



MARINA CIARALLO CALIXTO

EFEITO DA ATIVAÇÃO DA AMPK NA EXACERBAÇÃO DA INFLAMAÇÃO
PULMONAR ALÉRGICA EM CAMUNDONGOS OBESOS

CAMPINAS

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

MARINA CIARALLO CALIXTO

EFEITO DA ATIVAÇÃO DA AMPK NA EXACERBAÇÃO DA INFLAMAÇÃO
PULMONAR ALÉRGICA EM CAMUNDONGOS OBESOS

ORIENTAÇÃO: Prof. Dr. Edson Antunes

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção de
título de Doutora em Farmacologia.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA POR
MARINA CIARALLO CALIXTO E ORIENTADA PELO
PROF. DR. EDSON ANTUNES.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

C129e Calixto, Marina Ciarallo, 1980-
Efeito da ativação da AMPK na exacerbação da
inflamação pulmonar alérgica em camundongos obesos /
Marina Ciarallo Calixto. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Edson Antunes.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Obesidade. 2. Asma. 3. Resistência à insulina. 4.
Metformina. I. Antunes, Edson, 1960-. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Effect of AMPK activation on allergic airway inflammation in obese mice.

Palavras-chave em inglês:

Obesity
Asthma
Insulin resistance
Metformin

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Doutora em Farmacologia

Banca examinadora:

Edson Antunes [Orientador]
Eliana Pereira de Araújo
Alessandra Gambero
Iolanda de Fátima Lopes Calvo Tibério
Soraia Kátia Pereira Costa

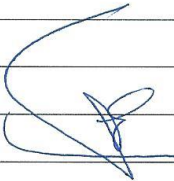
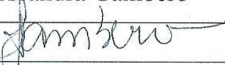
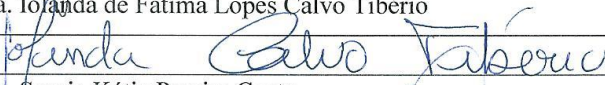
Data da defesa: 21-11-2012

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

Banca Examinadora de Tese de Doutorado

MARINA CIARALLO CALIXTO

Orientador: Prof. Dr. Edson Antunes

Membros:	
Prof. Dr. Edson Antunes	
Prof. Dra. Eliana Pereira de Araujo	
Prof. Dra. Alessandra Gambero	
Prof. Dra. Iolanda de Fátima Lopes Calvo Tibério	
Prof. Dra. Soraia Kátia Pereira Costa	

Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 21/11/2012

DEDICATÓRIA

A Deus, pelo dom da vida e por estar sempre presente em minha vida, principalmente nos momentos mais difíceis, em que os obstáculos pareciam intransponíveis. Suas manifestações em minha vida continuam a me impulsionar. Obrigada por não me deixar desistir.

Aos meus pais, Mariza e João, que sempre foram um grande exemplo, e ao meu irmão, Gustavo, pela dedicação, incentivo, carinho e apoio em todos os momentos, tornando possível a realização de mais uma etapa da minha vida. Sou eternamente grata a vocês!!

Ao Daniel, meu companheiro e amigo, por todo amor, carinho, cuidado e dedicação, sempre me fortalecendo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Edson Antunes meu enorme agradecimento pela oportunidade de realizar este trabalho em seu laboratório e por todos os ensinamentos, apoio e incentivo à pesquisa.

Ao prof. Dr Gabriel Anê pela valiosa colôbaração com western blotting e ChIP assay e por permitir livre acesso ao seu laboratório durante a realização deste trabalho.

A Prof. Dra. Silva Bordin (ICB-USP) por permitir a utilização de toda estrutura de seu laboratório para realização da técnica ChIP Assay, bem como pela valiosa colaboração ao desenhar os primers utilizados.

Ao Prof. Dr. Richardt Landgraft pela colaboração com as análises histológicas.

Ao Dr. Camilo Lellis (ICB-USP) pelo valioso apoio e disponibilidade durante toda a padronização e realização do Chip Assay.

Ao Danilo pela disponibilidade, boa vontade e dedicação nos experimentos de western blotting na fase final da realização desta tese. Seu auxílio foi fundamental!!!

À Dra. Leticia Lintomen, cuja participação foi fundamental em diversas etapas deste trabalho.

Aos colegas do laboratório de Células e Cascata, Camila, Líneu, Priscila, Rafael Prada, Celso, Eduardo, Fábio, Fabiano, Fernanda Grossi, Fernando Bau, Julio, Lorenzo, Luiz Osório, Paulo, Renata, Rodrigo e Wagner e pela amizade e convivência durante esse período.

Especialmente aos colegas e queridos amigos do Laboratório de Inflamação (Edema) Dra. Gláucia, Dra. Ivani, Dalize, Diana e Fábio. Agradeço pelo carinho, paciência, amizade, pela convivência e por tudo que aprendi com vocês. Muito obrigada!

Às amigas do departamento de farmacologia, Elisa, Nadinha, Carol e Débora. Ao lado de vocês a vida se torna mais divertida!!!

À Dra. Elen Landucci, pela amizade e convivência diária.

Agradeço aos alunos do Prof Gabriel por aceitarem com boa vontade a minha presença constante e assim dividirem seu espaço comigo durante este último ano.

Aos funcionários e responsáveis do biotério, assim como todos os funcionários do departamento, os seus trabalhos tornaram possível a realização deste estudo.

Aos animais, seres fundamentais para a realização dos protocolos experimentais e conseqüentemente para os resultados de minha tese de doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, que com sua extrema seriedade, compromisso e competência apoiou a realização deste trabalho.

Finalmente agradeço a todos os amigos, da vida acadêmica e pessoal, e aos profissionais que de alguma forma me auxiliaram ao longo deste trabalho. Obrigada a todos!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	XVI
LISTA DE MATERIAIS	XX
LISTA DE FIGURAS	XXIII
LISTA DE TABELAS	XXVI
RESUMO	27
ABSTRACT	29
1. INTRODUÇÃO.....	32
1.1. <i>Obesidade</i>	32
1.1.1. Obesidade e resistência periférica à ação da insulina.....	34
1.1.2. Metformina.....	36
1.2. <i>Asma.....</i>	37
1.2.1. Fisiopatologia da Asma.....	39
1.2.2. A importância dos eosinófilos na asma.....	40
1.3. <i>Asma e obesidade.....</i>	43
1.3.1. Asma e resistência à insulina	45
2. OBJETIVOS	48
3. MATERIAIS E MÉTODOS	51
3.1. ANIMAIS	51
3.2. INDUÇÃO DA OBESIDADE COM DIETA HIPERLIPÍDICA	51
3.3. TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT)	51
3.4. SENSIBILIZAÇÃO COM OVALBUMINA (OVA) E DESAFIO INTRANASAL.....	52
3.5. TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS	52
3.5.1 <i>Tratamento com metformina.....</i>	52
3.5.2. <i>Tratamento com anticorpo anti-TNF-α.....</i>	53
3.6. COLETA E CONTAGEM DE CÉLULAS NO LAVADO BRONCOALVEOLAR E MEDULA ÓSSEA	54

3.6.1 Lavado broncoalveolar.....	54
3.6.2 Medula óssea	54
3.7. ANÁLISE MORFOLÓGICA	55
3.8. DOSAGENS DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS NO LBA E/OU MO	55
3.9. DOSAGENS DE NOx	56
3.10. ENSAIO DE ADESÃO.....	56
3.11. CITOMETRIA DE FLUXO	57
3.13. ENSAIO CHIP (CHROMATIN IMMUNOPRECIPITATION ASSAY)	59
3.14. ANÁLISE ESTATÍSTICA	60
4. RESULTADOS.....	62
4.1. EFEITO DO TRATAMENTO COM METFORMINA SOB A ADIPOSIDADE, GLICEMIA E RESISTÊNCIA À INSULINA.....	62
4.2. EFEITO DO TRATAMENTO COM METFORMINA NA INFLAMAÇÃO PULMONAR DE CAMUNDONGOS OBESOS E ASMÁTICOS ...	66
4.3. MOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS OBESOS	74
4.4. ADESÃO DE EOSINÓFILOS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS OBESOS E ASMÁTICOS	76
4.5. EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO E DE RECEPTORES DE QUIMIOCINAS NA SUPERFÍCIE DE EOSINÓFILOS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS OBESOS E ASMÁTICOS	79
4.6. PRODUÇÃO EOTAXINA E IL-5 NA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS OBESOS E ASMÁTICOS	82
4.7. EFEITO DO TRATAMENTO COM METFORMINA SOBRE OS NÍVEIS DE EOTAXINA, IL-5 E TNF- α NO LBA DE CAMUNDONGOS OBESOS E ASMÁTICOS.....	84
4.8. EFEITO DO TRATAMENTO COM METFORMINA NOS NÍVEIS DE NOx NO PULMÃO DE CAMUNDONGOS OBESOS E ASMÁTICOS.	86
4.9. EXPRESSÃO DA iNOS NO PULMÃO DE CAMUNDONGOS OBESOS E ASMÁTICOS	87
4.10. EXPRESSÃO E ATIVIDADE DA P-AMPK E P-ACC NO PULMÃO DE CAMUNDONGOS OBESOS E ASMÁTICOS.....	89
4.11. ATIVAÇÃO DO NF- κ B NO PULMÃO DE CAMUNDONGOS OBESOS E ASMÁTICOS	91
4.12. EFEITO DA OBESIDADE SOB A EXPRESSÃO DAS ENZIMAS 11- β HSD1 E 11- β HSD2 NO PULMÃO DE CAMUNDONGOS OBESOS E ASMÁTICOS.....	95

4.13. EFEITO DO BLOQUEIO DO TNF- α SOB O RECRUTAMENTO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS PARA O PULMÃO.....	97
5. DISCUSSÃO	107
6. CONCLUSÕES	127
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129

LISTA DE ABREVIATURAS

11- β HSD1	11- β hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1
11- β HSD2	11- β hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2
ACC	Acetil-CoA carboxilase
AKT/PKB	Proteína Serina/ treonina quinase B
AMP	Adenosina 5'-monofosfato
AMPc	AMP cíclico
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
ATP	Adenosinatrifosfato
BH ₄	Tetraidrobiopterina
BSA	Albumina bovina sérica
CCR3	Receptor para eotaxina
ChIP	Imunoprecipitação de cromatina
cNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva
ECP	proteína catiônica do eosinófilo
EDN	Neurotoxina derivada do eosinófilo
EDTA	Ácido etilenodiaminatetracético
EOS	Eosinófilos
EPM	Erro padrão da média

EPO	Peroxidase eosinofílica
EROS	Espécies reativas de oxigênio
GM-CSF	Fator estimulante de colônia granulócito-macrófago
H/E	Hematoxilina/eosina
HDL	Lipoproteína de alta densidade
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IgE	Imunoglobulina E
IκB	Inibidor do NF-κB
IL	Interleucina
IL-5	Interleucina 5
IMC	Índice de massa corporal
INF-γ	Interferon-gama
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IRS-1	Substrato 1 do receptor de insulina
IRβ	Receptor de insulina
ITT	Teste de tolerância à insulina
Kitt	Constante de decaimento da glicose
LBA	Lavado broncoalveolar
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
Mac-1	Macrophage adhesion molecule-1

MBP	Proteína básica principal
MO	Medula óssea
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear κ B
NO	Óxido nítrico
NO _x	Metabólitos do óxido nítrico (nitrito e nitrato)
OPD	Dicloridrato de ortofenilenodiamina
OVA	Ovalbumina
PBS	Tampão salina-fosfato
PGC-1	Co-ativador do receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo 1
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
Rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Reação transversa da polimerase em cadeia
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
Ser	Serina
Th ₂	<i>T helper 2</i>
Thr	Treonina
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa

TRIS	Tri(hidroximetil)-aminometano
Tyr	Tirosina
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
VLA-4	<i>Very late antigen-4</i>

LISTA DE MATERIAIS

Susbtância

Procedência

Ácido acético glacial	J.T.Baker (Eldorado, México)
Ácido cítrico	CETUS (Santo Amaro, Brasil)
Al(OH) ₃	Sanofi-synthelabo (Rio de Janeiro, Brasil)
Álcool (70% - 100%)	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Anti- fosfo-AMPK	Abcam (Cambridge, MA, EUA)
Anti -VLA-4	BD Pharmigen (San Jose, CA, EUA)
Anti-11-βHSD1	Santa Cruz (Santa Cruz, CA, EUA)
Anti-11-βHSD2	Santa Cruz (Santa Cruz, CA, EUA)
Anti-CCR3	BD Pharmigen (San Jose, CA, EUA)
Anti-fosfo-ACC	Abcam (Cambridge, MA, EUA)
Anti-fosfo-IκB	Santa Cruz (Santa Cruz, CA, EUA)
Anti-iNOS	Abcam (Cambridge, MA, EUA)
Anti-Mac-1	BD Pharmigen (San Jose, CA, EUA)
Anti-p65-NF-κB	Abcam (Cambridge, MA, EUA)
Anti-TNF-α	Biolegend (San Diego, CA, EUA)
Azida sódica	Sigma (EUA)
BSA	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
CaCl ₂ .2H ₂ O	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Corante hematológico	Laboclin Ltda (Pinhais, Brasil)

Cristal de violeta	Merck (Darmstadt, Alemanha)
EDTA	J.T.Baker (Phillipsburg, USA)
Fluoreto de sódio	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Formaldeído (37%)	CETUS (Santo Amaro, Brasil)
Fosfato de potássio	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
H/E	Laboclin Ltda (Pinhais, Brasil)
H ₂ O ₂	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
H ₂ SO ₄	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
HCl	CETUS (Santo Amaro, Brasil)
HEPES	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
ICAM-1	R&D Systems™ (Minneapolis, EUA)
Isoforine	Cristália (Itapira, SP, Brasil)
KCl	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
KH ₂ PO ₄	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Kit mouse Eotaxina	R&D Systems™ (Minneapolis, EUA)
Kit mouse IL-5	R&D Systems™ (Minneapolis, EUA)
Kit mouse Nitrito e Nitrato	Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan, USA)
Kit mouse TNF- α	R&D Systems™ (Minneapolis, EUA)
Metanol	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Na ₂ CO ₃	Merck (Darmstadt, Alemanha)

Na ₂ HPO ₄	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
NaCl	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
NaHCO ₃	Merck (Darmstadt, Alemanha)
NaHPO ₄	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Óleo de imersão p/ microscopia	Merck (Darmstadt, Alemanha)
OPD	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Ortovanadato de sódio	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
OVA (grau V)	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Paraformaldeído	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Pirofosfato de sódio	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Primer iNOS	Sigma (São Paulo, SP, Brasil)
Proteína Sefarose A	R&D Systems™ (Minneapolis, EUA)
Solução fisiológica 0,9%	EQUIPLEX® (Aparecida de Goiânia, Brasil)
SYBER Green I	Abgene Life Sciences, Epsom, KT, Inglaterra
Taq DNA polymerase	Abgene Life Sciences, Epsom, KT, Inglaterra
Tris	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Trizol	Invitrogen, Grand Island, NY, EUA
Tween 20	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
VCAM-1-	R&D Systems™ (Minneapolis, EUA)
Xilol	Labsynth (Diadema, Brasil)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do protocolo de sensibilizações e desafios aplicados para camundongos obesos e controles.....	51
Figura 2. Curva de tolerância a insulina (ITT) em animais obesos e controles tratados ou não com metformina.....	62
Figura 3. Efeito do tratamento com metformina (3 mg/kg/dia) no ganho peso ponderal e no peso da gordura epididimal.....	63
Figura 4. Efeito do tratamento com metformina (3 mg/kg/dia) sobre o número de células inflamatórias totais e eosinófilos no tecido pulmonar.....	64
Figura 5. Fotomicrografia representativa do efeito do tratamento com metformina (3 mg/kg/dia) sobre o número de células inflamatórias e eosinófilos no tecido pulmonar 48 h após o desafio intranasal com ovalbumina (OVA).....	66
Figura 6. Efeito do tratamento com metformina (3 mg/kg/dia) sobre o número de células inflamatórias total e eosinófilos no lavado broncoalveolar (LBA).....	68
Figura 7. Efeito do tratamento com metformina (3 mg/kg/dia por) sobre a produção de muco e depósito de colágeno no tecido pulmonar.....	71
Figura 8. Efeito do tratamento com metformina (3 mg/kg/dia) sobre número de eosinófilos maduros e imaturos na medula óssea (MO).....	73

Figura 9. Efeito da obesidade e do tratamento com metformina (3 mg/kg/dia) sobre a adesão in vitro de eosinófilos de medula óssea (MO).....	76
Figura 10. Efeito da obesidade e do tratamento com metformina (3 mg/kg/dia) sobre a expressão de moléculas de adesão nas células obtidas da medula óssea (MO).....	78
Figura 11. Efeito da obesidade e do tratamento com metformina (3 mg/kg/dia) sobre a média de intensidade de fluorescência de moléculas de adesão nas células obtidas da medula óssea (MO).....	79
Figura 12. Efeito da obesidade e do tratamento com metformina (3 mg/kg/dia) sobre os níveis quimiocinas e citocinas na medula óssea (MO).....	81
Figura 13. Efeito do tratamento com metformina (3 mg/kg/dia) sobre os níveis de quimiocinas e citocinas no lavado broncoalveolar (LBA).....	84
Figura 14. Efeito do tratamento com metformina (3 mg/kg/dia por 2 semanas) sobre os níveis dos metabólitos do óxido nítrico (NOx) no lavado broncoalveolar (LBA).....	85
Figura 15. Efeito do tratamento com metformina (3 mg/kg/dia) sobre a expressão da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) no pulmão.....	86
Figura 16: Efeito da obesidade e do tratamento com metformina (3 mg/kg/dia) sobre a expressão de p-AMPK e p-ACC no pulmão.....	89
Figura 17: Efeito do tratamento com metformina (3 mg/kg/dia por 2 semanas) sobre a expressão da p-IkB no pulmão.....	90

Figura 18. . Efeito da obesidade e do tratamento com metformina na ligação do NF- κ B no gene da iNOS.....	92
Figura 19. Efeito da obesidade sobre os níveis de TNF- α no lavado broncoalveolar (LBA) em diferentes tempos após o desafio com OVA.....	93
Figura 20: Efeito da obesidade sobre a expressão das enzimas 11- β HSD1 e 11- β HSD2 no pulmão.....	94
Figura 21: Efeito da neutralização do TNF- α sobre o número de células inflamatórias totais e eosinófilos no tecido pulmonar.....	96
Figura 22: Fotomicrografia representativa do efeito da neutralização do TNF- α sobre o número de células inflamatórias e eosinófilos no tecido pulmonar 48 h após o desafio intranasal com ovalbumina (OVA).....	97
Figura 23: Efeito da neutralização do TNF- α sobre o número de células inflamatórias total e eosinófilos no lavado broncoalveolar (LBA).....	99
Figura 24: Efeito da neutralização da IgG sobre o número de células inflamatórias total e eosinófilos no lavado broncoalveolar (LBA).....	100
Figura 25. Efeito da neutralização do TNF- α sobre o número de eosinófilos maduros e imaturos na medula óssea (MO).....	102
Figura 26: Efeito da neutralização do IgG sobre o número de eosinófilos maduros e imaturos na medula óssea (MO).....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito do tratamento com metformina (3 mg/kg/dia) sobre o número de neutrófilos e células mononucleares do lavado broncoalveolar (LBA) de animais sensibilizados e desafiados com ovoalbumina (OVA).....69

Tabela 2. Efeito do tratamento com metformina (3 mg/kg/dia) sobre o número total e diferencial de leucócitos da medula óssea de animais sensibilizados desafiados com ovoalbumina (OVA).....74

RESUMO

A obesidade e a asma são doenças prevalentes e crescentes, e ambas têm impacto significativo na saúde pública mundial. O aumento simultâneo da prevalência da asma e da obesidade tem levado investigadores a sugerir que a obesidade possa ser um fator importante no desenvolvimento da asma, ou até piorar um quadro de asma pré-existente. Numerosos estudos populacionais conduzidos em todo o mundo indicam que a prevalência de asma é maior em indivíduos obesos *versus* magros. Além disso, diversos estudos prospectivos, tanto em adultos quanto em crianças, indicam que o risco relativo da incidência de asma aumenta com o índice de massa corporal (IMC). A obesidade também piora o controle medicamentoso da asma e a gravidade desta doença. Recentemente, diversos dados emergiram indicando que a inflamação associada à obesidade pode aumentar a propensão para o desenvolvimento de asma. Acredita-se que a resistência à insulina associada à obesidade desempenha importante papel no desenvolvimento da asma, explicando, ao menos em parte, a associação da asma com obesidade. Relatos recentes indicam uma alta prevalência de resistência à insulina em pacientes obesos e asmáticos *versus* obesos não asmáticos, sugerindo que a resistência à insulina possa contribuir com este fenótipo. Baseado nestas informações, o objetivo deste trabalho foi verificar se doenças metabólicas associadas à obesidade, tal como a resistência à insulina, podem estar envolvidas na exacerbação da asma associada à obesidade. No presente estudo observamos que o tratamento de camundongos obesos com metformina corrige a resistência à ação sistêmica da insulina. Além disso, metformina normaliza o trânsito dos eosinófilos da medula óssea até o lúmen em animais obesos e desafiados com OVA. Essa normalização parece ser mediada pela ativação da AMPK no pulmão e diminuição das concentrações de

TNF- α e NOx no LBA e inibição da expressão de iNOS induzida pelo fator de transcrição NF- κ B no pulmão. Além disso, ao normalizar o tráfego de eosinófilos da região peribronquiolar para a luz das vias aéreas, o tratamento com metformina induz concomitante diminuição do acúmulo de eosinófilos na medula óssea devido à regulação positiva da expressão de moléculas de adesão VLA-4 e Mac-1 na superfície das células e posterior aumento da resposta adesiva à ICAM-1 e VCAM-1. Os resultados descritos neste estudo parecem confirmar a hipótese que a resistência à insulina, resultante da obesidade, medeia a exacerbação da resposta inflamatória pulmonar observada em animais obesos. Dessa forma, ao corrigir a resistência à insulina sistêmica através da ativação da AMPK, camundongos sensibilizados obesos aceleram o início do processo de resolução da inflamação pulmonar alérgica.

ABSTRACT

Obesity and asthma are prevalent and increasing diseases, and both have significant impact on global public health. The increase in prevalence of asthma and obesity has led researchers to suggest that obesity may be an important factor in the development of asthma, or even worse the pre-existing asthma. Numerous populational studies conducted around the world indicate that the prevalence of asthma is higher in obese versus lean person. In addition, several prospective studies, both in adults and in children, indicate that the relative risk of incident asthma increases with body mass index (BMI). Obesity also worsens the drug therapy of asthma and the severity of this disease. Recently, several data emerged showing that the inflammation associated with obesity increase the propensity for development of asthma. It is believed that insulin resistance associated with obesity plays an important role in the development of asthma, explaining, at least in part, asthma associated with obesity. Recent reports indicate a high prevalence of insulin resistance in obese asthmatics versus obese non-asthmatics patients, suggesting that insulin resistance may contribute to this phenotype. Based on this information, the purpose of this study was to determine whether metabolic diseases associated with obesity such as insulin resistance, are involved in asthma exacerbation associated with obesity. In the present study we observed that obese mice treated with metformin, impairs the resistance to the systemic action of insulin. Furthermore, in obese mice challenged with OVA, metformin normalizes the transit of eosinophils from bone marrow to the lung lumen. This normalization is mediated by AMPK activation in the lung, as well as decreased concentrations of TNF- α and nitrite and nitrate in BAL fluid accompanied by the inhibition of NF- κ B induced iNOS expression in the lung. Furthermore, by normalizing the eosinophils trafficking from peribronchiolar

region to airway lumen, metformin treatment induces concomitant reduction in the accumulation of eosinophils in bone marrow through the upregulation of adhesion molecules VLA-4 and Mac-1 on cell surface and subsequent increase in the adhesive response to plates coated with ICAM-1 and VCAM-1. Our data seem to confirm the hypothesis that insulin resistance resulting from obesity mediates the exacerbation of airway inflammation in high fat-diet mice. Thus, by normalizing the systemic insulin resistance through the activation of AMPK, obese sensitized mice progress to resolution of allergic airway inflammation.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Obesidade

A obesidade é considerada atualmente um dos principais problemas de saúde pública. Nos últimos 25 anos a incidência da obesidade aumentou dramaticamente em todo o mundo. Dados obtidos até o ano de 2008 estimam que existem mundialmente 1,45 bilhões de adultos acima do peso, dos quais 500 milhões são obesos (Flegal et al., 2010). O número de indivíduos com excesso de peso já ultrapassa o número de pessoas desnutridas, uma estatística que, em parte, reflete a aceitação global de alimentos ricos em gorduras, porém carente de vitaminas e micronutrientes (Finucane et al., 2011). Por conseguinte, o aumento da obesidade mundial tem resultado em uma explosão de problemas de saúde relacionados, como resistência à insulina, diabetes tipo 2, doenças coronarianas, esteatose hepática, câncer, distúrbios do trato urinário e asma (Berrington de Gonzalez, et al., 2010; Toque et al., 2010; Agrawal et al., 2011). Dentre as principais causas da obesidade, destacam-se as mudanças alimentares da população com o excessivo consumo energético, composto por alimentos pobres em nutrientes e ricos em gordura saturada e açúcares, acompanhado de redução da atividade física (WHO, 2004). Além disso, a predisposição genética parece ser fator determinante na suscetibilidade à obesidade (Slomko et al., 2012).

Está atualmente bem estabelecido que abordagens comportamentais e dietéticas têm se mostrados ineficazes no combate à obesidade (Leibel, 2008), e assim a ênfase atual está focada na compreensão das correlações moleculares entre obesidade e as doenças metabólicas crônicas. Neste contexto, a inflamação crônica de baixo grau, que é mediada

principalmente por células do sistema imune inato e adaptativo surgiu como um elo importante entre obesidade e alterações metabólicas (Hotamisligil, 2006; Olefsky e Glass, 2010). Hotamisligil e colaboradores (1993) foram os primeiros a identificar as primeiras ligações entre obesidade, inflamação e resistência à insulina. Nestes relatos iniciais, os autores observaram que o tecido adiposo de animais obesos expressa fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), uma citocina pró-inflamatória que promove resistência à insulina através de fosforilação em serina do substrato do receptor de insulina 1 (IRS1). Embora essas descrições iniciais tenham lançado as bases moleculares associando inflamação no tecido adiposo e resistência à insulina, a verdadeira natureza deste processo inflamatório deixou de ser investigada por mais de uma década.

A obesidade e doenças associadas, como resistência à insulina, diabetes do tipo 2, dislipidemia e esteatose hepática, condição atualmente conhecida como síndrome metabólica, representam um dos maiores desafios para a ciência básica e pesquisas clínicas. É evidente que o desenvolvimento de modelos animais apropriados é crucial para os estudos da patogênese e terapia desta complexa desordem metabólica. Do ponto de vista científico é racional a necessidade não somente de um fenótipo, mas também de um modelo que reproduza em animais as condições patológicas encontradas nos humanos (Buettner et al., 2007). Considerando a natureza poligênica da síndrome metabólica humana, fica claro que os estudos voltados à obesidade monogênica (camundongos ob/ob ou ratos obesos Zucker; (fa/fa) devem ser interpretados com cautela. Por essa razão, diversos estudos vêm utilizando dietas enriquecidas com gordura, conhecidas como dietas hiperlipídicas, para produzir modelos de obesidade em roedores. A primeira descrição desta intervenção nutricional data da década de 40. Estudos subsequentes revelaram que as dietas

hiperlipídicas promovem hiperglicemia e resistência à insulina (Sclafani, 1991; Ikemoto et al., 1996; Woods et al., 2003). Baseado nestas experiências está bem estabelecido que dietas hiperlipídicas podem ser utilizadas para criar um modelo válido de obesidade em roedores (Buettner et al., 2007). Dentre estas linhagens, os camundongos C57BL/6J são os mais utilizados como modelo de síndrome metabólica e resistência à insulina (Collins et al., 2004). A predisposição desta linhagem para desenvolver obesidade tem sido explicada pelo aumento na resistência à leptina quando comparado a outras linhagens (Takahashi et al., 2002; Prpic et al., 2003).

1.1.1. Obesidade e resistência periférica à ação da insulina

A resistência dos tecidos metabólicos, tais como tecido adiposo, fígado e músculo, às ações anabólicas da insulina é denominado resistência à insulina, uma característica das disfunções metabólicas induzida pela obesidade (Kahn e Flier, 2000). A resistência à insulina manifesta-se como disponibilidade de glicose deficiente no músculo e aumento da lipólise de triglicerídeos no tecido adiposo, o que resulta em hiperinsulinemia, hiperglicemia e hiperlipidemia (Kim et al., 1996; Shulman, 2000). Em contraste, o fígado exibe resistência parcial à insulina, com supressão prejudicada da produção de glicose (gliconeogênese), mas não da lipogênese (Brown e Goldstein, 2008). A resistência periférica à insulina em tecidos metabólicos induz aumento da secreção de insulina pelas células beta no pâncreas, um processo denominado hiperinsulinemia compensatória. No entanto, com o agravamento da resistência à insulina, ocorre a exaustão da célula β , resultando em hiperglicemia sustentada e diabetes tipo 2 (Kahn e Flier, 2000; Shulman, 2000). Em geral, vários mecanismos extrínsecos e intrínsecos exibem uma relação de causa

e efeito entre o ganho de peso e resistência periférica à insulina (Qatanani e Lazar, 2007). As vias intrínsecas incluem disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, estresse de retículo endoplasmático e deposição lipídica ectópica. As alterações nos níveis de adipocinas circulantes e de ácidos graxos, assim como a ocorrência de inflamação do tecido metabólico compreendem os mecanismos extrínsecos, os quais modulam a ação periférica da insulina (Chawla et al., 2011).

Weisberg e colaboradores (2003) demonstraram que a obesidade leva a infiltração do tecido adiposo por macrófagos e células do sistema imune (linfócitos e neutrófilo), que são as principais células responsáveis pela resposta inflamatória neste tecido (Ferrante, 2007; Odegaard e Chawla, 2011). Os macrófagos encontrados no tecido adiposo de camundongos obesos têm um fenótipo pró-inflamatório clássico (M1) e induzem expressão de TNF- α e iNOS (Lumeng et al., 2008). Macrófagos alternativamente ativados (M2), encontrados no tecido adiposo magro, exercem papel crucial na manutenção da sensibilidade à insulina, através da secreção de interleucina-10 (IL-10) (Lumeng et al, 2008; Odegaard e Chawla, 2011), uma citocina reguladora que potencializa a sinalização de insulina em adipócitos. Em contraste, os macrófagos classicamente ativados no tecido adiposo de obesos secretam citocinas pró-inflamatórias (Lumeng et al, 2008; Olefsky e Glass, 2010) que induzem resistência à insulina através da fosforilação inibitória do resíduo de serina do IRS mediada pela I κ B quinase β -(IKK β) e pela jun N-terminal quinase (JNK) (Shoelson et al., 2003; Chawla et al., 2011).

1.1.2. Metformina

A metformina é uma das drogas antidiabéticas orais mais prescritas no mundo, sendo o medicamento de escolha no tratamento inicial do diabetes mellitus tipo 2 (DM2), especialmente em pessoas obesas, resistentes à insulina (Bailey e Turner, 1996; ADA, 2008). Apesar da longa história e de décadas de sucesso na clínica, o mecanismo de ação da metformina permanece pouco esclarecido.

A redução da glicemia pela metformina deve-se principalmente às suas ações hepáticas e musculares, que apresentam efeito sensibilizador da insulina (Bailey e Turner, 1996). No fígado, inibe a gliconeogênese e a glicogenólise, enquanto nos tecidos periféricos insulino-dependentes, principalmente na musculatura esquelética, aumenta a captação de glicose, provocando rápida redução da glicemia plasmática. Diferentemente dos secretagogos, a metformina nem aumenta os níveis plasmáticos de insulina, nem causa hipoglicemia, mesmo em doses terapêuticas (Bailey e Turner, 1996). Esta biguanidina também parece alterar o metabolismo lipídico, diminuindo os triglicérides plasmáticos e ácidos graxos livres em virtude de uma inibição da lipólise (Hemmingsen et al., 2009). Estudos mostraram também redução na taxa de colesterol total e de LDL e discreto aumento na taxa de HDL (Rains et al., 1989; Nagi e Yudkin, 1993; Despres, 2003).

Acredita-se que a metformina exerça sua ação farmacológica através da ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK). Esta enzima induz uma cascata de eventos intracelulares em resposta à mudança da carga energética celular (Carling, 2004; Canto e Auwerx, 2010; Hardie et al., 2012). AMPK é uma serina/treonina quinase e consiste em um complexo heterodimérico, que inclui uma subunidade catalítica α e duas unidades regulatórias β e γ . Existem duas isoformas da subunidade α ($\alpha 1$ e $\alpha 2$) e β ($\beta 1$ e $\beta 2$) e três

subunidades γ ($\gamma 1, \gamma 2, \gamma 3$), as quais são diferentemente expressas nos tecidos de mamíferos. A AMPK é ativada via regulação alostérica do aumento da concentração de AMP e pela fosforilação em Thr172 da subunidade α através da serina/treonina quinase LKB1 e da proteína quinase β dependente de cálcio-calmodulina (CaMKK β) (Hardie et al., 2012). A AMPK atua em diversos substratos *downstream*, os quais são normalmente enzimas metabólicas e proteínas envolvidas na regulação da transcrição gênica (Salminen et al., 2012). Sua principal função sinalizadora é responder aos requerimentos metabólicos, tanto através da estimulação da produção de energia, incluindo catabolismo de glicose e lipídeos ou inibição das vias de consumo energético, como síntese de proteína, de ácidos graxos e de colesterol. A atividade diminuída da AMPK pode induzir resistência à insulina em diversos tecidos (Canto e Auwerx, 2010; Hardie et al., 2012).

1.2. Asma

A asma é um problema sério de saúde pública mundial, pois afeta pessoas de todas as idades, podendo ser grave e algumas vezes fatal. Atualmente, a asma atinge 300 milhões de indivíduos no mundo, sendo considerada uma preocupação mundial (Global Initiative National for Asthma, 2011; Wenzel, 2012). Nos últimos 30 anos tem se observado um aumento da prevalência da asma em países industrializados, principalmente nas áreas urbanas (Cooper et al., 2006; Kazani et al., 2011). Os países da América Latina, incluindo o Brasil, vêm sofrendo com o rápido processo de mudanças na população, que inclui urbanização, migração, desenvolvimento econômico e a adoção do moderno estilo de vida. Neste contexto, a asma e as doenças alérgicas estão entre os principais problemas de saúde pública em ascensão, principalmente na população infantil (Cooper et al., 2006; Pearce e Douwes, 2006).

A exemplo da obesidade, a asma também é considerada uma doença inflamatória crônica, e, embora não se conheça a natureza exata da doença, acredita-se que envolva interações com fatores ambientais e genéticos (Wenzel, 2012). É uma doença complexa, caracterizada por obstrução e inflamação das vias aéreas e hiperreatividade brônquica a vários estímulos, a qual é reversível espontaneamente ou com tratamento farmacológico (Hanania, 2008; Lemanske e Busse, 2010; Holgate, 2012). A inflamação crônica das vias aéreas envolve diversos tipos celulares, como linfócitos, neutrófilos, mastócitos e especialmente eosinófilos, que desempenham funções importantes (Holgate, 2008). A ativação destas células leva à liberação de mediadores pró-inflamatórios e citocinas, os quais causam aumento da permeabilidade vascular, contração da musculatura brônquica, infiltração de células inflamatórias, hipersecreção de muco, hiperreatividade das vias aéreas e por último remodelamento das vias aéreas. Estas mudanças são expressas clinicamente como chiado, respiração curta e ofegante, dispnéia, tosse e deposição de muco.

A asma alérgica é a mais comum, sendo frequentemente associada a histórico familiar de atopia, podendo ser desencadeada por antígenos ambientais (Robbins et al. 1994; Galli e Tsai, 2012). A atopia e doenças relacionadas como a asma, rinite alérgica e dermatite atópica são conhecidas como doenças presentes em tecidos específicos, como pulmão, nariz e pele, respectivamente. Recentemente, porém, tem se proposto que a alergia exibe natureza sistêmica, devendo-se considerar a participação da medula óssea e eventos hematopoiéticos sistêmicos relacionados aos processos alérgicos (Denburg, 2008). Em sujeitos alérgicos, a provocação com alérgeno promove uma resposta sistêmica, estimulando a produção de progenitores de células inflamatórias específicas (eosinófilos) na medula óssea, levando à diferenciação precoce de eosinófilos e liberação do

compartimento da medula óssea (Uhm et al., 2012), quando então são recrutadas para a mucosa respiratória e outros tecidos (Rankin, 2008).

1.2.1. Fisiopatologia da Asma

O desenvolvimento da crise de asma e a relação desta com o fator desencadeante têm sido estudados mais amplamente em indivíduos atópicos. O processo de sensibilização da doença provavelmente representa a primeira etapa para o desenvolvimento do quadro asmático. Os alérgenos inalados entram em contato com a mucosa respiratória e são capturados por células dendríticas presentes no epitélio brônquico. Estas células são capazes de reconhecer, processar e apresentar o antígeno aos linfócitos T. A interação destas células com os linfócitos T faz com que os linfócitos B sejam estimulados, produzindo imunoglobulina E (IgE), que, liberadas na circulação, se ligam a receptores de alta afinidade presentes em mastócitos (Holgate et al, 2005; Afshar, 2008; Galli e Tsai, 2012). Nos próximos contatos como agente desencadeante, a maioria dos pacientes asmáticos desenvolve uma fase imediata e uma fase tardia de broncoconstrição. A fase imediata se instala em poucos minutos sendo caracterizada por obstrução das vias aéreas de curta duração. A fase tardia ocorre após cerca de 3 horas de contato com o alérgeno, podendo durar por vários dias. Nesta fase, há um amplo processo inflamatório decorrente de intensa migração celular para as vias aéreas (O'Byrne, 1998; Holgate, 2008; Holgate, 2012).

Um aspecto fundamental da asma associado à sensibilização alérgica é a habilidade das vias aéreas em reconhecer os alérgenos ambientais e gerar uma resposta do tipo Th2.

Uma vez sensibilizados, os linfócitos T não somente migram das vias aéreas para o local de apresentação do antígeno, mas também se tornam potentes produtores de diversas citocinas, como a interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6), interleucina (IL-9), interleucina (IL-13) e fator estimulante de colônia de macrófago-granulócito (GM-CSF) (O'Byrne, 2005; Afshar et al., 2008; Holgate, 2008; Islam e Luster, 2012). Através da produção de citocinas, estas células T são capazes de recrutar células efetoras secundárias, tais como macrófagos, basófilos, neutrófilos e principalmente eosinófilos para a zona inflamada, onde se tornam primadas e subseqüentemente ativadas para a secreção de mediadores inflamatórios (Umetsu e Dekruyff, 2006; Holgate, 2012).

1.2.2. A importância dos eosinófilos na asma

Indivíduos asmáticos têm número elevado de eosinófilos no sangue e no lavado broncoalveolar (LBA) e infiltrado inflamatório pulmonar rico em células ativadas (mastócitos, monócitos, linfócitos), principalmente eosinófilos (Uhm et al., 2012). A importância dos eosinófilos foi enfatizada pelos achados que correlacionavam o grau de eosinofilia no sangue e LBA com o grau de hiperreatividade brônquica e gravidade da asma (Szeffler et al., 2012). Os achados obtidos de pacientes asmáticos e de modelos de asma experimental mostram que os eosinófilos desempenham um papel importante nesta; sendo assim, seu acúmulo seletivo e ativação na mucosa brônquica são considerados eventos centrais na patogênese da asma (Weller, 1991; Holgate, 2008; Szeffler et al., 2012).

Eosinófilos derivam de células progenitoras hematopoiéticas CD 34+ na medula óssea que, sob ação da IL-3, IL-5 e GM-CSF, se diferenciam em eosinófilos a partir de seus precursores mielóides (Boyce et al., 1995; Trivedi e Lloyd, 2007). Em resposta a diversos

estímulos, os eosinófilos são recrutados da circulação para o local inflamado, onde modulam a resposta inflamatória (Barnes, 2011). Eosinófilos ativados liberam substâncias citotóxicas, como espécies reativas de oxigênio (ERO) e proteínas tóxicas como a proteína básica principal (MBP), proteína catiônica do eosinófilo (ECP), neurotoxina derivada do eosinófilo (EDN) e peroxidase do eosinófilo (EPO), além de produzirem e liberarem vários mediadores pró-inflamatórios, incluindo citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos (Hogan, et al., 2008; Finiasz et al.; 2011; Kita, 2011). Dentre as citocinas citadas acima, a IL-5 é a mais específica para a linhagem eosinofílica sendo responsável pelo crescimento, diferenciação, ativação e sobrevida desses leucócitos (Sanderson, 1992; Collins et al., 1995; Barnes, 2008). A eotaxina exerce atração específica sobre os eosinófilos, atuando predominantemente em receptores CCR-3 (Barnes, 2008). Os mecanismos responsáveis pelo recrutamento de eosinófilos para o sítio inflamatório ainda não estão completamente elucidados; porém, evidências apontam para o envolvimento de IL-3, GM-CSF, IL-5 e quimiocinas, principalmente a eotaxina (Rosenberg et al., 2007; Uhm et al., 2012). Supõe-se que a IL-5 e a eotaxina ajam cooperativamente neste evento, onde a IL-5 atuaria ativando e aumentando o número de eosinófilos em resposta à eotaxina (Mould et al., 1997, Palframan et al., 1998b; Rothenberg et al., 2006).

Acredita-se que o recrutamento de eosinófilos para as vias aéreas exacerbe a asma e contribua para o caráter crônico desta doença (Barnes, 2011). A migração de eosinófilos para o tecido inflamado é um processo complexo, regulado por numerosos fatores, incluindo citocinas, quimiocinas, óxido nítrico (NO) e interações de moléculas de adesão (Szefer et al., 2012). As integrinas estão entre as proteínas celulares mais versáteis, e têm sido alvo de muito interesse no estudo da patogênese da asma por serem moléculas de

adesão importantes no extravasamento dos eosinófilos para as vias aeríferas (Broide e Sriramarao, 2001). As integrinas mais importantes na adesão firme de eosinófilos ao endotélio são Mac-1 (CD11b/CD18; $\alpha_x\beta_2$) e VLA-4 (CD49d/CD29; $\alpha_4\beta_1$), que se ligam a *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) e *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1), respectivamente. A ICAM-1 e VCAM-1 são membros da superfamília das imunoglobulinas; estão presentes na superfície das células endoteliais, e são responsáveis pela interação célula-célula (Lampinen et al, 2004; Gonlugur e Efeoglu, 2004). Após a adesão firme, os eosinófilos são capazes de migrar para os tecidos em resposta a fatores quimiotáticos produzidos no local da inflamação.

O NO tem sido apontado como potencial mediador na inflamação asmática (Thomassen et al., 1999; Sugiura e Ichinose, 2011). Animais submetidos ao desafio alérgico assim como pacientes asmáticos apresentam níveis elevados de NO no ar exalado (Barnes e Liew, 1995; Petsky et al., 2012; Szeffler et al., 2012). Embora a fonte exata do NO não esteja esclarecida, há indícios de que seja advindo da iNOS produzida pelas células epiteliais das vias aéreas inferiores (Hjoberg et al., 2004; Iijima et al., 2005; Xia et al., 2012). Camundongos *knockout* para a iNOS apresentam manifestações da inflamação pulmonar alérgica bastante atenuadas, incluindo redução do infiltrado eosinofílico (Xiong et al., 1999). Outros trabalhos conduzidos em animais sensibilizados com antígeno mostraram que L-NMMA, L-NAME (inibidores não seletivos da iNOS) e aminoguanidina (inibidor seletivo da iNOS) inibem o influxo de células inflamatórias induzido pelo alérgeno. Esses trabalhos apóiam o conceito de que o NO, através da iNOS, exerce um papel importante na migração de células inflamatórias (Ferreira et al., 1996, 1998; Korhonen et al., 2005; Hesslinger et al., 2009; Prado et al., 2011; Marques et al., 2012).

A função do NO depende da sua concentração e da sua interação com biomoléculas e proteínas. O NO reage com ERO, em especial com ânion superóxido (O_2^-), formando o peroxinitrito ($ONOO^-$), o qual induz modificações covalentes do resíduo tirosina de diversas proteínas (nitração), causando alterações estruturais e biológicas, além de causar dano ao DNA celular e inibir a cadeia respiratória mitocondrial (Folkerts et al., 2001; Andreadis et al., 2003; Sugiura e Ichinose, 2011).

1.3. Asma e obesidade

A asma e a obesidade são importantes problemas de saúde pública (Flegal et al., 2002). Nos últimos 30 anos, a incidência de obesidade cresceu de forma dramática em todo o mundo enquanto que a prevalência de asma triplicou (Mannino et al., 2002). Ainda permanece incerto se esta associação é causal ou coincidente, e o maior desafio na compreensão da natureza da relação entre obesidade e asma tem sido determinar se a obesidade realmente modifica o risco da asma ou o seu fenótipo. No final da década de noventa, Camargo e colaboradores (1999) reportaram o primeiro estudo prospectivo associando a obesidade e o risco do desenvolvimento de asma em adultos. A partir daí, diversos grupos ao redor do mundo, utilizando uma variedade de modelos confirmaram uma associação positiva entre o índice de massa corporal (IMC) e a asma (Ford, 2005; Santamaria et al., 2012). Dados epidemiológicos indicam um aumento da incidência de asma em adultos e crianças com sobrepeso e obesos (Moudgil, 2000; Ford, 2005; Ma et al., 2010; Arshi et al., 2010; Santamaria et al., 2012). Numerosos estudos populacionais conduzidos em todo mundo indicam que a prevalência de asma é maior em indivíduos

obesos *versus* magros. Além disso, diversos estudos prospectivos, tanto em adultos quanto em crianças, indicam que o risco relativo da incidência de asma aumenta com o IMC (Shaheen et al., 1999; Thomson et al., 2003; Pakhale et al., 2010). A obesidade também piora o controle medicamentoso da asma e a gravidade desta doença (Tantisira et al., 2001; Varraso et al., 2005; Saint-Pierre et al., 2006; Lavoie et al., 2006; Chanez et al., 2007; Taylor et al., 2008; Sutherland et al., 2010; Dixon, 2012). As observações que a perda de peso, seja cirúrgica ou por indução de dieta, proporciona melhora das diversas consequências da asma, incluindo prevalência, gravidade, uso de medicamentos e hospitalizações, reforçam a relação entre a obesidade e a asma (Hakala et al., 2000; Ford et al., 2003; Beuther et al., 2006; Sikka et al., 2010; Sideleva et al., 2012). Tem sido sugerido que a obesidade e a asma apresentam algumas etiologias comuns, principalmente em suas bases genéticas (Weiss, 2005); entretanto, é possível que existam outros mecanismos biológicos através dos quais a obesidade possa ser tanto a responsável pela causa ou pelo agravamento da asma.

Dados obtidos de modelos animais também sustentam esta relação entre obesidade e asma (Shore e Johnston, 2006; Shore, 2007; Calixto et al., 2010; Lintomen et al., 2012). Na tentativa de avaliar os mecanismos relevantes da associação da obesidade e da asma, camundongos obesos vêm sendo utilizados para descrever os potenciais mecanismos através dos quais a obesidade pode modular a inflamação das vias aéreas e/ou sua função. O modelo mais frequentemente utilizado nestes estudos é o de obesidade genética, incluindo camundongos geneticamente deficientes na produção de leptina (camundongos ob/ob), que vem a ser o principal hormônio responsável pela regulação do apetite e do gasto energético, ou do receptor de leptina (camundongos db/db), assim como camundongos

deficientes da produção de carboxipeptidase E (camundongos Cpefat), uma enzima importante no processamento de pró-hormônios e pró-neuropeptídeos envolvidos na saciedade e no gasto de energia (Leibel et al., 1997). Estes estudos têm examinado principalmente o impacto da obesidade na hiperreatividade inata das vias aéreas, assim como na resposta a agentes desencadeadores de asma, como o ozônio (poluente do ar) e alérgenos. Camundongos obesos ob/ob, db/db e Cpefat exibem hiperreatividade inata das vias aéreas, uma característica importante na asma. A magnitude desta hiperreatividade parece variar de acordo com a magnitude da obesidade (Shore et al., 2003; Lu et al., 2006; Shore e Johnston, 2006; Shore, 2007). Camundongos obesos apresentam aumento na resposta pulmonar ao ozônio (O₃), incluindo aumento da resistência pulmonar, hiperreatividade das vias aéreas e inflamação pulmonar (Shore, 2007). Estas observações já foram observadas em humanos obesos, os quais também respondem ao O₃ com aumento significativo da reatividade e diminuição da função pulmonar comparados a indivíduos magros (Alexeeff et al., 2007; Bennett et al., 2007). Estudo conduzido por Calixto e colaboradores (2010) mostrou que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica influencia a eosinopoiese, aumenta o recrutamento de eosinófilos da medula óssea para o tecido pulmonar, e retarda seu trânsito através do epitélio até o lúmen das vias aéreas. Dessa forma, os eosinófilos permanecem por mais tempo na região peribronquiolar exercendo suas funções citotóxicas. Estes resultados também foram encontrados em camundongos ob/ob, deficientes de leptina (Lintomen et al., 2012).

1.3.1. Asma e resistência à insulina

A resistência à insulina associada à obesidade parece desempenhar importante papel no desenvolvimento da asma, explicando, ao menos em parte, a associação da asma com

obesidade (Thuesen et al., 2009; Agrawal et al., 2011). Relatos recentes indicam uma alta prevalência de resistência à insulina em pacientes obesos e asmáticos *versus* obesos não asmáticos, sugerindo que a resistência à insulina possa contribuir para este fenótipo (Gulcan et al., 2009; Thuesen et al., 2009; Arshi et al., 2010; Ma et al., 2010). Estudos epidemiológicos têm mostrado que a obesidade abdominal está mais fortemente associada à asma do que a massa corporal geral (Von et al., 2001). A obesidade abdominal está também associada à síndrome metabólica secundária à obesidade, que é representada ao nível molecular por resistência à insulina e hiperinsulinismo (Samuel e Shulman, 2012).

A via do NO parece dar suporte experimental à elucidação da associação entre asma e resistência à insulina. A iNOS, que é induzida por uma variedade de estímulos inflamatórios, sintetiza elevados níveis de NO, que, na presença de ERO, conduz à geração de espécies reativas de nitrogênio mais tóxicas, como o ONOO- (Mabalirajan et al., 2010). O estresse nitrosativo leva a modificações covalentes e inibição de várias proteínas fundamentais na sinalização da insulina (Carvalho-Filho et al., 2006; Pilon, et al., 2010). Estudos mostram que o bloqueio crônico do NO, através do uso de L-NAME, em camundongos obesos ou a deleção do gene da iNOS diminui a adiposidade induzida pela dieta hiperlipídica, reduz a inflamação do tecido adiposo e “melhora” a sinalização da insulina no músculo esquelético, sugerindo que o NO desempenha papel modulatório no desenvolvimento da obesidade e resistência à insulina (Tsuchiya et al., 2007; Perreault e Marette, 2001). Além disso, a resistência à insulina associada com a iNOS em camundongos é mediada por S-nitrosilação (Carvalho-Filho et al., 2006) e nitração (Pilon, et al., 2010) das proteínas envolvidas na transdução de sinal de insulina, como o receptor de insulina, sub-unidade beta (IRbeta), o substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) e Akt.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é verificar se a resistência à insulina é responsável pela exacerbação da asma associada à obesidade, com ênfase para o infiltrado eosinofílico pulmonar e eosinopoiese medular.

2.1 *Objetivos específicos*

- I. Avaliar o efeito do tratamento crônico com metformina na resistência sistêmica à insulina em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica;
- II. Avaliar o efeito do tratamento com metformina sobre o número de eosinófilos no tecido pulmonar, no lavado broncoalveolar (LBA) e na medula óssea (MO) de camundongos obesos e asmáticos;
- III. Avaliar o efeito do tratamento com metformina sobre os níveis de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-5), de quimiocinas (eotaxina) e dos metabólitos do óxido nítrico (NOx) no LBA de camundongos obesos e asmáticos;
- IV. Avaliar o efeito do tratamento com metformina sobre a expressão da p-AMPK, p-ACC e p-I κ B no tecido pulmonar de camundongos obesos e asmáticos;
- V. Avaliar o efeito do tratamento com metformina sobre a expressão de iNOS no tecido pulmonar de camundongos obesos e asmáticos, e se a mesma é regulada pelo fator de transcrição NF- κ B.
- VI. Avaliar a adesão *in vitro* de eosinófilos da MO de camundongos obesos e asmáticos em placas recobertas com ICAM-1 e VCAM-1;

- VII. Avaliar a expressão de moléculas de adesão (VLA-4 e Mac-1) e receptores para quimiocinas (CCR-3) na superfície de eosinófilos da medula óssea (MO) de camundongos obesos e asmáticos;
- VIII. Avaliar o efeito do tratamento metformina sobre adesão de eosinófilos da MO à ICAM-1 e VCAM-1, bem como sob expressão de moléculas de adesão (VLA-4 e Mac-1) em camundongos obesos e asmáticos;
- IX. Avaliar os níveis de citocinas (IL-5, TNF- α) e quimiocina (eotaxina) na medula óssea de camundongos obesos e asmáticos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos de 4 semanas de idade das linhagens C57BL/6. Os animais foram fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP e mantidos a 24°C, com um período de iluminação diária de 12 h, com água e alimentação *ad libitum* no Departamento de Farmacologia da FCM/UNICAMP. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) – IB – UNICAMP sob protocolo de nº 1496-1.

3.2. Indução da obesidade com dieta hiperlipídica

A obesidade foi induzida através da substituição da dieta padrão por dieta AIN-93 modificada para hiperlipídica (Reeves et al., 1993) que consiste em 46,5% de lipídeo, 38,5% de carboidrato e 15% de proteína, durante 10 semanas. Os grupos controles receberam dieta comercial padrão para roedores de acordo com o AIN-93G, da marca NUVILAB. As dietas e a água foram oferecidas *ad libitum*.

3.3. Teste de tolerância à insulina (ITT)

Camundongos alimentados com dieta hiperlipídica ou dieta padrão para roedores (controle) foram mantidos em jejum por 6 h. Após o jejum, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de insulina (1 U/Kg; Lilly). O sangue foi coletado da cauda dos camundongos e o nível de glicose foi medido nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 min, utilizando aparelho glicosímetro (Accu-Chek Performa, Roche Diagnostics, E.U.A). A taxa de decaimento da glicose foi obtida através da curva de regressão linear do logaritmo

neperiano da glicose *versus* o tempo. Este valor foi assumido como a constante de decaimento de glicose após o ITT (KITT) e expresso por porcentagem por minuto.

3.4. Sensibilização com ovalbumina (OVA) e desafio intranasal

A sensibilização teve início na 8ª semana de tratamento com a dieta hiperlipídica. Cada camundongo recebeu injeção subcutânea de OVA (100 µg de OVA, 1,6 mg de Al(OH)₃ em 0,4 ml de soro fisiológico) no dorso, no dia zero e no dia 7. Nos dias 14 e 15 os animais foram desafiados por via intranasal (10 µg de OVA em 50 µl de soro fisiológico) 2 vezes (com intervalo de 6 h). Em intervalos de 3 a 72 h após o desafio intranasal, os animais foram anestesiados, exsanguinados, e submetidos aos diversos procedimentos experimentais para coleta do lavado broncoalveolar (LBA), do sangue circulante, da medula óssea (MO), do pulmão e da gordura epididimal.

3.5. Tratamentos farmacológicos

3.5.1 Tratamento com metformina

Camundongos obesos e controles (magros) foram tratados com metformina (3 mg/kg) diariamente por gavagem, durante duas semanas (Shore et al., 2008). O início do tratamento ocorreu concomitantemente com a primeira imunização e os desafios sucederam-se nos dois dias finais do tratamento com metformina. A coleta do LBA, MO e pulmão para análise histológicas foram realizadas 3 e 48 h após o primeiro desafio, conforme ilustrado no esquema abaixo (Fig. 1).

3.6. Coleta e contagem de células no lavado broncoalveolar e medula óssea

3.6.1 Lavado broncoalveolar

Os camundongos tiveram a traquéia exposta com o auxílio de material cirúrgico (pinça e tesoura pequenas); em seguida, a traquéia foi delicadamente canulada com um cateter (24G). Em seguida, amarrou-se delicadamente uma linha em volta da traquéia para que o cateter não se movesse e nem saísse do interior da traquéia. Posteriormente, através da cânula já fixada à traquéia, foram feitas 5 lavagens broncoalveolares com 300 µl de PBS gelado. Ao término do método, recuperou-se um volume aproximado de 1,5 ml de LBA por camundongo. Após a coleta, o LBA foi centrifugado a 4°C (500 x g por 10 minutos); o sobrenadante foi coletado e estocado a -80°C. O *pellet* foi ressuspensão em 200 µl de PBS e utilizado para contagem total de células em câmara de Neubauer, para confecção de lâmina em citocentrífuga e posterior contagem diferencial dos leucócitos.

3.6.2 Medula óssea

O fêmur direito de cada animal foi retirado com o auxílio de material cirúrgico (pinças e tesouras) e transferido para uma placa de Petri pequena contendo 2,5 ml de PBS. O canal medular foi lavado com o PBS contido na placa, utilizando-se seringa e agulha (25x0,70 mm ou 22G1). Após esse procedimento, a suspensão celular foi transferida para um tubo cônico de 15 ml e homogeneizado com auxílio pipeta Pasteur. As células da medula óssea foram utilizadas para contagem total de células em câmara de Neubauer (com líquido de Turk), para a confecção de lâmina (citocentrífuga) e para posterior contagem diferencial (corante hematológico). Através de critérios morfológicos e da coloração da linhagem eosinofílica diferenciaram-se eosinófilos imaturos de eosinófilos maduros.

Consideraram-se mieloblastos, promielócitos e mielócitos como eosinófilos imaturos; e metamielócitos, bastonetes e segmentados como sendo eosinófilos maduros.

3.7. Análise morfológica

Para a análise histológica, os pulmões de animais imunizados e desafiados com OVA foram retirados e embebidos em formalina (10%) por 24 h e em seguida em álcool 70% até inclusão em parafina. Posteriormente, esses pulmões foram seccionados em segmentos de 4 a 5 µm os quais foram corados com hematoxilina-eosina (H-E). e com o de periódico ácido de Schiff (PAS)/hematoxilina para avaliação de células produtoras de muco ou picrosirius-hematoxilina e anticorpo contra o colágeno tipo I. Para cada animal, as contagens de leucócitos totais e diferenciais foram realizadas em 5 campos de grande aumento com auxílio de um microscópio Nikon Eclipse E600. As imagens foram captadas com uma câmera digital Nikon DXM1200C e a análise morfométrica foi realizada utilizando o NIS Elements AR Software Imaging 2,30. Para a produção de muco e colágeno quantificou-se a área corada com o número máximo de vias aéreas pequenas (0,4 - 0,7 mm de diâmetro) em cada lâmina (uma lâmina/animal). As áreas coradas de cada animal foram calculadas e este número foi considerado representativo para um animal individual. Os resultados são apresentados como a média da área corada em micrometros quadrados.

3.8. Dosagens de citocinas e quimiocinas no LBA e/ou MO

A suspensão celular obtida do LBA ou da medula óssea foi centrifugada por 10 minutos a 500 g e o sobrenadante foi utilizado para dosar IL-5, eotaxina e TNF- α através de kits ELISA (R&D, Minneapolis, E.U.A).

3.9. Dosagens de NO_x

A detecção dos metabólitos do NO, nitrato e nitrito (NO_x), no LBA foi feita através da conversão de nitrato em nitrito através da enzima nitrato redutase, na presença de cofatores e subsequente dosagem do nitrito com o reagente de Griess. Para tal, utilizamos o Kit comercial *Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit*; Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan, USA)

3.10. Ensaio de Adesão

Os fêmures foram retirados e o canal medular de cada osso foi lavado com 2,5 ml de RPMI morno. A suspensão celular obtida foi homogeneizada, distribuídas em placas de Petri e mantidas em estufa à 37° e 5% CO₂ por 30 min. Após 30 min as células não aderentes foram recuperadas, a placa foi lavada por duas vezes com RPMI morno e transferidos para novo tubo. Parte da suspensão celular foi utilizada para confecção de lâminas para a contagem diferencial.

O ensaio de adesão foi realizado como descrito previamente por Hakansson e colaboradores (1994), com algumas modificações. Os ensaios foram realizados usando-se placas de 96 poços (Costar - Corning Inc., EUA), sendo as mesmas previamente recobertas com 50 µl de ICAM-1 (recombinante ICAM-1/CD54/Fc de camundongo; R&D Systems, 5µg/mL), ou VCAM-1 (recombinante VCAM-1/CD106/Fc de camundongo; R&D Systems, 2,5µg/mL). As placas recoberta foram deixadas *overnight* à 4°C. Os poços foram lavados no dia seguinte com 200 µl de PBS por 2x, e as ligações não específicas foram bloqueadas com a adição de 100 µl de PBS/BSA 0,1% por 1 h à 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas mais 2 vezes com 200 µl de PBS e deixadas secar à 37°C. Após este período, 25 µl da suspensão celular (1x10⁶ células/mL) obtida da medula óssea, foram

adicionados aos poços. A placa foi então incubada por 30 min (37°C; 5% CO₂; ar úmido), e posteriormente lavada por 2x com 200 µL de PBS para retirar as células não aderidas. Os poços ensaiados receberam 25 µl de RPMI; logo após, foi acrescido a todos os poços ensaiados 25 µL do substrato da EPO (1 mM H₂O₂, 1 mM fenilenediamina, 0,1% triton X-100 em tampão Tris pH 8,0). Sob leve agitação, a placa foi incubada à temperatura ambiente por 30 min, e após esse período, foi adicionado 25 µl de H₂SO₄ (4 M) por poço para interromper a reação. A absorbância foi avaliada no leitor de ELISA (Multiscan MS, Labsystems, EUA), à 490 nm. A adesão dos eosinófilos foi medida através da atividade da EPO das células aderidas das amostras (Nagata et al., 1995). A adesão foi calculada através da correção dos valores da densidade óptica e do número de eosinófilos acrescidos em cada poço.

3.11. Citometria de fluxo

A expressão de moléculas de adesão na superfície de eosinófilos da medula óssea, coletados 48 h após o desafio com OVA, foi detectada usando-se a técnica de citometria de fluxo. Para isto, 100 µl da suspensão celular (1×10^5 células/ml) obtida da medula óssea foram lavados e pré-incubados durante 20 min com PBS contendo 1% de albumina de soro bovino (BSA). Em seguida, as células foram lavadas com PBS e incubadas com uma concentração saturada dos seguintes anticorpos monoclonais: anti-CCR3 Alexafluor-conjugado, anti-CD49d PE-conjugado, e anti-CD11b FITC-conjugado ou com seus respectivos controles isotípicos por 20 min à 4°C no escuro. As células foram lavadas duas vezes com PBS contendo 0,1% de BSA e então fixadas em 300 ml paraformaldeído 0.5% por 10 min à 4°C. Polimorfonucleares de alta granulosidade, CCR3+, foram identificados como eosinófilos. As leituras foram realizadas utilizando-se o citômetro de fluxo Becton-

Dickinson FACScalibur (San Jose, CA , EUA), e analisadas através do software CellQuest Pro.

3.12. Western blotting

Os pulmões retirados de animais obesos e controle tratados ou não com Metformina (3 mg/kg/dia) foram homogeneizadas com um Polytron (Kinematica. Suíça) em tampão de extração (SDS 1%, Tris (pH 7,4) 100mM, pirofosfato de sódio 100mM, fluoreto de sódio 100mM, EDTA 10mM, ortovanadato de sódio 100mM) e incubadas à 96°C por 10 min. Após centrifugação, foi removido o material insolúvel, e parte do sobrenadante das amostras foi utilizado para determinação do conteúdo protéico por espectrofotometria com reagente Bradford (Biorad, CA, USA) e o restante foi acrescido de tampão Laemmli 5X e incubado à 96°C por 10 min. A mesma quantidade de proteínas totais de cada amostra tratada com Laemmli foi fracionado em SDS-PAGE (2,6%C e 8-12%T) em aparelho para minigel (*Bio-Rad*). Após separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, CA, USA). As membranas foram então bloqueadas com uma solução contendo BSA 5%, Tris-Base, NaCl e Tween-20 por 2 horas à temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com anticorpos específicos contra iNOS, p-AMPK, p-ACC, p-IkB, 11-βHSD1, 11-βHSD2 e GAPDH por 4 horas à temperatura ambiente. Após marcação com anticorpo primário, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado à peroxidase por 1 hora à temperatura ambiente (GE Healthcare, USA). Antes da detecção, as membranas foram incubadas por 1 minuto com uma solução contendo luminol, ácido p-cumárico e H₂O₂ e, então, expostas durante tempos variados a filmes de raio-X. Depois de revelados, esses filmes foram submetidos a análise de densitometria óptica pelo Software Scion Image

(Scioncorp, NIH, EUA). Os valores de intensidade óptica obtidos na leitura das bandas após a incubação com os anticorpos de interesse foram corrigidas pela intensidade óptica da leitura das bandas incubadas com o anticorpo anti-GAPDH, pois esta proteína é constitutiva e sua expressão não é alterada em função de intervenções realizadas, podendo deste modo atuar como um fator de correção na análise semi-quantitativa obtida pela técnica de Western blot.

3.13. Ensaio ChIP (*chromatin immunoprecipitation assay*)

A imunoprecipitação do fator de transcrição ligado à cromatina foi realizada de acordo com método previamente descrito (Freitas *et al.*, 2008). Resumidamente, os fragmentos de pulmão de camundongos obesos e controles, tratados ou não com metformina, foram submetidos a uma etapa inicial de *cross-link* com formaldeído 1% a temperatura ambiente por 10 minutos, para promover a estabilização da ligação das proteínas nucleares ao DNA. Após fixação, foi feita a lise das membranas celulares e nucleares em tampão com alta concentração de SDS, seguida da fragmentação da cromatina por sonicação (11 pulsos à amplitude de 60%) em fragmentos entre 500 e 1.000 pares de bases. Logo após foi realizado o *preclearing* por 2 h à 4°C com esferas de sefarose revestidas de Proteína A e saturadas de DNA de esperma de salmão. Uma alíquota de 10 ul foi coletada como *input*. Os fragmentos de DNA ligados ao fator de transcrição de interesse foram separados por imunoprecipitação com 2 µg anticorpo específico para subunidade p65 do fator de transcrição NF-κB e esferas de sefarose revestidas de Proteína A e saturadas de DNA de esperma de salmão por 24 horas à 4°C. Os fragmentos de DNA co-imunoprecipitados foram eluídos das esferas com tampão contendo alta concentração de SDS e bicarbonato de sódio. O *cross-link* do DNA com o fator de transcrição foi revertido

com incubação das amostras a 65°C por 24 horas. No final, o DNA foi purificado com fenol-clorofórmio e uma alíquota foi submetida à amplificação por PCR em tempo real com *primers* específicos para a região promotora do gene da iNOS, as sequências dos *primers* utilizados foram 5'GCAAGCACTTTACCAACTGAGCC3' para sense e 5'CTAGCACATCCTGCCAGGGTCC3 para antisense'. Os valores foram expressos como a relação entre a amostra imunoprecipitada com o anticorpo específico para a subunidade p65 do NF-κB e a amostra *input*. O *input* é uma amostra utilizada na reação em cadeia da polimerase (PCR) como controle da quantidade total de DNA utilizado no ensaio.

3.14. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão das médias (EPM). Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) para múltiplas comparações seguido pelo teste de Tukey, ou teste *t* de *Student* não pareado, quando apropriado. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Efeito do tratamento com metformina sob a adiposidade, glicemia e resistência à insulina.

Camundongos C57BL/6J desenvolvem obesidade acompanhada de intolerância à glicose quando alimentados com dieta hiperlipídica por um período de 10 semanas (Calixto et al., 2010). No presente estudo avaliamos se camundongos alimentados com dieta hiperlipídica apresentam intolerância à insulina após se tornarem obesos e se o tratamento diário, por um período de 15 dias, com metformina reverte este quadro.

O tratamento com metformina modificou tanto os valores de glicemia de jejum como a resistência à insulina nos animais obesos. O teste de tolerância à insulina (TTI) mostrou que os animais obesos são resistentes à ação da insulina quando comparados com os animais controle (Figura 2 A). Após a administração da insulina, o nível de glicose sanguínea, nos camundongos controle abaixa progressivamente, ao passo que nos animais alimentados dieta hiperlipídica, a queda dos valores glicêmicos é menor. O tratamento com metformina diminuiu de forma significativa a resistência à ação da insulina nos camundongos obesos por indução de dieta hiperlipídica (Figura 2B).

A taxa de queda de glicose em resposta a 1 UI / kg de insulina recombinante foi avaliada através do cálculo da constante de captação de glicose (Kitt). A Kitt está diminuída no grupo obeso em relação ao grupo controle. O tratamento com metformina aumentou em 2,8 vezes o Kitt nos animais obesos, quando comparado com obesos não tratados. Não existe diferença estatística nos valores de Kitt entre obeso e controle tratados com metformina (Figura 2C). Estes dados confirmam que a metformina reverte a resistência à insulina induzida pela obesidade.

O ganho de peso e o peso da gordura epididimal não foram alterados pelo tratamento com metformina (Figura 3 A e B). Animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram ganho de peso e o peso da gordura epididimal significativamente maiores ($p > 0,001$) comparados com animais alimentados com dieta padrão para roedores.

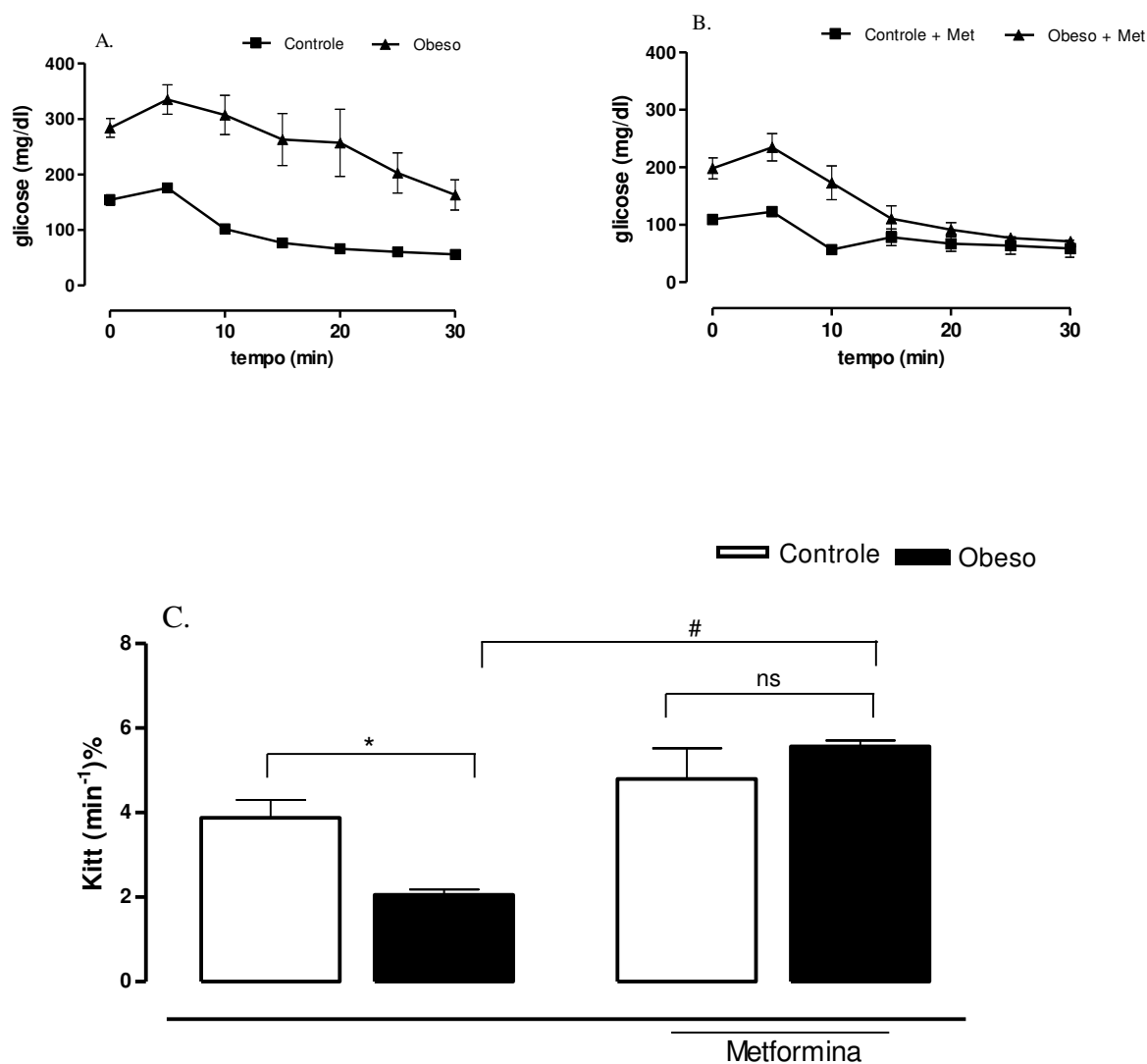


Figura 2: Curva de tolerância a insulina (ITT) em camundongos obesos e controles tratados ou não com metformina. Os gráficos representam os dados obtidos de animais obesos e controles (A), animais obesos e controles tratados com metformina (3 mg/kg/dia) (B) e cálculo da constante de captação de glicose (Kitt) de animais obesos e controles tratados com metformina (C). Os dados estão expressos como média $\pm$ E.P.M para $n=6$. * $p < 0,05$ comparado com controle tratado. # $p < 0,05$ comparando com obeso não tratado. NS quando não há diferença significativa.

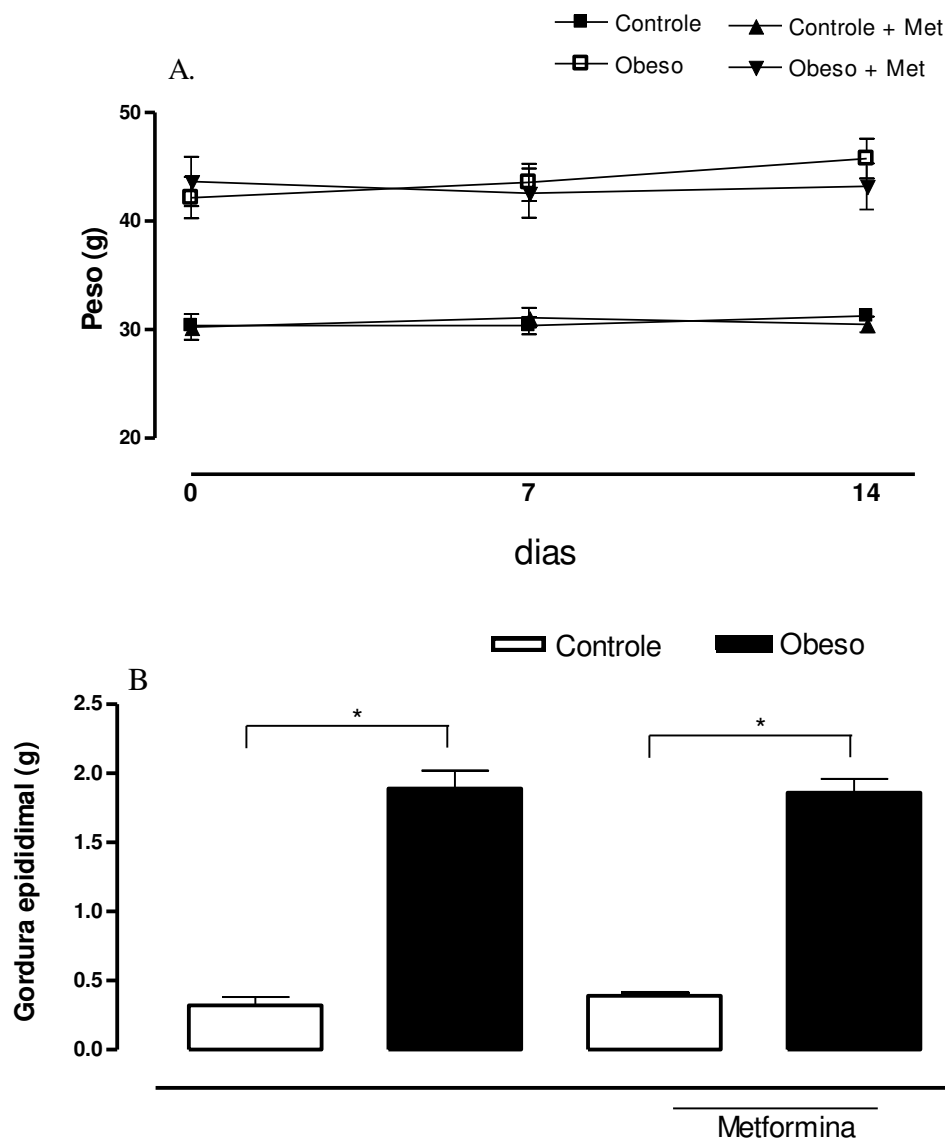


Figura 3: Efeito do tratamento com metformina (3 mg/kg/dia) no ganho ponderal e no peso da gordura epididimal. Os gráficos representam o ganho ponderal (A) e o peso da gordura epididimal (B) obtidos de camundongos obesos controles após 14 dias de tratamento com metformina. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M para $n=7-12$. * $p < 0,05$ comparando controle com obeso tratados ou não com metformina.

4.2. Efeito do tratamento com metformina na inflamação pulmonar de camundongos obesos e asmáticos

4.2.1 Parênquima pulmonar

Com intuito de avaliar o efeito do tratamento com metformina (3 mg/kg/dia) na inflamação pulmonar, realizamos a quantificação de células inflamatórias totais (Figura 4A) e de eosinófilos (Figura 4B) no tecido pulmonar através de análises morfológicas.

Como esperado, o desafio com OVA aumentou significativamente o infiltrado de células inflamatórias na região peribronquiolar dos camundongos obesos (SO) em relação aos controles (SC) ($42,2 \pm 4,3$ e $152,2 \pm 10,2$ cels/mm² para controle e obesos, respectivamente). Grande parte desse infiltrado composto por eosinófilos ($21,8 \pm 1,6$ e $60,0 \pm 4,5$ para animais controles e obesos, respectivamente).

A Figura 4 mostra que o número de células totais e de eosinófilos no pulmão é significativamente menor nos camundongos sensibilizados obesos tratados com metformina comparados aos sensibilizados obesos não tratados ($P < 0,001$). Entretanto, ainda existe aumento significativo no número de eosinófilos dos animais SO tratados comparados aos SC tratados com metformina. O tratamento com metformina também diminui o número de eosinófilos no tecido pulmonar nos camundongos controles e não modificou de forma significativa o número de células totais (Figura 4A e B).

A Figura 5 mostra fotos representativas de histologia pulmonar para os quatro grupos experimentais.

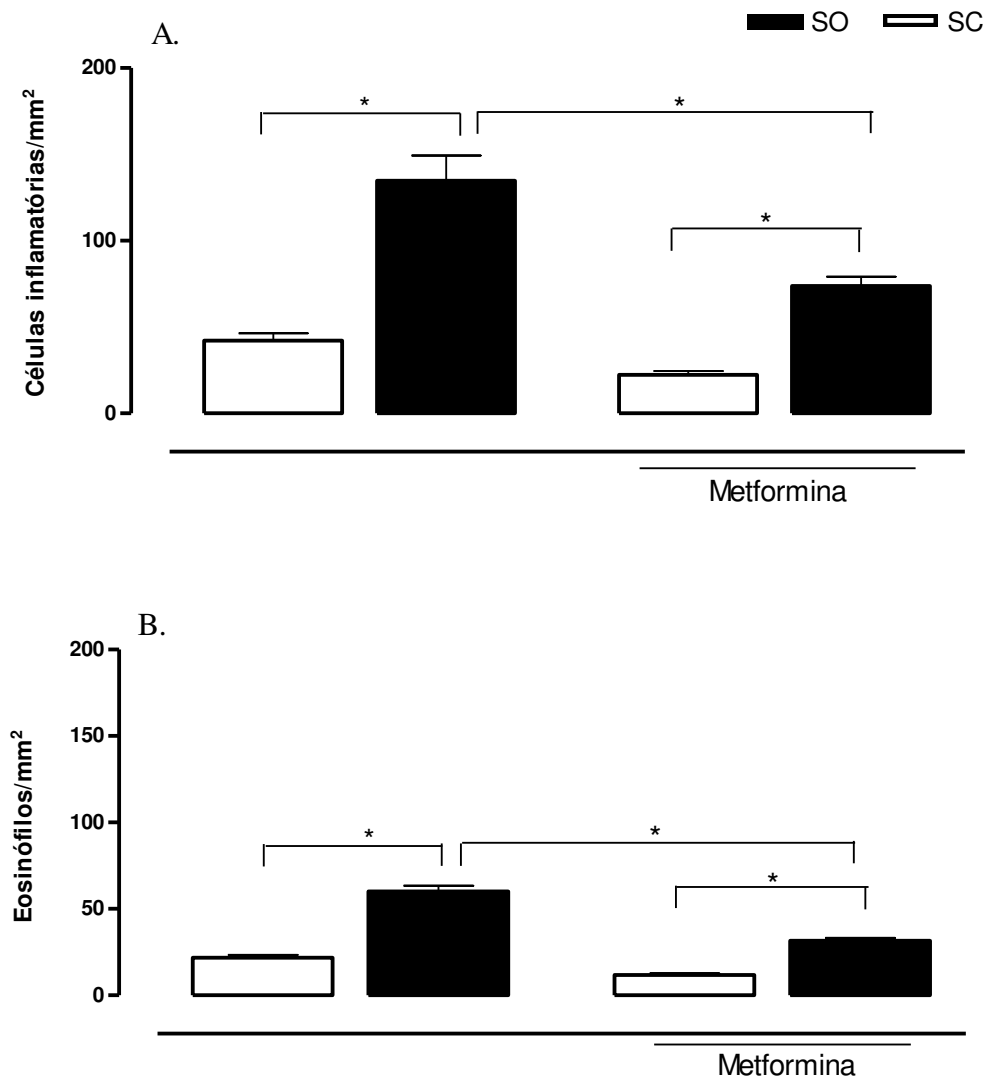


Figura 4. Efeito do tratamento com metformina (3 mg/kg/dia) sobre o número de células inflamatórias totais e eosinófilos no tecido pulmonar. Os gráficos mostra o número de células inflamatórias totais (A) e eosinófilos (B) no tecido pulmonar obtidos de camundongos sensibilizados controles (SC) e sensibilizados obesos (SO) 48 h após o desafio intranasal com OVA. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M para n=6. *p < 0,05.

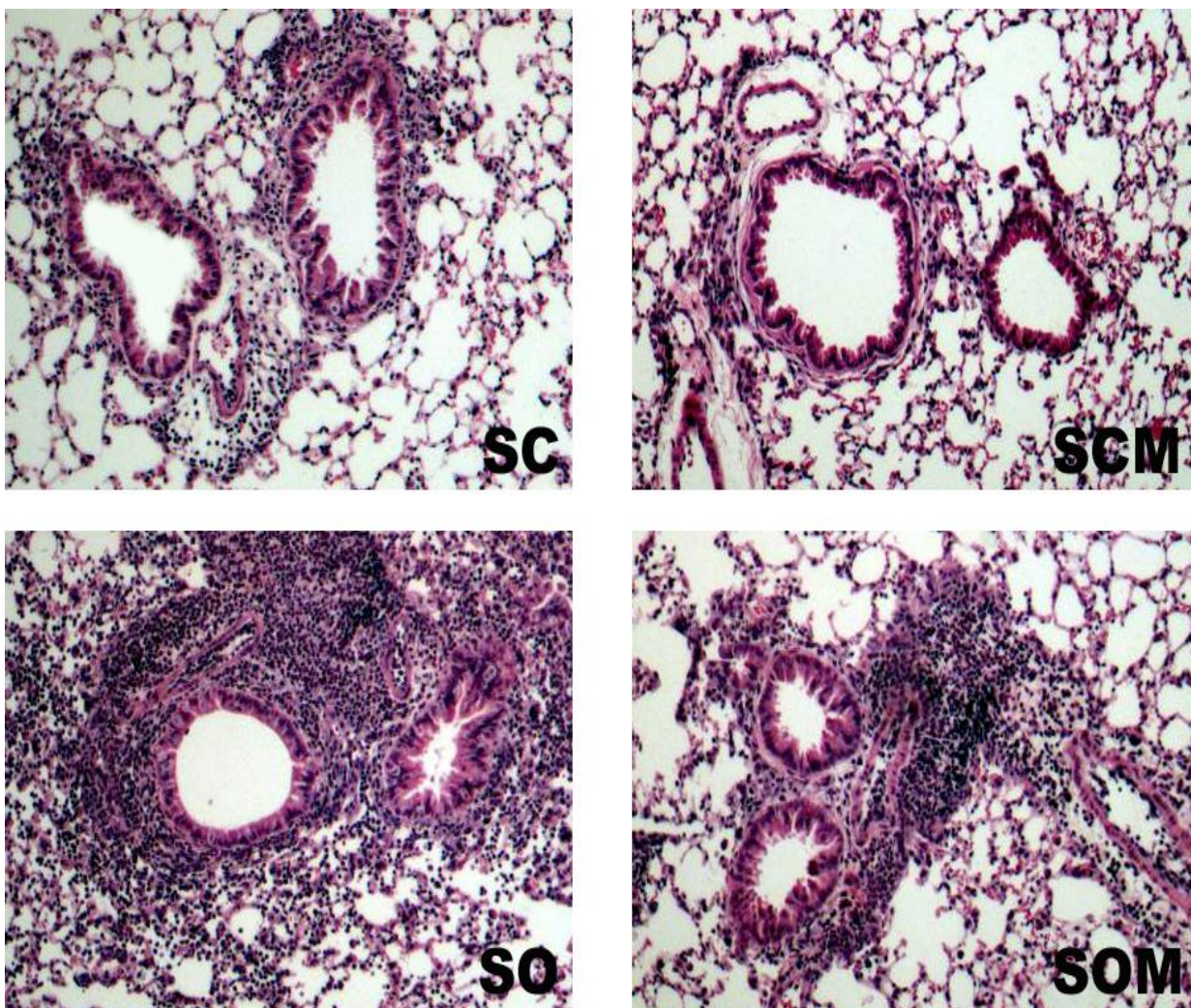


Figura 5: Fotomicrografia representativa do efeito do tratamento com metformina (3 mg/kg/dia) sobre o número de células inflamatórias e eosinófilos no tecido pulmonar 48 h após o desafio intranasal com ovalbumina (OVA). As fotos representam cortes de pulmões obtidos dos grupos sensibilizado controle (SC); sensibilizado obeso (SO), sensibilizado controle + metformina (SCM) e sensibilizado obeso + metformina (SOM). Aumento 250X.

4.2.2 Lavado broncoalveolar

Com intuito de avaliar o efeito do tratamento com metformina na inflamação pulmonar, realizamos a quantificação de células totais (Figura 6 A) e eosinófilos (Figura 6 B e tabela 1) no LBA. As contagens de eosinófilos no LBA foram realizadas 48 h após o desafio com OVA.

A Figura 6 A e B mostra que camundongos obesos desafiados com OVA apresentaram diminuição no número de células inflamatórias totais ($P < 0,05$) e eosinófilos ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle. O tratamento com metformina (3 mg/kg/dia) aumentou em ambos os grupos o número de células inflamatórias e de eosinófilos no LBA 48 h após o desafio com OVA. Entretanto, não houve diferença estatística na migração celular entre obesos e controle após o tratamento com metformina (Figura 6 A e B).

O número de neutrófilos no LBA dos animais obesos foi menor em relação ao grupo controle, e o tratamento com metformina corrigiu esta diferença (tabela 1). Em relação às células mononucleares, não houve diferença entre os grupos controle e obeso. Entretanto, o tratamento com metformina aumentou o número de células mononucleares em ambos os grupos, mas o aumento foi maior no grupo obeso (Tabela 1).

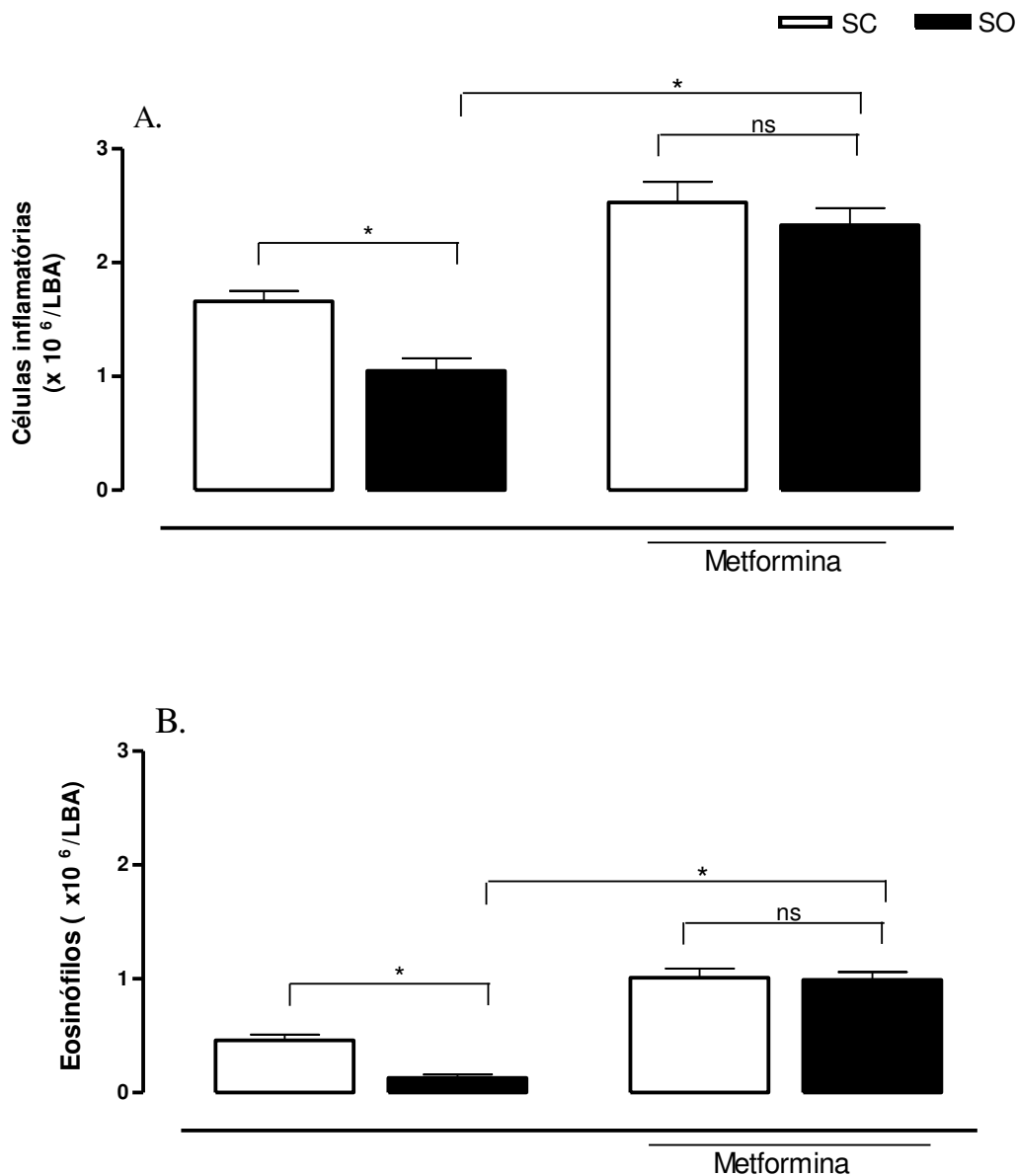


Figura 6: Efeito do tratamento com metformina (3 mg/kg/dia) sobre o número de células inflamatórias total e eosinófilos no lavado broncoalveolar (LBA). Os gráficos representam o número de células inflamatórias total (A) e eosinófilos (B) obtidos de camundongos sensibilizados controles (SC) e sensibilizados obesos (SO) 48 h após o desafio intranasal com OVA. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M para n= 10-15. * $p < 0,05$. NS, não significativo.

Tabela 1. Efeito do tratamento com metformina (3 mg/kg/dia) sobre o número de neutrófilos e células mononucleares no lavado broncoalveolar (LBA) de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA.

Grupo	Neutrófilos (x 10 ⁶ /LBA)	Mononucleares (x 10 ⁶ /LBA)
SC	0,51 ± 0,1	0,62 ± 0,06
SO	0,18 ± 0,02*	0,70 ± 0,18
SC + met	0,46 ± 0,04	0,94 ± 0,11 #
SO + met	0,41 ± 0,04	1,29 ± 0,13 ♦&

Os dados foram obtidos de animais sensibilizados controles (SC), sensibilizados obesos (SO), sensibilizados controles + metformina (SC + met), sensibilizados obesos + metformina (SO + met). Cada coluna representa a média ± E.P.M para n= 10-15. * $p < 0,05$ quando comparado com SC; # $p < 0,05$ comparado com SC; ♦ $p < 0,05$ comparado com SO; & $p < 0,05$ comparado com SC + Met.

4.2.3 Efeito do tratamento com metformina sobre a produção de muco e depósito de colágeno no pulmão

Animais obesos sensibilizados e desafiados com OVA apresentaram um aumento significativo na produção de muco em relação aos seus respectivos controles sensibilizados e desafiados (20,3 ± 2,8 e 12,6 ± 1,7 mm² respectivamente). Após o tratamento com

metformina ocorreu uma diminuição significativa na produção de muco tanto no o grupo SC quanto no SO ($2,64 \pm 0,62$ e $4,33 \pm 0,75$ mm², respectivamente) (Figura 7 A). A metformina foi capaz de inibir em aproximadamente 57% ($p < 0,05$) o depósito de colágeno produzido pelo desafio antigênico em ambos os grupos (Figura 7 B).

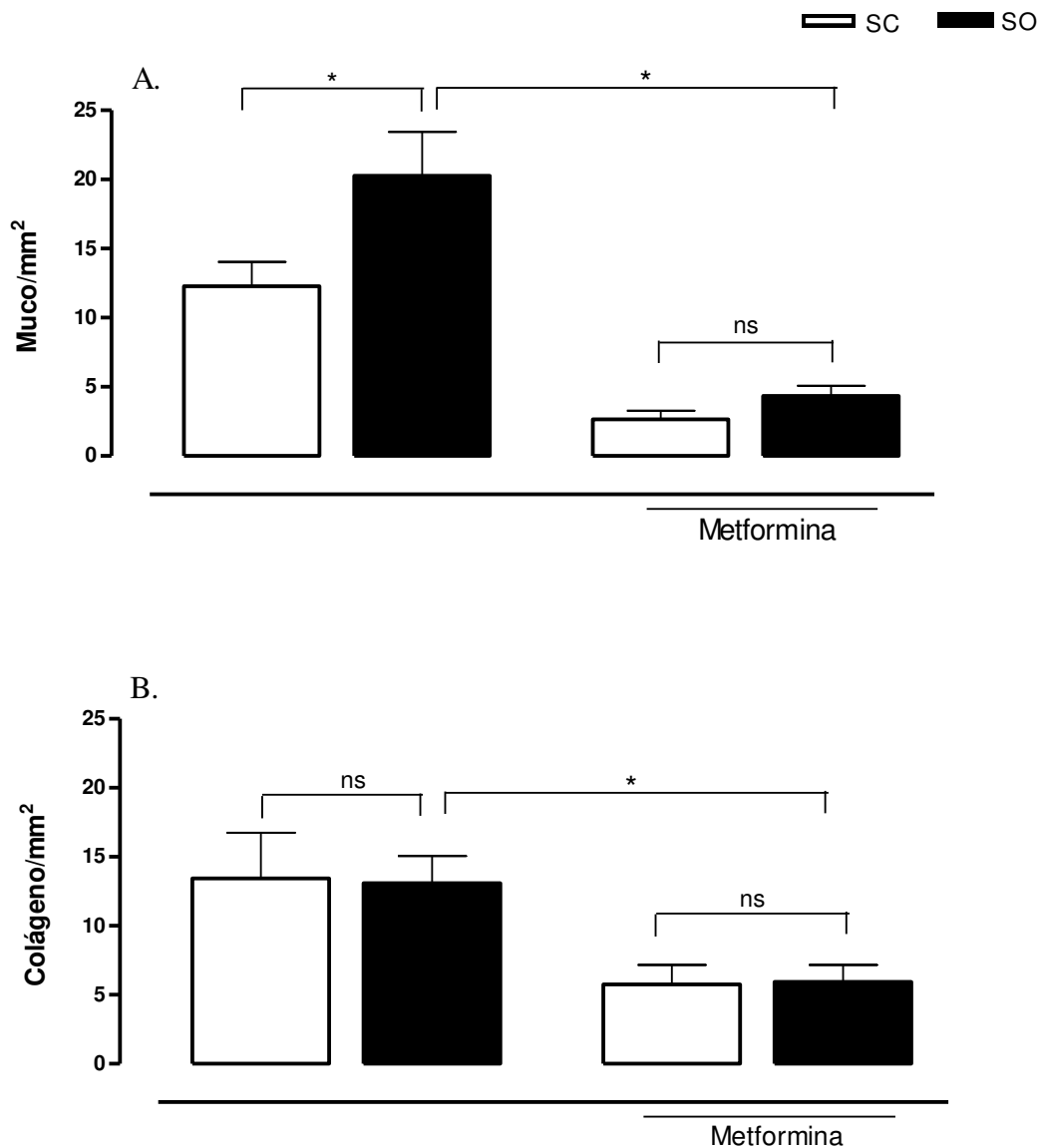


Figura 7: Efeito do tratamento com metformina (3 mg/kg/dia por) sobre a produção de muco e depósito de colágeno no tecido pulmonar. Os gráficos representam a produção de muco (A) e depósito de colágeno (B) no tecido pulmonar obtidos de camundongos sensibilizados controles (SC) e sensibilizados obesos (SO) 48 h após o desafio intranasal com OVA. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M para n=6. * $p < 0,05$. NS, não significativo.

4.3. Mobilização de células inflamatórias da medula óssea de camundongos obesos

O número de leucócitos totais da medula óssea de camundongos obesos mostrou-se significativamente maior ($P < 0,001$) 48 h após o desafio com OVA, quando comparado com animais controles (Tabela 2).

A obesidade aumentou significativamente o número de eosinófilos maduros e imaturos na MO, comparado aos animais controles (Figura 8). O tratamento com metformina (3 mg/kg/dia) diminuiu significativamente ($p < 0,001$) o número de eosinófilos maduros e imaturos, comparado aos animais obesos não tratados (Figura 8 A e B).

A metformina não interferiu de maneira significativa no número de neutrófilos maduros e imaturos na MO dos camundongos sensibilizados controles e obesos ($n=10-15$; Tabela 2).

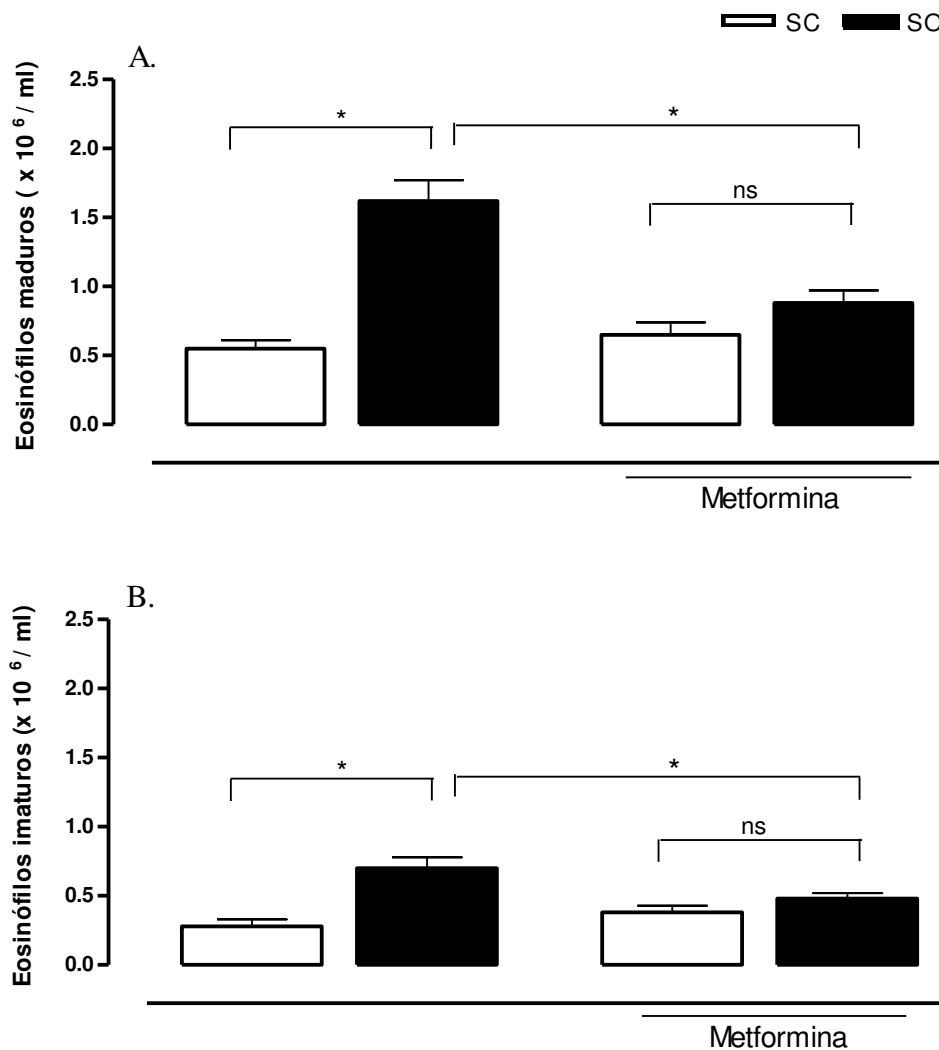


Figura 8. Efeito do tratamento com metformina (3 mg/kg/dia) sobre número de eosinófilos maduros e imaturos na medula óssea (MO). Os gráficos representam o número de eosinófilos maduros (A) e imaturos (B) na medula óssea MO obtida de camundongos sensibilizados controles (SC) e sensibilizados obesos (SO) 48 h após o desafio intranasal com OVA. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M para n= 10-15. * p < 0,05. NS, não significativo.

Tabela 2. Efeito do tratamento com metformina (3 mg/kg/dia) sobre o número de leucócitos totais e neutrófilos da medula óssea de camundongos sensibilizados desafiados com OVA

Grupo	Leucócitos totais (x 10 ⁶ /ml)	Neutrófilos maduros (x 10 ⁶ /ml)	Neutrófilos imaturos (x 10 ⁶ /ml)
SC	12,0 ± 0,67	4,6 ± 0,42	2,9 ± 0,3
SO	16,9 ± 0,61*	4,9 ± 0,32	3,9 ± 0,43
SC + met	13,2 ± 0,82	5,3 ± 0,52	3,1 ± 0,21
SO + met	14,5 ± 0,69	5,3 ± 0,3	3,6 ± 0,23

Os dados foram obtidos de camundongos sensibilizados controles (SC), sensibilizados obesos (SO), sensibilizados controles + metformina (SC + met), sensibilizados obesos + metformina (SO + met). Cada coluna representa a média ± E.P.M para n= 10-15. * $p < 0,05$ quando comparado com SC.

4.4. Adesão de eosinófilos da medula óssea de camundongos obesos e asmáticos

A Figura 9 (Painel A e B) mostra que 48 h após o desafio antigênico a adesão *ex vivo* de eosinófilos obtidos da MO de animais sensibilizados obesos e desafiados com OVA está significativamente diminuída quando comparada com grupo controle. Esta diminuição na adesão dos eosinófilos de camundongos obesos é detectada tanto para VCAM-1 quanto para ICAM-1. O tratamento com metformina foi capaz de reverter a diminuição na resposta aderente nos camundongos obesos. Ou seja, após o tratamento com metformina não há

diferença significativa entre os grupos obeso e controle (Figura 9 A e B). O tratamento com metformina também aumentou a adesão à VCAM-1 e ICAM-1 em camundongos controles.

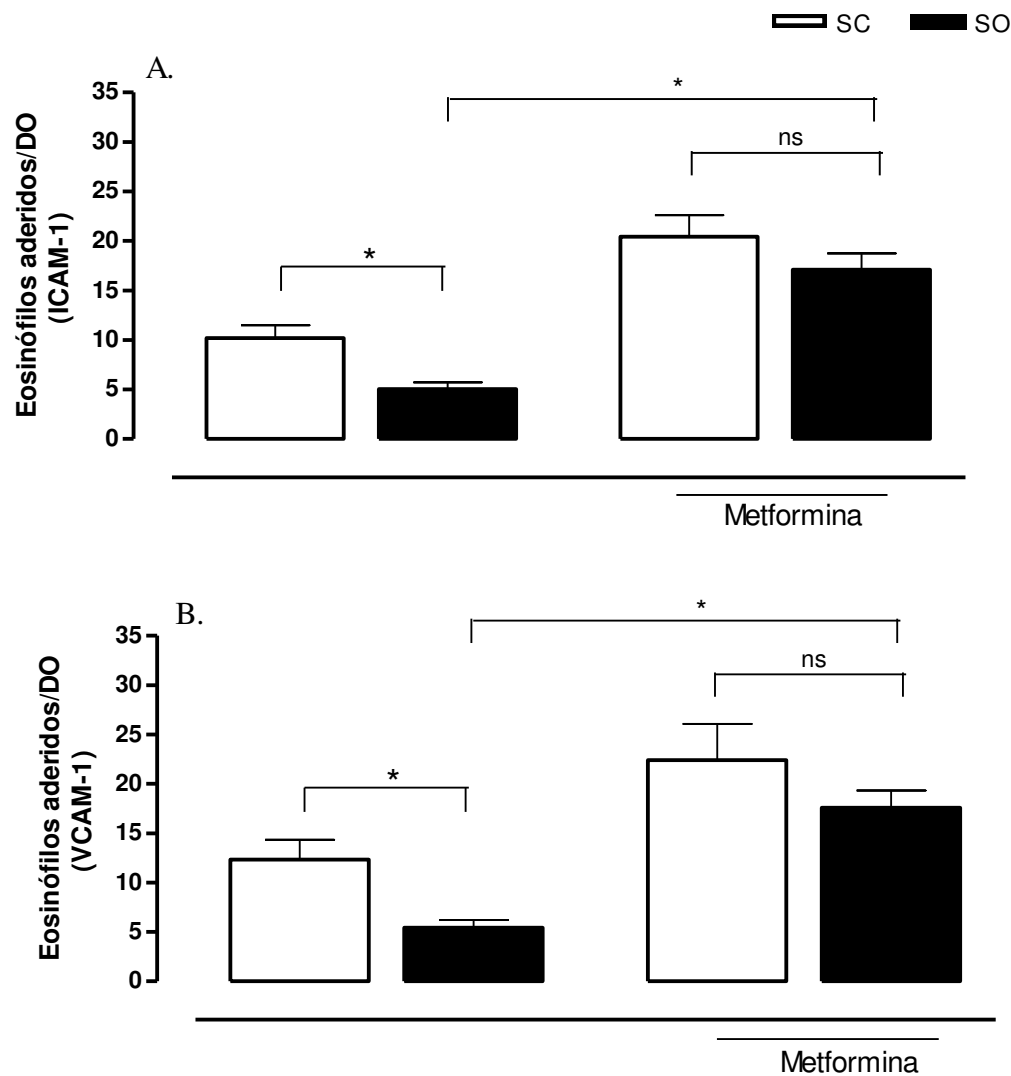


Figura 9: Efeito da obesidade e do tratamento com metformina (3 mg/kg/dia) sobre a adesão *ex vivo* da eosinófilos de medula óssea. Suspensão celular contendo eosinófilos (1×10^6 células/mL – 25 μ L/poço) obtidas da MO de camundongos sensibilizados controle (SC) e sensibilizado obesos (SO) 48 h após o desafio intranasal com OVA foram incubados em poços recobertos com ICAM-1 (5 μ g/ml) (A) e VCAM-1 (2,5 μ g/ml) (B). Os resultados são expressos como média da relação entre a densidade ótica e o numero de EOS colocados em cada poço $\pm$ EPM (n=6-10); *P<0,05.

4.5. Expressão de moléculas de adesão e de receptores de quimiocinas na superfície de eosinófilos da medula óssea de camundongos obesos e asmáticos

Com intuito de verificar se o aumento na adesão a VCAM-1 e ICAM-1 pelo tratamento com metformina seria mediado por aumento da expressão de moléculas de adesão na superfície celular, avaliamos, através de citometria de fluxo, a expressão das moléculas de adesão Mac-1 e VLA-4 e do receptor para eotaxina, CCR-3, na superfície de eosinófilos da MO de camundongos obesos e controles.

A Figura 10 ilustra o número de células que expressam concomitantemente CCR3 e VLA-4 (painel A) e CCR3 e Mac-1 (painel B). Não houve diferença significativa na frequência de células CCR-3+ VLA-4+ (A) e CCR-3+ Mac-1+ (B), obtidas de medula óssea de camundongos sensibilizados controles (SC) e sensibilizados obesos (SO) 48 h após o desafio intranasal com OVA. Entretanto, ao analisarmos a média de intensidade de fluorescência (Figura 11), observamos que a obesidade diminuiu significativamente este parâmetro para as moléculas de adesão VLA-4 (CD49d) (Figura 11, painel B) e Mac-1 (CD11b) (Figura 11, painel C). Ao analisarmos a expressão receptor para eotaxina, o CCR-3 (painel A), verificamos que não houve diferença na média de intensidade de fluorescência nos animais obesos e desafiados com OVA quando comparados com controle também desafiados.

O tratamento com metformina aumentou de maneira significativa a expressão de VLA-4 (Figura 11, painel A) e Mac-1 (Figura 11, painel B) na superfície das células obtidas da MO dos camundongos obesos e desafiados com OVA. No grupo controle, a metformina diminuiu a expressão de VLA-4, mas não interferiu na intensidade média de

fluorescência da Mac-1. A metformina não alterou a média de intensidade de fluorescência do receptor de eotaxina, CCR-3, para ambos os grupos (Figura 11, painel C).

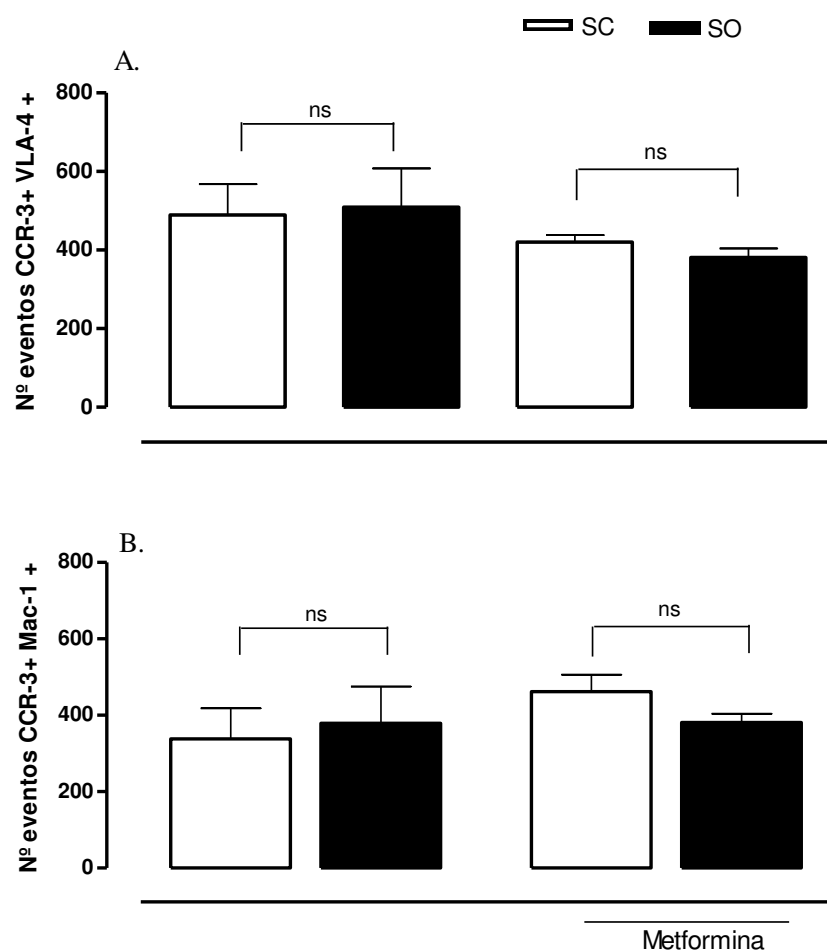


Figura 10: Efeito da obesidade e do tratamento com metformina (3 mg/kg/dia) sobre a expressão de moléculas de adesão nas células obtidas da medula óssea (MO). O painel A e B representa a frequência de células CCR-3 + VLA-4+ (A) e CCR-3 + Mac-1+ (B), obtidos da MO de camundongos sensibilizados controles (SC) e sensibilizados obesos

(SO) 48 h após o desafio intranasal com OVA. Os resultados são expressos como média $\pm$ SEM (n= 6-10), * $p < 0,05$.

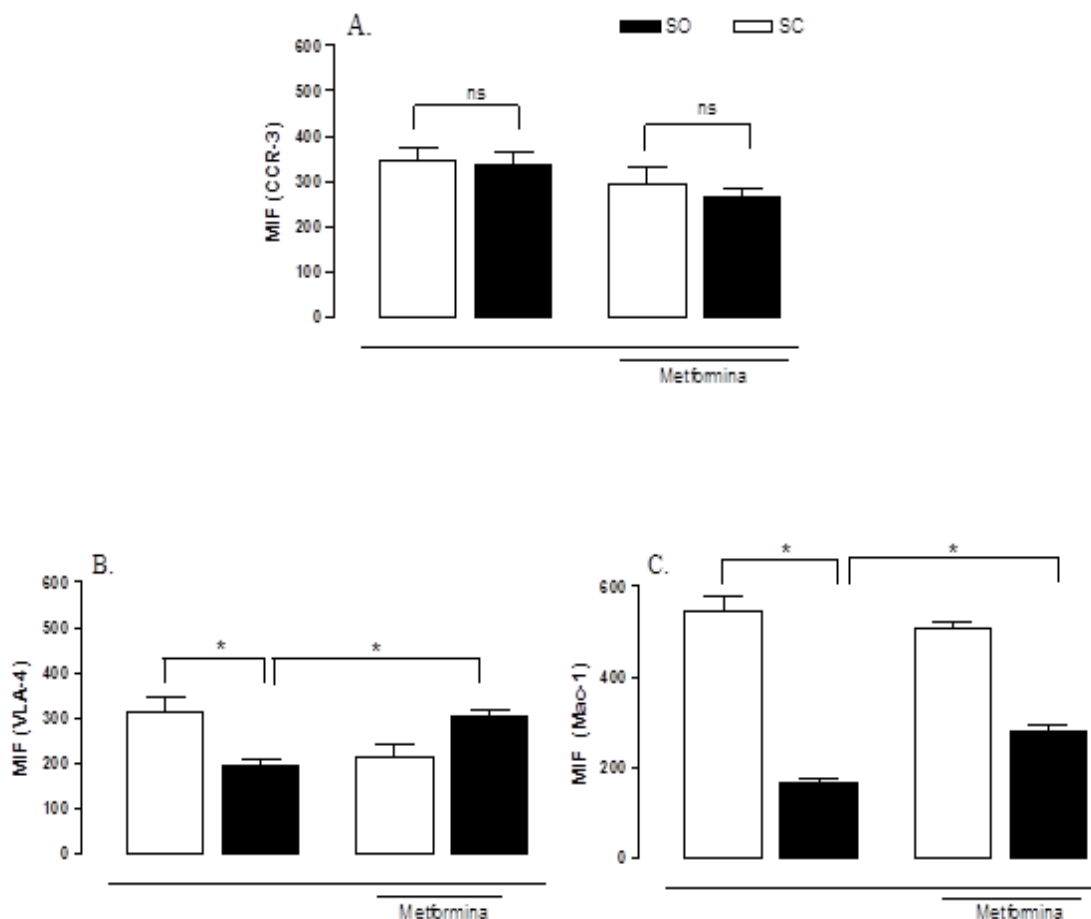


Figura 11: Efeito da obesidade e do tratamento com metformina (3 mg/kg/dia) sobre a média de intensidade de fluorescência de moléculas de adesão nas células obtidas da medula óssea (MO). Os painéis A, B e C representam a média de intensidade de fluorescência de VLA-4 (A), Mac-1 (B) e CCR-3 (C), obtidos da MO de camundongos sensibilizados controles (SC) e sensibilizados obesos (SO) 48 h após o desafio intranasal com OVA. Os resultados são expressos como média $\pm$ SEM (n= 6-10), * $p < 0,05$.

4.6. Produção eotaxina e IL-5 na medula óssea de camundongos obesos e asmáticos

Avaliamos o efeito do tratamento com metformina sobre os níveis de citocinas e quimiocinas eosinofilótáticas, como IL-5 e eotaxina, na MO de camundongos obesos sensibilizados e desafiados com OVA (Figura 12 A e B).

Os resultados mostraram que, apesar do aumento no número de eosinófilos na MO de camundongos obesos (Figura 8), não há diferença significativa nos níveis de IL-5 e eotaxina entre obeso e controle (Fig. 12 A e B). O tratamento com metformina não modificou os níveis de IL-5 nem no grupo controle, nem no obeso. Entretanto, a metformina foi capaz de induzir um aumento significativo nos níveis de eotaxina na MO de ambos os grupos (Figura 12 A).

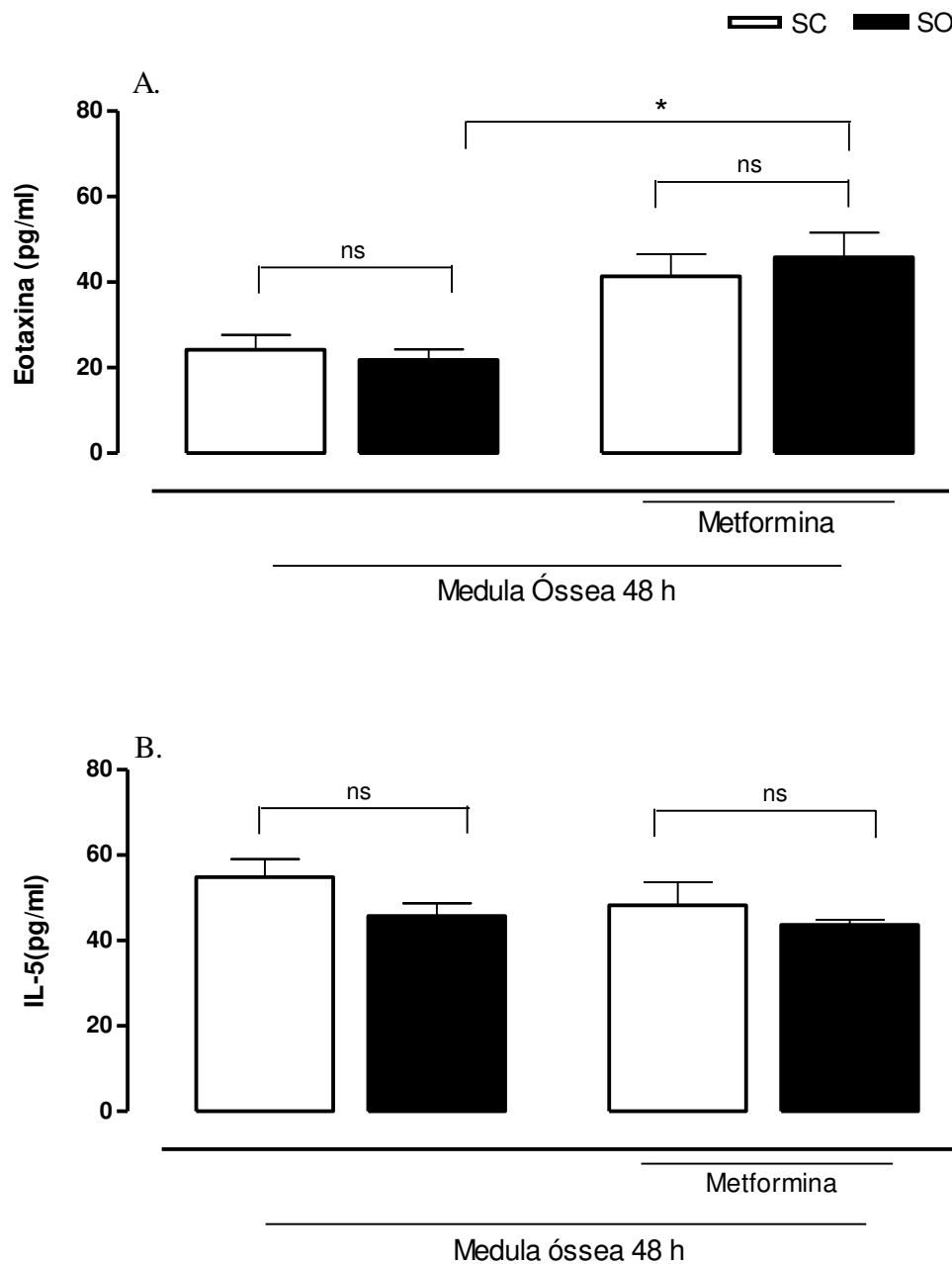


Figura 12: Efeito da obesidade e do tratamento com metformina (3 mg/kg/dia) sobre os níveis de eotaxina e IL-5 na medula óssea (MO). Os dados representam os níveis de eotaxina (A) e IL-5 (B) na MO de camundongos sensibilizados controle (SC) e sensibilizado obesos (SO) 48 h após o desafio intranasal com OVA. Cada coluna representa a média $\pm$ EPM (n= 5-6); *P< 0,05.

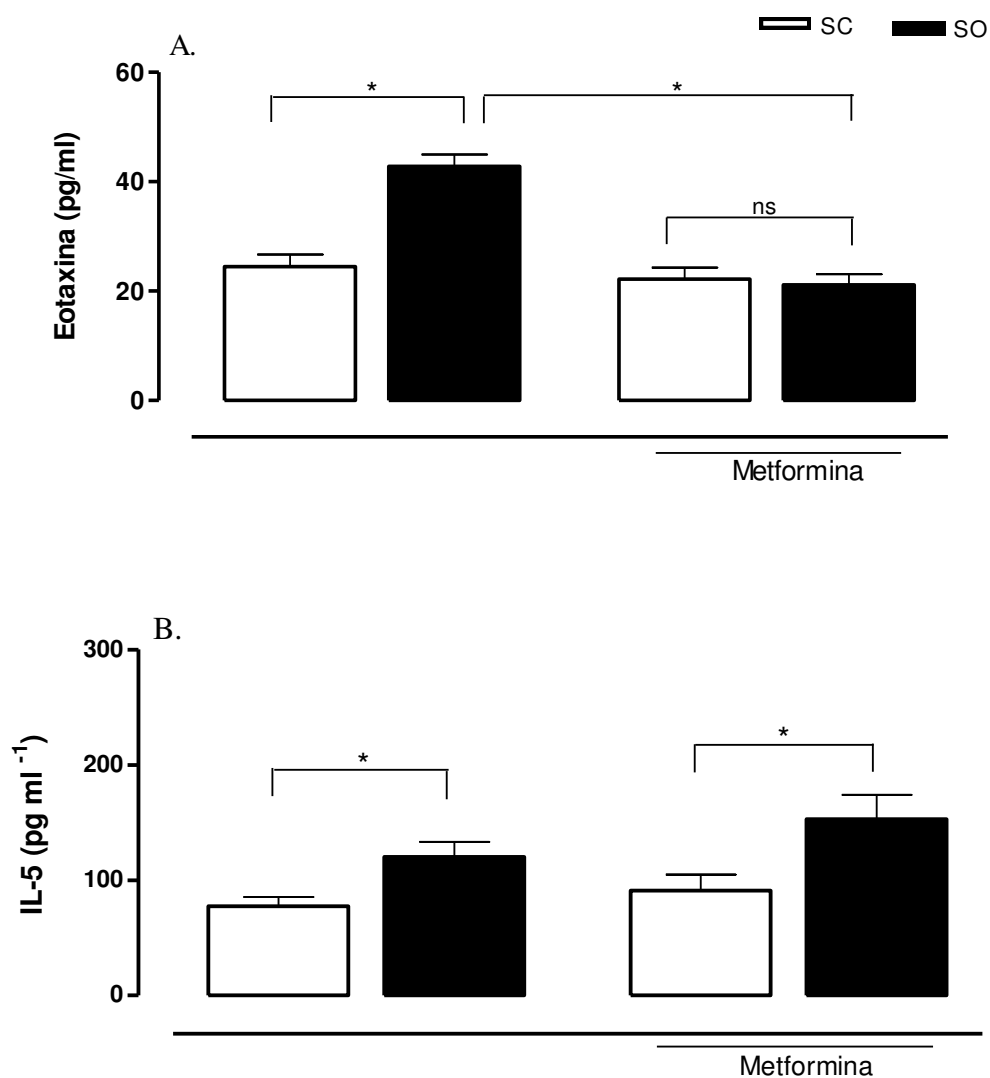
4.7. Efeito do tratamento com metformina sobre os níveis de eotaxina, IL-5 e TNF- α no LBA de camundongos obesos e asmáticos

A eotaxina, em sinergismo com IL-5, tem papel primordial no recrutamento de eosinófilos da medula óssea para as vias aéreas. Por isso, incluímos em nossos planos verificar se o tratamento com metformina estaria modificando o influxo de eosinófilos, em animais obesos, através desses mediadores. A Figura 13 mostra os níveis de eotaxina (painel A) e IL-5 (painel B) no LBA de animais sensibilizados, tratados ou não com metformina (3 mg/kg/dia). No tempo avaliado (48 h), os níveis de eotaxina estão significativamente maiores no grupo obeso em relação ao grupo controle. O tratamento com metformina diminuiu a concentração de eotaxina no LBA de camundongos obesos, sem modificar a concentração nos animais controles. Dessa maneira, não há diferença significativa entre os animais obesos e controle após o tratamento com metformina.

Ao analisarmos a Figura 13 (painel B) podemos notar que o grupo sensibilizado obeso possui quantidade de IL-5 significativamente elevada no LBA quando comparamos com o grupo sensibilizado controle. O tratamento com metformina não modificou o nível de IL-5 em ambos os grupos.

O TNF- α é uma das principais citocinas produzidas pelo tecido adiposo e está intimamente relacionada ao desenvolvimento da resistência à insulina; além disso, influencia o recrutamento de eosinófilos da medula óssea para as vias aéreas. Por isso, incluímos em nossos planos verificar se o tratamento com metformina inibiria a produção desta citocina no LBA. A Figura 13 mostra os níveis de TNF- α detectados no LBA de animais sensibilizados, tratados ou não com metformina. Os níveis de TNF- α foram significativamente maiores nos animais obesos comparado com controles. O tratamento

com metformina foi capaz de inibir de maneira significativa a produção deste mediador, tanto em camundongos controles (52,2%) quanto em obesos (83,2%); porém, o grau de inibição foi maior nos animais obesos. A metformina normalizou as concentrações de TNF- α no LBA dos animais obesos em relação aos animais sensibilizados controles.



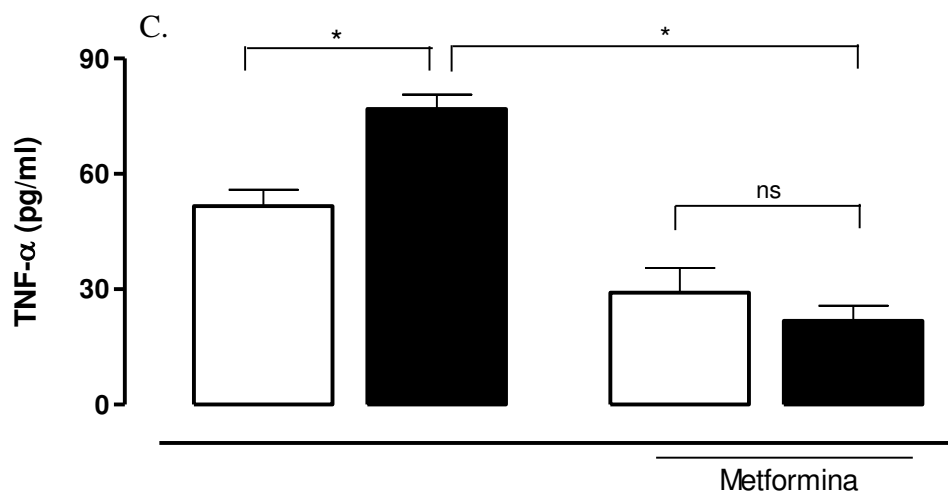


Figura 13: Efeito do tratamento com metformina (3 mg/kg/dia) sobre os níveis de quimiocinas e citocinas no lavado broncoalveolar (LBA). Gráficos representativos das dosagens de eotaxina (A), IL-5 (B) e TNF- α (C) no LBA obtidos de camundongos sensibilizados controles (SC) e sensibilizados obesos (SO) 48 h após o desafio intranasal com OVA. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M para $n= 6-10$. * $p < 0,05$. NS, não significativo.

4.8. Efeito do tratamento com metformina nos níveis de NOx no pulmão de camundongos obesos e asmáticos.

A medida de nitrito e nitrato (NOx) é uma boa opção para avaliar de forma indireta a produção de NO nas vias aéreas. Sabe-se que esses metabólitos são mais estáveis e passíveis de detecção. Animais sensibilizados obesos apresentaram níveis elevados de NOx no LBA 48 h após o desafio com OVA, comparados com sensibilizados controles e desafiados com OVA (Figura 14). Baseado nessa informação, avaliamos se a metformina

seria capaz de diminuir a produção de NOx no LBA. A Figura 14 mostra que a metformina diminui de maneira significativa os níveis de NOx no LBA obtidos de camundongos obesos, não alterando os níveis de NOx no LBA do grupo controle.

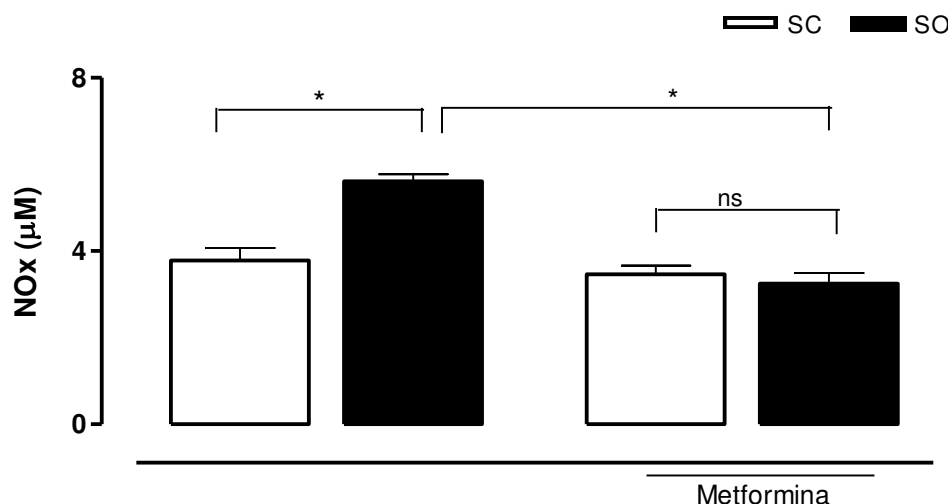


Figura 14: Efeito do tratamento com metformina (3 mg/kg/dia) sobre os níveis dos metabólitos do óxido nítrico (NOx) no lavado broncoalveolar (LBA). O gráfico representa a dosagem de NOx no LBA obtido de camundongos sensibilizados controles (SC) e sensibilizados obesos (SO) 48 h após o desafio intranasal com OVA. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M para $n=6$. $*p < 0,05$. NS, não significativo.

4.9. Expressão da iNOS no pulmão de camundongos obesos e asmáticos

A expressão da iNOS foi determinada em cada um dos grupos através da técnica de Western blotting; para tal, foram utilizados o homogenato do tecido pulmonar obtidos em diferentes tempos após o desafio com OVA. Os resultados mostraram que o grupo sensibilizado obeso e desafiado com OVA apresenta um aumento marcante ($p < 0,001$) na expressão pulmonar de iNOS em 3 e 48 h após o desafio, quando comparado com o grupo

controle. O tratamento com metformina reduziu de forma significativa a expressão dessa proteína nos animais obesos sensibilizados (Figura 15). O tratamento não alterou a expressão de iNOS no pulmão dos animais sensibilizados controle.

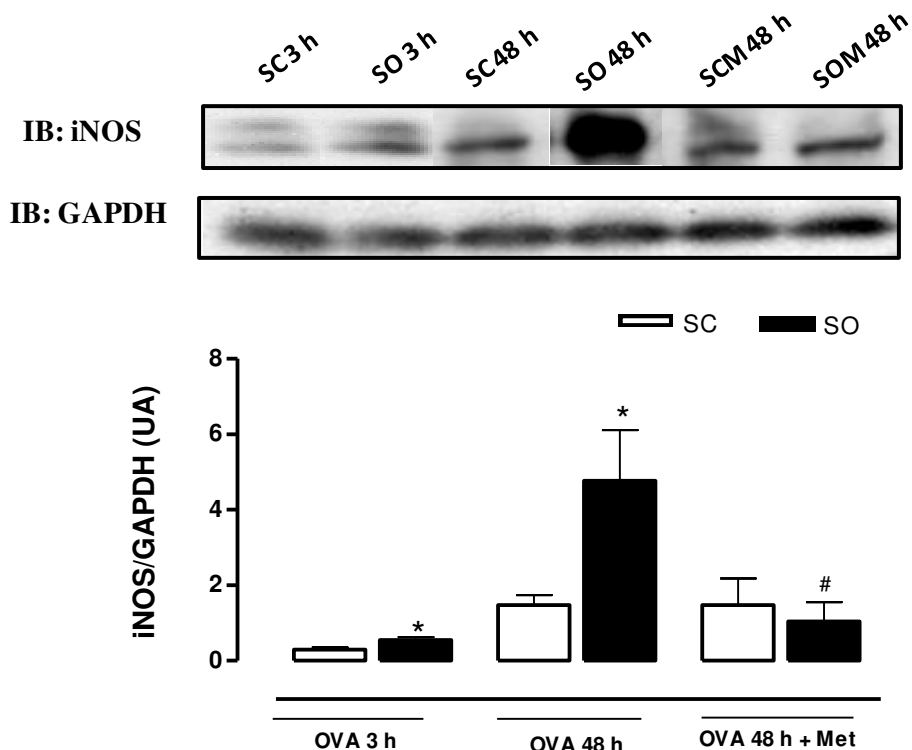


Figura 15. Efeito do tratamento com metformina (3 mg/kg/dia) sobre a expressão da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) no pulmão. O gráfico representa a expressão da iNOS nos pulmões obtidos de camundongos sensibilizados controles (SC) e sensibilizados obesos (SO), 3 e 48 h após o desafio intranasal com OVA. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M para $n = 5-6$. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo SC; # $p < 0,05$ quando comparado com SO + Met. Os valores da expressão da iNOS de cada grupo foram normalizados por GAPDH e expressos por unidades arbitrárias (UA).

4.10. Expressão e atividade da p-AMPK e p-ACC no pulmão de camundongos obesos e asmáticos

A metformina é capaz de ativar a enzima AMPK em diversos tipos celulares, incluindo leucócitos. Para confirmar a participação da AMPK no recrutamento de eosinófilos para as vias aéreas, foi quantificada a fosforilação no resíduo de Thr172 da AMPK no tecido pulmonar de camundongos obesos e tratados com metformina (3 mg/kg/dia).

A Figura 16 A mostra que o desafio com OVA diminuiu significativamente a expressão da p-AMPK no pulmão dos animais controle tanto em 3 h quanto em 48 h após o desafio com OVA. No pulmão dos animais obesos, notamos redução significativa dos níveis basais da p-AMPK (PBS), assim como em 48 h após o desafio com OVA. O tratamento com metformina nos animais desafiados com OVA elevou a expressão da p-AMPK no pulmão de animais controle e obeso, não mais havendo diferença significativa entre os grupos.

A fim de confirmar a ativação da AMPK, também verificamos os níveis de fosforilação no resíduo Ser79 da ACC, conhecida como um alvo *downstream* da AMPK, em 48h após o desafio com OVA. Nossos dados mostraram que os níveis da p-ACC estão menores no pulmão dos animais obesos desafiados com OVA, em relação ao grupo controle. O tratamento com metformina elevou a expressão dessa proteína em ambos os grupos, não havendo mais diferença significativa entre eles (Figura 16B)

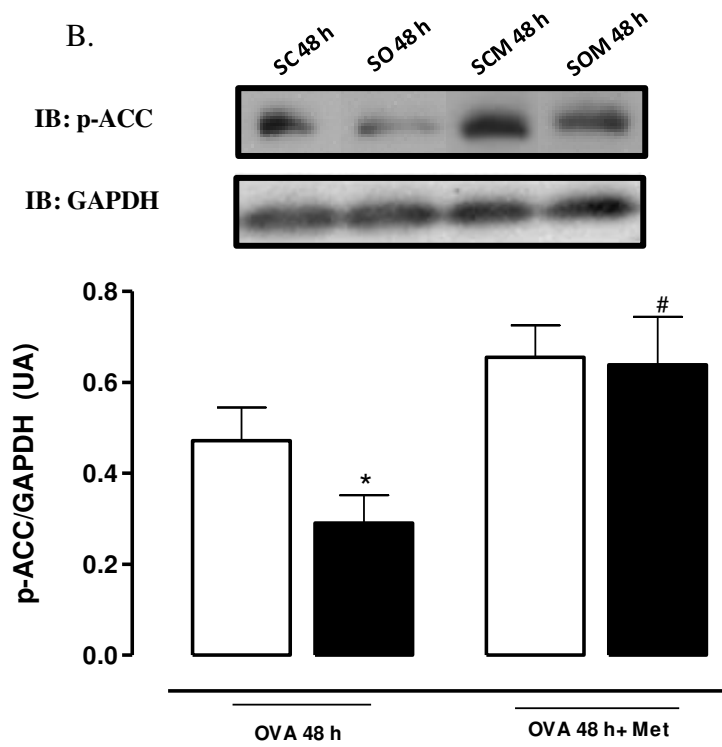
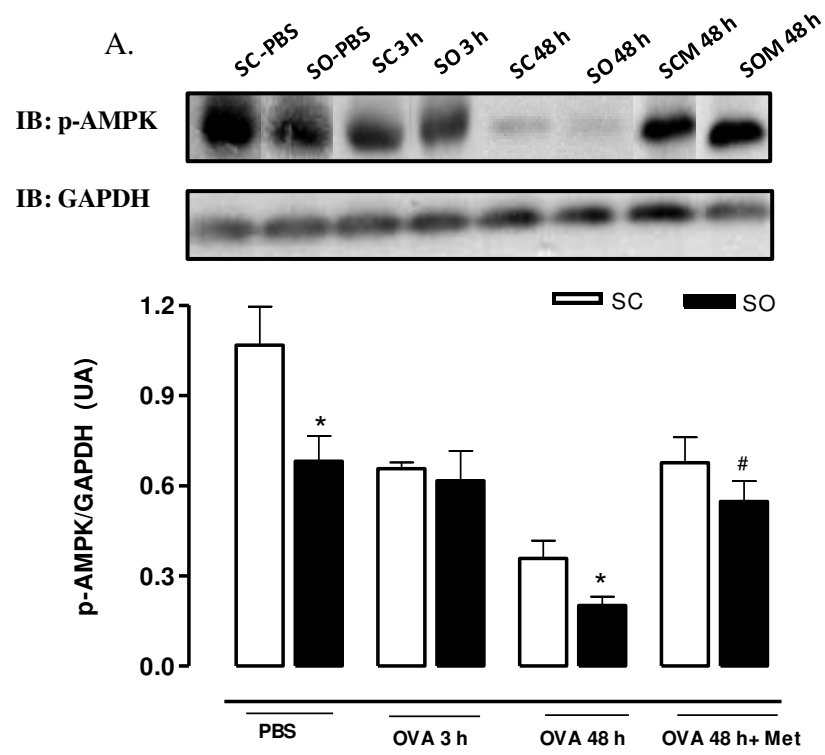


Figura 16: Efeito da obesidade e do tratamento com metformina (3 mg/kg/dia) sobre a expressão de p-AMPK e p-ACC no pulmão. Os gráficos representam a expressão (A) e atividade (B) da AMPK avaliados através da expressão da p-AMPK (A) e p-ACC (B) no homogenato de pulmão obtido de camundongos sensibilizados controle (SC) e sensibilizado obesos (SO), em 3 h e/ou 48 h após o desafio intranasal com OVA. Cada coluna representa a média $\pm$ EPM (n= 5-8); * $p < 0,05$ comparado com SC; # $p < 0,05$ comparado com SO. Os valores da expressão da pAMPK e pACC de cada grupo foram normalizados por GAPDH e expressos por unidades arbitrárias (UA).

4.11. Ativação do NF- κ B no pulmão de camundongos obesos e asmáticos

Expressão da p-I κ B

Levando-se em consideração que a translocação do NF- κ B é precedida pela fosforilação e degradação do I κ B, analisamos os efeitos da metformina sob a fosforilação do I κ B. Em 48 h após o desafio com OVA ocorre diminuição na fosforilação da I κ B nos animais sensibilizados obesos e controles (Figura 17). A metformina inibe a fosforilação e degradação do I κ B nos animais obesos, sem modificá-lo no grupo controle (Figura 17).

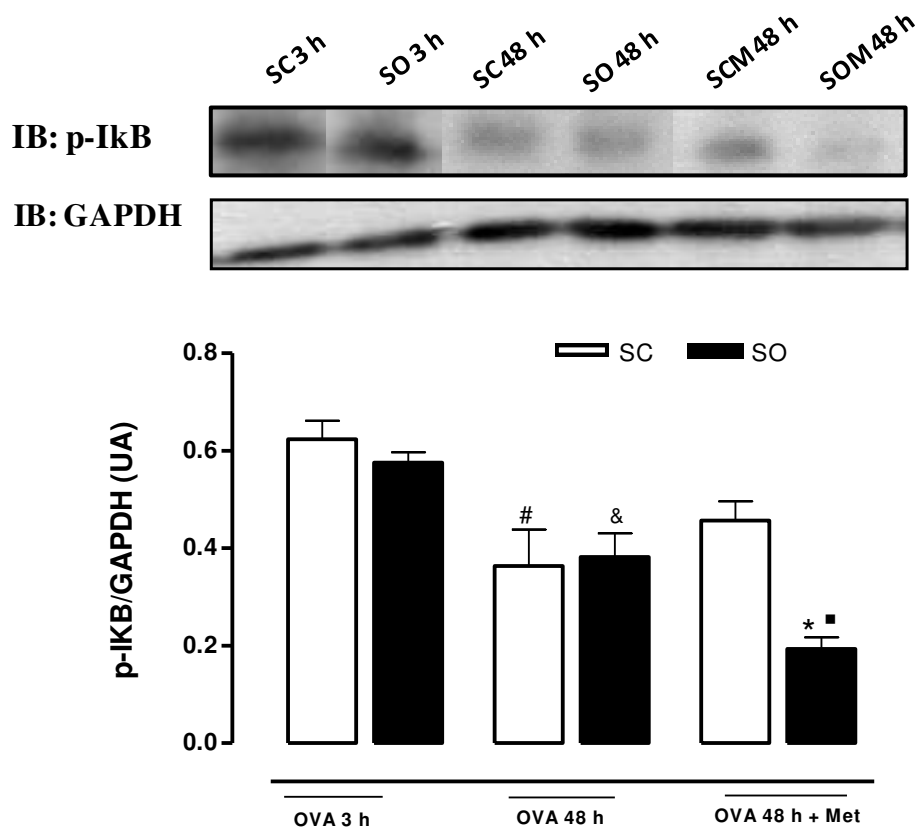


Figura 17: Efeito do tratamento com metformina (3 mg/kg/dia) sobre a expressão da p-IkB no pulmão. A ativação do NF- κ B foi avaliada através da expressão da p-IkB no homogenato de pulmão obtido de camundongos sensibilizados controle (SC) e sensibilizado obesos (SO), em 3 h e 48 h após o desafio intranasal com OVA. Cada coluna representa a média $\pm$ EPM (n= 5); * p <0,05 comparado com SO; ■ p <0,05 comparado com SC + Met; # p < 0,05 comparado com SC; & comparado com SO 3 h. Os valores da expressão da p-IkB de cada grupo foram normalizados por GAPDH e expressos por unidades arbitrárias (UA).

4.11.2. Ligação do NF- κ B na região promotora do gene da iNOS no pulmão de camundongos obesos e asmáticos

Com intuito de confirmar se a ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B seria responsável pelo aumento significativo na expressão de iNOS e na produção de NO_x no pulmão de camundongos obesos e desafiados com OVA, foi realizada a técnica de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) para verificar se a subunidade p65 do fator de transcrição nuclear NF- κ B está ligado na região promotora do gene da iNOS, aumentando assim a expressão desta proteína. E ainda, se a metformina estaria regulando transcricionalmente a expressão de iNOS. No tempo de 48 h após o desafio com OVA, a ligação da subunidade p65 na região promotora da iNOS mostrou-se diminuída nos animais obesos desafiados comparado com o grupo controle. A metformina inibiu de maneira significativa a ligação da p65 em ambos os grupos (Figura 18).

Sabendo que a citocina TNF- α é um importante ativador do NF- κ B verificamos a produção de TNF- α em diferentes tempos no LBA para verificar o tempo ideal para um novo experimento de ChIP. Com base na Figura 19, verificamos que o TNF- α mostra-se elevado em tempos precoces (3 h após o desafio com OVA). Camundongos controles apresentam queda nos níveis de TNF- α no LBA nos tempos mais tardios, enquanto que camundongos obesos mantêm os níveis maiores de TNF- α para o período de 24 a 72 h (Figura 19).

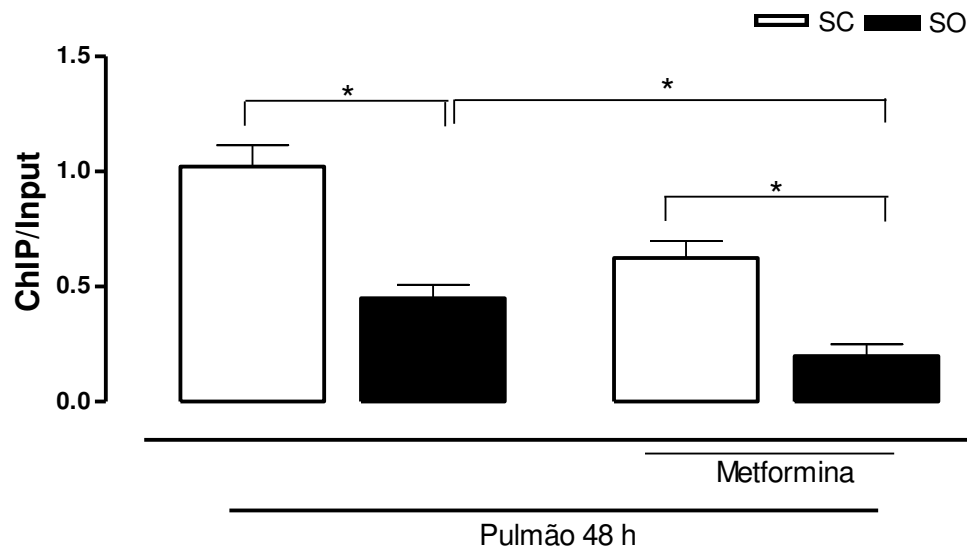


Figura 18. Efeito da obesidade e do tratamento com metformina na ligação do NF- κ B no gene da iNOS. Gráfico representativo do ensaio de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) para verificação da ligação da subunidade p65 do fator de transcrição NF- κ B na região promotora da iNOS no tecido pulmonar obtidos de camundongos sensibilizados controles (SC) e sensibilizados obesos (SO) 48 h após o desafio intranasal com OVA. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M para $n=5$. $*p < 0,05$. Os valores foram expressos como a relação entre a amostra imunoprecipitada com o anticorpo específico para p65 do NF- κ B e a amostra *input*. O *input* é uma amostra utilizada como controle da quantidade total de DNA utilizado no ensaio.

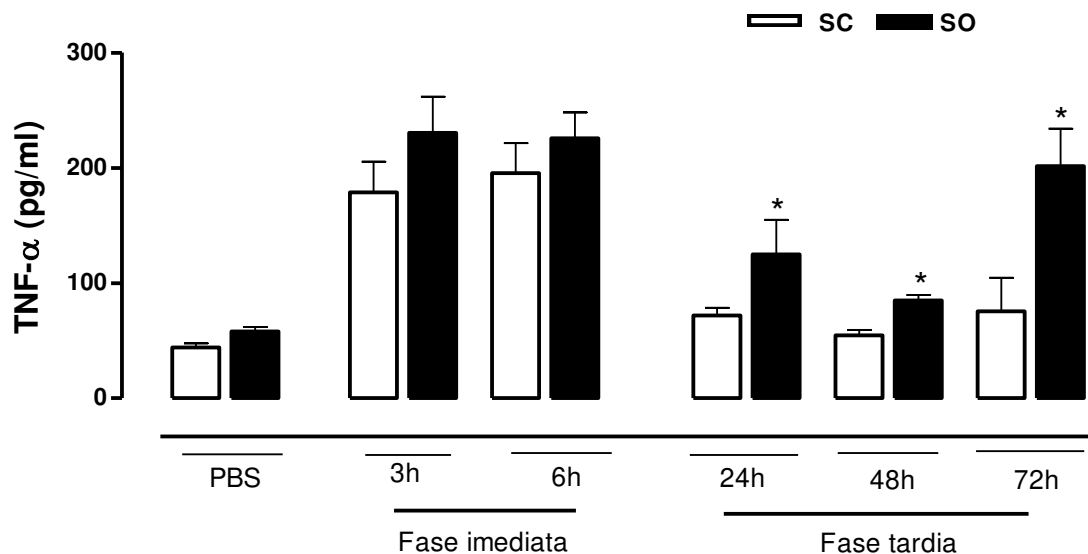


Figura 19. Efeito da obesidade sob os níveis de TNF- α no lavado broncoalveolar (LBA) em diferentes tempos após o desafio com OVA. Dosagem dos níveis do fator de necrose tumoral α (TNF- α) no LBA obtidos de camundongos sensibilizados controles (SC) e sensibilizados obesos (SO) na fase inicial do processo inflamatório (3-6 h) e na fase tardia (24-72 h). Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M para $n=6$. * $p < 0,05$ em relação ao grupo SC.

4.12. Efeito da obesidade sob a expressão das enzimas 11- β HSD1 e 11- β HSD2 no pulmão de camundongos obesos e asmáticos

Estudos demonstram que o contato com o estímulos pró-inflamatórios induz ativação da enzima 11- β HSD1 e regulação negativa da 11- β HSD2 (Georen *et al.*, 2005). A expressão da 11- β HSD1 é responsável pela conversão de glicocorticóides inativos cortisona (humanos) e 11-dehidrocorticosterona (roedores) em glicocorticóides ativos, (cortisol ou corticosterona respectivamente). Nossos dados mostraram que a

expressão da 11- β HSD1 está significativamente menor no grupo obeso em 48 h (mas não em 3 h) após o desafio com OVA, comparando-se com o grupo controle (Figura 20). A diminuição da expressão da isoforma 11- β HSD1 no pulmão de animais obesos foi acompanhada por aumento na expressão da enzima, a 11- β HSD2, a qual tem efeito oposto na conversão de glicocorticóides endógenos (Figura 20).

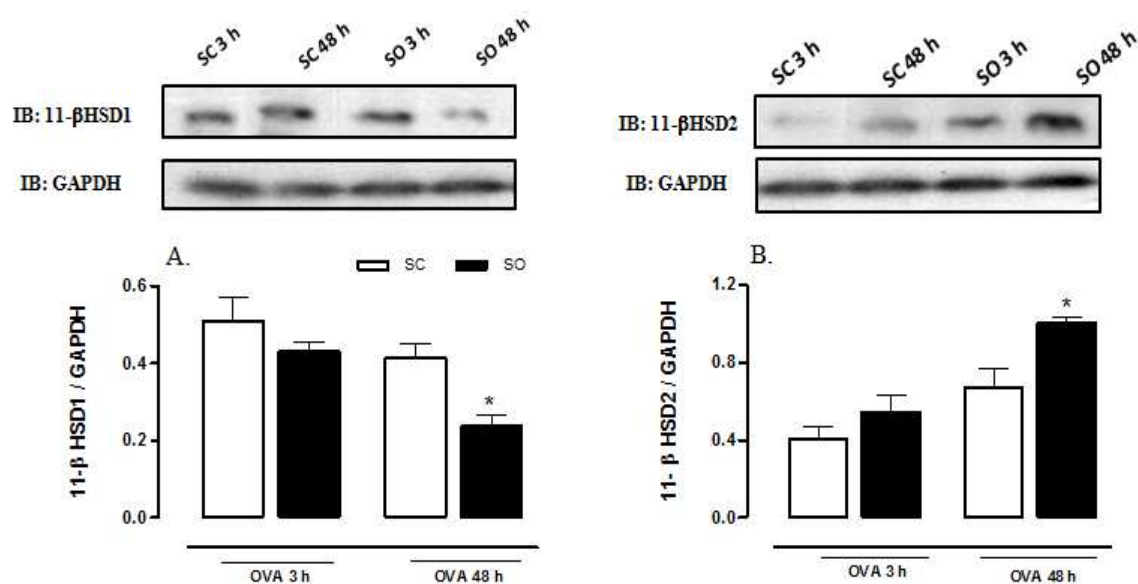


Figura 20: Efeito da obesidade sobre a expressão das enzimas 11- β HSD1 e 11- β HSD2 no pulmão. Gráficos representativos da expressão da 11- β HSD1 (A) e 11- β HSD2 (B) no homogenato de pulmão obtido de camundongos sensibilizados controle (SC) e sensibilizado obesos (SO) 3 h e 48 h após o desafio intranasal com OVA. Cada coluna representa a média $\pm$ EPM (n= 6); * p < 0,05 quando comparado com SC. Os valores da expressão da 11- β HSD e 11- β HSD2 de cada grupo foram normalizados por GAPDH e expressos por unidades arbitrárias (UA).

4.13. Efeito do bloqueio do TNF- α sob o recrutamento de células inflamatórias para o pulmão

Com intuito de avaliar a participação do TNF- α na exacerbação da resposta inflamatória pulmonar alérgica em animais obesos, optamos por estudar o efeito do bloqueio TNF- α através do tratamento dos animais com anticorpo anti-TNF- α (2 mg/kg). Para tal, realizamos a quantificação de células inflamatórias totais e de eosinófilos infiltrados no tecido pulmonar, no LBA e medula óssea. As análises foram realizadas 48 h após o primeiro desafio, baseado em nossos resultados anteriores obtidos com metformina.

4.13.1. Parênquima pulmonar

Como mostrado anteriormente, o desafio com OVA aumentou significativamente o infiltrado de células inflamatórias na região peribronquiolar dos camundongos obesos ($50,1 \pm 3,02$ e $162,2 \pm 8,2$ cels/mm² para grupo controle e obeso, respectivamente), sendo grande parte desse infiltrado composto por eosinófilos ($25,5 \pm 1,5$ e $64,5 \pm 2,8$ para grupos controle e obeso respectivamente) (Figura 21).

O número de células totais (Figura 21 A) e de eosinófilos (Figura 21 B) no pulmão apresentou-se significativamente diminuído nos camundongos sensibilizados obesos tratados com anti-TNF- α comparados aos animais não tratados ($P < 0,001$). Entretanto, ainda existe diferença significativa entre o número de eosinófilos dos animais SO comparados aos SC após bloqueio com anti-TNF- α .

A Figura 22 mostra fotos representativas de histologia pulmonar para os quatro grupos experimentais.

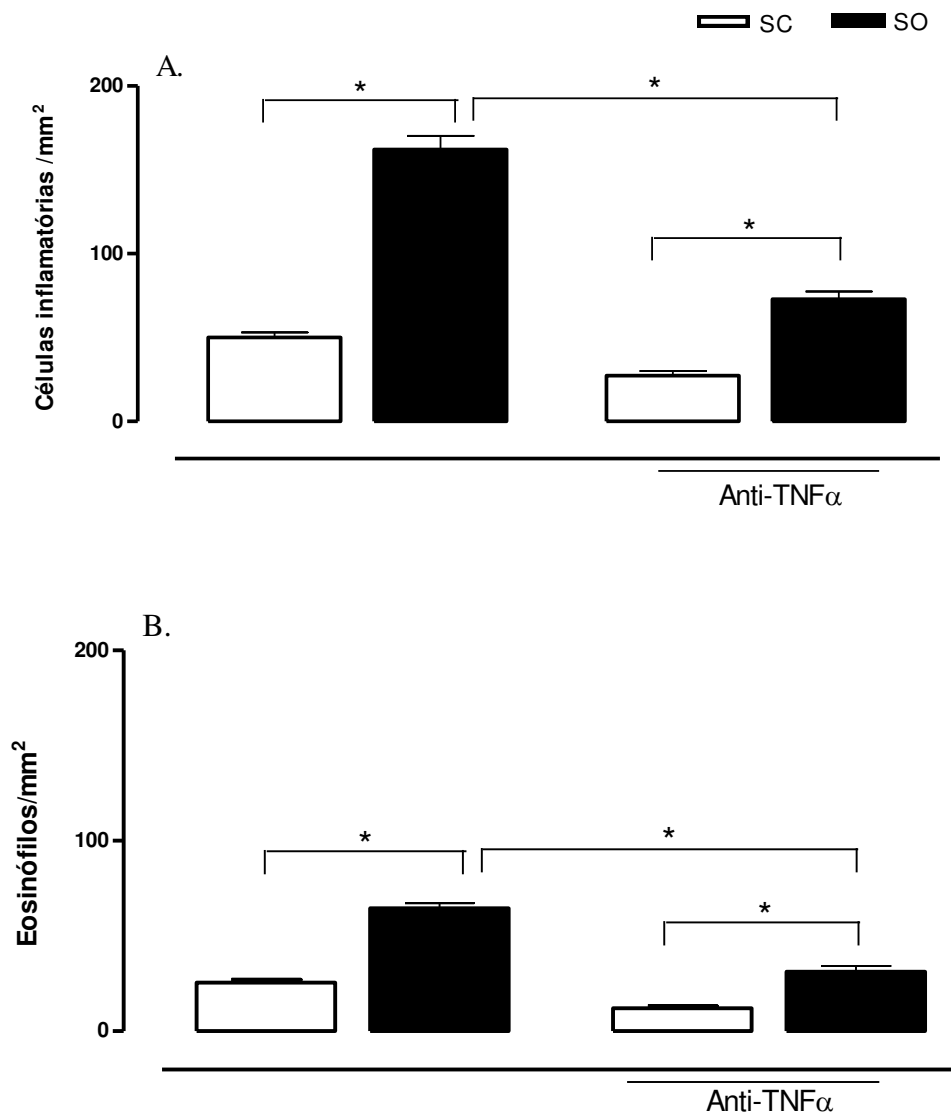


Figura 21: Efeito da neutralização do TNF- α sobre o número de células inflamatórias totais e eosinófilos no tecido pulmonar. Gráficos representativos do tratamento com anti-TNF- α (2 mg/kg; 1 h antes do primeiro desafio diário), sobre o número de células inflamatórias totais (A) e eosinófilos (B) no tecido pulmonar obtidos de camundongos sensibilizados controles (SC) e sensibilizados obesos (SO), em 48 h após o desafio intranasal com OVA. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M para n=6. * $p < 0,05$.

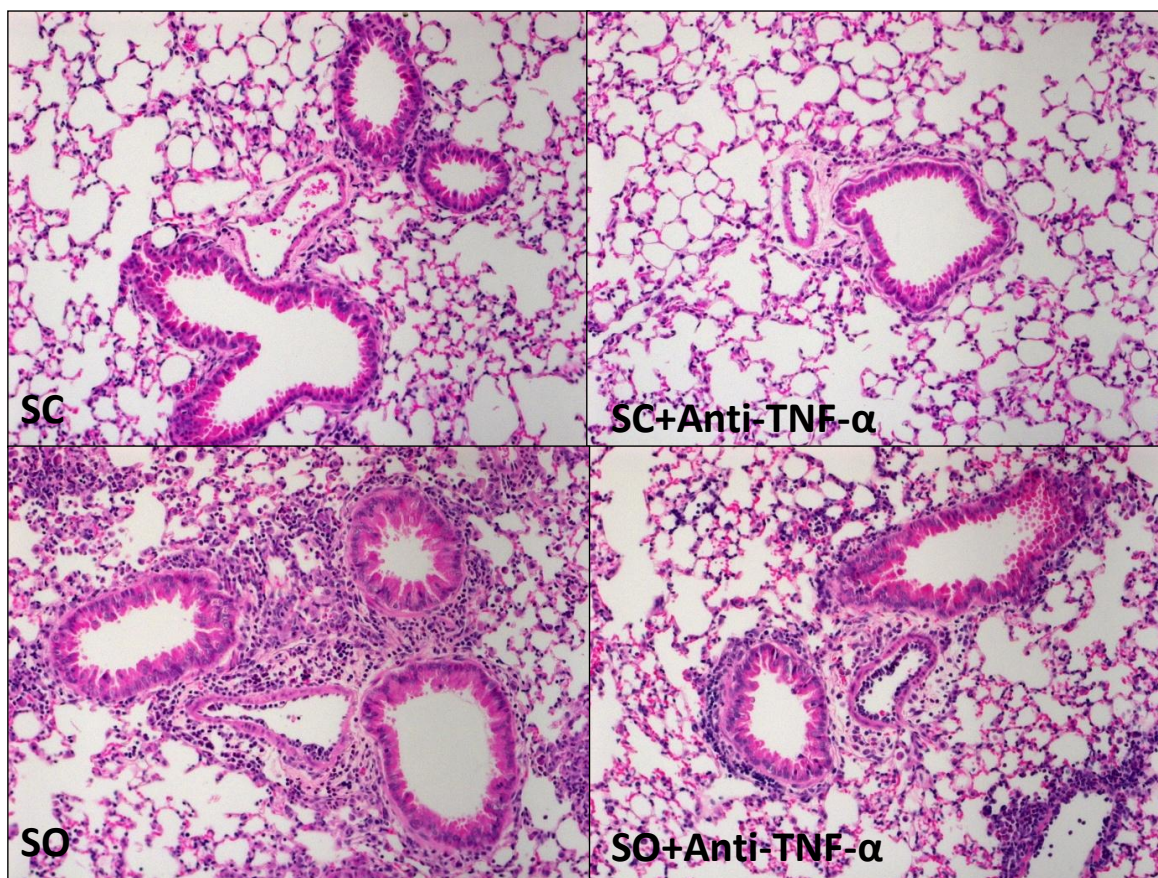


Figura 22: Fotomicrografia representativa do efeito da neutralização do $\text{TNF-}\alpha$ sobre o número de células inflamatórias e eosinófilos no tecido pulmonar 48 h após o desafio intranasal com ovalbumina (OVA). As fotos representam cortes de pulmões obtidos de camundongos sensibilizado controle (SC); sensibilizado obeso (SO), sensibilizado controle tratado com anti-TNF- α (SC+anti-TNF- α) e sensibilizado obeso tratado com anti-TNF- α (SO+ anti-TNF- α).

4.13.2. Lavado broncoalveolar (LBA)

A Figura 23 mostra que o número de células totais e de eosinófilos no LBA apresentou-se significativamente diminuído nos camundongos sensibilizados obesos comparado ao grupo controle. O tratamento com anti- TNF- α reduziu o infiltrado celular em ambos os grupos experimentais; entretanto não notamos diferença significativa para o número de células totais entre animais SO e SC após o bloqueio com anti-TNF- α , ao passo que o número de eosinófilos manteve-se significativamente diminuído no grupo obeso. O tratamento com o anti IgG (2 mg/kg), que é o isotipo controle do anticorpo anti TNF- α , não modificou o número de eosinófilos no LBA dos camundongos SC e SO (Figura 24).

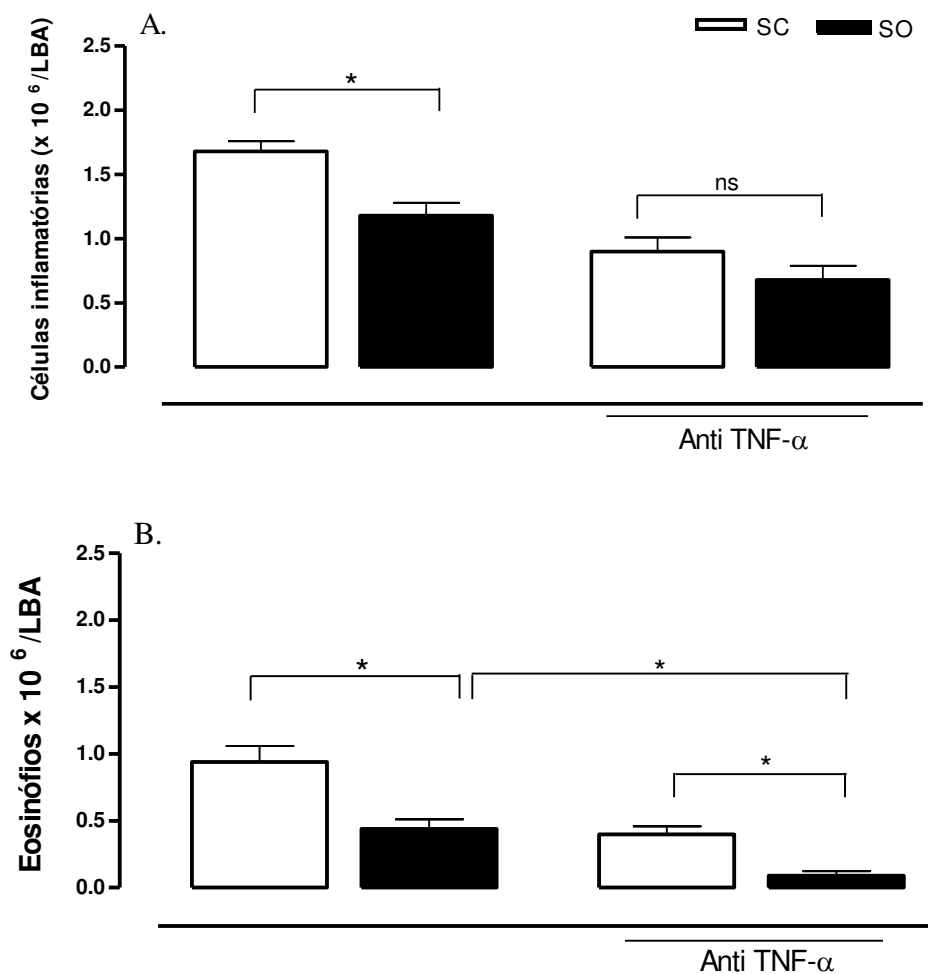


Figura 23: Efeito da neutralização do TNF- α sobre o número de células inflamatórias total e eosinófilos no lavado broncoalveolar (LBA). Os gráficos representam o efeito do tratamento com anticorpo anti TNF- α (2 mg/kg) no número de células inflamatórias total (A) e eosinófilos (B) no LBA obtidos de camundongos sensibilizados controles (SC) e sensibilizados obesos (SO) 48 h após o desafio intranasal com OVA. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M para $n = 6$. * $p < 0,05$. NS, não significativo.

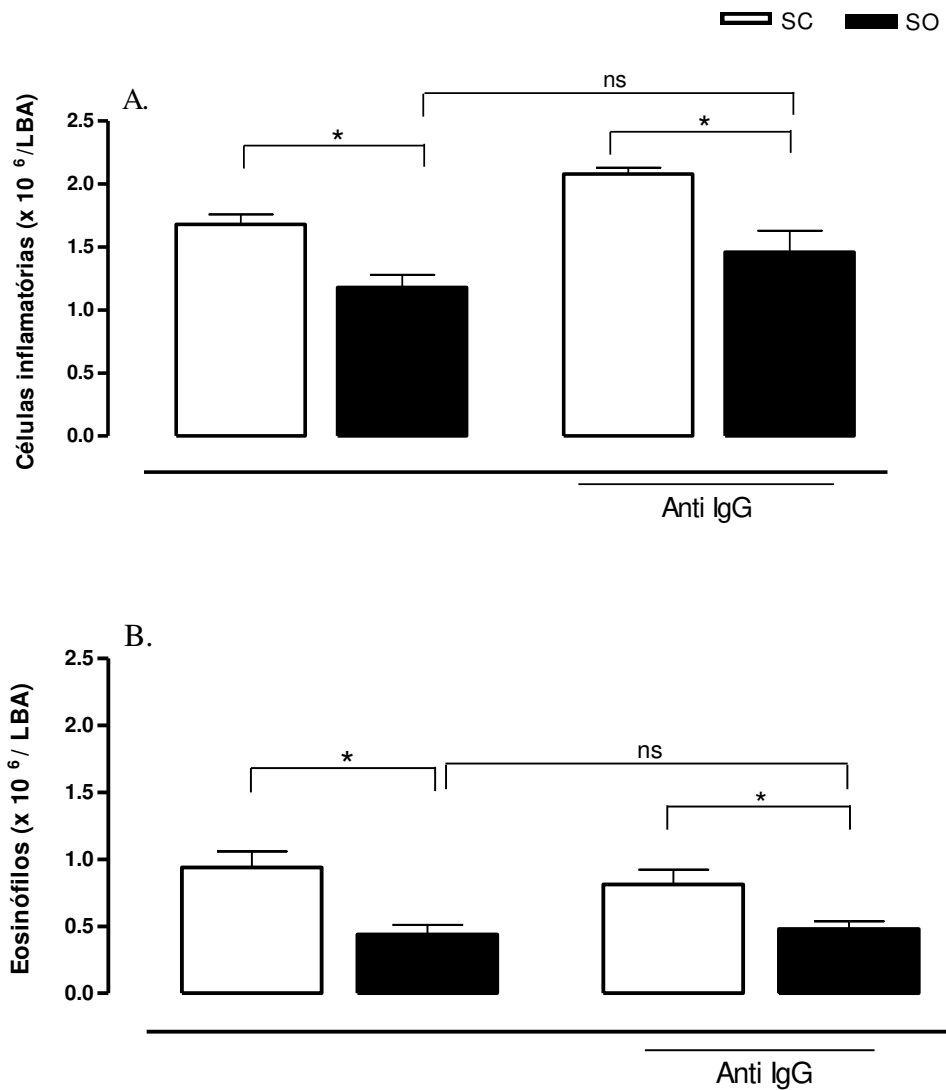


Figura 24: Efeito da neutralização da IgG sobre o número de células inflamatórias total e eosinófilos no lavado broncoalveolar (LBA). Os gráficos representam o efeito do tratamento com anticorpo anti IgG (2 mg/kg) no número de células inflamatórias total (A) e eosinófilos (B) no LBA obtidos de camundongos sensibilizados controles (SC) e sensibilizados obesos (SO), 48 h após o desafio intranasal com OVA. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M para $n=6$. * $p < 0,05$. NS, não significativo.

4.13.3. Medula Óssea

Conforme mostrado anteriormente (Figura 8), a obesidade aumentou significativamente o número de eosinófilos maduros e imaturos na medula óssea, comparado aos animais controles (magros) sensibilizados e desafiados com OVA.

O tratamento com anti-TNF- α (2 mg/kg) normalizou o número de eosinófilos maduros e imaturos nos animais obesos sensibilizados e desafiados, não havendo mais diferença significativa entre os grupos controle e obeso (Figura 25 A e B).

O tratamento com o isotipo controle do anticorpo anti TNF- α (anti IgG) não modificou o número de eosinófilos maduros e imaturos na MO dos camundongos SC e SO (Fig. 26 A e B).

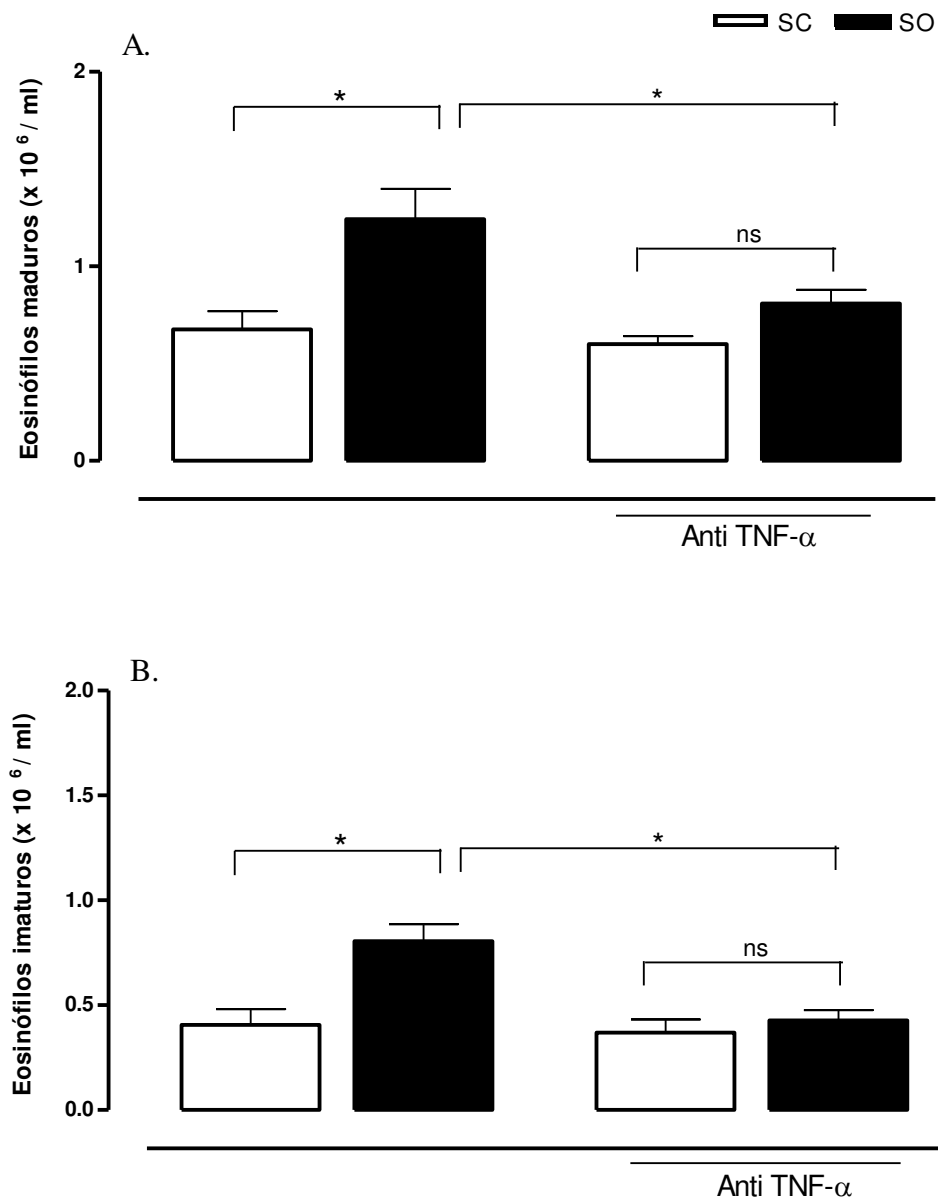


Figura 25. Efeito da neutralização do TNF- α sobre o número de eosinófilos maduros e imaturos na medula óssea (MO). Os gráficos representam o efeito do tratamento com anticorpo anti TNF- α (2 mg/kg) no número eosinófilos maduros (A) e eosinófilos imaturos (B) na MO obtidas de camundongos sensibilizados controles (SC) e sensibilizados obesos (SO), 48 h após o desafio intranasal com OVA. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M para $n=6$. $*p < 0,05$. NS, não significativo.

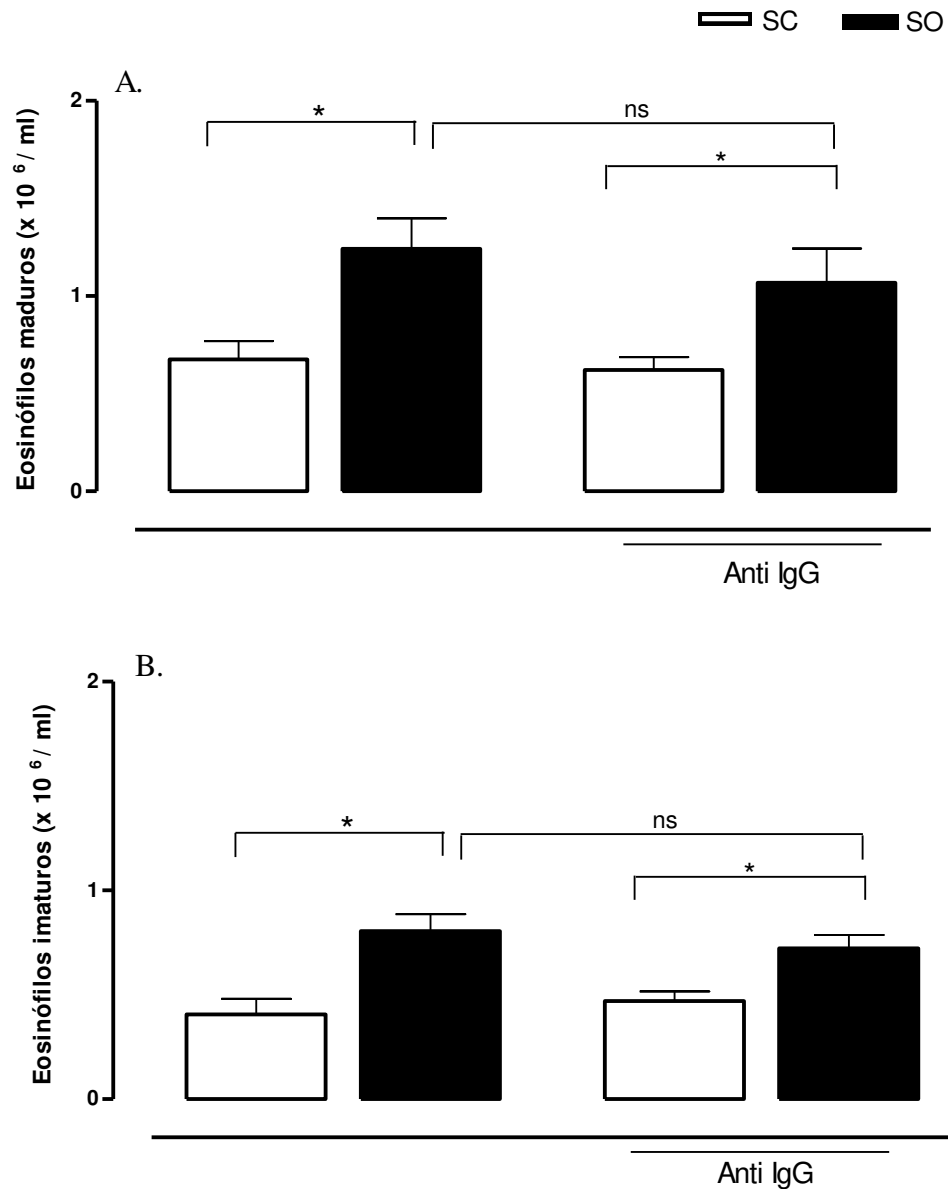


Figura 26: Efeito da neutralização do IgG sobre o número de eosinófilos maduros e imaturos na medula óssea (MO). Os gráficos representam o efeito do tratamento com anticorpo anti IgG (2 mg/kg/i.p) no número eosinófilos maduros (A) e eosinófilos imaturos (B) na MO obtidas de camundongos sensibilizados controles (SC) e sensibilizados obesos (SO), 48 h após o desafio intranasal com OVA. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M para $n=6$. * $p < 0,05$. NS, não significativo.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A asma e obesidade são doenças crônicas de elevada prevalência, sendo considerados sérios problemas de saúde pública, uma vez que se associam a elevada morbidade e custos crescentes para o sistema de saúde. A relação entre essas duas doenças tem sido bem documentada em estudos epidemiológicos. Todavia, a natureza e a causalidade desta associação não estão claramente esclarecidas e suscitam acalorada discussão. Mecanismos inflamatórios, disfunção oxidativa, alterações na mecânica respiratória e resistência periférica à insulina têm sido investigados para se entender a relação entre asma e obesidade.

No presente estudo mostramos que a metformina, droga de primeira escolha na clínica para tratamento da resistência à insulina, atenua significativamente o infiltrado de eosinófilos no tecido pulmonar peribronquiolar, assim como os níveis de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , eotaxina, e NOx no LBA e expressão da iNOS. Em camundongos obesos, o desafio com OVA promoveu aumento significativo do número de eosinófilos na medula óssea, que foi acompanhado por redução da adesão a ICAM-1 e VCAM-1, bem como da expressão de VLA-4 e Mac-1 nas células da medula óssea. O tratamento com metformina restaurou todas as alterações observadas na medula óssea de camundongos obesos desafiados com OVA.

É interessante notar que a metformina aumentou o número de eosinófilos no LBA de camundongos sensibilizados obesos e controle, sendo que, após o tratamento, o influxo de eosinófilos ocorreu de maneira semelhante em ambos os grupos, independentemente do fenótipo. É provável que o aumento no número de eosinófilos no LBA de camundongos

obesos seja fruto do aumento na transmigração dessas células da região peribronquiolar até o lúmen. Os granulócitos retidos no tecido podem ser removidos de forma eficiente e não lesiva por meio do egresso dessas células através do epitélio brônquico para o lúmen das vias aéreas (Persson e Uller et al., 2010). Uller e col (2006) propuseram que a remoção de granulócitos do tecido pulmonar para a luz das vias aéreas contribui grandemente para a resolução do processo inflamatório pulmonar. No presente estudo, as análises morfológicas do tecido pulmonar confirmam essa hipótese, pois a metformina diminuiu marcadamente o número de eosinófilos retidos na região peribronquiolar de camundongos obesos e desafiados com OVA. De acordo com Calixto e colaboradores (2010), a obesidade promove retenção de eosinófilos na região peribronquiolar, permitindo a estas células exercerem suas funções efectoras por mais tempo. Entretanto, os mecanismos que determinam a retenção de granulócitos no tecido pulmonar de camundongos obesos ainda não estão esclarecidos. É possível que a resistência à insulina desempenhe papel importante neste processo, visto que o tratamento com metformina reduz a intolerância à insulina e facilita o extravasamento dos eosinófilos da região peribronquiolar para o lúmen da via aérea. É concebível que a hiperglicemia contribua para o fenótipo pró-asmático em camundongos obesos. O *stress* oxidativo e nitrosativo, uma das conseqüências da hiperglicemia, contribui em diversos aspectos para o fenótipo obeso (Houstis et al., 2006; Scherer, 2006), e podem estar associado à asma (Kirkham e Rahman, 2006; Holguin e Fitzpatrick, 2010). Além disso, relatos recentes indicam uma alta prevalência de resistência à insulina em pacientes obesos e asmáticos comparado a obesos não asmáticos (Gulcan et al., 2009; Thuesen et al., 2009; Arshi et al., 2010; Ma et al., 2010).

Com o intuito de aprofundarmos nosso conhecimento sobre o papel da resistência à insulina sistêmica no recrutamento de eosinófilos para as vias aéreas, analisamos o efeito do tratamento com metformina sob a mobilização de eosinófilos da medula óssea de camundongos obesos e os possíveis mecanismos envolvidos na migração para o foco inflamatório. Os eosinófilos são produzidos na medula óssea, e na circulação são encontrados em baixo número, constituindo de 1-3% do total de leucócitos circulantes. Em resposta ao estímulo alérgico no pulmão, o *pool* de eosinófilos se expande na medula óssea, sendo grande quantidade recrutada subsequentemente para a circulação e pulmão (Gleich, 2000; Uhm et al., 2012) .

Inicialmente, nosso principal objetivo foi entender se o aumento no número de eosinófilos na MO de camundongos obesos é causa ou consequência do intenso recrutamento eosinofílico pulmonar.

Moléculas de adesão são conhecidas por exercer papel importante no acúmulo de leucócitos nas vias aéreas inflamadas. A aderência de eosinófilos às células endoteliais via moléculas de adesão é considerada um evento essencial e inicial para a inflamação alérgica eosinofílica. O primeiro passo para a migração de eosinófilos para o tecido inflamado inicia com o rolamento no endotélio. O rolamento progride para a adesão firme devido às interações das integrinas CD11a (LFA-1), CD11b (Mac-1) e CD49b (VLA-4) na superfície dos eosinófilos com as moléculas de adesão da família das imunoglobulinas, tais como ICAM-1 e VCAM-1 presentes no endotélio (Lampin et al., 2004). As integrinas medeiam a adesão de eosinófilos às vênulas pós-capilares permitindo a migração destas células do sangue para a parede das vias aéreas e para o espaço aéreo (Bochner, 2004). No presente estudo verificamos que eosinófilos da medula óssea de camundongos obesos

apresentam diminuição significativa na expressão de VLA-4 e Mac-1, mas não do receptor para eotaxina, o CCR3. A diminuição da aderência de eosinófilos nos ensaios de adesão *in vitro* em placas recobertas com ICAM-1 e VCAM-1 corroboram com a diminuição na expressão de VLA-4 e Mac-1 na superfície de eosinófilos da medula óssea. Dessa forma, podemos inferir que a adesão diminuída nos obesos esteja acontecendo devido à diminuição na expressão dos contra ligantes para VCAM-1 e ICAM-1 na superfície celular.

É interessante notar que a metformina normaliza o número de eosinófilos na medula óssea, assim como corrige a adesão à ICAM-1 e VCAM-1. A expressão menor de Mac-1 e VLA-4 na superfície de eosinófilos da medula óssea de camundongos obesos é também corrigida pela metformina. O aumento na adesão à ICAM-1 e VCAM-1 encontrada nos animais obesos após o tratamento com metformina parece ser mediado, ao menos em parte, pelo aumento nos níveis de eotaxina no sobrenadante da medula óssea. Johansson e colaboradores (2008) mostraram que, após desafio antigênico, ocorre ativação das integrinas $\beta 1$ e *upregulation* na expressão de $\beta 2$ em eosinófilos, mudanças essas que facilitam a interação dos eosinófilos com VCAM-1 presente no endotélio. Além disso, Saito e colaboradores (2002) demonstraram que a eotaxina aumenta a adesão de eosinófilos à ICAM-1 em indivíduos asmáticos. A eotaxina, conhecida como potente quimiocina, é um agente quimiotático para eosinófilos da medula óssea, sendo capaz de estimular rápida mobilização dos mesmos para a circulação (Palframan et al., 1998a). A eotaxina parece estabelecer um gradiente positivo através do endotélio da medula óssea para estimular a liberação de eosinófilos, ao passo que a IL-5, devido à sua atividade quimiocinética, parece ser eficiente quando presente no plasma ou quando gerada extra vascularmente na medula óssea (Palframan et al., 1998b).

O excessivo acúmulo de eosinófilos no tecido pulmonar e o aumento nos níveis de mediadores pró-inflamatórios pode estar ativando vias regulatórias, na tentativa de controlar a inflamação. Uma dessas vias seria a retenção de eosinófilos na medula óssea, pois diversos estudos demonstram uma forte comunicação entre o pulmão e a medula óssea na inflamação alérgica das vias aéreas (Sehmi et al., 1997; Gaspar Elsas et al., 1997; Ohkawara et al., 1997; Wood et al., 1998; O'Byrne, 1999). Existem diversos estudos mostrando que células progenitoras hematopoiéticas podem ser mobilizadas da medula óssea para o local da exposição ao estímulo alérgico, onde se diferenciam *in situ* em eosinófilos, sob a influência de mediadores produzidos localmente, contribuindo assim para o aumento da inflamação das vias aéreas (Dorman et al., 2004; Southam et al., 2005; Rådinger e Lötvall, 2009). Baseado nisso, podemos sugerir que no estado obeso ocorra acentuada diferenciação *in situ* no pulmão, e com isso uma regulação negativa no recrutamento de eosinófilos da medula óssea, com o intuito de refrear a resposta inflamatória exagerada no pulmão. Recentemente, foi demonstrado que a fração do estroma vascular do tecido adiposo é um reservatório extramedular de células tronco e progenitoras, inclusive de células hematopoiéticas progenitoras (Han et al., 2010). Assim, pode-se especular que células progenitoras hematopoiéticas sejam recrutadas do tecido adiposo para o pulmão, pois no pulmão dos obesos os níveis de mediadores quimiotáticos estão maiores do que os controles; e no pulmão, sob a influência da IL-5, se diferenciariam em eosinófilos, aumentando o número destas células sem necessariamente recrutar células da medula óssea. No conjunto, nos parece que a regulação negativa do recrutamento de eosinófilos da medula óssea observada em camundongos obesos parece ser uma maneira de frear a exacerbação da inflamação pulmonar resultante da excessiva retenção de eosinófilos

no pulmão, sendo esta retenção fruto da ineficiente transmigração dos eosinófilos para a luz das vias aéreas; e assim falha no processo de resolução da inflamação.

O envolvimento do NO na modulação da expressão de moléculas de adesão e no recrutamento de eosinófilos da medula óssea foi investigado recentemente por Pelaquini e colaboradores (2011). Em tal estudo, demonstrou-se que o tratamento de camundongos com o inibidor seletivo da iNOS, 1400w, resulta em aumento significativo na adesão de eosinófilos da medula óssea, seguido de aumento na expressão de Mac-1, confirmando que a iNOS é capaz de regular o recrutamento de eosinófilos da medula óssea. Outra possível via responsável pela regulação do recrutamento de eosinófilos da medula óssea para as vias aéreas é a ativação da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K). Trabalhos mostram a PI3K está envolvida na patogênese da asma (Ezeamuzie et al., 2001; Lee et al., 2006; Takeda et al., 2010). Além disso, Xia e colaboradores (2012) demonstraram que a inibição da PI3K diminui a expressão e atividade da iNOS no epitélio brônquico após o desafio com OVA, reduzindo a migração de células inflamatórias para o pulmão. Estes dados evidenciam que a via de sinalização PI3K-iNOS-NO exerce papel importante no desenvolvimento da inflamação das vias aéreas. A contribuição individual das diferentes isoformas da PI3K na inflamação das vias aéreas já foi investigada através da utilização de inibidores seletivos (Lee et al., 2006; Park et al., 2008) ou de animais geneticamente modificados (Nashed et al., 2007; Takeda et al., 2009). A PI3K p110 δ é a isoforma predominantemente expressa em eosinófilos de medula óssea, e sua inibição resulta em inibição da adesão à VCAM-1 e ICAM-1, bem como da expressão de Mac-1 em eosinófilos da medula óssea de camundongos (Kang et al., 2012).

O acúmulo de leucócitos, incluindo eosinófilos nos tecidos depende não somente do número de células recrutadas, mas também do número de células retiradas ou que deixam o tecido (Bradley et al., 1991; Duffin et al., 2010). Dessa forma, a metformina, ao ativar a AMPK no pulmão e estimular a transmigração dos eosinófilos do tecido pulmonar para a luz das vias aéreas, diminui a inflamação pulmonar e normaliza o recrutamento de eosinófilos da medula óssea, esvaziando-a. A metformina, ao ativar AMPK no pulmão, inibiria a ativação do NF- κ B e expressão da iNOS, favorecendo o processo de resolução da inflamação pulmonar em animais obesos. Os efeitos causados pela metformina podem estar relacionados ao seu potencial em controlar a resistência à insulina, já que seus efeitos sobre a inflamação pulmonar mostram-se mais significativos em animais obesos e resistentes à insulina em comparação aos controles.

Estudos clínicos e modelos experimentais de asma mostram elevação dos níveis de citocinas do tipo Th2 no LBA. Estes dados se assemelham aos resultados encontrados em nosso trabalho, os quais demonstram elevados níveis de TNF- α , eotaxina e IL-5 no LBA de animais obesos obtidos 48 h após o desafio com OVA, sendo o tratamento com metformina capaz de reduzir os níveis de TNF- α e eotaxina, não exercendo efeito inibitório sobre os níveis de IL-5. A IL-5 é considerada um regulador chave da função de eosinófilos, como migração, desenvolvimento e ativação (Dent et al., 1990; Tominaga et al., 1991; Yamaguchi et al., 1991; Sano et al., 2005; Corren, 2011). A eotaxina e a IL-5 agem cooperativamente para promover o recrutamento de eosinófilos para os tecidos, tanto em humanos quanto em animais (Collins et al., 1995; Mould et al., 1997, 2000; Rothenberg, 1999). O TNF- α está aumentado na obesidade onde exerce atividade pró-inflamatória. Além disso, o TNF- α age diretamente no adipócito regulando o acúmulo de gordura,

interferindo assim na homeostase glicêmica e no metabolismo de lipídios (Fantuzzi, 2005). Além de influenciar no desenvolvimento da resistência à insulina, diversos trabalhos, tanto em humanos quanto em animais, mostram que o TNF- α exerce importante papel na asma (Brightling et al., 2008). Por exemplo, níveis elevados de TNF- α são encontrados no LBA e no escarro de pacientes asmáticos (Cembrzynska-Nowak et al., 1993; Obase et al., 2001; Matera et al., 2010). A administração de TNF- α em aerossol em indivíduos saudáveis aumenta a hiperreatividade das vias aéreas e o número de neutrófilos no escarro (Thomas et al., 1995), e a inalação do TNF- α em pacientes asmáticos causa hiperreatividade acompanhada de neutrofilia e eosinofilia no escarro (Thomas et al., 2002). Em nosso estudo, a diminuição nos níveis de eotaxina no LBA e na produção de muco, após o tratamento com metformina, pode ser consequência da diminuição dos níveis TNF- α . Estudos prévios vêm mostrando que o TNF- α pode induzir a síntese de eotaxina em células epiteliais (Lilly et al., 1997), endoteliais (Matsukura et al., 1999), monócitos (Nakamura et al., 1998) e fibroblastos (Bartels et al., 1996). O TNF- α tem papel relevante para a hipersecreção de muco na asma grave. A ligação do TNF- α ao seu receptor geralmente leva à ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B (Song et al., 2003) e a produção de muco mediada pelo TNF- α é dependente I κ B quinase (IKK) e NF- κ B, tanto in vitro como in vivo (Lora et al., 2005).

Diversos estudos experimentais vêm demonstrando que os efeitos da metformina não estão ligados somente ao diabetes. A metformina exerce seus efeitos principalmente através da ativação da AMPK, a qual é uma serina/treonina quinase, composta por uma subunidade catalítica (α) e duas subunidades reguladoras (β , γ), que protege as células contra depleção de ATP. O papel da AMPK tem sido documentado na regulação de uma ampla variedade de processos fisiológicos, como o metabolismo de substratos,

metabolismo de lipídios, síntese de proteínas, proliferação celular e apoptose (Hardie et al., 2012). Apesar dos relatos a respeito dos efeitos da metformina na inflamação, via ativação da AMPK, poucos estudos até o momento estudaram os efeitos desta droga na asma. Dentre eles, o estudo conduzido por Ratnovsky e colaboradores (2007) evidenciou que o tratamento com metformina inibe a proliferação *in vitro* das células musculares lisas das vias aéreas via ativação do AMPK. Entretanto, Shore e colaboradores (2008) mostraram que a metformina não exerce efeito sobre a hiperreatividade e inflamação induzida por ozônio em camundongos geneticamente obesos. Todavia, é importante ressaltar que este trabalho difere do nosso, pois foi utilizado modelo de obesidade por modificações genéticas e inflamação induzida por ozônio, a qual não é de natureza alérgica e se caracteriza por um maciço infiltrado neutrofílico, sem participação de eosinófilos. Um estudo mais recente realizado com ativadores da AMPK mostrou que a ativação da mesma melhora a inflamação e a hiperreatividade das vias aéreas induzida por tolueno, além de diminuir a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e citocinas Th2 em camundongos (Park et al., 2012). Estes dados corroboram com os nossos, nos quais animais desafiados com OVA apresentam diminuição da fosforilação da AMPK e de seu principal substrato, a ACC, a qual é revertida pelo tratamento com metformina. Assim, é possível que a diminuição da ativação da AMPK esteja relacionado com o quadro de inflamação alérgica pulmonar. Existe uma vasta literatura mostrando que a ativação de AMPK pode inibir a resposta inflamatória induzida por diferentes insultos, ao passo que a diminuição da sua atividade está associada ao aumento da resposta inflamatória (Nath et al., 2005; Steinberg et al., 2006; Sag et al., 2008; Zhao et al., 2008; Ko et al., 2009; Bai et al., 2010; Myerburg et al., 2010; Gauthier et al., 2011). Dentre estes, é válido ressaltar o estudo de Sag e

colaboradores (2008), que revelou que a AMPK age diretamente nas vias sinalizadoras de macrófagos, suprimindo a resposta pró-inflamatória e promovendo a polarização destas células para o fenótipo anti-inflamatório. Estimulação de macrófagos com citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β , resulta em rápida fosforilação da AMPK, ao passo que a estimulação dos mesmos com estímulos pró-inflamatórios como LPS, resulta em desfosforilação da AMPK. Além disso, Steinberg e colaboradores (2006) observaram que o TNF- α suprime a atividade da AMPK no músculo esquelético, através da regulação positiva da expressão da proteína fosfatase 2C, conhecida como inibidora da sinalização da AMPK. Levando em consideração que macrófagos, bem como o TNF- α , exercem papel de grande relevância na inflamação das vias aéreas e que camundongos obesos apresentam elevados níveis de TNF- α no LBA, podemos inferir que a modulação da expressão da AMPK é uma possível via pela qual a obesidade induz a exacerbação da inflamação pulmonar, bem como a via pela qual a metformina exerce seus efeitos anti-inflamatórios no pulmão de animais obesos.

O TNF- α é uma citocina quimiotática capaz de induzir migração, proliferação e ativação de leucócitos, provavelmente via regulação positiva na expressão de moléculas de adesão, tais como VCAM-1 e ICAM-1, facilitando assim a migração dessas células (Chai et al., 2005; Yoshifuku et al., 2007, Babu et al, 2011). Assim, o aumento dos níveis circulantes do TNF- α na obesidade pode contribuir para exacerbação da asma. Em nossos experimentos, a dosagem de TNF- α no LBA mostrou-se maior em animais obesos, sendo restaurada pelo tratamento com metformina. Este achado nos pareceu relevante, levando-nos a investigar com mais profundidade a influência desta citocina sobre o infiltrado eosinofílico em camundongos obesos. Para tal, investigamos o efeito da neutralização do

TNF- α , através do tratamento com anticorpo anti-TNF- α , sobre a migração de eosinófilos da medula óssea para o pulmão. Procuramos comparar os efeitos do anticorpo anti-TNF- α com aqueles produzidos pela metformina.

O tratamento com anticorpo anti-TNF- α diminuiu significativamente o número de eosinófilos maduros e imaturos na medula óssea dos camundongos obesos e desafiados com OVA, sem mostrar qualquer alteração nas contagens de eosinófilos do grupo controle. Podemos propor que os efeitos da metformina possam ser, ao menos em parte, devido à inibição da produção de TNF- α . O número de eosinófilos infiltrados no tecido pulmonar de camundongos obesos tratados com anti- TNF- α foi menor, à semelhança dos animais tratados com metformina. Entretanto, o infiltrado eosinofílico no LBA apresentou-se divergente nos dois tratamentos. Ou seja, a metformina causou apenas uma diminuição nos níveis de TNF- α no LBA, permitindo ainda uma atividade pró-inflamatória residual desse mediador, enquanto que o tratamento com anticorpo levou a um bloqueio sistêmico do TNF- α . Diversos estudos já demonstraram que a metformina é capaz de diminuir os níveis dessa citocina em diferentes tecidos (Nath et al, 2009; Arai et al, 2010; Alhaider et al, 2011). Somado a isso, Hattori e colaboradores (2006) demonstraram que a metformina, através da ativação da AMPK, reduz a atividade do fator de transcrição nuclear NF- κ B, induzida pelo TNF- α , em células endoteliais. A metformina, ao inibir a ativação desse fator de transcrição, pode inibir a síntese de diversos mediadores inflamatórios envolvidos na asma, na obesidade e provavelmente na associação das duas patologias.

Dentre os mediadores pró-inflamatórios podemos destacar a iNOS, que é responsável pela formação de grandes quantidades de NO, que tem sido apontado como mediador chave na inflamação asmática (Thomassen et al., 1999; Sugiura e Ichinose,

2011). Animais submetidos ao desafio alergênico, assim como pacientes asmáticos apresentam níveis elevados de NO no ar exalado (Gustafsson et al., 1991; Petsky et al., 2012; Yamamoto et al., 2012). Embora a fonte exata do NO não esteja esclarecida, há indícios de que seja advindo da iNOS produzida pelas células epiteliais das vias aéreas inferiores (Asano et al., 1994; Lane et al., 2004; Xia et al., 2012). Macrófagos alveolares também são fonte de NO, porém a produção de NO por macrófagos de indivíduos asmáticos não parece ser a principal fonte de NO em humanos (Robbins et al., 1997). Entretanto, os macrófagos presentes nas vias aéreas podem modular a produção de NO através da produção de TNF- α e IL-1 β . Estas citocinas podem, por sua vez, aumentar a transcrição de iNOS no epitélio brônquico. A participação de macrófagos na produção de NO fortalece a correlação entre a obesidade e a asma, haja vista que macrófagos alveolares de indivíduos obesos e asmáticos apresentam fenótipo pró-inflamatório (Lugogo et al., 2012).

Perreault e Marette (2001) demonstraram em camundongos que as isoformas eNOS e nNOS, ambas constitutivamente expressas no tecido adiposo e músculo esquelético, não apresentam-se alteradas após alimentação com dieta hiperlipídica. Por outro lado, a expressão de iNOS, que é fracamente detectada no tecido adiposo e músculo esquelético de camundongos, aumenta marcadamente após a ingestão de dieta hiperlipídica. Em condições fisiológicas, tanto a eNOS quanto a nNOS produzem localmente pequenas quantidades de NO no tecido adiposo, enquanto que o aumento da produção da iNOS no estado obeso pode produzir grandes quantidades de NO, o qual pode contribuir para o desenvolvimento ou exacerbação de patologias associadas à obesidade, tal como a asma.

A via do NO parece dar suporte experimental à elucidação da associação entre asma e resistência à insulina. O estresse nitrosativo leva a modificações covalentes e inibição de várias proteínas fundamentais na sinalização da insulina (Carvalho-Filho et al., 2006; Pilon, et al., 2010). Estudos mostram que o bloqueio crônico do NO, através do uso de L-NAME, em camundongos obesos ou a deleção do gene da iNOS diminui a adiposidade induzida pela dieta hiperlipídica, reduz a inflamação do tecido adiposo e melhora a sinalização da insulina no músculo esquelético, sugerindo que o NO tem um papel modulatório no desenvolvimento da obesidade e na resistência à insulina (Tsuchiya et al., 2007; Perreault e Marette, 2001). Além disso, a resistência à insulina associada à iNOS em camundongos é mediada por S-nitrosilação (Carvalho-Filho et al., 2006) e nitração (Pilon, et al., 2010) das proteínas envolvidas na transdução de sinal de insulina, como o receptor de insulina subunidade beta (IRbeta), substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) e Akt. Levando-se em consideração que o NO é apontado atualmente como mediador chave na inflamação asmática, incluindo o recrutamento eosinofílico (Ferreira et al., 1996; Korhonen et al., 2005; Sugiura e Ichinos), e que os níveis de NO estão elevados no LBA de camundongos obesos, é plausível especular que o agravamento da asma observada na obesidade esteja ligado à produção de NO e resistência à insulina.

As informações acima referenciadas corroboram com nossos resultados de produção de metabólitos do NO e da expressão de iNOS pulmonar, através dos quais observamos que animais obesos sensibilizados e desafiados com OVA apresentam aumento significativo desses dois marcadores, e que a metformina é efetiva em inibi-los. A atividade inibitória da metformina sob a expressão da iNOS já foi descrita anteriormente. Pilon e colaboradores (2004) descreveram que a ativação farmacológica da AMPK, através de drogas que

melhoram a sensibilidade à insulina, tal como a metformina, inibe marcadamente a iNOS em diversos tipos celulares. A ativação da AMPK in vivo também inibe a expressão da iNOS no músculo e no tecido adiposo de roedores. A redução da expressão da AMPK, através da utilização de siRNA, reverte o efeito inibitório dos ativadores da AMPK sobre a expressão da iNOS e produção de NO em miócitos (Pilon et al., 2004).

Variados estudos têm mostrado que a ativação da AMPK regula negativamente a ativação do fator de transcrição NF- κ B (Salminen, 2011). A AMPK possui vários alvos diretos de fosforilação (Canto e Auwerx, 2010), mas parece que a AMPK suprime a sinalização do NF- κ B indiretamente via mediadores *downstream*, tais como SIRT-1, *Forkhead Box* (FoxO) e PGC-1 α , os quais podem subsequentemente reprimir a expressão de fatores inflamatórios. Além disso, a ativação da AMPK pode ativar o NF- κ B no intuito de estimular a expressão de proteínas anti-inflamatórias e anti-apoptóticas, como IL-10, survivina e Bcl-2 (Sag et al., 2008; Liu et al., 2010). Macrófagos obtidos da medula óssea, quando estimulados com IL-10, produzem um aumento rápido e marcante nos níveis de p-AMPK; em contrapartida, quando estimulados com LPS levam à redução da p-AMPK (Sag et al., 2008). Hattori e colaboradores (2006) verificaram que a metformina atenua a expressão de genes pró-inflamatórios e de moléculas de adesão através da inibição do NF- κ B, via ativação da AMPK. A metformina, através da ativação da AMPK, também atenua a fosforilação da I κ B, suprimindo a ativação do NF- κ B induzida pelo TNF- α . Estes dados corroboram com nossos resultados que mostram que a metformina inibe a ligação do NF- κ B na região promotora da iNOS através da inibição da fosforilação da I κ B induzida pelo TNF- α .

A quantidade de NO produzida pela iNOS é regulada principalmente ao nível transcricional. Os mecanismos moleculares para a transcrição do gene da iNOS têm sido estudados em diferentes células. Dependendo do estímulo ou do tipo celular, diferentes vias de sinalização ativam fatores de transcrição e ativadores de fatores de transcrição, tais como a proteína quinase C, tirosina-quinase, Janus quinase, proteína quinase ativada por mitógeno (MAP quinase), e inibidores como proteína tirosina fosfatase (Chu et al., 1998; Marks-Konczalik et al, 1998; Kristof et al., 2001; Lahti et al, 2002). A região promotora do gene da iNOS de camundongos contém vários locais de ligação para fatores de transcrição como NF-kB, Jun/Fos, C/EBT CREB, e a família de fatores de transcrição STAT, dentro das suas regiões proximais e distais. Para confirmar os efeitos inibitórios da metformina sob a expressão da iNOS, realizamos o experimento de imunoprecipitação de cromatina (ChIP), com intuito de verificar a ligação do fator de transcrição NF-kB na região promotora da iNOS em pulmões obtidos 48 h após o desafio com OVA. Verificamos que a metformina exerce efeito direto sob a região promotora do gene da iNOS. Embora em 48 h a ligação do fator de transcrição nuclear kB esteja diminuído nos animais obesos, o que provavelmente ocorre devido ao efeito auto-regulatório do NO, a metformina inibe a ligação do subunidade p65 do fator de transcrição NF-kB na região promotora do gene da iNOS em ambos os grupos.

De acordo com a dosagem de TNF- α no LBA em diferentes tempos após o desafio com OVA, percebe-se que os níveis desta citocina estão elevados precocemente (3 h), que corresponde à resposta asmática imediata. Sabendo-se que o TNF- α está elevado em 3 h após o desafio em animais obesos, e que o mesmo é um importante ativador do NF-kB, é cabível que a translocação deste para o núcleo esteja aumentada precocemente. Somado a

isso, animais obesos apresentam aumento na expressão pulmonar de iNOS já em 3 h após o desafio quando comparados com o grupo controle. Neste mesmo tempo ocorre aumento da fosforilação do I κ B, que pode estar induzindo a ativação do NF- κ B, a transcrição da iNOS e subsequente produção de NO, que por sua vez, recruta células inflamatórias para o tecido pulmonar, as quais aumentarão a produção de NO, exacerbando assim o processo inflamatório nos obesos em 48 h. O organismo, na tentativa de minimizar os danos causados pela inflamação, ativa processos que induzem a resolução, dentre eles a auto-regulação da iNOS. Isto confirma que, tal como demonstrado na literatura, a iNOS exerce efeitos pró-inflamatórios na fase inicial da asma alérgica seguida por efeitos regulatórios, ou anti-inflamatórios na fase tardia. A inflamação é um mecanismo de defesa normal que protege o organismo de infecção e outros insultos, onde inicialmente elimina o patógeno, reparando os tecidos e a restaurando a homeostase em locais infectados ou danificados. A auto-regulação da resposta inflamatória envolve a ativação de mecanismos de *feedback* negativo, como o a secreção de citocinas anti-inflamatórias, a inibição da cascata de sinalização pró-inflamatória e ativação de células regulatórias. Como tal, e controlada adequadamente, a resposta inflamatória regulada é essencial para manter a homeostase.

O NO pode regular sua própria produção, exercendo efeitos bifásicos em sua própria síntese (auto-regulação), através da modulação da expressão de mRNA da iNOS (Connelly et al., 2001). Estudos prévios têm deixado claro que o NO desempenha um papel central na regulação da expressão gênica (Deakin et al., 1995; Patel, et al., 1999; Perez-Sala et al., 2001). Um aspecto chave desta atividade reguladora pode ser o controle da indução da própria iNOS (Colasanti, et al., 1995; Park et al., 1997; Peng et al., 1998). Connelly e colaboradores (2003) relataram que o NO tem efeito bifásico sob a atividade do NF- κ B em

macrófagos murinos e, portanto, possui a capacidade de regular tanto positiva quanto negativamente a expressão de numerosas proteínas pró-inflamatórias, como iNOS, ciclooxigenase-2 e interleucina-6. O efeito duplo do NO sobre o NF- κ B exerce pronunciado efeito sobre o perfil de ativação de células imunes e, portanto, tem implicações importantes tanto para o início quanto para a supressão da resposta inflamatória. Em particular, as concentrações nanomolares de NO aumentam a ativação de macrófagos e a expressão de proteínas pró-inflamatórias em resposta ao LPS; em contraste, concentrações micromolares de NO, semelhantes às geradas pela iNOS, inibe a expressão do gene (Connelly et al., 2001; 2003). Estes dados corroboram com nossos resultados, nos quais observamos que animais obesos e desafiados com OVA apresentam elevados níveis de iNOS logo em 3 h após o desafio. Em 48 h após o desafio, a expressão de iNOS é tão intensa que as elevadas quantidades de NO no pulmão induz sua própria regulação através da diminuição da fosforilação e degradação da I κ B e consequente inativação do NF- κ B, o qual se desliga da região promotora da iNOS em 48 h após o desafio.

A inflamação pulmonar nos camundongos obesos atinge um nível de exacerbação grave, demonstrado pelos elevados níveis de TNF- α , NO $_x$, iNOS e infiltrado eosinofílico, fazendo com que o organismo ative mecanismos diversos na tentativa de controlar a inflamação desenfreada e induzir o processo de resolução, com o intuito de evitar a evolução para inflamação crônica. Dentre os mecanismos de auto-controle podemos ressaltar o efeito auto-inibitório da iNOS-NO no pulmão e a retenção de eosinófilos na medula óssea. É de se supor que, embora sejam deflagrados mecanismos indutores da resolução da inflamação em camundongos obesos esses mecanismos não seriam suficientes, haja vista que os níveis de TNF- α no LBA apresentam um novo pico em 72 h,

bem como a eosinofilia pulmonar se mantém presente até 72 h após o desafio com OVA (Calixto et al., 2010). Além disso, o aumento na expressão da enzima 11-HSD2 e diminuição na expressão 11-HSD1 no tecido pulmonar sugerem que os níveis de glicocorticóides endógenos estão diminuídos localmente 48 h após o desafio nos animais obesos. As 11- β hidroxisteroide desidrogenase (11-HSD) são enzimas tecido-específicas responsáveis pela interconversão da forma inativa de glicocorticóides endógenos para a forma bioativa, como cortisol ou cortisona em humanos (Albiston et al., 1994; Seckl, 2004), e corticosterona em roedores (Li et al., 1997), bem como podem fazer a conversão inversa. Existem duas isoformas da enzima 11- β HSD, com efeitos opostos. A isoforma 11- β HSD1 funciona como oxiredutase a fim de produzir glicocorticóides ativos, cortisol ou corticosterona, e a isoforma 11- β HSD2 age sob glicocorticóides como desidrogenase, a fim de produzir metabólitos inativos (Stewart e Krozowski, 1999). Em paralelo com os bem conhecidos benefícios terapêuticos dos glicocorticóides no tratamento da asma, diversos estudos têm demonstrado que os níveis séricos de glicocorticóides endógenos estão elevados em indivíduos asmáticos após o desafio antigênico e que sua liberação exerce papel essencial para atenuar a resposta broncoconstritora (Blumenthal et al., 1996; Fujitaka et al., 2000; Peebles et al., 2000). De maneira semelhante, estudos conduzidos em modelos animais de asma alérgica reportaram que glicocorticóides endógenos suprimem tanto o infiltrado eosinofílico pulmonar, quanto a hiperreatividade induzida pela exposição ao alérgeno (Nagai et al., 1991; De Bie et al., 1996; Silverman et al., 2004; Georen et al., 2005). Na ausência da 11- β HSD1, camundongos tornam-se mais sensíveis à endotoxemia (Zhang e Daynes, 2007), as inflamações agudas se tornam mais graves (Coutinho et al., 2012), e os mecanismos pró-resolução ficam retardados (Gilmour et al., 2006; Coutinho et

al., 2012) indicando que a 11- β HSD1 é essencial para limitar o progresso das doenças inflamatórias agudas.

Os resultados descritos nesta tese indicam que a resistência à insulina, resultante da obesidade, é responsável pela exacerbação da resposta inflamatória pulmonar observada em animais obesos. A reversão da resistência à insulina pela metformina em camundongos obesos permite que animais obesos entrem em processo de resolução da inflamação tal como camundongos controle. Isto é evidenciado pela normalização do trânsito dos eosinófilos da medula óssea até o lúmen das vias aéreas. Essa normalização seria essencialmente mediada pela ativação da AMPK no pulmão, diminuição das concentrações de TNF- α no LBA e da produção de NOx, como consequência da inibição da expressão da iNOS induzida pelo fator de transcrição NF- κ B, o qual deixa de ser ativado pelo TNF- α . Além disso, ao normalizar o tráfego de eosinófilos da região peribronquiolar para a luz das vias aéreas, o tratamento com metformina induz concomitante diminuição do acúmulo de eosinófilos na medula óssea devido à regulação positiva da expressão de VLA-4 e Mac-1 na superfície celular e posterior aumento da resposta adesiva à ICAM-1 e VCAM-1. A literatura acumula estudos relatando que a asma em obesos é mais grave e de difícil controle e tratamento. Obesos asmáticos não respondem de forma efetiva aos medicamentos disponíveis na clínica para o tratamento da asma, ou requerem doses elevadas dos mesmos. Desta forma, drogas que controlem as desordens metabólicas secundárias à obesidade, tal como a resistência à insulina, poderiam se tornar coadjuvantes no tratamento da asma.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

No presente estudo mostramos que o tratamento crônico com metformina em camundongos obesos e sensibilizados com OVA, induz:

- I. Reversão da resistência à insulina sistêmica;
- II. Aumento na expressão da p-AMPK e p-ACC no tecido pulmonar;
- III. Diminuição no infiltrado de células inflamatórias no tecido pulmonar, em especial, de eosinófilos na região peribronquiolar;
- IV. Diminuição nos níveis de mediadores pró-inflamatórios TNF- α e eotaxina, acompanhada de diminuição da concentração de metabólitos do óxido nítrico (NOx) no LBA;
- V. Inibição da expressão da iNOS e p-I κ B no pulmão;
- VI. Inibição da ligação da subunidade p65 do NF- κ B no gene da iNOS;
- VII. Diminuição no número de eosinófilos na medula óssea e normalização do recrutamento dos mesmos para luz das vias aéreas;
- VIII. Aumento na adesão à ICAM-1 e VCAM-1, bem como na expressão de VLA-4 e Mac-1 na superfície das células da medula óssea.
- IX. No conjunto, após a ativação da AMPK através do tratamento com metformina, camundongos obesos deixam de ser resistentes à ação da insulina, passando a apresentar diminuição da exacerbação da resposta inflamatória pulmonar. Dessa forma, ao corrigir a resistência à insulina sistêmica, camundongos sensibilizados obesos aceleram o processo de resolução da inflamação da inflamação pulmonar alérgica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abu-Ghazaleh RI, Kita H, Gleich GJ. Eosinophil activation and function in health and disease. *Immunol*; 1992; 57:137–167.

Afshar R, Medoff BD, Luster AD. Allergic asthma: a tale of many T cells. *Clin Exp Allergy*. 2008;12:1847-1857.

Agrawal A, Mabalirajan U, Ahmad T, Ghosh B. Emerging interface between metabolic syndrome and asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;44(3):270-5.

Ahmad T, Mabalirajan U, Ghosh B, Agrawal A. Altered asymmetric dimethyl arginine metabolism in allergically inflamed mouse lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010;42:3–8.

Albiston AL, Obeyesekere VR, Smith RE, Krozowski ZS. Cloning and tissue distribution of the human 11 α -hydroxysteroid dehydrogenase type II enzyme. *Mol Cell Endocrinol* 1994;105:R11–R17.

Alexeeff SE, Litonjua AA, Suh H, Sparrow D, Vokonas PS, Schwartz J. Ozone exposure and lung function: effect modified by obesity and airways hyperresponsiveness in the VA normative aging study. *Chest*. 2007;132(6):1890-7.

Alhaider AA, Korashy HM, Sayed-Ahmed MM, Mobark M, Kfoury H, Mansour MA. Metformin attenuates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats through modulation of oxidative stress genes expression. *Chem Biol Interact*. 2011; 15;192(3):233-42.

American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2008. *Diabetes Care*. 2008 31 Suppl 1:S12-54.

Andreadis, A. A.; Hazen, S. L.; Comhair, S. A. A.; Erzurum, S. C. Oxidative and nitrosative events in asthma. *Free Radical Biology & Medicine* 2003;5(3): 213–225.

Arai M, Uchiba M, Komura H, Mizuochi Y, Harada N, Okajima K. Metformin, an antidiabetic agent, suppresses the production of tumor necrosis factor and tissue factor by

inhibiting early growth response factor-1 expression in human monocytes in vitro. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010; 334(1):206-13.

Arshi M, Cardinal J, Hill RJ, Davies PS, Wainwright C. Asthma and insulin resistance in children. *Respirology* 2010; 23 15(5):779-84.

Asano K, Chee CB, Gaston B, Lilly CM, Gerard C, Drazen JM, Stamler JS. Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 11;91(21):10089-93.

Babu SK, Puddicombe SM, Arshad HH, Wilson SJ, Ward J, Gozzard N, Higgs G, Holgate ST, Davies DE. Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) autoregulates its expression and induces adhesion molecule expression in asthma. *Clin Immunol*. 2011; 140(1):18-25.

Bai A, Ma AG, Yong M, Weiss CR, Ma Y, Guan Q, Bernstein CN, Peng Z. AMPK agonist downregulates innate and adaptive immune responses in TNBS-induced murine acute and relapsing colitis. *Biochem Pharmacol* 2010; 80:1708–1717.

Bailey CJ, Turner RC. Metformin. *N Engl J Med*. 1996; 29;334(9):574-9.

Barnes PJ, Liew FY. Nitric oxide and asthmatic inflammation. *Immunol Today* 1995; 16:128-130.

Barnes PJ. Pathophysiology of allergic inflammation. *Immunol Rev*. 2011;242(1):31-50.

Barnes, PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest* 2008; 118:3546–3556.

Bartels J, Schlüter C, Richter E, Noso N, Kulke R, Christophers E, Schröder JM. Human dermal fibroblasts express eotaxin: molecular cloning, mRNA expression, and identification of eotaxin sequence variants. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;225:1045–51.

Bennett WD, Hazucha MJ, Folinsbee LJ, Bromberg PA, Kissling GE, London SJ. Acute pulmonary function response to ozone in young adults as a function of body mass index. *Inhal Toxicol* 2007;19:1147-1154.

Berrington de Gonzalez A, Hartge P, Cerhan JR, Flint AJ, Hannan L, MacInnis RJ, Moore SC, Tobias GS, Anton-Culver H, Freeman LB, Beeson WL, Clipp SL, English DR, Folsom AR, Freedman DM, Giles G, Hakansson N, Henderson KD, Hoffman-Bolton J, Hoppin JA, Koenig KL, Lee IM, Linet MS, Park Y, Pocobelli G, Schatzkin A, Sesso HD, Weiderpass E, Willcox BJ, Wolk A, Zeleniuch-Jacquotte A, Willett WC, Thun MJ.. Body-mass index and mortality among 1.46 million white adults. *N. Engl. J. Med.* 2010;363, 2211–2219.

Beuther, D. A., Weiss, S. T, Sutherland E. R. Obesity and asthma. *Am J Resp Crit Care Med* . 2006; 174: 112-119.

Beuther DA. Recent insight into obesity and asthma. *Curr Opin Pulm Med*; 2010:64-70.

Bjorntorp, P. Obesity. *Lancet* 1997; 350:423-426.

Blease K, Lukacs NW, Hogaboam CM, Kunel SL. Chemokines and their role in airway hyper-reactivity. *Respir Res*; 2000:1:54-61.

Blumenthal MN, Mclean JA, Mathews KP, Sheldon JM, Mich AA. Adrenal-pituitary function in bronchial asthma. *Arch Intern Med* 1996; 117:34–38.

Bochner BS. Adhesion molecules as therapeutic targets. *Immunol Allergy Clin North Am* 2004;24:615–630.

Boyce J., Friend D, Matsumoto R, Austen KF, Owen WF. Differentiation in vitro of hybrid eosinophil/basophil granulocytes: autocrine function of an eosinophil developmental intermediate. *J Exp Med* 1995;182:49–57.

Bradley BL, Azzawi M, Jacobson M, Assoufi B, Collins JV, Irani AM, Schwartz LB, Durham SR, Jeffery PK, Kay AB. Eosinophils, T-lymphocytes, mast cells, neutrophils, and macrophages in bronchial biopsy specimens from atopic subjects with asthma: comparison with biopsy specimens from atopic subjects without asthma and normal control subjects

and relationship to bronchial hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol.* 1991;88(4):661-74.

Brightling C, Berry M, Amrani Y. Targeting TNF- α : a novel therapeutic approach for asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121(1):5-10.

Broide D, Sriramarao P. Eosinophil trafficking to sites of allergic inflammation. *Immunol Rev*; 2001: 179:163-172.

Brown MS, Goldstein JL. Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell Metab.* 2008;7(2):95-6.

Buettner, R, Scolmerich, J, Bollheimer, C. High-fat Diets: Modeling the Metabolic Disorders of Human Obesity in Rodents. *Obesity* 2007; 15:798-808.

Calixto MC, Lintomen L, Schenka A, Saad MJ, Zanesco A, Antunes E. Obesity enhances eosinophilic inflammation in a murine model of allergic asthma. *Br J Pharmacol*; 2010; 1;159(3):617-25.

Camargo CA Jr, Weiss ST, Zhang S, Willett WC, Speizer FE. Prospective study of body mass index, weight change, and risk of adult-onset asthma in women. *Arch Intern Med* 1999;159:2582-2588.

Canto C, Auwerx J. AMP-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways. *Cell Mol Life Sci* 2010; 67:3407–3423.

Carling D. The AMP-activated protein kinase cascade – a unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci*; 2004: 29:18-23.

Carvalho-Filho MA, Ueno M, Carvalheira JB, Velloso LA, Saad MJ. Targeted disruption of iNOS prevents LPS-induced S-nitrosation of IR β /IRS-1 and Akt and insulin resistance in muscle of mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;291(3):E476-82.

Cembrzynska-Nowak M, Szklarz E, Inglot AD, Teodorczyk-Injeyan JA. Elevated release of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma by bronchoalveolar leukocytes from patients with bronchial asthma. *Am Rev Respir Dis*, 1993;147(2):291-295.

Chai OH, Lee HK, Lee YC, Lee MS, Han EH, Kim HT, Song CH. Roles of TNF-alpha and IgE in the late phase of contact hypersensitivity induced by trimellitic anhydride. *Exp Mol Med*; 2005; 37:408-17.

Chanez P, Wenzel SE, Anderson GP, Anto JM, Bel EH, Boulet LP, et al. Severe asthma in adults: what are the important questions? *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:1337-48109.

Chawla A, Nguyen KD, Goh YP. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(11):738-49.

Chihara J, Kakazu T, Higashimoto I, Saito N, Honda K, Sannohe S, Kayaba H, Urayama O. Signaling through the beta2 integrin prolongs eosinophil survival. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106(1 Pt 2):S99-103.

Chu SC, Marks-Konczalik J, Wu HP, Banks TC, Moss J. Analysis of the cytokine-stimulated human inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene: characterization of differences between human and mouse iNOS promoters *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;30;248(3):871-8.

Colasanti, M., Persichini, T., Menegazzi, M., Mariotto, S., Giordano, E., Caldarera, C. M., Sogos, V., Lauro, G. M., Suzuki, H. *J. Biol. Chem*. 1995;270, 26731–26733.

Collins PD, Marleau S, Griffiths Johnson DA, Jose PJ, Williams TJ. Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation *in vivo*. *J Exp Med* 1995; 182:1169–1174. 86.

Collins S, Martin TL, Surwit RS, Robidoux J. Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. *Physiol Behav* 2004;81:243– 248.

Connelly L, Palacios-Callender M, Ameixa C, Moncada S, Hobbs AJ. Biphasic regulation of NF-kappa B activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of nitric oxide. *J Immunol.* 2001; 15;166(6):3873-81.

Cooper PJ, Chico ME, Vaca MG, Rodriguez A, Alcântara-Neves NM, Genser B, Pontes de Carvalho L, Stein RT, Cruz AA, Rodrigues LC, Barreto ML. Risk factors for asthma and allergy associated with urban migration: background and methodology of a cross-sectional study in Afro-Ecuadorian school children in Northeastern Ecuador (Esmeraldas-SCAALA Study). *BMC Pulm Med* 2006; 6:24.

Corren J. Anti-interleukin-5 antibody therapy in asthma and allergies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2011;11(6):565-70

Coutinho AE, Gray M, Brownstein DG, Salter DM, Sawatzky DA, Clay S, Gilmour JS, Seckl JR, Savill JS, Chapman KE. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1, but not type 2, deficiency worsens acute inflammation and experimental arthritis in mice. *Endocrinology.* 2012;153(1):234-40.

Danen EH, Sonnenberg A. Integrins in regulation of tissue development and function. *J Pathol* 2003;201:632–641.

De Bie JJ, Hessel EM, Van Ark I, Van Esch B, Hofman G, Nijkamp FP, Van Oosterhout AJ. Effect of dexamethasone and endogenous corticosterone on airway hyperresponsiveness and eosinophilia in the mouse. *Br J Pharmacol* 1996; 119: 1484–1490.

Deakin, A. M., Payne, A. N., Whittle, B. J., Moncada, S. The modulation of IL-6 and TNF- α release by nitric oxide following stimulation of J774 cells with LPS and IFN- γ . *Cytokine* 1995;7, 408–416.

Denburg, J. A. Keith, P. K.. Eosinophil progenitors in airway diseases. *Chest* 2008; 134:1037–1043.

Dent, L. A., Strath, M., Mellor, A. L. and Sanderson, C. J. Eosinophilia in transgenic mice expressing interleukin 5. *J. Exp. Med.* 1990; 167:43.

Despres JP. Potential contribution of metformin to the management of cardiovascular disease risk in patients with abdominal obesity, the metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Metab* 2003;29: 6S53-6S61.

Dixon A. The treatment of asthma in obesity. *Expert Rev Respir Med*. 2012; 6(3):331-40.

Donnelly LE, Barnes PJ. Expression and regulation of inducible nitric oxide synthase from human primary airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002;26(1):144-5

Dorman SC, Efthimiadis A, Babirad I, Watson RM, Denburg JA, Hargreave FE, O'Byrne PM, Sehmi R. Sputum CD34+IL-5Ralpha+ cells increase after allergen: evidence for in situ eosinophilopoiesis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169(5):573-7.

Duffin R, Leitch AE, Fox S, Haslett C, Rossi AG. Targeting granulocyte apoptosis: mechanisms, models, and therapies. *Immunol Rev*. 2010 Jul;236:28-4.

Dutta J, Fan Y, Gupta N, Fan G, Gelinas C. Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-kappaB. *Oncogene* 2006;25:6800–16. *Biochem Soc Trans.*; 2004;32:456-60.

Ezeamuzie CI, Sukumaran J, Philips E. Effect of wortmannin on human eosinophil responses in vitro and on bronchial inflammation and airway hyperresponsiveness in rats in vivo. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:1633–1639.

Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115(5):911-9; quiz 920.

Ferrante, A. W. Jr. Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation. *J. Intern. Med*. 2007; 262, 408–414.

Ferreira HHA, Medeiros MV, Lima CSP, Flores CA, Sannomiya P, Antunes E, De Nucci G. Inhibition of eosinophil chemotaxis by chronic blockade of nitric oxide biosynthesis. *Eur J Pharmacol* 1996; 310:201-207.

Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ, Singh GM, Gutierrez HR, Lu Y, Bahalim AN, Farzadfar F, Riley LM, Ezzati M; Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating Group (Body Mass Index). National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet*. 2011;377(9765):557-67.

Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Johnson CL. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000. *JAMA*. 2002;288(14):1723-7.

Folkerts G, Kloek J, Muijsers RB, Nijkamp FP. Reactive nitrogen and oxygen species in airway inflammation. *Eur J Pharmacol*. 2001;429(1-3):251-6.

Ford ES. Asthma, body mass index, and C-reactive protein among US adults. *J Asthma*. 2003;40(7):733-9.

Ford ES. The epidemiology of obesity and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115(5):897-909; quiz 910.

Freitas HS, Anhê GF, Melo KF, Okamoto MM, Oliveira-Souza M, Bordin S, Machado UF. Na(+)-glucose transporter-2 messenger ribonucleic acid expression in kidney of diabetic rats correlates with glycemic levels: involvement of hepatocyte nuclear factor-1alpha expression and activity. *Endocrinology*. 2008;149(2):717-24.

Fujitaka M, Nomura S, Sakura N, Ueda K, Matuura R, Yumiba C. Morning and afternoon serum levels of cortisone and cortisol in asthmatic patients. *Clin Chim Acta* 2000; 299: 101-108.

Furchgott, R. F. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circulation Res*. 1983;53:557-573.

Galli SJ, Tsai M. IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med*. 2012 4;18(5):693-704.

Gaspar Elsas MI, Joseph D, Elsas PX, Vargaftig BB. Rapid increase in bone-marrow eosinophil production and responses to eosinopoietic interleukins triggered by intranasal allergen challenge. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997;17(4):404-13.

Gauthier MS, O'Brien EL, Bigornia S, Mott M, Cacicedo JM, Xu XJ, Gokce N, Apovian C, Ruderman N. Decreased AMP activated protein kinase activity is associated with increased inflammation in visceral adipose tissue and with whole-body insulin resistance in morbidly obese humans. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 404:382–387.

Georen S, Ahnblad P, Stjarne P, Wikstrom AC, Stierna P. Significance of endogenous glucocorticoid sensitivity for airway eosinophilia in a murine model of allergy. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 2005; 125: 378–385.

Gilmour JS, Coutinho AE, Cailhier JF, Man TY, Clay M, Thomas G, Harris HJ, Mullins JJ, Seckl JR, Savill JS, Chapman KE. Local amplification of glucocorticoids by 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 promotes macrophage phagocytosis of apoptotic leukocytes. *Immunol.* 2006 15;176(12):7605-11.

Gleich GJ. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;105(4):651-63.

Global Initiative National for Asthma-2011.

Gonlugur U, Efeoglu T. Vascular adhesion and transendothelial migration of eosinophil leukocytes. *Cell Tissue Res.* 2004;318(3):473-82.

Gulcan E, Bulut I, Toker A, Gulcan A. Evaluation of glucose tolerance status in patients with asthma bronchiale. *J Asthma.* 2009;46(2):207-9.

Gustafsson LE, Leone AM, Persson MG, Wiklund NP, Moncada S. Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991; 16;181(2):852-7.

Hakala K, Stenius-Aarniala B, Sovijärvi A. Effects of weight loss on peak flow variability, airways obstruction, and lung volumes in obese patients with asthma. *Chest*. 2000;118(5):1315-21.

Han J, Koh YJ, Moon HR, Ryoo HG, Cho CH, Kim I, Koh GY. Adipose tissue is an extramedullary reservoir for functional hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 2010; 4;115(5):957-64.

Hardie DG, Ross FA, Hawley SA AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012; 22;13(4):251-62.

Hattori Y, Suzuki K, Hattori S, Kasai K. Metformin inhibits cytokine-induced nuclear factor kappaB activation via AMP-activated protein kinase activation in vascular endothelial cells. *Hypertension*. 2006;47(6):1183-8.

Hemmingsen B, Lund SS, Wetterslev J, Vaag A. Oral hypoglycaemic agents, insulin resistance and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol*. 2009;161(1):1-9.

Hesslinger C, Strub A, Boer R, Ulrich WR, Lehner MD, Braun C. Inhibition of inducible nitric oxide synthase in respiratory diseases. *Biochem Soc Trans*. 2009;37(Pt 4):886-91.

Hjoberg J, Shore S, Kobzik L, Okinaga S, Hallock A, Vallone J, Subramaniam V, De Sanctis GT, Elias JA, Drazen JM, Silverman ES. Expression of nitric oxide synthase-2 in the lungs decreases airway resistance and responsiveness. *J Appl Physiol*. 2004;97(1):249-59.

Holgate ST, Djukanović R, Casale T, Bousquet J. Anti-immunoglobulin E treatment with omalizumab in allergic diseases: an update on anti-inflammatory activity and clinical efficacy. *Clin Exp Allergy*. 2005;35(4):408-16.

Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy*. 2008; 38(6):872-97.

Holgate ST. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat Med.* 2012;18(5):673-83.

Holguin F, Fitzpatrick A. Obesity, asthma, and oxidative stress. *J Appl Physiol.* 2010;108(3):754-9.

Hopkins, A. M., A. W. Baird, and A. Nusrat. ICAM-1: targeted docking for exogenous as well as endogenous ligands. *Adv. Drug Delivery Res*; 2004: 56: 763–778.

Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S. & Spiegelman, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; 259, 87–91.

Hotamisligil, G. S.. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006; 444: 860-867.

Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature.* 2006; 13;440(7086):944-8.

Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002;110:673–687.

Iijima H, Tulic MK, Duguet A, Shan J, Carbonara P, Hamid Q, Eidelman DH. NOS 1 is required for allergen-induced expression of NOS 2 in mice. *Int Arch Allergy Immunol.* 2005;138(1):40-50.

Ikemoto S, Takahashi M, Tsunoda N, Maruyama K, Itakura H, Ezaki O. High-fat diet-induced hyperglycemia and obesity in mice: differential effects of dietary oils. *Metabolism.* 1996;45:1539–1546.

Johansson, M.W, Kelly, E.A.B, Busse, W.W, Jarjour, N.N, Mosher, D.F. Upregulation and activation of eosinophil integrins in blood and airway after segmental lung antigen challenge. *J Immunol*; 2008;180(11):7622-35.

Kahn, BB. & Flier, J. S. Obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 2000;106, 473–481.

Kang BN, Ha SG, Ge XN, Reza Hosseinkhani M, Bahaie NS, Greenberg Y, Blumenthal MN, Puri KD, Rao SP, Sriramaraio P. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2012;302(11):L1179-91.

Kazani S, Israel E. Update in asthma 2011. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012 1;186(1):35-40.

Kim JK, Wi JK, Youn JH. Metabolic impairment precedes insulin resistance in skeletal muscle during high-fat feeding in rats. *Diabetes*. 1996; 45(5):651-8.

Kirkham P, Rahman I. Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as a therapeutic strategy. *Pharmacol Ther*; 2006; 111: 476–494.

Ko HJ, Zhang Z, Jung DY, Jun JY, Ma Z, Jones KE, Chan SY, Kim JK. Nutrient stress activates inflammation and reduces glucose metabolism by suppressing AMP-activated protein kinase in the heart. *Diabetes* 2009; 58:2536–2546.

Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005; 4(4):471-9.

Kristof AS, Marks-Konczalik J, Moss J. Mitogen-activated protein kinases mediate activator protein-1-dependent human inducible nitric-oxide synthase promoter activation. *J Biol Chem*. 2001; 16;276(11):8445-52.

Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E. P38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB203580 has a bi-directional effect on iNOS expression and NO production. *Eur J Pharmacol*. 2002; 15;454(2-3):115-23

Lampinen M, Carlson M, Håkansson LD, Venge P. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. *Allergy*. 2004;59(8):793-805.

Lane C, Knight D, Burgess S, Franklin P, Horak F, Legg J, Moeller A, Stick S. Epithelial inducible nitric oxide synthase activity is the major determinant of nitric oxide concentration in exhaled breath. *Thorax*. 2004;59(9):757-60.

Lavoie KL, Bacon SL, Labrecque M, Cartier A, Ditto B. Higher BMI is associated with worse asthma control and quality of life but not asthma severity. *Respir Med*. 2006; 100(4):648-57.

Lee KS, Lee HK, Hayflick JS, Lee YC, Puri KD. Inhibition of phosphoinositide 3-kinase delta attenuates allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in murine asthma model. *FASEB J* 2006; 20(3):455-65.

Lee KS, Park SJ, Kim SR, Min KH, Jin SM, Puri KD, Lee YC. Phosphoinositide 3-kinase-delta inhibitor reduces vascular permeability in a murine model of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;118(2):403-9.

Leibel RL, Chung WK, Chua SC Jr. The molecular genetics of rodent single gene obesities. *J Biol Chem* 1997; 19;272(51):31937-40.

Leibel RL. Energy in, energy out, and the effects of obesity-related genes. *N Engl J Med.* 2008 11;359(24):2603-4.

Lemanske RF Jr, Busse WW. Asthma: clinical expression and molecular mechanisms. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2 Suppl 2):S95-102.

Li KXZ, Obeyesekere VR, Krozowski ZS, Ferrari P. Oxoreductase and dehydrogenase activities of the human and rat 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II enzyme. *Endocrinology* 1997;138:2948–2952

Lilly CM, Nakamura H, Kesselman H, Nagler-Anderson C, Asano K, Garcia-Zepeda EA, Rothenberg ME, Drazen JM, Luster AD. Expression of eotaxin by human lung epithelial cells: induction by cytokines and inhibition by glucocorticoids. *J Clin Invest* 1997; 99:1767–73.

Lintomen L, Calixto MC, Schenka A, Antunes E. Allergen-induced Bone Marrow Eosinophilopoiesis and Airways Eosinophilic Inflammation in Leptin-deficient ob/ob Mice. *Obesity* (Silver Spring). 2012. Epub ahead of print.

Liu C, Liang B, Wang Q, Wu J, Zou MH. Activation of AMP-activated protein kinase α 1 alleviates endothelial cell apoptosis by increasing the expression of anti-apoptotic proteins Bcl-2 and survivin. *J Biol Chem* 2010; 285:15346–15355.

Lora JM, Zhang DM, Liao SM, Burwell T, King AM, Barker PA, Singh L, Keaveney M, Morgenstern J, Gutiérrez-Ramos JC, Coyle AJ, Fraser CC. . Tumor necrosis factor- α triggers mucus production in airway epithelium through an I κ B kinase β -dependent mechanism. *J Biol Chem* 2005; 280:36510–36517.

Lu FL, Johnston RA, Flynt L, Theman TA, Terry RD, Schwartzman IN, Lee A, Shore SA. Increased pulmonary responses to acute ozone exposure in obese db/db mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;290(5):L856-65.

Luder, E., T. A. Melnik, M. DiMaio. Association of being overweight with greater asthma symptoms in inner city Black and hispanic children. *J Pediatr*, 1998; 132: 699-703.

Lugogo NL, Hollingsworth JW, Howell DL, Que LG, Francisco D, Church TD, Potts-Kant EN, Ingram JL, Wang Y, Jung SH, Kraft M. Alveolar Macrophages from Overweight/Obese Asthmatic Subjects Demonstrate a Pro-inflammatory Phenotype. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012 Jul 5. [Epub ahead of print].

Lumeng, C. N., DelProposto, J. B., Westcott, D. J. & Saltiel, A. R. Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. *Diabetes*, 2008; 57, 3239–3246.

Ma J, Xiao L, Knowles SB. Obesity, insulin resistance and the prevalence of atopy and asthma in US adults. *Allergy*. 2010; 65(11):1455-63.

Mabalirajan U, Ahmad T, Leishangthem GD, Joseph DA, Dinda AK, Agrawal A, Ghosh B. Beneficial effects of high dose of L-arginine on airway hyperresponsiveness and airway inflammation in a murine model of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(3):626-35.

Mannino DM, Homa DM, Akinbami LJ, Moorman JE, Gwynn C, Redd SC. Surveillance for asthma--United States, 1980-1999. *MMWR Surveill Summ*. 2002;51(1):1-13.

Marks-Konczalik J, Chu SC, Moss J. Cytokine-mediated transcriptional induction of the human inducible nitric oxide synthase gene requires both activator protein 1 and nuclear factor kappaB-binding sites. *J Biol Chem*. 1998; 273(35):22201-8.

Marletta, M. A., P. S. Yoon, R. Iyengar, C. P. Leaf, and J. S. Wishnot. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochem.* 1988;27:8706–8711.

Marques RH, Reis FG, Starling CM, Cabido C, de Almeida-Reis R, Dohnnikoff M, Prado CM, Leick EA, Martins MA, Tibério IF. Inducible nitric oxide synthase inhibition attenuates physical stress-induced lung hyper-responsiveness and oxidative stress in animals with lung inflammation. *Neuroimmunomodulation.* 2012;19:158-70.

Matera MG, Calzetta L, Cazzola M. TNF-alpha inhibitors in asthma and COPD: we must not throw the baby out with the bath water. *Pulm Pharmacol Ther.* 2010;23(2):121-8.

Matsukura S, Stellato C, Plitt JR, Bickel C, Miura K, Georas SN, Casolaro V, Schleimer RP. Activation of eotaxin gene transcription by NF-kappa B and STAT6 in human airway epithelial cells. *J Immunol* 1999; 163:6876–83.

Moudgil H. Prevalence of obesity in asthmatic adults. *BMJ.* 2000; 12;321(7258):448.

Mould AW, Matthaei KI, Young IG, Foster PS. Relationship between interleukin-5 and eotaxin in regulating blood and tissue eosinophilia in mice. *J Clin Invest* 1997;99:1064–1071.

Mould AW, Ramsay AJ, Matthaei KI, Young IG, Rothenberg ME, Foster PS. The effect of IL-5 and eotaxin expression in the lung on eosinophil trafficking and degranulation and the induction of bronchial hyperreactivity. *J Immunol.* 2000; 15;164(4):2142-50.

Myerburg MM, King JD Jr, Oyster NM, Fitch AC, Magill A, Baty CJ, Watkins SC, Kolls JK, Pilewski JM, Hallows KR. AMPK agonists ameliorate sodium and fluid transport and inflammation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010; 42:676–684.

Nagai H, Tsuji F, Goto S, Koda A. Pharmacological study of bacterial lipopolysaccharide-induced airway hyperresponsiveness in guinea-pigs. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1991; 313: 161–175.

Nagi DK, Yudkin JS. Effects of metformin on insulin resistance, risk factors for cardiovascular disease, and plasminogen activator inhibitor in NIDDM subjects. A study of two ethnic groups. *Diabetes Care* 1993;16:621-9.

Nakamura H, Haley KJ, Nakamura T, Luster AD, Lilly CM. Differential regulation of eotaxin expression by TNF-alpha and PMA in human monocytic U-937 cells. *Am J Physiol* 1998; 275:L601-10.

Nashed BF, Zhang T, Al-Alwan M, Srinivasan G, Halayko AJ, Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B, Hayglass KT, Marshall AJ. Role of the phosphoinositide 3-kinase p110delta in generation of type 2 cytokine responses and allergic airway inflammation. *Eur J Immunol* 2007; 37: 416-424.

Nath N, Giri S, Prasad R, Salem ML, Singh AK, Singh I. 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside: a novel immunomodulator with therapeutic efficacy in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2005; 175:566-574.

Nath N, Khan M, Paintlia MK, Singh I, Hoda MN, Giri S. Metformin attenuated the autoimmune disease of the central nervous system in animal models of multiple sclerosis. *J Immunol.*; 2009;15:8005-14. Erratum in: *J Immunol.* 2009; 1;183(5):3551.

Obase Y, Shimoda T, Mitsuta K, Matsuo N, Matsuse H, Kohno S. Correlation between airway hyperresponsiveness and airway inflammation in a young adult population: eosinophil, ECP, and cytokine levels in induced sputum. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2001,86(3):304-310.

O'Byrne P. Asthma pathogenesis and allergen-induced late responses. *J Allergy Clin Immunol.* 1998;102(5):S85-9.

O'Byrne PM, Gauvreau GM, Wood LJ. Interaction between haemopoietic regulation and airway inflammation. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 27-32, supplement 2.

O'Byrne PM, Inman MD, Adelroth E. Reassessing the Th2 cytokine basis of asthma. *Trends Pharmacol Sci.* 2005;25(5):244-8.

Odegaard JI, Chawla A. Alternative macrophage activation and metabolism. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:275-97.

Ohkawara, Y., Lei, X. F., Stampfli, M. R., Marshall, J. S., Xing, Z., Jordana, M. Cytokine and eosinophil responses in the lung, peripheral blood, and bone marrow compartments in a murine model of allergen-induced airways inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 1997; 16, 510–520.

Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol.* 2010;72:219-46.

Pakhale S, Doucette S, Vandemheen K, Boulet LP, McIvor RA, Fitzgerald JM, Hernandez P, Lemiere C, Sharma S, Field SK, Alvarez GG, Dales RE, Aaron SD. A comparison of obese and nonobese people with asthma: exploring an asthma-obesity interaction. *Chest.* 2010;137(6):1316-23.

Palframan, R.T., P.D. Collins, T.J. Williams, and S.M. Rankin. Eotaxin induces a rapid release of eosinophils and their progenitors from the bone marrow. *Blood.* 1998a; 91:2240–2248.

Palframan RT, Collins PD, Severs NJ, Rothery S, Williams TJ, Rankin SM. Mechanisms of acute eosinophil mobilization from the bone marrow stimulated by interleukin 5: the role of specific adhesion molecules and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Exp Med.* 1998b 2;188(9):1621-32.

Park, SK., Lin, H. L., Murphy, S. Nitric oxide regulates nitric oxide synthase-2 gene expression by inhibiting NF-kappaB binding to DNA. *Biochem. J.* 1997;322, 609–613.

Park SJ, Min KH, Lee YC. Phosphoinositide 3-kinase delta inhibitor as a novel therapeutic agent in asthma. *Respirology.* 2008;13(6):764-71.

Park SJ, Ahmad F, Philp A, Baar K, Williams T, Luo H, Ke H, Rehmann H, Taussig R, Brown AL, Kim MK, Beaven MA, Burgin AB, Manganiello V, Chung JH. Resveratrol

ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. *Cell*. 2012; 3;148(3):421-33

Park SJ, Lee KS, Kim SR, Chae HJ, Yoo WH, Kim DI, Jeon MS, Lee YC. AMPK activation reduces vascular permeability and airway inflammation by regulating HIF/VEGFA pathway in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma. *Inflamm Res*. 2012; 13. [Epub ahead of print]

Patel, R., Attur, M. G., Dave, M., Abramson, S. B., Amin, A. R. J. Regulation of cytosolic COX-2 and prostaglandin E2 production by nitric oxide in activated murine macrophages. *Immunol*. 1999; 162, 4191–4197.

Pearce N, Douwes J. The Latin American exception: why is childhood asthma so prevalent in Brazil? *J Pediatr (Rio J)*. 2006;82(5):319-21.

Prado CM, Yano L, Rocha G, Starling CM, Capelozzi VL, Leick-Maldonado EA, Martins Mde A, Tibério IF. Effects of inducible nitric oxide synthase inhibition in bronchial vascular remodeling-induced by chronic allergic pulmonary inflammation. *Exp Lung Res*. 2011;37:259-68.

Prado CM, Leick-Maldonado EA, Yano L, Leme AS, Capelozzi VL, Martins MA, Tibério IF. Effects of nitric oxide synthases in chronic allergic airway inflammation and remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006;35:457-65.

Peebles RS Jr, Togias A, Bickel CA, Diemer FB, Hubbard WC, Schleimer RP. Endogenous glucocorticoids and antigen-induced acute and late phase pulmonary responses. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 1257–1265.

Pelaquini EH, Guimarães Lde A, Benetti LR, Fernandes LG, Tamashiro WM, Conran N, Ferreira HH. Role of the Mac-1 and VLA-4 integrins, and concomitant Th2-cytokine production, in nitric oxide modulated eosinophil migration from bone marrow to lungs in allergic mice. *Int Immunopharmacol*. 2011;11(2):204-11.

Peng, H. B., Spiecker, M., Liao, J. K. Inducible nitric oxide: an autoregulatory feedback inhibitor of vascular inflammation. *J. Immunol.* 1998; 161, 1970–1976.

Perez-Sala, D., Cernuda-Morollon, E., Diaz-Cazorla, M., Rodriguez-Pascual, F., Lamas, S. Posttranscriptional regulation of human iNOS by the NO/cGMP pathway. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2001; 280, F466–F473.

Perreault M, Marette A. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat Med.*; 2001; 7:1138–1143.

Person C, Uller L. Transepithelial exit of leucocytes: inflicting, reflecting or resolving airway inflammation? *Thorax.* 2010; 65(12):1111-5.

Petsky HL, Cates CJ, Lasserson TJ, Li AM, Turner C, Kynaston JA, Chang AB. A systematic review and meta-analysis: tailoring asthma treatment on eosinophilic markers (exhaled nitric oxide or sputum eosinophils). *Thorax.* 2012;67(3):199-208.

Pilon G, Dallaire P, Marette A. Inhibition of inducible nitric-oxide synthase by activators of AMP-activated protein kinase: a new mechanism of action of insulin sensitizing drugs. *J Biol Chem.*; 2004; 14:20767-74.

Pilon G, Charbonneau A, White PJ, Dallaire P, Perreault M, Kapur S, Marette A. Endotoxin mediated-iNOS induction causes insulin resistance via ONOO⁻ induced tyrosine nitration of IRS-1 in skeletal muscle. *PLoS One.* 2010; 28;5(12):e15912.

Prpic V, Watson PM, Frampton IC, Sabol MA, Jezek GE, Gettys TW. Differential mechanisms and development of leptin resistance in A/J versus C57BL/6J mice during diet-induced obesity. *Endocrinology.* 2003;144:1155– 1163.

Qatanani, M. & Lazar, M. A. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes Dev.* 2007; 21, 1443–1455.

Rådinger M, Lötvall J. Eosinophil progenitors in allergy and asthma - do they matter? *Pharmacol Ther.* 2009;121(2):174-84.

Rains SG, Wilson GA, Richmond W, Elkeles RS. The reduction of low density lipoprotein cholesterol by metformin is maintained with long-term therapy. *J R Soc Med.* 1989;82(2):93-4.

Rankin, S. M.. Impact of bone marrow on respiratory disease. *Curr Opin in Pharmacology*, 2008; 8:236–241.

Ratnovsky A, Mellema M, An SS, Fredberg JJ, Shore SA. Airway smooth muscle proliferation and mechanics: effects of AMP kinase agonists. *Mol Cell Biomech.* 2007; 4(3):143-57.

Robbins RA, Grisham MB. Nitric oxide. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997;29(6):857-60.

Rothenberg ME. Eotaxin. An essential mediator of eosinophil trafficking into mucosal tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 21:291–295.

Sag D, Carling D, Stout RD, Suttles J. Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase promotes macrophage polarization to an anti-inflammatory functional phenotype. *J Immunol* 2008; 181:8633–8641.

Saint-Pierre P, Bourdin A, Chanez P, Daures JP, Godard P. Are overweight asthmatics more difficult to control? *Allergy.* 2006;61(1):79-84.

Saito N, Yamada Y, Sannohe S, Honda K, Adachi T, Kayaba H, Chihara J. Possible involvement of C-C chemokines in functional augmentation of adhesion molecules in asthmatic patients. *Lung.* 2002;180(5):251-63.

Salminen A, Hyttinen JM, Kaarniranta K. AMP-activated protein kinase inhibits NF- κ B signaling and inflammation: impact on healthspan and lifespan. *J Mol Med (Berl)* 2011; 89(7):667-76.

Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell.* 2012;148(5):852-71.

Sano, M., Leff, A. R., Myou, S. et al. Regulation of interleukin-5-induced α 5 β 2-integrin adhesion of human eosinophils by phosphoinositide 3-kinase. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2005; 33:65. -

Santamaria F, Montella S, Pietrobelli A. Obesity and pulmonary disease: unanswered questions. *Obes Rev.* 2012 [Epub ahead of print].

Scherer PE. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes*; 2006; 55: 1537–1545.

Sclafani A. Diet-induced obesity in rodents. In: Oomura Y, Tarui S, Inoue S, et al, eds. *Progress in obesity research*. London: John Libbey and Co, 1991:441–444.

Seckl, J.R. 11β -hydroxysteroid dehydrogenases: changing glucocorticoid action. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2004; 4, 597–602.

Sehmi R, Wood LJ, Watson R, Foley R, Hamid Q, O'Byrne PM, Denburg JA. Allergen-induced increases in IL-5 receptor α -subunit expression on bone marrow-derived CD34⁺ cells from asthmatic subjects. A novel marker of progenitor cell commitment towards eosinophilic differentiation. *J Clin Invest* 1997; 10:2466-2475.

Shaheen SO, Sterne JA, Montgomery SM, Azima H. Birth weight, body mass index and asthma in young adults. *Thorax.* 1999;54(5):396-402.

Shan J, Carbonara P, Karp N, Tulic M, Hamid Q, Eidelman DH. Localization and distribution of NOS1 in murine airways. *Nitric Oxide.* 2007;17(1):25-32.

Shoelson SE, Lee J, Yuan M. Inflammation and the IKK β /I κ B/NF- κ B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003; 27 Suppl 3:S49-52.

Shore, S. S., Y. M. Rivera-Sanchez, I. N. Schwartzman, R. A. Johnston. Responses to ozone are increased in obese mice. *J Appl Physiol*, 2003; 95: 938-945.

Shore, S. A., R. A. Johnston. Obesity and asthma. *Pharmacology & Therapeutics*, 2006; 110: 83-102.

Shore SA. Obesity and asthma: lessons from animal models. *J Appl Physiol*. 2007;102(2):516-28.

Shore SA, Williams ES, Zhu M. No effect of metformin on the innate airway hyperresponsiveness and increased responses to ozone observed in obese mice. *J Appl Physiol*. 2008;105(4):1127-33.

Shulman, G. I. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 2000;106, 171–176.

Sideleva O, Black K, Dixon AE. Effects of obesity and weight loss on airway physiology and inflammation in asthma. *Pulm Pharmacol Ther.* 2012; 15.

Sikka N, Wegienka G, Havstad S, Genaw J, Carlin AM, Zoratti E. Respiratory medication prescriptions before and after bariatric surgery. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2010;104(4):326-30.

Silverman ES, Breault DT, Vallone J, Subramanian S, Yilmaz AD, Mathew S, Subramaniam V, Tantisira K, Pacak K, Weiss ST, Majzoub JA. Corticotropin-releasing hormone deficiency increases allergen-induced airway inflammation in a mouse model of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 747–754.

Slomko H, Heo HJ, Einstein FH. Minireview: Epigenetics of obesity and diabetes in humans. *Endocrinology*. 2012;153(3):1025-30.

Song KS, Lee WJ, Chung KC, Koo JS, Yang EJ, Choi JY, Yoon JH. Interleukin-1 α and tumor necrosis factor- α induce MUC5AC overexpression through a mechanism involving ERK/p38 mitogen-activated protein kinases-MSK1-CREB activation in human airway epithelial cells. *J Biol Chem* 2003; 278:23243–23250.

Sousa LP, Carmo AF, Rezende BM, Lopes F, Silva DM, Alessandri AL, Bonjardim CA, Rossi AG, Teixeira MM, Pinho V. Cyclic AMP enhances resolution of allergic pleurisy by

promoting inflammatory cell apoptosis via inhibition of PI3K/Akt and NF-kappaB. *Biochem Pharmacol.* 2009; 15;78(4):396-405.

Southam DS, Widmer N, Ellis R, Hirota JA, Inman MD, Sehmi R. Increased eosinophil-lineage committed progenitors in the lung of allergen-challenged mice. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115(1):95-102.

Steinberg GR, Michell BJ, van Denderen BJW, Watt MJ, Carey AL, Fam BC, Andrikopoulos S, Proietto J, Gorgun CZ, Carling D, Hotamisligil GS, Febbraio MA, Kay TW, Kemp BE. Tumor necrosis factor α -induced skeletal muscle insulin resistance involves suppression of AMP-kinase signaling. *Cell Metab* 2006; 4:465–474.

Stewart PM, Krozowski ZS. 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase. *Vitam Horm* 1999;57:249–324.

Stuehr, D. J., and M. A. Marletta. Synthesis of nitrite and nitrate in murine macrophage cell lines. *Cancer Res.* 1987; 47:5590–5594.

Sugiura H, Ichinose M. Nitrate stress in inflammatory lung diseases. *Nitric Oxide.* 2011;1;25(2):138-44.

Sutherland ER, Camargo CA Jr, Busse WW, Meltzer EO, Ortega HG, Yancey SW, Emmett AH, Stempel DA. Comparative effect of body mass index on response to asthma controller therapy. *Allergy Asthma Proc.* 2010;31(1):20-5.

Szeftler SJ, Wenzel S, Brown R, Erzurum SC, Fahy JV, Hamilton RG, Hunt JF, Kita H, Liu AH, Panettieri RA Jr, Schleimer RP, Minnicozzi M. Asthma outcomes: biomarkers. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129.

Takahashi N, Patel HR, Qi Y, Dushay J, Ahima RS. Divergent effects of leptin in mice susceptible or resistant to obesity. *Horm Metab Res.* 2002;34:691–697.

Takeda M, Ito W, Tanabe M, Ueki S, Kato H, Kihara J, Tanigai T, Chiba T, Yamaguchi K, Kayaba H, Imai Y, Okuyama K, Ohno I, Sasaki T, Chihara J. Allergic airway

hyperresponsiveness, inflammation, and remodeling do not develop in phosphoinositide 3-kinase gamma-deficient mice. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123: 805–812.

Takeda M, Ito W, Tanabe M, Ueki S, Kihara J, Kato H, Tanigai T, Kayaba H, Sasaki T, Chihara J. The pathophysiological roles of PI3Ks and therapeutic potential of selective inhibitors in allergic inflammation. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;152 Suppl 1:90-5.

Tantisira KG, Weiss ST. Complex interactions in complex traits: obesity and asthma. *Thorax*. 2001;56 Suppl 2:ii64-73.

Taylor B, Mannino D, Brown C, Crocker D, Twum-Baah N, Holguin F. Body mass index and asthma severity in the National Asthma Survey. *Thorax*. 2008;63(1):14-20.

Thomas PS, Yates DH, Barnes PJ. Tumor necrosis factor-alpha increases airway responsiveness and sputum neutrophilia in normal human subjects. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995,152(1):76-80.

Thomas PS, Heywood G. Effects of inhaled tumor necrosis factor alpha in subjects with mild asthma. *Thorax*, 2002,57(9):774-778.

Thomassen MJ, Raychaudhuri B, Dweik RA, Farver C, Buhrow L, Malur A, Connors MJ, Drazba J, Hammel J, Erzurum SC, Kavuru MS. Nitric oxide regulation of asthmatic airway inflammation with segmental allergen challenge. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;104(6):1174-82.

Thomson CC, Clark S, Camargo CA Jr; MARC Investigators. Body mass index and asthma severity among adults presenting to the emergency department. *Chest*. 2003;124(3):795-802.

Thuesen BH, Husemoen LL, Hersoug LG, Pisinger C, Linneberg A. Insulin resistance as a predictor of incident asthma-like symptoms in adults.. *Clin Exp Allergy*; 2009;39(5):700-7.

Toque HA, da Silva FH, Calixto MC, Lintomen L, Schenka AA, Saad MJ, Zanesco A, Antunes E. High-fat diet associated with obesity induces impairment of mouse corpus cavernosum responses. *BJU Int*. 2011; 107(10):1628-34.

Tsuchiya K, Sakai H, Suzuki N, Iwashima F, Yoshimoto T, Shichiri M, Hirata Y. Chronic blockade of nitric oxide synthesis reduces adiposity and improves insulin resistance in high fat-induced obese mice. *Endocrinology*. 2007;148(10):4548-56

Uhm TG, Kim BS, Chung IY. Eosinophil development, regulation of eosinophil-specific genes, and role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2012;4(2):68-79.

Uller L, Persson CG, Erjefält JS. Resolution of airway disease: removal of inflammatory cells through apoptosis, egression or both? *Trends Pharmacol Sci*. 2006; 27(9):461-6.

Umetsu DT, Dekruyff RH. Immune dysregulation in asthma. *Curr Opin Immunol*. 2006;18(6):727-32.

Varraso R, Siroux V, Maccario J, Pin I, Kauffmann F; Epidemiological Study on the Genetics and Environment of Asthma. Asthma severity is associated with body mass index and early menarche in women. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 15;171(4):334-9

Von Mutius E, Schwartz J, Neas LM, Dockery D, Weiss ST. Relation of body mass index to asthma and atopy in children: the National Health and Nutrition Examination Study III. *Thorax*. 2001;56(11):835-8.

Walmsley SR, Cowburn AS, Sobolewski A, Murray J, Farahi N, Sabroe I, Chilvers ER. Characterization of the survival effect of tumour necrosis factor-alpha in human neutrophils. *Biochem Soc Trans*.; 2004: 32:465-7.

Ward C, Chilvers ER, Lawson MF, Pryde JG, Fujihara S, Farrow SN, Haslett C, Rossi AG. NF-kappaB activation is a critical regulator of human granulocyte apoptosis in vitro. *J Biol Chem*.; 1999: 274:4309-18.

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003; 112(12):1796-808.

- Weiss, S. T. Insight into origins of asthma. *Nat Immunol.* 2005; 6:537-539.
- Weller PF, Rand TH, Goelz SE, Chi-Rosso G, Lobb RR. Human eosinophil adherence to vascular endothelium mediated by binding to vascular cell adhesion molecule 1 and endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Aug 15;88(16):7430-3
- Wenzel SE. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med.* 2012; 4;18(5):716-25.
- Wood LJ, Inman MD, Denburg JA, O'Byrne PM. Allergen challenge increases cell traffic between bone marrow and lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998;18(6):759-67
- Wood LJ, Inman MD, Watson RM, Foley R, Denburg JA, O'Byrne PM. Changes in bone marrow inflammatory cell progenitors after inhaled allergen in asthmatic subjects. *Am J Respir Care Med* 1998; 157:99–105.
- Woods, SC, Randy, J, Seeley, PA, Rushing, DD, Tso, P. A Controlled High-Fat Diet Induces an Obese Syndrome in Rats. *J. Nutr* 2003; 133: 1081–1087.
- World Health Organization. 2004. Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health.
- Xia X, Hu X, Xu H, Wu L, Dai Y, Yang L, Xu Z. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor suppresses inducible nitric oxide synthase expression in bronchiole epithelial cells in asthmatic rats. *Mol Cell Biochem.* 2012; 359(1-2):293-9.
- Xiong Y, Karupiah G, Hogan SP, Foster PS, Ramsay AJ. Inhibition of allergic airway inflammation in mice lacking nitric oxide synthase 2. *J Immunol.* 1999;162(1):445-52.
- Yamamoto M, Tochino Y, Chibana K, Trudeau JB, Holguin F, Wenzel SE. Nitric oxide and related enzymes in asthma: relation to severity, enzyme function and inflammation. *Clin Exp Allergy.* 2012;42(5):760-8.

Yoshifuku K, Matsune S, Ohori J, Sagara Y, Fukuiwa T, Kurono Y. IL-4 and TNF α increased the secretion of eotaxin from cultured fibroblasts of nasal polyps with eosinophil infiltration. *Rhinology*; 2007;45:235-41.

Young B, Lowe JS, Stevens A, Heath JW, Heath JW. Wheater's functional histology: a text and colour atlas. 5th ed. Edinburgh:Elsevier; 2006.

Zang MW, Peng XX, Hu P, Liu JS. Construction of an inducible nitric-oxide synthase gene transferring vector mediated by retrovirus. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*. 1998;19(2):121-7.

Zhang, T.Y., Daynes, R.A., 2007. Macrophages from 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1-deficient mice exhibit an increased sensitivity to lipopolysaccharide stimulation due to TGF- β mediated up-regulation of SHIP1 expression. *J. Immunol*. 179, 6325–6335.

Zhao X, Zmijewski JW, Lorne E, Liu G, Park YJ, Tsuruta Y, Abraham E. Activation of AMPK attenuates neutrophil proinflammatory activity and decreases the severity of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008; 295(3):L497-504.

