

Escola Superior de Ensino do Instituto Butantan
Programa de Pós-graduação *Lato Sensu*
Biotecnologia para saúde: Vacinas e biofármacos

Nathalia Caroline Teixeira Zana

Avaliação da influência dos genótipos do gene *PYCARD* e da inflamação no consumo de ração, peso e indução de asma em camundongos geneticamente selecionados para alta ou baixa resposta inflamatória

São Paulo

2024

Nathalia Caroline Teixeira Zana

Avaliação da influência dos genótipos do gene *PYCARD* e da inflamação no consumo de ração, peso e indução de asma em camundongos geneticamente selecionados para alta ou baixa resposta inflamatória

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Biotecnologia para saúde: Vacinas e biofármacos do Programa de Pós-graduação *Lato Sensu* da Escola Superior do Instituto Butantan como requisito básico para a obtenção do título de Especialista em Biotecnologia para saúde: Vacinas e biofármacos.

Orientador (a): Nancy Starobinas

São Paulo

2024

Catálogo na Publicação
Instituto Butantan
Dados inseridos pelo(a) aluno(a)

Zana, Nathalia Caroline Teixeira

Avaliação da influência dos genótipos do gene PYCARD e da inflamação no consumo de ração, peso e indução de asma em camundongos geneticamente selecionados para alta ou baixa resposta inflamatória / Nathalia Caroline Teixeira Zana ; orientador(a) Nancy Starobinas - São Paulo, 2024.

37 p. : il.

Monografia (Especialização) - Escola Superior do Instituto Butantan, Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos.

1. Inflamassoma 2. Asma. 3. PYCARD. 4. Ganho de peso I. Starobinas, Nancy. II. Instituto Butantan. III. Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos. IV. Título.

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Nathalia Caroline Teixeira Zana, aluna do Curso de Especialização em Biotecnologia para saúde: Vacinas e biofármacos, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- Imediato
 06 meses
 12 meses
 Outro prazo _____ Justifique:

São Paulo, 15 de Janeiro de 2024

Nathalia C.T. Zana

Aluno(a): Nathalia Caroline Teixeira Zana

De acordo: *Nancy Starobinas*
Orientador(a): Nancy Starobinas

RESUMO

ZANA, Nathalia C. T. **Avaliação da influência dos genótipos do gene *PYCARD* e da inflamação no consumo de ração, peso e indução de asma em camundongos geneticamente selecionados para alta ou baixa resposta inflamatória.** 2024. 37 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Biotecnologia para saúde: Vacinas e biofármacos) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2024.

A asma é uma patologia heterogênea e multifatorial, caracterizada pela inflamação das vias aéreas. Uma das comorbidades que impactam essa patologia é a obesidade. Estudos mostram relação entre asma, obesidade e a ativação da via do inflamassoma, buscando compreender melhor essa associação foram utilizados, no presente trabalho, camundongos geneticamente selecionados para a resposta inflamatória aguda máxima (AIRmax) e mínima (AIRmin). A ativação do inflamassoma é essencial no processamento das citocinas IL-1 β e IL-18. Essas ativações dependem da proteína adaptadora ASC, codificada pelo gene *PYCARD*. Foram produzidas no Laboratório de Imunogenética sublinhagens da inflamação portadoras dos diferentes genes do *PYCARD*. Após a genotipagem, foi observado que os animais AIRmax possuíam os alelos fixados em homozigose no gene (C/C), mas os AIRmin apresentavam polimorfismo. Através de acasalamentos assistidos por genotipagem, foram produzidas as sublinhagens AIRmin com os genótipos de *PYCARD* (C/C, T/T), em que os animais T/T apresentavam uma mutação, levando ao mal funcionamento da via do inflamassoma. O objetivo deste estudo foi avaliar a interferência dos alelos do gene *PYCARD* no ganho de peso e consumo de ração nos animais da linhagem AIR. Além de padronizar um protocolo de indução a asma. Nossos resultados mostram que a ingestão de alimentos é semelhante em AIRmax e AIRmin C/C. Em todas as linhagens, as fêmeas comem menos e são mais leves que os machos. Os animais AIRmin C/C possuem o maior peso em relação às outras linhagens, e os AIRmin T/T apresentam o menor peso. Nossa avaliação da mecânica pulmonar demonstrou que a linhagem AIRmin (C/C ou T/T) apresenta resistência das vias aéreas (Rn) e do parênquima (G) mais altas que AIRmax. Já na elasticidade das vias aéreas os animais AIRmax apresentaram valores mais altos. Após a indução à asma, os animais AIRmax e AIRmin C/C obtiveram uma maior porcentagem de eosinófilos no lavado pulmonar. Quando comparamos os animais AIRmin pudemos observar que os AIRmin C/C apresentaram maior quantidade de eosinófilos que os AIRmin T/T, além disso, os AIRmin T/T foram a única linhagem que não demonstrou diferença da porcentagem de

eosinófilos entre os grupos experimentais e controles. Quanto aos demais tipos celulares, para os macrófagos/monócitos os AIRmin T/T apresentaram os maiores valores, os AIRmax, intermediários e os AIRmin C/C, os menores. Enquanto, os animais AIRmin C/C apresentaram maiores valores de linfócitos em relação às outras duas linhagens. Ao testar os diferentes protocolos de indução à asma experimental utilizando ovalbumina, nossos resultados mostraram uma tendência diferencial, porém é necessário mais ensaios para definir o melhor protocolo. Desta forma, nossos resultados evidenciam uma correlação entre asma e inflamassoma, bem como a compreensão da função pulmonar na linhagem AIR e seu acúmulo de peso.

Palavras-chave: Inflamassoma. Ganho de peso. Asma. AIR. *PYCARD*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Consumo de ração pelas linhagens	20
Figura 2 - Peso de cada linhagem.....	21
Figura 3 - Avaliação da função mecânica pulmonar	22
Figura 4 - Presença de Eosinófilos no Lavado Pulmonar (BAL).....	24
Figura 5 - Composição celular do lavado broncoalveolar.....	25
Figura 6 - Composição total celular do BAL nas diferentes linhagens no grupo.....	26
Figura 7 - Comparação entre diferentes protocolos de indução de asma experimental com OVA	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIR	Resposta inflamatória aguda
AIR _{máx}	Resposta inflamatória aguda máxima
AIR _{min}	Resposta inflamatória aguda mínima
Al	Hidróxido de alumínio
BAL	Lavado broncoalveolar
DAMP	Padrão molecular associado dano
G	Resistência do parênquima pulmonar
H	Elastância parênquima pulmonar
HDM	Ácaros domiciliares
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
ILC	Células linfóides inatas
IMC	Índice de massa corpórea
LPS	Lipopolissacarídeo
MCh	Metacolina
NLR	Receptores similares ao domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo
OVA	Ovalbumina
P1	Protocolo 1
P2	Protocolo 2
P3	Protocolo 3
PAMP	Padrão molecular associado a patógeno
PBS	Tampão fosfato-salino
PRR	Receptores de reconhecimento padrão
PYD	Domínio pirínico
Rn	Resistência das vias aéreas
TGF- β	Fator de transformação do crescimento β

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Asma	10
1.1.1 Asma e obesidade	10
1.2 Inflamassoma	11
1.2.1 Inflamassoma na asma	12
1.3 Modelo animal	12
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo geral	15
2.2. Objetivos específicos	15
3. METODOLOGIA.....	16
3.1. Animais.....	16
3.2. Pesagem e consumo de ração	16
3.3. Avaliação mecânico pulmonar – FlexiVent	16
3.4. Protocolos de indução de asma.....	17
3.4.1. Protocolo 1 (P1) e Protocolo 2 (P2)	17
3.4.2. Protocolo 3 (P3).....	17
3.5. Contagem diferencial de células do lavado broncoalveolar	18
3.6. Estatística.....	18
4. RESULTADOS.....	19
4.1. Comparação do consumo de ração e do peso	19
4.2. Avaliação da mecânica pulmonar	21
4.3. Contagem diferencial de células do Lavado Broncoalveolar (BAL)	24
4.4. Comparação entre diferentes protocolos de indução à asma alérgica	27
5. DISCUSSÃO	28
6. CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS	33

1. INTRODUÇÃO

1.1 Asma

A asma é uma doença caracterizada por inflamação crônica das vias aéreas, em que os portadores dessa patologia apresentam sibilos, falta de ar, aperto no peito e tosse, com variação de intensidade e duração (GINA COMMITTEE, 2022). Sendo caracterizada celularmente pela infiltração e ativação de células da imunidade inata como as células dendríticas, eosinófilos, neutrófilos, mastócitos e células linfóides inatas (ILCs), e os linfócitos da imunidade adaptativa. As células imunes interagem com as células estruturais do pulmão, gerando alterações nesse tecido levando a uma hiperresponsividade brônquica e um acúmulo de muco de longa duração que tampona a via.

Ela pode ser caracterizada como alérgica e não alérgica. Na asma alérgica há a ativação da via dos receptores de reconhecimento de padrão (PRR), devido a presença do alérgeno, que desencadeia liberação de citocinas como IL-1, TGF- β , IL-33, IL-25, fator de estimulação de colônia de granulócitos e de macrófagos e timopoetina. Essas estimulam à infiltração celular e liberação de outras citocinas como IL-4, IL-5, IL-13 e IL-9. Além disso, há a mudança de imunoglobulina para IgE. Todos esses mecanismos levam à alterações iniciais como extravasamento de plasma e vasodilatação, e tardiamente a ativação da parede vascular, sensibilizando-a para resposta inflamatória (HAMMAD; LAMBRECHT, 2021).

1.1.1 Asma e obesidade

A asma pode ser classificada de diferentes formas por ser heterogênea e de etiologia multifatorial. Os fatores genéticos, ambientais e de estilo de vida interferem na gravidade da doença (DHARMAGE, 2019). A comorbidade mais relacionada com a diminuição da expectativa de vida de pessoas asmáticas é o alto índice de massa corpórea (IMC), categorizado como obesidade de grau I ou grau II (INSTITUTE OF HEALTH METRICS AND EVALUATION, 2020).

A obesidade é caracterizada por um excesso lipídico nutricional com a presença de ácidos graxos, cristais de colesterol, lipoproteínas de baixa densidade e ceramidas. O tecido adiposo apresenta uma inflamação crônica e lenta. Animais submetidos a uma alimentação controlada com dieta hiperlipídica desenvolveram hiperresponsividade

aérea, com aumento de liberação de IL-1 β , sendo vista a dependência da ativação da via do inflamassoma no pulmão para o desenvolvimento da hiperresponsividade, mesmo na ausência de IL-4 e IL-13 (KIM *et al.* 2014).

Em modelo murino de asma induzida por ovalbumina (OVA) e com controle de alimentação, comum ou hiperlipídica, verificou-se que a dieta hiperlipídica induzia a liberação de IL-1 β no pulmão e maior ativação de caspase-1. Os animais obesos já apresentavam uma hiperresponsividade das vias aéreas e ao ser associada a asma eles apresentaram resistência a tratamento com esteróide (PINKERTON *et al.* 2022).

Experimentos mostraram que a adição do MCC950, inibidor do NLRP3, gerou uma diminuição de leucócitos, linfócitos e neutrófilos no lavado broncoalveolar, e a supressão completa da hiperresponsividade nos animais (PINKERTON *et al.* 2022). Mostrando assim, uma correlação entre asma, obesidade e a ativação da via do inflamassoma.

1.2 Inflamassoma

O inflamassoma é uma resposta do sistema imune inato. Ele é um complexo proteico multimérico que se organiza no citoplasma devido ao reconhecimento de PAMPs (Padrão molecular associado a patógeno) ou DAMPs (Padrão molecular associado dano) pelos receptores de reconhecimento padrão (PRRs), como os membros da família de receptores similares ao domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo (NLRs) ou do tipo NOD (NETEA *et al.* 2016).

O complexo é formado por NLRs e PRRs, que apresentam ao menos um domínio pirínico (PYD), uma molécula adaptadora ASC, codificada pelo gene *PYCARD*, e a pró-caspase-1, precursor enzimático inativo (MALIK; KANNEGANTI, 2017).

A ativação dessa via culmina na oligomerização de proteínas pró-caspase-1 que induz a clivagem auto-proteolítica em caspase-1. Essa, por sua vez, cliva os precursores das citocinas IL-1 β e IL-18, além de induzir uma forma inflamatória de morte celular conhecida por piroptose (Li *et al.* 2021). Ocorrendo a liberação do ASCspeck para o meio extracelular (eASC speck) que atua como um sinal de perigo e propaga a inflamação pela fagocitose e ativação de células imunes circulantes (SOUZA; STAROBINAS; IBAÑEZ, 2021).

A ativação dessa via contribui para o desenvolvimento de algumas doenças como

disfunções cardiovasculares, depressão, doenças neurodegenerativas, resistência à insulina e câncer (LI *et al.* 2021). Dentre essas patologias, foi observado essa ativação em reações alérgicas promovendo a ativação de células T auxiliares 2 (Th2), gerando sintomas similares a asma em murinos (XIAO; XU; SU, 2018).

1.2.1 Inflamassoma na asma

Na asma alérgica, em protocolos de indução com OVA e adjuvante em camundongos, foi visto aumento protéico de NLRP3 e caspase-1, com níveis elevados de IL-1 β e TNF- α secretado pelas células epiteliais e macrófagos alveolares. Além disso, em animais *knockout* para NLRP3 e ASC há uma queda da hiperresponsividade brônquica, redução da inflamação pulmonar, diminuição da expressão de IL-1 β no pulmão (THEOFANI *et al.* 2019).

Outro estudo utilizando ácaros domiciliares (HDM) como alérgenos em camundongos normais e *knockout* para NLRP3 observaram que os animais *knockout* apresentavam um menor recrutamento de eosinófilos e secreção de muco nas vias aéreas e que a via do inflamassoma foi crucial para o desenvolvimento e progressão da asma (MA *et al.* 2021).

Além disso, estudos genéticos na população brasileira mostraram uma associação entre polimorfismos em genes da via do inflamassoma como *NLRP3* e *CASP1* que aumentam a gravidade da asma (QUEIROZ *et al.* 2020).

1.3 Modelo animal

Tendo em vista a correlação de asma, obesidade, inflamassoma e a resposta inflamatória foram utilizados animais selecionados fenotípica e geneticamente para resposta inflamatória aguda máxima (AIRmax) e mínima (AIRmin).

Buscando compreender a regulação poligênica da resposta inflamatória aguda (AIR), os pesquisadores do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan fizeram duas linhagens heterogêneas de camundongos, sendo realizados cruzamentos de oito

linhagens isogênicas (A/J; BALB/c; C57BL/6J; CBA/J; DBA/2J; P/J; SJL/J e SWR/J) originando os híbridos F1. Esses híbridos foram acasalados gerando a população segregante F2, que deram origem a população F0 geneticamente heterogênea (IBAÑEZ *et al.* 1992).

Na população F0 os animais apresentavam uma distribuição populacional normal, com indivíduos que possuíam uma alta ou baixa resposta inflamatória aguda, de acordo com a quantidade de leucócitos e o teor de extravasamento de proteínas no local após a inoculação de biogel no tecido subcutâneo. Por seleção bidirecional por cruzamento, foram mantidos dois perfis de respostas : AIRmax - Animais com resposta inflamatória máxima e AIRmin - Animais com resposta inflamatória mínima, sendo acompanhado por experimentação (IBAÑEZ *et al.* 1992).

Ao longo dos anos foram realizados estudos de variações genéticas entre AIRmax e AIRmin. Por exemplo, a suscetibilidade de AIRmin a infecção por *Salmonella typhimurium* e *Listeria monocytogenes*, e ao desenvolvimento de câncer de pulmão induzido por uretana, enquanto que AIRmax apresentaram resistência em ambos os casos de desenvolver essas patologias (RIBEIRO *et al.* 2005; BIOZZI *et al.* 1998). Essas diferenças foram sendo estudadas por ensaios genéticos como na infecção por *S. typhimurium* em que foi identificado uma modulação pelo gene *NRAMP1* (BORREGO *et al.* 2006).

Semelhantemente foi observado diferença na liberação de IL-1 β . Em que animais AIRmax liberam maiores quantidades do que AIRmin. Por ensaios genéticos foi observada uma região responsável por essa capacidade inflamatória no cromossomo 7, locus *Irm-1*. Dentro desse *locus* alguns genes apresentavam polimorfismos, como o gene *PYCARD*, codificador da proteína adaptadora ASC da via do inflamassoma. Cujas mutação levava a troca de aminoácido na proteína prejudicando sua função (BORREGO *et al.* 2022).

Os animais AIRmax apresentaram homozigose C/C, liberando altas concentrações de IL-1 β . Enquanto que os animais AIRmin apresentavam alelos T, com 61% de frequência, e C, com 39%, não estando fixo nessa população. Desta forma, foram feitos acasalamentos assistidos por genotipagem dando origem a três sublinhagens: AIRmax C/C, AIRmin C/C e AIRmin T/T (BORREGO *et al.* 2022). Utilizados para compreender

a importância do inflamassoma, esses animais fazem-se de extrema relevância para entender a importância do gene *PYCARD* e da via que está envolvido.

Visando correlacionar a ativação da via do inflamassoma com a asma e buscando verificar qual melhor modelo de indução asmática utilizando a OVA como antígeno para essas linhagens analisou-se, em um primeiro momento, a diferença de peso e consumo de ração desses animais, devido a influência que a obesidade possui nesta patologia. Seguido pelo teste de diferentes protocolos de indução da asma utilizando a presença de eosinófilos no lavado broncoalveolar (BAL) como critério de avaliação da indução experimental.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a interferência dos alelos do gene *PYCARD* no ganho de peso e consumo de ração nos animais da linhagem AIR. Além da padronização de um protocolo de indução a asma nos animais da seleção para resposta inflamatória portadores de diferentes alelos do gene *PYCARD*

2.2. Objetivos específicos

- Analisar o consumo de ração e o ganho de peso em animais portadores de diferentes alelos do gene *PYCARD* - AIRmax C/C, AIRmin C/C e AIRmin T/T
- Avaliar a correlação entre os diferentes alelos do gene *PYCARD* com o ganho de peso e a indução a asma
- Padronizar um protocolo para indução de asma alérgica e comparar os diferentes protocolos de asma para a sublinhagem AIR portadora dos diferentes alelos do gene *PYCARD*

3. METODOLOGIA

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas da sublinhagem da inflamação portadores dos diferentes alelos do gene *PYCARD*, sendo: AIRmax C/C, AIRmin C/C e AIRmin T/T. Esses animais foram mantidos e produzidos no biotério do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan, São Paulo/SP em condições padrões de criação com ração e água *ad libitum* e em ciclo claro/escuro de 12 horas. Os experimentos realizados obtiveram a aprovação da Comissão de ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) nº 9093270723 e nº 3268080319.

3.2. Pesagem e consumo de ração

Os animais da sublinhagem AIR foram mantidos sob dieta convencional monitorados uma vez na semana durante cinco meses a partir do terceiro mês de vida. Essa dieta é obtida da empresa Nuvilab CR-1 cuja em sua composição há milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix vitamínico mineral e aminoácidos. Além do monitoramento da dieta, foi realizado pesagem semanalmente desses animais acompanhando seu ganho de massa corpórea durante o mesmo período.

3.3. Avaliação mecânico pulmonar – FlexiVent

Os animais foram anestesiados e passaram por uma manipulação cirúrgica com a administração de metacolina via intravenosa e mantidos em ventilação artificial.

A cirurgia consiste em uma incisão na região centro-escapular dos animais e uma posterior traqueostomia com a inserção de uma cânula metálica de 0,838 mm de diâmetro interno e 12,7 mm de comprimento. A veia jugular direita foi dissecada para inserção de cateter de polietileno.

Após o procedimento a cânula inserida na traquéia dos animais foi conectada ao aparelho de ventilação mecânica para pequenos animais (FlexiVent, SCIREQ®). Nestas condições, os parâmetros de ventilação pulmonar foram ajustados: volume corrente, 10 ml/kg; frequência, 150 ciclos/minuto e PEEP (*positive end-expiratory pressure*), 3 cm/H₂O. Após isso, foi feita administração de uma dose de pancurônio (Pancuron®), 1

mg/kg via intraperitoneal para indução do relaxamento muscular, a fim de auxiliar a ventilação mecânica imposta pelo equipamento.

Decorridos 7 minutos da administração de pancurônio, os animais receberam PBS através da cânula inserida na veia jugular direita no volume de 20 μ L/10g de peso do camundongo. Sendo construída uma curva dose-resposta à metacolina (MCh), um agonista de receptor muscarínico nas seguintes doses: 30, 100, 300 e 1000 μ g/kg (por meio da cânula inserida na veia jugular direita). Nessas condições os parâmetros avaliados foram: Resistência do parênquima pulmonar (G), elastância do parênquima pulmonar ou alvéolos (H) e Resistência de vias aéreas (Rn).

3.4. Protocolos de indução de asma

Para padronização do melhor protocolo de indução a asma nessas linhagens foram testados três protocolos com duração de um mês, sendo utilizado apenas fêmeas de cada linhagem. Os animais controle seguiram o mesmo protocolo recebendo PBS ou PBS + Alúmen nas duas primeiras semanas e PBS ou OVA nas duas últimas semanas, de acordo com seus grupos.

3.4.1. Protocolo 1 (P1) e Protocolo 2 (P2)

Os animais foram sensibilizados na primeira e segunda semana via subcutânea, sendo uma vez por semana, com OVA (4 μ g – livre de LPS para o P1 e P2 com a OVA grau de pureza V) e hidróxido de alumínio (1,6 mg) em uma solução de 200 μ L por animal. Na terceira e quarta semana, receberam o desafio intranasal contendo 10 μ g de OVA por animal em uma solução de 30 μ L, sob anestesia (xilazina – 12,5 mg/kg e quetamina – 25 mg/kg). A eutanásia foi realizada 24h depois do último desafio.

3.4.2. Protocolo 3 (P3)

Os animais foram sensibilizados na primeira semana via subcutânea com OVA (30 μ g – pureza de grau V) e hidróxido de alumínio (2,8 mg) em uma solução de 200 μ L por animal, e na segunda semana receberam, por essa mesma via, OVA (50 μ g) e hidróxido de alumínio (2,8 mg) em uma solução de 200 μ L por animal. Na terceira e quarta semana, receberam o desafio intranasal contendo 20 μ g de OVA por animal em uma solução de 30 μ L, sob anestesia (xilazina – 12,5 mg/kg e quetamina – 25 mg/kg). A eutanásia foi

realizada 24h depois do último desafio.

3.5. Contagem diferencial de células do lavado broncoalveolar

O lavado broncoalveolar (BAL) foi coletado após a eutanásia do animal e avaliação pulmonar, com a injeção de 1000 μL de PBS pela canula e com o uso de uma seringa, sendo perfundido e aspirado.

Após a coleta foi feita contagem global de células utilizando a câmara de Malassez, utilizando o azul de tripan como identificador para células mortas. Para a contagem diferencial a suspensão celular foi ajustada para 5×10^4 células em 300 μL , e colocadas em cassetes, citocentrifugação (Cytospin) a 800 rpm por 5 min e coradas com Hematoxilina e Eosina. As células foram identificadas e contadas de acordo com suas características morfológicas.

3.6. Estatística

Os resultados obtidos foram apresentados em média \pm erro padrão. Foi utilizado o *software* GraphPad Prism 9.4.1 para os testes estatísticos. Todas as análises foram feitas utilizando o teste One-Way ANOVA seguido com o pós teste de Bonferroni. Assumindo um intervalo de confiança de 95%. Sendo representados com **** valores de $p < 0,0001$, com *** valores de $p < 0,001$, com ** valores de $p < 0,01$ e com * valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Comparação do consumo de ração e do peso

O consumo dos animais foi avaliado semanalmente, sendo pesado a ração para consumo durante a semana e subtraído do valor restante na semana seguinte, o valor obtido era dividido pela quantidade de animais referentes a aquela gaiola. Desta forma, obtinha-se uma estimativa do valor consumido por animal de cada gaiola.

Na figura 1.A. está exposto a média do consumo de ração de cada animal por linhagem, durante cada semana. Representando o consumo, na figura 1.B e 1.C. está caracterizado a média consumo dos animais aos seis meses de vida.

Os animais AIRmax C/C e AIRmin C/C possuem um consumo semelhante. Enquanto os AIRmin T/T possuem um menor consumo comparado com AIRmax ($p < 0,0001$) e AIRmin C/C ($p < 0,05$) (Figura 1.B.).

Ao comparar a diferença entre os sexos, pode-se observar que em todas as linhagens as fêmeas possuem um menor consumo quando comparado aos machos ($p < 0,0001$) (Figura 1.C).

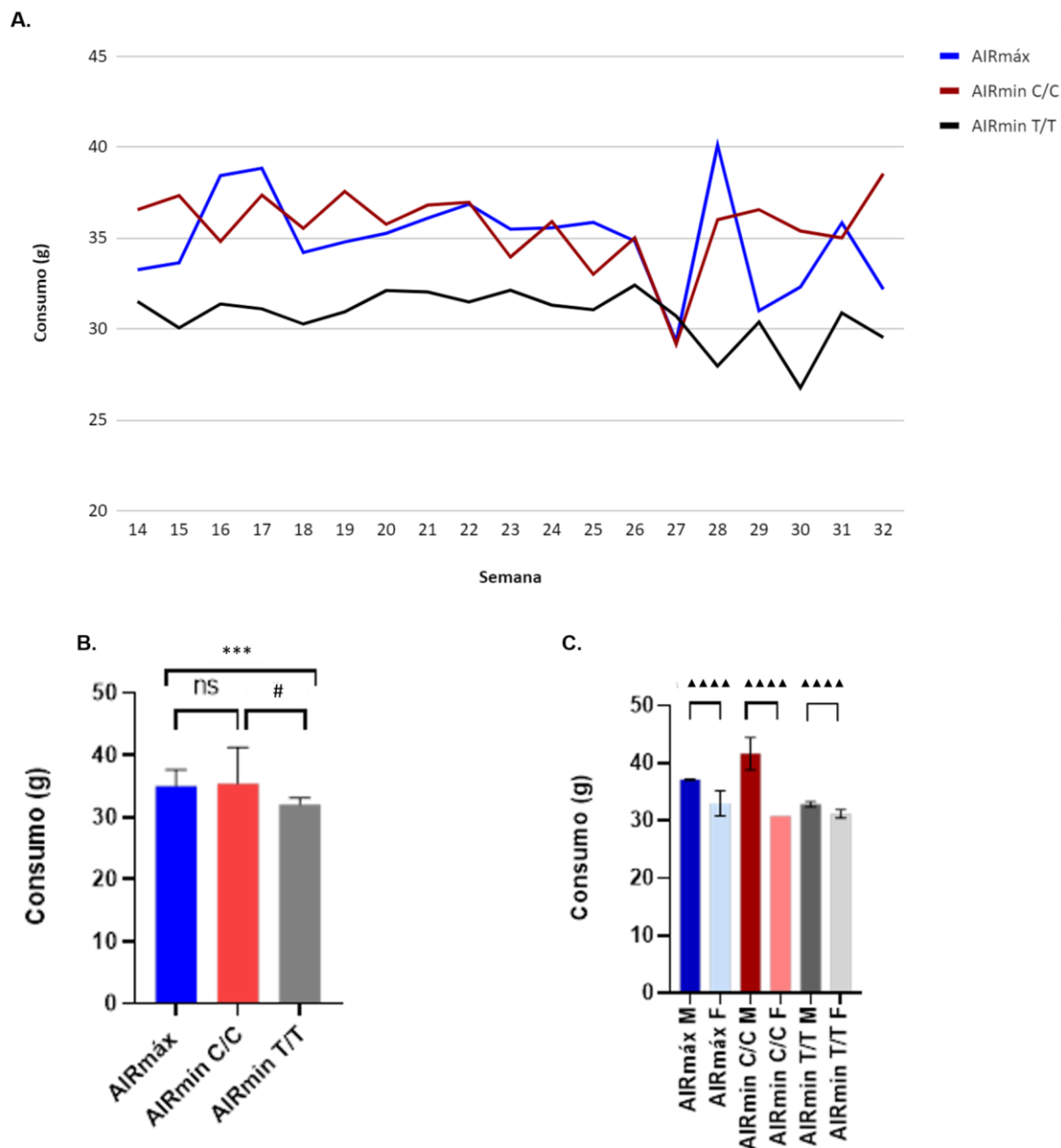
O peso dos animais foi mensurado semanalmente e acompanhado durante o mesmo período que o consumo de ração. Na figura 2.A está exposto a média do peso por linhagem de acordo com sua respectiva semana. Para a representatividade desses valores, na figura 2.B e 2.C está caracterizada a média dos pesos dos animais aos seis meses de vida.

Os animais AIRmin C/C foram os que apresentaram maior peso, e os AIRmin T/T com menor peso. Os animais AIRmáx comparados aos AIRmin C/C apresentam menor peso ($p < 0,001$), e um maior peso comparado a AIRmin T/T ($p < 0,001$) (Figura 2.B.) Verificando a diferença entre os sexos dentro da mesma linhagem, nota-se que as fêmeas apresentam um menor peso do que os machos para todas as linhagens ($p < 0,0001$) (Figura 2.C.)

Uma relação entre consumo de ração com o peso pode ser observada na linhagem AIRmin, em que os animais AIRmin C/C que possuem o maior consumo de ração apresentam o maior peso, e os animais AIRmin T/T o menor consumo e menor peso.

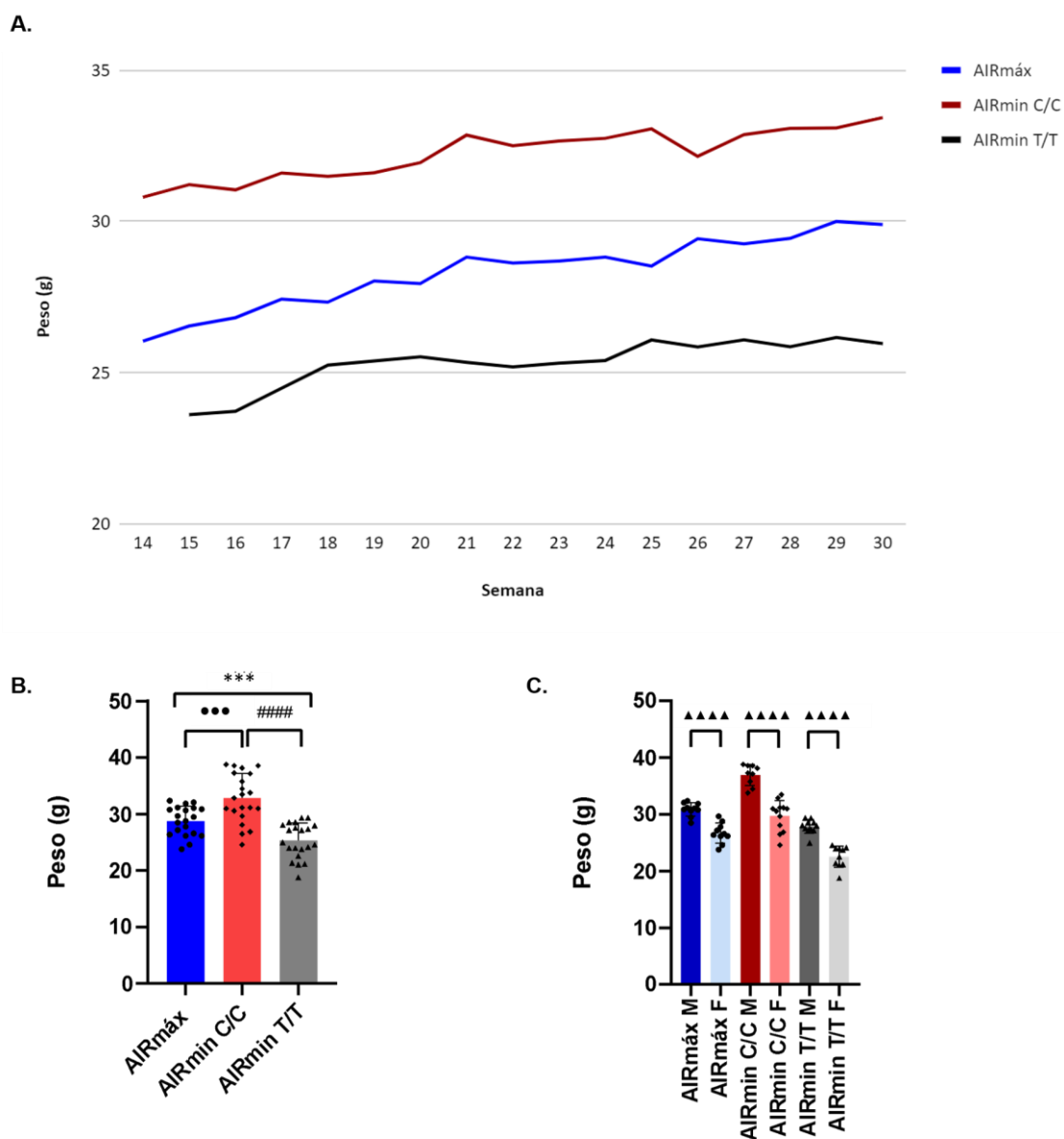
Além disso, há uma relação quanto ao sexo em que as fêmeas apresentam um menor consumo e menores pesos do que os machos em todas as linhagens.

Figura 1 - Consumo de ração pelas linhagens



Fonte: próprio autor, 2024.

Média do consumo de ração convencional (a) semanalmente, (b) por linhagem ao sexto mês de vida e (c) por sexo ao sexto mês de vida. Os dados estão representados em média \pm erro padrão; M – Macho; F- Fêmea. Diferença estatística: * comparação entre AIRmax e AIRmin T/T; # comparação entre AIRmin C/C e AIRmin T/T; ▲ comparação entre os sexos; ns - Não significante; * valores de $p < 0,05$ e **** valores de $p < 0,0001$

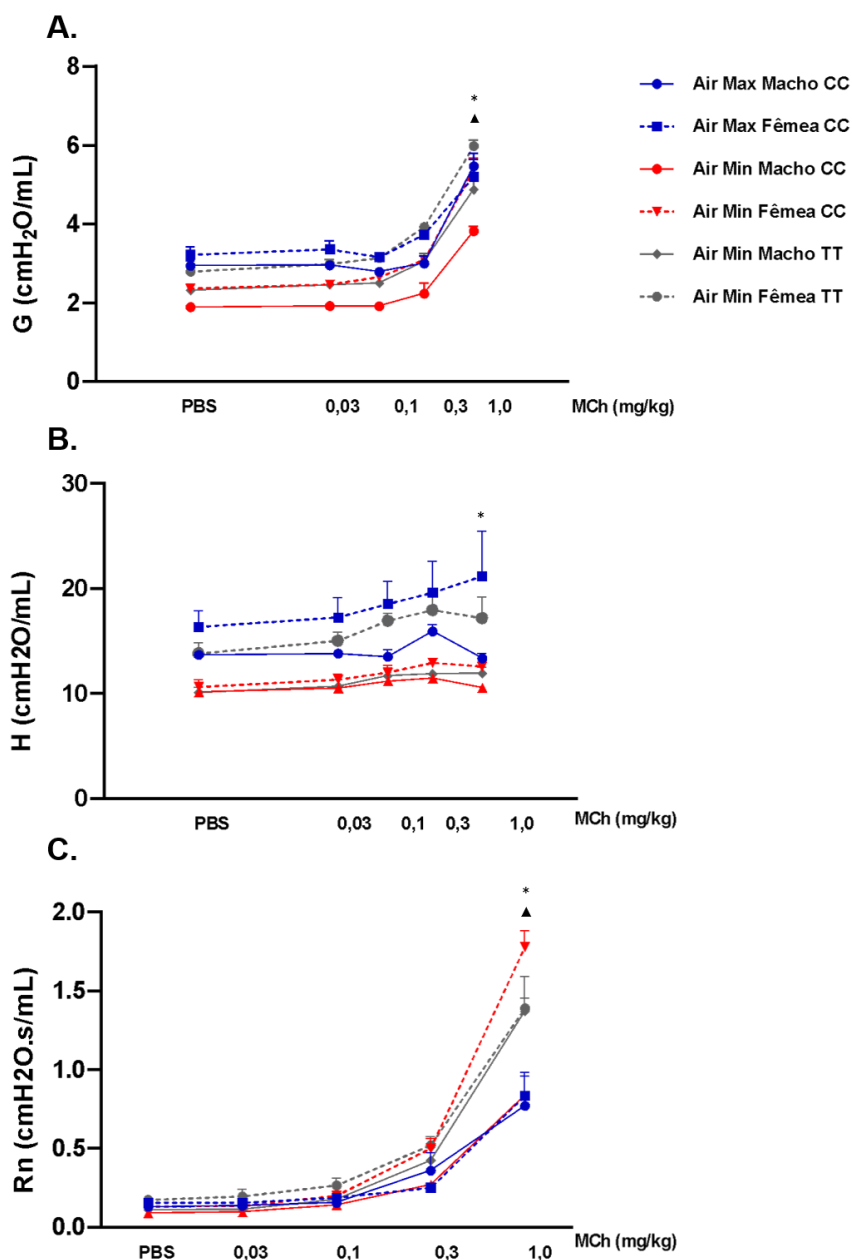
Figura 2 - Peso de cada linhagem

Fonte: próprio autor, 2024.

Média do peso dos animais (A) semanalmente, (B) por linhagem ao sexto mês de vida e (C) por sexo ao sexto mês de vida. Os dados estão representados em média \pm erro padrão; M – Macho; F- Fêmea; Diferenças estatística: * comparação entre AIRmax e AIRmin T/T; # comparação entre AIRmin C/C e AIRmin T/T; ▲ comparação entre os sexos; *** valores de $p < 0,001$ e **** valores de $p < 0,0001$.

4.2. Avaliação da mecânica pulmonar

Dentro dos parâmetros utilizados para avaliar a funcionalidade mecânica do pulmão foram analisados: Resistência parênquima pulmonar (G), Elastância do parênquima pulmonar (H) e Resistência de vias aéreas (Rn).

Figura 3 - Avaliação da função mecânica pulmonar

Fonte: próprio autor, 2024.

Avaliação da função mecânica pulmonar feita por FlexiVent utilizando Metacolina (MCh) nas concentrações de 0,03, 0,1, 0,3 e 1,0 mg/kg. (A) Resistência do parênquima pulmonar - G (B) Elastância - H (C) Resistência das vias aéreas - Rn. Os dados estão representados em média \pm erro padrão. Diferença estatística: * entre as linhagens; ▲ entre sexos da mesma linhagem; * $p < 0,05$.

A G é a força tecidual necessária para sobrepor as forças viscosas do tecido levando à movimentação dos pulmões e das paredes torácicas (WEST, 2013).

Neste parâmetro, para ambos os sexos, os animais AIRmax apresentam uma resistência maior que AIRmin C/C macho ($p < 0,0001$) e as fêmeas AIRmax possuem G maior que as fêmeas AIRmin C/C ($p < 0,01$) e que os machos AIRmin T/T ($p < 0,0001$). Os animais AIRmin C/C apresentam uma menor resistência do que AIRmin T/T fêmea ($p < 0,0001$). Os machos AIRmin C/C possuem uma menor G comparados aos machos AIRmin T/T ($p < 0,0001$) e as fêmeas AIRmin C/C ($p < 0,01$). Por fim, foi observado que as fêmeas AIRmin T/T possuem uma maior resistência que os machos da mesma linhagem ($p < 0,0001$) (Figura 3.A).

A H é a capacidade que o pulmão tem de retornar a sua forma original quando uma força promove uma deformação e essa força é removida. Essa medida é inversamente proporcional a complacência, a capacidade de resistir a deformação mecânica. Uma alta complacência e baixa elastância pulmonar representa uma condição em que o pulmão é estendido facilmente, mas que não voltará ao seu volume de repouso quando essa força é cessada (SILVERTHORN, 2017).

Quanto a este parâmetro, as fêmeas AIRmax possuem uma elastância maior que os machos AIR max ($p < 0,01$), a linhagem AIRmin C/C (machos e fêmeas) ($p < 0,0001$) e os machos AIRmin T/T ($p < 0,0001$). Os machos ($p < 0,001$) e as fêmeas ($p < 0,05$) AIRmin C/C apresentam uma H menor que a fêmea AIRmin T/T. Por fim, foi vista uma diferença em que as fêmeas possuem maior H que os machos ($p < 0,01$) (Figura 3.B).

A Rn é definida como o grau de dificuldade de movimentação do fluxo de ar nas vias aéreas. Seu cálculo se dá pela diferença de pressão entre os alvéolos e a boca dividido pela taxa de fluxo aéreo (PEREIRA; MOREIRA, 2002).

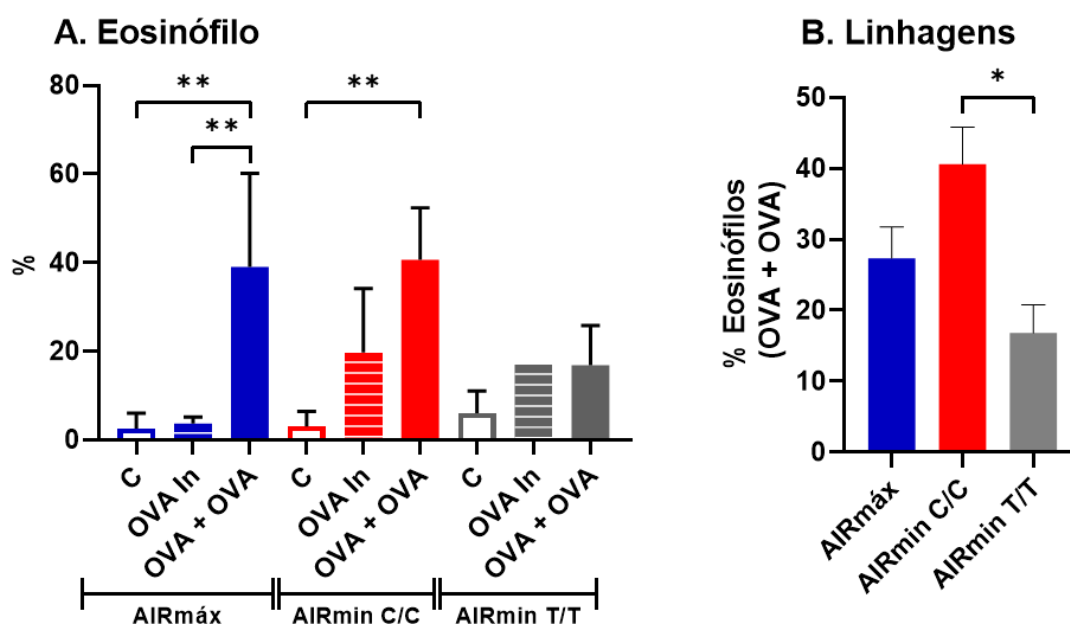
Os animais AIRmax (machos e fêmeas) possuem uma Rn menor que as fêmeas AIRmin (C/C e T/T) ($p < 0,01$), sendo essa linhagem a que possui a menor Rn. Os animais AIRmin C/C apresentam uma diferença entre os sexos em que as fêmeas possuem a maior resistência ($p < 0,0001$). Os machos da linhagem AIRmin C/C apresentam uma Rn inferior aos animais AIRmin T/T, tanto para o macho ($p < 0,05$) quanto para fêmea ($p < 0,001$) (Figura 3.C).

4.3. Contagem diferencial de células do Lavado Broncoalveolar (BAL)

Os animais passaram por protocolos de indução de asma, após 24h do último estímulo, os animais foram eutanasiados e o BAL foi colhido ao perfundir e aspirar com PBS. Após as células serem ajustadas para 5×10^4 em $300 \mu\text{L}$ foi feita a contagem diferencial, em lâminas coradas com eosina e hematoxilina.

Ao avaliar a porcentagem de eosinófilos no BAL, foi observado um aumento nos animais experimentais que foram imunizados e depois induzidos com OVA quando comparados ao grupo controle nas linhagens AIRmax e AIRmin C/C. Nos animais AIRmax há também uma diferença em relação ao grupo que recebeu apenas a OVA intranasal e o grupo controle ($p < 0,01$) e para AIRmin C/C há um aumento de células em relação ao controle ($p < 0,01$) (Figura 4.A).

Figura 4 - Presença de Eosinófilos no Lavado Pulmonar (BAL)

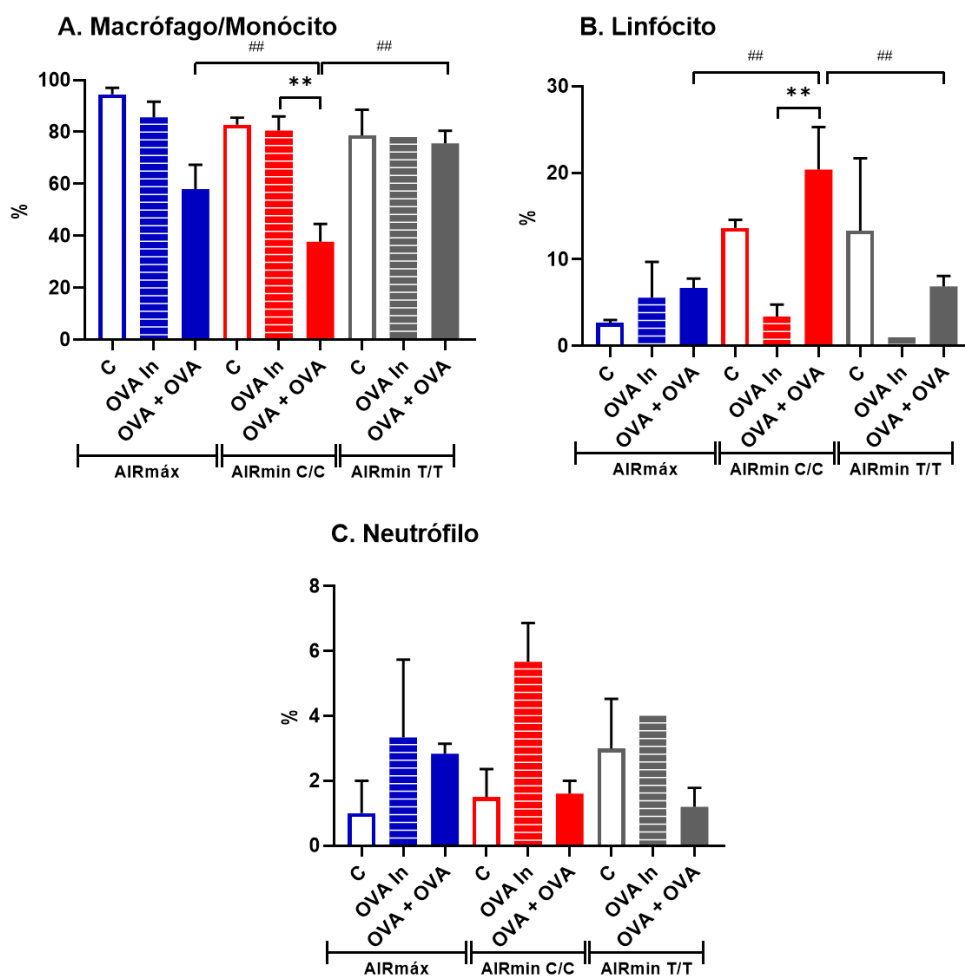


Fonte: próprio autor, 2024.

Contagem de eosinófilos no BAL dos diferentes grupos e linhagens, sendo (A) Comparação entre os grupos (B) Comparação entre as linhagens no grupo experimental.; C – Controle, animais receberam apenas PBS; OVA In – Animais receberam apenas OVA intranasal na terceira e quarta semanas; OVA + OVA – Animais receberam OVA + Hidróxido de alumínio na primeira e segunda semanas e OVA intranasal na terceira e quarta semanas; Os dados estão representados em média da porcentagem \pm erro padrão. Diferença estatística: * valores de $p < 0,05$ e ** valores de $p < 0,01$.

Quando os grupos dos animais experimentais das linhagens foram comparados pode-se observar uma diferença entre eles. Em que os animais AIRmax e AIRmin C/C são semelhantes, enquanto os animais AIRmin T/T apresentam uma menor quantidade de eosinófilos comparado ao AIRmin C/C ($p < 0,05$) (Figura 4.B).

Figura 5 - Composição celular do lavado broncoalveolar



Fonte: próprio autor, 2024.

Contagem de células no BAL dos diferentes grupos e linhagens, sendo (A) Macrófagos/monócitos (B) Linfócitos e (C) Neutrófilos. C – Controle, animais receberam apenas PBS; OVA In – Animais receberam apenas OVA intranasal na terceira e quarta semanas; OVA + OVA – Animais receberam OVA + Hidróxido de alumínio na primeira e segunda semanas e OVA intranasal na terceira e quarta semanas; Os dados estão representados em média \pm erro padrão. Diferença estatística: # comparação entre as linhagens; * comparação entre os grupos; ** valores de $p < 0,01$.

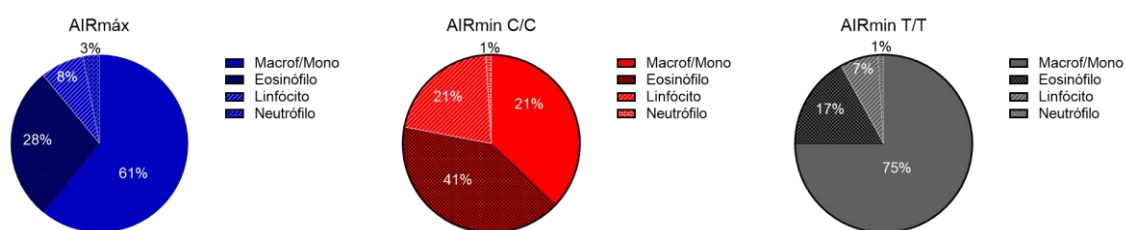
Para os macrófagos/monócitos foi observada uma diferença entre as linhagens nos animais experimentais ($p < 0,01$), sendo que os AIRmin T/T apresentaram os maiores valores, os AIRmax números intermediários e os AIRmin C/C os menores valores. Além disso, há uma diferença de macrófagos/monócitos entre os animais AIRmin C/C que receberam apenas OVA intranasal e os experimentais, havendo uma queda no número de células no grupo experimental em relação ao grupo OVA intranasal ($p < 0,01$) (Figura 5.A).

Os linfócitos possuem diferença entre as linhagens nos animais experimentais ($p < 0,01$). Os animais AIRmin C/C apresentaram maior quantidade do que os AIRmax e os AIRmin T/T, enquanto que AIRmax e AIRmin T/T apresentam valores similares. Uma diferença entre o grupo OVA intranasal e o experimental da linhagem AIRmin C/C também foi observada, ocorrendo um aumento para os animais previamente imunizados e depois desafiados com OVA ($p < 0,01$) (Figura 5.B).

Por outro lado, os neutrófilos não apresentaram diferença entre as linhagens e entre os grupos que receberam diferentes tratamentos (Figura 5.C).

Esses dados foram reunidos e plotados de forma que fosse possível observar a composição geral do lavado broncoalveolar de cada linhagem (Figura 6). Evidenciando a diferença de constituição de cada linhagem.

Figura 6 - Composição total celular do BAL nas diferentes linhagens no grupo



Fonte: próprio autor, 2024.

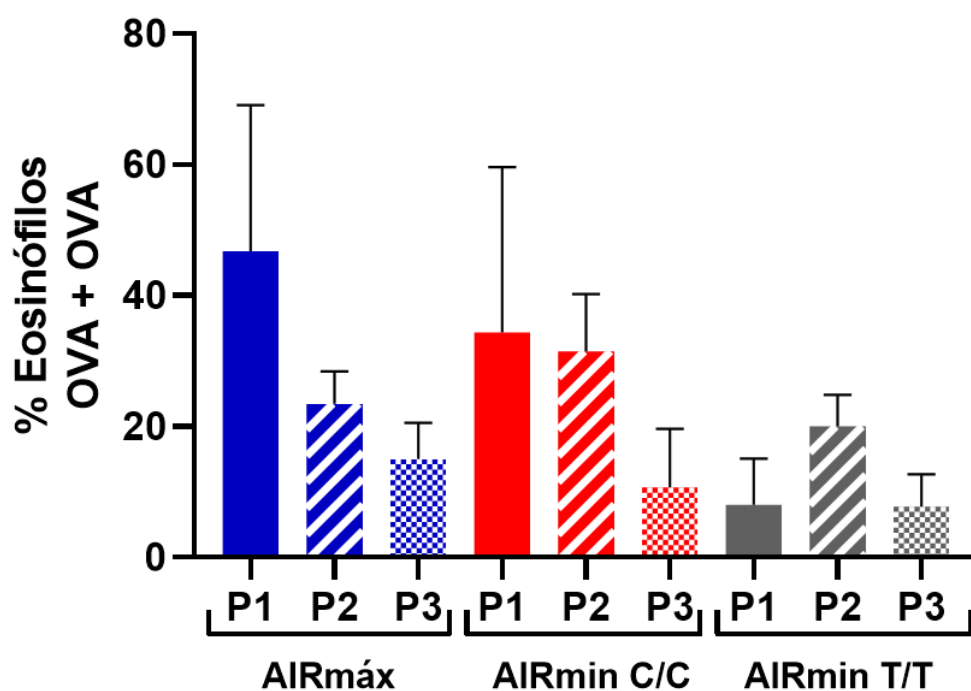
Composição total celular no BAL nas linhagens AIRmax, AIRmin C/C e AIRmin T/T no grupo experimental sensibilizado com OVA no subcutâneo e desafiado com OVA intranasal. Os dados estão representados em porcentagem.

4.4. Comparação entre diferentes protocolos de indução à asma alérgica

Buscando validar os diversos tipos de protocolos para indução da asma alérgica experimental em modelos murinos, testou-se três protocolos diferentes utilizando OVA LPS *free* ou OVA de grau V. O critério utilizado para essa avaliação foi a porcentagem de eosinófilos presentes no lavado pulmonar após o final do protocolo, dentro de cada grupo experimental.

Nossos resultados mostram uma tendência diferencial entre os protocolos, no entanto são necessários mais ensaios para a definir qual o melhor protocolo a ser utilizado nos próximos estudos nessas linhagens (Figura 7).

Figura 7 - Comparação entre diferentes protocolos de indução de asma experimental com OVA



Fonte: próprio autor, 2024.

Porcentagem de eosinófilos no grupo experimental em diferentes protocolos. Os dados estão representados em média ± erro padrão; P1 – Protocolo 1; P2 – Protocolo 2; P3 – Protocolo 3;

5. DISCUSSÃO

A asma é uma patologia caracterizada pela inflamação das vias aéreas em que a imunidade inata e adaptativa desempenham papéis cruciais. Ademais é observado uma correlação entre asma e obesidade, devido a heterogeneidade e influência de fatores genéticos, ambientais e de estilo de vida envolvidos na asma.

A obesidade é um fator de risco para diversas doenças cardíacas, renais e pulmonares. Estudos mostram uma associação entre o excesso de tecido adiposo e dificuldades respiratórias, levando a uma redução do volume pulmonar e mudanças estruturais que afetam a resistência respiratória (PEROSSI, 2022). No entanto, os mecanismos por trás dessa relação não são totalmente elucidados. Estudos sugerem que o excesso lipídico desencadeia mecanismos que contribuem para a hiperresponsividade aérea, como a ativação da via do inflamassoma (KIM *et al.* 2014; PINKERTON *et al.* 2022).

O trabalho de Tino de Franco *et al.* (2022) mostrou que houve uma diferença no ganho de peso nas linhagens AIRmax e AIRmin, em que os animais AIRmax apresentaram um peso maior do que AIRmin. Tendo em vista esses dados, o presente estudo buscou verificar a correlação entre o gene *PYCARD*, associado a via do inflamassoma, com o aumento de peso e a asma.

Nossos resultados demonstram um consumo similar entre a linhagem AIRmax e AIRmin C/C, no entanto os animais AIRmin C/C apresentaram maior peso. Os animais AIRmin T/T possuem o menor peso quando comparado com as outras linhagens. A separação do genótipo do gene *PYCARD* na linhagem AIRmin, mostrou uma alteração em que os animais AIRmin C/C apresentaram um maior ganho de peso do que os animais AIRmax, diferentemente do que foi observado no estudo anterior. Desse modo, é necessário um estudo mais aprofundado para a compreensão do papel desse gene na modificação observada entre as linhagens.

Ao avaliar a função pulmonar desses animais pode-se observar que os animais AIRmin C/C apresentam uma menor resistência pulmonar comparado aos AIRmin T/T e AIRmax, para ambos os sexos. Isso demonstra que a linhagem AIRmin C/C apresentaram

uma passagem de ar facilitada durante a respiração, podendo estar associado a uma função pulmonar mais eficiente.

Quanto a elastância, os machos de todas as linhagens apresentaram uma função similar, enquanto que nas fêmeas foi observada uma diferença em que os AIRmin C/C possuem uma menor elastância, ou seja, seus pulmões se distendem mais e possuem maior capacidade expansiva durante a inspiração, logo, possuem maior dificuldade em retornar ao seu estado inicial durante a expiração e na retenção de ar nos pulmões (BATES, 2009). Por outro lado as fêmeas AIRmax e AIRmin T/T apresentaram uma maior elastância indicando que os pulmões se distendem e tendem a apresentar maior contração durante a expiração, o que pode levar a uma capacidade pulmonar reduzida.

A resistência das vias aéreas é a oposição que o fluxo de ar encontra ao passar pelas vias respiratórias durante a respiração, sendo um fator de apuração do transporte de ar para dentro e fora dos pulmões. Dentre as fêmeas, os animais AIRmin (C/C e T/T) possuem uma maior resistência, indicando uma maior oposição ao fluxo de ar nas vias respiratórias. Enquanto que os animais AIRmax apresentam uma menor resistência, havendo uma passagem de ar facilitada e eficiente. Nos machos os animais AIRmin T/T apresentavam maior resistência do que os animais AIRmin C/C e AIRmax.

Resumidamente, as fêmeas AIRmax e AIRmin T/T apresentaram uma maior resistência pulmonar e elastância indicando uma função pulmonar reduzida e menos eficiente do que as AIRmin C/C. No entanto, os animais AIRmin (C/C e T/T) apresentam uma maior resistência das vias aéreas, uma condição comumente vista em patologias como a asma, inflamação e constrição das vias aéreas, que torna a passagem do ar mais difícil. Nos machos, a resistência se demonstrou igual ao visto nas fêmeas, no entanto, quanto a elastância todas as linhagens se mostraram semelhantes. Os machos AIRmin T/T apresentaram maior resistência das vias aéreas comparados a AIRmin C/C e AIRmax.

Tendo em vista que o presente trabalho utilizou esses animais em um estado *naive* com uma alimentação comum, demonstramos uma diferença respiratória entre as linhagens. Para verificar uma melhor correlação entre obesidade e alterações pulmonares, deve ser feito um estudo induzindo o sobrepeso com uma alimentação hiperlipídica.

Após a observação destas linhagens em seus estados *naive*. Foi feita uma avaliação da celularidade do lavado broncoalveolar em protocolos de indução de asma. A linhagem

AIR apresenta uma abordagem única para investigar a correlação entre asma e inflamassoma, devido seu fundo genético heterogêneo que possibilita o estudo da regulação poligênica na resposta inflamatória, em que é possível observar dois extremos populacionais, indivíduos que têm uma máxima e mínima resposta inflamatória aguda. Além de possibilitar a compreensão da importância do gene *PYCARD* e a via do inflamassoma em diferentes fundos genéticos, devido ao polimorfismo encontrado de animais C/C que possuem uma ativação normal da via e T/T que apresentam uma deficiência nessa via devido uma mutação que impede a formação do complexo do inflamassoma.

Estudos apontam a importância do inflamassoma para a asma, tanto em humanos quanto em modelos murinos. Nossos resultados indicam a influência da via do inflamassoma na indução da asma alérgica, pois os animais AIRmax C/C e AIRmin C/C, que apresentam ativação normal do inflamassoma, mostraram um aumento de eosinófilos no pulmão após a indução da asma quando comparados aos animais controle. Por outro lado, os animais AIRmin T/T, que possuem uma mutação no adaptador ASC e não ativam o inflamassoma, apresentaram valores próximos aos seus controles ao serem induzidos por OVA. Além do mais, ao comparar as linhagens AIRmin com o genótipo *PYCARD* diferente os animais C/C possuem uma maior presença de eosinófilos do que os animais T/T.

A presença de monócito/macrófago na linhagem AIRmin T/T é similar aos controles, tendo em vista que essas células são residentes do tecido. Da mesma forma, nota-se sua redução nas linhagens AIRmin C/C e AIRmax, em que os animais induzidos à asma apresentavam uma mudança no perfil celular no BAL, sendo uma diminuição dos macrófagos/monócitos e aumento de eosinófilos.

Estudos sugerem que a ativação da via do inflamassoma promove a ativação de células T auxiliares 2 (Th2). Essas células são cruciais para a progressão e desenvolvimento da asma, em que sua ativação leva a liberação de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. Essas citocinas são importantes para indução e manutenção da resposta inflamatória característica da asma. Além de estimular a troca de classe de imunoglobulina para IgE e promover a quimiotaxia dos eosinófilos (HAMMAD; LAMBRECHT, 2021). Em concordância a isso, a linhagem AIRmin C/C que apresentaram altos níveis de

eosinófilos, também possuem maior quantidade de linfócitos em seu lavado broncoalveolar.

A asma pode ser categoricamente dividida em alérgica e não-alérgica. A asma não-alérgica apresenta migração de neutrófilos, enquanto a alérgica de eosinófilos. A baixa presença de neutrófilos e alta de eosinófilos demonstram a indução de uma asma alérgica.

No presente trabalho foram utilizados três protocolos diferentes, com OVAs e concentrações diferentes, visando encontrar a melhor metodologia para a indução de asma nestas linhagens. Nossos resultados demonstraram uma diferença entre os protocolos, no entanto a variação entre os animais foi muito grande, devemos aumentar o número amostral para poder definir o protocolo que será utilizado.

Em suma, nossos resultados demonstram que os animais AIRmin C/C que apresentaram o maior ganho de peso, juntamente com a linhagem AIRmax responderam mais à indução da asma, considerando a migração de eosinófilos e presença de linfócitos. Outra relação importante é do inflamassoma com a asma, em que os animais que possuem o genótipos C/C para o gene *PYCARD* apresentaram uma celularidade do lavado broncoalveolar similar ao do perfil asmático. Enquanto a linhagem com o genótipo T/T não apresenta diferença entre seus grupos experimentais e controle, mostrando a influência dos diferentes alelos do gene *PYCARD* na indução da asma.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados demonstraram uma importante correlação entre obesidade, asma e a via do inflamassoma. Destacando-se a importância de compreender as vias moleculares envolvidas nesta patologia. Além de evidenciar um papel diferencial do gene *PYCARD* em relação à resposta asmática, sugerindo a necessidade de estudos mais aprofundados que elucidem seu impacto.

O presente trabalho indica uma associação significativa entre a via do inflamassoma, vista pelo polimorfismo do gene *PYCARD* e a presença de eosinófilos e linfócitos no lavado broncoalveolar. Sugerindo uma potencial contribuição do inflamassoma para a indução e manutenção da resposta inflamatória característica da asma alérgica. Por fim, obtivemos uma variação nos resultados entre diferentes protocolos destacando a necessidade de investigações adicionais.

Os animais AIRmin C/C que apresentaram maior ganho de peso, também exibiram uma resposta mais pronunciada à indução a asma, corroborando com a correlação entre o excesso de peso e asma. Além disso, os animais AIRmin T/T que possuem o menor peso, apresentaram o menor valor de eosinófilos e linfócitos, e um maior de macrófagos/monócitos em seu BAL. Indicando uma correlação entre o inflamassoma e a asma. Outro fator importante é a relação entre o genótipo *PYCARD* e a asma, em que animais C/C, AIRmax e AIRmin C/C, com a ativação normal da via apresentaram um aumento de eosinófilos, enquanto nos animais AIRmin T/T não exibiram alterações.

Em resumo, nosso estudo sugere uma correlação entre o polimorfismo do gene *PYCARD*, e conseqüentemente, do inflamassoma e a asma, e traz observações importantes para compreensão do excesso de peso e da função pulmonar. Além disso, contribui para o conhecimento de diferenças entre os animais da linhagem AIR.

REFERÊNCIAS¹

BATES, Jason H. T.. Lung Mechanics: an inverse modeling approach. Nova York: Cambridge University Press, 2009.

BIOZZI, G *et al.* Effect of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse. *Carcinogenesis*, [S.L.], v. 19, n. 2, p. 337-346, 1 fev. 1998. **Oxford University Press (OUP)**. <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/19.2.337>. Último acesso: 20 Dez. 2023.

BORREGO, Andrea *et al.* Genetic determinants of acute inflammation regulate Salmonella infection and modulate Slc11a1 gene (formerly Nramp1) effects in selected mouse lines. **Microbes And Infection**, [S.L.], v. 8, n. 12-13, p. 2766-2771, out. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2006.08.005>. Último acesso: 20 Dez. 2023.

BORREGO, Andrea *et al.* *PYCARD* and BC017158 Candidate Genes of Irm1 Locus Modulate Inflammasome Activation for IL-1 β Production. **Frontiers in Immunology**, v. 13, n. June, p. 1–16, 21 jun. 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35799794/> Último acesso: 03 de Jan. 2023

DHARMAGE, Shyamali C.; PERRET, Jennifer L.; CUSTOVIC, Adnan. Epidemiology of Asthma in Children and Adults. **Frontiers in Pediatrics**, v. 7, n. JUN, p. 1–15, 18 jun. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31275909/>. Último acesso: 27 de Dez. 2023.

GINA COMMITTEE. Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2022 Update. Global Initiative for Asthma. Global Initiative for Asthma (2022): 225, 2022.

HAMMAD, Hamida; LAMBRECHT, Bart N. The basic immunology of asthma. **Cell**, [S.L.], v. 184, n. 6, p. 1469-1485, mar. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.016>. Último acesso: 10 Jan. 2024.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

IBANEZ, Olga M. *et al.* Genetics of nonspecific immunity: I. Bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness. **European Journal of Immunology**, v. 22, n. 10, p. 2555–2563, out. 1992. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1396963/>. Último acesso: 5 Jan. 2024.

INSTITUTE OF HEALTH METRICS AND EVALUATION. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. Asthma. **The Lancet**, v. 396, p. 108–109, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33069326/>. Último acesso: 5 Jan. 2024.

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: <http://www.nature.com/articles/nm.3423>; Último acesso: 5 Jan. 2024.

LI, Yangxin *et al.* Inflammasomes as therapeutic targets in human diseases. *Signal Transduction And Targeted Therapy*, [S.L.], v. 6, n. 1, 2 jul. 2021. **Springer Science and Business Media LLC**. Disponível em : <http://dx.doi.org/10.1038/s41392-021-00650-z>. Último acesso: 20 de Dez. 2023

MALIK, Ankit; KANNEGANTI, Thirumala-Devi. Inflammasome activation and assembly at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 130, n. 23, p. 3955–3963, 1 dez. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29196474/>. Último acesso: 8 Jan. 2024.

MA, Ming *et al.* Inhibition of the Inflammasome Activity of NLRP3 Attenuates HDM-Induced Allergic Asthma. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 1-12, 3 ago. 2021. **Frontiers Media SA**. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2021.718779>. Último acesso: 27 de Dez. 2023

NETEA, Mihai G *et al.* Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. **Science**, v. 352, n. 6284, 22 abr. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5087274/>. Último acesso: 10 Jan. 2024.

PEREIRA, Carlos A. de C.; MOREIRA, Maria A. F. Pletismografia - resistência das vias aéreas. **J Pneumol.** [S.L.] v.28, n. 3 p. 139-150. out. 2002. Disponível em : https://cdn.publisher.gn1.link/jornaldepneumologia.com.br/pdf/Suple_142_45_66%20Pletismografia.pdf. Último acesso: 10 de Jan. 2024.

PEROSSI, Larissa *et al.* Increased airway resistance can be related to the decrease in the functional capacity in obese women. **Plos One**, [S.L.], v. 17, n. 6, p. 1-9, 7 jun. 2022. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0267546>. Último acesso: 7 Jan. 2024

PINKERTON, James W. *et al.* Relationship between type 2 cytokine and inflammasome responses in obesity-associated asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 149, n. 4, p. 1270–1280, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34678326/>. Último acesso: 5 Jan. 2024.

QUEIROZ, Gerson de A. *et al.* New variants in NLRP3 inflammasome genes increase risk for asthma and *Blomia tropicalis*-induced allergy in a Brazilian population. **Cytokine: X**, [S.L.], v. 2, n. 3, p. 100032, set. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyttox.2020.100032>. Último acesso: 27 de Dez. 2023

RIBEIRO, Orlando Garcia *et al.* Genetic Selection For High Acute Inflammatory Response Confers Resistance To Lung Carcinogenesis In The Mouse. **Experimental Lung Research**, [S.L.], v. 31, n. 1, p. 105-116, jan. 2004. Informa UK Limited. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/01902140490495237>. Último acesso: 20 Dez. 2023.

SILVERTHORN, Dee Unglaub. *Fisiologia Humana: uma abordagem integrada*. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SOUZA, Jean Gabriel; STAROBINAS, Nancy; IBÁÑEZ, Olga Celia Martinez. Unknown/enigmatic functions of extracellular ASC. **Immunology**, v. 163, n. 4, p. 377–388, 22 ago. 2021. Disponível em

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/imm.13375>. Último acesso: 20 Dez. 2023.

THEOFANI, Efthymia *et al.* Targeting NLRP3 Inflammasome Activation in Severe Asthma. **Journal Of Clinical Medicine**, [S.L.], v. 8, n. 10, p. 1615, 4 out. 2019. MDPI AG. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/jcm8101615>. Último acesso: 20 de Dez. 2023

TINO DE FRANCO, M *et al.* Impact of Long-Term of Standard and High Fat Diet on Selected Obesity Parameters and Respiratory Mechanics in Phenotypically Selected Mice for Minimal or Maximal Acute Inflammatory Reaction. 2022, [S.l: s.n.], 2022.

WEST, John B.. Fisiologia respiratória: princípios básicos. 9. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

XIAO, Yichen; XU, Wenna; SU, Wenru. NLRP3 inflammasome: A likely target for the treatment of allergic diseases. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 48, n. 9, p. 1080–1091, set. 2018. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29900602/>. Último acesso: 20 Dez. 2023.

YOU, Yanyan *et al.* Frontline Science: Inflammasome activation in airway epithelial cells after multiwalled carbon nanotube exposure mediates a profibrotic response in lung fibroblasts. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 104, n. 2, p. 475–490, 1 ago. 2018. Disponível em: <https://www.jleukbio.org/doi/10.1002/JLB.2HI1017-365R>. Último acesso: 8 Jan. 2024.

ZAMBON, Alexander C *et al.* The inflammasome: a way to understand the origin? **Immunology**, v. 160, n. 4, p. 313–328, 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/imm.13222>. Último acesso: 8 Jan. 2024.