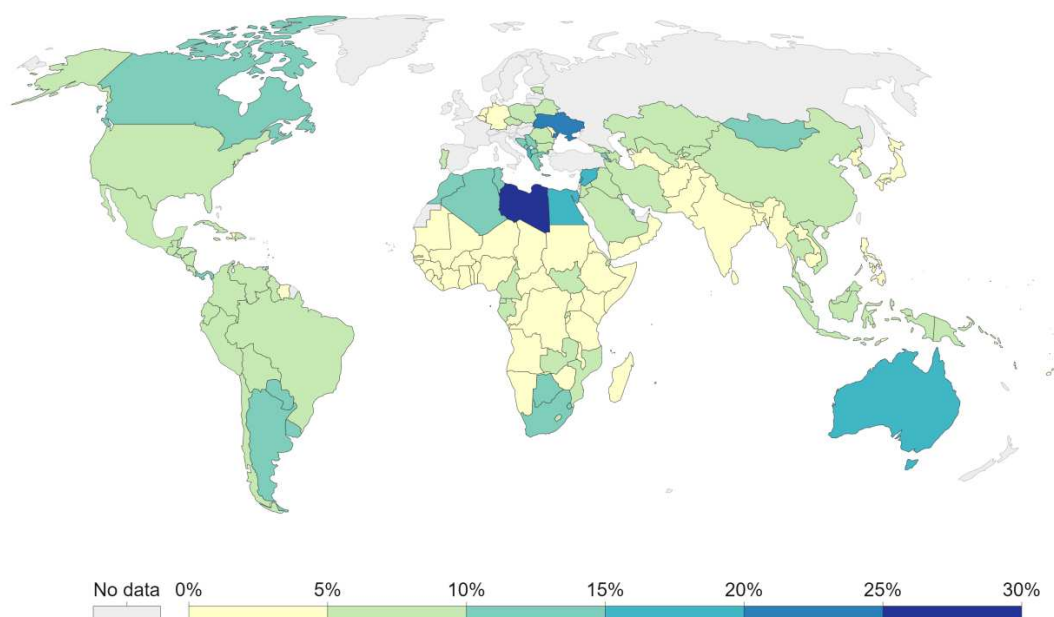


Figura 4– Prevalência mundial de sobrepeso e obesidade em crianças menores de 5 anos de idade em 2016. Fonte: VAAMONDE; ÁLVAREZ-MÓN, 2020. Adaptado de <https://ourworldindata.org/> Acesso em 25 de maio de 2022

O aumento da massa corporal se dá em grande parte pela hiperplasia e hipertrofia do tecido adiposo branco (GHABEN; SCHERER, 2019), que além das funções clássicas de armazenamento de energia, proteção mecânica e isolamento térmico exerce importantes funções endócrinas. Dentre estas funções destaca-se a liberação de adipocinas, como a leptina e a adiponectina, que são proteínas que podem atuar no metabolismo energético, nas funções endoteliais, no controle da saciedade, no crescimento tumoral e inflamação (ZHANG *et al.*, 2017).

A produção de adiponectina é inversamente proporcional à quantidade de tecido adiposo e ao IMC do indivíduo. Tem funções anti-inflamatórias como a indução de produção de IL-10 e do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1RA) em macrófagos e DCs, suprimindo a produção de IL-6 e do fator de necrose tumoral (TNF)- α (do inglês –*Tumor Necrosis Factor alpha*) (FANG; JUDD, 2018). Já a leptina, tem como principal função o controle da saciedade, agindo no sistema nervoso central reduzindo a ingestão de alimento. Porém, na obesidade ocorre aumento dos seus níveis séricos, bem como a geração de resistência em células-alvo, contribuindo para o desenvolvimento e manutenção da obesidade. Adicionalmente, atua como mediador inflamatório, capaz de ativar células da imunidade inata e adaptativa (LA CAVA, 2017; STOLARCZYK, 2017). Uma vez que seu receptor (Ob-Rb), expresso em diversas

células imunes, age aumentando a produção de citocinas em macrófagos (TNF- α , IL-1 β e IL-6) e mastócitos, promovendo quimiotaxia de granulócitos e polarização de linfócitos para um perfil Th1/Th17. Adicionalmente, a sinalização da leptina suprime a proliferação de Tregs (ABELLA *et al.*, 2017) e favorece a sobrevivência de ILC2 e linfócitos Th2 (ZHENG *et al.*, 2016).

Além da maior produção de leptina a obesidade leva a uma mudança de perfil imune no tecido adiposo. Em condições fisiológicas o tecido é composto de adipócitos e células imunes como macrófagos do tipo M2, produtores de IL-10, IL-4 e IL-13, eosinófilos e linfócitos Tregs. Enquanto na obesidade ocorre o recrutamento de células inflamatórias como linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, mastócitos, neutrófilos, células dendríticas e macrófagos M1 (KAWAI; AUTIERI; SCALIA, 2021).

O estabelecimento do estado inflamatório ocorre devido à hipertrofia de adipócitos, levando ao estrangulamento de vasos sanguíneos locais, causando morte celular e a liberação de marcadores de hipóxia. Estes, em paralelo com a leptina aumentam a produção de citocinas inflamatórias, resultando em um estado inflamatório sistêmico de baixo grau. Além disso, ácidos graxos saturados provenientes da dieta são reconhecidos pelo receptor TLR-4 promovendo a ativação de vias de sinalizações ligadas ao inflamassoma do tipo NLRP-3 (do inglês – *Nucleotide-binding and oligomerization domain like receptor family pyrin domain containing 3*) (WOOD *et al.*, 2019).

A obesidade leva ao aumento da “mortalidade por todas as causas” e se torna um fator de risco importante para várias doenças, como as metabólicas (arteriosclerose, diabetes, dislipidemias), diversos tipos de cânceres, osteoartrite, doenças mentais (depressão e ansiedade), distúrbios do sono (apneia), além de representar um importante fator para o agravamento da asma (JUNG; CHOI, 2014).

1.3 INTERAÇÃO OBESIDADE E ASMA

Diversos estudos clínicos e epidemiológicos apontam para uma estreita relação entre obesidade e asma. A concomitância dessas doenças em um mesmo indivíduo leva a considerável piora dos sintomas respiratórios, aumento da hiperresponsividade brônquica e da produção de muco, com menor responsividade a terapias convencionais, reduzindo a qualidade de vida e levando a uma maior frequência de hospitalizações e gastos com saúde (FITZPATRICK; JOKS; SILVERBERG, 2012; MOORE *et al.*, 2010).

Além da piora dos sintomas da asma, pacientes obesos tem maior risco de desenvolver a doença (BEUTHER; SUTHERLAND, 2007), uma possível explicação para tal é o compartilhamento de cerca de 8% de seus componentes genéticos (ZHU *et al.*, 2020). Dentre estes, polimorfismos no receptor β 3-adrenérgico, localizado no tecido adiposo, relacionado com ganho de peso e fenótipos mais severos de asma, com baixa responsividade a medicamentos β -agonistas (HALLSTRAND *et al.*, 2005). Diversos outros *loci* também são compartilhados, sobretudo os envolvidos na regulação da inflamação e remodelamento, como os genes SMAD3 (do inglês – *Mothers against decapentaplegic homolog 3*), ligado a via do Fator de transformação do crescimento beta (TGF- β , do inglês– *transforming growth factor beta*), e FOXA3 (do inglês – *forkhead box protein A3*) envolvido na metaplasia de células calciformes e regulação da massa corporal (ZHU *et al.*, 2020).

Além de fatores genéticos, a obesidade independente da asma causa redução da capacidade respiratória (FORNO *et al.*, 2018). O acúmulo de gordura no tórax e abdômen causa restrição da mobilidade do diafragma, dificultando sua expansão (PETERS *et al.*, 2018). Pacientes adultos obesos, sem outras comorbidades respiratórias, têm redução do volume expiratório forçado em 1-segundo (VEF-1), capacidade vital forçada (CVF) e capacidade pulmonar total (CPT) (ARISMENDI *et al.*, 2020). Ao passo que crianças obesas apresentam um VEF-1 e CVF normais, porém com uma razão VEF-1 e CVF baixa, indicando um padrão obstrutivo das vias aéreas. O que pode ser explicado pelo crescimento desproporcional entre os pulmões e o calibre das vias aéreas (disanapsia) (ARISMENDI *et al.*, 2020). Tais fatores estão associados a maiores taxas de mortalidade e resistência a terapia com corticoides em crianças obesas asmáticas (FITZPATRICK; JOKS; SILVERBERG, 2012; FORNO *et al.*, 2017).

A associação entre obesidade e asma resulta em fenótipos particulares a depender da idade em que se desenvolve a asma. Em crianças obesas que desenvolvem asma até 12 anos, se observa um agravamento da asma alérgica, com maior obstrução de vias aéreas, inflamação eosinofílica e maiores níveis de IgE (CVEJOSKA-CHOLAKOVSKA *et al.*, 2019; HOLGUIN, F. *et al.*, 2011; MATSUDA *et al.*, 2005). Nestes casos a leptina apresenta papel central na patogênese, contribuindo para a sobrevivência e expansão linfócitos Th2 e de ILC2 (ZHENG *et al.*, 2016). Além de estimular a expressão de citocinas pró-inflamatórias e o recrutamento de eosinófilos (GROTTA *et al.*, 2013; SUZUKAWA *et al.*, 2015). No entanto alguns

estudos apontam para a predominância de inflamação Th1 em crianças com obesidade e asma, com acentuado aumento de INF- γ e redução de IL-4 e IgE, associado com agravamento no seu quadro clínico (NYAMBUYA *et al.*, 2020; YOUSSEF *et al.*, 2013). Tais contradições na literatura não são completamente elucidadas e requerem maiores estudos.

Em adultos sem histórico de alergia, especialmente mulheres, fica evidenciado um perfil pró-neutrófilico/Th17 (MOORE *et al.*, 2010). Estes indivíduos desenvolvem asma geralmente na idade adulta (WANG *et al.*, 2011), é característico destes pacientes baixos níveis de IgE e redução da inflamação do tipo Th2 (HOLGUIN, FERNANDO *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2011), além de sintomas severos e resistência ao tratamento com corticosteroides (FUKAKUSA *et al.*, 2005). Ocorre uma predominância do perfil Th17, com aumento de neutrófilos no escarro (SCOTT *et al.*, 2011), podendo se apresentar com ou sem eosinofilia, e um aumento na produção de IgG alérgeno-específica (CALIXTO *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2019; SILVA, *et al.*, 2017). O papel da classe de anticorpo IgG na asma ainda não é completamente esclarecida, mas é possível que esta se relacione com anafilaxia mediada por neutrófilos (JÖNSSON *et al.*, 2019).

O maior influxo de neutrófilos causa significativas alterações para o tecido pulmonar, uma vez que estas células produzem enzimas proteolíticas como elastase neutrofílica e metaloproteinase-9, que causam danos ao tecido pulmonar, por sua vez, o dano tecidual induz a produção e secreção de muco, além de remodelamento tecidual (BRUIJNZEEL; UDDIN; KOENDERMAN, 2015). É possível que esse intenso recrutamento de células se dê pelo aumento na expressão de moléculas de adesão, como sICAM-1 (do inglês –*soluble Intercellular Adhesion Molecule 1*) e sVCAM-1 (do inglês – *vascular cell adhesion molecule 1*) em crianças obesas asmáticas (BI *et al.*, 2018) e maiores concentrações de sICAM-1, E-selectin (do inglês – *endothelial-leukocyte adhesion molecule 1*) e P-selectin no soro de adultos obesos (MULHEM *et al.*, 2021). Além do desenvolvimento do perfil Th17 com altos níveis de IL-17A, indivíduos asmático-obesos também podem apresentar maior número de linfócitos T $\gamma\delta$, ILCs do tipo 3, macrófagos M1 e intensificação da ativação do inflamassoma NLRP3 (KIM *et al.*, 2014).

Distúrbios metabólicos podem também estar envolvidos com o agravamento da asma, Su e colaboradores (2018) identificaram uma média superior de colesterol total e fração LDL em uma metanálise de pacientes asmáticos. Enquanto, níveis baixos de

HDL foram associados a asma em idosos (PARK *et al.*, 2018). Já em crianças, altas concentrações de colesterol, triglicérides e resistência à insulina se relacionam com asma (AL-SHAWWA *et al.*, 2007; COTTRELL *et al.*, 2011; KO *et al.*, 2018).

A resistência à insulina foi descrita como um fator prejudicial para a função pulmonar, independente do IMC (ENGSTRÖM *et al.*, 2003; LAZARUS; SPARROW; WEISS, 1998). Inclusive, a exposição direta das vias aéreas a esse hormônio leva a hipertrofia da musculatura lisa das vias aéreas, hiperresponsividade brônquica e remodelamento tecidual (SINGH *et al.*, 2016). Nesse sentido, testes de administração inalatórias de insulina exógena foram descontinuados devido a efeitos adversos como tosse, dispneia e redução da função respiratória (ROSENSTOCK *et al.*, 2009). Um possível mecanismo para esses efeitos deletérios seria a inibição de receptores muscarínicos M2 (AL-SHAWWA *et al.*, 2007).

A ocorrência de distúrbios metabólicos está frequentemente relacionada a padrões dietéticos, os quais podem ter influência no risco e agravamento da asma (NAGEL *et al.*, 2010). Dietas obesogênicas, também chamadas de ocidentais, são ricas em gordura saturada e açúcares, sendo pobres em fibras e antioxidantes (WOOD, 2017). O excesso de ácidos graxos em circulação, os quais agem como ligantes para TLRs, ativam a via do inflamassoma NLRP3, leva à produção de IL-1 β , IL-6, TNF- α e espécies reativas de oxigênio (HOTAMISLIGIL, 2010; VANDANMAGSAR *et al.*, 2011; KIM, HYE YOUNG *et al.*, 2014). Essa maior disponibilidade de ácidos graxos também afeta a infiltração de eosinófilos, em modelo de alergia, a qual depende de FABP4 (do inglês *-Fatty acid binding protein 4*), uma proteína transportadora desses componentes (SHUM *et al.*, 2006). Estes padrões de dieta também são relacionados com aumento de ILCs no pulmão (EVERAERE *et al.*, 2016), bem como elevada hiperresponsividade brônquica e redução da resposta a broncodilatadores (WOOD; GARG; GIBSON, 2011).

Deficiências em determinados nutrientes também tem um importante papel, nota-se que a carência de vitamina D está associada tanto ao desenvolvimento de obesidade (EARTHMAN *et al.*, 2012), quanto ao agravamento de asma e resistência a terapia com corticoides (BREHM *et al.*, 2012). Intervenções com dietas ricas em antioxidantes (como vitaminas A, C, E e flavonoides), geram melhora em parâmetros respiratórios e reduzem a frequência de exacerbações asmáticas (WOOD *et al.*, 2012), provavelmente por mecanismos como inibição de recrutamento de leucócitos, bloqueio da síntese de prostaglandinas e neutralização de radicais livres (ALWARITH

et al., 2020). Porém, evidências ainda não são o suficiente para sustentar a suplementação de vitaminas para a prevenção da asma (HAN *et al.*, 2015).

O baixo consumo de fibras aparenta ser o fator mais diretamente relacionado com o risco do desenvolvimento de asma. Dietas ricas em fibras são associadas com melhora em parâmetros respiratórios (HANSON *et al.*, 2016; KAN *et al.*, 2008) e redução de mediadores inflamatórios como IL-6, proteína C reativa e redução na expressão do receptor 2 de TNF- α (MA *et al.*, 2006, 2008). As fibras da dieta sofrem modificações pela microbiota intestinal, formando ácidos graxos de cadeia curta (AGCC do inglês –*short-chain fatty acids*), os quais tem papel essencial na modulação da resposta imune no pulmão, e são os principais integrantes do eixo-intestino pulmão (DANG; MARSLAND, 2019). Assim, o consumo reduzido de fibras, frequente em pacientes obesos, e as alterações na microbiota intestinal causadas pela obesidade tornam-se um fator de risco e agravamento para a asma (TROMPETTE *et al.*, 2014).

1.3.1 Obesidade materna e asma

A obesidade materna é o principal fator complicador de gestações, aumentando o risco de diabetes gestacional, hipertensão e pré-eclâmpsia (MARCHI *et al.*, 2015). Estima-se que cerca 38 milhões de mulheres grávidas estavam com sobrepeso ou obesas no ano de 2014 (CHEN, CHENG; XU; YAN, 2018). Consistindo em um grande problema de saúde pública, uma vez que não apenas aumenta o risco de complicações para a gestante, como se traduz em efeitos duradouros sobre o feto como macrossomia, defeitos congênitos e doenças metabólicas (MARCHI *et al.*, 2015). Além disso, a obesidade materna está relacionada com o aumento da incidência de natimortos, defeitos no tubo neural e cardíacos, bem como com um maior risco de diversos problemas crônicos, como déficits cognitivos, transtorno do déficit de atenção e hiperatividade, doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, câncer, alergia e asma (WILSON; MESSAOUDI, 2015).

O risco aumentado para o desenvolvimento de doenças em filhos de mães obesas parece ser mediado principalmente por alterações epigenéticas na prole, desencadeadas pela exposição a altos níveis de glicose, insulina, lipídios e citocinas inflamatórias (ACEVEDO *et al.*, 2021). Outro mecanismo envolve a colonização por uma microbiota inadequada, a qual não contribui para o desenvolvimento saudável de um sistema imune tolerante a antígenos próprios e inócuos (RENZ; SKEVAKI, 2021).

A placenta é o órgão de interface entre a circulação fetal e materna, criando um

ambiente propício para o desenvolvimento fetal, através da regulação de nutrientes, troca de gases, hormônios e exercendo funções imunes (MARCHI *et al.*, 2015). É ainda um órgão de delicado balanço inflamatório, pois a produção de citocinas é um ponto crítico no estabelecimento e manutenção da gravidez (HAUGUEL-DE MOUZON; GUERRE-MILLO, 2006).

Estudos mostram que a obesidade materna afeta o transporte de aminoácidos, funções mitocondriais e também funções vasculares, prejudicando o desenvolvimento fetal, tornando-se um importante alvo terapêutico (MURTHI; RAJARAMAN, 2020). Na placenta de mães obesas ocorre uma maior infiltração de macrófagos e expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-8 e TNF- α , CCL2 e de receptores como CXCR2 (do inglês – *C-X-C motif chemokine receptor 2*). Bem como, um maior número de neutrófilos no espaço intersticial, e maior espessura dos vasos sanguíneos placentários (AYE; JANSSON; POWELL, 2015; MARCHI *et al.*, 2015). A obesidade materna também é relacionada com a ativação de vias inflamatórias intracelulares como STAT3 (do inglês – *signal transducer activated transcription factor 3*) e MAPK p38 (do inglês – *stress/mitogen activated protein kinases*) (AYE *et al.*, 2014).

Enquanto o perfil pró-inflamatório observado na placenta está bem estabelecido, evidências conflitantes são encontradas em relação ao feto. A medida que alguns estudos observam níveis mais altos de TNF- α , IFN- α , IL-6 e proteína C reativa em filhos de obesas (DOSCH *et al.*, 2016; WILSON; MESSAOUDI, 2015), outros encontram reduzida contagem de eosinófilos e linfócitos T auxiliares (WILSON *et al.*, 2015b), bem como maior número de eritrócitos nucleados com funções imunossupressoras, e aumento de células T CD4⁺ e TCD8⁺ regulatórias (GONZALEZ-ESPINOSA *et al.*, 2016; IBRAHIM *et al.*, 2017). Além disso, evidências apontam que a obesidade materna pode gerar defeitos intrínsecos em células apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês – *Antigen presenting cells*) (WILSON *et al.*, 2015), como a produção reduzida de IL-6 e TNF- α em resposta a agonistas de TLR-1, 2 e 4, em monócitos e células dendríticas mieloides (SURESHCHANDRA *et al.*, 2017; WILSON *et al.*, 2015). Adicionalmente, podem ocorrer prejuízo da capacidade fagocítica em células de Kupffer em filhos de obesas, com maior produção de espécies reativas de oxigênio (MOURALIDARANE *et al.*, 2013), demonstrando um possível dano na ativação destas células. O prejuízo à função de células apresentadoras de antígenos fica ainda mais evidente quando se observa alteração na expressão de genes relativos a vias de apresentação de antígenos (FARLEY *et al.*, 2009), corroborado pelo

aumento da letalidade em modelos de sepse (MYLES *et al.*, 2013).

Estudos demonstram que células hematopoiéticas são especialmente sensíveis a um ambiente obesogênico. Nesse sentido, a dieta materna pode restringir a expansão de células-tronco hematopoiéticas, e de células precursoras no fígado fetal, causando um desequilíbrio entre as linhagens mieloides e linfoides (ADLER *et al.*, 2014; KAMIMAE-LANNING *et al.*, 2015), um processo aparentemente dependente da sinalização por TLR4 (LIU, AILING *et al.*, 2018).

Além dos efeitos supracitados, diversos outros efeitos foram observados em órgãos específicos. No sistema nervoso central, uma dieta rica em gordura durante a gestação levou a exacerbação da encefalite autoimune experimental nos filhotes (MYLES *et al.*, 2013). Bem como promoveu uma maior produção de TNF- α frente a estimulação de células da micróglia CD11b⁺ com LPS (lipopolissacarídeo) (EDLOW *et al.*, 2019). A mesma dieta levou ainda a redução da frequência de Tregs no baço, além de aumentar a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1 β e IL-17) em esplenócitos murinos estimulados com LPS (MYLES *et al.*, 2013). A prole de mães obesas também apresentou maior expressão hepática de enzimas metabólicas e lipotoxicidade (MCCURDY *et al.*, 2009) associada a inflamação periportal em camundongos (SODERBORG *et al.*, 2018). No intestino se observa uma maior sinalização da via NF κ B (do inglês – *nuclear factor kappa B*), com maior expressão IL-1 β , IL-6, CCL2, IL-17, TNF- α , IL-8, CD68, CD14 e TGF- β . Nota-se também a redução na frequência de Tregs na lâmina própria, além de aumento no infiltrado neutrofílico e menor expressão de moléculas de adesão, aumentando a permeabilidade intestinal e gerando maior susceptibilidade a colites e doenças inflamatórias intestinais (BIBI *et al.*, 2017; YAN *et al.*, 2011).

Em resumo, as evidências apontam que a obesidade materna causa alterações em diversos órgãos da prole, bem como desregulação do sistema imune, levando tanto ao prejuízo de respostas contra microrganismos, como a exacerbação de respostas inflamatórias (Figura 5).

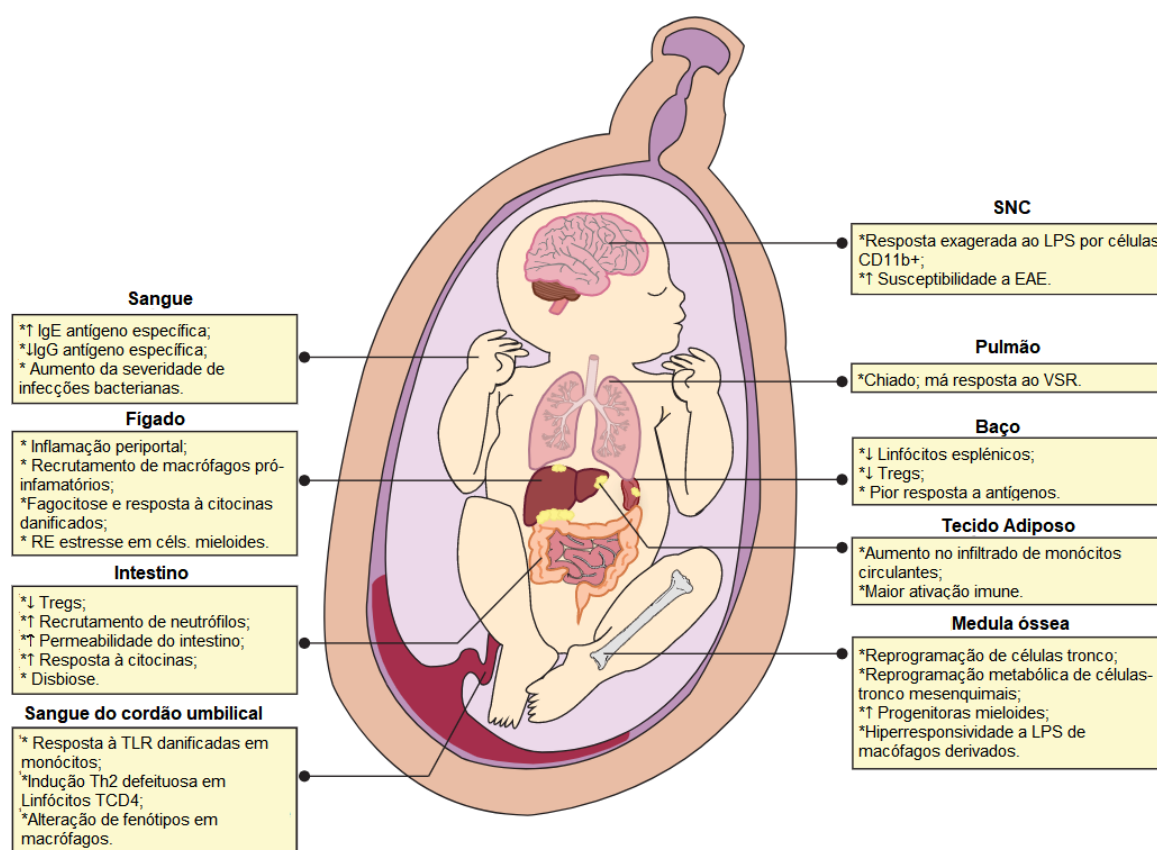


Figura 5– Impacto da obesidade/dieta materna em células imunes circulantes e residentes. Adaptado de SURESHCHANDRA; MARSHALL; MESSAOUDI, 2019.

Os efeitos da obesidade materna na progênie favorecem o desenvolvimento de alergia e podem agravá-la. Nesse contexto, a obesidade materna é associada com um maior risco de asma até os 12 anos. Nesse grupo nota-se que meninos apresentam maior propensão ao desenvolvimento de asma não alérgica, enquanto meninas tem maior risco de apresentar a forma alérgica (DUMAS *et al.*, 2016). Uma metanálise abordando 22 estudos observacionais, envolvendo cerca de 145 mil pares de mães e filhos, detectou uma forte associação entre sobrepeso/obesidade materna pré-gestacional e a ocorrência de asma e chiado. (LIU, SHUFANG *et al.*, 2020).

Um mecanismo provável para a influência da obesidade materna na prole pode estar relacionado ao atraso da maturação pulmonar do feto, causado pela resistência à insulina materna, que interfere na produção de surfactantes, essenciais para maturação alveolar. Esse fator vai ao encontro de evidências clínicas, que demonstram um aumento da incidência da síndrome do estresse respiratório em neonatos de mães obesas (MCGILLICK *et al.*, 2017). Associado a isso, altas dosagens de leptina no cordão umbilical estiveram fortemente relacionadas com diabetes gestacional e elevado peso ao nascer (STEFANIAK *et al.*, 2019; VASILAKOS

et al., 2022). Adicionalmente, altas concentrações de leptina no cordão umbilical acresceram em 30% a chance de desenvolver asma na primeira infância (CASTRO-RODRIGUEZ *et al.*, 2020).

Apesar da grande relevância de estudos clínicos, estes nem sempre permitem a investigação aprofundada dos mecanismos pelos quais a obesidade materna influencia no risco de desenvolvimento da asma. Logo, estudos em modelos experimentais são uma alternativa devido à facilidade para se isolar variáveis e realizar intervenções. Em camundongos, o consumo de dieta hiperlipídica materna aumenta não somente a hiperresponsividade brônquica, como elevam significativamente a contagem de células do lavado broncoalveolar, a porcentagem de neutrófilos e a concentração de IL-6 (MACDONALD *et al.*, 2017). Esses filhotes também apresentam um estado de hiperalimentação que leva ao aumento da expressão de IL-1 β , IL-23 e TNF- α no pulmão, maior concentração sérica e resistência à leptina, além de redução da tolerância a glicose (DINGER *et al.*, 2016).

Também em modelo experimental frente a sensibilização à OVA (ovalbumina) filhotes de obesas apresentaram uma maior produção de IgE OVA-específica em detrimento de IgG1 (ODAKA *et al.*, 2010). A dieta hiperlipídica materna também leva ao aumento da resistência pulmonar em desafios com metacolina, e eleva diversas citocinas inflamatórias no pulmão como: TNF- α , CCL2, IL-5, TGF- β 2 e eotaxina, um fator quimiotático de eosinófilos (GRIFFITHS *et al.*, 2016). Em contraste, já foi documentado redução de IL-4 e eosinófilos em cordão umbilical de filhos de obesas (WILSON *et al.*, 2015).

Em conjunto com o perfil dietético materno, o consumo de nutrientes específicos também impacta no desenvolvimento da asma na prole. Nesse sentido, o consumo de ácidos graxos poli-insaturados do tipo ômega 3, durante a gravidez, se mostrou um fator protetor contra a asma na prole, enquanto o consumo excessivo de gorduras saturadas e ácidos graxos poli-insaturados ômega 6 estão associados ao maior risco de desenvolver asma (LUMIA *et al.*, 2011; RUCCI *et al.*, 2016).

Diante do exposto fica clara a relação entre obesidade e dieta materna na asma da prole. Apesar de existirem mecanismos que expliquem, mesmo que parcialmente, essa relação, ainda há muito a ser elucidado. Um possível elo que vem sendo explorado mais recentemente é a mudança causada pela dieta/obesidade na microbiota, que se associa a diversas doenças, inclusive a asma.

1.4 OBESIDADE, MICROBIOTA E ASMA

1.4.1 Microbiota e asma

Considera-se microbiota a comunidade de microrganismos que vivem nos diversos habitats do corpo humano como pele, placenta, trato gastrointestinal (TGI) e respiratório. Formam relações simbióticas, comensais e patogênicas com seu hospedeiro, sendo determinantes de saúde e doença. A microbiota é constituída por vírus, protozoários, fungos, archeas e bactérias. Estas últimas são os organismos mais comumente estudados (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017). A região mais densamente habitada do organismo é o trato gastrointestinal, com até 10^{14} células bacterianas por grama de tecido (QIN *et al.*, 2010), as quais estão divididas em seis filos principais: Bacteroidetes e Firmicutes, os mais predominantes; seguidos pelos filos Proteobacteria; Actinobacteria; Fusobacteria e Verrucomicrobia (DONALDSON; LEE; MAZMANIAN, 2015). A comunidade bacteriana desempenha uma variedade de funções fundamentais como proteção contra patógenos, tanto por colonização das mucosas quanto por produção de moléculas antimicrobianas (MILLS *et al.*, 2019). Além disso, contribui para a manutenção da homeostasia energética e imune, por mecanismos que envolvem a produção de metabólitos a partir de fermentação de fibras derivadas da dieta, resultando na produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), como butirato, acetato e propionato. Estas substâncias agem sobre receptores acoplados a proteína G como: FFAR2 e FFAR4 (do inglês *–free fatty acid receptor*) presentes em células epiteliais do pulmão e em células imunes (DANG; MARSLAND, 2019).

Ácidos graxos de cadeia curta promovem a diferenciação de células T regulatórias extratímicas por inibição de histonas desacetilases (ARPAIA *et al.*, 2013). Propionato e butirato ainda promovem a diferenciação de DC CD11b^{high} com alta capacidade fagocítica, porém com menor potencial de ativação de células Th2, devido a uma menor expressão de CD40 e CD86 (DESCH; HENSON; JAKUBZICK, 2013; KOPF; SCHNEIDER; NOBS, 2015). Estes compostos também inibem a ativação de mastócitos e a produção de IL-4 por basófilos, induzindo alterações epigenéticas na via de sinalização mediada pelo FcεRI (FOLKERTS *et al.*, 2020). Nesse sentido, a presença de altos níveis de butirato e propionato em fezes de crianças foi associada à diminuição de atopia (RODUIT *et al.*, 2019). Enquanto a redução dos níveis de acetato, são associados à redução das populações de bactérias dos gêneros

Lachnospira, *Rothia*, *Faecalibacterium* e *Veillonella* aumentando o risco do desenvolvimento de asma na infância (ARRIETA *et al.*, 2015; TROMPETTE *et al.*, 2014).

É evidente o papel da microbiota no desenvolvimento da imunidade de mucosa, como se observa em estudos realizados com camundongos *germ-free* (animais desprovidos de microbiota criados e mantidos em ambiente estéril). Esses animais apresentam alta predisposição à resposta Th2/Th17 exacerbada nas vias aéreas, com eosinofilia e elevados níveis de IgE (HERBST *et al.*, 2011; UBAGS *et al.*, 2021). Além disso, bactérias específicas também estão relacionadas com a diminuição do risco de desenvolvimento de asma alérgica, como *Bifidobacterium longum* intestinal, associada a redução de incidência de asma em crianças (AKAY *et al.*, 2014).

1.4.2 Microbiota e obesidade

Uma microbiota em equilíbrio com o hospedeiro é altamente diversa e apresenta um equilíbrio dinâmico, resistindo a perturbações e voltando ao seu estado original. Porém, alguns fatores, como amamentação, tipo de parto, *status* nutricional materno, uso de antibióticos, infecções, e dietas, levam a sua alteração de maneira prolongada, o que é denominado disbiose (BÄCKHED *et al.*, 2012).

Em especial, dietas obesogênicas, pobres em fibras e ricas em lipídios e açúcares, podem levar a alterações da microbiota que aumentam o risco não apenas do desenvolvimento da asma, mas também de várias outras patologias, como doenças intestinais crônicas, diabetes mellitus e doenças cardiovasculares (SINGH, RASNIK K *et al.*, 2017). Humanos obesos, com menor diversidade bacteriana, apresentam redução da população de bactérias do filo Bacteroidetes e um aumento de Firmicutes (TURNBAUGH *et al.*, 2009). Estas últimas tem maior capacidade de extrair energia da dieta e estão associadas ao ganho de peso do hospedeiro (TURNBAUGH *et al.*, 2006). Além disso, outras famílias de bactérias se encontram aumentadas na obesidade, como *Prevotellaceae*, *Veillonellaceae* (SERENA *et al.*, 2018) e *Lachnospiraceae* (MURUGESAN *et al.*, 2015). Enquanto se observa uma redução nas famílias *Odoribacteraceae*, *Clostridaceae* (SERENA *et al.*, 2018) e *Oscillospiraceae* (MAYA-LUCAS *et al.*, 2019). Adicionalmente, a obesidade ainda leva ao aumento da permeabilidade intestinal, permitindo a difusão de produtos bacterianos para a corrente sanguínea, como a endotoxemia, que consiste no

aumento sérico de LPS, contribuindo para a inflamação sistêmica (FRAZIER; DIBASE; MCCLAIN, 2011).

1.4.3 Microbiota pulmonar

Apesar de o intestino ser o órgão mais densamente povoado por microrganismos e o mais amplamente estudado em relação aos seus efeitos sobre o sistema imune, ele não é o único que apresenta colonização microbiana permanente (LLOYD-PRICE; ABU-ALI; HUTTENHOWER, 2016). O pulmão até recentemente era considerado um órgão estéril, onde a colonização era apenas observada em casos de patologia (COTRAN *et al.*, 1999). Porém, com os avanços das técnicas moleculares de PCR (reação da cadeia de polimerase) e sequenciamento, observou-se que inúmeros microrganismos habitam o pulmão, contudo, estes não eram detectados por métodos convencionais de cultura (BASSIS *et al.*, 2015; MORRIS *et al.*, 2013). Essa microbiota pulmonar apresenta uma densidade populacional extremamente reduzida (10^3 a 10^5 bactérias/grama de tecido) quando comparada a população do TGI (REMOT *et al.*, 2017), porém, similar à microbiota do trato respiratório superior (DICKSON *et al.*, 2017). Tal similaridade indica que a microbiota pulmonar é provavelmente derivada da dispersão de bactérias da cavidade nasal/oral, mas o perfil de colonização do pulmão apresenta características próprias (VENKATARAMAN *et al.*, 2015). Os gêneros bacterianos mais comuns encontrados no pulmão saudável são: *Prevotella* (pertencente ao filo Bacteroidetes), *Streptococcus* (Firmicutes), *Fusobacterium* (Fusobacteria) e *Haemophilus* (Proteobacteria) (AHO *et al.*, 2015; DICKSON *et al.*, 2017; MARSLAND; TROMPETTE; GOLLWITZER, 2015).

Pouco se sabe a respeito dos efeitos fisiológicos da microbiota pulmonar (MATHIEU *et al.*, 2018). Estudos comparando camundongos *germ-free* com camundongos SPF (do inglês *-specific pathogen free*), camundongos com uma microbiota equilibrada, não observaram diferenças na presença de células T e B, tão pouco na presença de células dendríticas convencionais e plasmocitóides (GOLLWITZER *et al.*, 2014; REMOT *et al.*, 2017). Porém, o pulmão livre de bactérias apresentam drástico aumento em células iNKT (OLSZAK *et al.*, 2012) (do inglês *-invariant natural killer T*), células que combinam propriedades de linfócitos T e células NK, capazes de reconhecer principalmente antígenos lipídicos (HOGQUIST; GEORGIEV, 2020). Além disso, a microbiota pulmonar também modula a produção de muco e organização dos tecidos respiratórios. Camundongos SPF apresentam

maior produção de muco e maior número de alvéolos quando comparados a *germ-free* (REMOT *et al.*, 2017; YUN *et al.*, 2014). No contexto da asma, dados mostram que a microbiota pulmonar promove tolerância. Em camundongos neonatos, nos quais a colonização pulmonar ainda não é completa, observa-se resposta acentuada a antígenos do ácaro doméstico (GOLLWITZER *et al.*, 2014).

Bactérias específicas parecem ter papéis antagônicos na patogênese da asma. O estímulo com uma cepa específica, patenteada, do gênero *Staphylococcus* promoveu uma resposta pró-Th1, com efeito protetor, levando a redução de células totais do lavado broncoalveolar (BAL) e eosinófilos, menores níveis de IgE e IgG1 séricos e expressão reduzida de TSLP e IL-17A. Enquanto outra cepa também patenteada teve efeito contrário (REMOT *et al.*, 2017). Na asma já estabelecida a colonização por *Streptococcus pneumoniae* é mais frequente, levando a exacerbação da asma em camundongos adultos, aumentando a produção de IL-17A (JOUNIO *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2015). Por outro lado, o tratamento com *Acinetobacter baumannii* causa significativa redução na eosinofilia e no escore inflamatório do pulmão, bem como na redução da expressão de citocinas do perfil Th2 (QIU *et al.*, 2011).

A asma por si só pode gerar disbiose pulmonar. Enquanto se observa uma maior população de Bacteroidetes em indivíduos saudáveis (CHARLSON *et al.*, 2011), em estados patológicos predominam *Gammaproteobacteria* (HILTY *et al.*, 2010), classe de bactérias que utilizam espécies reativas de nitrogênio produzidas durante o processo inflamatório para sobreviver em ambientes anaeróbios (WINTER; BÄUMLER, 2014). Dentre estas se destacam *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis*, que em conjunto com *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* estão relacionadas com asma neutrofílica grave (GREEN *et al.*, 2014).

O papel da obesidade na disbiose pulmonar e a influência na asma ainda não está totalmente esclarecido. Contudo, alguns estudos demonstram mudanças na composição bacteriana do pulmão em obesos asmáticos (LEE *et al.*, 2021). Entre as principais mudanças tem-se a redução nas populações das famílias *Enterococcaceae*, *Aeromonadaceae*, e nos gêneros *Paraprevotella*, *Phascolarctobacterium* e *Megasphaera* em comparação com pacientes saudáveis (MICHALOVICH; RODRIGUEZ-PEREZ; SMOLINSKA; PIROZYNSKI; MAYHEW; O'MAHONY; *et al.*, 2019), em contrapartida há um aumento nas populações das famílias *Prevotellaceae*, *Mycoplasmataceae*, *Lachnospiraceae* e *Spirochaetaceae*

(HUANG, YVONNE J. *et al.*, 2015). Em modelo experimental, o consumo de dieta hiperlipídica provocou em animais alérgicos a redução na abundância relativa do gênero *Ralstonia* e aumento de *Lactobacillus* no pulmão (LEE *et al.*, 2021). Um trabalho prévio realizado pelo nosso grupo de pesquisa, reportou um aumento expressivo da população de Firmicutes no pulmão de obesos asmáticos, bem como de Actinobacteria e *Moraxella catarrhalis*, apesar de curiosa redução na população geral de Proteobacteria. Tais alterações estiveram associadas a um atraso na expressão de TLR2/4, CD80 e PDL1 (do inglês– *programmed death-ligant 1*) em células dendríticas. Interessantemente neste mesmo trabalho a obesidade, por si só, levou a redução na população de Firmicutes e aumentou a de Proteobacteria (AYUPE *et al.*, 2019).

As evidências expostas acima, mostram que tanto a dieta como obesidade são fatores que influenciam na colonização intestinal e pulmonar, podendo ser considerados fatores de risco para os diferentes fenótipos e agravamento da asma, ao longo da vida.

1.4.1 Obesidade Materna e Microbiota

Recentemente tem sido cada vez mais difundido o conceito de origens do desenvolvimento de saúde e doença, no qual existe uma janela crítica, desde a concepção até os dois anos, em que o desenvolvimento do indivíduo é profundamente influenciado pelo ambiente em todas suas formas (materno, nutricional, socioeconômico, ecológico, entre outros) programando saúde, ou aumentando risco de desenvolvimento de doenças durante toda a vida (CHARLES; DELPIERRE; BREÁNT, 2016). Não coincidentemente, este período é também de colonização microbiana, o qual é profundamente influenciada por fatores maternos e ambientais (BUTEL; WALIGORA-DUPRIET; WYDAU-DEMATTEIS, 2018).

A colonização de neonatos possivelmente se inicia antes mesmo do nascimento (CHU; MEYER; *et al.*, 2016), mas é durante o parto e após o nascimento que ocorre exposição a uma maior diversidade de microrganismos. Com o passar do tempo a microbiota do neonato sofrerá influências da amamentação, contato com adultos, agentes antimicrobianos e alimentação. Essa microbiota precoce sofre significativas alterações na sua composição durante os primeiros anos de vida, mas perto dos três anos se estabelece e se manterá até a idade adulta (BUTEL; WALIGORA-DUPRIET; WYDAU-DEMATTEIS, 2018). A exposição de recém-

nascidos a microrganismos ambientais tem impacto profundo no desenvolvimento do sistema imune, e determina a tolerância ou resposta a antígenos ambientais como os alérgenos (GENSOLLEN *et al.*, 2016). Por exemplo, a colonização das vias aéreas de neonatos com *M. catarrhalis*, *H. influenzae* e *S. pneumoniae* está associada a maior contagem de eosinófilos, e títulos de IgE no sangue, e um perfil misto de resposta Th1, Th2 e Th17, com altos níveis de IL-1 β nas vias aéreas (BISGAARD *et al.*, 2007; PATTARONI *et al.*, 2018). A abundância de espécies do gênero *Veillonella* e *Prevotella* em recém nascidos foi associada ao desenvolvimento de asma em crianças (THORSEN *et al.*, 2019). Por outro lado, a exposição materna a *Acinetobacter lwoffii* gera um efeito protetor contra a asma na prole, levando a significativa redução de eosinófilos no BAL, menor produção de muco e escore inflamatório (CONRAD *et al.*, 2009).

É evidente a influência da microbiota materna na colonização e modelamento da microbiota da prole, logo uma microbiota materna obesogênica pode ser propagada na prole, contribuindo não apenas para o ciclo intergeracional da obesidade, como para outras doenças (GALLEY *et al.*, 2014). Entre as alterações da microbiota intestinal observadas na progênie de obesas ou de mulheres expostas a uma dieta rica em gordura estão: a redução geral da diversidade, com expressiva redução de Firmicutes (importante produtor de butirato) (BRUCE-KELLER *et al.*, 2017; WANKHADE *et al.*, 2017; SHOAI *et al.*, 2013), redução de Bacteroides no mecônio (CHU; ANTONY; *et al.*, 2016), grupo essencial para o desenvolvimento da imunidade na mucosa intestinal (TROY; KASPER, 2010); e aumento de *Lachnospiraceae* (TUN *et al.*, 2018), *Parabacteroides* spp e *Oscillibacter* spp (CLARKE *et al.*, 2013; MARTÍNEZ *et al.*, 2013).

Em contraposição aos efeitos deletérios da dieta hiperlipídica e obesidade, dietas maternas ricas em fibra reduzem o risco de asma e atenuam respostas inflamatórias das vias aéreas frente ao desafio com OVA na prole (THORBURN *et al.*, 2015; VENTER *et al.*, 2022). Provavelmente devido ao fato de AGCCs atravessarem a barreira transplacentária e induzirem a diferenciação de Tregs (NAKAJIMA *et al.*, 2017). O aumento na carga microbiana materna também se mostrou protetor, em modelo de alergia, com expressão reduzida de TLR2 e 4 no pulmão da prole, maior proporção de Tregs no baço e uma expressão reduzida da enzima Histona Desacetilase 9, HDAC9 (do inglês– *Histone Deacetylase-9*) no pulmão, relacionada a supressão de Tregs (DE ZOETEN *et al.*, 2010; LIU, JING *et al.*, 2020). Evidenciando

ainda mais o efeito da microbiota materna na homeostase pulmonar da prole, o uso materno de antibióticos durante a gestação levou ao aumento da severidade da asma na prole de maneira dose-dependente, causando alterações na microbiota intestinal da prole e matrizes, com expressiva redução de AGCCs (ALHASAN *et al.*, 2020).

Até o momento, nenhum estudo relacionou a obesidade materna com a disbiose pulmonar da prole, muito menos considerando o contexto da asma, logo este estudo teve como objetivo se aprofundar nas modificações que a dieta materna é capaz de causar no sistema imune antes e após o estabelecimento da alergia. Bem como estabelecer se a dieta hiperlipídica consumida pela mãe pode desencadear alterações na microbiota pulmonar da prole. A figura 6 resume o que se sabe, e as lacunas ainda persistentes a respeito da influência da obesidade e dieta materna no contexto da asma.

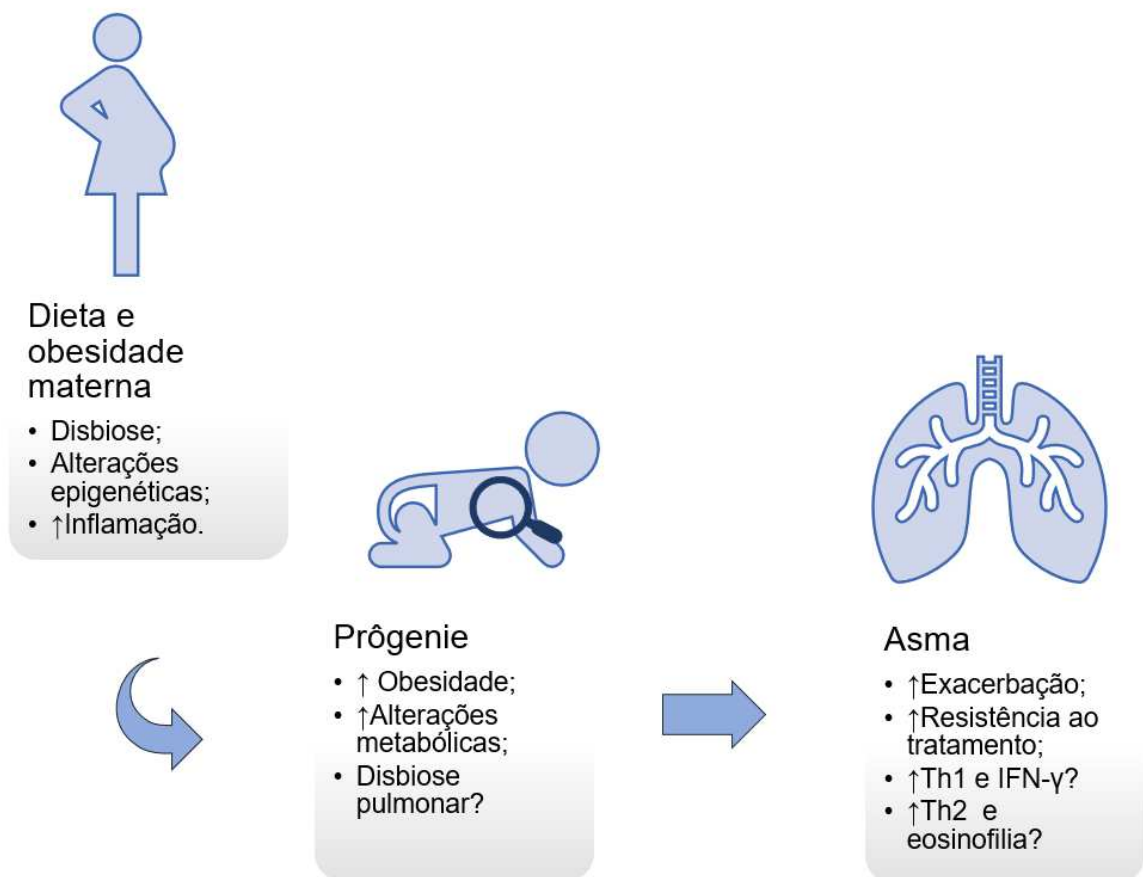


Figura 6– Efeitos da dieta e obesidade sob a progênie no contexto da asma. (Elaborado pela autora).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da dieta hiperlipídica materna no desenvolvimento precoce de asma na prole.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da dieta hiperlipídica no estabelecimento de obesidade em matrizes;
- Averiguar se a dieta hiperlipídica materna acarreta o desenvolvimento de obesidade na prole;
- Investigar se células dendríticas oriundas da prole de matrizes alimentadas com dieta hiperlipídica tem seu padrão de ativação alterado;
- Verificar se a dieta hiperlipídica materna altera o padrão de ativação/regulação da resposta imune em órgãos que participam da patogênese da asma e obesidade na prole;
- Avaliar se a dieta hiperlipídica materna acarreta maior risco e/ou atua como fator de agravamento para o desenvolvimento da asma alérgica na prole;
 - Verificar se há mudança no perfil do infiltrado inflamatório;
 - Averiguar se há diferença nas proporções de leucócitos diferenciados na medula óssea;
 - Verificar se há modificação do perfil de resposta humoral.
- Averiguar se a dieta hiperlipídica materna e a asma da prole causam alterações no perfil microbiano do pulmão.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Para realização deste trabalho, foram utilizados camundongos, fêmeas e machos da linhagem BALB/c, com 4-6 semanas de idade, bem como sua prole com 24 dias de idade, provenientes do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora (CBR-UFJF). Estes animais foram mantidos no setor de manutenção e experimentação do CBR-UFJF, em estante climatizada. O protocolo experimental realizado neste trabalho está de acordo com a Comissão de Ética na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFJF) da Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora, sob o protocolo 33/2020.

3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

As fêmeas foram divididas aleatoriamente em 2 grupos experimentais, de acordo com a indução da obesidade materna: grupo dieta padrão (SD, do inglês– standard diet), ao qual foi oferecida dieta padrão comercial para roedores AIN93G da marca Nuvilab®, contendo 10% das calorias derivadas de gordura; e o grupo dieta hiperlipídica (HFD, do inglês– *high-fat diet*) (Tabela 1), no qual foi oferecida dieta hiperlipídica contendo 60% das calorias derivada de gordura. Na tabela 2 foram discriminados os constituintes de ambas as dietas. O consumo da dieta foi acompanhado semanalmente nos mesmos dias e horários.

Tabela 1–Divisão dos grupos experimentais das matrizes

| Grupos | Identificação | Dieta Hiperlipídica |
|---------------|---|----------------------------|
| SD | Matriz alimentada com dieta padrão | - |
| HFD | Matriz alimentada com dieta hiperlipídica | + |

Tabela 2–Composição das dietas padrão e hiperlipídica.

| Composição | Dieta Padrão (g) | Dieta Hiperlipídica (g) |
|--------------------------|-----------------------------|--|
| Amido de milho | 398,00 | 115,5 |
| Caseína | 200,00 | 200,00 |
| Amido dextrinizado | 132,00 | 132,00 |
| Sacarose | 100,00 | 100,00 |
| Óleo de soja | 70,00 | 40,00 |
| Fibra | 50,00 | 50,00 |
| L-cistina | 3,00 | 3,00 |
| Colina | 2,50 | 2,600 |
| Mix mineral PSB 10026 | 35,00 | 35,00 |
| Mix vitamínico | 10,00 | 10,00 |
| Banha | 0,00 | 427,46 |
| TOTAL | 1000,00 | 1000,00 |

Após oito semanas de dieta as fêmeas foram colocadas em contato com camundongos machos na proporção de duas fêmeas por macho, durante 14 dias, a fim de se realizar o acasalamento. Após este tempo, as fêmeas foram separadas para gestar e parir os filhotes. Estes foram divididos em 4 grupos a depender da dieta materna e da indução da asma. O grupo controle dieta padrão (SD_o– *Standard diet offspring*) foi gestado por fêmeas SD e não sofreu nenhuma outra intervenção. O grupo (HFD_o– *high-fat diet offspring*) foi gerado por fêmeas HFD e não sofreu nenhuma outra intervenção. O grupo AP (alergia pulmonar) é proveniente de uma fêmea SD e sofreu a indução da asma, e por fim o grupo HFD_o/AP foi gestado por uma fêmea HFD e passou pelo protocolo de indução da asma (Tabela 3).

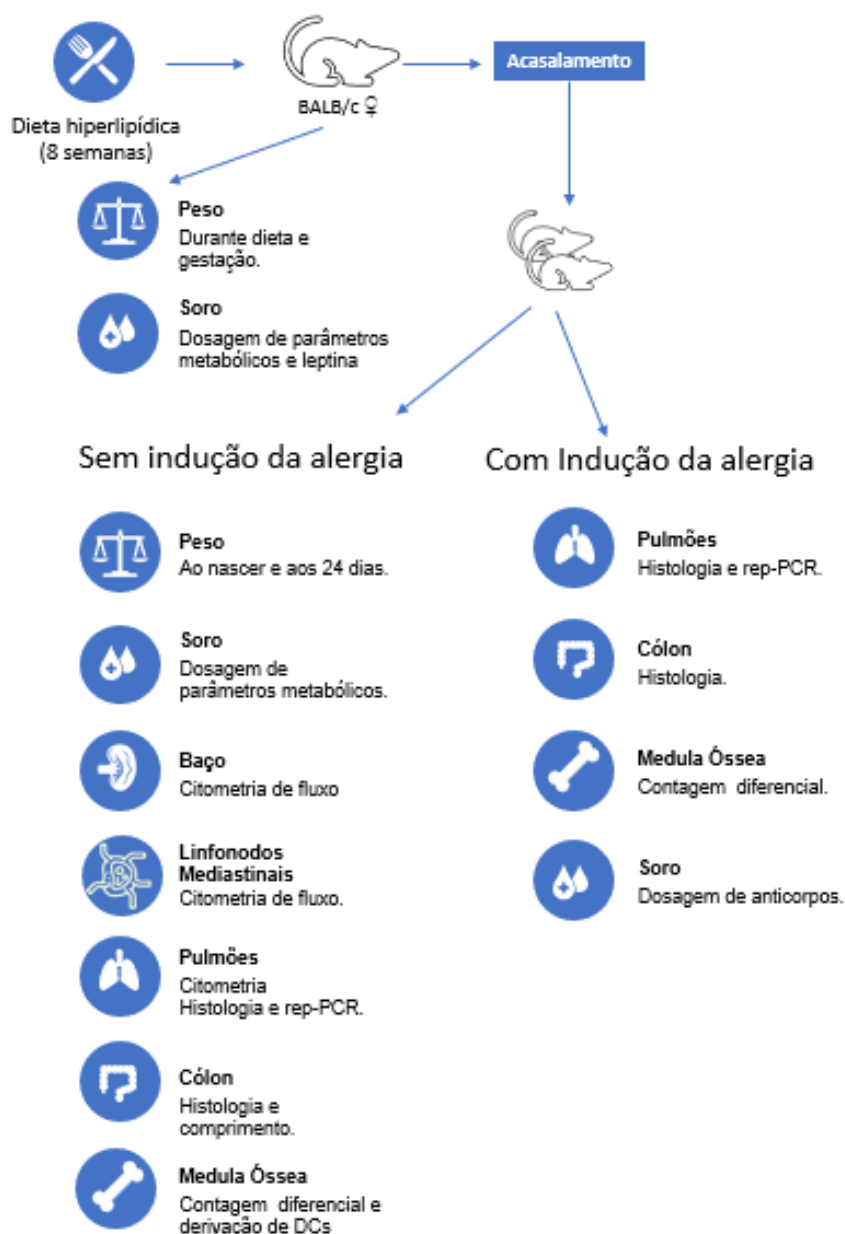
Tabela 3– Divisão dos grupos experimentais da prole

| Grupos | Identificação | Genitora alimentada com dieta hiperlipídica | Indução do modelo de alergia pulmonar |
|---------------------------|--|--|--|
| SD₀ | Dieta padrão | - | - |
| HFD₀ | Dieta hiperlipídica | + | - |
| AP | Alergia pulmonar | - | + |
| HFD₀/AP | Dieta hiperlipídica e alergia pulmonar | + | + |

3.3 INDUÇÃO DO MODELO DE ALERGIA PULMONAR EXPERIMENTAL

A indução do modelo de alergia pulmonar foi realizada nos grupos AP e HFD₀/AP através de duas sensibilizações. A primeira, ocorreu no 7º dia de vida e a segunda no 14º dia de vida, os animais foram imunizados com injeção intraperitoneal contendo 1,5µg de OVA (Grade V, Sigma-Aldrich Corp, EUA) diluídos em uma suspensão contendo 1mg de hidróxido de alumínio (Sigma-Aldrich Corp, EUA). Posteriormente, no 21º, 22º e 23º dia de vida, os animais foram desafiados intranasalmente com OVA 1% em tampão fosfato salino (PBS 1x) sob sedação com o anestésico inalatório isoflurano. Todos os animais foram eutanasiados em 24 horas após o último desafio com a OVA no 24º dia de vida. A figura 7 mostra o delineamento experimental.

A– Delineamento Experimental



B

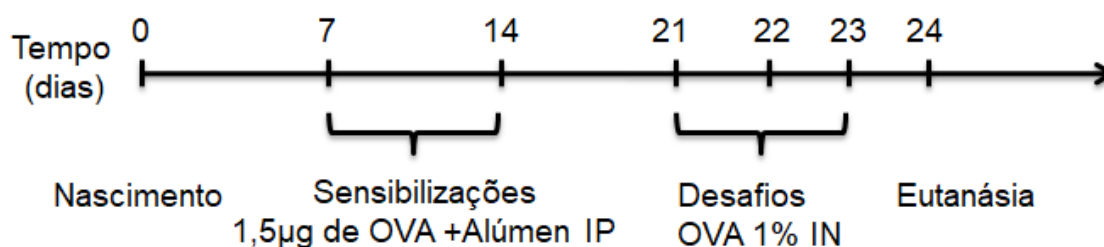


Figura 7– Delineamento experimental do protocolo experimental desenvolvido em camundongos BALB/c. Análises realizadas para cada grupo e órgão (A). Protocolo de indução de asma (B). Sensibilizações foram feitas no 7º e 14º dias de vida com 1,5µg de OVA diluída em suspensão contendo 1mg de alúmen (hidróxido de alumínio) desafios foram feitos em três dias consecutivos a partir do 21º dia com OVA à 1% diluída em tampão fosfato salino. Após 24h procedeu-se com a eutanásia no 24º dia de vida dos animais. OVA – ovalbumina; IP – administração intraperitoneal; IN– administração intranasal.

3.4 AVALIAÇÃO DA PORCENTAGEM DE GANHO DE MASSA CORPORAL

Para a avaliação do efeito do consumo das dietas, o peso das matrizes foi avaliado em balança semi-analítica (Micronal B6000®, Brasil) semanalmente, nos mesmos dias e horários, durante todo o protocolo de indução da obesidade, incluindo o tempo gestacional, para obtenção da porcentagem de ganho de massa.

3.5 OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO

As amostras biológicas foram coletadas no 24° dia, 24 horas após o último desafio com a OVA. A eutanásia dos animais foi feita através de dose letal de solução de ketamina (90 mg/Kg, Syntec, Brasil) e xilasina (10 mg/kg, Agener União, Brasil) por via intraperitoneal. As amostras foram devidamente identificadas, armazenadas individualmente, e mantidas sob refrigeração em freezer a -80 °C até serem processadas e analisadas.

3.5.1 Coleta do soro

Após a anestesia, o sangue foi coletado a partir de punção cardíaca. As amostras foram centrifugadas a 1500 rotações por minuto (rpm), por dez minutos à temperatura ambiente (Centrífuga 5410, Eppendorf, Alemanha) para obtenção do soro, armazenado a -80 °C, para posterior análise de parâmetros metabólicos, colesterol total e frações, triglicérides e glicemia, além de níveis séricos de anticorpos e de leptina.

3.5.2 Coleta do Pulmão

Para coleta do pulmão foi realizado o rompimento do diafragma, a caixa torácica foi exposta e a traqueia foi seccionada em sua porção distal, separando os lóbulos pulmonares da carcaça do animal. A massa pulmonar total foi mensurada em balança analítica para os animais dos grupos SD₀ e HFD₀. Para os animais selecionados para análise de microbiota por PCR foram seguidos procedimentos estéreis. Além disso, o lobo pulmonar esquerdo foi utilizado para análise histológica e os demais lobos para citometria de fluxo.

3.5.3 Coleta da medula óssea

A medula óssea foi utilizada para contagem de granulócitos na medula óssea e diferenciação de células dendríticas. Para isso os dois ossos do fêmur dos animais foram retirados utilizando material cirúrgico (pinças e tesouras). O canal medular foi lavado com 1mL de solução fisiológica injetável resfriada (Equiplex®, Goiânia –GO), utilizando seringa de 5mL e agulha de 22G. Para as células destinadas à diferenciação e cultura foram seguidos procedimentos estéreis.

3.5.4 Coleta do intestino

O cólon do animal foi identificado e foi feito um corte transversal na sua região proximal e próximo ao reto, a fim de mensurar seu comprimento, com auxílio de paquímetro. Posteriormente, foi seccionada sua porção distal, este foi lavado com PBS 1x para retirar do bolo fecal, e em seguida imerso em paraformaldeído 4% tamponado por 24h, e transferido para etanol 70% até sua inclusão em parafina. Após os procedimentos rotineiros de inclusão em parafina, foram realizados cortes semi-seriados de 4µm de espessura.

3.6 DOSAGEM DE GLICEMIA, TRIGLICÉRIDES, COLESTEROL TOTAL E FRAÇÕES

As determinações da glicemia, triglicerídeos, colesterol total, colesterol-HDL e colesterol-LDL foram realizadas utilizando o analisador BT 3000 plus (Wiener Lab Group) com reagentes da LabTest®. Para a dosagem de triglicerídeos, glicose e colesterol foram utilizados método enzimático colorimétrico. Na dosagem do colesterol-HDL foi utilizado um método colorimétrico sem precipitação. Os níveis de colesterol-LDL foram calculados por aplicação da equação de Friedwald (1):

$$Colesterol\ LDL = (Colesterol\ total - Colesterol\ HDL) - \left(\frac{Triglicérides}{5}\right)(1)$$

3.7 DOSAGEM DOS NÍVEIS SÉRICOS DE LEPTINA

As análises de leptina no soro foram realizadas utilizando o método de ELISA por meio de kit comercial (PeproTech, EUA) seguindo as instruções dos fabricantes. Foram utilizadas placas MaxSorp High-binding® (Nunc –Thermo Fisher, EUA) específicas para Elisa do tipo “sanduíche”. As placas foram sensibilizadas com os

anticorpos de captura e incubadas por 18h a 4°C. Em seguidas lavadas 4 vezes com tampão fosfato salino adicionado de 0,05% de Tween 20 (PBST) e bloqueadas com albumina sérica bovina a 2%, durante 1h, após mais um ciclo de lavagens as amostras foram adicionadas e incubadas por 24 horas a 4°C. No dia seguinte, após mais um ciclo de lavagem, os anticorpos de detecção acrescido de peroxidase foram adicionados e incubados por 2h a temperatura ambiente (TA). Em seguida as placas foram lavadas novamente e a reação foi revelada utilizando como substrato 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazol-6-sulfonato (ABTS, Pepro Tech, EUA). A reação foi parada com ácido sulfúrico a 2 N, e a leitura realizada em leitor de microplacas (SpectraMax 190, Molecular Devices, EUA) a 405nm. As dosagens foram expressas em picogramas por mililitro, calculadas a partir de curva de calibração.

3.8 DOSAGEM SÉRICA DE ANTICORPOS ANTI-OVA

A avaliação dos níveis de IgM, IgE, IgG1 e IgG2a específica anti-OVA foi analisada pela técnica de ensaio de imunoabsorção enzimático (ELISA). A sensibilização das placas foi feita com solução de OVA 1% (Grade V; Sigma-Aldrich Corp, St Louis, MO, USA) diluída em tampão carbonato (100µL/poço), as placas foram incubadas a 4°C por 18h e posteriormente lavadas 4 vezes com PBST. Após bloqueio com 2% de albumina sérica bovina diluída em PBST (200µL/poço), a placa foi lavada 4 vezes e as amostras de soro foram adicionadas, na concentração de 1:20 para dosagem de IgE, 1:8000 para IgG1 e 1:800 para IgG2a e IgM seguindo-se uma incubação por 24h. Seguidamente, a placa foi novamente lavada e os anticorpos anti-IgE, IgG1, e IgG2a na diluição de 1:500 e anti-IgM na diluição de 1:2000 (Pharmingen™, Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) foram adicionados. A estreptavidina marcada com peroxidase (Pharmingen™, Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) foi adicionada após incubação (1h a temperatura ambiente) e lavagem da placa. A reação foi revelada pela adição de substrato contendo ácido cítrico 0,1M, citrato de sódio 0,1M, água destilada, cromógeno OPD e peróxido de hidrogênio a 30%. A reação foi parada com ácido sulfúrico a 2 N e a leitura foi feita em leitor de microplacas a 492nm (SpectraMax® 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). A detecção do anticorpo específico foi expressa como densidade ótica (DO).

3.9 CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE GRANULÓCITOS NA MEDULA ÓSSEA

Após a coleta da medula óssea, a suspensão celular foi diluída na proporção de 1:10 e homogeneizada em tubo cônico. Esta suspensão celular foi utilizada para contagem total de células em câmara de Neubauer utilizando o corante de viabilidade Azul de Trypan. Em seguida foi feita a contagem diferencial de leucócitos. Para tal, confeccionou-se um esfregaço utilizando 100µL do sedimento do BAL, contendo aproximadamente 1×10^6 células, centrifugadas a 20g por 5 minutos à T.A. (FANEM 248, São Paulo, Brasil). Posteriormente, as lâminas foram coradas com Panótico rápido (Laborclin Ltda, Pinhais, Brasil). E de acordo com critérios morfológicos e com a coloração diferenciada apresentada pelos grânulos eosinofílicos, foram contadas 300 células no total entre células mononucleadas, neutrófilos e eosinófilos maduros, com o auxílio de microscópio ótico Zeiss (Hallbergmoos, Alemanha) em aumento de 1000X.

3.10 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO PULMÃO E CÓLON

3.10.1 Número de eosinófilos no tecido pulmonar e do colônico

Para avaliação histológica, o lobo pulmonar direito e o cólon foram fixados durante 24h em solução de paraformaldeído tamponado a 4% e após esse tempo foi acondicionado em álcool 70%, até a inclusão em parafina. Após os procedimentos rotineiros de inclusão em parafina, foram realizados cortes semi-seriados de 4µm de espessura.

Para realização da contagem de eosinófilos nos tecidos pulmonar e colônico, após seções rotineiras de desparafinação e desidratação, os cortes foram corados com o corante Direct Red 80-Sirius Red (Sigma Aldrich), por uma hora, contra corados com hematoxilina. Foram analisados 20 campos, em uma área delimitada por retículo Olympus (10 mm/10) na região peribroncovascular, em aumento de 1000X, a contagem foi expressa por número de eosinófilos por $100\mu\text{m}^2$.

3.10.2 Número de mastócitos no tecido pulmonar

A contagem de mastócitos no tecido pulmonar foi realizada através da coloração por azul de toluidina (Sigma Aldrich) após etapas rotineiras de

desparafinação e hidratação, durante três minutos. Foi expressa por média da contagem do número de mastócitos por $100\mu\text{m}^2$ em todo o corte pulmonar sob aumento de 400X.

3.11 IMUNOFENOTIPAGEM DAS CÉLULAS IMUNES NO PULMÃO E BAÇO E LINFONODOS

Para a análise por citometria de fluxo, os pulmões, baços e linfonodos mediastinais dos animais foram coletados e acondicionados em 10mL de meio de cultura RPMI até o processamento. Foi feita a digestão dos pulmões em solução de colagenase a 0,75mg/mL por 20 minutos sob agitação à 37°C. Em seguida foram macerados em tampão de extração (Meio de cultura RPMI com 5% de Soro Fetal Bovino e 0,075 g de EDTA – etileno diamina tetra acetato dissódico) em *cellstrainer* (70 μm). Posteriormente, os macerados foram centrifugados a 1500rpm, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspendido em 1 mL de Tampão PBS 1x com 2% de Soro Fetal Bovino.

Uma alíquota das células foi contada com Azul de Trypan (1:20) e foram plaqueadas 1×10^6 de células por poço em placa de fundo U. Para bloquear possíveis ligações inespecíficas de anticorpos marcados a receptores para porção Fc de anticorpos, as células foram incubadas com solução de bloqueio (1:150 de soro de camundongo em tampão PBS 1x com 2% de Soro Fetal Bovino. Após esse processo, as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm, por 10 minutos, a 4 °C. Posteriormente foi realizada incubação com anticorpos descritos na tabela 4. Para proteínas intracelulares foi ainda realizada uma etapa de permeabilização com Triton® X-100 (Sigma Aldrich) 0,1% em PBS e uma nova etapa de marcação intracelular. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo FACS-CANTO II Becton&Dickson (EUA). Os resultados foram expressos em mediana da intensidade de fluorescência (MFI do inglês –*median of fluorescence intensity*).

Tabela 4– Especificações dos marcadores utilizados na Citometria de Fluxo

| Marcador | Diluição | Fluorocromo | Fabricante |
|----------------|----------|-------------|------------|
| MHCII | 1:200 | BB 515 | BD |
| CD86 | 1:150 | APC | |
| PDL1 | 1:150 | PE | |
| CD80 | 1:150 | APC | |
| GATA-3 | 1:150 | Alexa647 | |
| ROR γ T | 1:150 | BV421 | |

3.12 CULTURA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA

Para derivação de células dendríticas da medula óssea, os lavados medulares foram centrifugados a 1500rpm, por 5 minutos, a 4 °C e o sedimento foi ressuspensionado em 1mL de meio de cultura RPMI suplementado (10% de Soro Fetal Bovino, 1% de antibiótico, 1% de aminoácido e os fatores de crescimento celular GM-CSF (do inglês – *Granulocyte-macrophage colony-stimulating*) factor na concentração de 20ng/mL e IL-4 na concentração de 10ng/mL).

Uma alíquota foi retirada para contagem de células diluídas em Azul de Trypan (1:50) em Câmara de Neubauer a fim de verificar a viabilidade celular. Logo após, as células foram plaqueadas na concentração de 5×10^6 em placas de seis poços e incubadas em estufa com 5% de gás carbônico a 37°C por quatro dias em meio RPMI suplementado conforme descrito acima. No 4º dia, as amostras foram coletadas, transferidas para um tubo cônico e centrifugadas a 1000rpm, por 10 minutos, 10°C, posteriormente, foi descartado o sobrenadante e o sedimento foi ressuspensionado em meio de cultura RPMI suplementado. As células foram novamente plaqueadas em placa de seis poços e novamente colocadas na estufa com 5% de CO₂ a 37 °C por mais três dias.

No 7º dia, foram adicionados mais 2mL de meio de cultura RPMI suplementado, as células foram transferidas para tubo cônico, centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos, 10°C e o sedimento foi ressuspensionado em meio não suplementado com os recombinantes e uma alíquota foi novamente usada para contagem em Câmara de Neubauer, com posterior plaqueamento das células na concentração de

5×10^4 células/poço em placa de fundo U, a fim de se calcular o rendimento da diferenciação através de imunofenotipagem (MHC^{high}, CD80⁺).

Posteriormente, no 10º dia de cultura foram adicionados às células LPS como estímulo na concentração de 1 µg/mL e foram novamente incubadas por um período de 24h. No dia seguinte, a suspensão de DCs foi centrifugada a 1500rpm, por 5 minutos a 4°C, e posteriormente, foram marcadas com os anticorpos para citometria de fluxo.

3.13 EXTRAÇÃO DE DNA BACTERIANO DO TECIDO PULMONAR

Para extração de DNA bacteriano, as amostras de pulmão de aproximadamente 800mg de pulmão em cabine de fluxo laminar. Após a coleta, as amostras foram maceradas em solução de TE (Tris-EDTA: Tris 10nM e EDTA 1nM pH 8,0). Posteriormente, o macerado foi centrifugado a 3000rpm por 5 minutos para que as fibras teciduais decantassem e as células bacterianas ficassem em suspensão. Foi coletado o sobrenadante, e adicionou-se 500µL de solução de lise (Sacarose 25% em TE, EDTA 0,5M, tris 1M, lisozima e H₂O). Nessa etapa, as amostras ficaram em banho-maria 37°C por 60 minutos. Posteriormente, adicionou-se 50 µL de SDS 20% (Duodecil sulfato de sódio diluído em TE) com incubação à TA por 30 minutos.

A extração do DNA se deu a partir do protocolo de fenol-clorofórmio. Adicionou-se 500 µL de fenol saturado em TRIS HCl (2-Amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol) (pH 8,0) às amostras, após agitação, adicionou-se uma mistura de clorofórmio e álcool isoamílico a 29:1 seguida de nova agitação. Em seguida os tubos foram centrifugados por 14000 rpm durante 5 minutos, a 4°C e retirou-se a fase aquosa sendo passado para um novo microtubo de 1,5mL e descartou-se a parte com o fenol. Repetiu-se este processo mais uma vez. Em seguida adicionou-se 50µL de acetato de sódio 5M diluído em água ultrapura, 1,2 mL de etanol gelado e deixar 18h a -20°C. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 14000rpm por 30 minutos, desprezou-se o sobrenadante, adicionou-se 100µL de etanol 70%, seguido de centrifugação 14000rpm por 5 minutos, retirou-se o excesso de álcool e realizou-se a secagem em temperatura ambiente. Posteriormente, o DNA foi ressuspendido em 50 µL de solução de TE, quantificado em aparelho Nanodrop (Lite Spectrophotometer –Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) e armazenado em freezer -20°C.

3.14 ANÁLISE DA MICROBIOTA PULMONAR

A microbiota pulmonar foi analisada pelo ensaio da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando sequências palindrômicas extragênicas repetidas (rep-PCR). Para a realização da PCR foi utilizada 20ng do DNA molde, 1x Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA), 0,8 μ M do primer e água ultrapura para PCR (Promega, Madison, WI, EUA) em quantidade suficiente para completar o volume de 25 μ L. A amplificação foi realizada termociclador automatizado (Biometra T1 Thermal Cycler, Gttingen, Alemanha) programado nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 50 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 2,5 minutos; extensão final a 72 °C por 10 minutos. Foi utilizada a seguinte sequência de primer descrita por de Paula e colaboradores (2018): (GTG)₅ 5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3'.

Os amplicons gerados foram separados por gel de poliacrilamida a 8% com TRIS-borato-EDTA a 1x. Com o padrão molécula 100pb DNA ladder (Promega, Madison, WI, EUA). A eletroforese foi realizada a 70 volts, 400 miliampères, 120 watts por 10h. E em seguida corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador de luz ultravioleta (GE Healthcare, Reino Unido). Para as análises de fingerprints de fragmentos de DNA, observaram-se os padrões de bandeamento por inspeção visual, buscando bandas de amplificação presentes ou ausentes.

3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPadPrism 5.0 (Graphpad Software, EUA). As variáveis numéricas foram avaliadas nos diferentes grupos pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov para distribuição gaussiana dos dados. Posteriormente, para a comparação de médias foi utilizado o Teste T de Student para os dados paramétricos e o teste de Mann-Whitney para dados não paramétricos. O nível de significância admitido para os testes foi de $p \leq 0,05$. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Para análise de *fingerprint*, obtidas na análise de microbiota, utilizou-se o programa XLSTAT 2022.3.1.1340 (Addinsoft, França), avaliadas pelo método de *Agglomerative hierarchical clustering* (AHC), sendo as amostras agrupadas por *Unweighted pair-group average* (UPGA), empregando-se o coeficiente de Dice e um *bootstrap* de 1000x para análise dos *clusters*.

4 RESULTADOS

4.1 DIETA HIPERLIPÍDICA ELEVOU NÍVEIS DE LEPTINA E COLESTEROL LDL EM FÊMEAS BALB/C

Durante as 8 semanas de dieta, a porcentagem de ganho de peso das fêmeas foi registrada, porém, não foi possível observar uma diferença significativa no ganho de peso entre matrizes alimentadas com dieta padrão e com dieta hiperlipídica (Figura 8A). Durante a gestação foi possível observar uma tendência a uma maior massa corporal das matrizes HFD, porém sem diferença estatística (Figura 8B).

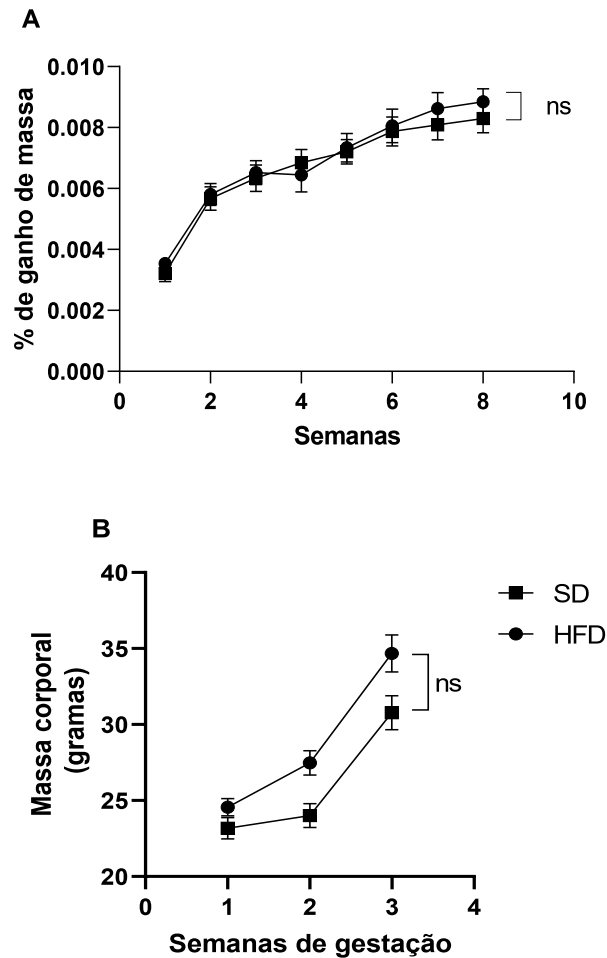


Figura 8– Efeito da dieta hiperlipídica na massa corporal das matrizes. Curva de porcentagem de ganho de massa corporal (**A**); Massa corporal durante a gestação (**B**). SD: grupo matrizes dieta padrão; HFD matrizes dieta hiperlipídica. Resultados expressos em média \pm desvio padrão da média. ns $p > 0,05$; * $p < 0,049$; ** $p < 0,004$; *** $p < 0,0004$; **** $p < 0,0001$, $n = 8$.

A dosagem de leptina sérica demonstrou uma concentração expressivamente maior desta adipocina nas matrizes HFD, comparadas às matrizes alimentadas com dieta padrão (SD) (Figura 9A). Apesar da maior dosagem de leptina não foram observadas alterações significativas nas concentrações séricas de glicose (Figura 9B) e colesterol HDL (Figura 9C), contudo, houve um significativo aumento de colesterol LDL (Figura 9D) no grupo HFD em relação ao grupo SD.

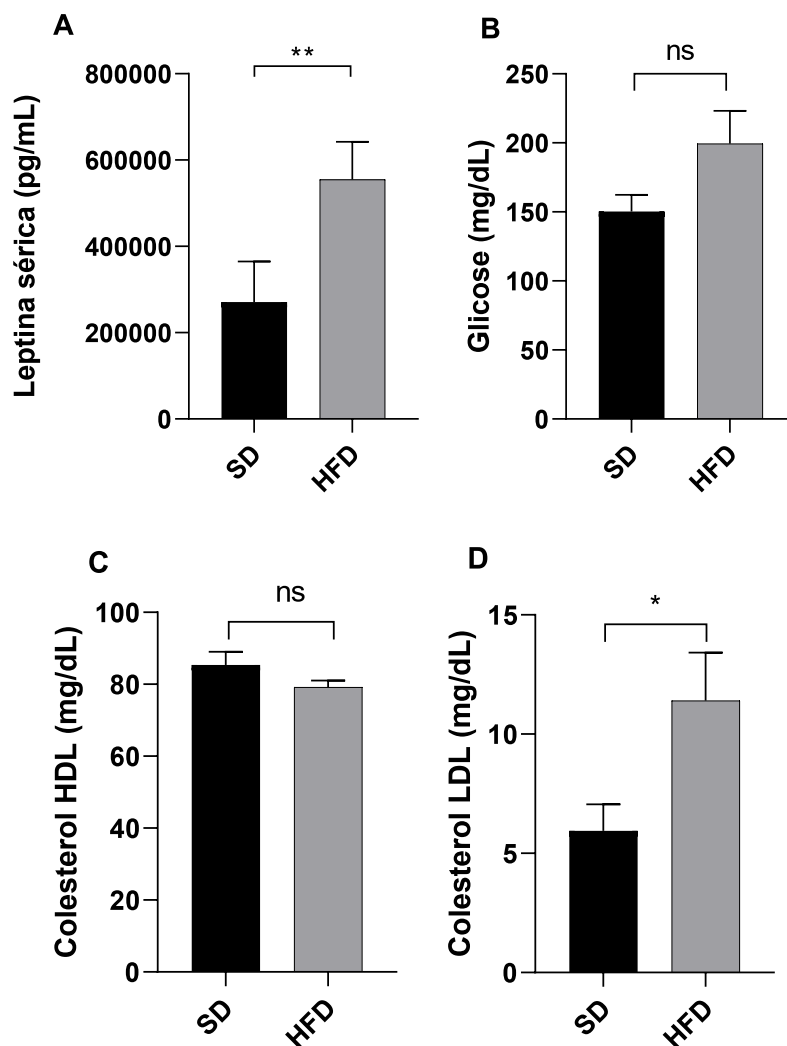


Figura 9– Efeitos da dieta hiperlipídica sobre o metabolismo das matrizes. Dosagem sérica de leptina das matrizes (pg/mL) (A); dosagem sérica de glicose (mg/dL) (B); dosagem sérica de colesterol HDL (mg/dL) (C); Dosagem sérica de colesterol LDL (mg/dL) (D). SD: grupo matrizes dieta padrão; HFD matrizes dieta hiperlipídica. Resultados expressos em média \pm Desvio padrão da média. ns $p > 0,05$; * $p < 0,049$; ** $p < 0,004$; *** $p < 0,0004$; **** $p < 0,0001$, n=8.

4.2 DIETA MATERNA ALTEROU PARÂMETROS MÉTRICOS E BIOQUÍMICOS DA PROLE

Uma vez que neste protocolo não se observou um aumento de massa significativo entre as matrizes do grupo alimentado com dieta hiperlipídica, voltou-se a atenção para a média de massa corporal da prole. E observou-se que a prole de matrizes alimentadas com a dieta hiperlipídica apresentaram maior massa corporal ao nascer (figura 10A), e aos 24 dias de vida (figura 10B), quando comparados a prole de fêmeas alimentadas com dieta padrão.

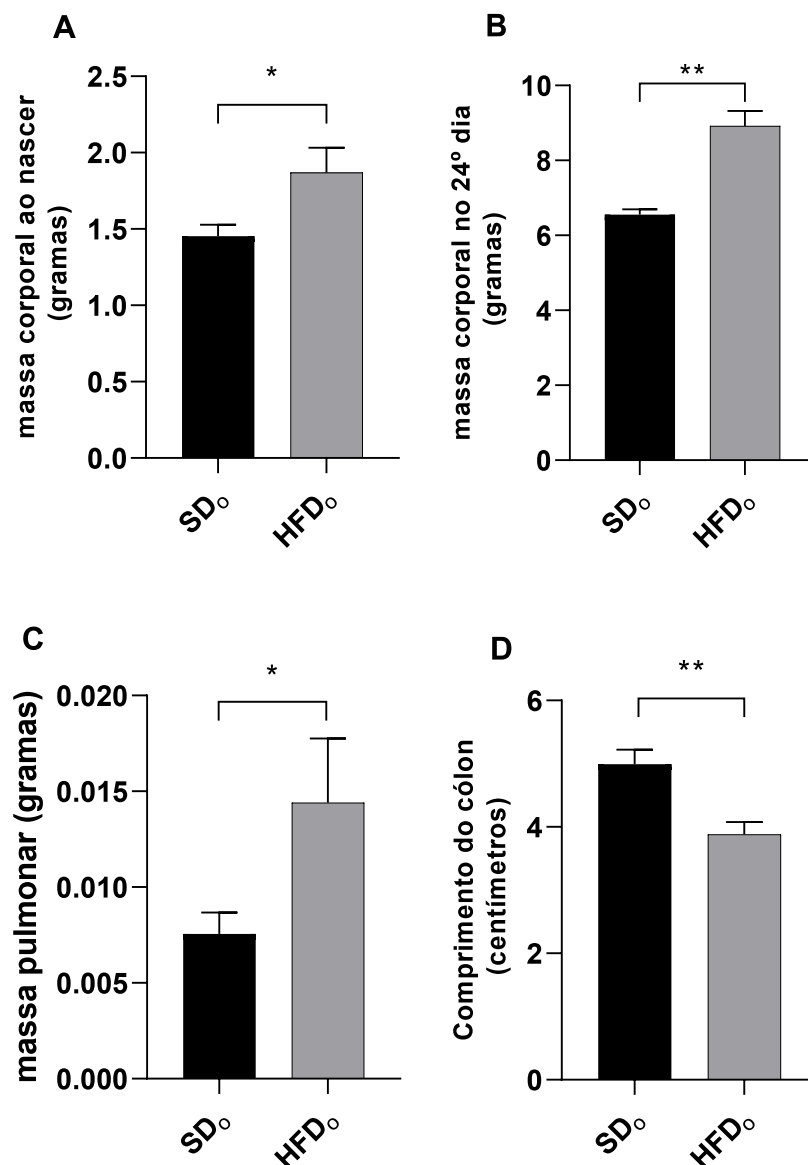


Figura 10– Parâmetros métricos da prole. Média de massa ao nascer (g) (A); massa corporal aos 24 dias de vida (g) (B); massa do tecido pulmonar (g) (C); comprimento do cólon (cm) (D). Resultados expressos em média \pm desvio padrão da média. SD_o prole de fêmeas alimentadas com dieta padrão. HFD_o prole de fêmeas alimentadas com dieta hiperlipídica. ns $p > 0,05$; * $p < 0,049$; ** $p < 0,004$; *** $p < 0,0004$; **** $p < 0,0001$, $n = 11$.

Observou-se também uma maior massa do tecido pulmonar, ajustado pelo peso, dos camundongos HFD_o quando comparados com o grupo SD_o (figura 10C), e curiosamente a prole de fêmeas HFD apresentaram um comprimento do cólon significativamente reduzido (figura 10D).

Assim como nas matrizes, dosaram-se parâmetros bioquímicos no soro da prole a fim de se determinar impactos da dieta sobre o metabolismo da prole. Observou-se que as concentrações de glicose estavam significativamente aumentadas na prole de mães alimentadas com dieta hiperlipídica (HFD_o), quando comparada à prole de matrizes alimentadas com dieta padrão (SD_o) (Figura 11A). O colesterol HDL se mostrou acentuadamente reduzido no grupo HFD_o (Figura 11B) enquanto não se observou diferença para o colesterol LDL (Figura 11C).

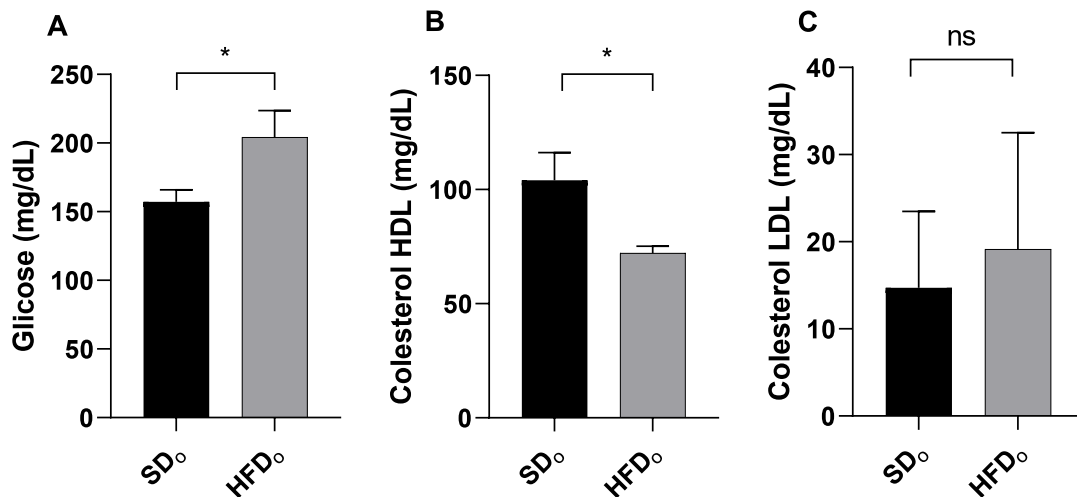


Figura 11– Parâmetros bioquímicos da prole. Glicose sérica (mg/dL) (A); Colesterol HDL (mg/dL) (B). Colesterol LDL (mg/dL) (C). Resultados expressos em média + desvio padrão da média. SD_o prole de fêmeas alimentadas com dieta padrão. HFD_o prole de fêmeas alimentadas com dieta hiperlipídica. ns $p > 0,05$; * $p < 0,049$; ** $p < 0,004$; *** $p < 0,0004$; **** $p < 0,0001$, n=7.

4.3 DIETA HIPERLIPÍDICA MATERNA REDUZIU ATIVAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DIFERENCIADAS EX VIVO

Dados apontam que a obesidade altera as funções de progenitores de células dendríticas, o que pode alterar o desenvolvimento das respostas imunes (WILSON *et al.*, 2015). Por isso, foi avaliado se obesidade materna poderia danificar as funções efetoras dessas células. Para isso, DCs derivadas da medula óssea foram estimuladas com LPS e avaliadas quanto a expressão de moléculas coestimulatórias (CD80) e inibitórias (PDL1). A figura 12 demonstra a estratégia de *gating* e os histogramas representativos para a expressão dos marcadores de ativação/regulação

na população selecionada. Observou-se uma menor expressão de CD80 nas DCs provenientes do grupo HFD₀, estimuladas com LPS quando comparadas com os controles (Figura 13A). Interessantemente, observou-se uma maior expressão de PDL1 em camundongos HFD₀ não estimulados, quando comparados ao controle (Figura 13B).

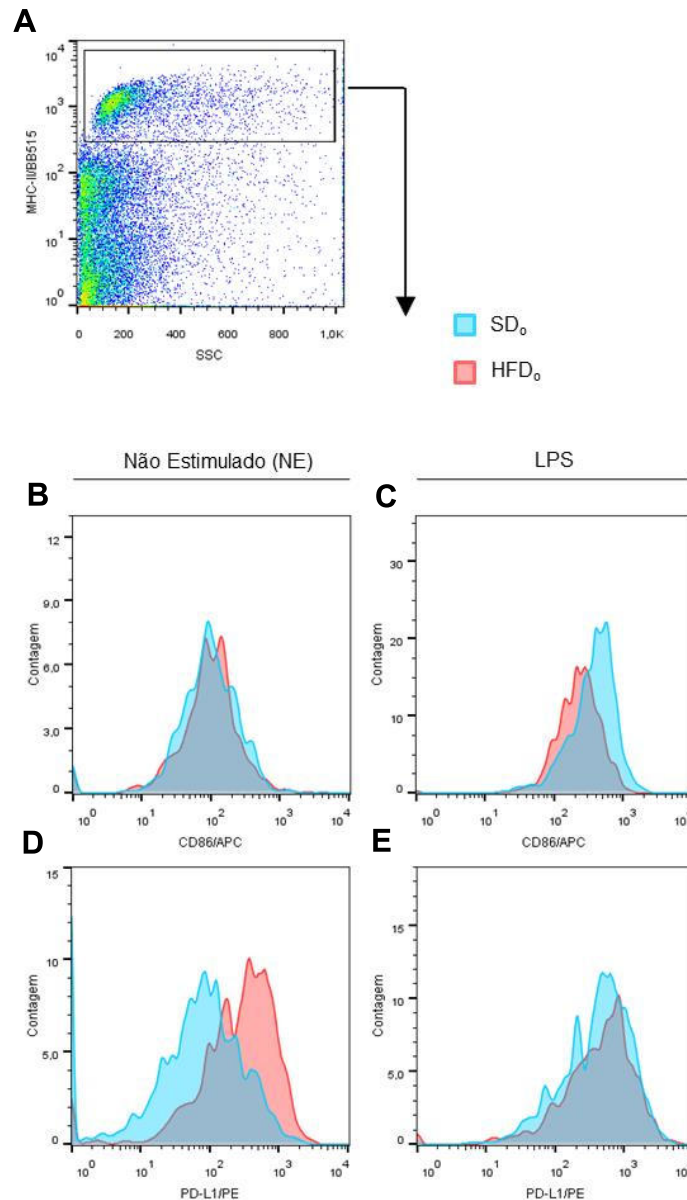


Figura 12– Avaliação da expressão de marcadores de inibição e ativação em células MHC^{hi}. Estratégia de gating demonstrando separação por nível de expressão de MHCII (A); expressão de CD80 em células não estimuladas (B); expressão de CD80 em células estimuladas com LPS (C); expressão de PDL1 em células não estimuladas (D); expressão de PDL1 em células estimuladas com LPS (E). Em azul, células provenientes da prole de animais tratados com dieta padrão, em vermelho células provenientes da prole de animais tratados com dieta hiperlipídica.

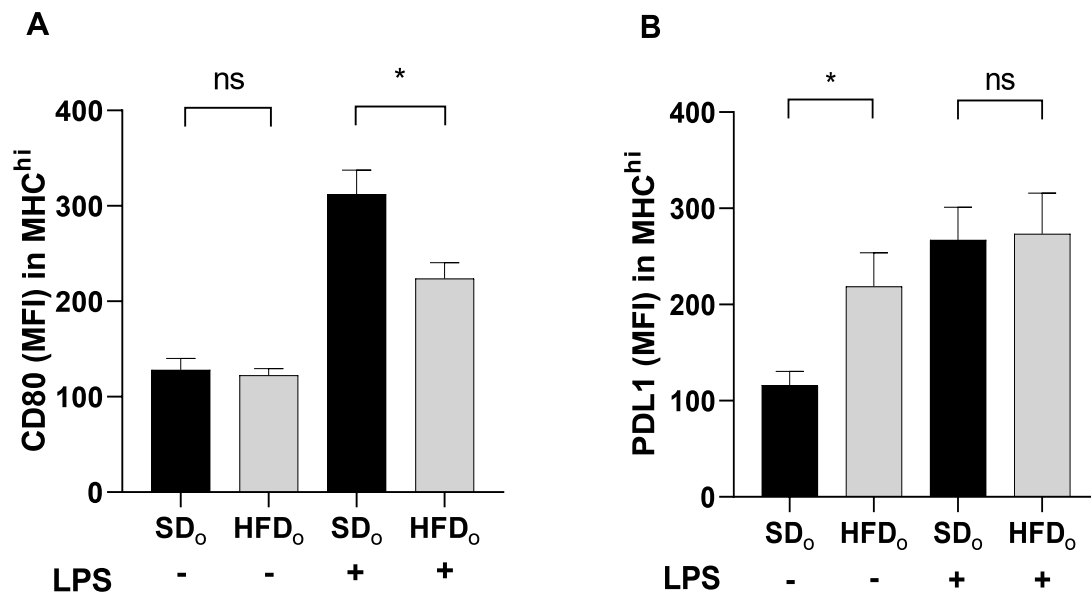


Figura 13– Perfil de ativação de células dendríticas derivadas da medula óssea. Expressão de CD80 em células MHC^{hi} (A); expressão de PDL1 em células MHC^{hi} (B). Resultados expressos em mediana de intensidade de fluorescência + desvio padrão da média. SD_o prole de fêmeas alimentadas com dieta padrão. HFD_o prole de fêmeas alimentadas com dieta hiperlipídica. ns $p > 0,05$; * $p < 0,049$; ** $p < 0,004$; *** $p < 0,0004$; **** $p < 0,0001$, $n = 12$.

4.4 DIETA MATERNA PROMOVEU ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS COESTIMULATÓRIAS NO BAÇO E PULMÃO.

A fim de avaliar o efeito da dieta materna ao nível pulmonar e de órgãos linfoides secundários como o baço, foi avaliada a expressão geral da molécula coestimulatórias (CD86) e inibitória (PDL-1). Observou-se uma menor quantidade de leucócitos totais no baço da prole de matrizes obesas (HFD_o) quando comparado ao grupo SD_o (Figura 14A). Quantificou-se também a expressão de moléculas coestimulatórias na população geral, e observou-se um expressivo aumento de CD86 nas células do baço do grupo HFD_o, quando comparado com o controle (Figura 14B). Curiosamente o mesmo foi observado em relação ao receptor PDL1, no qual o grupo HFD_o apresentou significativa maior expressão (Figura 14C).

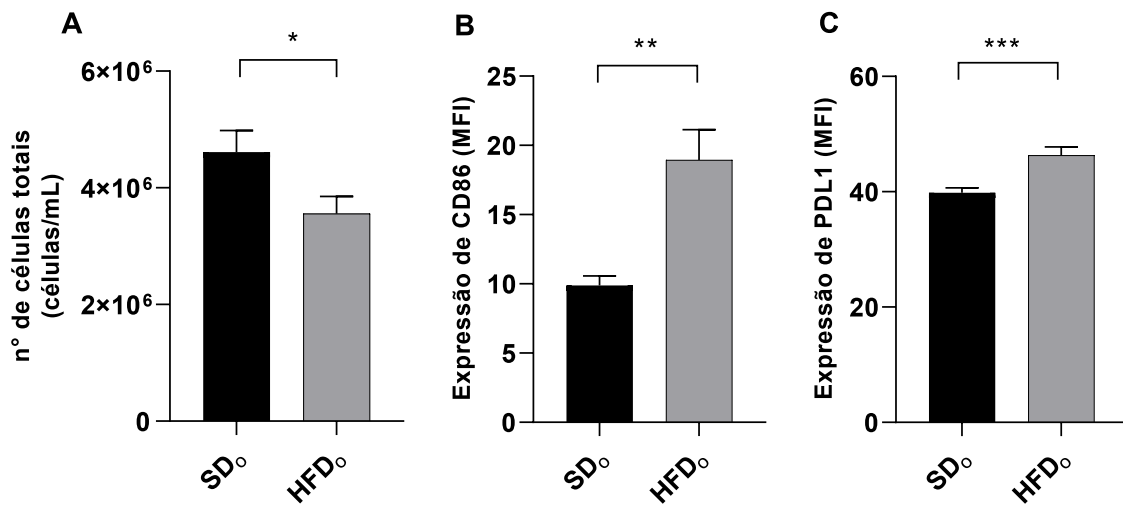


Figura 14– Marcadores imunológicos no baço. Contagem de leucócitos totais no tecido esplênico (A); Expressão de CD86 em células totais do baço (B); expressão de PDL1 no baço (C). Resultados expressos em média + SEM e mediana da intensidade de fluorescência + desvio padrão da média. SD_o prole de fêmeas alimentadas com dieta padrão. HFD_o prole de fêmeas alimentadas com dieta hiperlipídica. ns $p > 0,05$; * $p < 0,049$; ** $p < 0,004$; *** $p < 0,0004$; **** $p < 0,0001$, n=11.

Foram analisados também linfonodos mediastinais, embora o número de células totais nos linfonodos da prole de matrizes obesas fosse reduzido, não houve diferença significativa na expressão de CD86 ou de PDL1, quando comparado ao grupo SD (Figura 15).

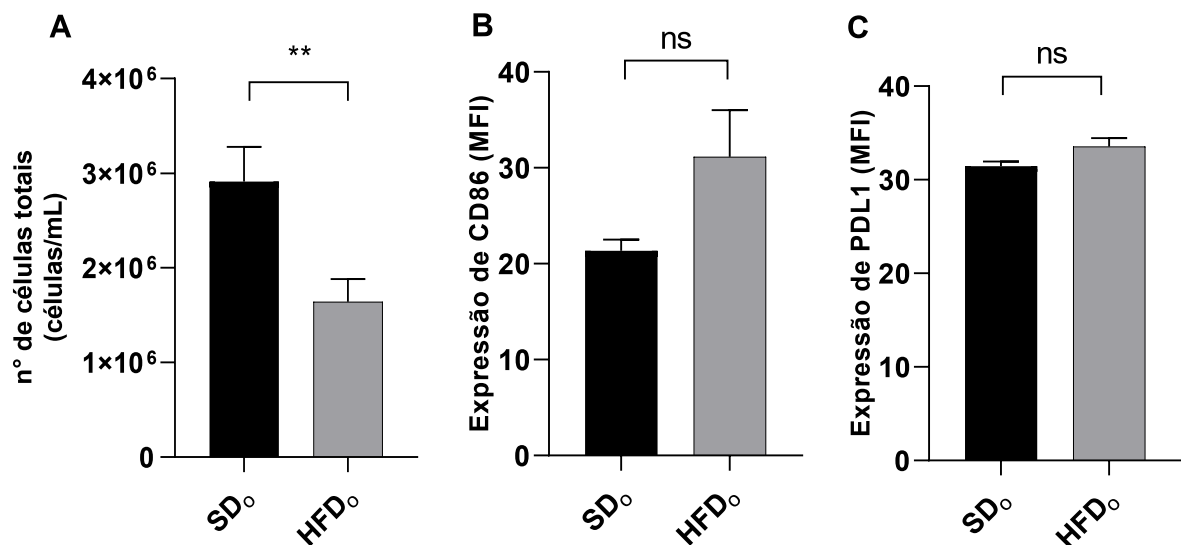


Figura 15– Marcadores imunológicos nos linfonodos mediastinais. Contagem de leucócitos totais no tecido linfóide (A); expressão de CD86 em células totais dos linfonodos (B); expressão de PDL1 nos linfonodos (C). Resultados expressos em média + desvio padrão da média e mediana da intensidade de fluorescência + SEM. SD_o prole de fêmeas alimentadas com dieta padrão. HFD_o prole de fêmeas alimentadas com dieta hiperlipídica. ns $p > 0,05$; * $p < 0,049$; ** $p < 0,004$; *** $p < 0,0004$; **** $p < 0,0001$, n = 11.

Um padrão similar ao do baço foi observado também no pulmão, com uma maior contagem de leucócitos totais no grupo HFD_o (Figura 16A), uma maior expressão de CD86 e PDL1 na população geral do grupo HFD_o quando comparado com o grupo SD_o (Figuras 16B e C).

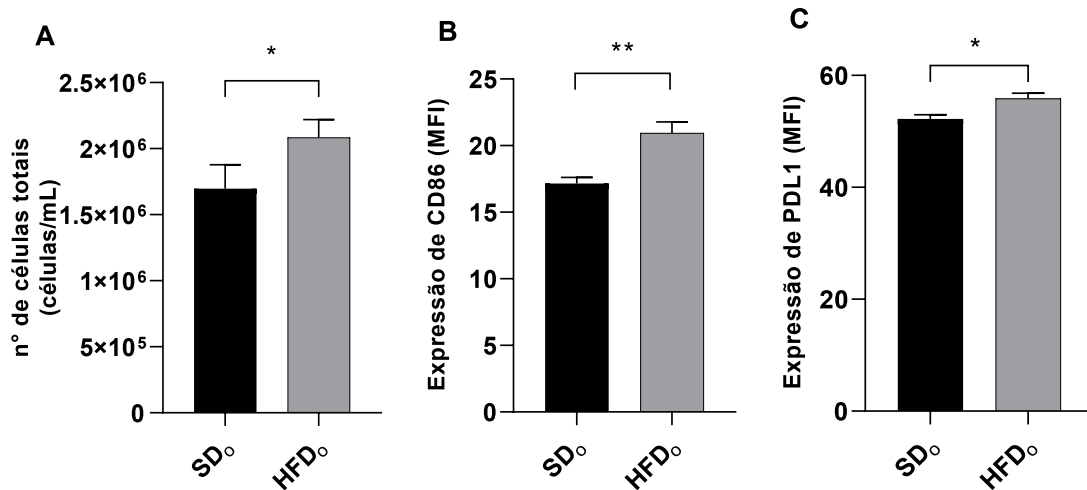


Figura 16– Marcadores imunológicos no pulmão. Contagem de leucócitos totais no tecido pulmonar (A); expressão de CD86 em células totais do pulmão (B); expressão de PDL1 no pulmão (C). Resultados expressos em média + desvio padrão da média e mediana da intensidade de fluorescência + desvio padrão da média. SD_o prole de fêmeas alimentadas com dieta padrão. HFD_o prole de fêmeas alimentadas com dieta hiperlipídica. ns $p > 0,05$; * $p < 0,049$; ** $p < 0,004$; *** $p < 0,0004$; **** $p < 0,0001$, n=11.

4.5 DIETA MATERNA PROMOVEU ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO NO BAÇO, PULMÃO E LINFONODOS MEDIASTINAIS.

A fim de avaliar como a dieta materna afeta o perfil de ativação em órgãos linfoides secundários e pulmão, foi feita a quantificação de GATA3 e ROR γ T. No baço, houve um significativo aumento da expressão de GATA3 no grupo HFD_o, e um pequeno, mas significativo aumento de ROR γ T quando comparado ao grupo SD_o (Figuras 17A e B).

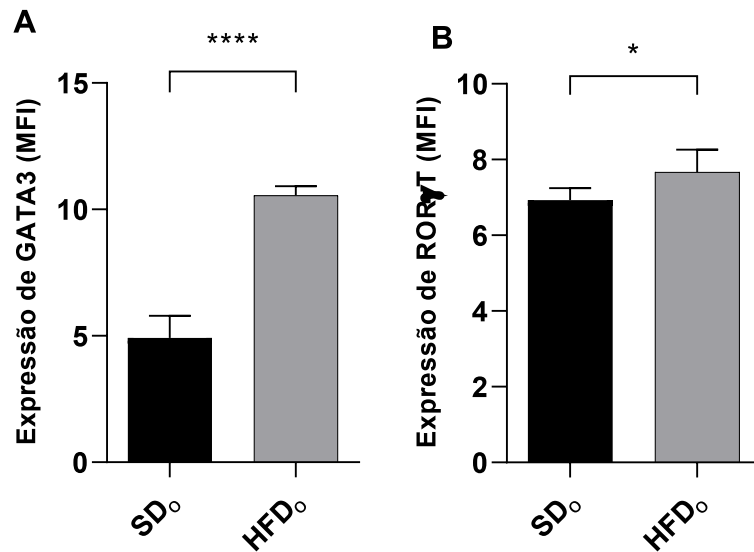


Figura 17– Expressão de fatores de transcrição no baço. Expressão de GATA3 nas células totais do baço (A); expressão de ROR γ T no baço (B). Resultados expressos em mediana da intensidade de fluorescência + desvio padrão da média. SD $^{\circ}$ prole de fêmeas alimentadas com dieta padrão. HFD $^{\circ}$ prole de fêmeas alimentadas com dieta hiperlipídica. ns $p > 0,05$; * $p < 0,049$; ** $p < 0,004$; *** $p < 0,0004$; **** $p < 0,0001$, n=11.

Nos linfonodos mediastinais não se observou alterações significativas na expressão de GATA3 entre os grupos. Enquanto, em relação à expressão de ROR γ T houve significativa redução no grupo HFD $^{\circ}$ quando comparado com o grupo SD $^{\circ}$ (Figuras 18A e B)

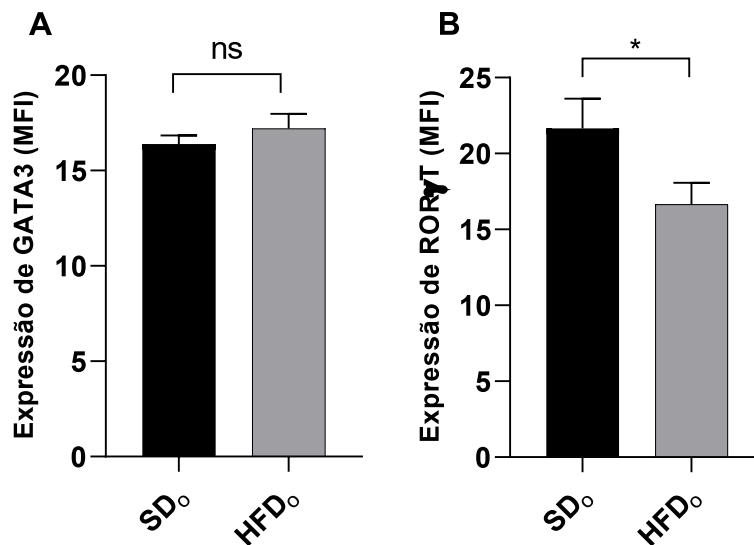


Figura 18– Expressão de fatores de transcrição em linfonodos mediastinais. Expressão de GATA3 nas células totais dos linfonodos (A); expressão de ROR γ T nos linfonodos (B). Resultados expressos em mediana da intensidade de fluorescência + desvio padrão da média. SD $^{\circ}$ prole de fêmeas alimentadas com dieta padrão. HFD $^{\circ}$ prole de fêmeas alimentadas com dieta hiperlipídica. ns $p > 0,05$; * $p < 0,049$; ** $p < 0,004$; *** $p < 0,0004$; **** $p < 0,0001$, n=11.

Já no pulmão se observou uma discreta, porém significativa expressão de GATA3 no grupo HFD_o, e uma redução nos níveis de expressão de RORγT no mesmo grupo, quando comparados com o grupo SD_o. (Figura 19A e B).

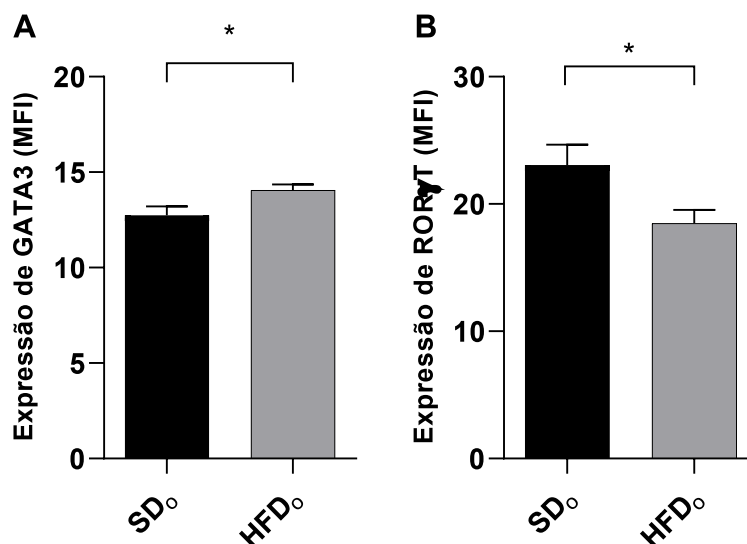


Figura 19– Expressão de fatores de transcrição no pulmão. Expressão de GATA3 nas células totais do pulmão (A); expressão de RORγT no pulmão (B). Resultados expressos em mediana da intensidade de fluorescência + desvio padrão da média. SD_o prole de fêmeas alimentadas com dieta padrão. HFD_o prole de fêmeas alimentadas com dieta hiperlipídica. ns $p > 0,05$; * $p < 0,049$; ** $p < 0,004$; *** $p < 0,0004$; **** $p < 0,0001$, n=11.

4.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA OBESIDADE MATERNA NA RESPOSTA IMUNE NA ASMA NA PROLE

Os dados até aqui descritos apontam a influência da dieta materna em importantes parâmetros imunológicos independentes do processo de indução da alergia, por isso a etapa seguinte foi avaliar o efeito da obesidade materna após a indução da asma.

4.6.1 População de eosinófilos e mastócitos da prole foram afetados pela dieta materna e indução da alergia, em tecidos periféricos

Eosinófilos são células de fundamental importância na homeostasia das mucosas com papel importante na asma (FOLCI *et al.*, 2021). Nossos resultados demonstraram uma redução do número destas células no cólon da prole HFD_o, quando comparado a prole SD_o. Mesmo com a indução da asma, o seu número permaneceu reduzido nos animais HFD_o/AP em relação ao grupo AP (Figura 20A). Fotos representativas de cada grupo podem ser observadas na figura 20B.

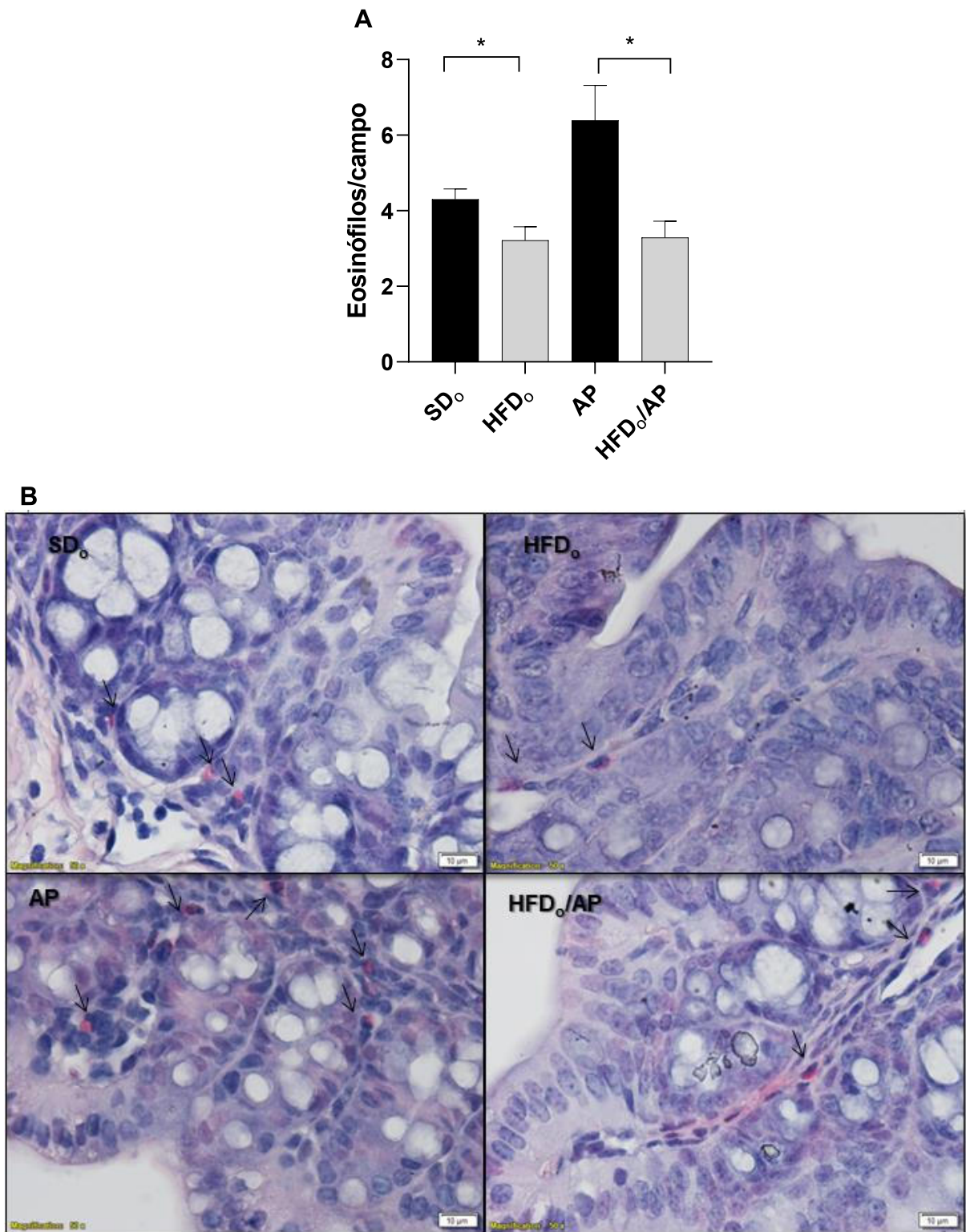


Figura 20– Infiltrado eosinofílico do intestino. Contagem de eosinófilos no tecido intestinal corados com Sirius Red (**A**); imagens representativas de cada grupo experimental (**B**). As setas pretas indicam a localização dos eosinófilos. Resultados expressos em média + desvio padrão da média. SD₀ prole de fêmeas alimentadas com dieta padrão. HFD₀ prole de fêmeas alimentadas com dieta hiperlipídica. AP prole de fêmeas alimentadas com dieta padrão com alergia pulmonar induzida. HFD₀/AP prole de fêmeas alimentadas com dieta hiperlipídica com alergia pulmonar induzida. ns $p > 0,05$; * $p < 0,049$; ** $p < 0,004$; *** $p < 0,0004$; **** $p < 0,0001$, n=9.

Já no pulmão, nos animais sem a indução da alergia, observou-se significativa redução do número dos eosinófilos presentes no tecido pulmonar no grupo HFD₀ quando comparado com o grupo SD₀. E nos animais alérgicos, observou-se um aumento acentuado de eosinófilos no grupo HFD₀/AP quando comparado com o grupo AP (Figura 21A). Na figura 21C pode-se observar fotos representativas dos cortes histológicos de cada grupo.

Mastócitos são células da imunidade inata centrais aos mecanismos imunes da asma (MÉNDEZ-ENRÍQUEZ; HALLGREN, 2019). No pulmão foi possível observar um aumento expressivo no número destas células tanto nos animais HFD₀, quanto nos animais HFD₀/AP quando comparadas com os animais SD₀ e AP, respectivamente (Figura 21B).

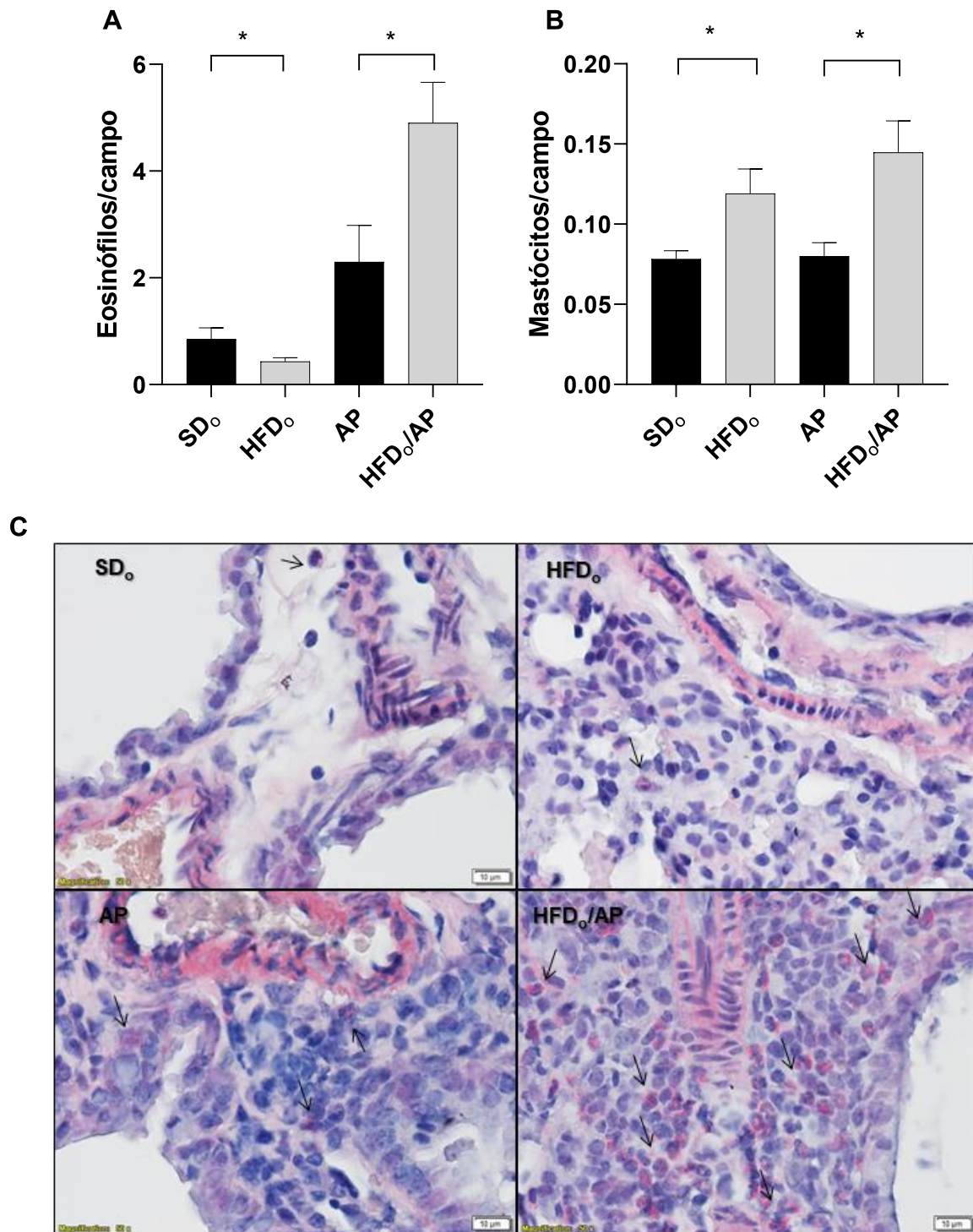


Figura 21—Infiltrado eosinofílico do pulmão. Contagem de eosinófilos no tecido corados com Sirius Red (A); contagem de mastócitos corados com Azul de Toluidina (B); imagens representativas de cada grupo experimental (C). As setas pretas indicam a localização dos eosinófilos. Resultados expressos em média + desvio padrão da média. SD_o prole de fêmeas alimentadas com dieta padrão. HFD_o prole de fêmeas alimentadas com dieta hiperlipídica. AP prole de fêmeas alimentadas com dieta padrão com alergia pulmonar induzida. HFD_o/AP prole de fêmeas alimentadas com dieta hiperlipídica com alergia pulmonar induzida ns $p > 0,05$; * $p < 0,049$; ** $p < 0,004$; *** $p < 0,0004$; **** $p < 0,0001$, $n = 7$.

4.6.2 Prole de fêmeas alimentadas com HFD apresentaram alterações na proporção de leucócitos na medula óssea

Após a avaliação da influência da dieta materna e da asma no infiltrado inflamatório na prole, avaliou-se a proporção de leucócitos na medula óssea da prole. Não foi observada diferença entre os grupos para o número total de células no órgão (Figura 22A). Porém, ao realizar a contagem diferencial do lavado medular, observou-se um número significativamente menor de eosinófilos na prole de matrizes HFD_o, quando comparado com o grupo SD_o. Esta diferença não se manteve após a indução da asma, não se observando diferenças significativas entre os grupos AP e HFD_o/AP (Figura 22B). Em contrapartida, observou-se uma maior proporção de neutrófilos em camundongos do grupo HFD_o quando comparados com o grupo SD_o, que curiosamente se inverteu após a indução da alergia, com o grupo HFD_o/AP apresentando uma menor contagem de neutrófilos quando comparado ao grupo AP (Figura 22C). Em relação a células mononucleares (linfócitos e monócitos) o grupo controle apresentou uma proporção significativamente maior destas células quando comparadas com o grupo HFD_o (Figura 22D).

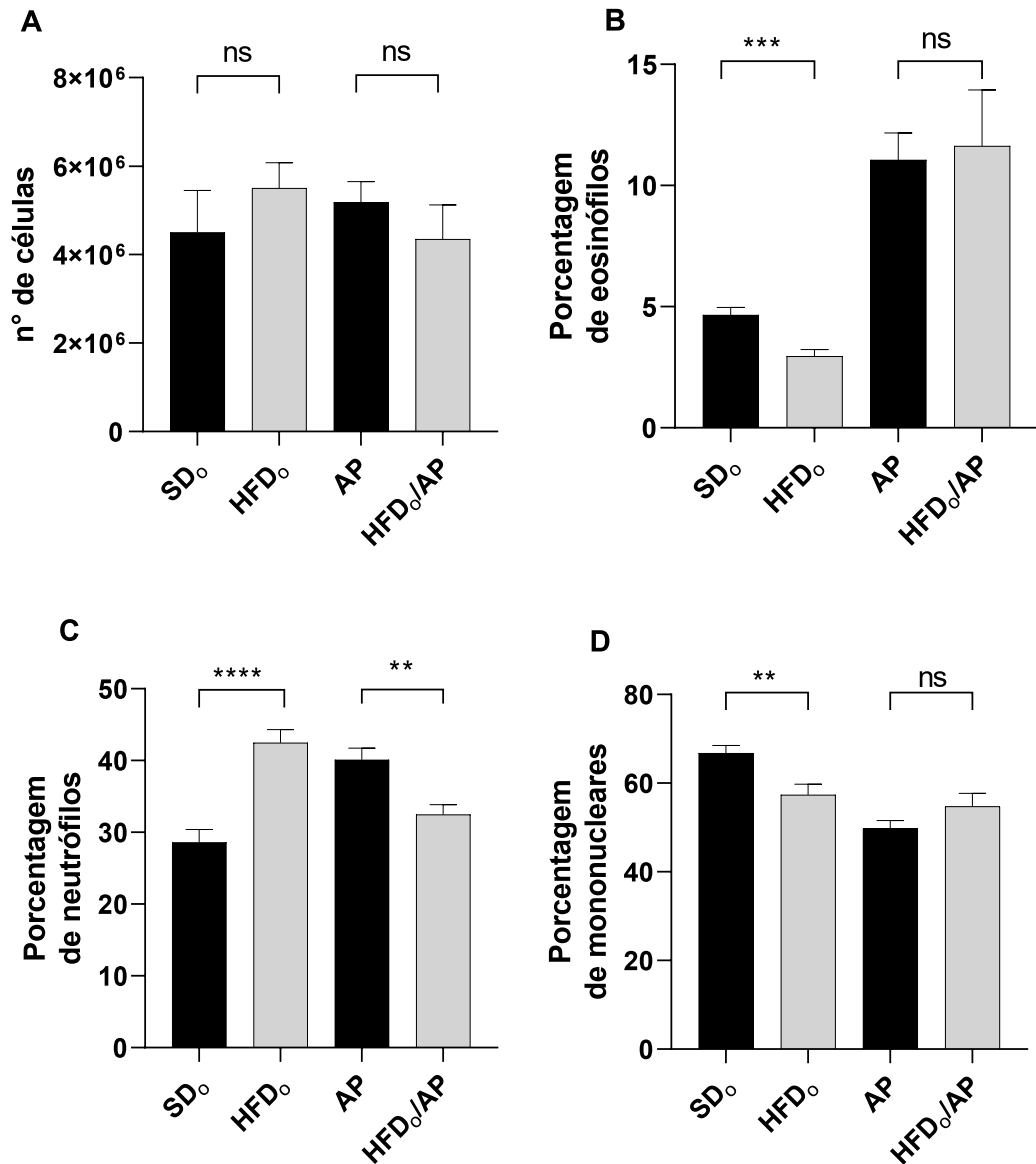


Figura 22– Contagem de células do lavado medular. Contagem total de leucócitos em lavado medular (A); contagem relativa de eosinófilos em lavado medular (B); contagem relativa de neutrófilos em lavado medular (C); contagem relativa de células mononucleares em lavado medular (monócitos e linfócitos) (D). Resultados expressos em média + desvio padrão da média. SD_o prole de fêmeas alimentadas com dieta padrão. HFD_o prole de fêmeas alimentadas com dieta hiperlipídica. Prole de fêmeas alimentadas com dieta padrão com alergia pulmonar induzida. HFD_o/AP prole de fêmeas alimentadas com dieta hiperlipídica com alergia pulmonar induzida. ns $p > 0,05$; * $p < 0,049$; ** $p < 0,004$; *** $p < 0,0004$; **** $p < 0,0001$, n=11.

4.6.3 Padrões alimentares maternos alteraram títulos de anticorpos alérgeno específicos

Observou-se que a dieta materna não teve influência significativa nos títulos de IgM entre os dois grupos (Figura 23A). Já os títulos de IgE e de IgG1 foram significativamente menores no grupo HFD_o/AP quando comparados ao grupo AP. (Figuras 23B e C). Interessantemente, os níveis de IgG2a (Figura 23D) se apresentaram significativamente elevados no grupo HFD_o/AP, quando comparado com o grupo AP.

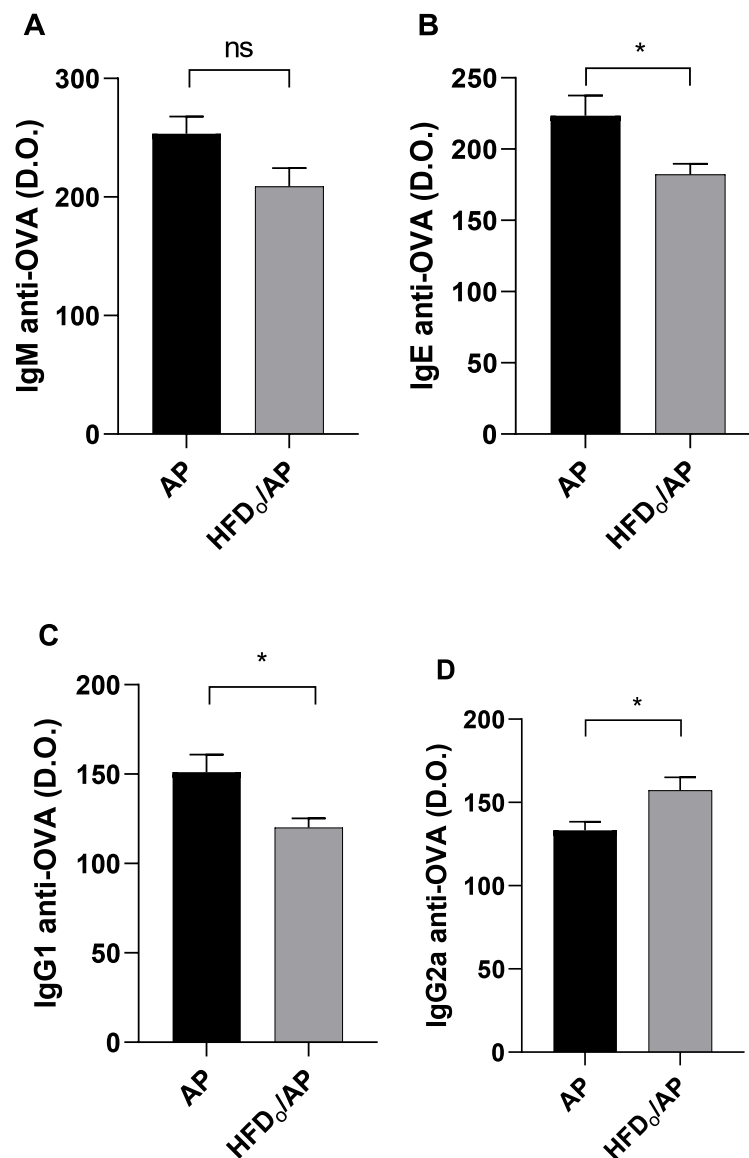


Figura 23– Títulos de isotipos de anticorpos séricos anti-ovalbumina. Títulos de IgM anti-OVA (A); Títulos de IgE anti-OVA (B); títulos de IgG1 anti-OVA (C); Títulos de IgG2a anti-OVA (D). Resultados expressos em média da densidade ótica + SEM. AP prole de fêmeas alimentadas com dieta padrão com alergia pulmonar induzida. HFD_o/AP prole de fêmeas alimentadas com dieta hiperlipídica com alergia pulmonar induzida. ns $p > 0,05$; * $p < 0,049$; ** $p < 0,004$; *** $p < 0,0004$; **** $p < 0,0001$, n=8.

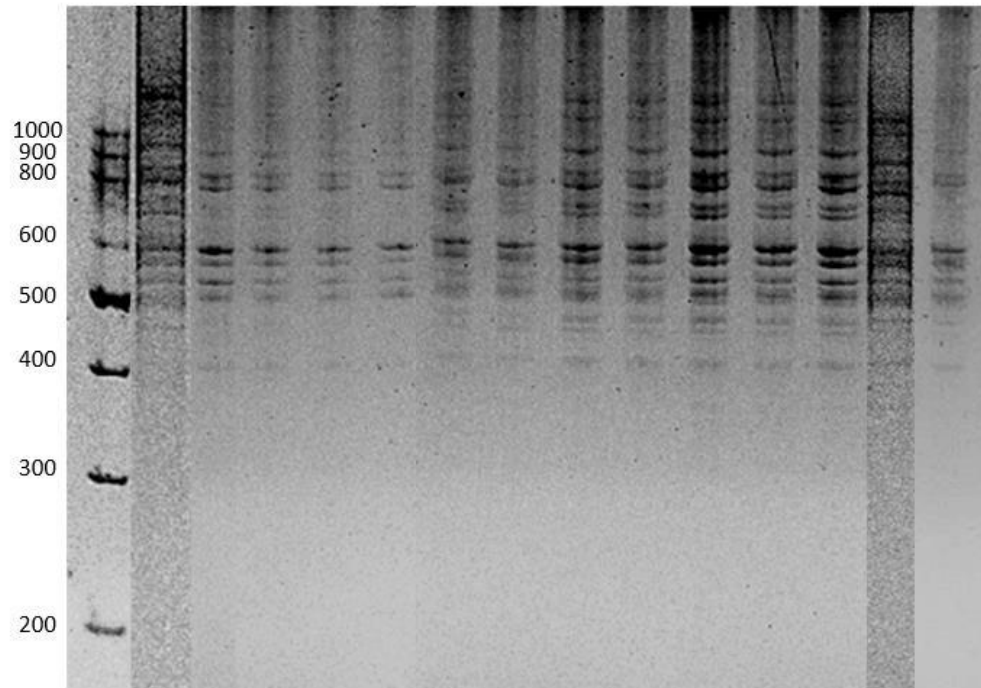
4.7 ASMA ALÉRGICA PROMOVEU ALTERAÇÕES NA MICROBIOTA PULMONAR DA PROLE

A fim de avaliar se a dieta materna ou a asma pode alterar a estrutura global da comunidade bacteriana no trato respiratório inferior, foi feita uma comparação de similaridade utilizando rep-PCR. Para o qual realizou-se a extração de DNA total de fragmentos pulmonares, em um método independente de cultivo bacteriano. O rep-PCR é uma técnica que permite a diferenciação de microrganismos baseado na amplificação de sequências repetitivas conservadas de DNA, com tamanhos diversos, que podem ser posteriormente separadas por eletroforese e geram um perfil de bandas que permite a diferenciação de bactéria ao nível linhagem (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991). É uma técnica de baixa resolução, mas capaz de gerar impressões genéticas globais que permitem a comparação de padrões de DNA entre as amostras, com aplicações em diferentes campos, como a busca de perfis microbianos em diferentes estados de saúde em populações humanas, animais ou alimentos. Esta técnica agrupa isolados bacterianos através da geração de *fingerprints*, ou seja, “impressões digitais” de DNA, e pode ser empregada como um rastreio prévio ao sequenciamento e identificação destas bactérias (DE PAULA *et al.*, 2018; VAMANU; PELINESCU; SARBU, 2016).

Considerando como ponto de corte um coeficiente de similaridade de 80%, curiosamente, a dieta materna apresentou um coeficiente de similaridade em torno de 70% para os grupos SD₀ e HFD₀, abaixo do ponto de corte estabelecido, portanto, agrupados sob um mesmo cluster. Algumas exceções foram observadas, como uma amostra do grupo SD₀ que foi agrupada em um cluster próprio (cluster 1) e uma amostra do grupo HFD₀ que foi agrupada no cluster 3 (Figura 25).

Chama-se a atenção para a asma como um forte fator de agrupamento para a microbiota pulmonar, animais do grupo AP e HFD₀/AP apresentaram coeficiente de semelhança maior que 80% (cluster 3), observável pelo padrão de bandas (Figura 24) e o dendograma (Figura 25). Com a exceção de uma amostra do grupo HFD₀/AP, agrupada no cluster 2.

Não se observou significativa semelhança entre os grupos não alérgicos (SD₀ e HFD₀) e alérgicos (AP e HFD₀/AP), sendo estes geralmente agrupados em diferentes clusters, indicando que a asma é um maior fator modificador da microbiota pulmonar quando comparada a dieta materna.

A

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Padrão | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| HFD materna | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + |
| OVA | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + |

B

| PM | SD _o | SD _o | HFD _o | HFD _o | HFD _o | HFD _o | AP | AP | AP | AP | HFD _o /AP | HFD _o /AP | HFD _o /AP | HFD _o /AP |
|---------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|----|----|----|----|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 1016.13 | ■ | | | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | |
| 969.38 | | | | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | |
| 939.51 | | | | | | | | | | | | | | ■ |
| 897.95 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 875.87 | ■ | | | | | | | | | | | | | ■ |
| 844.71 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 814.84 | | ■ | ■ | ■ | ■ | | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 781.07 | | | | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | |
| 755.10 | ■ | | | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | |
| 687.56 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 652.50 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 599.25 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 573.28 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 521.33 | | | | | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | |
| 495.36 | | | | | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | |
| 427.82 | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |

Figura 24– Avaliação da microbiota pulmonar por rep-PCR. Gel de poliacrilamida com os produtos de rep-PCR gerados a partir de macerado de pulmão de camundongo (**A**); Representação gráfica das bandas obtidas no gel de poliacrilamida com seu respectivo peso molecular (**B**). PM: padrão molecular de 1kb, HFD materna: prole de matrizes alimentadas com dieta hiperlipídica. OVA: animais que passaram pelo protocolo de indução da alergia. SD_o prole de fêmeas alimentadas com dieta padrão. HFD_o prole de fêmeas alimentadas com dieta hiperlipídica. AP prole de fêmeas alimentadas com dieta padrão com alergia pulmonar induzida. HFD_o/AP prole de fêmeas alimentadas com dieta hiperlipídica com alergia pulmonar induzida.

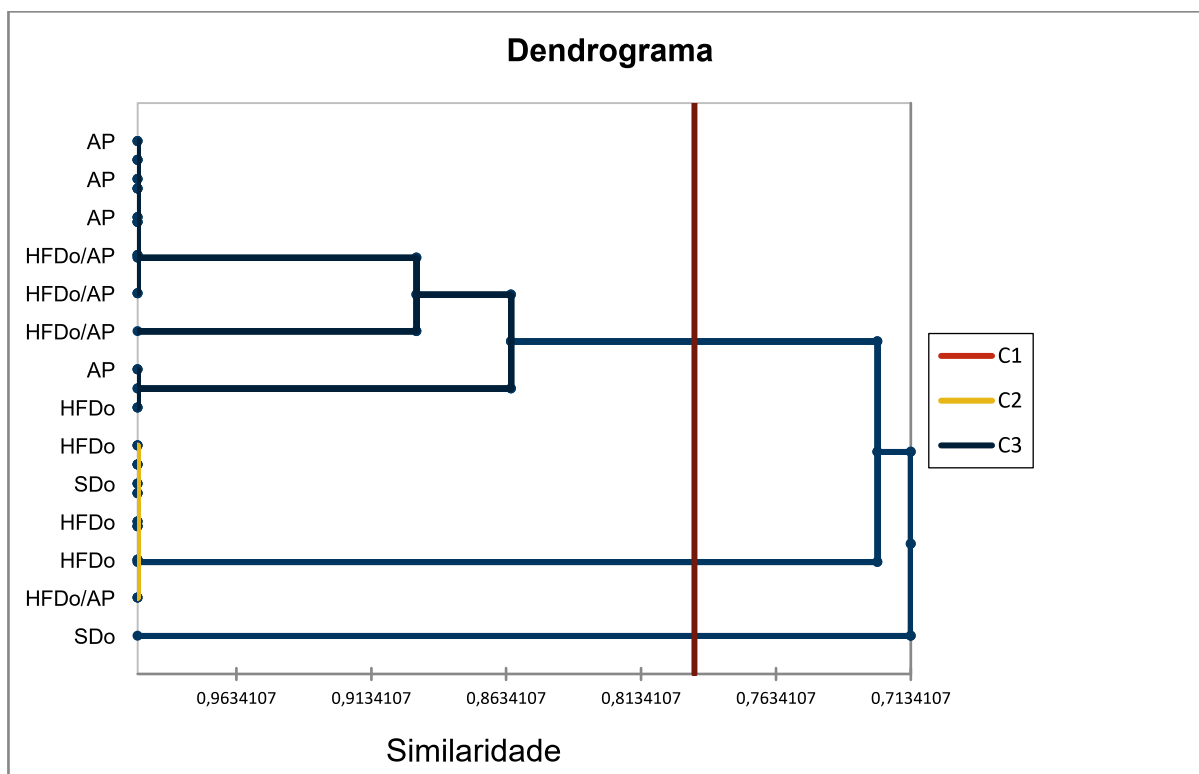


Figura 25– Dendrograma gerado a partir dos dados obtidos do rep-PCR. Cores iguais no eixo Y mostram similaridade genética. Números no eixo X representam coeficientes de similaridade de Dice. Os resultados foram obtidos através de AHC, aglomerados pelo método UPGA. SDo prole de fêmeas alimentadas com dieta padrão. HFD₀ prole de fêmeas alimentadas com dieta hiperlipídica. AP prole de fêmeas alimentadas com dieta padrão com alergia pulmonar induzida. HFD₀/AP prole de fêmeas alimentadas com dieta hiperlipídica com alergia pulmonar induzida.

5 DISCUSSÃO

O efeito da obesidade sob a resposta imune na asma durante a infância é contraditório. Alguns estudos mostram uma associação com a exacerbação da resposta imune Th2 e atopia em uma asma já estabelecida, enquanto outros mostram o aumento da resposta Th1 e redução de atopia. Independentemente do perfil, o obeso asmático apresenta um quadro clínico mais grave e resistência a terapias convencionais (SANSONE *et al.*, 2020; SHAN; ZHOU; SHANG, 2020). A influência de dietas obesogênicas e da própria obesidade iniciam-se durante o desenvolvimento fetal e podem atuar como fator de risco e de agravamento para a asma (SURESHCHANDRA; MARSHALL; MESSAOUDI, 2019), porém, a influência da obesidade materna nos diferentes fenótipos clínicos da asma ainda é uma área para intensa pesquisa. Neste estudo avaliou-se a influência do consumo de uma dieta obesogênica sobre o sistema imune e a microbiota pulmonar da prole.

Inicialmente, não foi encontrada alteração de massa corporal nas matrizes alimentadas com a dieta hiperlipídica. Tal fato pode estar relacionado com a resistência já conhecida da linhagem BALB/c ao ganho de peso (JOVICIC *et al.*, 2015). Entretanto, a prole das matrizes alimentadas com a dieta hiperlipídica apresentou peso maior em relação aos controles, corroborando com os dados observados por MacDonald e colaboradores (2017). De fato, em humanos o peso da progênie ao nascer é intimamente ligado ao *status* nutricional materno (DAI; HE; HU, 2018).

Apesar de não ter sido observado ganho de peso entre as matrizes, a dieta alterou o perfil lipídico materno, aumentando os níveis de colesterol LDL, porém sem alterar significativamente as concentrações de glicose sérica e colesterol HDL. Altos níveis de colesterol LDL materno estão associados com macrosomia fetal (XI *et al.*, 2021), justificando os maiores pesos encontrados nos filhotes das matrizes HFD. Estes resultados diferem de dados já obtidos anteriormente no qual fêmeas BALB/c apresentam todos esses parâmetros alterados (SILVA *et al.*, 2017). Uma possível explicação para a ausência de alteração nesses parâmetros metabólicos seria a retirada da dieta após o 14º dia de vida prole, a fim de evitar o consumo direto da dieta pelos filhotes, com isso, a administração da dieta padrão pode ter contribuído para a normalização metabólica das matrizes.

Enquanto a dieta hiperlipídica não alterou as concentrações de glicose e colesterol HDL nas matrizes, esses se mostraram bem alterados na prole, com

exceção da fração LDL. Diversos estudos corroboram com estes resultados, demonstrando que a dieta hiperlipídica materna leva à alteração do metabolismo de glicose e lipídios dos filhotes (DESAI *et al.*, 2014; DUNFORD; SANGSTER, 2017; MAMOUNIS *et al.*, 2020). Além disso, baixos níveis de colesterol HDL e resistência à insulina estão associadas a incidência de asma (AL-SHAWWA *et al.*, 2007; COTTRELL *et al.*, 2011; KO *et al.*, 2018; LIN *et al.*, 2022). A grande variação nos níveis de LDL pode ser explicada, em parte, devido ao reduzido número amostral utilizado para as análises, o que impossibilitou a separação por gênero da prole. Um fator importante, tendo em vista que a dieta materna afeta a prole dependentemente de gênero (LOMAS-SORIA *et al.*, 2018).

Em conjunto com as alterações metabólicas, é comum encontrar uma produção exacerbada de leptina em obesos. Esta adipocina, em níveis fisiológicos, atua no controle da saciedade e na homeostasia do sistema imune, porém em altos níveis causa exacerbação da inflamação (ABELLA *et al.*, 2017). No presente estudo, foram encontrados altos níveis de leptina nas matrizes. Esse aumento pode influenciar diretamente na programação metabólica da prole (MCMILLEN *et al.*, 2004). De fato, um aumento de leptina é observado no cordão umbilical na progênie de mães obesas (STEFANIAK *et al.*, 2019), demonstrando a transmissão vertical desta adipocina. Na asma, níveis elevados de leptina são associados a piora dos sintomas em crianças (YOUSSEF *et al.*, 2013). Apesar disso, curiosamente não se observou alterações nos níveis séricos de leptina na prole no presente estudo (dados não mostrados). No entanto, não se pode descartar que os níveis desta adipocina não estiveram alterados em outros momentos do desenvolvimento fetal e pós-natal. Em conjunto, estes dados apontam que apesar da dieta hiperlipídica não alterar a massa corporal das matrizes, esta promoveu alterações metabólicas na linhagem de camundongos BALB/c e seus efeitos foram transmitidos para a prole.

Além dos efeitos acima mencionados, a dieta hiperlipídica materna causou alterações no desenvolvimento e em características da resposta imune. É bem estabelecido que células dendríticas são essenciais para o início de qualquer resposta antígeno-específica. O balanço da expressão de moléculas coestimulatórias e inibitórias em sua membrana no momento da apresentação do antígeno inibirá ou ativará os linfócitos T (CHEN, LIEPING; FLIES, 2013). No presente estudo observou-se que a dieta hiperlipídica materna promoveu uma redução na expressão de CD80 em células dendríticas derivadas da medula óssea, particularmente em resposta ao

estímulo com LPS. Em paralelo, houve um aumento na molécula inibitória PDL1 em células não estimuladas. Esses dados são um indicativo de um perfil regulatório apresentado por essas células (CHEN, LIEPING; FLIES, 2013). Observa-se na obesidade materna, que células dendríticas provenientes do cordão umbilical apresentam defeitos intrínsecos como menor produção de citocinas frente ao estímulo de agonistas de TLR2 e 4 (WILSON *et al.*, 2015), o que pode resultar em uma resposta prejudicada a microrganismos (MYLES *et al.*, 2013). Interessantemente, foi observado um aumento na expressão geral de CD86 tanto em órgãos linfoides secundários, quanto no próprio pulmão, sugerindo que a dieta hiperlipídica materna afetou o perfil de ativação das células presentes nestes tecidos. A diferença entre a expressão das moléculas coestimulatórias pode ser devido à expressão constitutiva de CD86 sendo mais rapidamente aumentada frente a estímulos quando comparada a CD80 (ROWSHANRAVAN; HALLIDAY; SANSOM, 2018), o ambiente pró-inflamatório proporcionado pela dieta hiperlipídica pode ser um fator para essa regulação positiva. Em relação à expressão de PDL1 aumentada em ambos os órgãos, pode sinalizar uma tentativa de contrarregulação de tal perfil inflamatório, a fim de manter a homeostasia. Este experimento deve ser repetido comparando-se ao grupo alérgico a fim de avaliar se, frente ao estímulo com OVA, esta contrarregulação se mantém.

Durante a ativação de linfócitos T auxiliares, a depender das citocinas presentes no meio, os linfócitos podem se diferenciar em subtipos específicos como Th1, Th2 e Th17. Esta diferenciação vai ser em parte direcionada por fatores de transcrição específicos, como T-bet para células Th1, GATA3 para células do tipo Th2 e ROR γ T para Th17 (HILLIGAN; RONCHESE, 2020). Neste sentido, nossos resultados mostraram um aumento expressivo de GATA3, no baço, linfonodos e pulmão, sugerindo um perfil de linfócitos Th2 aumentado. O que poderia explicar o risco aumentado para o desenvolvimento de asma alérgica ainda na infância (LIU, SHUFANG *et al.*, 2020). Além de células Th2, outra fonte possível para o aumento da expressão de GATA3 são as ILC2s que também estão intimamente ligadas a patogênese da asma, e apresentam expressão desse fator de transcrição (JONCKHEERE; BULLENS; SEYS, 2019). Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Oliveira e colaboradores (2019) em camundongos adultos alimentados com dieta hiperlipídica. Por outro lado, o fator de transcrição ROR γ T, está aumentado no baço e reduzido no pulmão e linfonodos. O aumento deste fator de transcrição, particularmente no baço, evidencia a inflamação sistêmica provocada pela dieta

materna. No entanto, a redução de ROR γ T no pulmão pode ser um indicativo de um desequilíbrio na mucosa, uma vez que este fator de transcrição é essencial para a produção de citocinas que garantem integridade do epitélio (GAFFEN; MOUTSOPOULOS, 2020; OHNMACHT *et al.*, 2015). O que, por sua vez, poderia permitir o acesso de alérgenos ao parênquima pulmonar facilitando o processo de sensibilização (GEORAS; REZAEI, 2014).

Apesar do aumento na expressão de GATA3, foi observado que a dieta hiperlipídica materna não aumentou a eosinofilia na ausência de alergia, sugerindo a ausência de translocação desse fator para o núcleo (MARBACH *et al.*, 2012). Estudos adicionais são necessários para comprovar este efeito. Eosinófilos são células produzidas na medula óssea em resposta a estímulos de células Th2 e ILC2. Eosinófilos são envolvidos em diversos processos fisiológicos, como na defesa contra patógenos, remodelamento tecidual, reparo muscular e metabolismo de glicose. Mas também são implicados na patogênese de diversas doenças, recrutados para o pulmão durante processo alérgico, e considerados marcadores fenotípicos da resposta imune Th2 na asma (AKAR-GHIBRIL *et al.*, 2020; WECHSLER *et al.*, 2021). Dados apontam que a dieta materna também leva a alterações na hematopoese da prole (KAMIMAE-LANNING *et al.*, 2015). Neste estudo foi observada significativa redução de eosinófilos na medula óssea da prole, associada com um menor influxo de eosinófilos no pulmão e cólon, demonstrando que a dieta hiperlipídica afetou a produção desta célula. Por outro lado, eosinófilos no pulmão saudável tem papel regulatório e foram relacionados a redução da inflamação Th2, logo chama-se a atenção para diferentes subtipos de eosinófilos com diferentes papéis (OLBRICH *et al.*, 2020). Portanto, a redução na população dessas células encontrada nos filhotes de matrizes HFD, pode indicar uma ruptura da homeostasia. Redução semelhante foi encontrada em modelos experimentais murinos adultos, nos quais a dieta reduz a produção dessas células da medula óssea, impactando no seu recrutamento para diferentes órgãos (CALIXTO *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2017).

Interessantemente, após a indução da asma houve um expressivo aumento de eosinófilos no pulmão, abrindo uma importante questão em relação à origem destas células, uma vez que não houve diferença na produção delas na medula entre os grupos sensibilizados com o alérgeno. Este fato associado com a redução dos eosinófilos no cólon do grupo HFD_o/AP sugere que estas células possam estar sendo recrutadas deste local, conforme proposto por LLOYD e SAGLANI (2013). O aumento

observado de eosinófilos no tecido pulmonar provocado pela dieta materna frente ao desafio com o alérgeno é semelhante ao encontrado por Lacerda e colaboradores (2019). Tais resultados também são semelhantes aos encontrados em estudos clínicos, onde a eosinofilia é relacionada com a asma grave na infância (BOSSLEY *et al.*, 2012; GROTTA *et al.*, 2013; PEREZ *et al.*, 2021).

Neutrófilos são importantes propagadores da inflamação sistêmica mediada pela obesidade (URIBE-QUEROL; ROSALES, 2022), e é uma importante célula encontrada em número elevado no pulmão de asmáticos obesos, correlacionando com a gravidade da doença e resistência à terapia (RAY; KOLLS, 2017). A dieta materna levou ao aumento do número de neutrófilos na medula, embora não tenha sido avaliada a presença destas células no pulmão dos animais. Similar ao encontrado por Blue e colaboradores (2015), que observaram aumento da neutrofilia sanguínea na prole de fêmeas alimentadas com HFD. Em contrapartida, após a indução da asma foi observado a redução de neutrófilos na medula, uma possível explicação seria o tempo de análise após o último desafio com a OVA, uma vez que um atraso no aumento da neutrofilia em camundongos BALB/c obesos é observado (SILVA *et al.*, 2017). Análises posteriores deverão ser realizadas para avaliar o influxo de neutrófilos em diferentes tecidos.

Uma característica marcante da asma alérgica é a atopia, diagnosticada por níveis elevados de IgE, a qual promove a sensibilização e degranulação de mastócitos (GALLI; TSAI, 2012). Surpreendentemente, no presente estudo foi observado níveis reduzidos de IgE na prole alérgica de matrizes-HFD. Outro isótipo de anticorpo que também se mostrou reduzido foi IgG1. Em murinos, diferentes subclasses de IgG indicam uma maior resposta a citocinas de diferentes perfis de resposta imunológica. Enquanto IgG1 está relacionada a uma resposta do tipo Th2 com maior produção de IL-4, a subclasse IgG2a está relacionada a uma resposta do tipo Th1, com maior produção de INF- γ (COLLINS, 2016). Neste trabalho, a prole de matrizes-HFD sensibilizada com OVA, apresentou uma maior produção de IgG2a quando comparados com animais do grupo alérgico. Estes resultados vão ao encontro de um estudo prévio publicado pelo nosso grupo, porém em animais adultos (OLIVEIRA *et al.*, 2019). Corroborando com estudos clínicos nos quais a obesidade na infância provoca uma redução nos níveis de IgE e menor atopia (CHEN, YANG-CHING *et al.*, 2019; JANSON *et al.*, 2007; VISNESS *et al.*, 2010). Os baixos níveis de IgE não necessariamente indicam uma patologia mais branda, especialmente quando

acompanhados de maiores níveis de IgG2a, uma vez que esta imunoglobulina poderia estar mediando uma anafilaxia por neutrófilos (JÖNSSON *et al.*, 2019).

Anticorpos alérgeno-específicos, em especial a IgE se ligam em mastócitos sensibilizando-os e promovendo a sua degranulação (BANAFEIA *et al.*, 2022). Estas células são positivamente correlacionadas com a gravidade da doença (FRICKER *et al.*, 2020; LEZMI *et al.*, 2016). Os resultados do presente estudo mostraram que a dieta hiperlipídica materna foi associada com o aumento de mastócitos nos pulmões da progênie alérgica e não alérgica. Estes resultados confirmam o encontrado por SILVA e colaboradores (2017) que avaliou mastócitos nos pulmões e traqueias de camundongos fêmeas adultas obesas. Porém, divergem de resultados da clínica que não encontram diferenças significativas em triptase sérica (uma proteína expressa por mastócitos) em crianças asmáticas acima do peso, quando comparado com crianças asmáticas com peso normal (PERIYALIL *et al.*, 2015), bem como em adultos (FENGER *et al.*, 2012). O alto número de mastócitos presentes no grupo HFD_o pode ser explicado por um efeito da dieta materna durante o desenvolvimento fetal, uma vez que estas células migram para tecidos periféricos nesta etapa do desenvolvimento (GENTEK *et al.*, 2018). Além disso, a obesidade promove aumento de mastócitos em diferentes tecidos (SILVA, *et al.*, 2017; SISMANOPOULOS *et al.*, 2013).

Apesar dos baixos níveis séricos de IgE, o acúmulo de mastócitos foi significativo na prole de matrizes HFD antes e após a indução da asma. Tal fato chama a atenção para algumas hipóteses: a primeira seria que a IgE reduzida no soro estaria ligada no FcεRI nos mastócitos pulmonares. Nesse sentido, pacientes com fenótipos distintos de asma alérgica apresentam títulos similares de IgE sistêmica, contudo, os níveis de IgE associada as vias aéreas são elevados em pacientes com o perfil eosinofílico (BALZAR *et al.*, 2007). Além disso, anticorpos dessa subclasse são rapidamente capturados/removidos de circulação por diversas células portadoras do receptor FcεRI, contribuindo para sua reduzida meia-vida (GREER *et al.*, 2014). Outra hipótese seria que apesar dos níveis reduzidos de IgE, esta bastaria para sensibilizar o maior número de mastócitos. A dosagem de triptase poderia auxiliar na resposta desta questão. Além disso, mastócitos podem ser ativados por uma série de outros estímulos como IgG, componentes do complemento, ligantes de TLR, entre outros. Estes estímulos podem levar degranulação de mastócitos por si só ou tendo um efeito sinérgico sob o mastócito já sensibilizado com IgE (YU *et al.*, 2016).

Há diferentes mecanismos pelos quais a dieta e a obesidade materna podem

influenciar no agravamento da asma. Diretamente por alterações imunes e metabólicas como exposto acima. Mas também, podem atuar indiretamente através da modulação da microbiota intestinal (ALSHARAIRI, 2020; CHU; ANTONY; *et al.*, 2016). Neste trabalho buscou-se mostrar uma possível influência da dieta materna na microbiota pulmonar da prole. Curiosamente, os resultados preliminares apresentados mostraram que a asma foi um fator mais forte para a alteração dessa microbiota do que a dieta materna. De fato, o microambiente inflamatório já se mostrou capaz de promover alterações na composição bacteriana pulmonar (HILTY *et al.*, 2010). No entanto, a análise realizada foi de caráter qualitativo, análises quantitativas poderiam demonstrar uma possível influência da dieta materna nessa microbiota. Como demonstrado em modelos experimentais com animais adultos e em humanos (AYUPE *et al.*, 2019; LEE *et al.*, 2021; MICHALOVICH *et al.*, 2019).

Este estudo teve várias limitações, entre as quais não foi possível realizar a avaliação direta hiperresponsividade brônquica, importante para a avaliação da severidade da doença (CHARRON; PAKHALÉ, 2016), o que deixou apenas dados indiretos para mensuração da severidade da asma, como o infiltrado eosinofílico. Outra limitação foi a não avaliação de parâmetros de inflamação neutrofílica e de citocinas pulmonares, a fim de determinar com maior precisão o fenótipo apresentado. Infelizmente também não foi possível avaliar as principais bactérias descritas na literatura como determinantes para o agravamento da asma como *M. catharralis*, *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *H. influenzae* e *P. aeruginosa* (LOVERDOS *et al.*, 2019). Por outro lado, como pontos positivos, este estudo foi o primeiro a avaliar como a dieta materna pode influenciar na composição da microbiota pulmonar. Além disso, foi um dos poucos a avaliar diversos subtipos de anticorpos no contexto da asma associada à dieta materna.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, este trabalho demonstrou que a dieta materna teve influência sobre parâmetros métricos e metabólicos da prole. Além de alterar a ativação de células dendríticas e o perfil imune geral de órgãos como baço e pulmão, podendo ser um fator predisponente para o desenvolvimento da asma. Frente à indução da asma, a dieta materna ainda levou a uma intensificação da eosinofilia e a produção de IgG2a, sugerindo o envolvimento do perfil Th1. O aumento de eosinófilos e mastócitos após a indução mostra a capacidade da dieta materna de agravar características imunopatológicas do quadro asmático na prole. Apesar de não ter sido possível associar a dieta materna a uma alteração da microbiota pulmonar, não se pode descartar que mudanças quantitativas possam ter influência na severidade da asma.

REFERÊNCIAS

ABELLA, Vanessa *et al.* Leptin in the interplay of inflammation, metabolism and immune system disorders. **Nature Reviews Rheumatology** v. 13, n. 2, p. 100–109 , 5 fev. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrrheum.2016.209>>.

ACEVEDO, Nathalie *et al.* *Perinatal and early-life nutrition, epigenetics, and allergy*. **Nutrients**. [S.l.]: Multidisciplinary Digital Publishing Institute. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2072-6643/13/3/724/htm>>. Acesso em: 23 jul. 2021. , 25 fev. 2021

ADLER, Benjamin J *et al.* High fat diet rapidly suppresses B lymphopoiesis by disrupting the supportive capacity of the bone marrow niche. **PLoS ONE** v. 9, n. 3 , 2014. Disponível em: <www.plosone.org>.

AHO, Velma T.E. *et al.* *The microbiome of the human lower airways: A next generation sequencing perspective*. **World Allergy Organization Journal**. [S.l.]: World Allergy Organization. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC4468963/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24878320/)>. Acesso em: 7 jun. 2022. , 16 jun. 2015

AKAR-GHIBRIL, Nicole *et al.* Allergic Endotypes and Phenotypes of Asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice** v. 8, n. 2, p. 429–440 , 1 fev. 2020. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC7569362/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32064643/)>. Acesso em: 8 fev. 2022.

AKAY, Hatice Kubra *et al.* The relationship between bifidobacteria and allergic asthma and/or allergic dermatitis: A prospective study of 0-3 years-old children in Turkey. **Anaero** v. 28, p. 98–103 , 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24878320/>>. Acesso em: 1 jun. 2022.

AL-SHAWWA, Baha A. *et al.* Asthma and insulin resistance in morbidly obese children and adolescents. **Journal of Asthma** v. 44, n. 6, p. 469–473 , jul. 2007. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02770900701423597>>. Acesso em: 23 maio 2022.

ALHASAN, Moumen M. *et al.* Antibiotic use during pregnancy increases offspring asthma severity in a dose-dependent manner. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology** v. 75, n. 8, p. 1975–1986 , 1 ago. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32064643/>>. Acesso em: 10 jun. 2022.

ALSHARAIRI, Naser A. *The infant gut microbiota and risk of asthma: The effect of maternal nutrition during pregnancy and lactation*. **Microorganisms**. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <www.mdpi.com/journal/microorganisms>. , 2020

ALWARITH, Jihad *et al.* The role of nutrition in asthma prevention and treatment. **Nutrition Reviews** v. 78, n. 11, p. 928–938 , 2020. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nutritionreviews/article/78/11/928/5804968>>.

ARISMENDI, Ebymar *et al.* Effects of Obesity and Asthma on Lung Function and Airway Dysanapsis in Adults and Children. **Journal of Clinical Medicine** v. 9, n. 11, p. 3762 , 2020. Disponível em: <www.mdpi.com/journal/jcm>. Acesso em: 18 jan. 2021.

ARPAIA, Nicholas *et al.* Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. **Nature** v. 504, n. 7480, p. 451–455, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24226773/>>. Acesso em: 25 maio 2022.

ARRIETA, Marie Claire *et al.* Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma. **Science Translational Medicine** v. 7, n. 307, p. 307ra152-307ra152, 30 set. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26424567/>>. Acesso em: 29 jun. 2021.

AYE, Irving L.M.H. *et al.* Increasing maternal body mass index is associated with systemic inflammation in the mother and the activation of distinct placental inflammatory pathways. **Biology of Reproduction** v. 90, n. 6, p. 129–130, 1 jun. 2014. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article/90/6/129, 1-9/2514321>>. Acesso em: 26 maio 2022.

AYE, Irving L.M.H.; JANSSON, Thomas; POWELL, Theresa L. TNF- α stimulates system a amino acid transport in primary human trophoblast cells mediated by p38 MAPK signaling. **Physiological Reports** v. 3, n. 10, p. e12594, 1 out. 2015. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.14814/phy2.12594>>. Acesso em: 26 maio 2022.01_00018467.

AYUPE, Marina Caçador; SILVA, Flávia Márcia de Castro e.; OLIVEIRA, Erick Esteves De; *et al.* Obesity causes pulmonary dysbiosis affecting innate immune response in murine asthma model. **Allergy** v. 74, n. 11, p. 2230–2233, 7 nov. 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/all.13827>>. Acesso em: 20 dez. 2019.

BÄCKHED, Fredrik *et al.* *Defining a healthy human gut microbiome: Current concepts, future directions, and clinical applications*. **Cell Host and Microbe**. [S.l.]: Cell Press, 15 nov. 2012

BALZAR, Silvana *et al.* IgE expression pattern in lung: Relation to systemic IgE and asthma phenotypes. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** v. 119, n. 4, p. 855–862, 1 abr. 2007.

BANAFEFA, Ghalya H. *et al.* The role of human mast cells in allergy and asthma. **Bioengineered** v. 13, n. 3, p. 7049–7064, 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35266441/>>. Acesso em: 5 ago. 2022.

BARU, Abdul Mannan *et al.* Selective depletion of Foxp3+ Treg during sensitization phase aggravates experimental allergic airway inflammation. **European Journal of Immunology** v. 40, n. 8, p. 2259–2266, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20544727/>>. Acesso em: 11 mar. 2022.

BASSIS, Christine M. *et al.* Analysis of the Upper Respiratory Tract Microbiotas as the Source of the Lung and Gastric Microbiotas in Healthy Individuals. **mBio** v. 6, n. 2, maio 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25736890/>>. Acesso em: 9 jan. 2020.

BATEMAN, E. D. *et al.* *Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary*. **European Respiratory Journal**. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2021/05/GINA-Main-Report-2021-V2-WMS.pdf>>. Acesso em: 5 jul. 2021. , 2008

BEUTHER, David A.; SUTHERLAND, E. Rand. Overweight, obesity, and incident asthma: A meta-analysis of prospective epidemiologic studies. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine** v. 175, n. 7, p. 661–666 , abr. 2007.

Bl, Jing *et al.* Changes and correlations of serum interleukins, adhesion molecules and soluble E-selectin in children with allergic rhinitis and asthma. **Pakistan Journal of Medical Sciences** v. 34, n. 5, p. 1288–1292 , 1 set. 2018.

BIBI, Shima *et al.* Maternal high-fat diet consumption enhances offspring susceptibility to DSS-induced colitis in mice. **Obesity** v. 25, n. 5, p. 901–908 , 2017. Disponível em: <http://www.nature.com/authors/editorial_policies/license.html#terms>. Acesso em: 10 mar. 2022.

BISGAARD, Hans *et al.* Childhood Asthma after Bacterial Colonization of the Airway in Neonates. **New England Journal of Medicine** v. 357, n. 15, p. 1487–1495 , out. 2007.

BLUE, Emily K *et al.* Fetal hyperglycemia and a high-fat diet contribute to aberrant glucose tolerance and hematopoiesis in adult rats. **Pediatric Research** v. 77, n. 2, p. 316–325 , 2015.

BOSSLEY, Cara J. *et al.* Pediatric severe asthma is characterized by eosinophilia and remodeling without TH2 cytokines. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** v. 129, n. 4 , 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22385633/>>. Acesso em: 20 jun. 2022.

BREHM, John M. *et al.* Vitamin D insufficiency and severe asthma exacerbations in Puerto Rican children. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine** v. 186, n. 2, p. 140–146 , 15 jul. 2012.

BRUCE-KELLER, Annadora J. *et al.* Maternal obese-Type gut microbiota differentially impact cognition, anxiety and compulsive behavior in male and female offspring in mice. **PLoS ONE** v. 12, n. 4, p. e0175577 , 1 abr. 2017. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0175577>>. Acesso em: 7 jun. 2022.1111111111.

BRUIJNZEEL, P. L. B.; UDDIN, M.; KOENDERMAN, L. Targeting neutrophilic inflammation in severe neutrophilic asthma: can we target the disease-relevant neutrophil phenotype? **Journal of Leukocyte Biology** v. 98, n. 4, p. 549–556 , 1 out. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25977288/>>. Acesso em: 10 mar. 2021.

BUTEL, M. J.; WALIGORA-DUPRIET, A. J.; WYDAU-DEMATTEIS, S. *The developing gut microbiota and its consequences for health* .**Journal of Developmental Origins of Health and Disease**. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/S2040174418000119>>. , 2018

CALIXTO, M C *et al.* Obesity enhances eosinophilic inflammation in a murine model of allergic asthma. **British Journal of Pharmacology** v. 159, n. 3, p. 617–625 , 2010.

CASCIANO, Julian *et al.* Value of peripheral blood eosinophil markers to predict severity of asthma. **BMC Pulmonary Medicine** v. 16, n. 1, p. 109 , jul. 2016.

CASTRO-RODRIGUEZ, Jose A. *et al.* Leptin in cord blood associates with

asthma risk at age 3 in the offspring of women with gestational obesity. **Annals of the American Thoracic Society** v. 17, n. 12, p. 1583–1589 , dez. 2020. Disponível em: <<https://www.atsjournals.org/doi/10.1513/AnnalsATS.202001-080OC>>.

CHAPMAN, Martin D.; WÜNSCHMANN, Sabina; POMÉS, Anna. Proteases as Th2 adjuvants. **Current allergy and asthma reports** v. 7, n. 5, p. 363–367 , set. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17697645/>>. Acesso em: 8 fev. 2022.

CHARLES, Marie Aline; DELPIERRE, Cyrille; BREÁNT, Bernadette. *Le concept des origines développementales de la santé: Évolution sur trois décennies*. **Medecine/Sciences**. [S.l.]: Med Sci (Paris). Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26850602/>>. Acesso em: 14 mar. 2022. , 1 jan. 2016

CHARLSON, Emily S. *et al.* Topographical Continuity of Bacterial Populations in the Healthy Human Respiratory Tract. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine** v. 184, n. 8, p. 957–963 , 15 out. 2011. Disponível em: <www.atsjournals.org>.2011040655.

CHARRON, Catherine B.; PAKHALÉ, Smita. The role of airway hyperresponsiveness measured by methacholine challenge test in defining asthma severity in asthma-obesity syndrome. **Current opinion in allergy and clinical immunology** v. 16, n. 3, p. 218–223 , 1 jun. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27054318/>>. Acesso em: 11 ago. 2022.

CHEN, Cheng; XU, Xianglong; YAN, Yan. Estimated global overweight and obesity burden in pregnant women based on panel data model. **PLoS ONE** v. 13, n. 8 , 1 ago. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31814991/>>. Acesso em: 26 maio 2022.

CHEN, Lieping; FLIES, Dallas B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. **Nature reviews. Immunology** v. 13, n. 4, p. 227–242 , abr. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23470321/>>. Acesso em: 3 ago. 2022.

CHEN, Yang-Ching *et al.* Causal relationships between adiposity and childhood asthma: bi-directional Mendelian Randomization analysis. **International Journal of Obesity** v. 43, n. 1, p. 73–81 , 19 jan. 2019. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41366-018-0160-8>>. Acesso em: 5 ago. 2022.

CHU, Derrick M.; ANTONY, Kathleen M.; *et al.* The early infant gut microbiome varies in association with a maternal high-fat diet. **Genome Medicine** v. 8, n. 1, p. 1–12 , 9 ago. 2016. Disponível em: <<https://genomemedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13073-016-0330-z>>. Acesso em: 7 jun. 2022.

CHU, Derrick M; MEYER, Kristen M; *et al.* Impact of maternal nutrition in pregnancy and lactation on offspring gut microbial composition and function. **Gut Microbes** v. 7, n. 6, p. 459–470 , 29 nov. 2016. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=kgmi20>>. Acesso em: 7 jun. 2022.

CLARKE, Siobhan F. *et al.* Targeting the Microbiota to Address Diet-Induced Obesity: A Time Dependent Challenge. **PLoS ONE** v. 8, n. 6, p. e65790 , 7 jun. 2013. Disponível em:

<<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0065790>>. Acesso em: 7 jun. 2022.

COLLINS, Andrew M. *IgG subclass co-expression brings harmony to the quartet model of murine IgG function*. **Immunology and Cell Biology**. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <www.nature.com/icb>. , 2016

CONRAD, Melanie L. *et al.* Maternal TLR signaling is required for prenatal asthma protection by the nonpathogenic microbe *Acinetobacter lwoffii* F78. **Journal of Experimental Medicine** v. 206, n. 13, p. 2869–2877 , 21 dez. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19995952/>>. Acesso em: 7 jun. 2022.

COSTA, Eduardo *et al.* Estimated cost of asthma in outpatient treatment: A real-world study. **Revista de Saude Publica** v. 52, p. 27–27 , 2 abr. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.11606/S1518-8787.2018052000153>>. Acesso em: 1 jul. 2021.

COTRAN, RS *et al.* **Robbins Pathologic Basis of Disease**. 6. ed. Philadelphia: Saunders, 1999. 1424 p. .

COTTRELL, Lesley *et al.* Metabolic abnormalities in children with asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine** v. 183, n. 4, p. 441–448 , 20 dez. 2011. Disponível em: <www.atsjournals.org>. Acesso em: 23 maio 2022.

CVEJOSKA-CHOLAKOVSKA, Valentina *et al.* The Association between Asthma and Obesity in Children - Inflammatory and Mechanical Factors. **Open access Macedonian journal of medical sciences** v. 7, n. 8, p. 1314–1319 , 30 abr. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31110576/>>. Acesso em: 23 jun. 2022.

DAI, Rui xue; HE, Xiu Jie; HU, Chuan Lai. Maternal pre-pregnancy obesity and the risk of macrosomia: a meta-analysis. **Archives of Gynecology and Obstetrics** v. 297, n. 1, p. 139–145 , 1 jan. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29080962/>>. Acesso em: 24 jun. 2022.

DANG, Anh Thu; MARSLAND, Benjamin J. *Microbes, metabolites, and the gut–lung axis*. **Mucosal Immunology**. [S.l.]: Nature Publishing Group. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41385-019-0160-6>>. Acesso em: 8 jan. 2020. , 1 jul. 2019

DE PAULA, Ana Caroline *et al.* Antibiotic Resistance Genetic Markers and Integrins in White Soft Cheese: Aspects of Clinical Resistome and Potentiality of Horizontal Gene Transfer. **Genes** v. 9, n. 2, p. 106 , 19 fev. 2018. Disponível em: <www.mdpi.com/journal/genes>.

DE ZOETEN, Edwin F. *et al.* Inhibition of HDAC9 Increases T Regulatory Cell Function and Prevents Colitis in Mice. **Gastroenterology** v. 138, n. 2, p. 583–594 , 1 fev. 2010.

DESAI, Mina *et al.* Maternal obesity and high-fat diet program offspring metabolic syndrome. **American Journal of Obstetrics and Gynecology** v. 211, n. 3, p. 237.e1-237.e13 , 1 set. 2014.

DESCH, A. Nicole; HENSON, Peter M.; JAKUBZICK, Claudia V. Pulmonary dendritic cell development and antigen acquisition. **Immunologic Research** v. 55, n. 1–3, p. 178–186 , mar. 2013. Disponível em: <[pmc/articles/PMC4153344/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24111057/)>. Acesso em: 23 jun. 2022.

em: 25 maio 2022.

DHARMAGE, Shyamali C. *et al.* Epidemiology of Asthma in Children and Adults. **Frontiers in Pediatrics** | www.frontiersin.org v. 1, n. JUN, p. 246 , 2019. Disponível em: <www.frontiersin.org>. Acesso em: 6 jan. 2020.

DICKSON, Robert P. *et al.* Bacterial Topography of the Healthy Human Lower Respiratory Tract. **mBio** v. 8, n. 1 , 14 jan. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28196961/>>. Acesso em: 9 jan. 2020.

DINGER, Katharina *et al.* Early-onset obesity dysregulates pulmonary adipocytokine/insulin signaling and induces asthma-like disease in mice. **Scientific Reports** v. 6 , 2016. Disponível em: <www.nature.com/scientificreports/>.

DONALDSON, Gregory P.; LEE, S. Melanie; MAZMANIAN, Sarkis K. *Gut biogeography of the bacterial microbiota* .**Nature Reviews Microbiology**. [S.l.]: Nature Publishing Group. , 16 dez. 2015

DOSCH, Natalie C. *et al.* Maternal obesity affects inflammatory and iron indices in umbilical cord blood. **Journal of Pediatrics** v. 172, p. 20–28 , 1 maio 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26970931/>>. Acesso em: 26 maio 2022.

DUMAS, O. *et al.* Longitudinal study of maternal body mass index, gestational weight gain, and offspring asthma. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology** v. 71, n. 9, p. 1295–1304 , set. 2016.

DUNFORD, Ashley R.; SANGSTER, Janice M. Maternal and paternal periconceptional nutrition as an indicator of offspring metabolic syndrome risk in later life through epigenetic imprinting: A systematic review. **Diabetes & metabolic syndrome** v. 11 Suppl 2, p. S655–S662 , 1 dez. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871402117301091>>. Acesso em: 24 jun. 2022.

E-LACERDA, Rodrigo Rodrigues *et al.* Maternal Obesity in Mice Exacerbates the Allergic Inflammatory Response in the Airways of Male Offspring. **Nutrients** v. 11, n. 12, p. 2902 , 1 dez. 2019. Disponível em: <www.mdpi.com/journal/nutrients>.

EARTHMAN, C. P. *et al.* The link between obesity and low circulating 25-hydroxyvitamin D concentrations: considerations and implications. **International Journal of Obesity** v. 36, n. 3, p. 387–396 , 21 mar. 2012. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ijo2011119>>. Acesso em: 23 maio 2022.

EDLOW, Andrea G. *et al.* Placental Macrophages: A Window Into Fetal Microglial Function in Maternal Obesity. **International Journal of Developmental Neuroscience** v. 77, n. 1, p. 60–68 , 1 out. 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/j.ijdevneu.2018.11.004>>. Acesso em: 27 maio 2022.

EGE, Markus J. The Hygiene Hypothesis in the Age of the Microbiome. **Annals of the American Thoracic Society** v. 14, n. Supplement_5, p. S348–S353 , 21 nov. 2017. Disponível em: <www.atsjournals.org>. Acesso em: 23 jul. 2021.

EGE, Markus Johannes *et al.* Prenatal farm exposure is related to the expression of receptors of the innate immunity and to atopic sensitization in school-age children. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** v. 117, n. 4, p. 817–823 , 1 abr. 2006.

ENGSTRÖM, G. *et al.* Lung function, insulin resistance and incidence of cardiovascular disease: A longitudinal cohort study. **Journal of Internal Medicine** v. 253, n. 5, p. 574–581 , 1 maio 2003. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2796.2003.01138.x>>. Acesso em: 23 maio 2022.

EVERAERE, Laetitia *et al.* Innate lymphoid cells contribute to allergic airway disease exacerbation by obesity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** v. 138, n. 5, p. 1309- 1318.e11 , 1 nov. 2016.

FAHY, John V. Type 2 inflammation in asthma — present in most, absent in many. **Nature Reviews Immunology** 2015 **15:1** v. 15, n. 1, p. 57–65 , 23 dez. 2014. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nri3786>>. Acesso em: 29 jul. 2022.

FANG, Han; JUDD, Robert L. Adiponectin regulation and function. **Comprehensive Physiology** v. 8, n. 3, p. 1031–1063 , 1 jul. 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cphy.c170046>>. Acesso em: 19 maio 2022.

FARLEY, D. *et al.* Feto-placental adaptations to maternal obesity in the baboon. **Placenta** v. 30, n. 9, p. 752–760 , set. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19632719/>>. Acesso em: 10 mar. 2022.

FENGER, R. V. *et al.* Determinants of serum tryptase in a general population: the relationship of serum tryptase to obesity and asthma. **International archives of allergy and immunology** v. 157, n. 2, p. 151–158 , fev. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21985913/>>. Acesso em: 30 jun. 2022.

FITZPATRICK, S.; JOKS, R.; SILVERBERG, J. I. Obesity is associated with increased asthma severity and exacerbations, and increased serum immunoglobulin E in inner-city adults. **Clinical and Experimental Allergy** v. 42, n. 5, p. 747–759 , maio 2012.

FOLCI, Marco *et al.* Eosinophils as Major Player in Type 2 Inflammation: Autoimmunity and Beyond. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [S.l.]: Adv Exp Med Biol, 2021. 1347 v. p. 197–219. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34031864/>>. Acesso em: 8 jun. 2022.

FOLKERTS, Jelle *et al.* Butyrate inhibits human mast cell activation via epigenetic regulation of FcεRI-mediated signaling. **Allergy** v. 75, n. 8, p. 1966–1978 , 1 ago. 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nature05414>>. Acesso em: 25 maio 2022.1476-4687 (Electronic)r0028-0836 (Linking).

FONTENOT, Jason D.; GAVIN, Marc A.; RUDENSKY, Alexander Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. **Journal of Immunology** v. 198, n. 3, p. 986–992 , fev. 2017.

FORNO, Erick *et al.* Obesity and airway dysanapsis in children with and without asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine** v. 195, n. 3, p. 314–323 , 1 fev. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27552676/>>. Acesso em: 11 mar. 2022.

FORNO, Erick *et al.* Overweight, Obesity, and Lung Function in Children and Adults-A Meta-analysis. **The journal of allergy and clinical immunology. In practice** v. 6, n. 2, p. 570- 581.e10 , 1 mar. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28967546/>>. Acesso em: 19 jul. 2022.

FRAZIER, Thomas H.; DIBASE, John K.; MCCLAIN, Craig J. Gut microbiota, intestinal permeability, obesity-induced inflammation, and liver injury. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition** v. 35, n. 5 SUPPL. , set. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21807932/>>. Acesso em: 1 jun. 2022.

FRICKER, Michael *et al.* Relationship of sputum mast cells with clinical and inflammatory characteristics of asthma. **Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology** v. 50, n. 6, p. 696–707 , 1 jun. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32291815/>>. Acesso em: 30 jun. 2022.

FUKAKUSA, Motonori *et al.* Oral corticosteroids decrease eosinophil and CC chemokine expression but increase neutrophil, IL-8, and IFN- γ -inducible protein 10 expression in asthmatic airway mucosa. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** v. 115, n. 2, p. 280–286 , fev. 2005.

GAFFEN, Sarah L.; MOUTSOPOULOS, Niki M. Regulation of host-microbe interactions at oral mucosal barriers by type 17 immunity. **Science immunology** v. 5, n. 43 , 3 jan. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31901072/>>. Acesso em: 3 ago. 2022.

GALLEY, Jeffrey D. *et al.* Maternal obesity is associated with alterations in the gut microbiome in toddlers. **PLoS ONE** v. 9, n. 11, p. e113026 , 19 nov. 2014. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0113026>>. Acesso em: 7 jun. 2022.

GALLI, Stephen J; TSAI, Mindy. IgE and mast cells in allergic disease. **Nature Medicine** v. 18, n. 5, p. 693–704 , 2012.

GENSOLLEN, Thomas *et al.* How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. **Science** v. 352, n. 6285, p. 539–544 , 29 abr. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27126036/>>. Acesso em: 25 maio 2022.

GENTEK, Rebecca *et al.* Hemogenic Endothelial Fate Mapping Reveals Dual Developmental Origin of Mast Cells. **Immunity** v. 48, n. 6, p. 1160- 1171.e5 , 19 jun. 2018.

GEORAS, Steve N.; REZAEI, Fariba. Epithelial barrier function: at the front line of asthma immunology and allergic airway inflammation. **The Journal of allergy and clinical immunology** v. 134, n. 3, p. 509–520 , 1 set. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25085341/>>. Acesso em: 3 ago. 2022.

GHABEN, Alexandra L.; SCHERER, Philipp E. *Adipogenesis and metabolic health* .**Nature Reviews Molecular Cell Biology**. [S.l.]: Nature Publishing Group. , abr. 2019

GLOBAL BURDEN OF DISEASE COLLABORATIVE NETWORK. **Global Burden of Disease Study 2019 (GBD 2019)**. Seattle: [s.n.], 2021.

GOLLWITZER, E.S. Eva S. E.S. *et al.* Lung microbiota promotes tolerance to allergens in neonates via PD-L1. **Nat. Med.** v. 20, n. 6, p. 642–647 , 11 maio 2014. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nm.3568>>. Acesso em: 9 jan. 2020.

GONZALEZ-ESPINOSA, Luis Octavio *et al.* Maternal obesity associated with increase in natural killer T cells and CD8+ regulatory T cells in cord blood units.

Transfusion v. 56, n. 5, p. 1075–1081 , 1 maio 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26815139/>>. Acesso em: 10 mar. 2022.

GONZÁLEZ-MUNIESA, Pedro *et al.* Obesity. **Nature Reviews Disease Primers** v. 3, p. 17034 , jun. 2017.

GRAS, Delphine *et al.* Human bronchial epithelium orchestrates dendritic cell activation in severe asthma. **European Respiratory Journal** v. 49, n. 3, p. 1602399 , mar. 2017.

GREEN, Benjamin J. *et al.* Potentially pathogenic airway bacteria and neutrophilic inflammation in treatment resistant severe asthma. **PloS one** v. 9, n. 6 , 23 jun. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24955983/>>. Acesso em: 7 jun. 2022.

GREER, Alexandra M. *et al.* Serum IgE clearance is facilitated by human FcεRI internalization. **The Journal of Clinical Investigation** v. 124, n. 3, p. 1187 , 3 mar. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24955983/>>. Acesso em: 11 ago. 2022.

GRIFFITHS, Pamela S *et al.* Maternal high-fat hypercaloric diet during pregnancy results in persistent metabolic and respiratory abnormalities in offspring. **Pediatric Research** v. 79, n. 2, p. 278–286 , 5 fev. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/pr2015226>>.

GROTTA, Milena Baptistella *et al.* Obesity increases eosinophil activity in asthmatic children and adolescents. **BMC Pulmonary Medicine** v. 13, n. 1, p. 39 , 18 dez. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23773659/>>. Acesso em: 20 jun. 2022.

HALIM, Timotheus Y.F. *et al.* Group 2 innate lymphoid cells are critical for the initiation of adaptive T helper 2 cell-mediated allergic lung inflammation. **Immunity** v. 40, n. 3, p. 425–435 , mar. 2014.

HALLSTRAND, Teal S. *et al.* Genetic pleiotropy between asthma and obesity in a community-based sample of twins. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** v. 116, n. 6, p. 1235–1241 , dez. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16337451/>>. Acesso em: 27 jan. 2021.

HAN, Yueh-Ying *et al.* Diet and asthma: an update. **Current opinion in allergy and clinical immunology** v. 15, n. 4, p. 369–74 , ago. 2015. Disponível em: <<https://journals.lww.com/00130832-201508000-00016>>.

HANSON, Corrine *et al.* The relationship between dietary fiber intake and lung function in the national health and nutrition examination surveys. **Annals of the American Thoracic Society** v. 13, n. 5, p. 643–650 , 1 maio 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26783997/>>. Acesso em: 23 maio 2022.

HARPSØE, Maria C. *et al.* Maternal obesity, gestational weight gain, and risk of asthma and atopic disease in offspring: A study within the Danish National Birth Cohort. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** v. 131, n. 4, p. 1033–1040 , abr. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23122630/>>. Acesso em: 10 mar. 2022.

HARTL, Dominik *et al.* Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4+CD25hi regulatory T cells in pediatric asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** v. 119, n. 5, p. 1258–1266 , maio 2007.

HASPESLAGH, Eline *et al.* *The hygiene hypothesis: immunological*

mechanisms of airway tolerance. **Current Opinion in Immunology**. [S.l.]: Elsevier Current Trends. , out. 2018

HAUGUEL-DE MOUZON, S.; GUERRE-MILLO, M. The Placenta Cytokine Network and Inflammatory Signals. **Placenta** v. 27, n. 8, p. 794–798 , 1 ago. 2006.

HERBST, Tina *et al.* Dysregulation of allergic airway inflammation in the absence of microbial colonization. **American journal of respiratory and critical care medicine** v. 184, n. 2, p. 198–205 , 15 jul. 2011. Disponível em: <www.atsjournals.org>. Acesso em: 25 maio 2022.

HILLIGAN, Kerry L; RONCHESE, Franca. Antigen presentation by dendritic cells and their instruction of CD4+ T helper cell responses. , 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41423-020-0465-0>>.

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

HOGQUIST, Kristin; GEORGIEV, Hristo. Recent advances in iNKT cell development. **F1000Research** v. 9, p. 127 , 20 fev. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32148771/>>. Acesso em: 7 jun. 2022.

HOLGATE, Stephen T. *et al.* Asthma. **Nature Reviews Disease Primers** v. 1, n. 1 , set. 2015.

HOLGATE, Stephen T. Innate and adaptive immune responses in asthma. **Nature Medicine** v. 18, n. 5, p. 673–683 , 4 maio 2012. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nm.2731>>. 1365-2222 (Electronic) 0954-7894 (Linking).

HOLGUIN, F. *et al.* Obesity and asthma: an association modified by age of asthma onset. **J Allergy Clin Immunol** v. 127 , 2011.

HOLGUIN, Fernando *et al.* An association between L-arginine/asymmetric dimethyl arginine balance, obesity, and the age of asthma onset phenotype. **American journal of respiratory and critical care medicine** v. 187, n. 2, p. 153–159 , 15 jan. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23204252/>>. Acesso em: 22 jun. 2022.

HOTAMISLIGIL, Gökhan S. Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic Disease. **Cell** v. 140, n. 6, p. 900–917 , 19 mar. 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009286741000187X>>. Acesso em: 23 maio 2022.

HUANG, Fei *et al.* Association of imbalance of effector T cells and regulatory cells with the severity of asthma and allergic rhinitis in children. **Allergy and Asthma Proceedings** v. 38, n. 6, p. e70–e77 , nov. 2017.

HUANG, Yvonne J. *et al.* The airway microbiome in patients with severe asthma: Associations with disease features and severity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** v. 136, n. 4, p. 874–884 , 1 out. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26220531/>>. Acesso em: 10 jan. 2020.

IBRAHIM, Mahmoud H. *et al.* Cord blood erythropoietin and cord blood nucleated red blood cells for prediction of adverse neonatal outcome associated with maternal obesity in term pregnancy: prospective cohort study. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine** v. 30, n. 18, p. 2237–2242 , 17 set. 2017. Disponível

em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27690727/>>. Acesso em: 10 mar. 2022.

IIKURA, Motoyasu *et al.* The importance of bacterial and viral infections associated with adult asthma exacerbations in clinical practice. **PloS one** v. 10, n. 4, p. e0123584 , 22 abr. 2015. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0123584>>. Acesso em: 7 jun. 2022.

JANSON, Christer *et al.* Risk factors associated with allergic and non-allergic asthma in adolescents. **The clinical respiratory journal** v. 1, n. 1, p. 16–22 , 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20298273/>>. Acesso em: 5 ago. 2022.

JOHANSSON, S. G. O. *et al.* A revised nomenclature for allergy: An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. **Allergy** v. 56, n. 9, p. 813–824 , 1 set. 2008. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1398-9995.2001.00002.x-i1>>. Acesso em: 8 fev. 2022.

JOHNSTON, Sebastian L. *et al.* Airway Epithelial Innate Immunity. **Frontiers in Physiology** v. 12, p. 2090 , 2021.

JONCKHEERE, Anne Charlotte; BULLENS, Dominique M.A.; SEYS, Sven F. *Innate lymphoid cells in asthma: Pathophysiological insights from murine models to human asthma phenotypes* .**Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**. [S.I.]: Lippincott Williams and Wilkins. Disponível em: <<https://journals.lww.com/00130832-201902000-00010>>. Acesso em: 9 fev. 2021. , fev. 2019

JÖNSSON, Friederike *et al.* An IgG-induced neutrophil activation pathway contributes to human drug-induced anaphylaxis. **Science translational medicine** v. 11, n. 500 , 10 jul. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31292264/>>. Acesso em: 22 jun. 2022.

JOUNIO, Ulla *et al.* Pneumococcal carriage is more common in asthmatic than in non-asthmatic young men. **Clinical Respiratory Journal** v. 4, n. 4, p. 222–229 , out. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20887345/>>. Acesso em: 7 jun. 2022.

JOVICIC, Nemanja *et al.* Differential Immunometabolic Phenotype in Th1 and Th2 Dominant Mouse Strains in Response to High-Fat Feeding. **PLOS ONE** v. 10, n. 7, p. e0134089 , 28 jul. 2015. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0134089>>. Acesso em: 29 jul. 2022.

JUNG, Un Ju; CHOI, Myung Sook. *Obesity and its metabolic complications: The role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease* .**International Journal of Molecular Sciences**. [S.I.]: MDPI AG. , abr. 2014

KAMIMAE-LANNING, Ashley N. *et al.* Maternal high-fat diet and obesity compromise fetal hematopoiesis. **Molecular Metabolism** v. 4, n. 1, p. 25–38 , 1 jan. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molmet.2014.11.001>>. Acesso em: 10 mar. 2022.

KAN, Haidong *et al.* Dietary fiber, lung function, and chronic obstructive

pulmonary disease in the atherosclerosis risk in communities study. **American Journal of Epidemiology** v. 167, n. 5, p. 570–578 , 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18063592/>>. Acesso em: 23 maio 2022.

KAWAI, Tatsuo; AUTIERI, Michael V; SCALIA, Rosario. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. **American Journal of Physiology - Cell Physiology** v. 320, n. 3, p. C375–C391 , 2021. Disponível em: <www.ajpcell.org>.

KIM, Hye Young *et al.* Interleukin-17–producing innate lymphoid cells and the NLRP3 inflammasome facilitate obesity-associated airway hyperreactivity. **Nature Medicine** v. 20, n. 1, p. 54–61 , 15 jan. 2014. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nm.3423>>. Acesso em: 10 fev. 2021.

KO, Sun Hye *et al.* Lipid profiles in adolescents with and without asthma: Korea National Health and nutrition examination survey data. **Lipids in Health and Disease** v. 17, n. 1, p. 1–7 , 18 jul. 2018. Disponível em: <<https://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12944-018-0807-4>>. Acesso em: 23 maio 2022.

KOPF, Manfred; SCHNEIDER, Christoph; NOBS, Samuel P. *The development and function of lung-resident macrophages and dendritic cells*. **Nature Immunology**. [S.l.]: Nat Immunol. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25521683/>>. Acesso em: 25 maio 2022. , 18 dez. 2015

LA CAVA, Antonio. *Leptin in inflammation and autoimmunity*. **Cytokine**. [S.l.]: Academic Press. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2016.10.011>>. Acesso em: 12 maio 2022. , 1 out. 2017

LAZARUS, R; SPARROW, D; WEISS, S. T. Impaired ventilatory function and elevated insulin levels in nondiabetic males: The Normative Aging Study. **European Respiratory Journal** v. 12, n. 3, p. 635–640 , 1998.

LEE, Jongan *et al.* Alterations of lung microbial communities in obese allergic asthma and metabolic potential. **PLoS ONE** v. 16, n. 10 October , 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256848>>.1111111111.

LEZMI, Guillaume *et al.* Mast cells are associated with exacerbations and eosinophilia in children with severe asthma. **The European respiratory journal** v. 48, n. 5, p. 1320–1328 , 1 nov. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27799385/>>. Acesso em: 30 jun. 2022.

LIN, Hui *et al.* Maternal High-Fat Diet Aggravates Allergic Asthma in Offspring via Modulating CD4 + T-Cell Differentiation. **Nutrients** v. 14, n. 12, p. 2508 , 16 jun. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35745240/>>. Acesso em: 15 ago. 2022.

LIU, Ailing *et al.* Bone marrow lympho-myeloid malfunction in obesity requires precursor cell-autonomous TLR4. **Nature Communications** v. 9, n. 1 , 1 dez. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29453396/>>. Acesso em: 10 mar. 2022.

LIU, Jing *et al.* Maternal microbiome regulation prevents early allergic airway diseases in mouse offspring. **Pediatric Allergy and Immunology** v. 31, n. 8, p. 962–973 , 1 nov. 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/pai.13315>>. Acesso em: 10 jun.

2022.

LIU, Shufang *et al.* Pre-pregnancy maternal weight and gestational weight gain increase the risk for childhood asthma and wheeze: An updated meta-analysis. **Frontiers in Pediatrics** v. 8, p. 134 , 3 abr. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32309270/>>. Acesso em: 27 jan. 2021.

LLOYD-PRICE, Jason; ABU-ALI, Galeb; HUTTENHOWER, Curtis. The healthy human microbiome. **Genome medicine** v. 8, n. 1, p. 51 , 27 dez. 2016. Disponível em: <<http://genomemedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13073-016-0307-y>>.

LLOYD, Clare M.; SAGLANI, Sejal. Eosinophils in the Spotlight: Finding the link between obesity and asthma. **Nature Medicine** 2013 19:8 v. 19, n. 8, p. 976–977 , 6 ago. 2013. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nm.3296>>. Acesso em: 1 ago. 2022.

LOMAS-SORIA, Consuelo *et al.* Maternal obesity has sex-dependent effects on insulin, glucose and lipid metabolism and the liver transcriptome in young adult rat offspring. **The Journal of physiology** v. 596, n. 19, p. 4611–4628 , 1 out. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29972240/>>. Acesso em: 2 ago. 2022.

LOVERDOS, Konstantinos *et al.* Lung microbiome in asthma: Current perspectives .**Journal of Clinical Medicine**. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2077-0383/8/11/1967>>. Acesso em: 10 jan. 2020. , 14 nov. 2019

LUMIA, Mirka *et al.* Dietary fatty acid composition during pregnancy and the risk of asthma in the offspring. **Pediatric Allergy and Immunology** v. 22, n. 8, p. 827–835 , 1 dez. 2011. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1399-3038.2011.01202.x>>. Acesso em: 1 jun. 2022.

MA, Yunsheng *et al.* Association between dietary fiber and markers of systemic inflammation in the Women’s Health Initiative Observational Study. **Nutrition** v. 24, n. 10, p. 941–949 , out. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18562168/>>. Acesso em: 23 maio 2022.

MA, Yunsheng *et al.* Association between dietary fiber and serum C-reactive protein. **American Journal of Clinical Nutrition** v. 83, n. 4, p. 760–766 , 1 abr. 2006. Disponível em: <</pmc/articles/PMC1456807/>>. Acesso em: 23 maio 2022.

MACDONALD, Kelvin D. *et al.* Maternal high-fat diet in mice leads to innate airway hyperresponsiveness in the adult offspring. **Physiological Reports** v. 5, n. 5 , 1 mar. 2017. Disponível em: <</pmc/articles/PMC5350159/>>. Acesso em: 24 maio 2021.

MAK, Tak W.; SAUNDERS, Mary E.; JETT, Bradley D. Immune Hypersensitivity. **Primer to the Immune Response**. [S.l.]: Elsevier, 2014. p. 487–516. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123852458000182>>. Acesso em: 18 jul. 2022. 978-0-12-385245-8.

MAMOUNIS, Kyle J *et al.* The effects of dietary fatty acids in the physiological outcomes of maternal high-fat diet on offspring energy homeostasis in mice. **Journal**

of **Developmental Origins of Health and Disease** v. 11, n. 3, p. 273–284 , 2020. Disponível em: <www.cambridge.org/dohOriginalArticle>.

MARBACH, Daniel *et al.* Wisdom of crowds for robust gene network inference. **Nature methods** v. 9, n. 8, p. 796–804 , ago. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22796662/>>. Acesso em: 15 ago. 2022.

MARCHI, J. *et al.* Risks associated with obesity in pregnancy, for the mother and baby: a systematic review of reviews. **Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity** v. 16, n. 8, p. 621–38 , 1 ago. 2015. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/obr.12288>>. Acesso em: 26 maio 2022.

MARSLAND, Benjamin J.; TROMPETTE, Aurélien; GOLLWITZER, Eva S. The Gut-Lung Axis in Respiratory Disease. **Annals of the American Thoracic Society** v. 12 Suppl 2, p. S150–S156 , 1 nov. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26595731/>>. Acesso em: 7 jun. 2022.

MARTÍNEZ, Inés *et al.* Gut microbiome composition is linked to whole grain-induced immunological improvements. **ISME Journal** v. 7, n. 2, p. 269–280 , 4 out. 2013. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ismej2012104>>. Acesso em: 7 jun. 2022.

MATHIEU, Elliot *et al.* Paradigms of Lung Microbiota Functions in Health and Disease, Particularly, in Asthma. **Frontiers in Physiology** v. 9, n. AUG, p. 1168 , 21 ago. 2018. Disponível em: <www.frontiersin.org>. Acesso em: 9 jan. 2020.

MATSUDA, K. *et al.* Increment of IgE production in obese children. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** v. 115, n. 2, p. S169 , 1 fev. 2005. Disponível em: <<http://www.jacionline.org/article/S0091674904039429/fulltext>>. Acesso em: 11 mar. 2022.

MAYA-LUCAS, Otoniel *et al.* The gut microbiome of Mexican children affected by obesity. **Anaerobe** v. 55, p. 11–23 , 1 fev. 2019.

MCCURDY, Carrie E. *et al.* Maternal high-fat diet triggers lipotoxicity in the fetal livers of nonhuman primates. **The Journal of clinical investigation** v. 119, n. 2, p. 323–335 , 2 fev. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19147984/>>. Acesso em: 10 mar. 2022.

MCGILLICK, Erin V. *et al.* *Maternal obesity mediated predisposition to respiratory complications at birth and in later life: understanding the implications of the obesogenic intrauterine environment*. **Paediatric Respiratory Reviews**. [S.l.]: W.B. Saunders Ltd. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27818069/>>. Acesso em: 27 jan. 2021. , 1 jan. 2017

MCMILLEN, I. C. *et al.* Prenatal programming of postnatal obesity: fetal nutrition and the regulation of leptin synthesis and secretion before birth. **Proceedings of the Nutrition Society** v. 63, n. 3, p. 405–412 , 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1079/PNS2004370>>.

MÉNDEZ-ENRÍQUEZ, Erika; HALLGREN, Jenny. *Mast cells and their progenitors in allergic Asthma*. **Frontiers in Immunology**. [S.l.]: Frontiers Media S.A. , maio 2019

MICHALOVICH, David; RODRIGUEZ-PEREZ, Noelia; SMOLINSKA, Sylwia;

PIROZYNSKI, Michal; MAYHEW, David; UDDIN, Sorif; *et al.* Obesity and disease severity magnify disturbed microbiome-immune interactions in asthma patients. **Nature Communications** 2019 **10:1** v. 10, n. 1, p. 1–14 , dez. 2019.

MICHALOVICH, David; RODRIGUEZ-PEREZ, Noelia; SMOLINSKA, Sylwia; PIROZYNSKI, Michal; MAYHEW, David; O'MAHONY, Liam; *et al.* Obesity and disease severity magnify disturbed microbiome-immune interactions in asthma patients. **Nature Communications** v. 10, n. 1, p. 1–14 , 1 dez. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41467-019-13751-9>>. Acesso em: 13 jan. 2020.

MILLS, Susan *et al.* Precision nutrition and the microbiome, part I: Current state of the science. **Nutrients** v. 11, n. 4, p. 923 , 24 abr. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31022973/>>. Acesso em: 25 maio 2022.

MOORE, Wendy C. *et al.* Identification of Asthma Phenotypes Using Cluster Analysis in the Severe Asthma Research Program. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine** v. 181, n. 4, p. 315–323 , 15 fev. 2010. Disponível em: <<http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/rccm.200906-0896OC>>.

MORRIS, Alison *et al.* Comparison of the respiratory microbiome in healthy nonsmokers and smokers. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine** v. 187, n. 10, p. 1067–1075 , 2013. Disponível em: <www.atsjournals.org>. Acesso em: 7 jun. 2022.

MOURALIDARANE, Angelina *et al.* Maternal obesity programs offspring nonalcoholic fatty liver disease by innate immune dysfunction in mice. **Hepatology** v. 58, n. 1, p. 128–138 , jul. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23315950/>>. Acesso em: 10 mar. 2022.

MULHEM, Arij *et al.* Circulating cell adhesion molecules in metabolically healthy obesity. **International Journal of Obesity** v. 45, n. 2, p. 331–336 , 1 fev. 2021.

MURRAY, Patrick R; ROSENTHAL, KS; PFALLER, MA. **Microbiologia Médica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. 888 p. .853528575X.

MURTHI, Padma; RAJARAMAN, Gayathri. Inflammasomes in the Pathophysiology of Maternal Obesity: Potential Therapeutic Targets to Reduce Long-Term Adverse Health Outcomes in the Mother and Offspring. **Current Vascular Pharmacology** v. 19, n. 2, p. 165–175 , 4 jun. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32493196/>>. Acesso em: 9 mar. 2022.

MURUGESAN, S. *et al.* Study of the diversity and short-chain fatty acids production by the bacterial community in overweight and obese Mexican children. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases** v. 34, n. 7, p. 1337–1346 , 23 jul. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25761741/>>. Acesso em: 2 jun. 2022.

MYLES, Ian A *et al.* Parental Dietary Fat Intake Alters Offspring Microbiome and Immunity. **The Journal of Immunology** v. 191, n. 6, p. 3200–3209 , 2013. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/191/6/3200>>.

NAGEL, Gabriele *et al.* Effect of diet on asthma and allergic sensitisation in the international study on allergies and asthma in childhood (ISAAC) phase two. **Thorax** v. 65, n. 6, p. 516–522 , 2010. Disponível em: <<http://thorax.bmj.com/>>.

NAKAJIMA, Akihito *et al.* Maternal High Fiber Diet during Pregnancy and

Lactation Influences Regulatory T Cell Differentiation in Offspring in Mice. **The Journal of Immunology** v. 199, n. 10, p. 3516–3524 , 15 nov. 2017. Disponível em: <<https://www.jimmunol.org/content/199/10/3516>>. Acesso em: 10 jun. 2022.

NOVAL RIVAS, Magali; CHATILA, Talal A. *Regulatory T cells in allergic diseases*. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. [S.l: s.n.], set. 2016

NYAMBUYA, Tawanda Maurice *et al.* Obesity-related asthma in children is characterized by T-helper 1 rather than T-helper 2 immune response: A meta-analysis. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology** v. 125, n. 4, p. 425- 432.e4 , 1 out. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32561508/>>. Acesso em: 23 jun. 2022.

ODAKA, Yukino *et al.* The Influence of a High-Fat Dietary Environment in the Fetal Period on Postnatal Metabolic and Immune Function. **Obesity** v. 18, n. 9, p. 1688–1694 , set. 2010. Disponível em: <www.obesityjournal.org>.

OHNMACHT, Caspar *et al.* MUCOSAL IMMUNOLOGY. The microbiota regulates type 2 immunity through ROR γ ⁺ T cells. **Science (New York, N.Y.)** v. 349, n. 6251, p. 989–993 , 28 ago. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26160380/>>. Acesso em: 3 ago. 2022.

OLBRICH, Courtney L. *et al.* Remote allergen exposure elicits eosinophil infiltration into allergen nonexposed mucosal organs and primes for allergic inflammation. v. 13, n. 5, p. 777–787 , 1 set. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27548519/>>. Acesso em: 20 jun. 2022.

OLIVEIRA, Erick Esteves De *et al.* Obesity affects peripheral lymphoid organs immune response in murine asthma model. **Immunology** v. 157, n. 3, p. 268–279 , 21 jul. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31112301/>>. Acesso em: 18 jan. 2021.

OLSZAK, Torsten *et al.* Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. **Science** v. 336, n. 6080, p. 489–493 , 27 abr. 2012. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1219328>>. Acesso em: 7 jun. 2022.

PARK, Sangshin *et al.* The relationship between metabolic syndrome and asthma in the elderly. **Scientific Reports** v. 8, n. 1, p. 1–8 , 20 jun. 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-018-26621-z>>. Acesso em: 23 maio 2022.

PATTARONI, Céline *et al.* Early-Life Formation of the Microbial and Immunological Environment of the Human Airways. **Cell Host and Microbe** v. 24, n. 6, p. 857- 865.e4 , 2018.

PAVORD, Ian D. *et al.* After asthma: redefining airways diseases. **The Lancet** v. 391, n. 10118, p. 350–400 , jan. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673617308796>>.

PEREZ, Amalui Vasquez *et al.* Characterization Of Severe Asthma In The Pediatric Population. **Allergologia et Immunopathologia** v. 49, n. 2, p. 60–65 , 2021. Disponível em: <www.all-imm.com><<http://creativecommons.org/>>. Acesso em: 20 jun. 2022.

PERIYALIL, Hashim A. *et al.* Macrophage activation, age and sex effects of immunometabolism in obese asthma. **European Respiratory Journal** v. 45, n. 2, p.

388–395 , 1 fev. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25186264/>>. Acesso em: 16 mar. 2021.

PETERS, Ubong *et al.* *Beyond BMI: Obesity and Lung Disease* .**Chest**. [S.l.]: Elsevier Inc. Disponível em: <<http://journal.chestnet.org/article/S0012369217312606/fulltext>>. Acesso em: 19 jan. 2021. , 1 mar. 2018

QIN, Junjie *et al.* A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature** v. 464, n. 7285, p. 59–65 , 2010.

QIU, Hongyu *et al.* Acinetobacter baumannii infection inhibits airway eosinophilia and lung pathology in a mouse model of allergic asthma. **PLoS ONE** v. 6, n. 7 , 2011. Disponível em: <www.plosone.org>.

RAY, Anuradha; KOLLS, Jay K. Neutrophilic Inflammation in Asthma and Association with Disease Severity. **Trends in immunology** v. 38, n. 12, p. 942–954 , 1 dez. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28784414/>>. Acesso em: 1 ago. 2022.

REMOT, Aude *et al.* Bacteria isolated from lung modulate asthma susceptibility in mice. **ISME Journal** v. 11, n. 5, p. 1061–1074 , 3 jan. 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ismej2016181>>. Acesso em: 7 jun. 2022.

RENZ, Harald; SKEVAKI, Chrysanthi. *Early life microbial exposures and allergy risks: opportunities for prevention* .**Nature Reviews Immunology**. [S.l.]: Nature Research. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41577-020-00420-y>>. Acesso em: 24 abr. 2021. , 1 mar. 2021

RODUIT, Caroline *et al.* High levels of butyrate and propionate in early life are associated with protection against atopy. **Allergy** v. 74, n. 4, p. 799–809 , 25 abr. 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/all.13660>>.

ROOK, G. A.W.; BRUNET, L. R. Microbes, immunoregulation, and the gut. **Gut** v. 54, n. 3, p. 317–320 , 1 mar. 2005. Disponível em: <<https://gut.bmj.com/content/54/3/317.1>>. Acesso em: 21 jul. 2022.2004;199:156775.

ROSENSTOCK, Julio *et al.* Safety and Efficacy of Inhaled Human Insulin (Exubera) During Discontinuation and Readministration of Therapy in Adults with Type 2 Diabetes: A 3-Year Randomized Controlled Trial. **Diabetes Technology & Therapeutics** v. 11, n. 11, p. 697–705 , 11 nov. 2009. Disponível em: <<https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/dia.2009.0062>>. Acesso em: 23 maio 2022.

ROWSHANRAVAN, Behzad; HALLIDAY, Neil; SANSOM, David M. CTLA-4: a moving target in immunotherapy. **Blood** v. 131, n. 1, p. 58–67 , 4 jan. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29118008/>>. Acesso em: 15 ago. 2022.

RUCCI, E. *et al.* Maternal fatty acid levels during pregnancy, childhood lung function and atopic diseases. The Generation R Study. **Clinical and Experimental Allergy** v. 46, n. 3, p. 461–471 , 1 mar. 2016. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/cea.12613>>. Acesso em: 1 jun. 2022.

SANSONE, Francesco *et al.* Asthma and obesity in children. **Biomedicines** v. 8, n. 7 , 2020. Disponível em: <www.mdpi.com/journal/biomedicines>. Acesso em:

18 jan. 2021.

SCHEURER, S.; TODA, M.; VIETHS, S. What makes an allergen? **Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology** v. 45, n. 7, p. 1150–1161 , 1 jul. 2015. Disponível em: <www.allergen.org>. Acesso em: 8 fev. 2022.

SCOTT, H.A. *et al.* Airway inflammation is augmented by obesity and fatty acids in asthma. v. 38, n. 3, p. 594–602 , 1 set. 2011. Disponível em: <<https://erj.ersjournals.com/content/38/3/594>>. Acesso em: 23 jul. 2021.

SERENA, Carolina *et al.* Elevated circulating levels of succinate in human obesity are linked to specific gut microbiota. **ISME Journal** v. 12, n. 7, p. 1642–1657 , 1 jun. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29434314/>>. Acesso em: 2 jun. 2022.

SHAN, Li Shen; ZHOU, Qian Lan; SHANG, Yun Xiao. *Bidirectional Association Between Asthma and Obesity During Childhood and Adolescence: A Systematic Review and Meta-Analysis*. **Frontiers in Pediatrics**. [S.l.]: Frontiers Media S.A. , 29 out. 2020

SHOAI, Saeed *et al.* Understanding the interactions between bacteria in the human gut through metabolic modeling. **Scientific Reports** v. 3, n. 1, p. 1–10 , 28 ago. 2013. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/srep02532>>. Acesso em: 7 jun. 2022.

SHUM, Bennett O.V. *et al.* The adipocyte fatty acid-binding protein aP2 is required in allergic airway inflammation. **Journal of Clinical Investigation** v. 116, n. 8, p. 2183–2192 , 1 ago. 2006. Disponível em: <<http://www.jci.org>>. Acesso em: 23 maio 2022.

SILVA, F. M.C. C. *et al.* Obesity promotes prolonged ovalbumin-induced airway inflammation modulating T helper type 1 (Th1), Th2 and Th17 immune responses in BALB/c mice. **Clinical and Experimental Immunology** v. 189, n. 1, p. 47–59 , 6 jun. 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/cei.12958>>. Acesso em: 18 jan. 2021.8222123270.

SILVA, Marília Lúcia Costa *et al.* Prevalência da asma e a importância do cuidado na infância / Prevalence of asthma and the importance of child care. **Brazilian Journal of Health Review** v. 5, n. 2, p. 5207–5218 , 25 mar. 2022. Disponível em: <<https://www.brazilianjournals.com/index.php/BJHR/article/view/45581/pdf>>. Acesso em: 12 maio 2022.

SINGH, Rasnik K *et al.* *Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health*. **Journal of Translational Medicine**. [S.l.: s.n.]. , 2017

SINGH, Suchita *et al.* Hyperinsulinemia adversely affects lung structure and function. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology** v. 310, n. 9, p. L837–L845 , 1 mar. 2016. Disponível em: <<https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajplung.00091.2015>>. Acesso em: 23 maio 2022.

SISMANOPOULOS, N *et al.* Do mast cells link obesity and asthma? **Allergy** v. 68, n. 1, p. 8–15 , jan. 2013. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/all.12043>>.

SODERBORG, Taylor K. *et al.* The gut microbiota in infants of obese mothers increases inflammation and susceptibility to NAFLD. **Nature Communications** v. 9, n. 1, 1 dez. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30367045/>>. Acesso em: 10 mar. 2022.

STEFANIAK, Małgorzata *et al.* Maternal serum and cord blood leptin concentrations at delivery. **PLoS ONE** v. 14, n. 11, 1 nov. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31697751/>>. Acesso em: 30 maio 2022.

STOLARCZYK, Emilie. Adipose tissue inflammation in obesity: a metabolic or immune response? **Current Opinion in Pharmacology** v. 37, p. 35–40, 1 dez. 2017.

STRACHAN, D. P. Hay fever, hygiene, and household size. **BMJ (Clinical research ed.)** v. 299, n. 6710, p. 1259–60, 18 nov. 1989. Disponível em: <<https://www.bmj.com/content/299/6710/1259>>. Acesso em: 7 jun. 2022.

SU, Xinming *et al.* Association between lipid profile and the prevalence of asthma: a meta-analysis and systemic review. **Current medical research and opinion** v. 34, n. 3, p. 423–433, 10 nov. 2018. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03007995.2017.1384371>>. Acesso em: 23 maio 2022.

SURESHCHANDRA, Suhas *et al.* Maternal Pregravid Obesity Remodels the DNA Methylation Landscape of Cord Blood Monocytes Disrupting Their Inflammatory Program. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)** v. 199, n. 8, p. 2729–2744, 15 out. 2017. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/199/8/2729>>. Acesso em: 10 mar. 2022.

SURESHCHANDRA, Suhas; MARSHALL, Nicole E; MESSAOUDI, Ilhem. *Impact of pregravid obesity on maternal and fetal immunity: Fertile grounds for reprogramming*. **Journal of Leukocyte Biology**. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <www.jleukbio.org>. , 2019

SUZUKAWA, Maho *et al.* Leptin enhances ICAM-1 expression, induces migration and cytokine synthesis, and prolongs survival of human airway epithelial cells. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology** v. 309, n. 8, p. L801–L811, 2015.

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

THORSEN, Jonathan *et al.* Infant airway microbiota and topical immune perturbations in the origins of childhood asthma. **Nature Communications** v. 10, n. 1, p. 1–8, nov. 2019.

TRAN, Trung N. *et al.* High blood eosinophil count is associated with more frequent asthma attacks in asthma patients. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology** v. 113, n. 1, p. 19–24, 2014.

TROMPETTE, Aurélien *et al.* Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. **Nature medicine** v. 20, n. 2, p. 159–166, 5 fev. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24390308/>>. Acesso em: 9 jan. 2020.

TROY, Erin B.; KASPER, Dennis L. Beneficial effects of *Bacteroides fragilis*

polysaccharides on the immune system. **Frontiers in Bioscience** v. 15, n. 1, p. 25–34 , 1 jan. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20036803/>>. Acesso em: 7 jun. 2022.

TUN, Hein M *et al.* Roles of birth mode and infant gut microbiota in intergenerational transmission of overweight and obesity from mother to offspring. **JAMA Pediatrics** v. 172, n. 4, p. 368–377 , 2018. Disponível em: <<http://www.childstudy.ca>>.

TURNBAUGH, Peter J. *et al.* A core gut microbiome in obese and lean twins. **Nature** v. 457, n. 7228, p. 480–484 , 30 jan. 2009. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nature07540>>. Acesso em: 9 jan. 2020.

TURNBAUGH, Peter J. *et al.* An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature** v. 444, n. 7122, p. 1027–1031 , 2006.1476-4687 (Electronic)r0028-0836 (Linking).

UBAGS, Niki D. *et al.* Microbiome-induced antigen-presenting cell recruitment coordinates skin and lung allergic inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** v. 147, n. 3, p. 1049- 1062.e7 , 1 mar. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32679208/>>. Acesso em: 7 jun. 2022.

URIBE-QUEROL, Eileen; ROSALES, Carlos. Neutrophils Actively Contribute to Obesity-Associated Inflammation and Pathological Complications. **Cells** v. 11, n. 12, p. 1883 , 10 jun. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35741012/>>. Acesso em: 1 ago. 2022.

VAAMONDE. J. Gargallo; ÁLVAREZ-MÓN. M. A. Obesity and overweight. , abr. 2020, p. 767–776 . Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>. Acesso em: 7 jan. 2020.

VAMANU, Emanuel; PELINESCU, Diana; SARBU, Ionela. Comparative Fingerprinting of the Human Microbiota in Diabetes and Cardiovascular Disease. **Journal of medicinal food** v. 19, n. 12, p. 1188–1195 , 1 dez. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27898282/>>. Acesso em: 5 ago. 2022.

VANDANMAGSAR, Bolormaa *et al.* The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. **Nature Medicine** v. 17, n. 2, p. 179–189 , 9 jan. 2011. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nm.2279>>. Acesso em: 23 maio 2022.

VASILAKOS, Lauren K. *et al.* Umbilical Cord Blood Leptin and IL-6 in the Presence of Maternal Diabetes or Chorioamnionitis. **Frontiers in Endocrinology** v. 13 , 7 fev. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35197933/>>. Acesso em: 30 maio 2022.

VENKATARAMAN, Arvind *et al.* Application of a neutral community model to assess structuring of the human lung microbiome. **mBio** v. 6, n. 1 , 20 jan. 2015. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/mBio.02284-14>>. Acesso em: 7 jun. 2022.

VENTER, Carina *et al.* The maternal diet index in pregnancy is associated with offspring allergic diseases: the Healthy Start study. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology** v. 77, n. 1, p. 162–172 , 1 jan. 2022.

VERSALOVIC, James; KOEUTH, Thearith; LUPSKI, R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial

genomes. **Nucleic Acids Research** v. 19, n. 24, p. 6823 , 12 dez. 1991. Disponível em: </pmc/articles/PMC329316/?report=abstract>. Acesso em: 5 jul. 2022.

VISNESS, Cynthia M. *et al.* Association of childhood obesity with atopic and nonatopic asthma: Results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2006. **Journal of Asthma** v. 47, n. 7, p. 822–829 , set. 2010.

WANG, F. *et al.* Different inflammatory phenotypes in adults and children with acute asthma. **European Respiratory Journal** v. 38, n. 3, p. 567–574 , 2011.1399-3003 (Electronic) 0903-1936 (Linking).

WANKHADE, Umesh D. *et al.* Enhanced offspring predisposition to steatohepatitis with maternal high-fat diet is associated with epigenetic and microbiome alterations. **PLoS ONE** v. 12, n. 4, p. e0175675 , 1 abr. 2017. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0175675>. Acesso em: 7 jun. 2022.1111111111.

WECHSLER, Michael E. *et al.* Eosinophils in Health and Disease: A State-of-the-Art Review. **Mayo Clinic Proceedings** v. 96, n. 10, p. 2694–2707 , 1 out. 2021. Disponível em: <http://www.mayoclinicproceedings.org/article/S0025619621004067/fulltext>. Acesso em: 30 jun. 2022.

WHO, World Health Organization. *Asthma*. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/asthma>. Acesso em: 1 jul. 2021.

WILSON, Randall M. *et al.* Maternal obesity alters immune cell frequencies and responses in umbilical cord blood samples. **Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology** v. 26, n. 4, p. 344–351 , 1 jun. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25858482/>. Acesso em: 8 mar. 2022.

WILSON, Randall M.; MESSAOUDI, Ilhem. The impact of maternal obesity during pregnancy on offspring immunity. n. 0 2, p. 134–142 , 15 dez. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26232506/>. Acesso em: 8 mar. 2022.

WINTER, Sebastian E.; BÄUMLER, Andreas J. Dysbiosis in the inflamed intestine: Chance favors the prepared microbe. **Gut Microbes** v. 5, n. 1, p. 71–73 , 1 jan. 2014. Disponível em: </pmc/articles/PMC4049941/>. Acesso em: 7 jun. 2022.

WOOD, Lisa G. Diet, obesity, and asthma. **Annals of the American Thoracic Society** v. 14, p. S332–S338 , 1 nov. 2017. Disponível em: <www.atsjournals.org>. Acesso em: 23 maio 2022.

WOOD, Lisa G. *et al.* Manipulating antioxidant intake in asthma: A randomized controlled trial1-3. **American Journal of Clinical Nutrition** v. 96, n. 3, p. 534–543 , 1 set. 2012. Disponível em: <https://academic.oup.com/ajcn/article/96/3/534/4576801>. Acesso em: 23 maio 2022.

WOOD, Lisa G. *et al.* Saturated fatty acids, obesity, and the nucleotide oligomerization domain–like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome in asthmatic patients. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** v. 143, n. 1, p. 305–315 , jan. 2019.

WOOD, Lisa G.; GARG, Manohar L.; GIBSON, Peter G. A high-fat challenge

increases airway inflammation and impairs bronchodilator recovery in asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** v. 127, n. 5, p. 1133–1140 , 1 maio 2011.

XI, Fangfang *et al.* Second-trimester and third-trimester maternal lipid profiles significantly correlated to LGA and macrosomia. **Archives of Gynecology and Obstetrics** v. 304, n. 4, p. 885–894 , 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00404-021-06010-0>>.0123456789.

YAN, Xu *et al.* Maternal obesity induces sustained inflammation in both fetal and offspring large intestine of sheep. **Inflammatory bowel diseases** v. 17, n. 7, p. 1513–1522 , jul. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21674707/>>. Acesso em: 10 mar. 2022.

YANG, Baohui *et al.* Neonatal Streptococcus pneumoniae infection may aggravate adulthood allergic airways disease in association with IL-17A. **PLoS ONE** v. 10, n. 3 , 27 mar. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25816135/>>. Acesso em: 7 jun. 2022.

YASUKAWA, Atsushi *et al.* Eosinophils Promote Epithelial to Mesenchymal Transition of Bronchial Epithelial Cells. **PLoS ONE** v. 8, n. 5, p. e64281 , 2013.

YOUSSEF, Doaa *et al.* The influence of leptin on Th1/Th2 balance in obese children with asthma* Influência da leptina no equilíbrio Th1/Th2 em crianças asmáticas obesas. **J Bras Pneumol** v. 39, n. 5, p. 562–568 , 2013.

YU, Yingxin *et al.* Non-IgE mediated mast cell activation. **European journal of pharmacology** v. 778, p. 33–43 , 5 maio 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26164792/>>. Acesso em: 5 ago. 2022.

YUN, Yeojun *et al.* Environmentally determined differences in the murine lung microbiota and their relation to alveolar architecture. **PLoS ONE** v. 9, n. 12, p. e113466 , dez. 2014.

ZHANG, Lei *et al.* Association of asthma diagnosis with leptin and adiponectin: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Investigative Medicine** v. 65, n. 1, p. 57–64 , jan. 2017.

ZHENG, Handong *et al.* Leptin Enhances TH2 and ILC2 Responses in Allergic Airway Disease. **The Journal of biological chemistry** v. 291, n. 42, p. 22043–22052 , 14 out. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27566543/>>. Acesso em: 25 maio 2022.

ZHU, Zhaozhong *et al.* Shared genetic and experimental links between obesity-related traits and asthma subtypes in UK Biobank. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** v. 145, n. 2, p. 537–549 , 1 fev. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.09.035>>. Acesso em: 27 jan. 2021.

ANEXO A – APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA PROTOCOLO Nº33/2020.



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA**

CERTIFICADO

A COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 02/03/2021, analisou o protocolo nº. 033/2020 intitulado "Avaliação do efeito da obesidade materna nos diferentes fenótipos clínicos de asma alérgica na prole", projeto de pesquisa sob a responsabilidade de Flávia Márcia de Castro e Silva e colaboração de Gilson Costa Macedo, Erick Esteves de Oliveira e Laura Machado Menegati, a ser realizado no período de 01/05/2021 a 01/03/2023. Por estar de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado pela CEUA. Serão utilizados 36 camundongos fêmeas com 6 a 8 semanas de idade e 360 filhotes de camundongos (machos e fêmeas) da espécie BALB/c, projeto a ser realizado no laboratório de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFJF. O prazo de validade desse certificado é equivalente a vigência do projeto prorrogável por mais um ano, desde que seja enviada justificativa a CEUA durante a vigência do projeto de acordo com orientação técnica do CONCEA.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº. 033/2020-CEUA about "Avaliação do efeito da obesidade materna nos diferentes fenótipos clínicos de asma alérgica na prole", under responsibility of Flávia Márcia de Castro e Silva and collaboration of Gilson Costa Macedo, Erick Esteves de Oliveira and Laura Machado Menegati, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (Concea) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 03/02/2020. For the development of this research 36 BALB/c female mice with 6 to 8 weeks old and 360 female and male pups, will be delivered as requested in the period of 05/01/2021 to 03/01/2023. The Project will be performed at Parasitology, Microbiology and Immunology laboratory of the Institute of Biological Sciences located at Federal University of Juiz de Fora. The term of validity of this certificate might be extended for one more year by means of justification during the period of validity.

Juiz de Fora, 10 de março de 2021.

Coordenadora
CEUA

Vice-Coordenadora
CEUA