

MARINA CIARALLO CALIXTO

**INFLUÊNCIA DA OBESIDADE NO DESENVOLVIMENTO
DA ASMA ALÉRGICA EXPERIMENTAL**

CAMPINAS

2009

MARINA CIARALLO CALIXTO

**INFLUÊNCIA DA OBESIDADE NO DESENVOLVIMENTO
DA ASMA ALÉRGICA EXPERIMENTAL**

*Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de
Mestre em Farmacologia.*

ORIENTADOR: Prof. Dr. Edson Antunes

CAMPINAS

2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

C29i Calixto, Marina Ciarallo
Influência da obesidade no desenvolvimento da asma alérgica experimental / Marina Ciarallo Calixto . Campinas, SP : [s.n.], 2009.

Orientador : Edson Antunes
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Obesidade. 2. Asma. 3. Eosinófilos. 4. Citocinas. 5. Medula óssea. I. Antunes, Edson. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Influence of obesity on allergic asthma development

Keywords:

- Obesity
- Asthma
- Eosinophils
- Cytokine
- Bone marrow

Titulação: Mestrado em Farmacologia

Banca examinadora:

Prof^o. Dr^o. Edson Antunes
Prof^a. Dr^a. Paulina Sannomiya
Prof^o. Dr^o. José Dirceu Ribeiro

Data da defesa: 29-07-2009

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Marina Ciarallo Calixto

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Edson Antunes

Membros:

Professor (a) Doutor (a) Paulina Sannomyia

Professor (a) Doutor (a) Jose Dirceu Ribiro

Professor (a) Doutor (a) Edson Antunes

Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 29/07/2009



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.

Aos meus pais, Mariza e João, 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.

AGRADECIMIENTOS

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.

À Dra. Leticia por sua amizade e companheirismo, você foi fundamental em todas as etapas desta dissertação. Agradeço sua dedicação e paciência ao me ensinar e acompanhar na realização das técnicas utilizadas neste trabalho.

Aos colegas do laboratório de Células e Cascata, Priscila, Lineu, Rafael Prada, Fabíola, Mário, Fernando Bau, Celso, Luis Osório, Fábio, Fernanda Priviero, Fernanda Grossi, Haroldo, Julio e Rodrigo pela amizade e convivência durante esse período.

Especialmente aos colegas e queridos amigos do Laboratório de Inflamação (Edema) Dra. Gláucia, Dra. Ivani, Camila, Dalize, Karina, Francislene, Geovana, Tatiane, Nádia, Luis Gustavo, Adriana e Fábio. Agradeço pelo carinho, paciência, amizade, pela convivência e por tudo que aprendi com vocês. Muito obrigada!

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

Ao Prof. Dr. Mário Saad pela valiosa colaboração para realização deste trabalho ao fornecer a dieta hiperlipídica.

Ao Prof. Dr. André Schenka pela colaboração com as análises histológicas.

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop, por permitir a utilização de seu laboratório e seus aparelhos.

A Prof. Dra. Angelina Zanesco pelo importante apoio no início da padronização do modelo de obesidade.

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

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!

A CAPES pelo apoio financeiro imprescindível para desenvolvimento deste projeto.

E por fim aos animais, seres fundamentais para a realização dos protocolos experimentais e conseqüentemente para os resultados de minha dissertação.



SUMÁRIO



RESUMO	18
ABSTRACT	20
1. INTRODUÇÃO	23
1.1 OBESIDADE	23
1.1.1 Fisiopatologia da obesidade	24
1.1.2 Modelos murinos de obesidade	25
1.2 ASMA	27
1.2.1 Fisiopatologia da Asma	29
1.2.2 Eosinófilos e asma	30
1.2.3 Modelos de asma experimental	32
1.3 OBESIDADE E ASMA	33
2. OBJETIVOS	39
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1 ANIMAIS	41
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS	42
3.3 SENSIBILIZAÇÃO E DESAFIO INTRANASAL COM OVA	43
3.4 COLETA E CONTAGEM DE CÉLULAS NO LAVADO BRONCOALVEOLAR, SANGUE PERIFÉRICO E MEDULA ÓSSEA	44
3.4.1 Sangue periférico	44
3.4.2 Lavado broncoalveolar	44
3.4.3 Medula óssea	45
3.5. DOSAGENS SÉRICAS E/OU NO LBA	45
3.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA	45
3.7 MEDIDA DO PERFIL LIPÍDICO	46
3.8 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE	46
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
4. RESULTADOS	48
4.1 GANHO DE PESO E GORDURA EPIDIDIMAL	48

4.2 PERFIL LIPÍDICO E CURVA DE TOLERÂNCIA À GLICOSE	50
4.3 EFEITOS DA OBESIDADE SOBRE O INFILTRADO EOSINOFÍLICO	52
4.3.1 Lavado broncoalveolar.....	52
4.3.2 Medula óssea	55
4.3.3 sangue periférico	59
4.3.4 Histologia pulmonar.....	61
4.4 NÍVEIS DE TNF-A, IL-6, IL-4, IL-5 E IL-10 E EOTAXINA NO LBA	64
4.5 NÍVEIS DE LEPTINA E ADIPONECTINA NO LBA E SORO.....	68
5. DISCUSSÃO.....	71
6. SUMÁRIO E CONCLUSÕES	82
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS

BH₄	tetraidrobiopterina
BSA	albumina bovina sérica
ECP	proteína catiônica do eosinófilo
EDN	Neurotoxina derivada do eosinófilo
EDTA	ácido etilenodiaminatetracético
EOS	eosinófilos
EPM	erro padrão da média
EPO	peroxidase eosinofílica
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
IL	interleucina
IMC	Índice de massa corporal
INF-γ	interferon-gama
LBA	lavado broncoalveolar
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
Mac-1	<i>macrophage adhesion molecule-1</i>
MBP	proteína básica principal
MCP-1	Proteína quimiotática de monócito -1
MIP-1α	proteína inibitória do macrófago
OPD	dicloridrato de ortofenilenodiamina
OVA	ovalbumina
PBS	tampão salina-fosfato
Rpm	rotações por minuto
Th₂	<i>T helper 2</i>
TNF-α	fator de necrose tumoral-alfa

VCAM-1 *vascular cell adhesion molecule-1*
VLA-4 *very late antigen-4*

LISTA DE MATERIAIS

Susbtância

Procedência

Ácido acético glacial	J.T.Baker (Eldorado, México)
Ácido cítrico	CETUS (Santo Amaro, Brasil)
Ácido fórmico	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Álcool (70% - 100%)	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Al(OH)₃	Sanofi-synthelabo (Rio de Janeiro, Brasil)
Azida sódica	Sigma (EUA)
BSA	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
CaCl₂.2H₂O	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Corante hematológico	Laboclin Ltda (Pinhais, Brasil)
Cristal de violeta	Merck (Darmstadt, Alemanha)
EDTA	J.T.Baker (Phillipsburg, USA)
Formaldeído (37%)	CETUS (Santo Amaro, Brasil)
Fosfato de potássio	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
FORANE[®]	ABBOTT (Rio de Janeiro, Brasil)
HCl	CETUS (Santo Amaro, Brasil)
H/E	Laboclin Ltda (Pinhais, Brasil)
HEPES	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
H₂O₂	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
H₂SO₄	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
KCl	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
KH₂PO₄	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Kit mouse Eotaxina	R&D Systems [™] (Minneapolis, EUA)
Kit mouse IL-4	R&D Systems [™] (Minneapolis, EUA)
Kit mouse IL-5	R&D Systems [™] (Minneapolis, EUA)
Kit mouse IL-6	R&D Systems [™] (Minneapolis, EUA)
Kit mouse IL-10	R&D Systems [™] (Minneapolis, EUA)
Kit mouse TNF-α	R&D Systems [™] (Minneapolis, EUA)

Kit mouse Leptina	R&D Systems™ (Minneapolis, EUA)
Kit mouse Adiponectina	R&D Systems™ (Minneapolis, EUA)
Leitor de microplacas Multiscan	Labsystems (USA)
Metanol	Merck (Darmstadt, Alemanha)
NaCl	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Na₂CO₃	Merck (Darmstadt, Alemanha)
NaHCO₃	Merck (Darmstadt, Alemanha)
NaHPO₄	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Na₂HPO₄	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
NaH₂PO₄.H₂O	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Óleo de imersão p/ microscopia	Merck (Darmstadt, Alemanha)
OPD	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
OVA (grau V)	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Paraformaldeído	Sigma (EUA)
Solução fisiológica 0,9%	EQUIPLEX® (Aparecida de Goiânia, Brasil)
Tris	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Tween 20	Sigma (EUA)
Xilol	Labsynth (Diadema, Brasil)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de sensibilizações e desafios	44
Figura 2. Efeito da dieta hiperlipídica no ganho de peso corporal e no peso da gordura epididimal	50
Figura 3. Efeito da dieta hiperlipídica no teste de tolerância oral à glicose	53
Figura 4. Efeito da obesidade sobre número de EO no lavado broncoalveolar	55
Figura 5. Efeito da obesidade sobre número de eosinófilos medula óssea	59
Figura 6. Efeito da obesidade sobre número de eosinófilos no sangue periférico	61
Figura 7. Efeito da obesidade na frequência de células inflamatórias no parênquima pulmonar	63
Figura 8. Efeito da obesidade na frequência de eosinófilos no parênquima pulmonar	55
Figura 9. Fotomicrografia representativa do parênquima pulmonar	65
Figura 10. Efeito da obesidade nos níveis das citocinas e quimiocinas no lavado broncoalveolar	68
Figura 11. Efeito da obesidade nos níveis das adipocitocinas no soro	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição da dieta experimental	42
Tabela 2. Efeito da dieta hiperlipídica sobre o perfil lipídico	52
Tabela 3. Efeito da dieta hiperlipídica sobre a tolerância à glicose	52
Tabela 4: Efeito da obesidade sobre número de eosinófilos no lavado broncoalveolar de animais não sensibilizados	56
Tabela 5. Efeito da obesidade sobre número de eosinófilos na medula óssea de animais desafiados com OVA.....	58
Tabela 6. Efeito da obesidade sobre a contagem total e diferencial da MO	60
Tabela 8. Efeito da obesidade sobre a contagem total e diferencial no sangue	62

RESUMO

O aumento no número de eosinófilos (EO) nos tecidos, sangue e medula óssea (MO) são considerados eventos importantes na asma, e em geral, números elevados destas células estão correlacionados com a gravidade da doença. Dados epidemiológicos indicam que a obesidade aumenta a prevalência e incidência de asma alérgica e reduz seu controle. Acredita-se que a obesidade e a asma apresentam algumas etiologias comuns, principalmente em suas bases genética. Entretanto, é possível que existam outros mecanismos biológicos através dos quais a obesidade pode ser tanto a responsável pela causa como pelo agravamento da asma. O aumento do tecido adiposo parece elevar a produção de citocinas e quimiocinas, tais como IL-6, TNF- α e eotaxina. Camundongos geneticamente obesos apresentam hiperreatividade inata das vias aeríferas, porém pouca atenção tem sido dada ao recrutamento pulmonar de EO em animais obesos. Uma vez que o acúmulo seletivo de eosinófilos para as vias aeríferas é considerado um evento central na patogênese da asma, este estudo teve como objetivo investigar o influxo de eosinófilos para o pulmão e o papel das citocinas Th1 e Th2 neste processo, em camundongos obesos por indução de dieta. Foram utilizados camundongos C57b16/J que receberam dieta hiperlipídica por dez semanas. Na oitava semana de tratamento, os animais foram sensibilizados com 2 injeções s.c de ovalbumina (OVA) com intervalo de sete dias entre as mesmas. Na semana seguinte, camundongos sensibilizados e não sensibilizados foram desafiados por via intranasal com OVA. Os camundongos foram sacrificados em diferentes tempos (24, 48, 72 e 96 h) após o desafio com OVA, e a contagem de EO no sangue, lavado broncoalveolar (LBA) e MO foi avaliada. Camundongos obesos por indução de dieta hiperlipídica exibiram aumento no ganho

de peso ponderal e no peso do tecido adiposo epididimal, bem como aumento nos níveis de colesterol total comparados com camundongos controle. O desafio intranasal com OVA em camundongos sensibilizados aumentou significativamente a contagem de EO no LBA em todos os tempos avaliados após o desafio com OVA. O número de eosinófilos foi praticamente nulo em camundongos não sensibilizados. Camundongos sensibilizados obesos apresentaram uma migração tardia de EO para o LBA, com pico em 72 h após o desafio. Além disso, a análise morfológica demonstrou que o parênquima pulmonar de camundongos sensibilizados obesos apresentam um marcante aumento no infiltrado de EO, tanto em 48 quanto em 72 h após o desafio, quando comparado com camundongos sensibilizados controles. Na MO foi encontrado um significativo aumento no número de eosinófilos maduros e imaturos nos animais sensibilizados obesos quando comparados com os sensibilizados controles. Os níveis de IL-4, IL-5, TNF- α , IL-6, IL-10 e eotaxina aumentaram significativamente nos camundongos obesos sensibilizados, atingindo o pico 72 h após o desafio com OVA. Nossos dados indicam que foi possível estabelecer um modelo de obesidade em camundongos que claramente aumenta o influxo de EO para o pulmão em resposta ao desafio com OVA. Em camundongos obesos, os EO permaneceram retidos no parênquima pulmonar, exercendo suas funções efetoras favorecendo a patogênese da asma.

ABSTRACT

Increases in eosinophil (EO) numbers in the tissues, blood, and bone marrow (BM) are a hallmark of asthma and, in general, elevated numbers correlate with disease severity. Epidemiological data indicate that obesity increases the prevalence and incidence of allergic asthma. The basis for this relationship is unknown, but might be the result of common etiologies, comorbidities or genetic basis. Increased fat mass, particularly with central obesity, leads to production of cytokines and chemokines, such as IL-6, TNF- α and eotaxin. Studies have shown that genetically obese mice exhibit innate airway hyperresponsiveness, but little attention has been given to the allergic pulmonary EO recruitment in obese animals. Since selective accumulation of eosinophils into the airways has become a central concept of the asthma pathology, this study was designed to investigate the eosinophil influx into lungs and the role of Th2 cytokines in diet-induced obese mice. Four-week-old male C57bl6/J mice received a high fat diet for 10 weeks. On the eighth week, mice were sensitized with two s.c. ovalbumin (OVA) injections at 7 day intervals. One week thereafter, sensitized and non-sensitized animals were intranasally challenged with OVA. The mice were killed at different times (24, 48, 72 and 96 h) after OVA challenge, and EO counts in blood, bronchoalveolar lavage fluid (BAL) and BM were evaluated. High-fat diet mice exhibited a significant increase in body weight and epididymal fat, as well as increased total serum cholesterol levels compared with non-obese groups. Intranasal challenge with OVA in sensitized mice largely increased the EO counts in BAL at 48 h and 72 h post-OVA challenge. Eosinophils were nearly absent in the non-sensitized mice. The sensitized obese mice showed a delayed EO emigration to BAL, peaking at 72 h post-OVA challenge. In addition,

the morphological analysis showed that lung parenchyma of sensitized obese mice presented a markedly higher EO infiltration at both 48 h and 72 h post-OVA challenge when compared with non-obese mice. In BM, a significant increase in counts of both mature and immature EO was also found in sensitized obese compared with sensitized non-obese mice. The levels of IL-4, IL-5, TNF- α , IL-6, IL-10 and eotaxin significantly increased in BAL of sensitized obese mice, peaking at 72 h-post OVA challenge. Our findings indicate that we have established an experimental model in C57bl6/J obese mice that clearly show a potentiation of EO influx in response to OVA challenge. In obese mice, EO are likely to be retained in the lung parenchyma exerting their effector functions in promoting the pathogenesis of airways diseases.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade

A obesidade é atualmente considerada um dos principais problemas de saúde pública. Nas últimas três décadas a prevalência da obesidade alcançou proporções epidêmicas nos Estados Unidos e na Europa (Farrigan & Pang, 2002). Estudos epidemiológicos recentes estimam que mais de 300 milhões de pessoas no mundo são classificadas como obesas. Nos Estados Unidos, cerca de 65% dos adultos estão acima do peso ou estão obesos (Melnikova & Wages, 2006). Este fenômeno não se restringe aos adultos, visto que entre as crianças a incidência global da obesidade vem crescendo de forma alarmante (Schwarzenberg, 2005). Segundo a *Sociedade Brasileira de Cardiologia*, aproximadamente 80% da população brasileira adulta é considerada sedentária, e aproximadamente 32% dos adultos são obesos. Estudos demonstram que a expectativa de vida para os próximos anos deverá diminuir devido ao acelerado aumento da incidência de obesidade (Olshansky et al., 2005).

Dentre as principais causas da obesidade, se destacam o crescente consumo da densidade energética, dos alimentos pobres em nutrientes e ricos em gordura saturada e açúcares, e redução da atividade física (WHO, 2004). Além disso, a predisposição genética parece ser fator determinante na suscetibilidade à obesidade (Oswal & Yeo, 2007). A obesidade pode ser detectada através do índice da massa corporal (IMC) acima ou igual a 30 quilogramas por m², calculado pela razão do peso em quilogramas dividido pelo quadrado da altura em metros (Bjorntorp, 1997).

A obesidade é uma condição complexa, sendo considerada como importante fator de risco para doenças cardiovasculares, dislipidemia, diabetes tipo 2, hipertensão arterial,

asma brônquica, osteoartrite e certos tipos de câncer (Field et al., 2001). Embora seja tema de muitos estudos, infelizmente, ainda hoje a obesidade permanece sem um tratamento satisfatório.

1.1.1 Fisiopatologia da obesidade

Apesar de a fisiopatologia da obesidade não estar completamente elucidada, muito do que se sabe hoje foi possível devido aos avanços da biologia molecular. A existência de camundongos *knockouts* para determinados genes possibilitou a identificação de novas vias de sinalização celular associada à obesidade (Sanchez, 1997). Atualmente são conhecidos muitos mecanismos que podem contribuir para o controle do peso corporal, porém, como exatamente funcionam ainda não está totalmente esclarecido. Estudos recentes têm mostrado que o tecido adiposo não deve mais ser considerado apenas como um órgão de estoque de energia, mas sim que possui funções endócrinas e imunológicas importantes (Guzik et al., 2006).

A obesidade é acompanhada por inflamação sistêmica, caracterizada por aumento plasmático de proteína C reativa e de um desbalanço na produção de citocinas pelos monócitos, linfócitos e outras células imunes (Ouchi et al., 2003). Simultaneamente, ocorre a disfunção endotelial e remodelamento vascular (Matsuzawa, 2006). Trabalhos recentes mostram que os adipócitos e células que infiltram o tecido adiposo liberam várias substâncias, chamadas adipocitocinas. As adipocitocinas, juntamente com citocinas clássicas (TNF- α , IL-6, MCP- 1) secretadas pelos adipócitos e/ou outras células presentes no tecido adiposo, exercem efeitos significativos no sistema imunológico, modificando e perpetuando a inflamação (Guzik et al., 2006; Trujillo & Scherer, 2006; Tilg & Moschen, 2006). Deste

modo, algumas adipocitocinas, como a leptina, a adiponectina, a resistina e a visfatina parecem participar nas vias de sinalização relevantes no controle da obesidade (Guzik et al., 2006).

1.1.2 Modelos murinos de obesidade

A obesidade e doenças associadas, tais como resistência a 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 que examinam a 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 (DH), para produzir modelos de obesidade em roedores. A primeira descrição desta intervenção nutricional data da década de 40. Estudos subseqüentes revelaram que as dietas hiperlipídicas promovem hiperglicemia e resistência a 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).

A alimentação prolongada com dieta hiperlipídica promove um aumento no peso corporal, em animais suscetíveis, na proporção de 10 a 20% acima dos controles alimentados com dieta padrão para roedores. A indução da obesidade torna-se mais efetiva quando a dieta tem início nos animais jovens e perdura por diversas semanas (Peckham, 1962). O ganho de peso durante o período de alimentação com a dieta é gradual, porém, já pode ser observado após duas semanas, tornando-se mais evidente quando o tratamento é realizado com dieta hiperlipídica por mais de quatro semanas (Buettner et al., 2007).

Estudos recentes demonstraram que animais suscetíveis à obesidade são hiperfágicos, e este fenômeno ocorre provavelmente devido a uma resistência central a ação anorexígena da insulina (Clegg, 2005) e redução na expressão hipotalâmica de peptídeos anorexígenos (Tian, 2004). Ratos que se mantêm magros quando submetidos à dieta hiperlipídica comem a mesma quantidade de calorias que os animais controle alimentados com dieta padrão (Farley, 2003). Estes animais resistentes à obesidade induzida por dieta podem tornar-se um importante modelo para o estudo da base genética do ganho de peso.

Ao analisar os dados registrados na literatura fica óbvio que os efeitos da dieta não dependem somente da composição da mesma, mas também do tipo de roedor e da sua linhagem (Wang, 1998; West, 1998). A análise da suscetibilidade à dieta dependente da linhagem e tem sido extensivamente estudada em camundongos. Por isso, sabe-se que camundongos C57BL/6J, AKR/J e DBA/2J são mais suscetíveis a desenvolver obesidade e resistência à insulina (Surwit, 1988; West, 1992; Surwit, 1995; Alexander, 2006).

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 devido ao aumento na

resistência à leptina quando comparado com outras linhagens (Takahashi et al., 2002; Prpic et al., 2003)

1.2 Asma

A asma representa um sério problema de saúde pública mundial, pois, afeta pessoas de todas as idades. Ela pode 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, 2003; Loughheed, 2007). A incidência de asma e doenças alérgicas tem aumentado nos últimos 30 anos. Evidências apontam para diferenças na prevalência de doenças alérgicas entre as áreas urbana e rural na Europa e em países não-industrializados, com alta prevalência de doenças alérgicas nas áreas urbanas. 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 & Douwes, 2006).

A asma é definida como doença inflamatória crônica das vias aeríferas na qual diversos tipos celulares, como linfócitos, neutrófilos, mastócitos e especialmente eosinófilos, desempenham funções importantes (Kay, 2005; 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 aeríferas e por último remodelamento das vias aeríferas. Estas mudanças são expressas clinicamente como chiado,

respiração curta e ofegante, dispnéia, tosse e disposição de muco. Estes episódios estão associados com obstrução variável do fluxo aéreo que é frequentemente reversível espontaneamente ou com tratamento (Masoli et al., 2004; Hanania, 2008).

Evidências patológicas e fisiológicas vêm sugerindo que a inflamação das vias aeríferas e o remodelamento, que caracterizam a asma, não ocorrem somente nas vias aeríferas centrais, mas se estendem ao pulmão distal e ao parênquima pulmonar (Despas, et al., 1972; Macklem et al., 1973; Yanai, et al., 1992; Carroll, et al., 1997; Tulic, 2003; De Magalhães Simões et al., 2005). Em estudo recente, De Magalhães Simões e colaboradores (2005) demonstraram que a inflamação eosinofílica em humanos está presente em toda a extensão do trato respiratório, ou seja, desde a mucosa nasal até ao parênquima pulmonar periférico.

A asma é uma doença episódica, alternando crises agudas com períodos assintomáticos e, embora rara, uma crise aguda pode levar à morte (Kroegel et al., 1993; McFadden, 1994). A asma é decorrente de interações complexas entre fatores externos e genéticos (Vargaftig, 1999; Bochner e Busse, 2005; Pearce e Douwes, 2006; Cooper et al., 2006).

A asma é tradicionalmente dividida em 2 tipos básicos: asma intrínseca e extrínseca (Corrigan & Kay, 1992; Robbins et al., 1994; Ying et al., 1999). A asma intrínseca apresenta história negativa para alergia, testes cutâneos e níveis séricos de IgE normais. Neste caso, os pacientes desenvolvem os sintomas típicos de asma após contato com certos estímulos como infecção viral ou bacteriana (Corrigan e Kay, 1992; Kroegel et al., 1993; McFadden, 1994), ar frio, inalantes irritantes, drogas, estresse emocional e exercícios físicos (Robbins et al., 1994; Busse & Lemanske, 2001).

A asma extrínseca é caracterizada por uma reação de hipersensibilidade do tipo I, induzida por um antígeno extrínseco. Este tipo inclui a asma alérgica (atópica), ocupacional e aspergilose broncopulmonar alérgica. A asma alérgica é a mais comum, e está frequentemente

associada a um histórico familiar de atopia. É desencadeada por antígenos ambientais presentes na poeira, no pólen, nos pêlos de animais, em alguns alimentos, dentre outros (Robbins et al., 1994; Smit & Lukacs, 2006; Holgate, 2008; Verstraelen et al., 2008).

1.2.1 Fisiopatologia da Asma

O desenvolvimento da crise de asma e a relação desta com o fator desencadeante têm sido estudado mais amplamente em indivíduos atópicos. O processo de sensibilização da doença provavelmente representa a primeira etapa para o desenvolvimento do quadro asmático. Os alergen 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 (Kay, 1991a, Holgate, 2003; Afshar, 2008). Em consequência deste processo, nos próximos contatos com agentes desencadeantes, a grande maioria dos pacientes asmáticos desenvolve uma fase imediata e uma fase tardia. A fase imediata se instala em poucos minutos e é caracteriza por obstrução das vias aeríferas e a fase tardia ocorre a partir de cerca de 3 horas de contato com o alergen, podendo durar por vários dias. Nesta fase há um forte processo inflamatório decorrente de uma intensa migração celular para as vias aeríferas (Kay 1991a; O'Byrne, 1998; Holgate, 2008).

Um aspecto fundamental da asma associado à sensibilização alérgica é a habilidade das vias aeríferas em reconhecer os alergen ambientais e gerar uma resposta do tipo Th2. Uma vez sensibilizados, os linfócitos T não somente migram das vias aeríferas 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) (Kay, 2006; Afshar, 2008; Holgate, 2008; Nouri-Aria & Durham, 2008).

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 (Akbari et al., 2006; Umetsu & Dekruyff, 2006, Hogan, 2008; Holgate, 2008; Nouri-Aria & Durham, 2008).

1.2.2 Eosinófilos e asma

A importância dos eosinófilos na asma foi enfatizada pelos achados que correlacionavam o grau de eosinofilia no sangue e no LBA com o grau de hiperreatividade brônquica e gravidade da doença (Gonzalo et al., 1998; Sato et al., 1999; Trivedi & Lloyd, 2007, Holgate, 2008). Entretanto, admite-se atualmente que o papel dos eosinófilos no desencadeamento da hiperreatividade brônquica é controverso, já que se demonstrou que a hiperreatividade pode ocorrer na ausência de inflamação eosinofílica (Giembycz, 2001; Smit e Lukacs, 2006; Jacobsen et al., 2007).

Os achados obtidos de pacientes asmáticos e de modelos de asma experimental mostram que os eosinófilos têm um papel importante nesta patologia; sendo assim, seu acúmulo seletivo e ativação na mucosa brônquica são considerados eventos centrais na patogênese da asma (Weller, 1991; Shahabuddin et al., 2000; Holgate, 2008).

Os eosinófilos foram primeiramente descritos por Paul Ehrlich em 1879 (Trivedi & Lloyd, 2007). São células com núcleo bilobado, destituído de nucléolo, que possuem corpúsculos lipídicos, principal depósito de ácido araquidônico, e grânulos citoplasmáticos.

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

Em resposta a diversos estímulos, os eosinófilos são recrutados da circulação para o local inflamado, onde modulam a resposta inflamatória. Eosinófilos ativados liberam substâncias citotóxicas, como espécies reativas de oxigênio 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 (Giembycz e Lindsay, 1999; Foster, 1999; Powell et al., 2001; Rothenberg e Hogan, 2006; Ten Broeke et al., 2006; Trivedi e Lloyd, 2007, Hogan, et al., 2008).

Dentre as citocinas citadas acima, a IL-5 é a mais específica para a linhagem eosinofílica sendo responsável pelo crescimento, diferenciação, ativação e sobrevivência desses leucócitos (Sanderson, 1992; Collins et al., 1995; Rothenberg et al., 2006; Barnes, 2008). A eotaxina exerce atração específica sobre os eosinófilos, atuando predominantemente em receptores CCR-3 (Murphy, 1994; Daugherty et al., 1996; Ponath et al., 1996; Broide et al., 1999; Zimmermann et al., 2003; Barnes, 2008). O mecanismo que promove o recrutamento de eosinófilos para o sítio inflamatório ainda não está completamente elucidado; porém, evidências apontam para o envolvimento de algumas citocinas como IL-3, GM-CSF e IL-5, e quimiocinas, principalmente a eotaxina (Giembycz e Lindsay, 1999; Shahabuddin et al., 2000; Murray et al., 2006; Pease e Williams, 2006; Rosenberg et al., 2007). Supõe-se que a IL-5 e a eotaxina ajam cooperativamente neste evento onde a IL-5 atua ativando e aumentando o número de eosinófilos em resposta à eotaxina (Mould et al., 1997, Palframan et al., 1998; Rothenberg et al., 2006; Hogan et al., 2008).

1.2.3 Modelos de asma experimental

Os principais eventos da asma aguda em humanos são inflamação das vias aeríferas, hipersecreção de muco e broncoconstrição. Com base nestes eventos, nas últimas décadas, muitos estudos têm evoluído na tentativa de desenvolver um modelo animal que mimetize uma resposta inflamatória das vias aeríferas em animais semelhante à verificada em humanos, com objetivo de estudar aspectos específicos da doença (Schröder e Maurer, 2007). Apesar de utilizarmos o termo "modelo de asma", ainda não existe um modelo experimental ideal que mimetize a asma humana (Vargaftig, 1999; Szelenyi, 2000; Smit & Lukacs, 2006). Todavia, mesmo com todas as limitações, ainda se aceita que o método mais abrangente para a compreensão da patologia da asma seja o modelo animal (Howat et al., 2002; Barnes, 2006; Zosky & Sly, 2007). O modelo de asma em animais tem sido utilizado há mais de um século (Karol, 1994). Várias espécies animais têm sido utilizadas incluindo a cobaia, o cão, o rato, o camundongo, o coelho, a ovelha e o macaco (Renz et al., 1992; Woolley et al., 1994; Gaspar Elsas et al., 1997; Petrolani et al., 1988; O'Byrne et al., 1999; Lintomen et al., 2002; Arts & Kuper, 2006; Ward & Selgrade, 2006; Zosky & Sly, 2007).

Embora os modelos em ratos e cobaias sejam relevantes, o modelo murino é mais usado devido à disponibilidade de ferramentas imunológicas, como linhagens de camundongos isogênicos, *knockouts* e transgênicos; disponibilidade de anticorpos e proteínas recombinantes (Dietrich et al., 1996; Elias et al., 2003). Dentre as linhagens de camundongos a mais utilizada para estes modelos é a do camundongo Balb/c, o qual exhibe uma tendência determinada geneticamente para desenvolver resposta imune do tipo Th2. Contudo, a reação inflamatória semelhante à asma também pode ser induzida em camundongos da linhagem C57BL/6, mesmo tendo menor perfil Th2 (Schröder & Maurer, 2007).

Diversos protocolos de indução da asma têm sido publicados utilizando variados tipos de antígenos, vias de aplicação, doses e tempos de avaliação. Os antígenos aplicados em modelos animais incluem alguns dos quais estão frequentemente associados com a asma em humanos, tais como pó ou poeira, alimentos e fungos, ao passo que muitos utilizam a ovalbumina (OVA) mesmo com pouca relevância clínica (Yssel et al., 1992; Sur et al., 1996; Lewkowich et al., 2005). O procedimento frequentemente utilizado em modelos animais é a indução de um estado alérgico, frente ao uso de antígeno conhecido, como a OVA, onde normalmente se empregam 2 injeções deste alérgeno associado ao alúmen (hidróxido de alumínio). O alúmen é o adjuvante do sistema, que é amplamente usado para a indução da síntese de anticorpos, particularmente da classe IgE. A administração de antígenos protéicos, associado ao alúmen, resulta em imunidade mediada por células e formação de anticorpos, dependente de células T (no caso, células Th₂) (Brewer et al., 1999; Kips et al., 2003).

1.3 Obesidade e Asma

A asma e a obesidade são importantes problemas de saúde pública (Flegal et al., 2002; Schiller et al., 2004). 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 desta relação entre a obesidade e a 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 mo-

delos de estudo, confirmaram uma associação positiva entre o índice de massa corporal (IMC) e a asma (Ford, 2005).

Dados epidemiológicos indicam o aumento da incidência de asma em adultos e crianças com sobrepeso e obesos (Luder et al., 1998; Huang et al., 1999). 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 a obesidade antecede a asma, e 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 sua gravidade (Tantisira et al., 2003; Varraso et al., 2005; Saint-Pierre et al., 2006; Lavoie et al., 2006; Chanez et al., 2007; Taylor et al., 2008).

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 pode ser tanto a responsável pela causa ou pelo agravamento da asma (Luder et al., 1998). As observações que a perda de peso, seja cirúrgica ou por indução de dieta, proporciona melhora das diversas conseqüências da asma, incluindo prevalência, gravidade, uso de medicamentos e hospitalizações, reforçam a relação entre a obesidade e a asma. Dados obtidos de modelos animais também sustentam esta relação entre obesidade e asma (Beuther et al., 2006; Shore & Johnston, 2006; Shore, 2007a; Shore, 2007b; Weiss, 2005).

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 aeríferas 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 o receptor de leptina (camundongos db/db), ou 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 aeríferas, assim como na resposta a agentes desencadeadores de asma, como o ozônio (poluente do ar) e alérgenos. Camundongos obesos exibem hiperreatividade inata das vias aeríferas, uma característica importante na asma. A hiperreatividade é observada, independente do agonista, em várias formas de camundongos geneticamente obesos, tal como em camundongos obesos por indução de dieta hiperlipídica. A magnitude desta hiperreatividade parece variar de acordo com a magnitude da obesidade (Shore et al., 2003; Lu et al., 2006; Shore & Johnston, 2006; Johnston et al., 2007; Shore, 2007).

Embora o tamanho do pulmão esteja afetado em vários destes camundongos geneticamente obesos (ob/ob e db/db) (Shore, 2007), o mesmo não ocorre nos camundongos Cpefat (Johnston et al., 2006) ou camundongos com obesidade por indução de dieta (Johnston et al., 2008), sugerindo que a obesidade independente do tamanho do pulmão, pode contribuir para a hiperreatividade das vias aeríferas.

Camundongos obesos e sensibilizados com OVA apresentam aumento da hiperreatividade quando comparados com camundongos magros (Johnston et al., 2007). Exibem também aumento na resposta pulmonar ao ozônio (O₃), incluindo aumento da resistência pulmonar, hiperreatividade das vias aeríferas e inflamação (Shore, 2007). Estas observações já foram observadas em humanos obesos, os quais também respondem ao O₃ com

significativo aumento da reatividade e diminuição da função pulmonar comparados com indivíduos magros (Alexeeff et al., 2007; Bennett et al., 2007).

Grande parte da literatura que estuda a relação entre obesidade, inflamação das vias aéreas e asma tem investigado o papel da leptina. O hormônio da saciedade, a leptina, é considerado como um fator pró-inflamatório (Fantuzzi, 2000; Fantuzzi, 2005, Farooqi & O'Rahill, 2009). Como os níveis séricos de leptina estão marcadamente aumentados na obesidade, e a asma é uma doença inflamatória, tem sido proposto que os efeitos pró-inflamatórios da leptina possam contribuir para a relação entre obesidade e asma.

Em um destes estudos, conduzidos com camundongos C57BL/6J, mostrou-se que a administração de leptina exógena aumenta a liberação de citocinas pró-inflamatórias induzida pelo ozônio no pulmão (Shore et al., 2003). Observou-se também que a hiperreatividade das vias aéreas induzida por ozônio parece estar ligada a diversos aspectos da inflamação induzida pelo mesmo; por esta razão é possível que a hiperreatividade aumentada das vias aéreas observada em camundongos *ob/ob*, após a exposição ao ozônio, seja resultado de uma resposta inflamatória aumentada (Shore et al., 2003).

Em camundongos BALB/cJ sensibilizados/desafiados com ovalbumina (OVA), a infusão subcutânea de leptina aumentou a hiperreatividade das vias aéreas e os níveis de IgE sérica após o desafio, resposta não observada em animais desafiados com salina (Shore et al, 2005). De fato, a leptina está significativamente aumentada em obesos e, mesmo após o controle do IMC, os níveis séricos de leptina permanecem aumentados em crianças asmáticas, quando comparados com não asmáticas (Guler, 2004).

Mudanças observadas na função de células T de camundongos obesos podem estar parcialmente envolvidas na fisiopatologia da asma na obesidade humana (Mito et al., 2002). Este estudo mostrou que níveis endógenos de leptina estão aumentados em camun-

camundongos com obesidade induzida por dieta, levando ao aumento da resposta inflamatória das vias aéreas. Estes camundongos foram sensibilizados/desafiados com OVA e apresentaram a resposta de células T OVA-específica aumentada.

Está atualmente bem estabelecido que a adiponectina encontra-se diminuída na obesidade. A adiponectina sérica também está reduzida durante a inflamação alérgica pulmonar e hiperreatividade brônquica em camundongos, e a administração exógena da mesma inibe a resposta alérgica das vias aéreas (Shore et al, 2006). Visto que a adiponectina possui propriedades antinflamatórias (Ouchi et al, 2003), é possível que a redução da mesma na obesidade possa contribuir para o aumento dos casos de asma observados em obesos.

Estudos realizados em camundongos e humanos forneceram evidências para um efeito da obesidade sobre a expressão da eotaxina (Beuther et al., 2006). A eotaxina é um potente agente quimiotático para EOS e participa do recrutamento deste tipo celular para as vias aéreas na asma. Recentemente, demonstrou-se que camundongos obesos por dieta têm os níveis de mRNA para eotaxina no tecido adiposo e níveis séricos de eotaxina significativamente aumentados (Vasudevan et al., 2006). Uma relação similar entre obesidade e concentração de eotaxina plasmática foi também mostrada em humanos, onde a concentração de eotaxina mostrou-se significativamente aumentada quando comparada com indivíduos não obesos. A perda de peso nos indivíduos obesos, por restrição calórica ou por cirurgia bariátrica, se mostrou associada à redução da concentração plasmática de eotaxina (Vasudevan et al., 2006).

As informações aqui relatadas mostram claramente a existência de uma associação entre obesidade e asma, e que, independentemente da modalidade de indução de obesidade, camundongos obesos servem como modelo para investigação do aumento do risco de asma observado em obesos.



2. OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito da obesidade induzida por dieta hiperlipídica sobre a resposta inflamatória das vias aeríferas de camundongos previamente sensibilizados e desafiados com ovalbumina (OVA)

2.1 Objetivos específicos

- i) Avaliar o número de leucócitos totais (com ênfase para os eosinófilos) no lavado broncoalveolar (LBA), na medula óssea (células maduras e imaturas) e sangue periférico de camundongos obesos e asmáticos;
- ii) Avaliar os níveis séricos e/ou no LBA de adipocitocinas (leptina, adiponectina) e de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-4, IL-5) e de IL-10 e quimiocinas (eotaxina) em camundongos obesos e asmáticos;
- iii) Avaliar o efeito da obesidade na morfologia do tecido pulmonar.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos com 4 semanas de idade da linhagem C57BL6/J. A obesidade foi induzida através da substituição da dieta padrão por dieta AIN-93G, (Reeves et al., 1993), modificada para hiperlipídica, a qual consiste em 35 % do peso de lipídeos (Tabela 1), 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*. Os animais foram mantidos em estantes apropriadas, com temperatura controlada em torno de $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, além da regulação de fotoperíodo em 12 horas claro/escuro. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) – IB – UNICAMP sob nº 1496-1.

Tabela 1. Composição da dieta experimental

<i>Ingredientes</i>	<i>AIN-93</i>	<i>AIN-93 modificada</i>
	g/100g	g/100g
Amido de milho	39,8	11,8
Caseína	20,0	20,0
Dextrina	13,2	13,2
Sacarose	10,0	10,0
Óleo de soja	7,0	4,0
Banha de porco	0,0	31,0
Celulose microfina (fibra)	5,0	5,0
Mix de Minerais	3,5	3,5
Mis de Vitaminas	1,0	1,0
L-cistina	0,30	0,30
Bitartarato de co- lina	0,25	0,25
TOTAL	100,0	100,0

Reeves, 1993. American Institution of Nutrition-93 G

3.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais:

- 1) **NSC**– não sensibilizados controles (alimentados com dieta padrão e não sensibilizados)
- 2) **NSO** – não sensibilizados obesos (alimentados com dieta hiperlipídica e não sensibilizados)
- 3) **SC** – sensibilizados controles (alimentados com dieta padrão e asmáticos)
- 4) **SO** - sensibilizados obesos (alimentados com dieta hiperlipídica e asmáticos)

3.3 Sensibilização e desafio intranasal com OVA

As sensibilizações ocorreram na 8^a e 9^a semana de tratamento com a dieta hiperlipídica. Cada camundongo recebeu injeção subcutânea no dorso de OVA (100 µg de OVA, 1,6 mg de Al(OH)₃ em 0,4 ml de soro fisiológico) no dia zero e reforço no dia 7. No dia 14, os animais foram desafiados por via intranasal com OVA (10 µg de OVA em 50 µl de soro fisiológico) duas vezes ao dia, com intervalo de 6 horas entre os desafios. Os desafios se repetiram nos dias seguintes conforme o tempo pré-estabelecido para a realização dos experimentos, que ocorreram em intervalos de 24 a 96 h após o primeiro desafio intranasal. Os grupos não sensibilizados controles não receberam sensibilização com OVA; porém estes e todos demais grupos experimentais receberam desafio com OVA intranasal. Os protocolos de sensibilização e desafio foram realizados de acordo com Lintomen e colaboradores (2009).

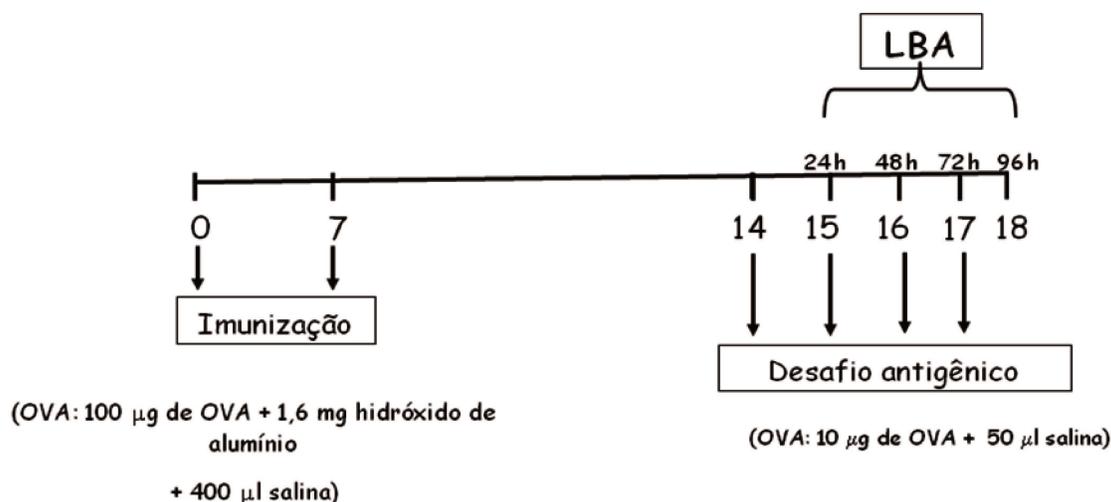


Figura 1. Esquema do protocolo de sensibilizações e desafios aplicados para camundongos obesos e controles.

3.4 Coleta e contagem de células no lavado broncoalveolar, sangue periférico e medula óssea

3.4.1 Sangue periférico

Os animais foram anestesiados com Isoflurano e o sangue foi coletado da veia cava abdominal com seringa de 1 ml na ausência de anticoagulante. Imediatamente após a coleta, um volume mínimo do sangue (10 µl) foi destinado à contagem total de células em câmara de Neubauer (com líquido de Turk) e à confecção de lâmina (esfregaço) para posterior contagem diferencial (coradas com corante hematológico). A quantidade de sangue restante foi centrifugada (1000 x g por 20 minutos); o soro foi coletado e estocado a -80°C.

3.4.2 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 x 3/4"). 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, recuperava-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 ressuspenso em 200 µl de PBS e utilizado para contagem total de células em câmara de Neubauer, para confecção de lâmina em citocentrífuga e para posterior contagem diferencial dos leucócitos.

3.4.3 Medula óssea

Os dois fêmures de cada animal foram retirados com o auxílio de material cirúrgico (pinças e tesouras) e transferidos para uma placa de Petri pequena contendo 5 ml de PBS. O canal medular de cada osso foi lavado com o PBS contido na placa, utilizando-se uma seringa de 5 ml e uma agulha (25x0,70 mm ou 22G1). Após esse procedimento, a suspensão celular foi transferida para um tubo cônico de 15 ml e homogeneizado com uma 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

3.5. Dosagens séricas e/ou no LBA

Leptina, adiponectina, TNF- α , IL-6, IL-4, IL-5, IL-10 e eotaxina foram quantificadas usando-se kits comerciais de ELISA disponíveis no mercado (Mouse DuoSet ELISA Development System), seguindo instruções do fabricante. (R & D, Minneapolis, E.U.A.).

3.6 Análise histológica

Os pulmões foram retirados, fixados em uma solução de formalina (10% em PBS) por 24 horas, e conservados em etanol (70%); e posteriormente embebidos em xilol até a inclusão em parafina. Cortes histológicos de 5 μ m foram corados com hematoxilina/eosina

(corante H/E) para contagem dos eosinófilos no tecido. A quantidade de eosinófilos no parênquima pulmonar foi determinada ao microscópio, em uma área de $28 \mu\text{m}^2$ circunjacente aos brônquios. Os valores representam a média de 10 brônquios examinados de forma aleatória sob um aumento de 250 x.

3.7 Medida do perfil lipídico

As dosagens de colesterol total, LDL, HDL e triglicerídeos foram realizada ao final da décima semana de tratamento com dieta hiperlipídica através de kits comerciais (Katal Biotecnológica Indústria e Comércio Ltda, Belo Horizonte - Brasil).

3.8 Teste de tolerância à glicose

Após 6 h de jejum os animais receberam solução concentrada de glicose (2 g/Kg) por gavagem. A concentração de glicose foi medida no sangue coletado da cauda dos animais e a glicemia foi determinada através de um glicosímetro (Accu-Chek Performa, Roche Diagnostics, E.U.A) em diferentes tempos após a administração da solução de glicose (0,15, 30, 60 e 120 minutos).

3.9 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão das médias (EPM) de n experimentos. 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 Ganho de peso e gordura epididimal

A figura 2 mostra a média do ganho ponderal de peso dos animais que se tornaram obesos através da alimentação com dieta hiperlipídica durante 10 semanas e seus respectivos controles alimentados com dieta padrão para roedores.

Os animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentam um aumento de 37,5% no peso corporal e de 400% no peso do tecido epididimal, confirmando aumento de adiposidade visceral.

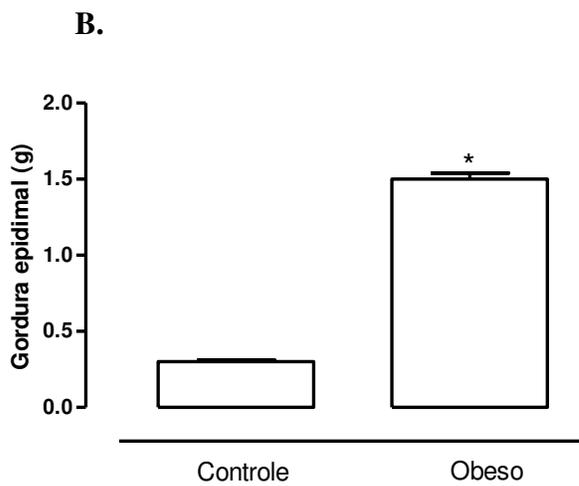
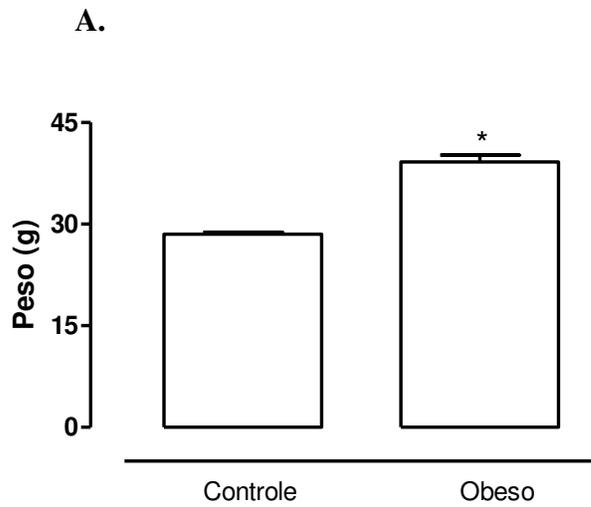


Figura 2: Efeito da dieta hiperlipídica no peso (g) corporal (A) e no peso (g) da gordura epididimal (B) dos camundongos após 10 semanas de tratamento. Os valores representam as médias \pm E.P.M de 20 animais. * $p < 0.05$ comparado com o grupo controle.

4.2 Perfil lipídico e Curva de tolerância à glicose

A tabela 2 apresenta as concentrações plasmáticas de colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e triglicérides (TG) circulantes dos dois grupos após 10 semanas de alimentação com dieta hiperlipídica e dieta padrão para roedores. Os animais obesos por indução de dieta apresentaram aumento ($p < 0,001$) de 49,7 % nas concentrações plasmáticas de colesterol total e de 115 % de LDL quando comparados com os animais alimentados com dieta padrão, ao passo que não foram encontradas diferenças significativas nos valores de HDL e de TG entre os grupos obeso e controle.

Para determinar se os animais obesos por indução de dieta hiperlipídica se tornaram intolerantes à glicose, realizou-se o teste de tolerância oral à glicose ao final da décima semana de tratamento com a dieta. Constatamos que animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentam queda na captação de glicose induzida pela insulina quando comparados com animais controle alimentados com dieta padrão. Este prejuízo observado na captação de glicose nos animais obesos ocorre de forma significativa ($p < 0,05$) nos tempos de 60 e 120 min após a ingestão da solução concentrada de glicose (Tabela 3; Figura 3).

No prazo estudado em nosso modelo não foi encontrada alterações significativas do papel da intervenção dietética na glicemia de jejum ($n = 20$ para grupo obeso e $n = 15$ para grupo controle).

Tabela 2. Efeito da dieta hiperlipídica sobre o perfil lipídico de camundongos C57BL6/J após 10 semanas de tratamento.

	<i>Controle</i>	<i>Obeso</i>
<i>Colesterol total (mg/ml)</i>	98,3 ± 4,02	147,2 ± 5,5 *
<i>LDL (mg/ml)</i>	32,1 ± 4,07	69,3 ± 8,3 *
<i>HDL (mg/ml)</i>	54,8 ± 0,7	59,6 ± 3,5
<i>Triglicerídeos (mg/ml)</i>	76,9 ± 1,5	71,9 ± 5,2

Os dados foram obtidos de animais controles e obesos. Cada coluna representa a média ± E.P.M para n=5. **p* < 0.05 comparado com o grupo controle.

Tabela 3. Efeito da dieta hiperlipídica sobre a tolerância à glicose de camundongos C57BL6/J após de 10 semanas de tratamento.

<i>Grupo</i>	<i>Inicial (mg/dl)</i>	<i>15 min (mg/dl)</i>	<i>30 min (mg/dl)</i>	<i>60 min (mg/dl)</i>	<i>120 min (mg/dl)</i>	<i>Área sob a curva</i>
Controle	147,4 ± 8,3	306 ± 16,5	249,8 ± 14,5	178 ± 5,1	134,6 ± 6,8	23364 ± 1220
Obeso	174,6 ± 13	339,4 ± 24,5	288,7 ± 32,2	243,3 ± 21,2	182,4 ± 12,5	29549 ± 1470 *

Os dados foram obtidos de animais controles e obesos. Cada coluna representa a média ± E.P.M para n=5. **p* < 0.05 quando comparados com grupo controle.

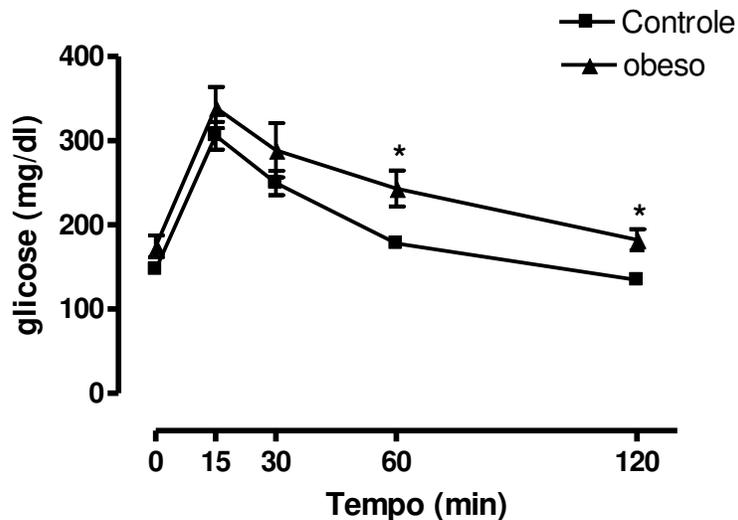


Figura 3: Teste de tolerância oral à glicose em camundongos após 10 semanas de tratamento com dieta hiperlipídica. Os valores representam as médias \pm E.P.M de 7 animais. * $p < 0.05$ quando comparados com animais controles.

4.3 Efeitos da obesidade sobre o infiltrado eosinofílico

4.3.1 Lavado broncoalveolar

A inflamação pulmonar foi avaliada através da quantificação de células totais (Tabela 4) e diferenciais (Figura 4) no lavado broncoalveolar (LBA). As contagens de eosinófilos no LBA foram realizadas em diferentes tempos: 24, 48, 72 e 96 h, após o desafio com OVA, com o objetivo de verificar se a cinética de migração de eosinófilos para as vias aéreas apresentaria comportamento diferenciado entre animais obesos e controles (magros). A figura 4 mostra que as contagens apresentaram-se significativamente elevadas ($p < 0,001$) nos camundongos sensibilizados controles (SC) e sensibilizados obesos (SO) comparadas àquelas dos animais não sensibilizados controles (NSC) e não sensibilizados obesos (NSO). O número de eosinófilos foi praticamente nulo nos animais não sensibilizados ($n=7$).

Camundongos controles (magros) sensibilizados e desafiados com OVA apresentaram aumento ($p < 0.05$) no número de eosinófilos no LBA 24 h após o desafio comparado com camundongos obesos, atingindo em 48 h o aumento máximo de eosinófilos ($p < 0,001$) (Figura 4). Em camundongos obesos sensibilizados e desafiados com OVA, a migração de eosinófilos para a luz das vias aeríferas ocorre tardiamente, sendo o aumento máximo ($p < 0.05$) observado somente 72 h após o desafio com OVA (Figura 4). Não foi verificada diferença significativa nas contagens de eosinófilos entre os camundongos obesos e controles no tempo de 96 h após o desafio com OVA (Figura 4).

A obesidade induzida por dieta não afetou os números de leucócitos totais, de neutrófilos e de mononucleares no LBA em nenhum dos tempos avaliados após o desafio com OVA nos animais não sensibilizados. Ao contrário, os animais sensibilizados controles (magros) apresentaram aumento significativo ($p < 0.05$) no número de neutrófilos em 24, 48 e 72 h após o desafio com OVA e de leucócitos totais ($p < 0,05$) em 24 e 48 h após o desafio, quando comparado com camundongos sensibilizados obesos (Tabela 4).

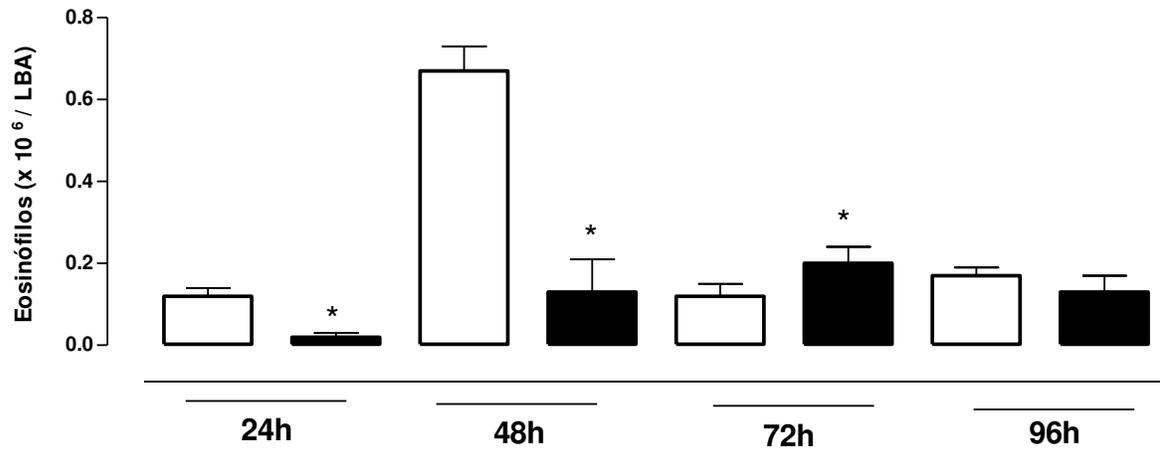


Figura 4: Efeito da obesidade sobre número de eosinófilos no lavado broncoalveolar (LBA) em diferentes tempos (24, 48, 72 e 96 h) após o desafio intranasal com ovalbumina (OVA). A barra branca representa os animais sensibilizados controles/sadios e as barras pretas representam os animais sensibilizados obesos. Cada coluna representa a média \pm E.P.M para n=7. * $p < 0.05$ comparado sensibilizado obeso (SO) com sensibilizado controle (SC).

Tabela 4. Efeito da obesidade sobre a contagem total e diferencial do lavado broncoalveolar de animais sensibilizados e não sensibilizados e desafiados com OVA em diferentes tempos.

<i>Tempo após o desafio</i>	<i>Grupo</i>	<i>Leucócitos totais (x 10⁶/LBA)</i>	<i>Neutrófilos (x 10⁶/LBA)</i>	<i>Mononucleares (x 10⁶/LBA)</i>
24 h	NSC	1,30 ± 0,19	0,15 ± 0,07	1,15 ± 0,21
	NSO	0,64 ± 0,09#	0,02 ± 0,01#	0,62 ± 0,09#
	SC	0,69 ± 0,14	0,16 ± 0,03	0,40 ± 0,04
	SO	0,28 ± 0,02*	0,03 ± 0,01*	0,24 ± 0,02
48 h	NSC	0,78 ± 0,11	0,02 ± 0,01	0,76 ± 0,11
	NSO	0,68 ± 0,07	0,02 ± 0,01	0,65 ± 0,07
	SC	1,87 ± 0,08	0,73 ± 0,13	0,49 ± 0,08
	SO	1,08 ± 0,11*	0,22 ± 0,06*	0,73 ± 0,08
72 h	NSC	0,92 ± 0,08	0,03 ± 0,01	0,89 ± 0,09
	NSO	0,7 ± 0,06	0,06 ± 0,01	0,64 ± 0,06
	SC	1,36 ± 0,28	0,69 ± 0,19	0,54 ± 0,19
	SO	1,00 ± 0,06	0,25 ± 0,05*	0,55 ± 0,06
96 h	NSC	0,92 ± 0,08	0,04 ± 0,01	0,88 ± 0,09
	NSO	0,75 ± 0,08	0,08 ± 0,01	0,67 ± 0,08
	SC	1,49 ± 0,15	0,73 ± 0,2	0,51 ± 0,05
	SO	1,10 ± 0,2	0,43 ± 0,18	0,53 ± 0,06

Os dados foram obtidos de animais sensibilizados controles (SC), sensibilizados obesos (SO), não sensibilizados controles (NSC) e não sensibilizados obesos (NSO). Cada coluna representa a média ± E.P.M para n=7. * $p < 0.05$ comparado sensibilizados obesos (SO) com sensibilizados controles (SC); # $p < 0,05$ comparado não sensibilizados controles (NSC) com não sensibilizados obesos (NSO).

4.3.2 Medula óssea

As contagens de eosinófilos na medula óssea mostraram-se significativamente maiores ($P < 0.05$) em todos os tempos avaliados após o desafio com OVA, quando comparados animais sensibilizados com animais não-sensibilizados (Tabela 5).

A obesidade modificou a contagem de eosinófilos na medula óssea após 48 h do desafio com OVA, aumentando significativamente o número de eosinófilos maduros e imaturos, em cerca de 517% e 226% respectivamente, comparando-se aos animais controles (magros) e desafiados com OVA (Figura 5A-B). O número de eosinófilos na medula óssea dos animais não sensibilizados não sofreu alteração significativa em nenhum dos tempos (Tabela 5).

A obesidade não interferiu no número de leucócitos totais, de neutrófilos maduros e imaturos e de mononucleares na medula óssea em todos os tempos após o desafio com OVA (Tabela 6).

Tabela 5. Efeito da obesidade sobre número de eosinófilos na medula óssea de animais desafiados com OVA em diferentes tempos.

EOSINÓFILOS MADUROS				
<i>Grupo</i>	<i>24h</i> (x 10 ⁶)	<i>48h</i> (x 10 ⁶)	<i>72h</i> (x 10 ⁶)	<i>96h</i> (x 10 ⁶)
<i>NSC</i>	0,05 ± 0,02	0,1 ± 0,04	0,12 ± 0,04	0,11 ± 0,04
<i>NSO</i>	0,06 ± 0,03	0,15 ± 0,08	0,14 ± 0,06	0,1 ± 0,06
<i>SC</i>	0,41 ± 0,05	0,28 ± 0,07	0,32 ± 0,07	0,35 ± 0,05
<i>SO</i>	0,17 ± 0,03	1,73 ± 0,32	0,61 ± 0,08	0,41 ± 0,05
EOSINÓFILOS IMATUROS				
<i>Grupo</i>	<i>24h</i> (x 10 ⁶)	<i>48h</i> (x 10 ⁶)	<i>72h</i> (x 10 ⁶)	<i>96h</i> (x 10 ⁶)
<i>NSC</i>	0,03 ± 0,02	0,06 ± 0,04	0,09 ± 0,05	0,11 ± 0,04
<i>NSO</i>	0,02 ± 0,02	0,12 ± 0,08	0,1 ± 0,05	0,07 ± 0,03
<i>SC</i>	0,29 ± 0,07	0,15 ± 0,05	0,22 ± 0,08	0,25 ± 0,1
<i>SO</i>	0,15 ± 0,05	0,49 ± 0,07	0,24 ± 0,04	0,29 ± 0,05

Os dados foram obtidos de animais não sensibilizados controles (NSC), não sensibilizados obesos (NSO), sensibilizados controles (SC) e sensibilizados obesos (SO). Cada coluna representa a média ± E.P.M para n=7

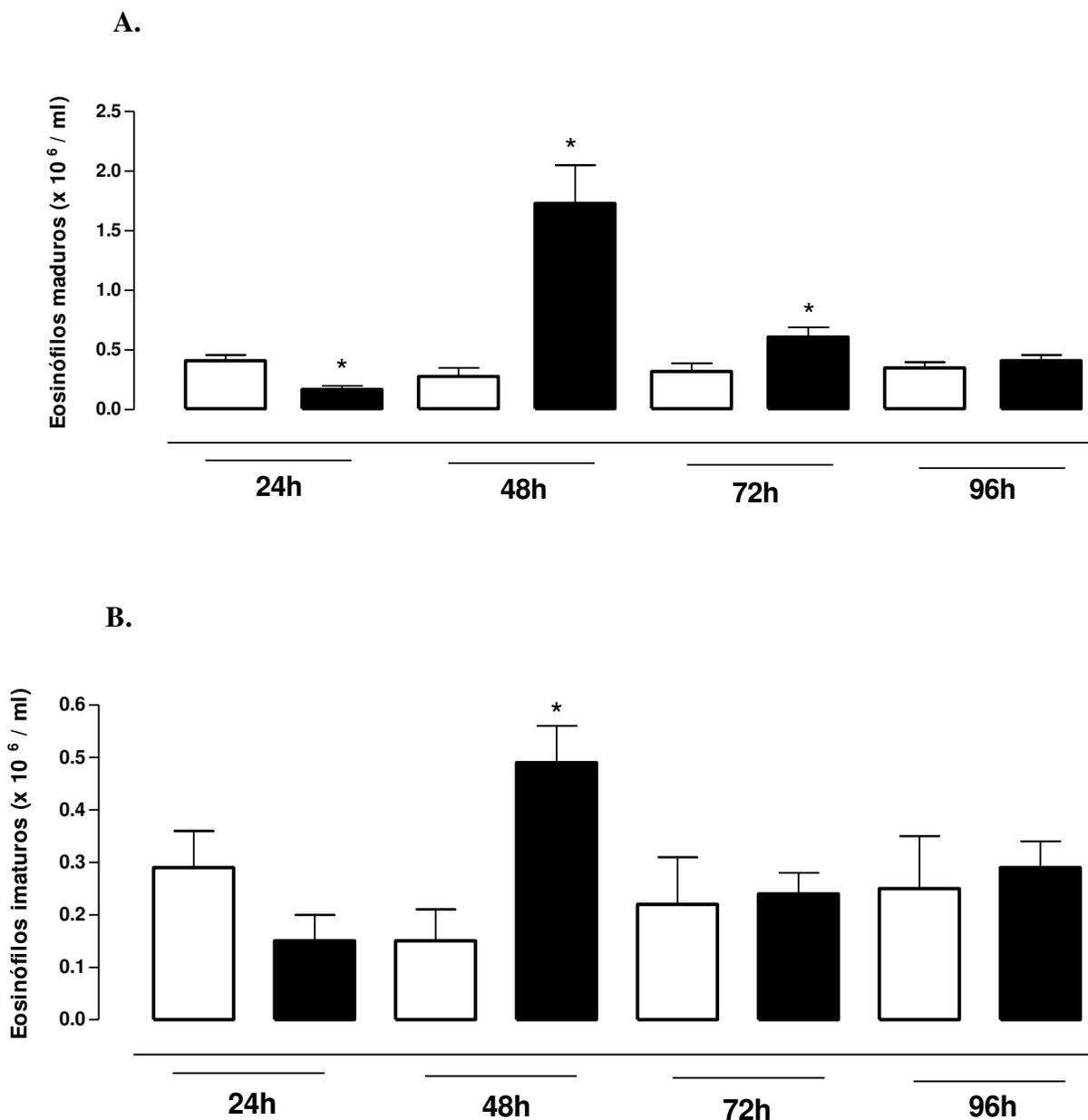


Figura 5. Efeito da obesidade sobre o número de eosinófilos na medula óssea (MO) em diferentes tempos (24, 48, 72 e 96 h) após o desafio intranasal com ovalbumina (OVA). O painel A representa a contagem de eosinófilos maduros e o painel B a contagem de eosinófilos imaturos. A barra branca representa os animais sensibilizados controles/sadios e as barras pretas representam os animais sensibilizados obesos. Cada coluna representa a média \pm E.P.M para $n=7$. * $p < 0.05$ comparado sensibilizados obesos (SO) com sensibilizados controles (SC).

Tabela 6. Efeito da obesidade sobre a contagem total e diferencial de leucócitos da medula óssea de animais sensibilizados e não sensibilizados e desafiados com OVA em diferentes tempos.

<i>Tempo após o desafio</i>	<i>Grupo</i>	<i>Leucócitos totais (x 10⁶/ml)</i>	<i>Neutrófilos maduros (x 10⁶/ml)</i>	<i>Neutrófilos imaturos (x 10⁶/ml)</i>	<i>Outras (x 10⁶/ml)</i>
24 h	NSC	9,23 ± 1,33	5,09 ± 0,83	1,58 ± 0,23	2,53 ± 1,07
	NSO	8,43 ± 1,08	3,45 ± 0,46	1,62 ± 0,3	3,32 ± 0,65
	SC	14,14 ± 1,58	6,72 ± 1,05	3,59 ± 0,54	3,11 ± 0,20
	SO	11,35 ± 1,51	5,84 ± 0,4	2,02 ± 0,26	2,28 ± 0,19
48 h	NSC	17,22 ± 2,39	8,9 ± 1,39	2,71 ± 0,3	5,44 ± 1,4
	NSO	19,3 ± 1,05	10,26 ± 0,41	2,58 ± 0,19	6,39 ± 0,67
	SC	12,31 ± 0,99	5,73 ± 0,53	2,39 ± 0,11	3,77 ± 0,34
	SO	16,34 ± 1,1	7,98 ± 0,52	2,46 ± 0,37	4,67 ± 0,43
72 h	NSC	15,1 ± 0,8	8,13 ± 1,4	2,78 ± 0,17	2,88 ± 0,84
	NSO	13,32 ± 1,23	5,84 ± 0,91	2,91 ± 0,49	4,41 ± 0,24
	SC	11,32 ± 0,96	5,34 ± 0,21	2,38 ± 0,42	3,00 ± 0,54
	SO	14,47 ± 1,82	6,79 ± 0,87	1,97 ± 0,26	3,63 ± 0,48
96 h	NSC	15,35 ± 0,94	9,73 ± 1,75	2,64 ± 0,18	2,90 ± 0,83
	NSO	15,29 ± 1,28	7,19 ± 1,06	3,77 ± 0,39	4,13 ± 0,22
	SC	14,05 ± 1,74	5,23 ± 0,66	3,71 ± 0,47	4,61 ± 0,60
	SO	12,98 ± 1,30	4,90 ± 0,6	3,39 ± 0,25	3,83 ± 0,86

Os dados foram obtidos de animais sensibilizados controles (SC), sensibilizados obesos (SO), não sensibilizados controles (NSC) e não sensibilizados obesos (NSO). Cada coluna representa a média ± E.P.M para n=7. **p* < 0.05 comparado sensibilizados obesos (SO) com sensibilizados controles (SC).

4.3.3 sangue periférico

As contagens de eosinófilos em todos os tempos avaliados após o desafio com OVA mostraram-se significativamente maiores (*P*<0.05) nos animais sensibilizados controles e obesos, quando comparadas aos animais não-sensibilizados instilados com OVA (Figura 6).

O número de eosinófilos foi significativamente baixo no sangue periférico dos animais não sensibilizados (n=7).

A obesidade não modificou significativamente o número de eosinófilos no sangue periférico nos camundongos desafiados com OVA, em comparação aos animais magros desafiados com OVA em nenhum dos tempos avaliados (Figura 6).

Animais obesos e sensibilizados não apresentaram alteração nas contagens para neutrófilos em nenhum dos tempos avaliados; entretanto, as contagens para leucócitos totais e células mononucleares apresentaram-se aumentadas ($p < 0,05$) apenas no tempo de 96 h após o desafio com OVA (Tabela 7).

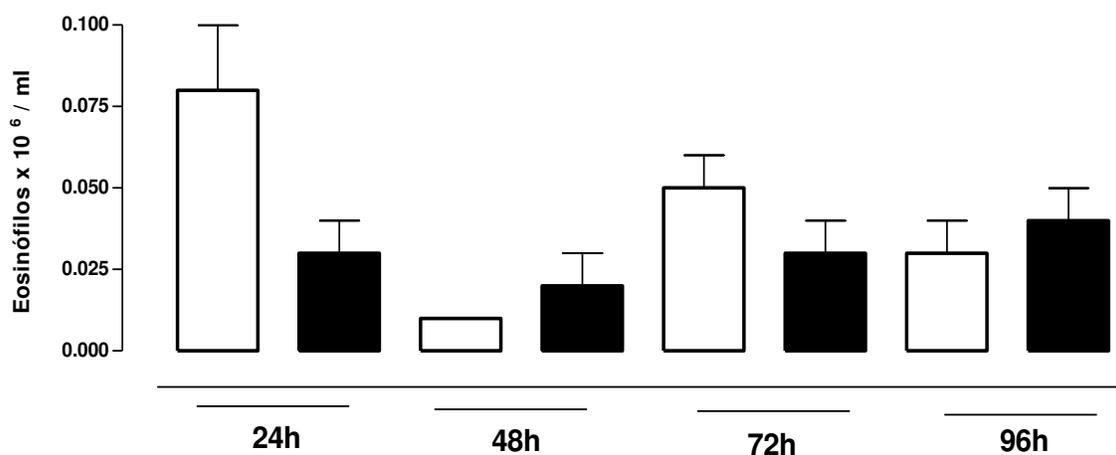


Figura 6. Efeito da obesidade sobre número de eosinófilos no sangue periférico em diferentes tempos (24, 48, 72 e 96 h) após o desafio intranasal com ovalbumina (OVA). A barra branca representa os animais sensibilizados controles/sadios e as barras pretas representam os animais sensibilizados obesos. Cada coluna representa a média \pm E.P.M para n=7.

Tabela 7. Efeito da obesidade sobre a contagem total e diferencial de leucócitos no sangue periférico de animais sensibilizados e não sensibilizados e desafiados com OVA em diferentes tempos.

<i>Tempo após o desafio</i>	<i>Grupo</i>	<i>Leucócitos totais (x 10⁶/ml)</i>	<i>Neutrófilos (x 10⁶/ml)</i>	<i>Mononucleares (x 10⁶/ml)</i>
24 h	NSC	6,87 ± 0,83	0,23 ± 0,04	1,14 ± 0,17
	NSO	4,94 ± 0,81	0,11 ± 0,08	0,86 ± 0,14
	SC	9,92 ± 0,73	0,37 ± 0,08	1,50 ± 0,12
	SO	7,51 ± 1,37	0,41 ± 0,17	1,07 ± 0,12
48 h	NSC	6,66 ± 0,43	0,28 ± 0,08	1,02 ± 0,07
	NSO	6,84 ± 0,35	0,11 ± 0,02	1,24 ± 0,05
	SC	10,25 ± 0,87	0,20 ± 0,07	1,81 ± 0,14
	SO	9,70 ± 0,84	0,33 ± 0,04	1,77 ± 0,13
72 h	NSC	9,21 ± 0,83	0,12 ± 0,02	1,72 ± 0,16
	NSO	7,51 ± 1,29	0,08 ± 0,03	1,41 ± 0,23
	SC	6,29 ± 0,80	0,28 ± 0,12	0,91 ± 0,12
	SO	8,38 ± 1,18	0,48 ± 0,10	1,15 ± 0,27
96 h	NSC	9,21 ± 1,25	0,12 ± 0,03	1,72 ± 0,25
	NSO	5,25 ± 1,24	0,06 ± 0,04	0,98 ± 0,20
	SC	8,57 ± 1,25	0,23 ± 0,1	1,40 ± 0,19
	SO	15,53 ± 2,02 *	0,32 ± 0,07	2,65 ± 0,34 *

Os dados foram obtidos de animais sensibilizados controle (SC), sensibilizados obesos (SO), não sensibilizados controles (NSC) e não sensibilizados obesos (NSO). Cada coluna representa a média ± E.P.M para n=7. **p* < 0.05 comparado sensibilizados obesos (SO) com sensibilizados controles (SC).

4.3.4 Histologia pulmonar

A influência exercida pela obesidade no recrutamento de eosinófilos para o pulmão, que foi verificada através do aumento na contagem de eosinófilos, confirmou-se através da análise morfológica do tecido pulmonar (Figuras 7 e 8).

Como era de se esperar, o acometimento bronquiolar ocorre com mais freqüência ao longo do parênquima pulmonar de animais sensibilizados em relação aos não sensibilizados (Figura 7 e 8). Além disso, o infiltrado de células inflamatórias na região peri-bronquiolar é significativamente mais intenso nos animais obesos comparado com os não obesos em ambos os tempos avaliados (Figura 7).

A porcentagem de eosinófilos infiltrados no parênquima pulmonar também é maior em animais sensibilizados em relação aos não sensibilizados. Este aumento é significativamente maior ($p < 0,001$) em camundongos obesos comparado com camundongos controles, sejam eles sensibilizados ou não. Em relação aos animais sensibilizados obesos, verifica-se um aumento significativo no infiltrado eosinofílico em 48 h ($p < 0,001$) e 72 h ($p < 0,05$) após o desafio com OVA quando comparados com sensibilizados controles (Figura 8).

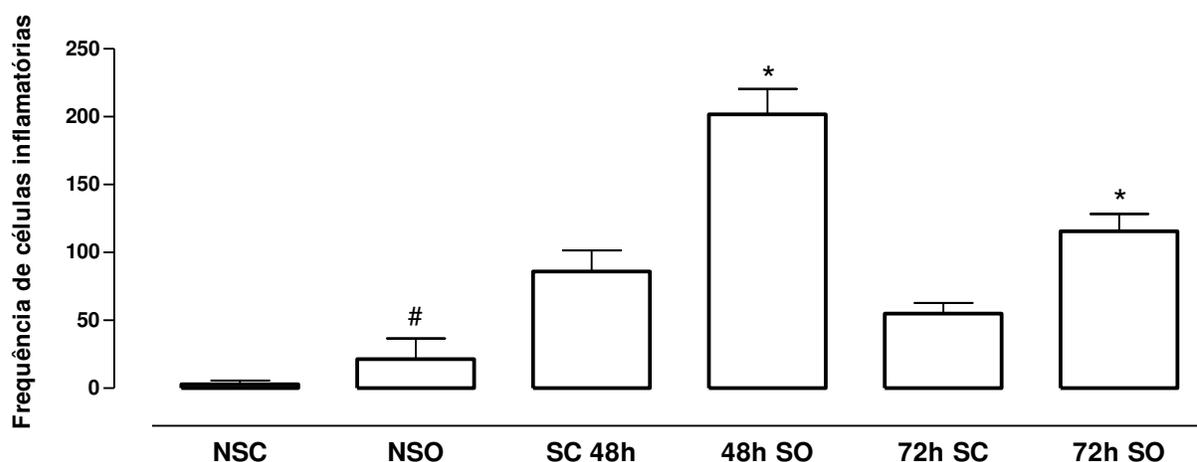


Figura 7: Efeito da obesidade na freqüência de células inflamatórias no parênquima pulmonar após a instilação intranasal com ovalbumina (OVA). Os dados representam o número de eosinófilos/brônquio de camundongos controle e obesos, sensibilizados ou não com OVA, 48 e 72 h após o desafio. Os grupos experimentais foram: NSC (não-sensibilizado controle), NSO (não-sensibilizado obeso), SC (sensibilizado controle) e SO (sensibilizado obeso). Cada coluna representa a média ± EPM (n=3). ^{*} $p < 0,05$, quando comparados com os grupos SC; e [#] $p < 0,05$ quando comparado com o grupo NSC.

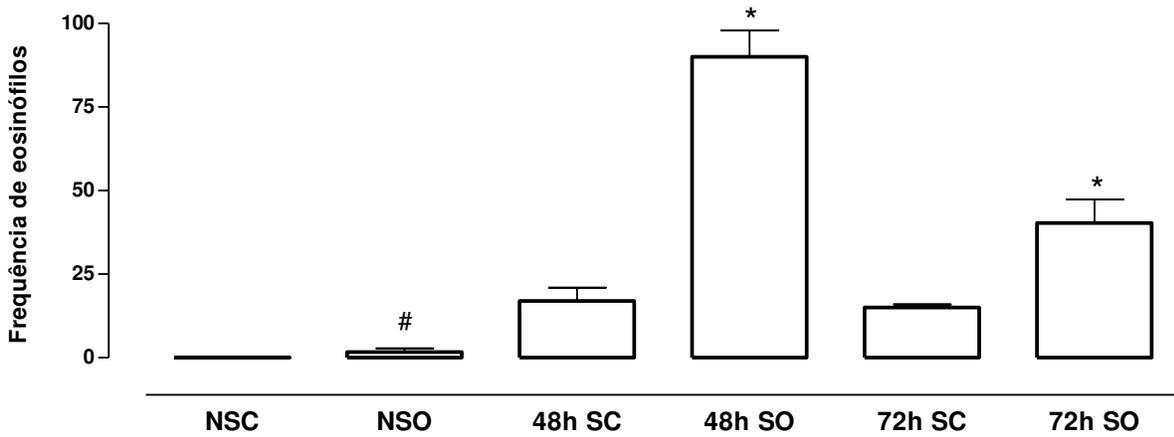


Figura 8: Efeito da obesidade na porcentagem média de eosinófilos no parênquima pulmonar após a instilação intranasal com ovalbumina (OVA). Os dados representam o número de eosinófilos/brônquios de camundongos controle e obesos, sensibilizados ou não com OVA, 48 h e 72 h após o desafio. Os grupos experimentais foram: NSC (não-sensibilizado controle), NSO (não-sensibilizado obeso), SC (sensibilizado controle) e SO (sensibilizado obeso). Cada coluna representa a média \pm EPM (n=3). *p<0.05, quando comparados os grupos SC; e #p<0.05 quando comparado com o grupo NSC.

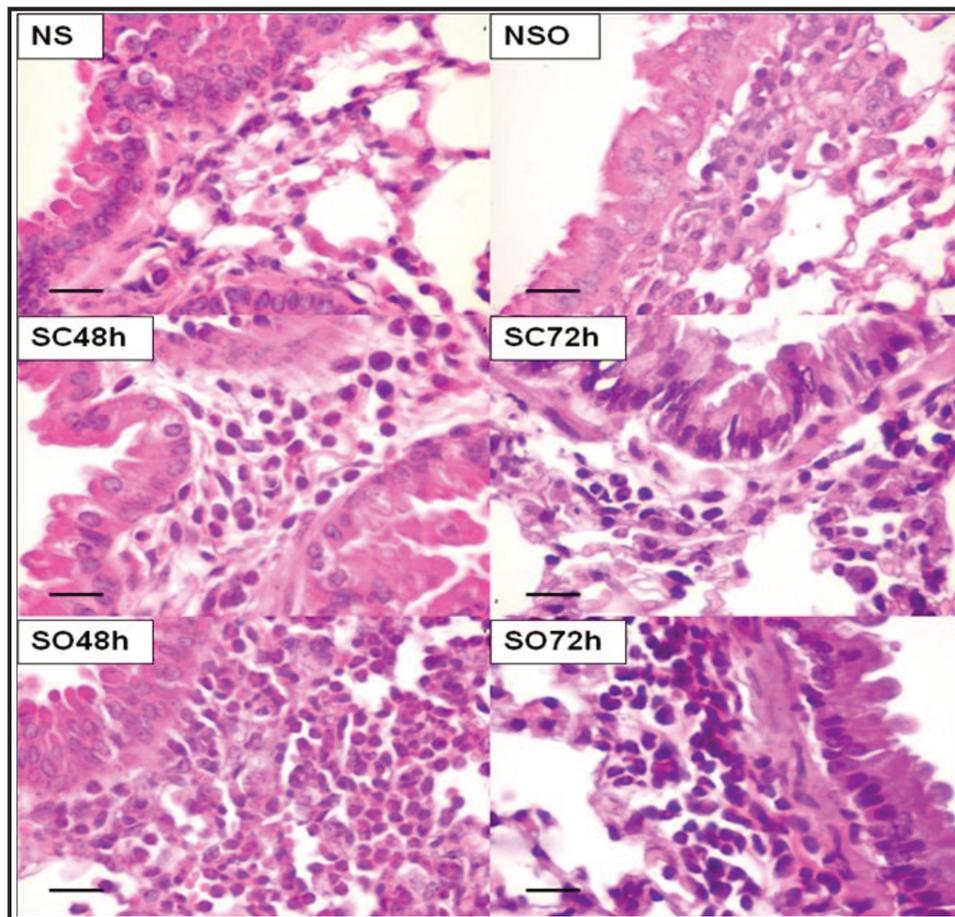


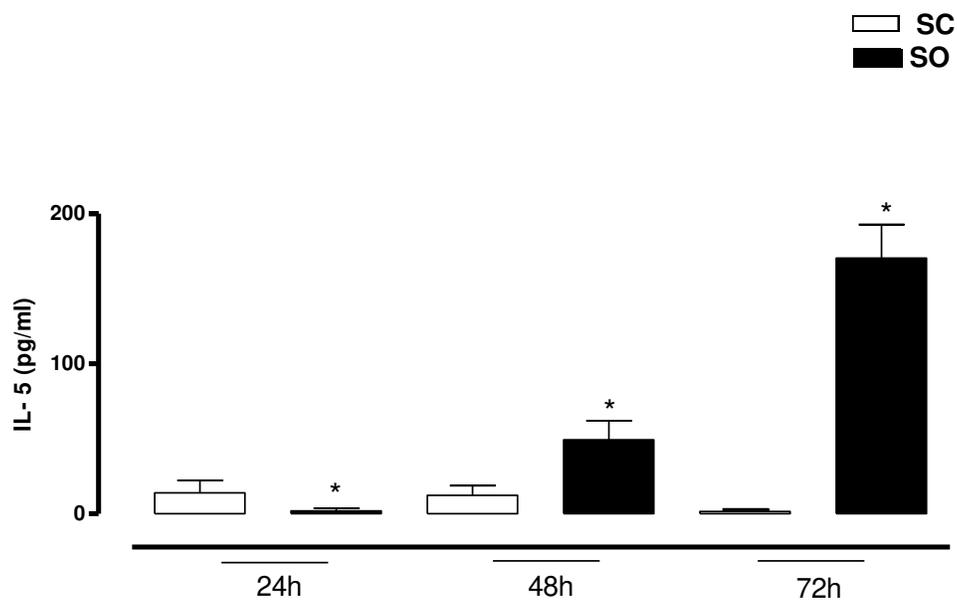
Figura 9. Fotomicrografia representativa do parênquima pulmonar de camundongos C57B16/J, 48 e 72 h após o desafio com ovalbumina (OVA) em animais controles e obesos. Os grupos experimentais foram: NS (não-sensibilizado controle), NSO (não-sensibilizado obeso), SC (sensibilizado controle) e SO (sensibilizado obeso). Aumento de 250x.

4.4 Níveis de TNF- α , IL-6, IL-4, IL-5 e IL-10 e eotaxina no LBA

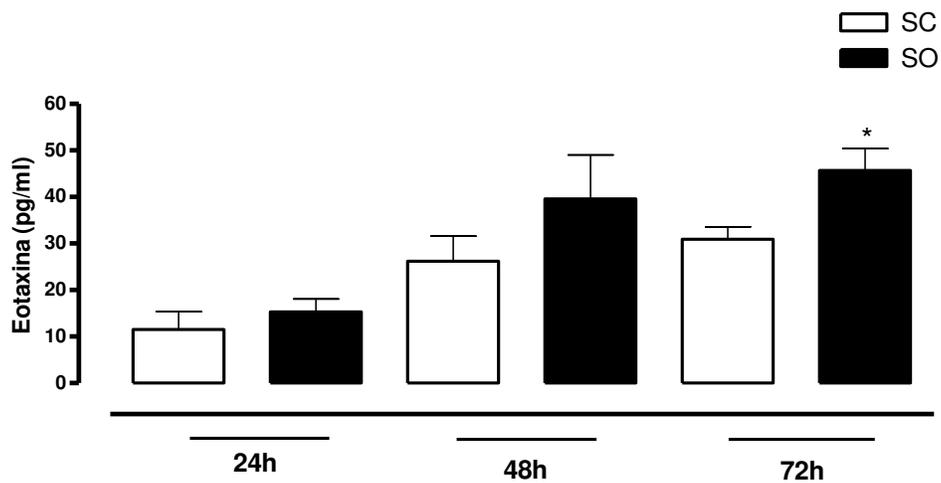
De acordo com a figura 10 (painel A-F), verificou-se que a obesidade por indução de dieta influenciou nos níveis de citocinas e quimiocinas no LBA de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA. Nos animais obesos verificou-se que os níveis da IL-5, eotaxina, IL-10 e TNF- α estão aumentados 48 e 72 h após o desafio comparado com os

animais controles. Os níveis de IL-6 e IL-4 nos animais obesos estavam diminuídos em 48 h e apresentaram significativo aumento em 72 h comparado com camundongos saudáveis (magros).

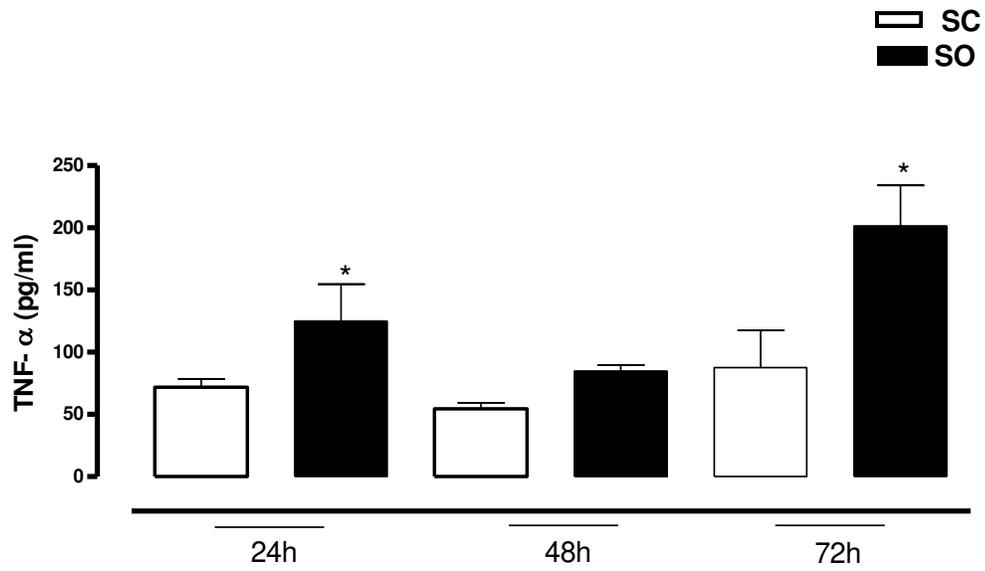
A. IL-5



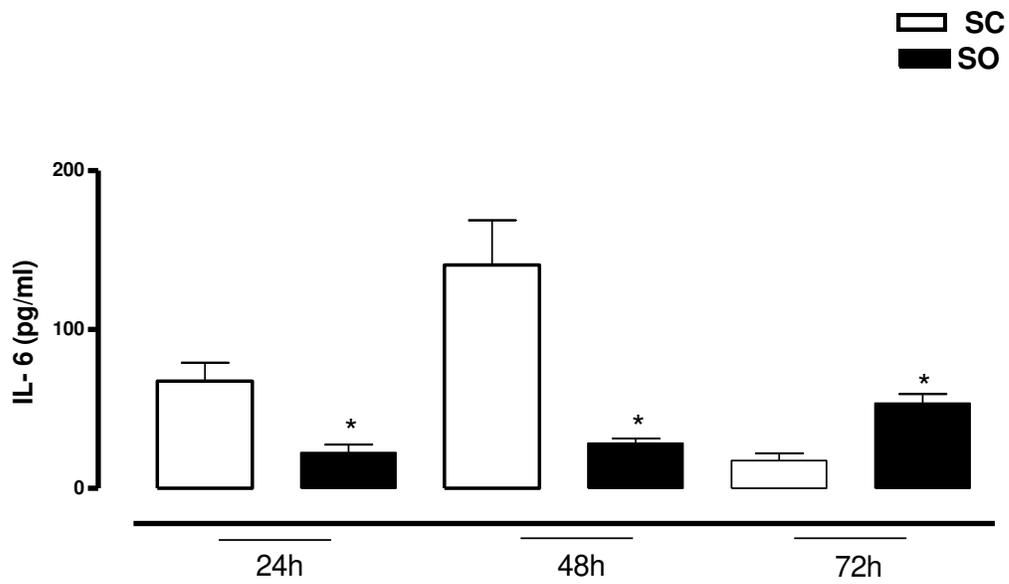
B. Eotaxina



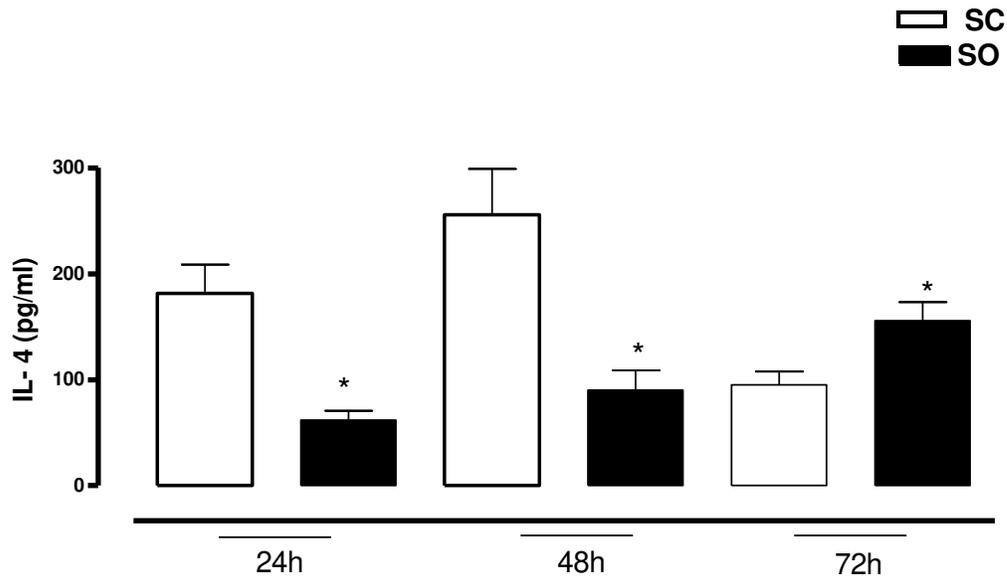
C. TNF- α



D. IL-6



E. IL-4



F. IL-10

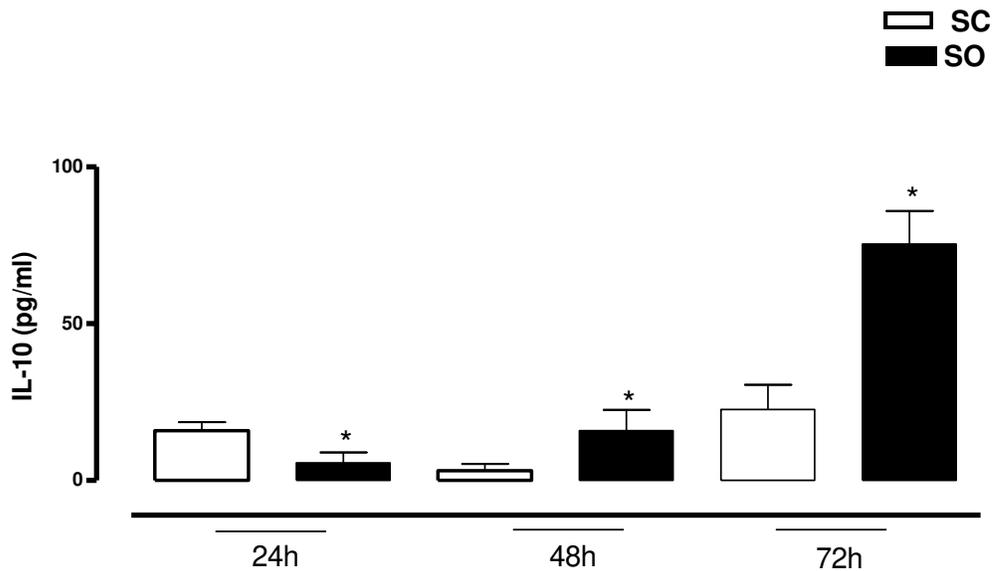


Figura 10. Efeito da obesidade nos níveis das citocinas IL-5(A), Eotaxina (B), TNF- α (C), IL-6 (D) , IL-4 (E) e IL-10 (F) no lavado broncoalveolar (LBA). O LBA foi coletado em diferentes tempos (24, 48 e 72 h) após a instilação intranasal de ovalbumina (OVA). Os grupos experimentais foram: SC (sensibilizado controle) e SO (sensibilizado obeso). Cada coluna representa a média \pm E.P.M para n=5. * $p < 0.05$ comparados com os grupos SC.

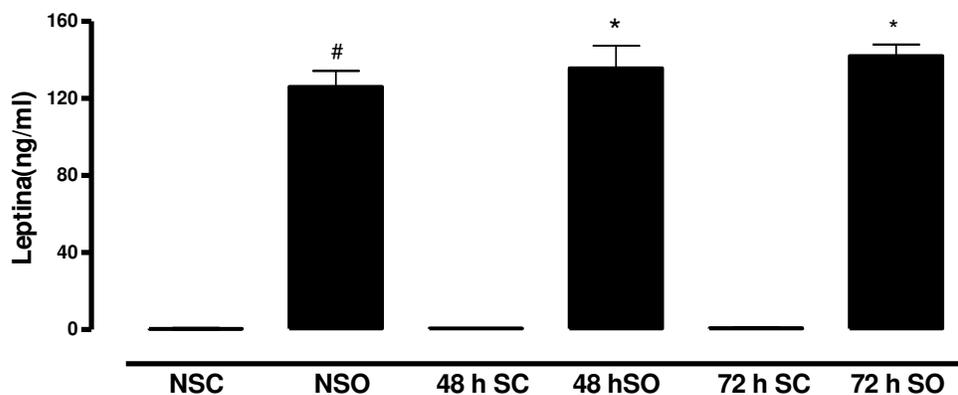
4.5 Níveis de leptina e adiponectina no LBA e soro

Os níveis séricos de leptina mostraram-se significativamente aumentados ($P < 0.001$) no soro de camundongos obesos quando comparados aos dos animais controles (magros), como esperado. Todavia, a sensibilização e o desafio com OVA não afetaram os níveis de leptina no soro (Figura 11A).

Assim como era esperado, os níveis séricos de adiponectina mostraram-se significativamente diminuídos ($P < 0.001$) no soro de camundongos obesos quando comparados aos dos animais controles (magros). À semelhança dos níveis de leptina, a sensibilização e o desafio com OVA não afetaram os níveis de adiponectina no soro (Figura 11B).

Os níveis das adipocitocinas, leptina e adiponectina, mostraram-se abaixo do limite de detecção no LBA de todos os grupos.

A. Leptina



B. Adiponectina

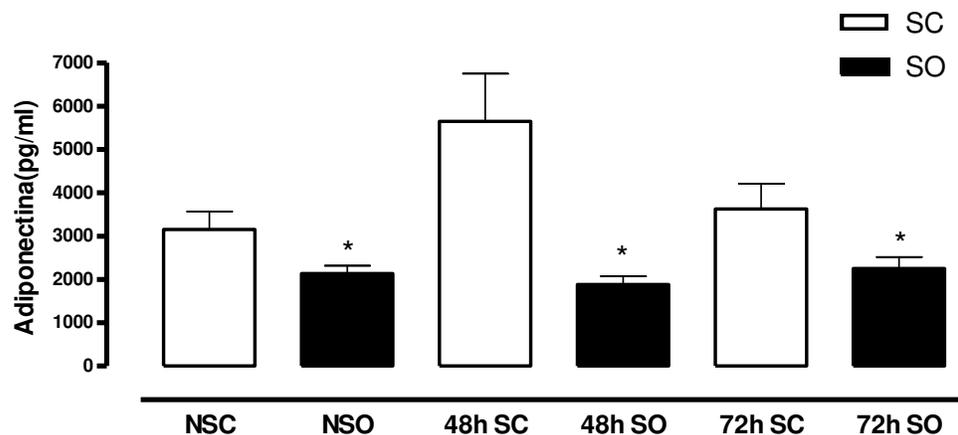


Figura 11. Efeito da obesidade nos níveis das adipocitocinas: leptina (A) e adiponectina (B) no soro. O soro foi coletado em diferentes tempos (48 e 72 h) após a instilação intranasal de ovalbumina (OVA). Os grupos experimentais foram: NSC (não sensibilizado controle); NSO (não sensibilizado obeso); SC (sensibilizado controle) e SO (sensibilizado obeso). Cada coluna representa a média \pm E.P.M para $n=5$. * $p < 0.05$ comparado SO com SC; # $p < 0,05$ comparado NSC e NSO.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A literatura vem acumulando informações que sugerem a existência de uma estreita associação entre obesidade e asma e dados epidemiológicos indicam o aumento da incidência de asma em adultos e crianças com sobrepeso e obesos (Luder et al., 1998; Huang et al., 1999).

Estudos recentes têm relatado o uso de modelos de obesidade em murinos para se investigar a relação entre obesidade e asma. Grande parte destes estudos tem dado atenção ao impacto da obesidade na hiperreatividade das vias aeríferas (Shore et al., 2003; Rivera-Sanchez et al., 2004; Shore et al., 2005; Lu et al., 2006). Todavia, até o presente momento, poucos estudos avaliaram a resposta inflamatória pulmonar em animais obesos. Dentre os estudos que avaliaram a resposta inflamatória, a maior parte deles avaliou a resposta a agentes não alérgicos, como o ozônio, sendo esta resposta predominantemente neutrofílica (Rivera-Sanchez et al., 2004; Lu et al., 2006; Johnston et al., 2008). Recentemente Johnston e colaboradores (2007) avaliaram a resposta inflamatória alérgica induzida por OVA, porém em camundongos geneticamente obesos. Baseado nos dados existentes atualmente na literatura, pode-se dizer que nosso trabalho é um dos poucos existentes que avalia os efeitos da obesidade induzida por dieta na inflamação pulmonar alérgica em camundongos. É importante ressaltar que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica é o modelo de obesidade experimental que melhor reproduz a obesidade verificada em humanos. (Surwit et al., 1995; Ikemoto et al., 1996))

Nossos resultados mostram claramente que a dieta hiperlipídica é capaz de induzir obesidade nos camundongos semelhante à obesidade em humanos. Os animais alimentados com a dieta hiperlipídica apresentaram, além de aumento significativo no ganho ponderal e

da adiposidade visceral, avaliados através do aumento do tecido epididimal, um desequilíbrio no perfil lipídico, e metabolismo de glicose prejudicado.

A dislipidemia é uma comorbidade comum na obesidade e, mesmo que especulativos, dados sugerem que alterações no tipo ou na quantidade de lipídeos sanguíneos exercem efeitos que promovem ou exacerbam a asma. Por exemplo, macrófagos CD11 são encontrados no tecido adiposo de obesos, e estas células respondem aos ácidos graxos livres com o aumento da síntese de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (Nguyen et al., 2007). Além disso, dieta rica em colesterol promove inflamação do tipo Th2 em modelos animais de asma (Yeh & Huang, 2001; McKay et al., 2004).

No prazo da dieta estudado em nosso modelo não foram encontradas alterações significativas na glicemia de jejum. Os animais que tornaram-se obesos por indução de dieta apresentaram somente uma tendência de hiperglicemia de jejum, mas, em contra partida, tornaram-se intolerantes ao teste oral de glicose. Segundo DeFronzo e Ferrannini (1991), no início do desenvolvimento da resistência à insulina, as células β do pâncreas são capazes de aumentar a secreção de insulina e, conseqüentemente, de manter a glicemia normal ou discretamente aumentada. No entanto, com a manutenção deste quadro, a excessiva secreção de insulina não pode ser mantida e o indivíduo pode evoluir para a intolerância à glicose ou até mesmo para o diabetes. Os efeitos da dieta hiperlipídica sob os níveis de glicose sanguínea em animais estão descritos na literatura de forma discrepante, variando de normoglicemia, discreta hiperglicemia e desenvolvimento do diabetes do tipo 2 tem sido reportado (Buettner et al., 2007).

Além das alterações metabólicas observadas nos animais obesos, o presente estudo mostrou que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica aumenta a migração de células inflamatórias, especificamente eosinófilos, para as vias aéreas de animais sensibilizados

com OVA, assim como os níveis de citocinas do tipo T *helper* 2 (Th2) no LBA. O estudo também mostrou que a obesidade aumenta de maneira significativa a eosinopoiese na medula óssea de animais sensibilizados. Estes resultados confirmam que a obesidade exerce um importante papel no desenvolvimento ou no agravamento da asma, principalmente devido aos seus efeitos pró-inflamatórios, que parecem não estar restritos somente à luz das vias aeríferas, mas também são extensivos ao parênquima pulmonar.

Apesar do aumento da incidência de obesidade e asma, existem poucos estudos avaliando os efeitos inflamatórios envolvidos nestas desordens. A obesidade é uma doença inflamatória crônica caracterizada por aumento anormal do tecido adiposo, levando a aumento das suas funções imunes, que pode repercutir em um estado de inflamação sistêmica (Fantuzzi, 2005). Algumas das citocinas aumentadas na inflamação sistêmica relacionada à obesidade, como TNF- α , IL-6 e IL-10, estão também associadas à asma (Sin & Sutherland, 2008).

Diversos estudos têm mostrado que as células inflamatórias exercem um papel central tanto no processo inflamatório da asma quanto no remodelamento das vias aeríferas, e que ambos os fatores estão associados à obstrução brônquica (Robinson et al., 1992; Robinson et al., 1993; Georas et al., 2005; Kariyawasam & Robinson, 2007). Estudos clínicos e modelos experimentais de asma mostram elevação dos níveis de citocinas do tipo Th2 no LBA, os quais se assemelham aos resultados também encontrados em nosso trabalho.

Observamos um perfil de resposta inflamatória diferenciado entre animais obesos e controles (magros). Animais controles apresentaram aumento no infiltrado de eosinófilos para as vias aeríferas 48 h após o desafio com OVA, sendo que nos animais obesos este aumento foi verificado somente 72 h após o desafio. Outra característica importante é que a migração tardia de eosinófilos foi acompanhada pelo aumento também tardio (72 h) dos

níveis das citocinas do tipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10), TNF- α e eotaxina no LBA de camundongos obesos e desafiados com OVA.

A migração tardia dos eosinófilos para a luz das vias aeríferas em animais obesos ocorre provavelmente como consequência da elevação também tardia das concentrações das citocinas e quimiocinas essenciais para esse processo. A IL-5, que é a principal citocina responsável pela maturação e diferenciação de eosinófilos, associada à eotaxina, que também está envolvida na migração, ativação e desgranulação de eosinófilos durante a resposta inflamatória alérgica (Yamaguchi et al., 1988; Lopez et al., 1991; Broide, 2008), estão aumentadas nos animais sensibilizados obesos, atingindo o pico de concentração no LBA em 72 h após o desafio antigênico. Shore e colaboradores (2003) também observaram que camundongos obesos expostos ao ozônio apresentaram níveis elevados de eotaxina no LBA. Além disso, recentemente, demonstrou-se que camundongos obesos por dieta apresentam níveis elevados de mRNA para a eotaxina no tecido adiposo e no soro. (Vasudevan et al., 2006).

Diversas evidências confirmam que patogênese da asma alérgica e outras doenças atópicas envolvem um desequilíbrio na resposta das células T (Kay & Durham, 1991; Robinson et al., 1992; Corrigan & Kay, 1996). Após a sensibilização ao alérgeno, células T de pacientes atópicos tendem a produzir elevados níveis de citocinas do tipo T *helper* 2, especialmente IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 (Kay, 1991; Djukanovic et al., 1992; Robinson et al., 1992; Holgate, 2008).

Através da análise dos dados de dosagens de citocinas no LBA observamos que este desequilíbrio na resposta das células T, após o contato com alérgeno, está mais exacerbado no animal obeso. Em nossos resultados, os animais obesos e desafiados com OVA apresentaram aumento significativo nos níveis de IL-4 comparado com animais magros e também

desafiados, o que em parte justifica a resposta Th2 exacerbada nos animais obesos, uma vez que a IL-4 induz e sustenta a diferenciação de linfócitos Th0 *naive* em linfócitos do tipo Th2, e com isso aumenta ainda mais a produção de citocinas Th2 (Yamaguchi et al., 1988; Lopez et al., 1991; Broide, 2008). Nossos dados estão de acordo com estudo recente de Johnston e colaboradores (2007) que demonstram que camundongos geneticamente obesos apresentam níveis elevados de IL-4 no LBA frente ao desafio com OVA.

A IL-6 atua de maneira colaborativa com outras citocinas e proporciona uma ligação entre a imunidade inata e adquirida. Exerce papel na expansão de células Th2, além de efeitos pró-inflamatórios na asma (Barnes, 2008). Trabalho publicado recentemente confirma que a leptina pode induzir *in vitro* a secreção de IL-6 pelos eosinófilos (Wong et al., 2007). Camundongos deficientes de IL-6 apresentam melhora da resposta inflamatória induzida por ozônio (Johnston et al., 2005) ao passo que camundongos obesos por indução de dieta apresentam elevados níveis de IL-6 no LBA quando expostos ao ozônio (Johnston et al., 2007).

É importante ainda ressaltar que a obesidade influenciou os níveis de TNF- α no LBA dos animais sensibilizados e desafiados com OVA. Verificamos que os camundongos obesos e desafiados apresentaram aumento significativo nas concentrações de TNF- α no LBA quando comparados com animais magros e desafiados. Estudo recente mostrou que o tecido adiposo é também fonte de diversas citocinas e quimiocinas (Fantuzzi, 2005), incluindo o TNF- α . Esta citocina encontra-se elevada no soro de humanos e de camundongos obesos, provavelmente devido à produção aumentada pelos macrófagos infiltrados no tecido adiposo. Está atualmente bem estabelecido que o TNF- α participa da resposta inflamatória das vias aéreas (Thomas, 2001; Babu et al., 2004), assim como é capaz de induzir

hiperreatividade das vias aeríferas (Shore & Johnston, 2006). O TNF- α é quimiotático para neutrófilos e eosinófilos (Lukacs et al., 1995), aumenta os efeitos citotóxicos dos eosinófilos sob as células endoteliais (Slungard et al., 1990), ativa célula T (Scheurich et al., 1987) e aumenta a expressão de moléculas de adesão (Lassale, et al., 1991). Com base nestas informações, sugere-se que o aumento desta citocina nos obesos sensibilizados esteja favorecendo o desenvolvimento ou o agravamento da asma.

O tecido adiposo também é fonte de IL-10 (Juge-Aubry et al., 2005). Esta citocina exerce efeitos anti-inflamatórios e desempenha um papel crucial na regulação do sistema imune. Nossos resultados mostraram níveis elevados de IL-10 no LBA do camundongo obeso, com pico em 72 h após o desafio com OVA. Com base nestes dados, podemos propor que a produção elevada de IL-10 nos animais obesos possa ser um mecanismo compensatório no sentido de diminuir o estado inflamatório, visto que uma de suas funções é inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Fiorentino et al., 1991; Moore et al., 2001; Espósito et al., 2003).

Nossos resultados mostram que camundongos que receberam dieta hiperlipídica durante 10 semanas apresentaram aumento nos níveis séricos de leptina e redução de adiponectina, quando comparados com os controles alimentados com dieta padrão para roedores. Estes dados corroboram com informações já bem estabelecidas na literatura, que mostram que na obesidade ocorre aumento excessivo nos níveis de leptina e redução nos níveis de adiponectina (Engeli et al., 2003, Fantuzzi, 2005). Visto que a leptina possui efeitos pró-inflamatórios, acredita-se que a mesma possa contribuir para o aumento da incidência de asma nos obesos. Recentemente, demonstrou-se que a leptina regula a apoptose, a expressão de moléculas de adesão e de quimiocinas, assim como a liberação de mediadores inflamatórios (IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1) em eosinófilos humanos (Wong et al., 2007). A adi-

adiponectina também é um importante mediador correlacionado à asma e à obesidade. Estudos demonstram que a adiponectina está reduzida durante a inflamação alérgica pulmonar e hiperreatividade brônquica em camundongos, e a administração exógena da mesma inibe a resposta alérgica das vias aeríferas (Shore et al., 2006; Vasudevan et al., 2006). Visto que a adiponectina possui propriedades anti-inflamatórias (Ouchi et al., 2003), é possível que a redução da mesma possa contribuir para o aumento das características inflamatórias da asma observadas em obesos. Os efeitos anti-inflamatórios da adiponectina estendem-se na inibição da produção de IL-6 (Wulster-Radcliffe et al., 2004) e da indução das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 (Ouchi et al., 1999; Kawanami et al., 2004).

O aumento no nível de leptina verificado em camundongos obesos correlaciona-se também às elevadas concentrações de citocinas Th2 verificadas nos animais obesos e desafiados com OVA. Visto que a leptina protege os linfócitos T da apoptose e regula a sua proliferação e ativação, e por isso é capaz de influenciar a produção de citocinas pelos linfócitos T (Martín-Romero et al., 2000; Farooqi et al., 2002; De Rosa et al., 2007).

Os resultados listados neste trabalho mostraram que a eosinopoiese está bastante estimulada nos camundongos obesos e asmáticos, sendo este aumento verificado em um tempo anterior ao aumento celular no LBA; ou seja, 48 h após o desafio com OVA ocorre um aumento marcante na proliferação e diferenciação de eosinófilos na medula óssea. Estes dados corroboram com o aumento dos níveis de IL-5 e eotaxina verificado nos camundongos obesos sensibilizados e desafiados com OVA.

Os eosinófilos são derivados de precursores mielóides na medula óssea, e em resposta à ativação por determinadas citocinas são liberados na circulação e recrutados para os tecidos de indivíduos alérgicos (Denburg et al., 2000). O desafio antigênico em indivíduos alérgicos pode também ativar uma resposta sistêmica e aumentar a produção celular na me-

dula óssea (Wood et al., 1998). A medula óssea responde a IL-5 com aumento da expressão de receptor de IL-5 em células progenitoras (Sehmi et al., 1997). Assim, após a inalação do alérgeno, sinais enviados das vias aeríferas à medula óssea, possivelmente mediados pela IL-5, aumentam a produção de células progenitoras de eosinófilos e basófilos, com consequente aumento do recrutamento celular nas vias aéreas (O'Byrne, 1998).

O aumento no número de eosinófilos observado na medula óssea de camundongos obesos sensibilizados pode ser resultado do aumento excessivo dos níveis de leptina verificada na obesidade, pois estudos mostram que células de medula óssea cultivadas na presença de leptina apresentam aumento no crescimento de colônias de granulócitos (Gainsford T, et al., 1996; Umemoto Y, et al., 1997). Além disso, dados da literatura mostram que a leptina influencia a hematopoiese, e que células progenitoras da medula óssea CD34 apresentam receptores para leptina (Gainsford et al., 1996; Fantuzzi et al., 2000). Com base nestas informações é possível especular que o aumento de leptina, como consequência do excesso de tecido adiposo, esteja influenciando na proliferação e diferenciação de eosinófilos na medula óssea de camundongos obesos e sensibilizados.

Ao constatar em nossos estudos elevação do número de eosinófilos na medula óssea de camundongos obesos e desafiados com OVA, do número de eosinófilos no LBA dos níveis de citocinas quimiotáticas para eosinófilos no BAL, optamos por analisar a morfologia do tecido pulmonar destes camundongos, na tentativa de melhor elucidar o trajeto do eosinófilo desde a medula óssea até o pulmão. Verificamos um acúmulo excessivo de células inflamatórias, especialmente eosinófilos, no parênquima pulmonar (48 h e 72 h após o desafio) de animais obesos e asmáticos. O número de eosinófilos na região peribronquilar de camundongos obesos mostrou-se acentuadamente maior do que o número de eosinófilos que atingem a luz das vias aeríferas. Baseado nestes achados, podemos sugerir que os

eosinófilos, ao migrarem da medula óssea para o tecido pulmonar, permanecem retidos no parênquima pulmonar; e somente em 72 h após o desafio com OVA parte deles alcança a luz das vias aeríferas. Dessa forma, algum mecanismo regulatório, ainda não identificado, possivelmente esteja retendo os eosinófilos no interior do parênquima pulmonar de camundongos obesos onde estes passam a exercer seus efeitos deletérios. Um possível mecanismo seria a diminuição da apoptose de eosinófilos no interior do parênquima pulmonar de camundongos obesos. Conus e colaboradores (2005) demonstraram, em estudos experimentais, que a leptina exerce efeitos anti-apoptóticos em eosinófilos. A leptina poderia ser nos animais obesos um importante fator de sobrevivência do eosinófilo, tal como GM-CSF.

Estudos sugerem que a resposta inflamatória na asma não está restrita às vias aeríferas, mas ocorre difusamente nos pulmões. O parênquima pulmonar de pacientes asmáticos apresenta inflamação eosinofílica, assim como hiper-expressão de IL-5 (Kraft et al, 1996; Minshall et al, 1998; de Magalhães Simões et al, 2005). O papel do tecido pulmonar periférico na fisiopatologia da asma tem sido também intensivamente estudado. Modelos experimentais mostram que a resposta do tecido a alérgenos pode ser tão importante ou até maior que aquela das vias aeríferas (Sakae, et al., 1992). Nagase e colaboradores (1994) avaliaram as propriedades do tecido pulmonar na resposta imediata e tardia de ratos sensibilizados com OVA, mostrando a participação tanto das vias aeríferas quanto do parênquima pulmonar nas duas fases da resposta alérgica.

O fato de que existe inflamação no tecido pulmonar periférico de indivíduos asmáticos aponta para um problema de ordem terapêutica, uma vez que corticóides inalatórios indicados para o tratamento da asma não conseguem atingir de maneira efetiva as regiões mais distais do pulmão (Sutherland & Martin, 2002). Este é um ponto relevante quando se trata de pacientes asmáticos e obesos, visto que indivíduos obesos possuem risco aumentado de desenvolver

asma, são mais sintomáticos, requerem doses mais elevadas de drogas anti-asmáticas e fazem visitas médicas de emergência mais frequentes quando comparados com indivíduos magros asmáticos (Sin & Sutherland, 2008).

Baseado em nossos resultados e somado aos dados já relatados anteriormente na literatura podemos sugerir que a asma em indivíduos obesos apresenta um perfil inflamatório diferenciado e com isso um fenótipo de asma diferente do observado em magros asmáticos. Nossos dados parecem justificar os relatos da literatura sobre a gravidade e a dificuldade para tratar clinicamente a asma associada à obesidade.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Utilizando modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica, nossos resultados nos permitem concluir que:

- I. Nos camundongos obesos ocorre um acúmulo significativo de eosinófilos maduros e imaturos na medula óssea 48 h após o desafio intranasal com OVA. A obesidade potencializa o influxo de eosinófilos para a luz das vias aeríferas, porém, a cinética de recrutamento é diferente entre camundongos controles (48 h) e obesos (72 h);
- II. O acúmulo pulmonar de eosinófilos parece ser mediado, em camundongos obesos, pelo aumento de citocinas do tipo Th1 e Th2 (IL-6, IL-4, IL-5 e IL-10 e TNF- α) e eotaxina.
- III. A obesidade provoca intensa retenção de eosinófilos no parênquima pulmonar 48 h e 72 h após o desafio com OVA;

Podemos concluir que, em nossas condições experimentais, a obesidade aumenta a mobilização de eosinófilos da medula óssea para o parênquima pulmonar e retarda seu transito para a luz das vias aeríferas. Com isso, os eosinófilos permanecem por mais tempo no tecido pulmonar exercendo suas funções efetoras.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Akbari, O, Faul, JL, Hoyte, EG et al. CD41 invariant T-cell-receptor⁺ natural killer T cells in bronchial asthma. *N Engl J Med* 2006 ;354: 1117–1129.

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;132:1890-1897.

Alexander J, Chang GQ, Dourmashkin JT, Leibowitz SF. Distinct phenotypes of obesity-prone AKR/J, DBA2J and C57BL/6J mice compared to control strains. *Int J Obes (Lond)* 2006;30:50 –59.

Al-Shawwa B, Al-Huniti N, Titus G, Abu-Hasan M. Hypercholesterolemia is a potential risk factor for asthma. *J Asthma* 2006;43:231-233.

Arts JHE, Kuper CF. Animal models to test respiratory allergy of low molecular weight chemicals: A guidance. *Methods* 2006; 41:61-71.

Babu KS, Davies DE, Holgate ST. Role of tumor necrosis factor alpha in asthma. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2004;24(4):583-597.

Barnes PJ. Molecular mechanisms of corticosteroids in allergic diseases. *Allergy* 2001;56:928–936.

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

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.

Beuther DA, Sutherland ER. Overweight, obesity, and incident asthma: a metaanalysis of prospective epidemiologic studies. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175:661-666.

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

Borish L, Culp JA. Asthma: a syndrome composed of heterogeneous diseases. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2008;101:1-8.

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.

Broide, DH. Immunologic and inflammatory mechanisms that drive asthma progression to remodeling. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121:560-570.

Bochner BS, Busse WW. Allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005 ;5:953-959.

Brewer JP, Kisselgof AB, Martin TR. Genetic variability in pulmonary physiological, cellular, and antibody responses to antigen in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160:1150-1156.

Brusselle GG, Kips JC, Tavernier JH, van der Heyden JG, Cuvelier CA, Pauwels RA, et al.. Attenuation of allergic airway inflammation in IL-4 deficient mice. *Clin Exp Allergy* 1994; 24:6-9.

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

Busse WW, Lemanske RF. Asthma. *N Engl J Med* 2001; 5:350-362.

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.

Cannon, B, Nedergaard, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 2004; 84: 277–359.

Carroll, N, Cooke, C, James, A. The distribution of eosinophils and lymphocytes in the large and small airways of asthmatics. *Eur Respir J*. 1997;10(2):292-300.

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.

Clegg DJ, Benoit SC, Reed JA, Woods SC, Dunn-Meynell A, Levin BE. Reduced anorexic effects of insulin in obesityprone rats fed a moderate-fat diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;288:R981–986.

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.

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.

Conus S, Bruno A, Simon HU. Leptin is an eosinophil survival factor. *J Allergy Clin Immunol*. 2005; 6:1228-1234.

Corrigan CJ, Kay AB. T-cell/eosinophil interactions in the induction of asthma. *Eur Respir J Suppl* 1996; 22:72s-77.

Cooper, PJ, Chico, ME, Vaca, MG, Rodriguez, A, Alcântara-Neves, NM, Genser, B. et al. 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.

Cockcroft DW, Davis BE. Mechanisms of airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118:551-559.

Corrigan CJ, Kay AB. T cells and eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Immunol Today* 1992; 13:501-506.

Daugherty BL, Siciliano SJ, DeMartino JA, Malkowitz L, Sirotina A, Springer MS. Cloning, expression, and characterization of the human eosinophil eotaxin receptor. *J Exp Med*; 1996; 183(5):2349–2354.

De Fronzo, RA, Ferrannini, E. Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 1991; 14:173-194.

De Magalhães Simões S, dos Santos MA, da Silva Oliveira M, Fontes ES, Fernezlian S, Garippo AL, et al. Inflammatory cell mapping of the respiratory tract in fatal asthma. *Clin Exp Allergy*. 2005; 5:602-611.

De Rosa V, Procaccini C, Calì G, Pirozzi G, Fontana S, Zappacosta S, La Cava A, Matarese G. A key role of leptin in the control of regulatory T cell proliferation. *Immunity* 2007;2:241-255.

De Vries A, Hazlewood L, Fitch PM, Seckl JR, Foster P, Howie SE. High-fat feeding redirects cytokine responses and decreases allergic airway eosinophilia. *Clinical and Experimental Allergy* 2009; 1–9.

Denburg JA, Sehmi R, Upham J, Wood L, Gauvreau G, O’Byrne P. Regulation of IL-5 and IL-5 receptor expression in the bone marrow of allergic asthmatics. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;118:101–103.

Denburg JA, Keith PK. Eosinophil progenitors in airway diseases: clinical implications. *Chest* 2008; 5:1037-1043.

Despas, PJ, Leroux, M, Mackelem, PT. Site of airway obstruction in asthma as determined by measuring maximal expiratory flow breathing air and a helium-oxygen mixture. *J Clin Invest.* 1972;51(12):3235-43.

Dietrich WF, Miller J, Steen R et al.. A comprehensive genetic map of the mouse genome. *Nature* 1996; 380:149-52.

Djukanovic R, et al. Bronchial mucosal manifestations of atopy: a comparison of markers of inflammation between atopic asthmatics, atopic nonasthmatics and healthy controls. *Eur Respir J* 1992; 5:538–544.

Elias JA, Lee CG, Zheng T, Ma B, Homer RJ, Zhu Z. New insights into the pathogenesis asthma. *J Clin Invest* 2003; 111:291-7.

Engeli, S, M. Feldpausch, K, Gorzelniak, F, Hartwig, U, Heintze, J, Janke, M, et al. Association between adiponectin and mediators of inflammation in obese women. *Diabetes* 2003; 52: 942-947.

Esposito K, Pontillo A, Giugliano F, Giugliano G, Marfella R, Nicoletti G, et al. Association of low interleukin-10 levels with the metabolic syndrome in obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:1055-1058.

Fantuzzi, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115:911-919.

Fantuzzi, G, Faggioni, R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukocyte Biol* 2000; 68:437-446.

Farrigan, C., K. Pang. Obesity market overview. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1: 257-258.

Farooqi IS, et al. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest* 2002; 110:1093-103.

Farooqi IS, O'Rahilly S. Leptin: a pivotal regulator of human energy homeostasis. *Am J Clin Nutr.* 2009; 89:980S-984S.

Field, A.E., E.H. Coakley, A. Must, J.L. Spadano, N. Laird, W.H. Dietz, E. Rimm, G.A. Colditz. Impact of overweight on the risk of developing common chronic diseases during a 10-year period. *Arch Intern Med* 2001;161: 1581-1586.

Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol.* 1991; 147:3815-3822.

Flegal, KM, Carroll, MD, Odgen, CL, Johnson, CL. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000. *JAMA* 2002;288:1723-1727.

Ford ES. The epidemiology of obesity and asthma. *J Clin Immunol* 2005;115: 897-909.

Farley C, Cook JA, Spar BD, Austin TM, Kowalski TJ. Meal pattern analysis of diet-induced obesity in susceptible and resistant rats. *Obes Res* 2003;11:845-851.

Foster PS. STAT6: an intracellular target for the inhibition of allergic disease. *Clin Exp Allergy* 1999; 29:12-16.

Foster PS, Hogan SP, Ramsay AJ, Matthaei KI, Young IG. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J Exp Med* 1996;183:195-201.

Fulkerson PC, Rothenberg ME, Hogan SP. Building a better mouse model: experimental models of chronic asthma. *Clin Exp Allergy.* 2005;35:1251-1253.

Gainsford T, et al. Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:14564-14568.

Gaspar M, Elsas I, 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;17:404-413.

Gaspar Elsas MI, Vargaftig BB, Xavier Elsas P. Do glucocorticoids enhance eosinopoiesis? *Trends Pharmacol Sci* 2000; 21:417-420.

Georas SN, Guo J, De Fanis U, Casolaro V. T-helper cell type-2 regulation in allergic disease. *Eur Respir J* 2005; 26:1119-1137.

Gesta, S, Tseng, YH, Kahn, R. Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source. *Cell* 2007; 131:242-256.

Gibson PG, Manning PJ, O'Byrne PM, Girgis-Gabardo A, Dolovich J, Denburg JA, Hargreave FE. Allergen-induced asthmatic responses. Relationship between increases in airway responsiveness and increases in circulating eosinophils, basophils, and their progenitors. *Am Rev Respir Dis.* 1991;143:331-335.

Giembycz MA, Lindsay MA. Pharmacology of the Eosinophil. *Pharm Rev* 1999; 51:213-339.

Giembycz MA. Are eosinophils out of asthma? *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22:61-62.

Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health 2003. No. 02-3659, Bethesda, Maryland.

Gonzalo J-A., Lloyd CM, Wen D, Albar JP, Wells TNC, Proudfoot A, Martinez A-C, Dorf M, Bjerke T, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC. The coordinated action of CC chemokines in the lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness. *J Exp Med* 1998; 188:157-167.

Guzik, T.J., D. Mangalat, R. Korbit. Adipocytokines - novel link between inflammation and vascular function? *J Physiol Pharmacol* 2006; 57: 505-528.

Hanania, NA. Targeting Airway Inflammation in Asthma Current and Future Therapies. *Chest* 2008; 133:989-998.

Hirsch, J, and Batchelor, B. Adipose tissue cellularity in human obesity. *Clin Endocrinol Metab* 1976; 5: 299-311.

Hogan, SP, Rosenberg, HF, Moqbel, R, Phipps, S, Foster, PS, et al. Eosinophils: Biological Properties and Role in Health and Disease. *Clinical and Experimental Allergy* 2008; 38:709-750.

Holgate, ST. Asthma-the pathophysiology. In: ST Holgate, MK Churchs. *Allergy*. London: Gower Medical Publishing 1993; 13:1-13.

Holgate, ST. Pathogenesis of Asthma. *Clin and Experimental Allergy* 2008; 38: 872-897.

Howat WJ, Holgate ST, Lackie PM. TGF- β isoform release and activation during in vitro bronchial epithelial wound repair. *Am J Physiol* 2002; 282:L115-23.

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.

Jacobsen EA, Taranova AG, Lee NA. Eosinophils: Singularly destructive effector cells or purveyors of immunoregulation? *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119:1313-20.

Johnston, RA, Theman, TA, Lu, FL, Terry, RD, Williams, ES, Shore, SA. Diet-induced obesity causes innate airway hyperresponsiveness to methacholine and enhances ozone-induced pulmonary inflammation. *J Appl Physiol* 2008; 6:1727-1735.

Johnston RA, Theman TA, Shore SA. Augmented responses to ozone in obese carboxypeptidase E-deficient mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;90:R126-133.

Johnston, RA, Zhu, M, Rivera-Sanchez, YM, Lu, FL, Theman, TA, Flynt, L, Shore, SA. Allergic Airway Responses in Obese Mice *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176:650–658.

Jose PJ, et al. Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. *J Exp Med* 1994; 179:881–887.

Juge-Aubry, CE, Somm, E, Pernin, A, Alizadeh, N, Giusti, V, Dayer, JM, et al. Adipose tissue is a regulated source of interleukin-10. *Cytokine* 2005;29:270–274.

Karol MH. Animal models of occupational asthma. *Eur Respir J* 1994; 5:555-68.

Kariyawasam HH, Robinson DS. The role of eosinophils in airway tissue remodelling in asthma. *Curr Opin Immunol* 2007; 19:681-686.

Kawanami D, et al. Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells: a new insight into adipocytokine-endothelial cell interactions. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;314:415-419.

Kay AB, Durham SR. T-lymphocytes, allergy and asthma. *Clin Exp Allergy* 1991a; 1:17–21.

Kay AB. Eosinophils and asthma. *N Engl J Med* 1991b; 324:1514–1515.

Kay, AB. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Trends Mol Med* 2005; 11: 148–152.

Kay, AB. The role of T lymphocytes in asthma. *Chem Immunol Allergy* 2006; 91:59–75.

Kips JC, Anderson GP, Fredberg JJ, Herz U, Inman MD, Jordana M, et al. Murine models of asthma. *Eur Respir J*. 2003;22:374-382.

Kissebah, AH, and Krakower, GR. Regional adiposity and morbidity. *Physiol Ver* 1994; 74:761–811.

Kraft M, Djukanovic R, Wilson S, Holgate ST, Martin RJ. Alveolar tissue inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 5:1505-1510.

Kroegel C, Virchow JC, Walker C. Asthma. *New Engl J Med* 1993; 328:1639-1640.

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;100:648-657.

Lewkowich IP, Herman NS, Schleifer KW, Dance MP, Chen BL, Dienger KM et al. CD4+CD25+ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. *J Exp Med* 2005;202:1549–1561.

Lintomen L, Gaspar Elsas MIC, Maximiano ES, Paula Neto HA, Joseph D, Vargaftig BB, Elsas XP. Allergic sensitization prevents upregulation of haemopoiesis by cyclo-oxygenase inhibitors in mice. *Br J Pharmacol* 2002; 135:1315-1323.

Lopez AF, Sanderson CJ, Gamble JR, Campbell HD, Young IG, Vadas MA. Recombinant human interleukin 5 is a selective activator of human eosinophil function. *J Exp Med* 1988; 167:219–224.

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; 5:L856-865.

Lougheed, M. D. Variability in asthma: symptom perception, care, and outcomes. *Can J Physiol Pharmacol* 2007; 85: 149-154.

Mannino DM, Homa DM, Akinbami LJ, Moorman JE, Gwynn C, Redd SC. Surveillance for asthma—United States, 1980-1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2002;51:1-13.

Marguet, C, Dean, TP, Warner, JO. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) and interferon-gamma in bronchoalveolar lavage fluid from children with airway diseases. *Am. J. Respir. Crit. CareMed.* 2000; 162: 1016–1022.

Maron, DJ, Fair, JM, Haskell, WL. Saturated fat intake and insulin resistance in men with coronary artery disease. *Circulation*, 1991; 84:2020-2027.

Martín-Romero C, Santos-Alvarez J, Goberna R, Sánchez-Margalet V. Human leptin enhances activation and proliferation of human circulating T lymphocytes. *Cell Immunol.* 2000; 1:15-24.

Masoli M, Fabian D, Holt S et al.. Global Initiative for Asthma (GINA) program: the global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy* 2004; 59:469-478.

Matsuzawa, Y. The metabolic syndrome and adipocytokines. *FEBS Lett* 2006; 580: 2917-2921.

McFadden ER. Asthma. In: Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL, editors. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 13th ed. New York: McGraw-Hill; 1994. p.1167-1172.

McKay, RM, McKay, JP, Avery, Graff, JM). *C. elegans*: a model for exploring the genetics of fat storage. *Dev Cell* 2003; 4: 131–142.

McKay A, Leung BP, McInnes IB, Thomson NC, Liew FY. A novel anti-inflammatory role of simvastatin in a murine model of allergic asthma. *J Immunol* 2004;172:2903-2908.

Macklem PJ, Despas PJ, Leroux M. Site of airway obstruction in asthma. *Chest*. 1973;63:28.

Mehra, R, redline, S. Sleep apnea: a proinflammatory disorder that coaggregates with obesity. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121:1096-1102.

Melnikova, I., D. Wages. 2006. Anti-obesity therapies. *Nat Rev Drug Discov* 5: 369-370.

Minshall EM, Hogg JC, Hamid QA. Cytokine mRNA expression in asthma is not restricted to the large airways. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 3:386-390.

Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:683-765.

Mosen, DM, Schatz, M, Magid, DJ, Camargo, CA. The relationship between obesity and asthma severity and control in adults. *J Allergy Immunol* 2008; 122:507-511.

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.

Murray LA, Syed F, Li L, Griswold DE, Das AM. Role of chemokines in severe asthma. *Curr Drug Targets* 2006; 7:579-588.

Nagase T, Moretto A, Dallaire MJ, Eidelman DH, Martin JG, Ludwig MS. Airway and tissue responses to antigen challenge in sensitized brown Norway rats. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 1:218-226

Murphy PM. The Molecular Biology of Leukocyte Chemoattractant Receptors. *Annual Review of Immunology* 1994; 12:593-633.

Nelson, TL, Vogler, GP, Pedersen, NL, Hong,Y, Miles, TP. Genetic and environmental influences on body fat distribution, fasting insulin levels and CVD: are the influences shared? *Twin Res* 2000; 3: 43–50.

Nguyen MT, Favelyukis S, Nguyen AK, Reichart D, Scott PA, Jenn A, et al. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J Biol Chem* 2007;282:35279-35292.

Nouri-Aria KT, Durham SR. Regulatory T cells and allergic disease. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2008;7(4):237-252.

O'Byrne P. Asthma pathogenesis and allergen-induced late responses. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 5:S85-89.

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

Olshansky SJ, Passaro DJ, Hershow RC, Layden J, Carnes BA, Brody J, Hayflick L, Butler RN, Allison DB, Ludwig DS. A potential decline in life expectancy in the United States in the 21st century. *N Engl J Med* 2005; 352:1138–1145.

Oswal A, Yeo, GSH. The leptin melanocortin pathway and control of body weight: lessons from human and murine genetics. *Obes Rev* 2007;4: 293-306.

Ouchi N, et al. novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 1999;100:2473-2476.

Ouchi, N., S. Kihara, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, K. Walsh. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Curr Opin Lipidol* 2003,14: 561-566.

Palframan RT, Collins PD, Williams TJ, Rankin SM. Eotaxin Induces a Rapid Release of Eosinophils and Their Progenitors From the Bone Marrow. *Blood* 1998; 91:2240-2248.

Parker, DR, Weiss, ST, Troisi, R, Cassano, PA, Vokonas, PS, Landsberg, L. Relationship of dietary saturated fatty acids and body habitus to serum insulin concentration: the normative Anging Study. *Am J Clin Nutr* 1993; 58:129-136.

Pastva A, Estell K, Schoeb TR, Atkinson TP, Schwiebert LM. Aerobic Exercise Attenuates Airway Inflammatory Responses in a Mouse Model of Atopic Asthma. *The Journal of Immunology* 2004; 172:4520-4526.

Peckham, SC, Entenmann, C, Carroll, HW. The influence of a hypercaloric diet on gross body and adipose tissue composition in the rat. *J Nutr* 1962;77:187–189.

Pearce N, Douwes J. The Latin American exception: why is childhood asthma so prevalent in Brazil? *J Pediatr* 2006; 82:319-321.

Pease JE, Williams TJ. Chemokines and their receptors in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118:305-318.

Peters SP. Heterogeneity in the pathology and treatment of asthma. *Am J Med* 2003;115(3A):49S-54S.

Peters-Golden M, Swern A, Bird SS, Hustad CM, Grant E, Edelman JM. Influence of body mass index on the response to controller agents. *Eur Respir J* 2006;27:495-503.

Petrolani M, Lefort J, Vargaftig BB. Active immunization induces lung hyperresponsiveness in the guinea pig. Pharmacologic modulation and triggering role of the booster injection. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138:1572-1578.

Ponath PD, Qin S, Post TW. Molecular cloning and characterization of a human eotaxin receptor expressed selectively on eosinophils. *J Exp Med*; 1996. 183(6):2437-2448.

Pond, CM. An evolutionary and functional view of mammalian adipose tissue. *Proc. Nutr Soc* 1992; 51: 367-377.

Powell WS, Ahmed S, Gravel S, Rokach J. Eotaxin and RANTES enhance 5-oxo-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid-induced eosinophil chemotaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107:272-278.

Prins, JB, and O'Rahilly, S. Regulation of adipose cell number in man. *Clin Sc (Lond)* 1997; 92: 3-11.

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.

Prussin C; Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117(2 Suppl Mini-Primer):S450-456.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 1993; 123(11):1939-51.

Renz H., Smith HR, Henson JE, Ray BS, Irbin CG, Gelfand EW. Aerosolized antigen exposure without adjuvant causes increased IgE production and increased airway responsiveness in the mouse. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89:1127-1138.

Rivera-Sanchez YM, Johnston RA, Schwartzman IN, Valone J, Silverman ES, Fredberg JJ, Shore SA. Differential effects of ozone on airway and tissue mechanics in obese mice. *J Appl Physiol* 2004; 6:2200-2206.

Robbins SL, Kumar V, Cotran RS. *Pathologic Basis of Disease*. 5th ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania 1994. p.583-584.

Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsiocopoulos A, Barkans J, Bentley AM, Corrigan C, Durham SR, Kay AB. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 1992; 326:298-304.

Robinson DS, Bentley AM, Hartnell A, Kay AB, Durham SR. Activated memory T helper cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with atopic asthma: relation to asthma symptoms, lung function, and bronchial responsiveness. *Thorax* 1993; 48:26-32.

Rosenberg HF, Phipps S, Foster PS. Eosinophil trafficking in allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119:1303-10.

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

Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol* 2006; 24:147-174.

Sanderson CJ. Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood* 1992; 79(12):3101-9.

Shahabuddin S, Ponath P, Schleimer PR. Migration of eosinophils across endothelial cell monolayers: interactions among IL-5, endothelial-activating cytokines, and C-C chemokines. *J Immunol* 2000; 164:3847-3854.

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

Sakae RS, Martins MA, Criado PM, Zin WA, Saldiva PH. In vivo evaluation of airway and pulmonary tissue response to inhaled methacholine in the rat. *J Appl Toxicol* 1992; 4:235-238.

Sanchez, MB. Genes y la obesidad. *An Esp Pediatr* 1997 ;46: 1-2.

Sato E, Simpson KL, Grisha MB, Koyama S, Robbins RA. Effects of reactive oxygen and nitrogen metabolites on RANTES- and IL-5-induced eosinophil chemotactic activity in vitro. *Am J Pathol* 1999; 155:591-598.

Schiller, JS, Bernadel, L. Summary health statistics for the US population: National Health Interview Survey, 2002. *Vital Health Stat* 2004;220:1-101.

Schröder, NWJ, Maurer, M. The role of innate immunity in asthma: leads and lessons from mouse models. *Allergy* 2007; 62:579–590.

Schwarzenberg, S.J. Obesity in children: epidemic and opportunity. *Minn Med* 2005; 88:62-66.

Schwenger G, Mordvinov V, Fournier R, Czabotar P, Peroni S, Sanderson CJ. IL-5. IL-5. In: Oppenheim JJ, Feldmann ME. New York, NY7 Academic Press 2000; 861–875.

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.

Sehmi R, Wood LJ, Watson R, Foley R, Hamid Q, O'Byrne PM, Denburg JA. Allergen-induced increases in IL-5 receptor alpha-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.

Szelenyi I. Animal models of bronchial asthma. *Inflamm Res* 2000; 49:639-54.

Shore SA, Rivera-Sanchez YM, Schwartzman IN, Johnston RA. Responses to ozone are increased in obese mice. *J Appl Physiol* 2003; 3:938-845.

Shore, SA, Schwartzman, IN, Mellema, MS, Flynt, L, Imrich, A, Johnston, RA. Effect of leptin on allergic airway responses in mice. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 103-109.

Shore, SA., Terry, RD, Flynt, L, Xu, A, Hug, C. Adiponectin attenuates allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness in mice. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118: 389-395.

Shore SA, Johnston RA. Obesity and asthma. *Pharmacol Ther* 2006;110:83-102.

Shore SA. Obesity and asthma: implications for treatment. *Curr Opin Pulm Med* 2007a;13:56-62.

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

Shore, SA. Obesity and asthma: possible mechanisms. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121:1087-1093.

Sin DD, Sutherland ER. Obesity and the lung: Obesity and asthma. *Thorax* 2008; 63:1018-23.

Smith, CH, Barker, JN, Lee, TH, Adhesion molecules in allergic inflammation. *Am. Rev. Respir. Dis* 1993; 148: S75–S78.

Smit JJ, Lukacs NW. A closer look at chemokines and their role in asthmatic responses. *Eur J Pharmacol* 2006; 533:277-288.

Sur S, Lam J, Bouchard P, Sigounas A, Holbert D, Metzger VJ. Immunomodulatory effects of IL-12 on allergic lung inflammation depend on timing of doses. *J Immunol* 1996;157:4173–4180.

Surwit RS, Kuhn CM, Cochrane C, McCubbin JA, Feinglos MN. Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes* 1988;37:1163–1167.

Surwit RS, Feinglos MN, Rodin J, et al. Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. *Metabolism* 1995; 44:645–651.

Sutherland ER, Martin RJ. Distal lung inflammation in asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; 2:119-124.

Tantisira KG, Litonjua AA, Weiss ST, Fuhlbrigge AL. Association of body mass with pulmonary function in the Childhood Asthma Management Program (CAMP). *Thorax* 2003;58:1036-1041.

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.

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;63:14-20.

Ten Broeke R, de Crom R, van Haperen R, Verweij V, Leusink-Muis T, van Ark I, de Clerck F, Nijkamp FP, Folkerts G. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase suppresses features of allergic asthma in mice. *Respiratory Research* 2006; 7:58.

Tian DR, Li XD, Shi YS, et al. Changes of hypothalamic alpha-MSH and CART peptide expression in diet-induced obese rats. *Peptides* 2004;25:2147–2153.

Tilg, H., A. R. Moschen. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 772-783.

Thomas, PS. Tumour necrosis factor-alpha: the role of this multifunctional cytokine in asthma. *Immunol Cell Biol.* 2001;79(2):132-140.

Trivedi SG, Lloyd CM. Eosinophils in the pathogenesis of allergic airways disease. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64:1269-1289.

Trujillo, M.E., P.E. Scherer. Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. *Endocr Rev* 2006; 27: 762-778.

Tulić MK, Hamid Q. Contribution of the distal lung to the pathologic and physiologic changes in asthma: potential therapeutic target. *Chest* 2003; 3: 348S-355S

Umamoto Y, et al. Leptin stimulates the proliferation of murine myelocytic and primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1997; 90:3438-3443.

Umetsu, DT, Dekruyff, RH. A role for natural killer T cells in asthma. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 953–958.

Vargaftig BB. What can we learn from murine models of asthma? *Clin. Exp. Allergy* 1999; 29 Suppl 1: 9-13.

Varraso R, Siroux V, Maccario J, Pin I, Kauffmann F. Asthma severity is associated with body mass index and early menarche in women. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:334-339.

Verstraelen, S, Bloemen, K, Nelissen, I, Witters, H, Schoeters, G, Van Den Heuvel, R. Cell types involved in allergic asthma and their use in in vitro models to assess respiratory sensitization. *Toxicology in Vitro* 2008; 22:1419–1431.

Wang J, Alexander JT, Zheng P, Yu HJ, Dourmashkin J, Leibowitz SF. Behavioral and endocrine traits of obesity-prone and obesity-resistant rats on macronutrient diets. *Am J Physiol* 1998;274:E1057–1066.

Wang J, Palmer K, Lotvall J, Milan S, Lei XF, Matthaei KI, et al. Circulating, but not local lung, IL-5 is required for the development of antigen-induced airways eosinophilia. *J Clin Invest* 1998;102:1132–1141.

Ward MDM, Selgrade MJK. Animal models for protein respiratory sensitizers. *Methods* 2006; 41:80-90.

Weiss ST. Obesity: insight into the origins of asthma. *Nat Immunol* 2005;6:537-539.

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;112:1796-808.

Weller PE. Immunobiology of eosinophils. *N Engl J Med* 1991; 324:1110.

West DB, Boozer CN, Moody DL, Atkinson RL. Dietary obesity in nine inbred mouse strains. *Am J Physiol* 1992; 262:R1025–1032.

West DB, York B. Dietary fat, genetic predisposition, and obesity: lessons from animal models. *Am J Clin Nutr* 1998; 67: 505–12S.

Wong, C.K., Cheung, P.F., Lam, C.W. Leptin-mediated cytokine release and migration of eosinophils: implications for immunopathophysiology of allergic inflammation. *Eur J Immunol* 2007; 37:2337-2348.

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; 18:759-767.

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.

Wooley MJ, Denburg A, Rllis R, Dahlback M, P'Obyrne PM. Allergen induced changes in bone marrow progenitors and airway responsiveness in dogs and the effect of inhaled budesonide on these parameters. *Am J Resp Cell Mol Biol* 1994; 11:600-606.

World Health Organization. 2004. Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health. Wulster-Radcliffe MC, Ajuwon KM, Wang J, Christian JA, Spurlock ME. Adiponectin differentially regulate cytokines in porcine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 316:924-9.

Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003;112:1821-1830.

Yanai M, Sekizawa K, Ohrui T, Sasaki H, Takishima T. Site of airway obstruction in pulmonary disease: direct measurement of intrabronchial pressure. *J Appl Physiol*. 1992;72(3):1016-1023.

Yamaguchi Y, et al. Purified interleukin 5 supports the terminal differentiation and proliferation of murine eosinophilic precursors. *J Exp Med* 1988; 167:43–56.

Yeh YF, Huang SL. Dietary cholesterol enhances pulmonary eosinophilic inflammation in a murine model of asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2001;125:329-334.

Ying S, Meng Q, Zeibecoglou K, Robinson DS, Macfarlane A, Humbert M, Kay AB. Eosinophil Chemotactic chemokines (Eotaxin, Eotaxin-2, RANTES, Monocyte Chemoattractant Protein-3 (MCP-3), and MCP-4), and C-C Chemokine Receptor 3 Expression in Bronchial Biopsies from Atopic and Nonatopic (Intrinsic) Asthmatics. *The Journal of Immunology* 1999; 163:6321-6329.

Yssel H, Johnson KE, Schneider PV, Wideman J, Terr A, Kastelein R et al. T cell activation-inducing epitopes of the house dust mite allergen Der p I. Proliferation and lymphokine production patterns by Der p I-specific CD4+ T cell clones. *J Immunol* 1992;148:738–745.

Zimmermann N, Hershey GK, Foster PS, Rothenberg ME. Chemokines in asthma: cooperative interaction between chemokines and IL-13. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003; 111:227-42.

Zosky GR, Sly PD, Turner DJ. Mouse models of asthma: What physiological evidence are they based on? *Allergy Clin Immunol Int* 2006; 18:76-79.



8. Anexo





UNICAMP



CEEA/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp**

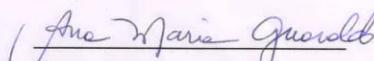
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **1496-1**, sobre "**Influência da obesidade no desenvolvimento da asma alérgica**", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Edson Antunes / Marina Ciarallo Calixto**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **31 de março de 2008**.

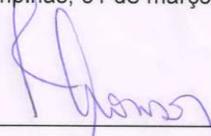
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1496-1**, entitled "**Influence of obesity in the development of allergic asthma**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **March 31, 2008**.

Campinas, 31 de março de 2008.



Profa. Dra. Ana Aparecida Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>