

FLAVIA MARCIA DE CASTRO E SILVA

**INFLUÊNCIA DA OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA SOBRE A
RESPOSTA IMUNE EM MODELO EXPERIMENTAL DE ALERGIA PULMONAR**

Tese de doutorado do curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas na área de Imunologia.

Orientadora: Prof. ^a Dr^a Ana Paula Ferreira

Juiz de Fora

2015

*“Mesmo quando tudo parece desabar,
cabe a mim decidir entre rir ou chorar,
ir ou ficar, desistir ou lutar;
porque descobri, no caminho incerto da vida,
que o mais importante é o decidir.”*
Cora Coralina

Dedico esse trabalho

Ao meu marido e aos meus filhos, pessoas que tanto amo e que me incentivaram e apoiaram tanto nessa etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo, pelos momentos difíceis sem os quais não foi possível crescer, pelos momentos felizes que me confortam, por minha família e meus amigos que sempre estiveram ao meu lado. Agradeço a oportunidade de viver, de errar e de ter a oportunidade de aprender com meus erros.

Ao meu esposo, Gilmar e aos meus filhos Bernardo e Gustavo, pelo apoio incondicional, incentivo, pela paciência e compreensão pelas minhas ausências e acima de tudo por acreditarem que eu fosse capaz de chegar onde estou hoje.

Aos meus pais, uma eterna gratidão, por nos momentos bons e difíceis estarem sempre ao meu lado.

A minha orientadora Dr^a Ana Paula Ferreira, a qual eu tenho profunda admiração e respeito, agradeço pela oportunidade, orientação, incentivo, que tanto contribuíram para minha formação.

Aos meus amigos queridos do Laboratório de Imunologia; Ana Claudia e ao Erick, que sempre estiveram ao meu lado, desde o início, me auxiliando, incentivando, discutindo, participando ativamente no desenvolvimento e execução de todo o projeto.

Aos amigos que conviveram comigo, mas que agora estão em outra etapa de suas vidas, a quem eu sempre agradecerei por terem contribuído em algum tempo e de alguma forma para o desenvolvimento desse projeto: Alessa, Caio, Fernanda.

Aos alunos de iniciação científica que passaram durante o desenvolvimento do projeto e que foram peças fundamentais para que tudo ocorresse na mais perfeita ordem: Leandra, Wesley, Marina.

A Barbara, Ana Cristina, Luan e Marcela, por terem contribuído em vários momentos de aperto...

Aos demais amigos do laboratório que não participaram ativamente do projeto, mas que estavam sempre presentes em todos os momentos, Ana Marcia, Alíria, Sandra.

A Prof. Dr^a Jacy Gameiro, por ter nos ajudado na padronização do modelo de obesidade e pelo apoio científico.

Às funcionárias do laboratório Sirlei, Leidiana, por zelarem pelo bom funcionamento do nosso ambiente de trabalho e por estarem sempre na torcida para que tudo corresse bem.

Aos animais experimentais que foram indispensáveis para o desenvolvimento deste projeto e da ciência.

A CAPES, FAPEMIG e CNPQ e a Universidade Federal de Juiz de Fora.

RESUMO

A asma e a obesidade são doenças inflamatórias crônicas de perfis imunológicos opostos. Contudo, estudos clínicos e epidemiológicos demonstram uma associação entre as duas patologias, através da observação de que indivíduos obesos asmáticos representam um fenótipo clínico distinto da asma alérgica clássica, apresentando aumento na gravidade dos sintomas e resistência a terapias convencionais. Entretanto, os mecanismos imunológicos envolvidos na associação obesidade e asma não estão esclarecidos, devido à escassez de estudos e a uma heterogeneidade nos dados encontrados em modelos experimentais. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da obesidade sobre a inflamação alérgica pulmonar. Para isso, a obesidade foi induzida por dieta com alto teor de gordura durante dez semanas nos animais dos grupos OB e OB/AP, enquanto os animais dos grupos CN e AP foram alimentados com a dieta padrão. Da sexta a décima semana do protocolo de indução da obesidade, os animais dos grupos AP e OB/AP foram submetidos a subseqüentes sensibilizações e desafios com a ovalbumina. As análises foram realizadas em 24 e 48 horas após o último desafio com a OVA. Os resultados demonstraram que após os desafios com o alérgeno, os animais do grupo AP apresentaram características marcantes da resposta imune alérgica, com elevado número de eosinófilos no LBA, no tecido pulmonar e na medula óssea, correlacionando com os níveis elevados de CCL11 e peroxidase eosinofílica, além de citocinas de perfil Th2 como IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-25, IL-33 e TSLP e de IgE sérica anti-OVA. Contudo, foi observado em 48 horas um declínio na resposta de perfil Th2 nos animais deste grupo. Já os animais do grupo OB/AP apresentaram em 24 horas, um menor número de eosinófilos no lavado broncoalveolar, no tecido pulmonar e na medula óssea, associado a menores níveis de CCL11, EPO e de IL-4, IL-5, TSLP e IL-25 assim como de IgE sérica anti-OVA. Em 48 horas, as análises de citocinas no grupo OB/AP demonstraram um aumento nos níveis de IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-9, IL-12, IL-13, IL-17A, TNF- α e IFN- γ associado ao maior influxo de macrófagos M1. Surpreendentemente, em 48 horas após o último desafio com a OVA, houve um aumento significativo de neutrófilos na medula óssea e de mieloperoxidase no tecido pulmonar. Paralelamente, os animais do grupo OB/AP, apresentaram um número maior de mastócitos e células caliciformes em ambos os tempos analisados, quando comparado aos animais do grupo AP. Conclusão: Somados estes resultados sugerem que a obesidade desenvolvida em camundongos BALB/c, foi capaz de influenciar a resposta imune no pulmão dos animais após as sensibilizações e os desafios com alérgeno, interferindo no desenvolvimento da resposta imune Th2 clássica e acarretando um atraso no desenvolvimento da resposta imune inflamatória. Adicionalmente, os animais obesos asmáticos apresentaram exacerbada resposta imune Th2, Th9 e altos níveis de IL-17A associada a um maior influxo de neutrófilos para o pulmão e a uma intensa produção de muco, sugerindo que estes animais apresentaram um perfil inflamatório mais grave de alergia pulmonar.

Palavras-chave: obesidade; asma; resposta imune Th2; resposta imune Th17; inflamação eosinofílica, inflamação neutrofílica.

ABSTRACT

Asthma and obesity are chronic inflammatory diseases with opposite immune profiles. Although, clinical and epidemiological studies reveal the association between them, as obese asthmatic individuals represent a distinct phenotype from the classic allergic asthma. However, the immune mechanisms involved in this association are not established yet, due to the lack of studies and the heterogeneity of the data obtained in experimental models. Therefore, the present study aimed to evaluate the influence of obesity over the immune response pulmonary allergic. Female Balb/c mice were fed with high fat diet during ten weeks so as to induce obesity. From the sixth to the tenth week of the protocol, PA and PA/OB groups were sensitized and challenged with ovalbumin. The following analyses were performed 24 and 48 hours after the last OVA challenge. Striking features of the allergic immune response were observed in the PA group, as elevated eosinophil count in BAL, lung tissue bone marrow, in association with high IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-25, IL-33, TSLP and anti-OVA IgE levels. There was also elevated production of CCL11 and EPO correlated with the eosinophilia. In contrast, IL-4, IL-5, TSLP and IL-25 levels were diminished in PA/OB group. In association with the reduced eosinophil count, low levels of CCL11, EPO and Anti-OVA IgE were detected. However, 48 hours after the last challenge, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-9, IL-12, IL-13, IL-17A, TNF- α and IFN- γ level were higher in the PA/OB, there was also an increased M1 macrophage influx. There was also more neutrophils in the bone marrow and MPO in the lung tissue, indicating their increased influx to the lung of PA/OB animals. Mast cells and goblet cells count was increased in this group, 24 and 48 hours after the last challenge. Taken together these results suggest that obesity developed in BALB/c mice was able to influence the immune response in the lungs of animals after sensitization and challenge with allergen, interfering with the immune response classical Th2 and causing a delay in the development inflammatory immune response. Additionally, asthmatic obese animals showed exaggerated Th2 immune response, Th9 and high IL-17A levels associated with an increased influx of neutrophils into the lung and an intense mucus production, suggesting that these animals showed an allergy more severe inflammatory profile lung.

Keywords: Obesity; Asthma; Th2 immune response; Th17 immune response; Eosinophilic inflammation; Neutrophilic inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Prevalência da asma no mundo.....	15
Figura 2:	Desenvolvimento da resposta imune alérgica.....	20
Figura 2:	Diferentes fenótipos de asma baseado na distinção da resposta imune Th2 não Th2.....	24
Figura 4:	Prevalência da obesidade em indivíduos de ambos os sexos acima de 20 anos de idade em 2008.....	26
Figura 5:	Modulação fenotípica no tecido adiposo.....	31
Figura 6:	Delineamento experimental do protocolo de indução de obesidade e alergia pulmonar experimental.....	42
Figura 7:	Caracterização da obesidade em camundongos BALB/c fêmeas.....	52
Figura 8:	Imagem representativa da histologia do tecido perigonadal...	54
Figura 9:	Glicemia de jejum e perfil lipídico no soro dos animais após 10 semanas de protocolo.....	56
Figura 10:	Avaliação dos níveis séricos de leptina e TNF- β após 10 semanas de dieta.....	58
Figura 11:	Contagem total e específica de leucócitos no LBA.....	61
Figura 12:	Avaliação do infiltrado inflamatório pulmonar.....	64
Figura 13:	Avaliação do infiltrado eosinofílico no tecido pulmonar.....	65
Figura 14:	Avaliação do número de mastócitos na traquéia e no pulmão.	66
Figura 15:	Avaliação do número de células caliciformes produtoras de muco no epitélio pulmonar.....	69
Figura 16:	Avaliação da expressão da enzima arginase em macrófagos alveolares (Mac-Arg ⁺).....	71
Figura 17:	Avaliação da expressão da enzima iNOS em macrófagos alveolares (Mac-iNOS ⁺).....	73
Figura 18:	Avaliação da atividade de EPO no pulmão.....	75
Figura 19:	Avaliação dos níveis de CCL11 no homogenato do tecido pulmonar	77
Figura 20:	Avaliação do número de eosinófilos e neutrófilos na medula óssea	79

Figura 21:	Avaliação do número de neutrófilos no pulmão	83
Figura 22:	Avaliação dos níveis da atividade da MPO.....	84
Figura 23:	Avaliação dos níveis séricos de IgE específica anti-OVA	86
Figura 24:	Avaliação dos níveis de leptina no homogenato do tecido pulmonar.....	88
Figura 25:	Avaliação dos níveis de citocinas de perfil Th2 no homogenato do tecido pulmonar.....	90
Figura 26:	Avaliação dos níveis de citocinas epiteliais no homogenato do tecido pulmonar.....	92
Figura 27:	Avaliação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias no homogenato do tecido pulmonar.....	93
Figura 28:	Avaliação dos níveis de citocinas de perfil Th1 no homogenato do tecido pulmonar.....	95
Figura 29:	Hipótese do efeito da obesidade na resposta imune desenvolvida no pulmão de camundongos BALB/c fêmeas antes e depois das sensibilizações e desafios com a OVA.....	104
Tabela 1	Composição das dietas padrão e hiperlipídica.....	40
Tabela 2	Grupos de animais utilizados no protocolo, de acordo com os procedimentos adotados.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABESO – Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade
- AP – Alergia Pulmonar
- APCs – Antigen presenting cell / Células apresentadoras de antígenos
- Arg- Arginase
- CCL11 - Chemokine (C-C motif) ligand 11/Quimiocina (C-C motive) ligante 11
- CDs – Células dendríticas
- CLS – Crown like structures / Estruturas em forma de coroa de células
- CN – Controle
- DAB - Diaminobenzidina
- DAMPs – Damage associated molecular pattern/Padrão molecular associado a danos
- DEXA - Dual Energy X Ray absorptiometry/ Raio X de dupla Energia
- DH – Dieta Hiperlipídica
- DP- Dieta Padrão
- EPO – Eosinophil peroxidase/Peroxidase eosinofílica
- Fc ϵ RI- Receptor I para porção Fc da Imunoglobulina-E
- GINA – Global Iniciativa for Asthma / Iniciativa Global para Asma
- HDL – lipoproteína de alta densidade
- HTAB - hexadeciltrimetil brometo de amônio
- IFN- γ - Interferon-gama
- IgE- Imunoglobulina E
- IgM – Imunoglobulina M
- ILCs -1, 2, 3 - Innate lymphoid cell/células linfóides inatas.
- IMC – índice de massa corporal
- iNOS – Induzible Nitric Oxid Sintase/Óxido Nítrico Sintase induzível
- LPS – Lipopolissacarídeo
- LBA – lavado broncoalveolar
- LDL – lipoproteína de baixa densidade

Mac- Macrófagos

MCP1 – Monocyte Chemoattractant Protein/Proteína quimioatraente de monócitos 1

MHC-II – Major Histocompatibility complex/ Principal Complexo de histocompatibilidade

MPO - Mieloperoxidase

NLRP3 – Nod like receptores 3 / receptores Nod 3

OB – Obesidade

OB/AP – Obesidade/Alergia Pulmonar

OMS – Organização Mundial de Saúde / World Health Organization

OPD - Ortofenildiamina

OVA - Ovalbumina

PAMPs - Pathogen-associated molecular pattern/Padrão molecular associado ao patógeno

PBS – tampão salina fosfato

ROS – reactive oxygen species / espécies reativas do oxigênio

RPM – rotações por minuto

Tbet – T box transcription factor

Th1 – T helper 1

Th17 – T helper 17

Th2 – T helper 2

TLRs – Toll Like Receptors / Receptores do tipo Toll

TNF- α – Tumor necrose factor alpha / Fator de necrose tumoral

TRegs – T regulatórias

TSLP – Thymic stromal Lymphopoietin / linfopoiética do estroma tímico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Asma	14
1.1.1	Definição.....	14
1.2	Obesidade	25
1.2.1	Definição.....	25
1.3	Obesidade e Asma	32
1.4	O modelo de obesidade e asma.....	36
2	OBJETIVOS.....	38
2.1	Objetivo geral	38
2.2	Objetivos específicos.....	38
3	MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1	Animais.....	40
3.2	Composição das dietas	40
3.3	Grupos experimentais	41
3.4	Indução do modelo de obesidade.....	42
3.5	Avaliação do consumo da ração e da massa corporal	42
3.6	Indução do modelo de alergia pulmonar experimental	43
3.7	Obtenção do material biológico	43
3.7.1	Coleta do soro	44
3.7.2	Coleta e processamento do lavado broncoalveolar (LBA) para contagem total e diferencial de células.....	44
3.7.3	Coleta da medula óssea	45
3.7.4	Coleta e processamento do pulmão para dosagem de citocinas, CCL11, EPO e MPO.	45
3.7.5	Coleta do tecido adiposo	46

3.8	Dosagem de Glicemia de jejum, triglicérides, colesterol total e frações	46
3.9	Dosagem sérica de anticorpos IgE anti-OVA	46
3.10	Contagem total e diferencial de leucócitos no lavado broncoalveolar	47
3.11	Contagem total e diferencial de granulócitos na medula óssea	47
3.12	Avaliação histológica do tecido pulmonar	48
3.13	Avaliação do perfil fenotípico de macrófagos e a número de neutrófilos no tecido pulmonar	49
3.14	Dosagem de citocinas e CCL11 no homogenato do tecido pulmonar	50
3.15	Avaliação da atividade das enzimas peroxidase eosinofílica (EPO) e mieloperoxidase (MPO).....	51
3.16	Análise Estatística	52
4	RESULTADOS	53
4.1	Caracterização da obesidade em camundongos BALB/c fêmeas	53
4.1.1	Consumo das dietas padrão e hiperlipídica, ganho de peso e acúmulo das gorduras perigonadal e retroperitoneal	53
4.1.2	Avaliação histológica do tecido adiposo perigonadal.....	55
4.1.3	Avaliação da glicemia de jejum e do perfil lipídico.....	57
4.1.4	Avaliação dos níveis séricos de leptina e TNF- α	59
4.2	Influência da obesidade induzida por dieta sobre a resposta imune em modelo de alergia pulmonar, 24 e 48 horas após o último desafio com a ovalbumina.	61
4.2.1	Contagem total e específica de leucócitos no lavado broncoalveolar....	61
4.2.2	Avaliação do infiltrado inflamatório pulmonar	64
4.2.3	Contagem de eosinófilos no tecido pulmonar através de coloração com Sirius Red	66
4.2.4	Contagem de mastócitos no pulmão e na traquéia.....	68
4.2.5	Contagem de células caliciformes no epitélio pulmonar	70
4.2.6	Expressão da enzima arginase em macrófagos alveolares.....	72
4.2.7	Expressão da enzima iNOS em macrófagos alveolares	74
4.2.8	Avaliação da atividade da enzima peroxidase eosinofílica (EPO).	76

4.2.9	Avaliação dos níveis da quimiocina CCL11	78
4.2.10	Avaliação do número de eosinófilos e neutrófilos na medula óssea.....	80
4.2.11	Avaliação do número de neutrófilos no tecido pulmonar	82
4.2.12	Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).....	84
4.2.13	Avaliação dos níveis séricos de IgE-específica anti-OVA.....	86
4.2.14	Avaliação dos níveis de leptina no pulmão	88
4.2.15	Avaliação dos níveis de citocinas de perfil Th2, TSLP, IL-25 e IL-33	90
4.2.16	Avaliação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias.....	93
4.2.17	Avaliação dos níveis de citocinas de perfil de Th1	95
5	DISCUSSÃO.....	97
6	CONCLUSÃO	110
7	REFERÊNCIAS	Erro! Indicador não definido.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Asma

1.1.1 Definição

A asma é uma doença inflamatória crônica desenvolvida no pulmão, que apresenta sintomas característicos como: hiperresponsividade das vias aéreas, com episódios recorrentes de sibilância, dispneia, aperto no peito e tosse. Estes sintomas estão associados à obstrução e limitação variável ao fluxo aéreo, devido à broncoconstrição, hipersecreção de muco e do processo inflamatório desenvolvido, podendo ser reversível espontaneamente ou com tratamento (GINA, 2014). Somado a estes fatores, a hipertrofia e a hiperplasia da musculatura das vias aéreas, bem como o aumento no número de células caliciformes produtoras de muco no epitélio e a fibrose da membrana basal subepitelial levam a mudanças estruturais, resultando no remodelamento tecidual, que está relacionado à cronicidade e à gravidade da doença (HOLGATE, 2012).

De acordo com o Guia para iniciativa da asma (GINA, 2014), a asma acomete aproximadamente 7% a 10% da população mundial, o que corresponde a cerca de 300 milhões de pessoas. Estima-se que nos próximos 15 a 20 anos, este número poderá alcançar 400 milhões de indivíduos e sua prevalência vem aumentando significativamente nas últimas décadas em muitos países (Figura 1). No Brasil, segundo as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o Manejo da Asma (2012) existem aproximadamente 20 milhões de asmáticos. Em 2011 foram registradas 160 mil hospitalizações (DATASUS), dado que colocou a asma como a quarta causa de internação no país. Porém, o nível de controle da asma, a gravidade da doença e os recursos médicos utilizados nos tratamentos são pouco documentados. Embora, um estudo recente (SANTOS et al., 2012) demonstrou que o custo direto da asma, considerando-se a utilização de serviços de saúde e medicações, foi o dobro entre pacientes com asma não controlada, quando comparados àqueles com asma controlada (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA PARA O MANEJO DA ASMA, 2012).

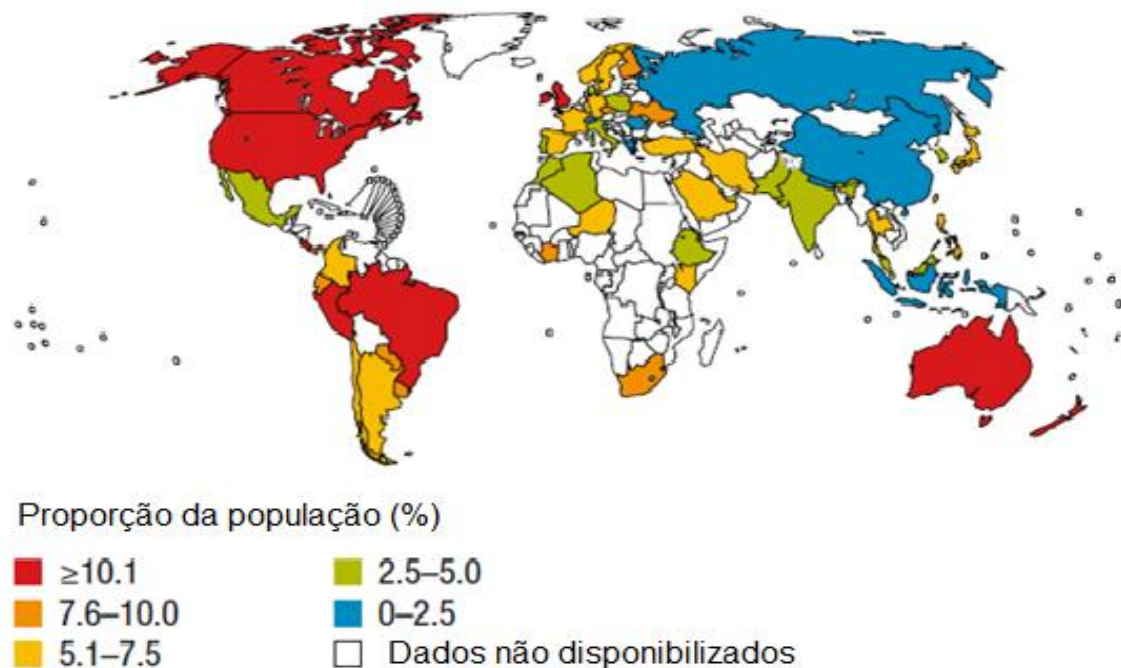


Figura 1: Prevalência da asma no mundo (GINA, 2014).

Algumas hipóteses já foram postuladas na tentativa de explicar o elevado aumento na prevalência de doenças atópicas em países desenvolvidos. Em 1989 Strachan propôs a “Hipótese da Higiene”. Segundo essa hipótese, mudanças decorrentes do moderno estilo de vida, incluindo os cuidados com a saúde, o aprimoramento no sistema de saúde pública, programas de vacinação e hábitos de higiene, em paralelo à exposição diminuída a produtos microbianos durante a infância, podem favorecer o desenvolvimento de doenças alérgicas (WILLS-KARP; SANTELIZ; KARP, 2001; GERN e BUSSE, 2002; BROOKS, PEARCE, DOUWES, 2013). Esta hipótese se baseia no fato de que a polarização da resposta imune para perfil Th1 decorrente de contatos com micro-organismos patogênicos, ainda na infância, atuaria inibindo o desenvolvimento da resposta imune para o perfil Th2 associada com a resposta alérgica (WILLS-KARP; SANTELIZ; KARP, 2001). Entretanto, não está claro este efeito, ao contrário, já foi descrito que certos tipos de infecções podem aumentar o risco ou até mesmo exacerbar a asma preexistente (HOLGATE et al., 2007).

Embora a hipótese da higiene possa explicar em parte o aumento na prevalência da asma, estudos epidemiológicos demonstram que outros fatores

também possam contribuir para o aumento no número de casos de asma no mundo, entre eles fatores associados a mudanças no estilo de vida, maior exposição a poluentes, fumaça de cigarro, estresse, consumo de dietas ricas em calorias e obesidade (WENZEL, 2012; ANTÓ, 2012; SEARS, 2014).

Reconhecidamente a asma é uma doença complexa e heterogênea, que se desenvolve em decorrência da associação de fatores genéticos com fatores ambientais resultando em diferentes fenótipos clínicos. Estes fenótipos geralmente são classificados de acordo com o *status* atópico, com a expressão de genes, assim como com a idade, gênero e com o tipo de resposta inflamatória apresentada (Figura 3) (BAINES et al., 2007; WANG et al., 2011; AMELINK et al., 2013 a/b; MOORE et al., 2013; SCHATZ et al., 2013). Mas apesar das vias que determinam estes diferentes fenótipos poderem coexistir em sinergia no mesmo indivíduo, acredita-se que diferentes mecanismos patogênicos possam estar atuando. Desse modo, a gravidade dos sintomas assim como as características patológicas pode variar de indivíduo para indivíduo (KIM, DEKRUYFF, UMETSU, 2010).

Dentre os fenótipos de asma, a forma alérgica, é considerada a mais comum, afetando principalmente crianças e adultos jovens que apresentam história familiar de alergia, com forte predisposição genética (WENZEL, 2012). Frequentemente, este fenótipo pode ser identificado pelo teste positivo de hipersensibilidade cutânea e níveis elevados de imunoglobulina-E (IgE) antígeno-específica (atopia) no soro em resposta a antígenos ambientais inócuos, denominados alérgenos, como o ácaro da poeira doméstica, pêlos de animais, pólen ou mofo (HOLGATE, 2012; WENZEL, 2012).

A resposta imune alérgica pode ser dividida em duas fases: a fase de sensibilização e a fase efetora. A fase de sensibilização pode ocorrer na infância a partir do primeiro contato com o alérgeno, determinando a prevalência de uma resposta imune adaptativa de perfil Th2 em detrimento das respostas imune de perfil Th1 e regulatória no pulmão (HOLGATE et al., 2007). Nesta fase, o antígeno é capturado, processado e transportado até os linfonodos drenantes pelas células dendríticas (CDs), onde elas apresentam o antígeno processado ligado ao MHC-II aos linfócitos T virgens, que são ativados e direcionados a desenvolver uma resposta imune de perfil Th2 pela liberação de citocinas como a IL-5 e IL-9, que atuam no recrutamento e manutenção da sobrevivência de eosinófilos e mastócitos, respectivamente. Além dessas, as citocinas IL-4 e IL-13 que provêm o primeiro sinal

durante a interação entre linfócitos T e B, para estimular a produção e a mudança de classe de isótipo de imunoglobulina IgM para IgE nos linfócitos B. Sendo que a IgE produzida e liberada liga-se a receptores de alta afinidade para a porção Fc da IgE (Fc ϵ RI) presentes na superfície de mastócitos e basófilos (WU e ZARRIN, 2014).

A fase efetora se inicia a partir de contatos subsequentes com o alérgeno podendo ser subdividida em duas etapas. Dessa forma, a fase de hipersensibilidade imediata ocorre dentro de poucos minutos a partir do contato com o alérgeno. Este, liga-se ao complexo IgE-Fc ϵ RI, localizado na superfície de mastócitos sensibilizados, ativando-os e promovendo sua degranulação, com a liberação de mediadores inflamatórios e lipídicos presentes em seus grânulos, como histamina, leucotrienos, proteases, citocinas e quimiocinas, que promovem o recrutamento celular para as vias aéreas. Em conjunto estes mediadores estão envolvidos direta e indiretamente com o aumento da permeabilidade vascular e da contração da musculatura lisa pulmonar (PAUL e ZHU, 2010). Após o contato inicial com o alérgeno, cerca de 2 a 3 horas depois se desenvolve a fase de hipersensibilidade tardia que pode se estender por mais de 24 horas. Ainda nesta fase, linfócitos Th2 que migraram para o pulmão tornam-se as principais células responsáveis pelo recrutamento e ativação de eosinófilos e mastócitos promovendo ativação contínua da resposta imune de perfil Th2. Além disso, estas células podem atuar também sobre as células epiteliais através da ação das citocinas IL-4, IL-9 e IL-13, induzindo a produção de muco, hiperplasia globular e hiperresponsividade (PAUL e ZHU, 2010). Contatos repetidos com o alérgeno levam a uma inflamação persistente levando à doença à cronicidade, caracterizada pela alteração na fisiologia pulmonar em decorrência do remodelamento tecidual nas vias aéreas, que incluem metaplasia brônquica, hipertrofia da musculatura lisa e deposição de colágeno (HOLGATE, 2012).

Dentro deste contexto, a inflamação pulmonar eosinofílica é considerada uma característica marcante na asma alérgica, particularmente quando relacionada a episódios de exacerbações (HALDAR et al., 2008; 2009) e remodelamento das vias aéreas (YASUKAWA et al., 2013). Uma vez no pulmão, os eosinófilos liberam grânulos contendo mediadores inflamatórios como a peroxidase eosinofílica (EPO), envolvida na disfunção e no remodelamento das vias aéreas (PEGORIER et al., 2006). No processo inflamatório eosinofílico, a IL-5 exerce uma importante função, estimulando a produção de eosinófilos a partir de precursores na medula óssea, além de aumentar a sobrevivência e ativação destas células (SITKAUSKIENE et al.,

2004). Embora, já tenha sido demonstrado que outras citocinas como a IL-4 (CHEN et al., 2004), IL-13 (MATTES et al., 2002) e IL-33 (CHERRY et al., 2008) podem atuar da mesma forma. Somado a estes fatores, a CCL11 ou eotaxina-1 é considerada um importante fator quimiotático de eosinófilos para as vias aéreas (POPE et al., 2005).

Contudo, estudos indicam que o desenvolvimento da asma não está restrito somente ao sistema imune adaptativo, sendo a interação com o sistema imune inato crucial para a iniciação e manutenção da resposta inflamatória alérgica (HAMMAD et al., 2009; XIAO et al., 2011). Uma vez que já foi observada que em indivíduos asmáticos a barreira física formada pelas células epiteliais brônquicas se encontra danificada, sugerindo que a entrada do alérgeno nas vias aéreas poderia ser facilitada permitindo que as células dendríticas tornem-se diretamente ativadas pela interação com o alérgeno (XIAO et al., 2011). Adicionalmente, as células epiteliais são células metabolicamente ativas consideradas células apresentadoras de antígeno (APCs), capazes de expressar uma variedade de receptores, incluindo os receptores do tipo Toll (TLR) (HAMMAD et al., 2009). Estas células respondem rapidamente a estímulos derivados de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos de padrões (DAMPs), através da liberação precoce de citocinas pró-inflamatórias como IL-25, também conhecida como IL-17E, IL-33 e a linfopoietina do estroma tímico (TSLP) (HAMMAD et al., 2009). Estas citocinas podem atuar diretamente em células dendríticas, estimulando-as a maturação e migração da medula óssea para o pulmão, além de induzir a produção de IL-5 e IL-13 o que conseqüentemente levará a polarização da resposta imune para o perfil Th2 (WANG et al., 2007; BESNARD et al., 2011; FROIDURE et al., 2014). Além desse efeito, IL-33 e TSLP estão envolvidas na manutenção da resposta inflamatória alérgica através da amplificação da polarização de macrófagos M2 ou alternativamente ativados (KUROWSKA-STOLARSKA et al., 2009; HAN et al., 2014) na ativação de mastócitos (ENOKSSON et al., 2011; HAN et al., 2014) e de eosinófilos (COOK et al., 2012; STORLARSKI et al., 2010). Ressaltando a importância dessas citocinas na fase inicial do desenvolvimento da resposta imune alérgica, estudos demonstram que o bloqueio ou a ausência de IL-25, IL-33 e TSLP reduz drasticamente a resposta imune de perfil Th2, e muitas das patologias características da asma alérgica como hiperresponsividade e produção de muco (BALLANTYNE et al., 2007; SHI et al., 2008; MIZUTANI et al., 2013)

Além disso, IL-25, IL-33 e TSLP podem atuar em um grupo de células de origem linfóide que não são nem linfócitos B e nem linfócitos T, e que não expressam receptores específicos para o antígeno denominadas de células linfóides inatas (ILCs). Estas células se encontram distribuídas constitutivamente em diferentes tecidos (NEILL et al., 2010; SONNENBERG et al., 2011) e são capazes de responderem rapidamente à sinais de danos derivados do epitélio independentemente da estimulação antigênica (SAENZ et al., 2010; KIM et al., 2012). As ILCs podem ser classificadas em três subtipos específicos baseado principalmente nas citocinas que produzem, dentre esses subtipos as ILC1s que incluem células NK produtoras de IFN- γ que expressam o fator de transcrição T-bet (BERNINCK et al., 2012). Outro subtipo são as ILC2s que foram inicialmente denominadas de células natural de ajuda ou nuócitos (NEILL et al., 2010). Estas células expressam os fatores de transcrição ROR α e GATA-3 (HOYLER et al., 2012; HALIM et al., 2014) e em resposta a IL-25 e IL-33 produzem altos níveis de IL-5, IL-9 e IL-13 (NEILL et al., 2010; HALIM et al., 2014) que vão atuar em células dendríticas induzindo-as a polarizar a resposta imune para o perfil Th2 (HALIM et al., 2014). Além disso, ILC2s promovem a ativação alternativa de macrófagos e o recrutamento de eosinófilos independentemente da imunidade adaptativa, exercendo um papel crítico na resposta imune alérgica (SAENZ et al., 2010; KIM et al., 2012) (Figure 3). Outro subtipo identificado de células linfóides inatas são as ILC3s, sendo que estas células expressam o fator de transcrição ROR γ T, sendo subdivididas em células linfóides teciduais envolvidas com a formação de órgãos linfóides secundários; em ILC3s produtoras de IL-17, identificadas em doenças inflamatórias intestinais e no pulmão (KIM et al., 2014) e em ILC3s produtoras de IL-22 que estão presentes na pele e no trato intestinal (SONNENBERG et al., 2011; SAWA et al., 2011).

Ao lado desses tipos celulares, reconhecidamente macrófagos alveolares é a população de células residente mais abundante no pulmão (CAI et al., 2014). Macrófagos são células consideradas de vida longa essenciais na fagocitose de células apoptóticas e na manutenção da homeostase pulmonar através do controle da captura do alérgeno pelas células dendríticas (LAUZON-JOSET et al., 2013; MATHIE et al., 2014). Durante o curso do desenvolvimento da resposta alérgica, são as primeiras células a entrar em contato com o alérgeno, aumentando seu número, perdendo suas funções regulatórias e liberando citocinas inflamatórias como a IL-1 β ,

IL-6 e TNF- α (BANG et al., 2011) sugerindo um importante papel nos eventos precoces que desencadeiam a resposta inflamatória na asma (CAI et al., 2014).

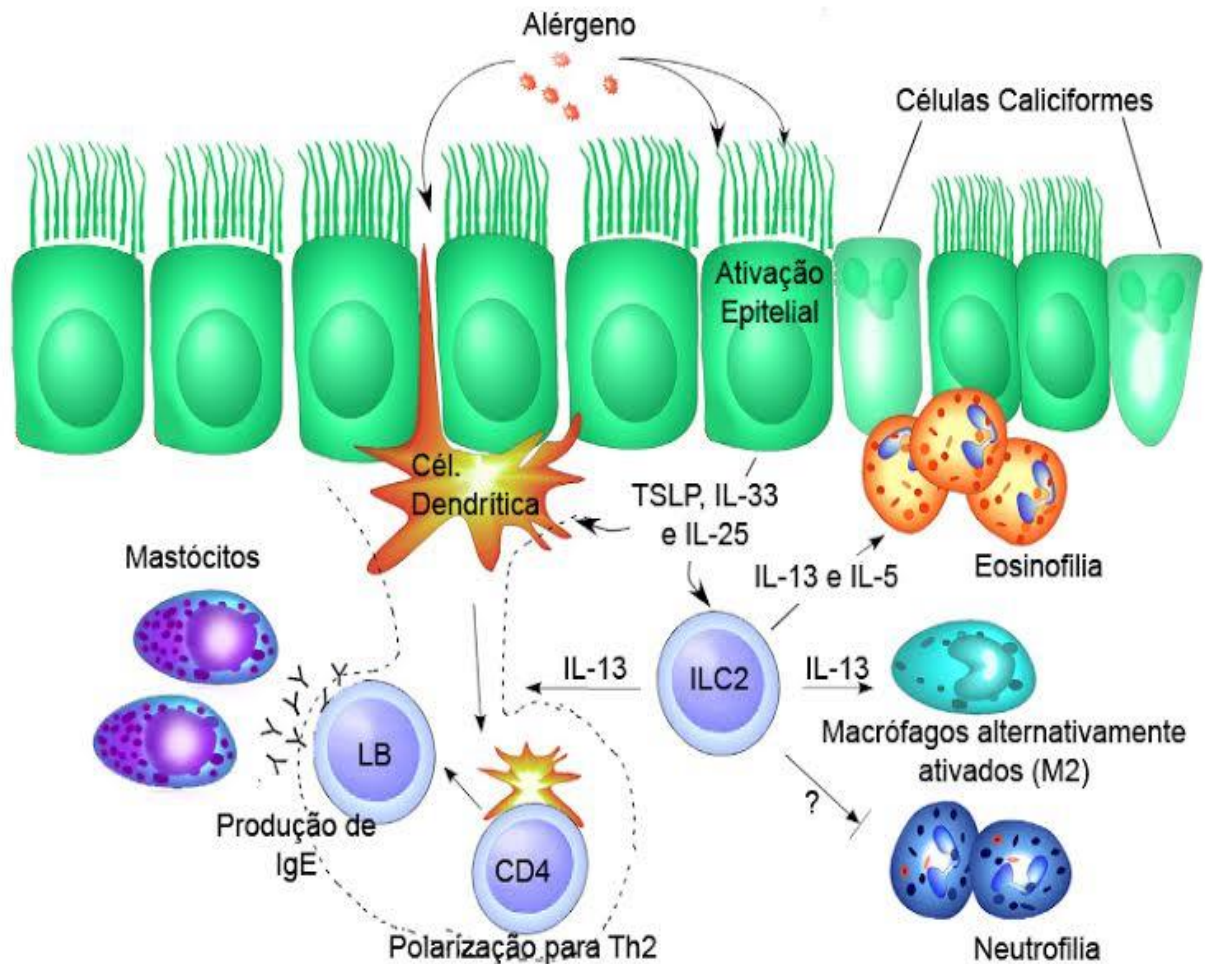


Figura 2: Desenvolvimento da resposta imune alérgica. O alérgeno que entra em contato com epitélio das vias aéreas pode ser reconhecido por receptores de reconhecimento de padrões expressos nas células epiteliais ou diretamente pelas células dendríticas. Após o reconhecimento do alérgeno as células epiteliais produzem e liberam IL-25, IL-33 e TSLP que ativam ILC2s. As ILC2s produzem IL-13 que ativam e direcionam as células dendríticas a induzirem uma resposta imune Th2 e produção de IgE pelos linfócitos B. A IgE liberada se liga em receptores Fc ϵ R1 na superfície de mastócitos ativando-os. Paralelamente ILC2s produzem IL-5 induzindo eosinofilia e ativação de macrófagos alternativamente ativados. Paralelamente, as ILC2s inibem o desenvolvimento da inflamação neutrofílica. (Adaptado de LAMBRECHT e HAMMAD, 2013).

Embora, hoje se reconheça a plasticidade fenotípica dos macrófagos, devido a sobreposição dos diferentes fenótipos, a polarização para um ou outro subtipo depende exclusivamente do microambiente proporcionado pelas diferentes citocinas (BALHARA e GOUNNI, 2012). De acordo com o estado de ativação a população de macrófagos pode ser subdividida em dois grupos distintos: Macrófagos M1 ou classicamente ativados, que são essenciais na defesa contra patógenos intracelulares e que se diferenciam sob a influência da citocina IFN- γ e por agonistas do receptor Toll como o LPS (KUMAR et al., 2012). Estas células atuam amplificando a resposta imune de perfil Th1 pela produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-12, IL-1 β e TNF- α (CAI et al., 2014). Uma das características fenotípicas apresentada por este subtipo é a expressão da enzima óxido-nítrico-sintase (iNOS), responsável pela geração de espécies reativas do oxigênio e do óxido nítrico (VEREMEYKO et al., 2013). Outro subtipo são os macrófagos M2 ou alternativamente ativados, são polarizados por IL-4 e IL-13 e estão envolvidos com a fagocitose de patógenos extracelulares e de células apoptóticas e com remodelamento tecidual no pulmão (VEREMEYKO et al., 2013). Estas células apresentam dentre vários marcadores fenotípicos a expressão constitutiva da enzima arginase (SIDDIQUI et al., 2013; VEREMEYKO et al., 2013). Adicionalmente, a expressão tanto de arginase quanto de iNOS pelo epitélio das vias aéreas, está relacionada ao remodelamento tecidual, produção de muco e hiperreatividade das vias aéreas (NAURA et al., 2009; BRATT et al., 2010; MAARSINGH et al., 2011; NADEEM et al., 2014).

Contudo, sabe-se que na asma alérgica, em resposta a IL-33 liberada pelo epitélio das vias aéreas (KUROWSKA-STOLARSKA et al., 2009; BUNTING et al., 2011) ocorre, sobretudo, em macrófagos alveolares um aumento na ativação e potencialização de marcadores fenotípicos de perfil M2, incluindo aumento na expressão de arginase, tanto em humanos quanto em modelo experimental (DRAIJER et al., 2013; WINKLER et al., 2014), embora, também já tenha sido documentado que o número de macrófagos M1 aumente proporcionalmente ao aumento na gravidade da doença (GOLEVA et al., 2008) e apresente relativa insensibilidade a terapias convencionais (BHAVSAR et al., 2008).

Nos últimos anos, outro tipo celular que tem recebido uma maior atenção são os neutrófilos, que são leucócitos polimorfonucleares originados de precursores mielóides na medula óssea que atuam na primeira linha de defesa contra infecções

causadas por bactérias e fungos (CIEPIELA, OSTAFIM, DEMKOW, 2014). Sabe-se que estas células apresentam um tempo de vida relativamente curto, que se eleva no contexto do processo inflamatório (PILLAY et al., 2010). A presença de neutrófilos em número elevado no pulmão está associada ao aumento na gravidade dos sintomas, além de serem menos responsivas aos tratamentos com corticóides (ITO et al., 2008; HIRSCH et al., 2012). Além de ser uma importante característica fenotípica da asma neutrofílica também denominada de asma não eosinofílica. O recrutamento de neutrófilos para as vias aéreas envolve uma cascata de eventos coordenados por citocinas e quimiocinas como a IL-1 β , IL-8, IL-17A e TNF α (BULLENS et al., 2006; FOLGLI et al., 2014; LAVINSKIENE et al., 2014; MANNI et al., 2014). No pulmão estas células exercem um importante papel na indução da produção de muco e remodelamento tecidual na asma, pela liberação de mediadores estocados em grânulos como metaloproteinases, mieloperoxidase (MPO), elastase, mediadores lipídicos e superóxido de oxigênio (MONTESEIRIN, 2009; CIEPIELA, OSTAFIM, DEMKOW, 2014).

Em contrapartida a função dos linfócitos Th2, os linfócitos T regulatórios (Tregs) têm um papel fundamental no controle da homeostase do sistema imune e conseqüentemente no desenvolvimento da asma. Da mesma forma, no trato respiratório, os linfócitos Tregs são cruciais na manutenção da homeostase imunológica, obtida principalmente através da indução de um perfil tolerogênico nas células dendríticas (OSTROUKHOVA et al., 2004), impedindo conseqüentemente o direcionamento de uma resposta imune inadequada, seja ela de perfil Th1 ou Th2 (BELLINGHAUSEN, et al., 2003). Paralelamente, os linfócitos Tregs inibem as funções efectoras de mastócitos (GRI et al., 2008), além de suprimir a produção de IgE alérgeno-específica por linfócitos B (MEILER et al., 2008). No entanto, o número destas células encontra-se reduzido no pulmão de asmáticos (BARCZYK et al., 2014).

Embora, tradicionalmente, a asma seja vista como uma doença de perfil imunológico Th2, evidências demonstram que uma significativa parcela de asmáticos demonstra um fenótipo diferenciado da forma clássica de asma. Frequentemente, estes pacientes exibem sintomas mais graves e persistentes, apresentam resistência a terapias convencionais e ausência de inflamação eosinofílica. E ainda, estes fenótipos não estão associados à história familiar de alergia e os sintomas aparecem somente no início da fase adulta decorrente de

estímulos não alérgicos como stress, exercícios, menopausa, ar frio, cigarro e obesidade (WOODRUFF et al., 2009; WENZEL, 2012; AMELINK et al., 2013) (Figura 3. Na asma neutrofílica acredita-se que o desenvolvimento da resposta imune esteja associado a uma disfunção na imunidade inata com aumento na expressão de receptores Toll-2 e Toll-4 (SIMPSON et al., 2007) frequentemente associado a um perfil inflamatório sistêmico com elevada expressão de genes envolvidos com a produção de citocinas como a IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α (SHANNON et al., 2008; HASTIE et al., 2010; WOOD et al., 2012; FU et al., 2013). Além disso, o infiltrado inflamatório é caracterizado pela presença de outros tipos celulares como macrófagos (FIGUEIREDO et al., 2012) e neutrófilos (SIMPSON et al., 2007; HASTIE et al., 2010). Por outro lado, células da imunidade adaptativa como os linfócitos Th1 e Th17, assim como níveis elevados das citocinas IFN- γ e IL-17A também estão envolvidas não só na mudança do perfil de resposta, mas na manutenção da gravidade dos sintomas e na resistência a terapias em humanos (YANG et al., 2009; ZHAO et al., 2010; AGACHE et al., 2010) e em modelo experimental (HERBERT et al., 2010; HERBERT et al., 2013). Estes dados confirmam que possivelmente diferentes mecanismos inflamatórios em adição a inflamação eosinofílica possam contribuir não só para a patogenia dos diversos fenótipos clínicos da asma assim como para avaliação de diferentes tipos de tratamento (ZEDAN et al., 2013; AMELINK et al., 2013; SCHATZ et al., 2013).

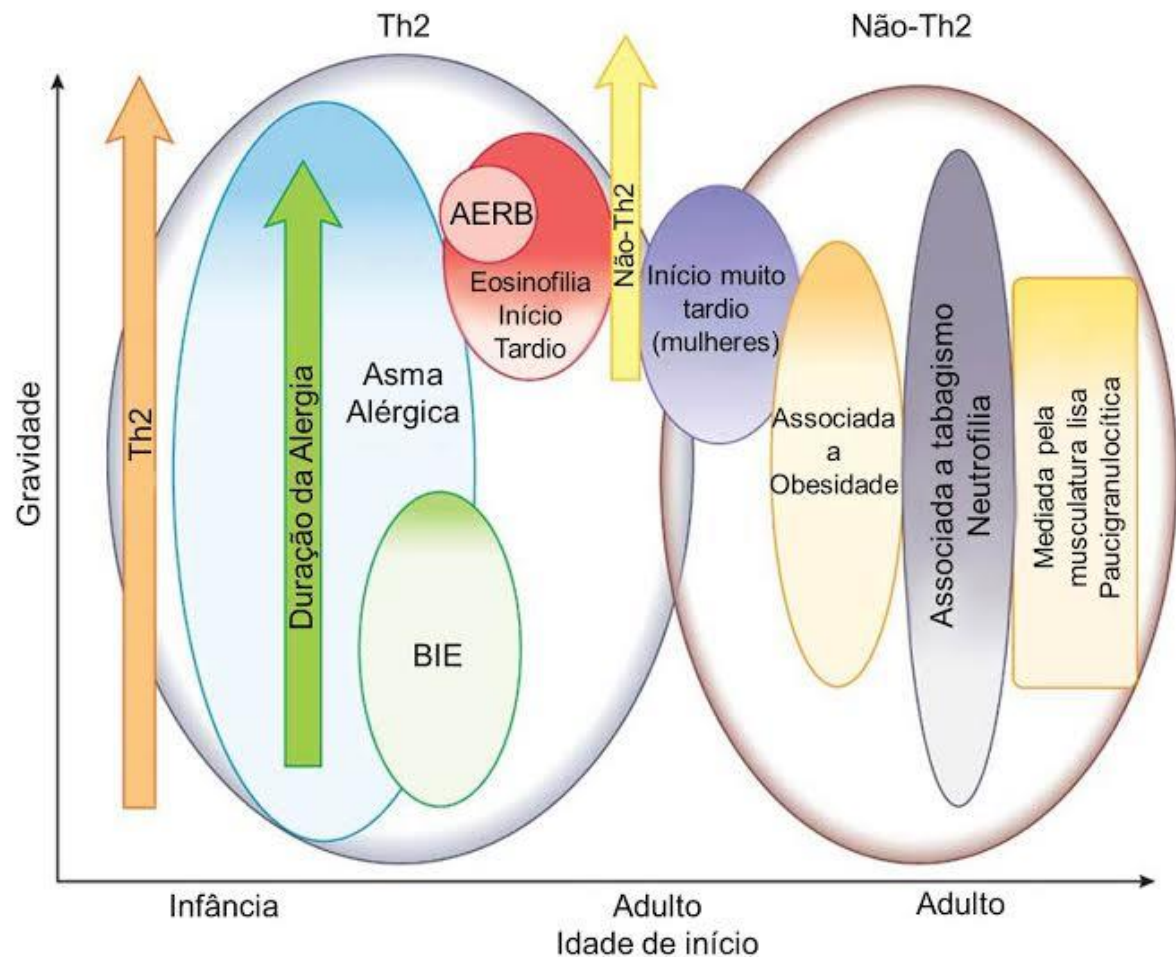


Figura 3: Diferentes fenótipos de asma baseado na distinção da resposta imune Th2 e não Th2.

A asma com perfil Th2 pode ter um início precoce ou tardio apresentando diferentes níveis em sua gravidade. Embora, a asma alérgica com início precoce apresente-se com um fenótipo mais moderado o aumento na complexidade da resposta imune pode levar a um aumento na gravidade dos sintomas. O fenótipo eosinofílico de asma com início tardio sem a influência de fatores alergênicos é considerada mais grave, considerando que a asma induzida por exercícios é considerada uma forma moderada da resposta imune Th2. A asma com fenótipo não Th2 inclui aquela com início tardio, asma associada à obesidade e asma neutrofílica relacionada ao cigarro, e asma paucigranulocítica, no qual o indivíduo apresenta pouco ou nenhum processo inflamatório. Os tamanhos dos círculos sugerem proporção relativa de indivíduos afetados. AERB – Doença respiratória exacerbada por aspirina; BIE – broncoespasmo induzido por exercícios (Adaptado de WENZEL, 2012).

1.2 Obesidade

1.2.1 Definição

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2013), o sobrepeso e a obesidade são definidos pelo acúmulo anormal ou excessivo de gordura. Pelas Diretrizes Brasileiras de Obesidade (ABESO, 2009/2010), tradicionalmente o critério mais utilizado para classificação e diagnóstico da obesidade em adultos é a medida do peso isolado ou índice de massa corporal (IMC), que consiste do peso ajustado pela altura. O indivíduo apresenta sobrepeso quando o IMC é igual ou superior a 25 kg/m², sendo considerado obeso quando o IMC é igual ou superior a 30 kg/m² (WHO, 2013).

Contudo, a observação de que a distribuição de gordura é mais preditiva de saúde, sugere-se que técnicas que abordam a sua distribuição, são as mais recomendadas, levando-se em conta custos e benefícios. Essas técnicas são consideradas padrão-ouro no diagnóstico da obesidade incluindo ressonância magnética, tomografia computadorizada, absorciometria com Raios-X de dupla energia (DEXA), medidas de prega cutânea, ultrassonografia entre outras (Diretrizes Brasileiras de Obesidade ABESO, 2009/2010).

Durante as últimas décadas, a incidência mundial da obesidade aumentou significativamente em todo o mundo, particularmente em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Isso pode ser explicado, em parte, pela associação de fatores genéticos e ambientais associado ao consumo excessivo de dietas ricas em calorias aliado a um baixo gasto energético (WHO, 2014). De acordo com a OMS, em 2014, aproximadamente 1,9 bilhão de adultos apresentavam sobrepeso e 600 milhões de pessoas entre homens e mulheres seriam clinicamente obesas. Em 2013, 42 milhões de crianças menores de cinco anos de idade foram consideradas obesas. Estes dados demonstram que a obesidade tornou-se um sério problema de saúde pública (Figura 4), uma vez que o estado inflamatório decorrente do acúmulo de gordura, particularmente na região abdominal (obesidade central ou visceral) predispõe a comorbidades como a síndrome metabólica, que inclui intolerância à glicose, hipertensão, dislipidemia, esteatose hepática e resistência à insulina (OUCHI et al., 2011). Paralelamente, a obesidade e as desordens metabólicas

podem levar ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, alguns tipos de câncer e asma (SHOELSON, 2011).

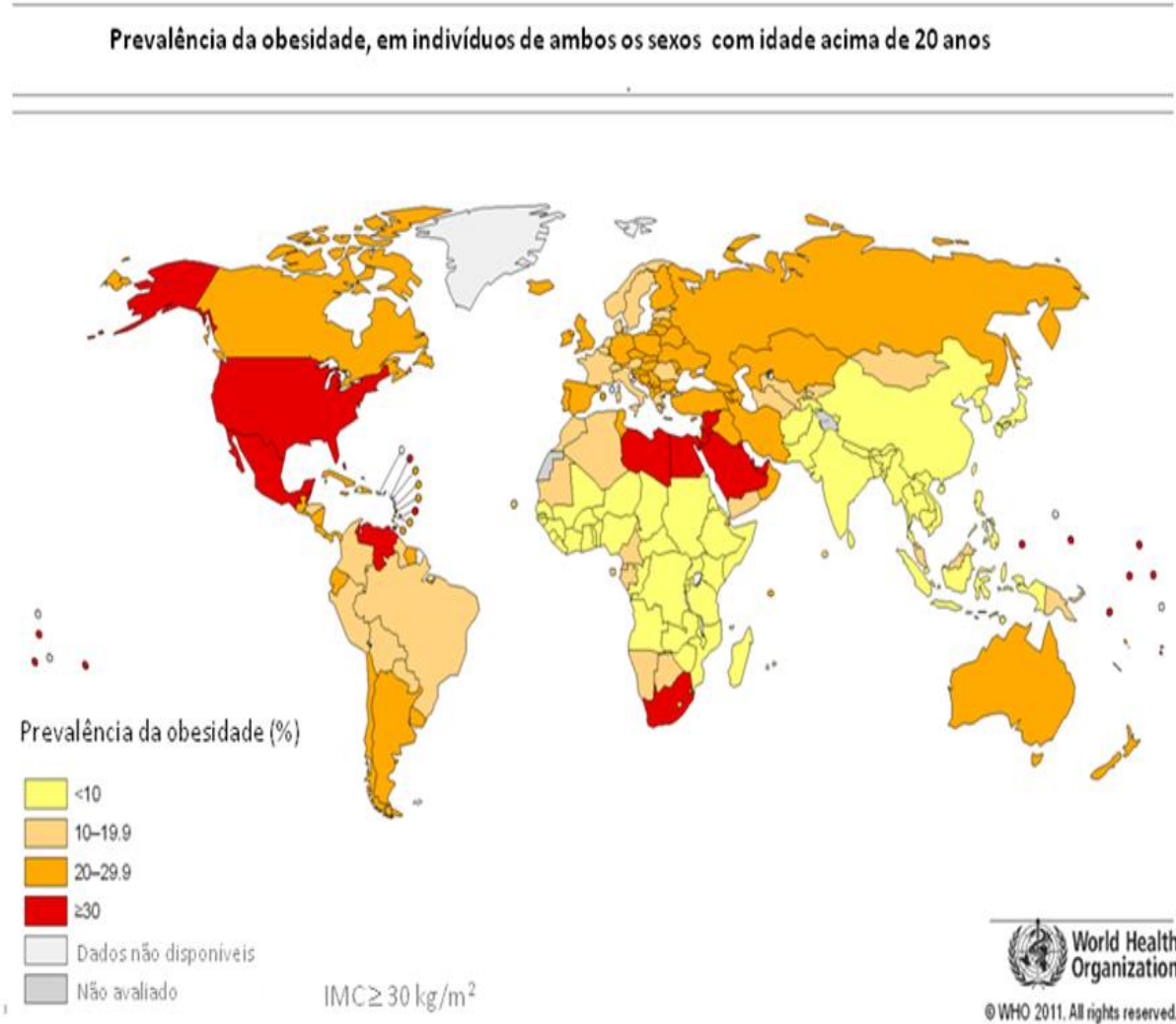


Figura 4: Prevalência da obesidade em indivíduos de ambos os sexos acima de 20 anos de idade em 2008 (WHO, 2008).

O tecido adiposo histologicamente pode ser dividido em dois subtipos, tecido adiposo branco e tecido adiposo marrom, diferindo entre eles não só nas funções exercidas assim como na composição celular e localização. O Tecido adiposo branco exerce várias funções entre elas função mecânica, de proteção, atua como isolante térmico e como tecido para estoque de energia. Somado a estas funções, acredita-se que o tecido adiposo branco é o que está mais envolvido com o desenvolvimento da obesidade. Embora, frequentemente a distribuição corporal deste tecido seja determinada pela raça, sexo e idade do indivíduo, de uma maneira geral, este tecido se encontra amplamente distribuído nas regiões subcutâneas (regiões glútea, abdominal e femoral) e ao redor dos órgãos viscerais, do mesentérico e do omento, denominado de tecido adiposo visceral. Contudo, podem ocorrer pequenos depósitos ao redor do epicárdico e músculos (LEE, WU, FRIED, 2012). Em adição, o tecido adiposo branco é altamente heterogêneo em relação à morfologia e função entre os diferentes depósitos (LEE, WU, FRIED, 2012). Sendo que o tecido adiposo visceral é considerado metabolicamente mais ativo do que o subcutâneo (WINER et al., 2009; BUCCI et al., 2015).

Reconhecidamente uma das funções do tecido adiposo é a estocagem de gorduras derivadas da ingesta na forma de triglicérides, assim como tem a capacidade de hidrolisar e liberar estas moléculas como ácidos graxos durante um período prolongado de jejum, exercendo um importante papel no metabolismo lipídico e glicídico (GUILHERME et al., 2008; HARWOOD JR., 2012). Essa função é exercida pelas principais células constituintes do tecido adiposo, os adipócitos, que apresentam como característica uma gotícula de lipídeo que ocupa cerca de 95% do volume total da célula. Sabe-se que os distúrbios no metabolismo lipídico levam a hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos, sendo um fator determinante para o aumento no tamanho dessas células, que pode variar de 20 a 200µm (LEE, WU, FRIED, 2013). Além disso, a hipertrofia destas células acarreta o remodelamento tecidual, que é caracterizado pelo recrutamento de células do sistema imune, angiogênese e produção excessiva da matriz extracelular, juntamente com hipóxia, morte celular e liberação de mediadores pró-inflamatórios ou adipocinas (OUCHI et al., 2012), além de fatores de crescimento (FAIN et al., 2005) e proteínas de fase aguda (POITU et al., 2005).

As adipocinas podem atuar no metabolismo, nas funções vascular e endotelial, no controle da saciedade, em processos fisiológicos, no crescimento

tumoral e inflamação (OUCHI, 2012). Dentre as adipocinas, a adiponectina e a leptina são as principais representantes (OUCHI, 2012). Sendo que a adiponectina é uma adipocina produzida em abundância no tecido adiposo, exclusivamente pelos adipócitos, e é encontrada em altos níveis no plasma de indivíduos saudáveis, sendo sua produção inversamente proporcional à quantidade de tecido adiposo presente no organismo e ao índice de massa corporal (HAJRI et al., 2011). É considerada predominantemente anti-inflamatória, uma vez que é capaz de induzir à produção da citocina IL-10 e do antagonista do receptor de IL-1 (IL1RA) em macrófagos e em células dendríticas (WOLF et al., 2004) inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e a IL-6 (YAMAGUCHI et al., 2007).

A leptina, do grego *leptos*, que significa magro, foi descoberta por Zhang e colaboradores (1994), como produto do gene *ob*, também conhecido como *lep*. A leptina é um hormônio derivado primariamente do tecido adiposo. Sendo que sua produção está diretamente relacionada ao *status* energético, à massa de tecido adiposo (LEE et al., 2007; ERUSAN et al., 2012) e a liberação de citocinas pró-inflamatórias (BRUUN et al., 2002; TRUJILLO et al., 2004; GAN et al., 2012). Estruturalmente, tanto a leptina quanto o seu receptor são membros relacionados à família da citocina IL-6. São conhecidas seis formas de receptores para a leptina, que se diferenciam pelo tamanho do seu domínio citoplasmático. A forma longa do receptor, conhecida como *Ob-Rb*, é altamente expressa no hipotálamo, na área responsável pelo controle da ingesta e do peso corporal (LAQUE et al., 2013). Apesar do mecanismo de ação da leptina no controle da ingesta ser eficiente, há casos em que a obesidade é desencadeada por uma deficiência de leptina (FAROOQI et al., 2007) e/ou do seu receptor (FAROOQI et al., 2007), embora a forma mais comum da doença seja caracterizada pela resistência à leptina já que em humanos e em modelo experimental, obesos apresentam níveis elevados de leptina circulantes proporcional ao acúmulo de tecido adiposo (MUC et al., 2014) e baixa sinalização mediada por seus receptores no hipotálamo (FUENTES et al., 2009; RING e ZELTSER, 2010).

Adicionalmente a função de controle da ingesta e do peso corporal, estudos sugerem que a leptina é um mediador comum entre o sistema imune e o sistema neuroendócrino. Uma vez que o receptor *Ob-Rb* também é expresso em diversas células do sistema imunológico incluindo células da imunidade inata como os neutrófilos (SUN et al., 2013); mastócitos (TAILDEMAN et al., 2009); eosinófilos

(CONUS et al., 2005) e basófilos (SUZUKAWA et al., 2011). Nestas células ela pode atuar induzindo a migração, ativação e a liberação de espécies reativas do oxigênio (ROS), assim como aumentar a sua sobrevivência (CONUS et al., 2005; SUSUKAWA et al., 2011; SUN et al., 2014). Em células dendríticas, a leptina induz estas células a promoverem a polarização para o perfil Th1 (MATTIOLI et al., 2005) e a liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-6 por macrófagos (ERUSAN et al., 2012), juntamente com aumento na expressão de moléculas de adesão no endotélio (APOLINAR et al., 2013). Na imunidade adaptativa, a leptina, promove a maturação, ativação e sobrevivência de linfócitos T (PAPATHANOSSOGLU et al., 2006; CLAYCOMBE et al., 2007). Em linfócitos B, induz a produção de IgG2a, mediante a supressão da resposta imune de perfil Th2 (AGRAWAL et al., 2011). Além disso, a leptina exerce um efeito inibitório na ativação e proliferação de linfócitos Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (DE ROSA et al., 2007; DEIULIIS et al., 2011).

Ao lado dos adipócitos, basicamente, as células imunes residentes no tecido adiposo compreendem a dois grupos funcionais distintos: na homeostasia o tecido adiposo é composto por macrófagos M2 produtores de IL-10, IL-4 e IL-13 (LUMENG et al., 2007), eosinófilos (WU et al., 2011) e linfócitos Tregs (DEIULIIS et al., 2011). No entanto, com o desequilíbrio proporcionado pelo consumo exagerado de gordura, ocorre uma mudança na composição do infiltrado celular no tecido adiposo, caracterizada pela presença marcante de macrófagos M1 (WEISBERG et al., 2003; LUMENG et al., 2007), células dendríticas (REYNOLDS et al., 2012); mastócitos (ALTINTAS et al., 2011), linfócitos T CD8⁺ (NISHIMURA et al., 2009) e linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ (ROCHA et al., 2008; DUFFAUT et al., 2009).

O recrutamento de macrófagos para o tecido adiposo é considerado o marco no desenvolvimento do processo inflamatório envolvido na obesidade. Os eventos iniciais que resultam na migração de macrófagos para o tecido adiposo ocorrem em consequência de uma série de fatores já mencionados como hiperplasia e à hipertrofia dos adipócitos, hipóxia (WANG, WOOD, TRAYURN, 2007), morte celular (CINTI et al., 2005), desequilíbrio no fluxo de ácidos graxos (NGUYEN et al., 2007), aumento na secreção de TNF- α e IL-6 (SUGANAMI et al., 2005) e liberação precoce da quimiocina MCP-1 ou CCL2 (KANDA et al., 2006).

No tecido adiposo, esses monócitos diferenciam-se em macrófagos classicamente ativados ou M1 que se localizam ao redor de adipócitos mortos, dando origem a estruturas em forma de uma coroa de células ou CLS (CINTI et al., 2005; MURANO et al., 2008). Esses macrófagos têm a função de fagocitar gotículas de lipídeos residuais dos adipócitos mortos, bem como liberar citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6 (WEISBERG et al., 2003; LUMENG et al., 2007). Estas citocinas atuam diretamente sobre os próprios adipócitos, aumentando a lipólise e reduzindo a síntese de triglicérides, o que resulta em um aumento dos níveis de ácidos graxos circulantes (SUGANAMI et al., 2005). Estes causam o acúmulo de triglicérides e lipídeos no músculo esquelético e fígado, causando um desequilíbrio das funções normais dessas estruturas. Desta forma, instala-se um ciclo vicioso que resultará na inflamação crônica (SUGANAMI et al., 2005; NGUYEN et al., 2007) (Figura 5).

Ao lado das células da imunidade inata, evidências demonstram que linfócitos T também se acumulam no tecido adiposo, tanto em humanos (KINTSCHER et al., 2008) quanto em modelo experimental de obesidade induzida por dieta (KINTSCHER et al., 2008; NISHIMURA et al., 2009). Assim como os macrófagos, esses linfócitos T também são encontrados nas CLS, sendo que a migração de linfócitos T CD8⁺ precede a migração de macrófagos, sugerindo que estas células contribuam para o acúmulo de macrófagos M1 no tecido adiposo (NISHIMURA et al., 2009).

Com isso, uma importante característica da resposta imune na obesidade, é o estágio inflamatório crônico sistêmico de grau moderado, em decorrência da produção e liberação, tanto pelos adipócitos quanto pelas células imunes inseridas no tecido adiposo, de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, TNF- α , leptina (ROCHA et al., 2008; MEIJER et al., 2011) e uma resposta de perfil Th1 com níveis elevados de IFN- γ (ROCHA et al., 2008; DUFFAUT et al., 2009; STRISSEL et al., 2010).

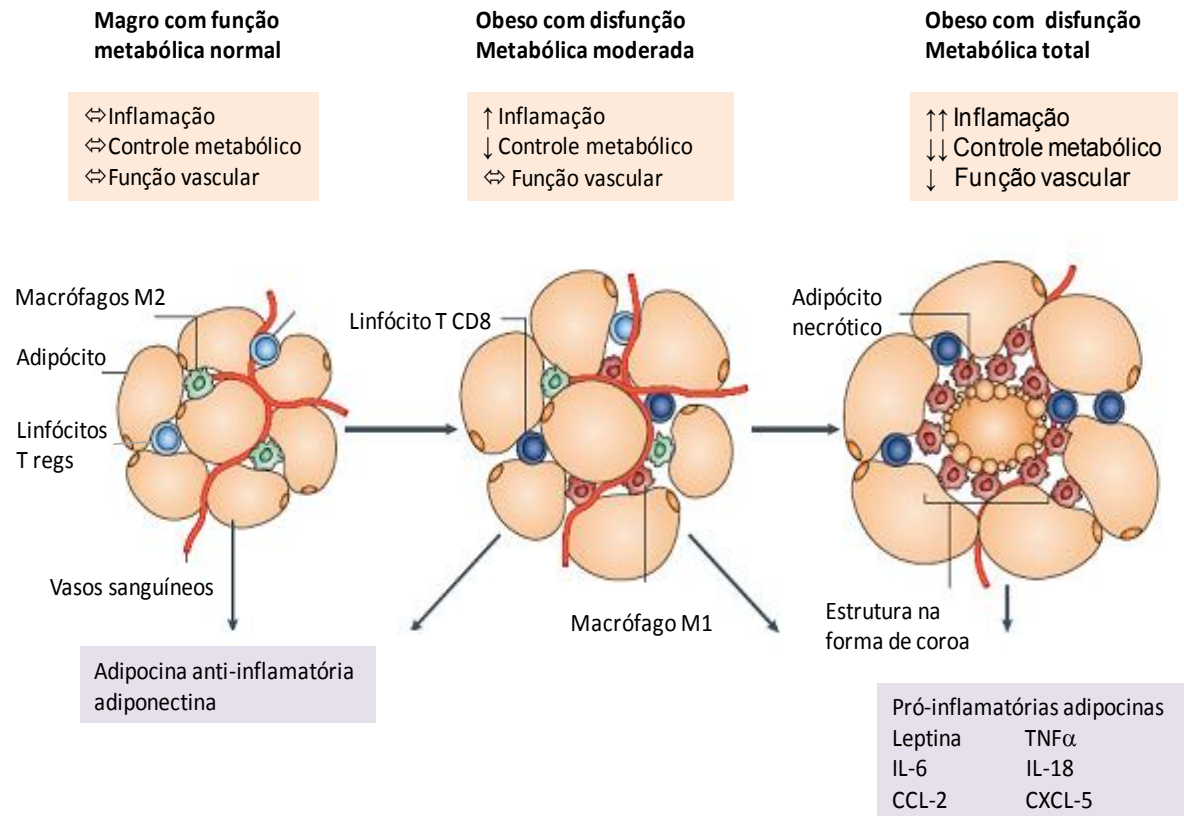


Figura 5: Modulação fenotípica no tecido adiposo. Na homeostase do tecido adiposo, ele é constituído por adipócitos, macrófagos M2, linfócitos Tregs. Considerando que a distribuição dos vasos sanguíneos, funções metabólicas e produção de adiponectina são normais. Porém, com o desenvolvimento da obesidade os adipócitos sofrem hipertrofia e hiperplasia levando a hipóxia celular e morte dos adipócitos. Paralelamente, estes eventos levam ao recrutamento de linfócitos T CD8⁺ e de macrófagos formando as estruturas em forma de coroa em torno dos adipócitos necróticos. Os adipócitos hipertrofiados e as células imunes produzem e liberam citocinas pró-inflamatórias como a leptina, IL-1 β , IL-6 e TNF- α entre outras (Adaptado de OUCHI et al., 2011).

1.3 Obesidade e Asma

Uma vez que a obesidade e a asma são consideradas importantes problemas de saúde pública, e que suas prevalências aumentaram concomitantemente nos últimos anos, estudos epidemiológicos têm sido conduzidos com o objetivo de avaliar a relação entre as duas patologias. Estes estudos demonstram um aumento na prevalência da asma em indivíduos obesos (DIXON et al., 2010; BARROS et al., 2011; FORTE et al., 2013), sendo que o risco relativo de desenvolvimento de asma eleva-se com o aumento do IMC (APPLETON et al., 2006; BEUTHER et al., 2007; DIXON et al., 2010; FITZPATRICK et al., 2012; BLACK et al., 2013). Além disso, frequentemente, a obesidade aumenta a gravidade e as exacerbações dos sintomas da asma (TAYLOR et al., 2007; BARROS et al., 2011; GIBEON et al., 2013). Estes dados são reforçados por observações de que obesos asmáticos, apresentam um quadro mais grave da doença, com sintomas respiratórios frequentes, danos à função pulmonar e obstrução das vias aéreas (FITZPATRICK et al., 2012; TELENGA et al., 2012; GIBEON et al., 2013), além de apresentarem menor resposta a terapias convencionais como a utilização de broncodilatores, glicocorticóides, anti-leucotrienos ou ao tratamento com anticorpos anti-IgE e anti-IL-5 (TAYLOR et al., 2007; FITZPATRICK et al., 2012; GIBEON et al., 2013). Este quadro conseqüentemente resulta em um maior número de hospitalizações devido a consecutivas exacerbações dos sintomas (TAYLOR et al., 2007; HOLGUIM et al., 2011; FITZPATRICK et al., 2012; WOOD et al., 2011; GIBEON et al., 2013; HASEGAWA et al., 2014), o que reflete em uma piora na qualidade de vida desses indivíduos (TAYLOR et al., 2007; HASEGAWA et al., 2014).

Essas observações levaram alguns autores a sugerirem que obesos asmáticos apresentam um fenótipo clínico, fisiológico e inflamatório diferenciado da asma do indivíduo não obeso (SUTHERLAND et al., 2008; DIXON et al., 2010; GIBEON et al., 2013). Neste contexto, estudos recentes identificaram em indivíduos obesos asmáticos pelo menos dois fenótipos clínicos distintos (HOLGUIM et al., 2011; SUTHERLAND et al., 2012; CHAPMAN et al., 2014). O primeiro fenótipo está associado ao desenvolvimento da asma em indivíduos mais jovens com níveis elevados de IgE e inflamação eosinofílica, que se complica pela presença da obesidade (HOLGUIM et al., 2011; MOHSEN e ALLAM, 2012; GROTTA et al., 2013).

O segundo fenótipo observado em obesos asmáticos é caracterizado pelo início da asma já na fase adulta não está relacionado a atopia, uma vez que apresentam níveis reduzidos de IgE (CHEN et al., 2006; APPLETON et al., 2006; HOLGUIM et al., 2011; *FENGER et al., 2012*; GIBEON et al., 2013; CHAPMAN et al., 2014), um menor número de eosinófilos no pulmão (TELENGA et al., 2012) e nenhuma alteração nos níveis de citocinas de perfil Th2 comparado a asmáticos não obesos (SUTHERLAND et al., 2008). Frequentemente este fenótipo desenvolve-se, sobretudo em mulheres (SCOTT et al., 2012; NEWSON et al., 2013; MUC et al., 2014). Apesar da ausência de uma resposta imune Th2 característica, obesos asmáticos apresentam maior declínio na função pulmonar, maior hiperresponsividade das vias aéreas, inflamação crônica sistêmica com elevado infiltrado pulmonar neutrofílico (SCOTT et al., 2012; TELENGA et al., 2012; WOOD et al., 2012; FU et al., 2013). Apesar dessas evidências, o mecanismo envolvido na associação entre a obesidade e asma não está totalmente esclarecido, tendo sido proposto o envolvimento de fatores genéticos, mecânicos, hormonais e ambientais. Nos últimos anos, com um maior conhecimento da resposta inflamatória desencadeada devido ao acúmulo de tecido adiposo, tem-se enfatizado a influência do sistema imunológico no desenvolvimento concomitante da asma e da obesidade (SOOD, 2010), provavelmente o perfil inflamatório característico da obesidade atue através de diferentes vias no desenvolvimento e agravamento da asma (HOLGUIM et al., 2011).

Além disso, acredita-se que o perfil de resposta imune observado em obesos asmáticos se desenvolva em decorrência de uma disfunção na imunidade inata. Simpson e colaboradores (2007) detectaram uma elevada expressão de TLR2 e TLR4 no escarro de indivíduos com asma neutrofílica. Alguns estudos vêm demonstrando que ácidos graxos circulantes derivados de dietas ricas em gorduras podem se ligar diretamente aos receptores da imunidade inata TLR-2 e TLR-4 desencadeando a liberação precoce de TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-1 β (SHI et al., 2006; SCHAEFFLER et al., 2008; SCOTT et al., 2011; WOOD et al., 2011) que são importantes mediadores do recrutamento de neutrófilos para as vias aéreas na asma (BAINES et al., 2007; WILLIAMS et al., 2013) e que se encontram em níveis elevados em indivíduos obesos asmáticos (CANOZ et al., 2008). Além disso, outros fatores relacionados a obesidade como resistência à insulina, níveis elevados de triglicérides e colesterol (HUSEMOEN et al., 2008; THUESEN et al., 2009;

COTTRELL et al., 2011), também estão associados ao início de sintomas de sibilância, aumento da hiperresponsividade das vias aéreas, e aumento no risco de desenvolvimento de asma na fase adulta.

Além dos mediadores inflamatórios, estudos têm avaliado o envolvimento das adipocinas, sobretudo o papel da leptina, na associação entre obesidade e asma (JANG et al., 2009; NEWSON et al., 2014; MUC et al., 2014). Holguim e colaboradores (2011) demonstraram que indivíduos obesos apresentam níveis mais elevados de leptina no pulmão sugerindo uma possível difusão da leptina do plasma para as vias aéreas. Somado a isso, já foi observado que tanto a leptina quanto seus receptores são expressos pelas células epiteliais brônquicas (BRUNO et al., 2009) e por macrófagos alveolares (LUGOGO et al., 2012). Estas células respondem a leptina pelo aumento na produção de muco e pela na liberação de IL-6, IL-8, TNF- α e IFN- γ (SARAIVA et al., 2011; LUGOGO et al., 2012).

Embora, diversos estudos clínicos tenham observado uma associação positiva entre os níveis de leptina e a resposta Th2, com aumento da hiperresponsividade e níveis elevados de IgE (GROTTA et al., 2013; MUC et al., 2013), em outros estudos não foi detectado a mesma associação (JARTI et al., 2009; HOLGUIM et al., 2011). Por outro lado, níveis elevados de leptina podem influenciar outras vias não relacionadas ao perfil Th2, como a ativação e a produção de estresse oxidativo em células inflamatórias (GIOULEKA et al., 2011) e de mediadores lipídicos por macrófagos alveolares (MANCUSO et al., 2004) e aumento na liberação do fator de crescimento do endotélio vascular (SHIN et al., 2008).

Estudos em modelos experimentais também vêm avaliando a complexa interação entre a obesidade e o agravamento da asma e os resultados nestes modelos assim como ocorre em humanos, mostram uma heterogeneidade nos dados. Mito e colaboradores (2002), Johnston e colaboradores (2007) e Vries e colaboradores (2009) utilizando a linhagem C57BL/6 com diferentes protocolos para a indução da asma, não encontraram relação da obesidade ou de leptina com um aumento da resposta imune alérgica ou com citocinas de perfil Th2. Por outro lado, Dietze e colaboradores (2012) demonstraram que camundongos AKR, que são susceptíveis tanto ao modelo de obesidade e quanto a hiperresponsividade das vias aéreas, apresentaram um limiar de sensibilização à OVA menor do que os animais não obesos. O estudo, de Calixto e colaboradores (2010) demonstraram em modelo experimental de obesidade e asma desenvolvido em camundongos C57BL/6, que

ocorre um atraso na eosinopoiese e na migração de eosinófilos para o lúmen das vias aéreas.

Além desses dados, considerando-se a complexidade do sistema imunológico outros mecanismos podem estar envolvidos na relação entre asma e a obesidade. Baseado nisso, na revisão de HERSOUG e LINNEMBERG (2007), os autores propuseram a hipótese de que o processo inflamatório crônico e sistêmico proporcionado pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, pelo tecido adiposo pode reduzir a tolerância imunológica a antígenos inalados, uma vez que essas substâncias podem modular negativamente a ação e o desenvolvimento de linfócitos T regs (DOGANCI et al., 2005; DE ROSA et al., 2007). Corroborando, com esta hipótese KIM e colaboradores (2014) observaram uma redução no número dessas células no pulmão de camundongos C57BL/6 obesos. No entanto, são necessários mais estudos para avaliar o envolvimento desses linfócitos na relação entre o processo inflamatório alérgico pulmonar e a obesidade.

1.4 O modelo de obesidade e asma

O uso de modelos experimentais é considerado uma ferramenta importante para o estudo de diversas patologias entre elas a obesidade e asma, seja individualmente ou na associação entre ambas as doenças. Para o estudo da obesidade, uma variedade de modelos experimentais são utilizados entre eles camundongos geneticamente obesos deficientes em leptina (*ob/ob*) e no seu receptor (*db/db*) e camundongos (*Cpe^{fat}*), deficientes na enzima carboxipeptidase que está envolvida no processamento de alguns hormônios e neuropeptídeos (COLLINS et al., 2004; BUETTNER, SCHOLMERICH, BOLHEIMER, 2007). Entretanto, o modelo considerado ideal por mais se assemelhar à obesidade em humanos é o induzido por dieta. Nestes modelos, diversas linhagens de camundongos, com graus variáveis de susceptibilidade ao desenvolvimento da obesidade podem ser utilizadas (MORI et al., 2010; MONTGOMERY et al., 2013). Dentre essas linhagens, camundongos C57BL/6 são utilizados mais frequentemente, por responderem satisfatoriamente à ingesta hipercalórica, apresentando rápido e elevado ganho de peso paralelamente a distúrbios metabólicos (COLLINS et al., 2004; WANG e LIAO., 2012).

A etiologia da asma é claramente multifatorial, na qual fatores genéticos exercem um papel fundamental no desenvolvimento e na gravidade da doença. Para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nesta patologia, diversas linhagens também são utilizadas para o estudo dos mecanismos fisiológicos e inflamatórios envolvidos com a asma. Contudo, durante a escolha da linhagem a ser utilizada no protocolo, deve-se considerar que as respostas: imune, fisiológica e biológica que se desenvolve sob o mesmo estímulo, pode divergir consideravelmente entre as diferentes elas, principalmente em decorrência de mutações e polimorfismos genéticos (WHITEHEAD et al., 2003; SAHU et al., 2010; SELLERS et al., 2012). Contudo, considera-se que a linhagem BALB/c é a que apresenta mais similaridades com a asma desenvolvida em humanos, uma vez que estes animais são geneticamente predispostos a desenvolver uma resposta imune de perfil Th2 (SAHU et al., 2010), uma vez que, após a indução do processo inflamatório alérgico, esses animais apresentam maior hiperresponsividade brônquica e produção elevada de IgE alérgeno específica, um número maior de

mastócitos e de citocinas do perfil Th2, quando comparados a camundongos C57BL/6 (MATTESS et al., 2002; WHITEHEAD et al., 2003; GUEDERS et al., 2009; SAHU et al., 2010). Porém, alguns estudos já demonstraram que camundongos C57BL/6 apresentam um número maior de eosinófilos após os desafios com o alérgeno comparado a linhagem BALB/c (WHITEHEAD et al., 2003, GUEDERS et al., 2009).

Embora, considera-se que camundongos BALB/c sejam geneticamente mais resistentes ao desenvolvimento de obesidade induzida por dieta hiperlipídica, alguns estudos demonstram que estes animais quando alimentados com uma dieta com alto teor de gordura apresentam acúmulo de gordura, ganho de massa corporal e um estágio pró-inflamatório (FEARNSIDE et al., 2008; KIM et al., 2012; PARK et al., 2012). Baseado neste fato e que ainda não foi relatado na literatura a utilização da linhagem BALB/c para a estudo da resposta imune desenvolvida na associação entre a obesidade e a asma, a proposta do presente estudo foi avaliar o efeito da obesidade induzida por dieta sobre o desenvolvimento da alergia pulmonar em camundongos da linhagem BALB/c, utilizando-se a OVA como alérgeno.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da obesidade induzida por dieta hiperlipídica sobre a resposta imune em camundongos BALB/c submetidos ao modelo experimental de alergia pulmonar induzida pela ovalbumina (OVA).

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a obesidade induzida por dieta hiperlipídica em camundongos da linhagem BALB/c, através dos seguintes parâmetros:
 - ✓ Acompanhamento do consumo diário da dieta e do ganho de massa corporal semanalmente;
 - ✓ Avaliação do acúmulo de tecido adiposo nas regiões perigonadal e retroperitoneal e alterações histopatológicas ocorridas no tecido adiposo perigonadal ao final do protocolo;
 - ✓ Analisar, em jejum, os níveis séricos de colesterol total e frações (HDL, LDL), triglicérides, glicose, leptina e TNF- α .
- Avaliar a influência da obesidade nos animais submetidos ao modelo de alergia pulmonar induzida pela ovalbumina, através dos seguintes parâmetros:
 - ✓ Contagem total e diferencial de células no LBA e de granulócitos na medula óssea;
 - ✓ Avaliação do grau do infiltrado celular inflamatório no tecido pulmonar; e contagem no tecido pulmonar de eosinófilos, mastócitos, células caliciformes produtoras de muco;
 - ✓ Identificação fenotípica de macrófagos de perfil M1 e M2 através da expressão das enzimas arginase e iNOS;
 - ✓ Determinação da atividade da EPO e MPO no homogenato de tecido pulmonar;

- ✓ Quantificação dos níveis séricos de IgE específica anti-OVA
- ✓ Quantificação dos níveis das citocinas IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-12, IL-13, IL-17A, IL-25, IL-33, TSLP, TNF- α , IFN- γ , Leptina e da quimiocina CCL11 no sobrenadante do homogenato de tecido pulmonar.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem BALB/c, com 6 semanas idade, provenientes do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora (CBR-UFJF). Estes animais foram mantidos no setor de manutenção e experimentação do Laboratório de Imunologia do ICB-UFJF, onde ficaram em gaiolas-padrão, em estante climatizada. O protocolo experimental realizado neste trabalho está de acordo com a Comissão de Ética na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFJF) da Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora, sob o número 094/2012.

3.2 Composição das dietas

Foram utilizadas durante todo o protocolo dois tipos de dietas: a dieta padrão comercial para roedores AIN 93G da marca Nuvilab®, contendo por Kg, 10% de Kcal derivada de gordura; e a dieta hiperlipídica (Prag Soluções Biociências Ltda) contendo por Kg, 60% de Kcal derivada de gordura. Na tabela 1 foram discriminados os constituintes de ambas as dietas.

Tabela 1: Composição das dietas Padrão e hiperlipídica

Composição	Dieta Padrão	Dieta Hiperlipídica
Amido de milho	398,0	0,000
Caseína	200,0	258,500
Amido dextrinizado	132,0	161,500
Sacarose	100,0	89,000
Óleo de soja	70,	32,300
Fibra	50,	64,600
L-cistina	3,00	3,900
Colina	2,50	2,600
BHT	0	0,28
Mix mineral PSB 10026	35,0	12,900
Mix vitamínico	10,0	12,900
Banha	0,0	316,600
Fosfato Ca dibase	0	16,800
Citrato Potássio	0	21,300
Carbonato de Cálcio	0	7,100
TOTAL		1000,03

3.3 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais, de acordo com os procedimentos adotados. Grupo controle (CN), no qual não foi adotado nenhum tipo de procedimento. Grupo obesidade (OB), no qual os animais foram alimentados com a dieta hiperlipídica. Grupo alergia pulmonar (AP), no qual os animais foram sensibilizados e desafiados com a ovalbumina. Grupo obesidade e alergia pulmonar (OB/AP), no qual os animais foram alimentados com a dieta hiperlipídica e foram sensibilizados e desafiados com a ovalbumina (Tabela 2).

Tabela 2: Grupos de animais utilizados no protocolo, de acordo com os procedimentos adotados.

Identificação	Grupos	Indução do modelo de obesidade	Indução modelo de alergia pulmonar experimental
1	CN	-	-
2	OB	+	-
3	AP	-	+
4	OB/AP	+	+

3.4 Indução do modelo de obesidade

Para indução do modelo de obesidade, os animais do grupo OB, após o desmame até a 5^a semana de idade, foram alimentados inicialmente com dieta padrão comercial (contendo 10% de gordura). A partir da 6^a semana de idade, os animais foram alimentados com dieta hiperlipídica, contendo 60% de calorias derivadas de gordura por 10 semanas, até a 16^a semana de idade. Sendo que os animais que foram alimentados com a dieta padrão comercial, contendo 10% de gordura durante todo o protocolo, foram utilizados como grupo controle.

3.5 Avaliação do consumo da ração e da massa corporal

Para análise do consumo da dieta, a ingestão alimentar foi monitorada durante todo o protocolo, a cada dois dias no mesmo horário, onde o consumo da ração foi mensurado em balança semi-analítica (Micronal B6000®, Brasil). Para avaliação da curva do consumo da dieta, foi avaliada a média do consumo diário por semana, o que correspondeu a 6^a a 16^o semana de idade (1^a a 10^a semana de dieta do protocolo). O peso foi avaliado semanalmente no mesmo dia e horários, a partir da 1^a a 10^a semana de dieta do protocolo de indução da obesidade.

3.6 Indução do modelo de alergia pulmonar experimental

A indução da alergia pulmonar nos animais foi realizada através de duas sensibilizações, sendo a primeira, na 6ª semana de dieta e a segunda na 8ª semana de dieta, o que correspondeu aos dias 0 e 14 do protocolo de indução da alergia pulmonar. Os animais foram imunizados com injeção intraperitoneal contendo 3 µg de OVA (Grade V, Sigma-Aldrich Corp, EUA) e 1 mg de hidróxido de alumínio (Sigma-Aldrich Corp, EUA). Na 9ª semana de dieta, correspondendo aos dias 21, 23, 25, 27 e 29 do protocolo de indução de alergia pulmonar, os animais foram desafiados através de nebulização com OVA 1% em tampão PBS por 20 minutos. Todos os animais foram eutanasiados em 24 e 48 horas após o último desafio com a OVA. A figura 6 mostra o delineamento experimental da indução do modelo de alergia pulmonar.

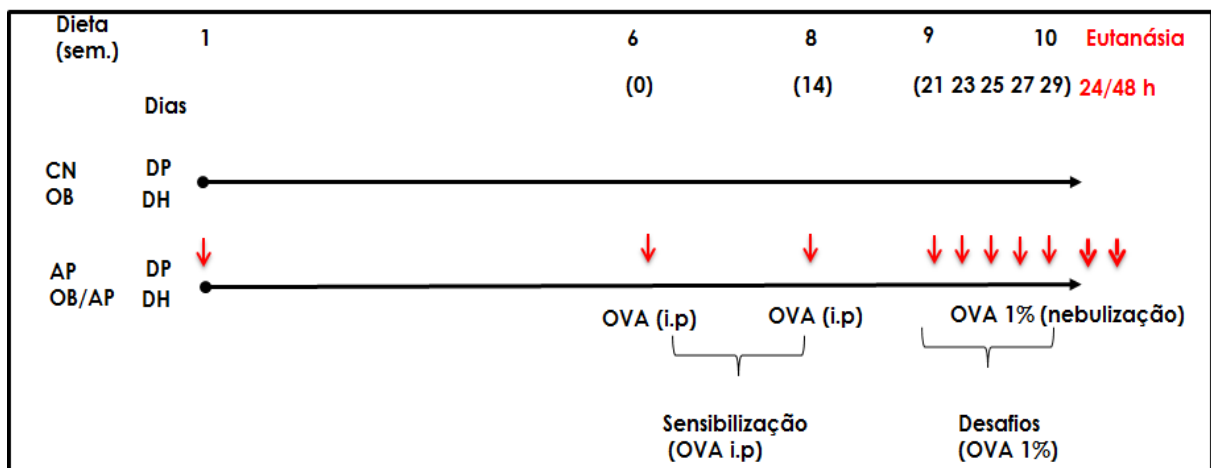


Figura 6 - Delineamento experimental do protocolo de indução de obesidade e alergia pulmonar experimental. DP – dieta padrão; DH – Dieta hiperlipídica.

3.7 Obtenção do material biológico

As amostras biológicas foram obtidas após 10 semanas de dieta, correspondendo a 24 e 48 horas após o último desafio com a OVA. Os animais foram eutanasiados através de dose letal de solução de ketamina (90mg/Kg, Syntec, Brasil) e xilasina (10mg/kg, Agener União, Brasil) por via intraperitoneal. As amostras

foram armazenadas individualmente, e mantidas sob refrigeração em freezer A -80°C até serem realizadas as análises.

3.7.1 Coleta do soro

Para a dosagem de glicemia de jejum, triglicérides, colesterol total e frações, no dia da eutanásia, os animais alimentados com a dieta padrão (CN), e os animais alimentados com a dieta hiperlipídica (OB) ficaram 8 horas de jejum. Após a anestesia o sangue foi coletado a partir de punção cardíaca. As amostras foram centrifugadas a 7.500 x g, por 2 minutos à temperatura ambiente (Centrífuga 5410, Eppendorf, Alemanha) para obtenção do soro, que foi armazenado a -80°C.

A análise dos níveis séricos de leptina e TNF- α , foi realizada em outro grupo experimental, no qual os animais não foram submetidos a jejum prolongado. Após a anestesia o sangue foi coletado a partir de punção cardíaca. As amostras foram centrifugadas a 7.500 x g, por 2 minutos à temperatura ambiente (Centrífuga 5410, Eppendorf, Alemanha) para obtenção do soro, que foi armazenado a -80°C. As análises foram realizadas com os Kits de Leptina (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) e TNF- α (kits de ELISA BD OptEIA, BD Biosciences, EUA) pelo método de ELISA de acordo com as instruções dos fabricantes. Paralelamente, para análise de IgE anti-OVA, uma alíquota do soro foi acondicionada em ependorf para posterior detecção do anticorpo específico quantificado como densidade ótica (DO) em leitor de microplacas (SpectraMax 190, Molecular Devices, EUA).

3.7.2 Coleta e processamento do lavado broncoalveolar (LBA) para contagem total e diferencial de células

Após a coleta do sangue, os animais foram eutanasiados por ruptura do diafragma e em seguida o lavado broncoalveolar (LBA) foi coletado através da inserção de sonda (CPL Medical's, São Paulo, SP, Brasil) na traquéia exposta. Os pulmões foram então lavados com 1.0 mL de PBS (NEUHAUS-STEINMETZ *et al*, 2000). O LBA coletado foi utilizado para a contagem total de células e, logo após, foi centrifugado a 440 x g, por 15 minutos a 4°C (CR 312, Thermo Electron Corporation, EUA).

3.7.3 Coleta da medula óssea

Para contagem de granulócitos na medula óssea, o fêmur da perna direita de cada animal foi retirado com o auxílio de material cirúrgico (pinças e tesouras). O canal medular foi lavado com 1mL de PBS contido na placa, utilizando-se uma seringa de 5 ml e uma agulha (25x0,70 mm ou 22G1). A suspensão coletada foi utilizada para contagem total e diferencial de granulócitos na medula óssea.

3.7.4 Coleta e processamento do pulmão para dosagem de citocinas, CCL11, EPO e MPO.

Após a coleta do LBA, a caixa torácica do animal foi recortada longitudinalmente e o tecido pulmonar foi lavado através de perfusão com 10 mL de PBS gelado, em seguida o lobo esquerdo pulmonar foi coletado e acondicionado a t° de -20° C para posterior dosagem citocinas, CCL11, EPO e MPO. O lobo direito do pulmão e a traquéia também foram coletados e fixados durante 24h em solução de formol tamponado 10% para posterior análise histológica. Para a obtenção do homogenato, 100 mg do lobo esquerdo do pulmão foi macerado em 1 mL de PBS contendo inibidores de proteases (0,1mM fluoreto de fenilmetilsulfonil, 0,1mM cloreto de benzetonio, 10mM EDTA e 2 µL de aprotinina A) e 0,05% Tween 20. As amostras foram então centrifugadas a 440 x g, por 15 minutos a 4°C (CR 312, Thermo Electron Corporation, EUA). Os sobrenadantes foram armazenados a -20°C, até serem utilizados para dosagem de citocinas e quimiocinas através de ELISA.

3.7.5 Coleta do tecido adiposo

Para coletar o tecido adiposo localizado nas regiões perigonadal e retroperitoneal, foi realizada uma incisão na região abdominal. Em seguida, o tecido adiposo perigonadal e retroperitoneal foram pesados e acondicionados em formol tamponado 10% para posterior análise histológica.

3.8 Dosagem de Glicemia de jejum, triglicérides, colesterol total e frações

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

3.9 Dosagem sérica de anticorpos IgE anti-OVA

A avaliação da produção IgE específica anti-OVA foi analisada através de ELISA. Após a sensibilização com 10 μ L de OVA (Grade V; Sigma-Aldrich Corp, St Louis, MO, USA) em 1 mL de tampão carbonato (100 μ L/poço), a placa foi incubada a 4°C por 18 horas e lavadas a seguir com PBST. Após bloqueio com 5% de caseína em PBST (200 μ L/poço), a placa foi lavada e as amostras de soro foram adicionadas, na concentração de 1:20 (IgE) seguindo-se uma incubação por 1 hora. A seguir, a placa foi novamente lavada e os anticorpo anti-IgE, (Pharmingen™, Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) foi adicionado. A estreptavidina marcada com peroxidase (Pharmingen™, Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) foi adicionada após incubação (1 hora a TA) e lavagem da placa. A seguir, a reação foi revelada pela adição de substrato contendo ácido cítrico 0,1M, citrato de sódio 0,1M, água destilada, cromógeno OPD e H₂O₂ 30%. A reação foi bloqueada com H₂SO₄ 4N e a leitura foi realizada em leitor de microplacas a 492 nm (SpectraMax® 190,

Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). A detecção do anticorpo específico foi quantificada como densidade ótica (DO) em leitor de microplacas (SpectraMax 190, Molecular Devices, EUA).

3.10 Contagem total e diferencial de leucócitos no lavado broncoalveolar

A contagem total de células no LBA foi realizada utilizando-se o corante de Turk (Sigma-Aldrich). As células foram contadas em câmara de Neubauer e os resultados foram expressos como número específico de células $\times 10^5/\text{mL}$ de LBA. O sedimento do LBA foi utilizado para a contagem diferencial de leucócitos, através de *cytospin*. Para isto, 200 μL do sedimento do LBA, contendo aproximadamente 1×10^5 células, foram citocentrifugados a $20 \times g$ por 5 minutos à T.A (FANEM 248, São Paulo, Brasil). Posteriormente, as lâminas foram coradas com Panótipo rápido (Laborclin Ltda, Pinhais, Brasil), sendo contadas 300 células por lâmina, com o auxílio de microscópio ótico Zeiss (Hallbergmoos, Alemanha) em aumento de 400X.

3.11 Contagem total e diferencial de granulócitos na medula óssea

Após a coleta na medula óssea, a suspensão celular foi diluída na proporção de 1:10 e homogeneizada em tubo falcon. Esta suspensão celular foi utilizada para contagem total de células em câmara de Neubauer (com líquido de Turk). Para isto, 100 μL do sedimento do LBA, contendo aproximadamente 1×10^6 células, foram citocentrifugados a $20 \times g$ por 5 minutos à T^oA (FANEM 248, São Paulo, Brasil). Posteriormente, as lâminas foram coradas com Panótipo rápido (Laborclin Ltda, Pinhais, Brasil). De acordo com critérios morfológicos e com a coloração diferenciada apresentada pelos grânulos eosinofílicos, foram contadas 200 células no total entre neutrófilos e eosinófilos maduros, com o auxílio de microscópio ótico Zeiss (Hallbergmoos, Alemanha) em aumento de 400X.

3.12 Avaliação histológica do tecido pulmonar

Para avaliação histológica, a traquéia e o lobo pulmonar esquerdo foram fixados durante 24h em solução de formol tamponado 10%. Após os procedimentos rotineiros de inclusão em parafina, foram realizados cortes semi-seriados de 4 μm de espessura.

3.12.1 Score inflamatório

Para a determinação do escore inflamatório, as lâminas foram coradas por H&E e observadas em toda sua extensão em microscópio óptico Zeiss (Hallbergmoos, Alemanha) em aumento de 200X. As áreas peribronquiolar e perivascular foram avaliadas de acordo com o grau de infiltrado celular inflamatório, ao qual foram atribuídos escores de 0 a 5 para cada campo (GOUVEIA et al., 2012).

- ✓ 0, ausência de processo inflamatório;
- ✓ 1, células inflamatórias esparsas;
- ✓ 2, uma camada de células inflamatórias ao redor da estrutura avaliada;
- ✓ 3, anel de células inflamatórias contendo 2 a 4 camadas;
- ✓ 4, aglomerado focal de células inflamatórias ao redor da estrutura;
- ✓ 5, infiltrado inflamatório intenso.

3.12.2 Número de eosinófilos no tecido pulmonar

Para a contagem de eosinófilos no tecido pulmonar, após seções rotineiras de desparafinização e desidratação, os cortes foram corados com o corante Direct Red 80-Sirius Red (Sigma Aldrich), por uma hora, e foram analisados 20 campos, em uma área delimitada por retículo Olympus (10mm/10) na região peribroncovascular, em aumento de 1000X, a contagem foi expressa por número de eosinófilos por 100 μm^2 .

3.12.3 Número de mastócitos no tecido pulmonar e traquéia

Para contagem de mastócitos, os cortes da traquéia e do tecido pulmonar desparafinizados e desidratados foram corados com Azul de Toluidina (Sigma Aldrich) por 2 a 3 min. O número de mastócitos foi obtido em toda extensão dos cortes, em aumento de 400X.

3.12.4 Número de células produtoras de muco no epitélio pulmonar

A avaliação da produção de muco pelas células caliciformes foi realizada nos cortes pulmonares corados com Ácido periódico Shiff (PAS) (Easypath – Erviegas Ltda) e foi expressa através da contagem do número de células PAS positivas por 100 μm^2 em 20 campos, sendo que a área foi delimitada por retículo Olympus (10mm/10) na região do epitélio pulmonar, aumento de 400X.

3.12.5 Análise histológica do tecido adiposo

Para análise histológica do tecido adiposo, após a fixação em formol, foram realizados os procedimentos rotineiros de inclusão em parafina, foram realizados cortes semi-seriados de 4 μm de espessura. Posteriormente os cortes foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE) e observadas em toda sua extensão em microscópio óptico Zeiss (Hallbergmoos, Alemanha) em aumento de 200X.

3.13 Avaliação do perfil fenotípico de macrófagos e a número de neutrófilos no tecido pulmonar

A imunohistoquímica foi utilizada para avaliação de marcadores fenotípicos em macrófagos localizados no pulmão, assim como para avaliar o número de neutrófilos no pulmão. Para isso foi utilizada a expressão das enzimas arginas e iNOS, para identificação do fenótipo apresentado por macrófagos. E a expressão da enzima mieloperoxidase foi utilizada para identificação da presença de neutrófilos no tecido pulmonar. A metodologia utilizada foi da Biotina-estreptavidina peroxidase

(Santa Cruz Biotechnology, Inc). Para isso, cortes histológicos de 5µm de espessura foram colocados em lâmina silanizadas. As lâminas foram desparafinizadas e hidratadas e na sequência, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada 10V (3%). Foi então realizada a lavagem com água e PBS. A recuperação antigênica foi obtida em alta temperatura. Após este período as lâminas foram lavadas em PBS. Finalizada a etapa do bloqueio, a solução com os anticorpos primário iNOS (1:50) Santa Cruz Biotechnology, Inc), arginase (1:50) (Santa Cruz Biotechnology, Inc) e MPO à 3µg/mL (R&D System) foi aplicada nos cortes histológicos em seguida as lâminas foram incubadas overnight a 4°C. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas em PBS. Após esta etapa, os cortes foram incubados por 30 min com o anticorpo secundário a 1µg/mL (Santa Cruz Biotechnology, Inc), em seguida foi adicionada o complexo biotina-estreptavidina por 30 min e seguiu-se a revelação pelo cromógeno 3,3 Diaminobenzidina (DAB) (Santa Cruz Biothechnology, Inc). Os macrófagos foram identificados fenotipicamente baseado em critérios morfológicos e na expressão das enzimas arginase para o perfil M2 e iNOS para o perfil M1. Para isso, foram analisados 20 campos, em uma área delimitada por retículo Olympus (10mm/10) na região peribroncovascular e no parênquima pulmonar, em aumento de 1000X, a contagem foi expressa por número de macrófagos positivos para arginase, iNOS e MPO / 100 µm².

3.14 Dosagem de citocinas e CCL11 no homogenato do tecido pulmonar

O sobrenadante do homogenato do tecido pulmonar foi utilizado no ensaio enzimático ELISA para as citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-12, TNF-α e IFN-γ (BD OptEIA, BD Biosciences, EUA), IL-13, IL-25, IL-33, leptina e a quimiocina CCL11 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), IL-17A (eBioscience, Inc) de acordo com as instruções dos fabricantes. Para isso, placas de 96 poços foram sensibilizadas com o anticorpo de captura diluído em tampão e incubadas por 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas em PBS Tween 20 0,05% (PBST), seguindo-se um bloqueio dos sítios inespecíficos da placa por 1 hora. As amostras foram adicionadas em cada poço e paralelamente para obtenção das curvas-padrão, foram adicionadas as concentrações indicadas dos recombinanes específicos para cada citocina. Após o tempo pré estabelecido foram realizadas a lavagem das placas. Em seguida para os

kits BD OpTEIA, o complexo anticorpo de captura biotilado e streptavidina foram adicionados e incubados por 2 horas a TA. Para os kits R&D Systems eBioscience, primeiramente foi adicionado e incubado o anticorpo de captura por 2 horas a TA, as placas foram lavadas e posteriormente adicionadas a streptavidina por 1 hora a TA, quando as placas foram lavadas foi adicionado o substrato. A reação foi interrompida com H_2SO_4 1M e as leituras foram realizadas a 450 nm em leitor de microplacas (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices, EUA).

3.15 Avaliação da atividade das enzimas peroxidase eosinofílica (EPO) e mieloperoxidase (MPO)

Para a dosagem da atividade das enzimas EPO e MPO o sedimento do homogenato pulmonar foi processado, após lise das hemácias, as amostras foram novamente centrifugadas a $440 \times g$, por 15 minutos a 4°C (CR 312, Thermo Electron Corporation, EUA), o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 1,9 mL de hexadeciltrimetil brometo de amônio (HTAB) 0,5% em PBS e homogeneizado. A seguir, as amostras foram congeladas três vezes em nitrogênio líquido e centrifugadas conforme condições descritas acima.

Para análise da produção de EPO, 50 μL do sobrenadante do homogenato pulmonar foram colocados em uma placa de 96 poços, juntamente com 50 μL de substrato contendo 1,5mM de ortofenileno-diamina (OPD) em tampão tris-HCl-0,075mM (pH = 8,0), acrescido de H_2O_2 6,6mM. As amostras foram incubadas por 30 minutos à TA, no escuro. A reação foi interrompida com 50 μL de H_2SO_4 1M e a leitura foi realizada a 492 nm em leitor de microplacas (SpectraMax[®] 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Para avaliação da MPO, 100ul de cada amostra foi adicionado/poço, posteriormente foi adicionado 100ul de substrato com 6mM de OPD em tampão citrato a 10mM (pH = 4,5) acrescido de H_2O_2 . A reação foi parada com 50 ul de H_2SO_4 1M e a leitura foi realizada a 492 nm em leitor de microplacas (SpectraMax[®] 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

3.16 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software Graph Pad Prism 5.0 (Graphpad Software,EUA). As variáveis numéricas foram avaliadas nos diferentes grupos pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov para distribuição gaussiana dos dados. Posteriormente foi utilizada ANOVA de duas vias para realização da curva de peso e da curva do consumo das dietas e em seguida o pós teste de Bonferroni. Para as demais análises foi utilizado o Teste t não pareado para os dados paramétricos e o teste de Mann Whitney para os dados não paramétricos. O nível de significância admitido para os testes foi de $P \leq 0,05$. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização da obesidade em camundongos BALB/c fêmeas

4.1.1 Consumo das dietas padrão e hiperlipídica, ganho de peso e acúmulo das gorduras perigonadal e retroperitoneal

Inicialmente para a confirmação da indução da obesidade foram analisados os consumos das dietas padrão pelos animais do grupo controle (CN) e hiperlipídica pelos animais do grupo obeso (OB). A análise do consumo das dietas foi realizada a cada dois dias durante as 10 semanas do protocolo de indução da obesidade, sendo que esta análise possibilitou a obtenção da média de consumo semanal (Figura 7A) e diário (Figura 7B). Os resultados demonstraram que durante a primeira semana do protocolo, as médias de consumo entre os animais dos grupos OB e CN foram semelhantes (Figura 7A). No entanto, a partir da segunda semana, houve redução significativa no consumo semanal pelos animais do grupo OB, quando comparados ao grupo CN, sendo que esta diferença manteve-se durante todo o protocolo de indução de obesidade. Paralelamente, houve também redução na média de consumo diário nos animais do grupo OB (Figura 7B).

Adicionalmente, o ganho de massa corporal também foi acompanhado semanalmente, sendo observado que a partir da primeira semana do protocolo, a massa dos animais do grupo OB foi superior nos animais do grupo CN, havendo diferença significativa entre os grupos durante todo o período de indução da obesidade (Figura 7C). Além disso, a porcentagem de ganho de massa ao final do protocolo foi significativamente maior nos animais do grupo OB quando comparado ao grupo CN (Figura 7D). Contribuindo para o ganho de massa, houve também acúmulo de tecido adiposo nesses animais, representado pelo acúmulo de gorduras perigonadal (Figura 7E) e retroperitoneal (Figura 7F).

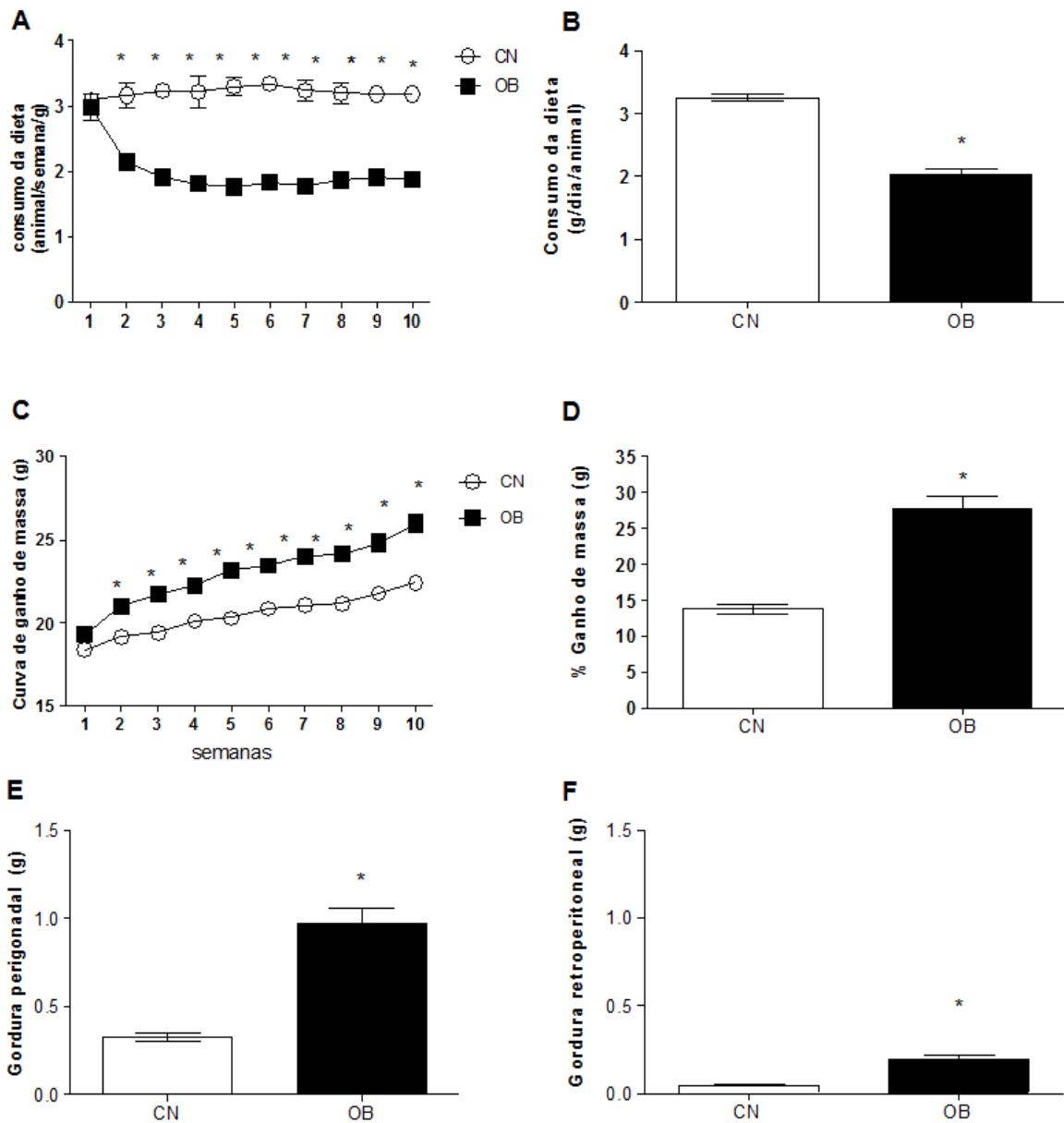


Figura 7: Caracterização da obesidade em camundongos BALB/c fêmeas. Consumo das dietas padrão (10% de calorias derivada de gordura) e hiperlipídica (60% de calorias derivada de gordura) (A); média do consumo diário/animal/g durante o protocolo (B); ganho de peso (C); porcentagem de ganho de peso (D); acúmulo de gordura perigonadal (E) e acúmulo de gordura retroperitoneal ao final do protocolo (F). Os dados são expressos como média +/- EPM. * $p < 0.05$. As barras representam a média +/- EPM. (n=10).

4.1.2 Avaliação histológica do tecido adiposo perigonadal

É bem estabelecido que a obesidade se desenvolva em decorrência da expansão do tecido adiposo devido à hiperplasia e hipertrofia dos adipócitos (SUN et al., 2011). No presente estudo, a observação histológica do tecido adiposo perigonadal indicou que os adipócitos dos animais do grupo OB (Figura 8B) apresentaram maior tamanho, quando comparados aos adipócitos dos animais do grupo CN (Figura 8A), sugerindo que a dieta hiperlipídica foi capaz de causar a hipertrofia dessas células, quando comparada à dieta padrão.

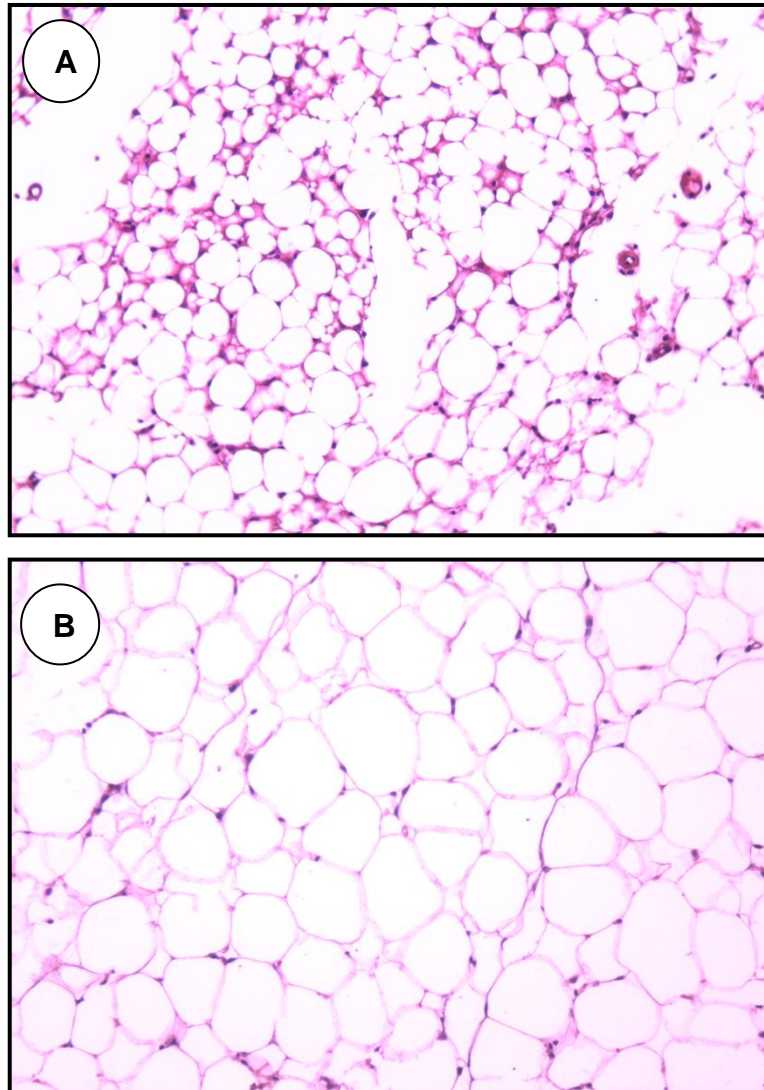


Figura 8: Imagem representativa da histologia do tecido adiposo perigonadal. Grupo CN (A); Grupo OB (B). Coloração HE. Aumento 20x. (n=10)

4.1.3 Avaliação da glicemia de jejum e do perfil lipídico.

Para avaliar o efeito da obesidade induzida pela dieta hiperlipídica sobre os níveis séricos de glicose, foi realizada a análise da glicemia de jejum no último dia do protocolo. A figura 9A mostra que os animais do grupo OB apresentaram glicemia em jejum maior quando comparada a glicemia dos animais do grupo CN. Além disso, foi observado que houve aumento das taxas de colesterol total (Figura 9B), colesterol-LDL (Figura 9D) e triglicérides (Figura 9E) no soro dos animais do grupo OB quando comparados aos animais do grupo CN. No entanto, não houve diferença nas taxas colesterol-HDL entre os grupos analisados (Figura 9C).

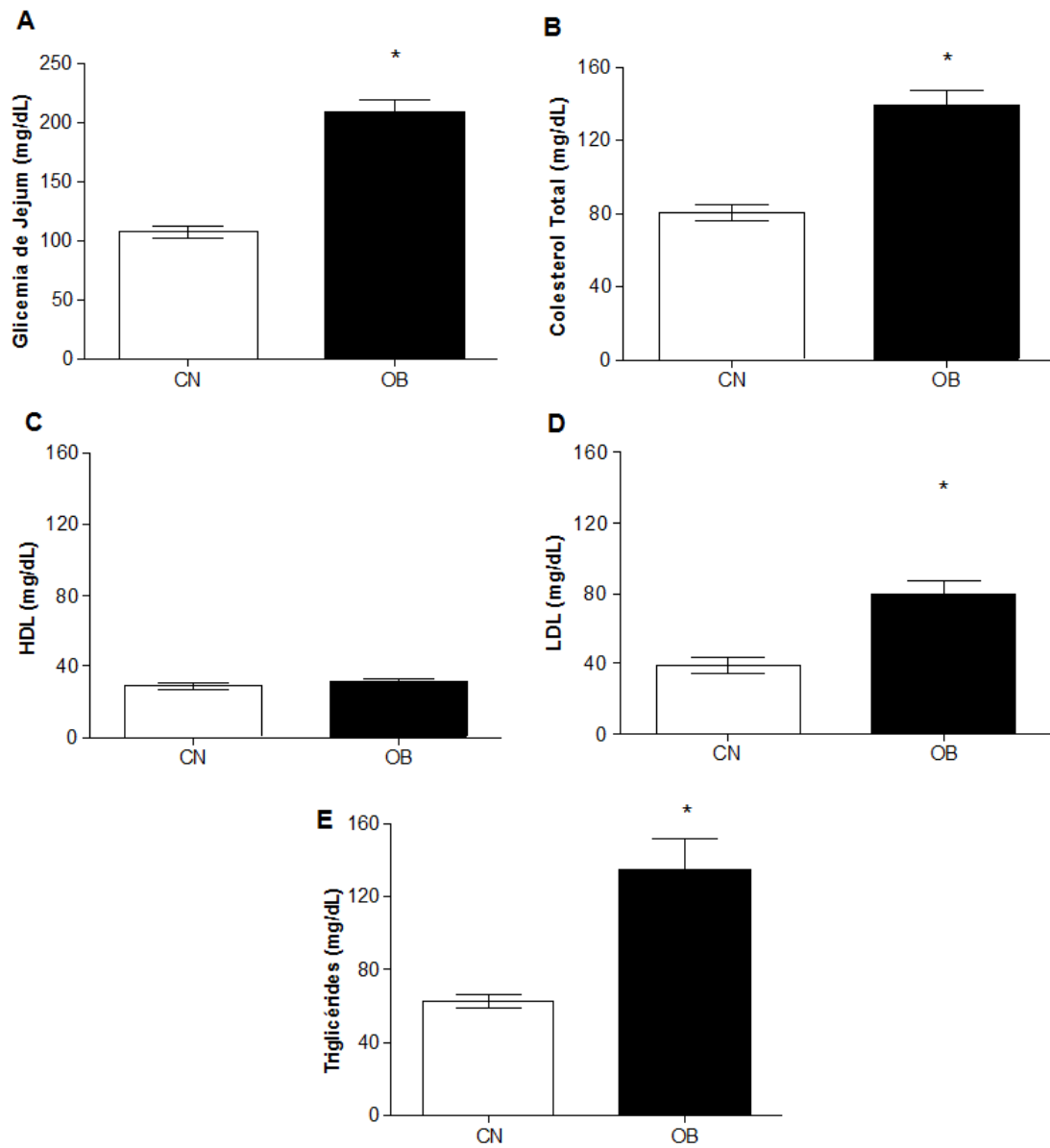


Figura 9: Glicemia de jejum e perfil lipídico no soro dos animais após 10 semanas de protocolo. Glicemia de Jejum (A); Colesterol total (B); HDL (C); LDL (D); Triglicérides (E). $*p < 0.05$. Os dados são expressos como média +/- EPM. $*p < 0.05$. As barras representam a média +/- EPM. (n=5).

4.1.4 Avaliação dos níveis séricos de leptina e TNF- α

Conforme relatado na literatura, sabe-se que a obesidade gera um quadro de inflamação sistêmica, tanto em humanos (SUGANAMI et al., 2005) quanto em modelo experimental (MORI et al., 2010). Desta forma, com o objetivo de avaliar se o presente modelo de obesidade reproduz esse quadro, os níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias leptina e TNF- α foram avaliados. Os resultados demonstraram que houve aumento significativo de leptina (Figura 10A) e de TNF- α (Figura 10B) nos animais do grupo OB, quando comparados aos animais do grupo CN.

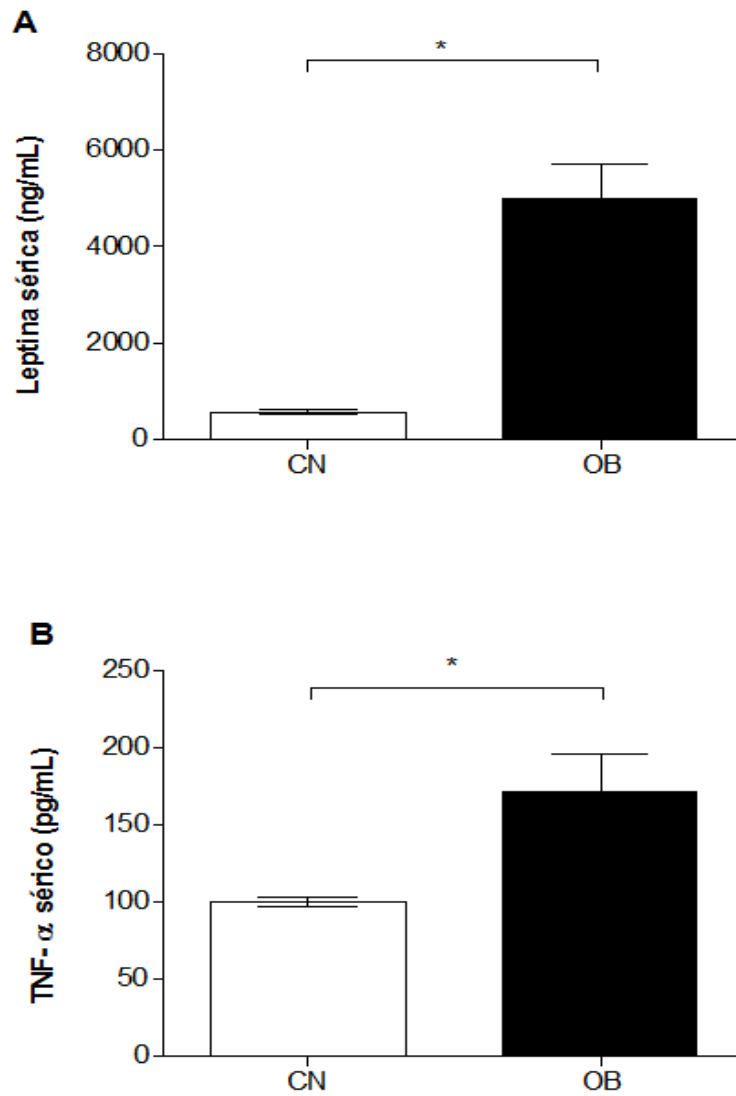


Figura 10: Avaliação dos níveis séricos de leptina (A) e TNF- α (B) após 10 semanas de dieta. Os dados são expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$. As barras representam a média \pm EPM. (n=5).

4.2 Influência da obesidade induzida por dieta sobre a resposta imune em modelo de alergia pulmonar, 24 e 48 horas após o último desafio com a ovalbumina.

4.2.1 Contagem total e específica de leucócitos no lavado broncoalveolar

Considerando-se que o influxo de células para o pulmão é uma característica da alergia pulmonar, foi realizada a contagem total e específica de leucócitos no LBA dos animais estudados, visando avaliar o grau de inflamação pulmonar em decorrência dos desafios com a OVA. A partir dessa análise, foi confirmado que o modelo utilizado para indução da alergia pulmonar foi eficaz, visto que houve aumento significativo no número total de leucócitos no LBA dos animais dos grupos AP em 24 e 48 horas após o último desafio com a OVA quando comparado ao grupo CN (Figuras 11A e 11B). Somado a este fato, o LBA dos animais do grupo AP apresentou um infiltrado predominantemente eosinofílico, sobretudo 24 horas após o último desafio (Figuras 11G e 11H), além de um número elevado de macrófagos (Figuras 11C e 11D), linfócitos (Figuras 11E e 11F) e neutrófilos (Figuras 11I e 11J), o que contribuiu para confirmar a indução da alergia pulmonar.

Contudo, uma análise comparativa dos resultados obtidos pela contagem de células em 48 horas em relação ao tempo de 24 horas no grupo AP demonstrou que o pico da resposta imune alérgica foi em 24 horas, uma vez que em 48 horas foi observada uma redução no infiltrado inflamatório (Figura 11B), no número de linfócitos (Figura 11F), eosinófilos (Figura 11H) e neutrófilos (Figura 11J), quando comparado aos resultados obtidos em 24 horas.

Com relação a influência da obesidade sobre o infiltrado celular no LBA foi observado que em 24 horas após o último desafio com a OVA, que os animais obesos submetidos ao modelo de alergia pulmonar (grupo OB/AP) apresentaram menor infiltrado inflamatório pulmonar (Figura 11A), com menor número de linfócitos (Figura 11E), eosinófilos (Figura 11G) e neutrófilos (Figura 11I), com exceção para o número de macrófagos, que apresentou um aumento significativo em ambos os tempos analisados (Figura 11C e 11D), quando comparado ao grupo AP. Entretanto, em 48 horas no LBA, o grupo OB/AP não foi observado uma diferença significativa em relação ao número total de leucócitos (Figura 11B) e de linfócitos (Figura 11F)

quando comparado ao grupo AP. Sendo que o número de eosinófilos (Figura 11H) e de neutrófilos (Figura 11J) nesse grupo permaneceu menor comparado ao grupo AP.

Além desses resultados, na análise comparativa entre os tempos foi observado que no LBA do grupo OB/AP houve um aumento de macrófagos em 48 horas quando comparado a 24 horas (Figura 11D), em contrapartida, houve uma significativa redução no número de eosinófilos (Figura 11H) e de neutrófilos (Figura 11J) quando comparada ao tempo de 24 horas.

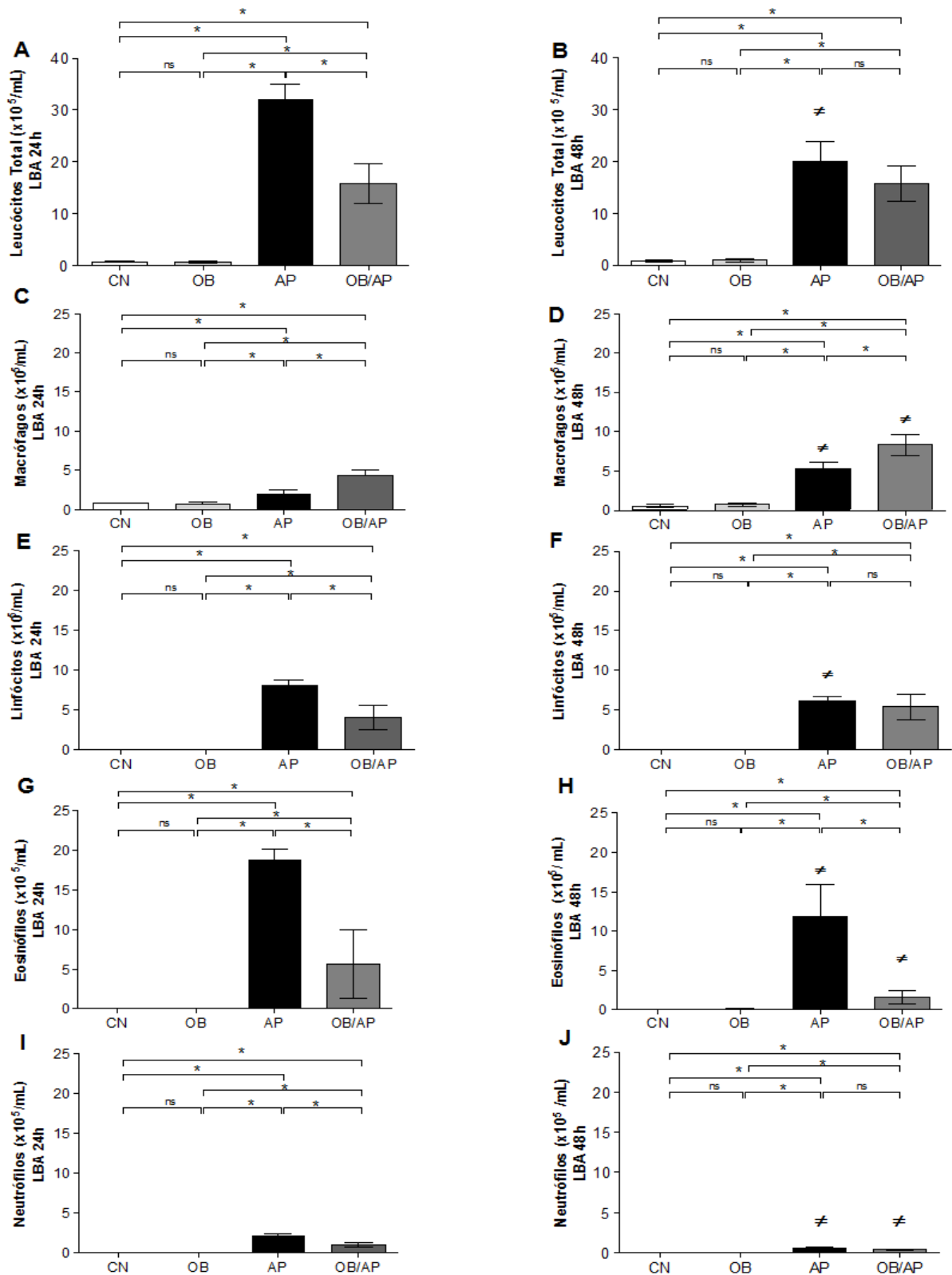


Figura 11: Contagem total e específica de leucócitos no LBA. Número total de leucócitos (A, B); Macrófagos (C, D); Linfócitos (E, F); Eosinófilos (G, H); Neutrófilos (I, J), 24h e 48h após o último desafio com a OVA. Os dados são expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$; n.s., não significativo. # $p < 0.05$ AP e OB/AP em 48h comparados a AP e OB/AP em 24h. As barras representam a média \pm EPM. (n=5).

4.2.2 Avaliação do infiltrado inflamatório pulmonar

A partir de uma avaliação semiquantitativa do infiltrado inflamatório celular no tecido pulmonar, obteve-se o grau de inflamação no pulmão dos animais estudados. Confirmando o aumento de células ocorrido no LBA em 24 e 48 horas após o último desafio com a OVA, o tecido pulmonar dos animais dos grupos AP apresentaram um infiltrado inflamatório perivascular e peribronquiolar intenso, quando comparado aos animais do grupo CN (Figuras 12A, 12B e 12C). A análise comparativa do escore inflamatório entre os dois tempos demonstrou que houve um declínio no infiltrado inflamatório em 48 horas nos animais do grupo AP quando comparado ao escore inflamatório de 24 horas no mesmo grupo.

Já nos animais do grupo OB/AP, o escore inflamatório foi significativamente menor, em 24 horas, quando comparado ao infiltrado presente no pulmão dos animais do grupo AP (12A e 12B). No entanto, em 48 horas, não houve diferença entre o escore inflamatório no pulmão dos animais do grupo OB/AP quando comparado ao do grupo AP (Figura 12C).

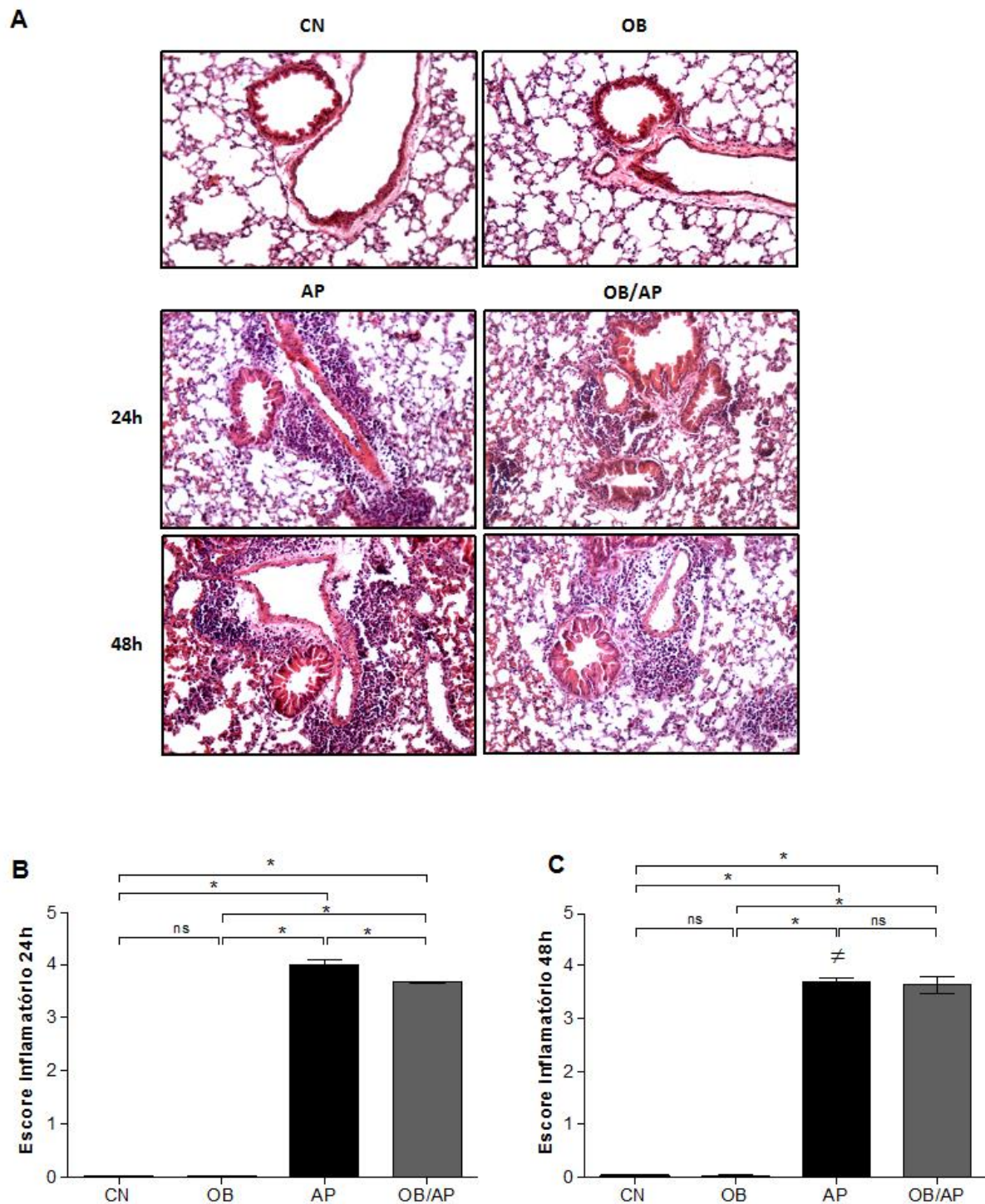


Figura 12: Avaliação do infiltrado inflamatório pulmonar. Imagem representativa do pulmão dos animais dos grupos CN, OB, AP e OB/AP 24h e 48h após o último desafio com a OVA (coloração HE) (A); Escore inflamatório em 24h (B) e em 48h (C) após o último desafio com a OVA. Os dados são expressos como média \pm EPM. $*p < 0.05$; n.s., não significativo. As barras representam a média \pm EPM. (n=5).

4.2.3 Contagem de eosinófilos no tecido pulmonar através de coloração com Sirius Red

Sabendo-se que os eosinófilos são células que exercem importante papel no desenvolvimento da resposta imune alérgica, sobretudo no remodelamento pulmonar (JOHANSSON, 2014), foi realizada análise do infiltrado eosinofílico pulmonar utilizando-se a coloração com Sírius Red, visto que este corante é mais específico para detecção destas células em vários tipos de tecidos (MEYERHOLZ et al., 2009).

Correlacionando com a contagem de eosinófilos no LBA, os resultados demonstraram que houve aumento no número de eosinófilos no tecido pulmonar, nos animais dos grupos AP tanto 24 horas quanto em 48 horas após o último desafio com a OVA quando comparado ao grupo CN (Figura 13A, 13B e 13C). No entanto, os animais do grupo OB/AP apresentaram um número de eosinófilos menor no pulmão em ambos os tempos analisados quando comparado ao grupo AP (Figuras 13A, 13B e 13C).

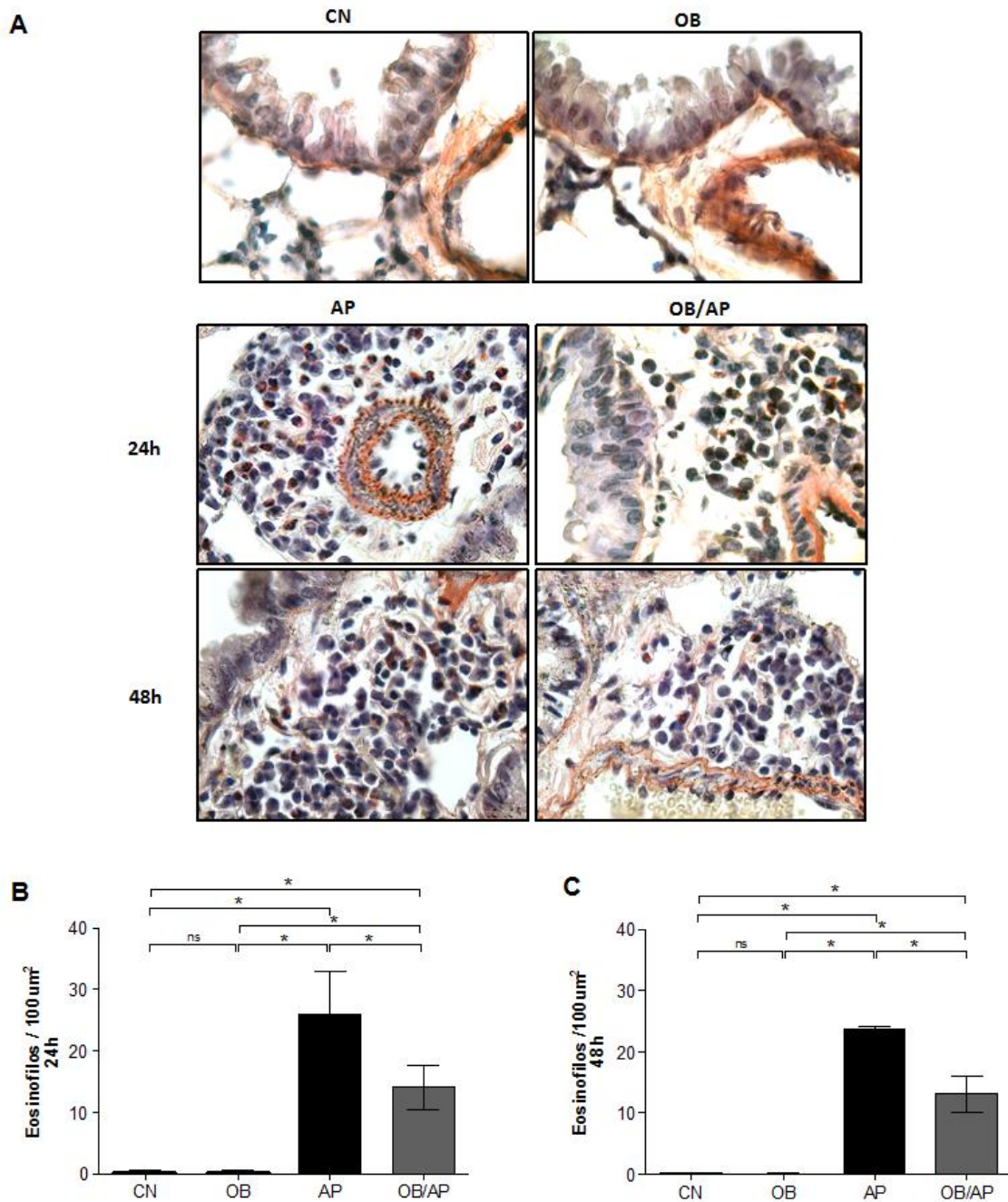


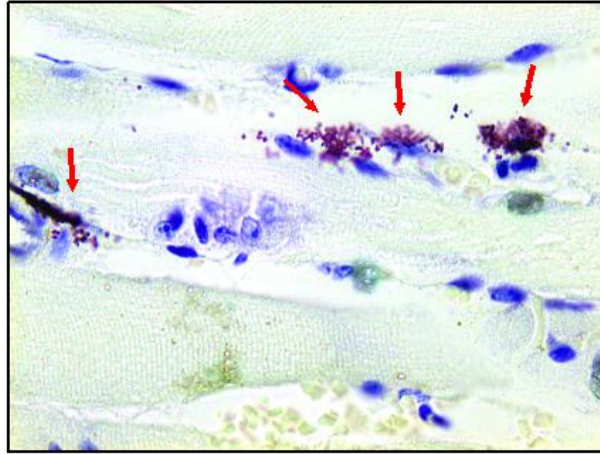
Figura 13: Avaliação do infiltrado inflamatório eosinofílico no tecido pulmonar. Imagem representativa do infiltrado eosinofílico no tecido pulmonar nos grupos CN, OB, AP, OB/AP 24h e 48h após o último desafio com a OVA, coloração Sírus Red (A); Número de eosinófilos 24h (B) e em 48h (C) após o último desafio com a OVA. Os dados são expressos como média +/- EPM. * $p < 0.05$; n.s., não significativo. As barras representam a média +/- EPM. (n=5).

4.2.4 Contagem de mastócitos no pulmão e na traquéia

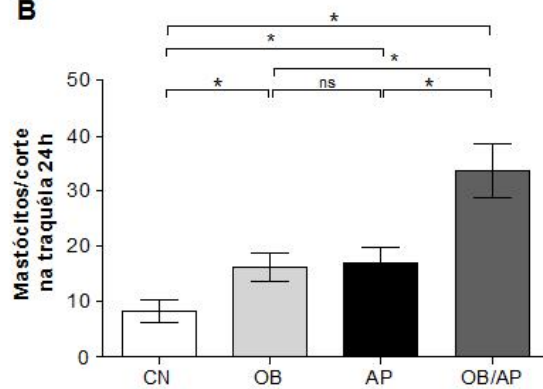
Estudos em modelo experimental de asma (XING et al., 2011; BANKOVA et al., 2014) já demonstraram que a traquéia é um importante local de acúmulo de mastócitos. Desta forma, foi realizada a contagem do número de mastócitos tanto na traquéia quanto no pulmão dos animais estudados, utilizando-se a coloração com Azul de Toluidina.

Em concordância com a literatura, à análise histológica evidenciou a presença significativa de mastócitos na traquéia dos animais do grupo AP, quando comparado ao número observado nos animais do grupo CN (Figura 14B). O mesmo não ocorreu no pulmão, visto que os animais do grupo AP apresentaram número similar de mastócitos comparado ao grupo CN (Figura 14C). Paralelamente, os animais do grupo OB/AP apresentaram um número mais elevado de mastócitos tanto na traquéia (figura 14B) quanto no pulmão (Figura 14C), quando comparado aos animais dos grupos AP. Surpreendentemente, verificou-se que a traquéia e o pulmão dos animais do grupo OB apresentaram elevado número de mastócitos comparado ao grupo CN (Figuras 14B e 14C).

A



B



C

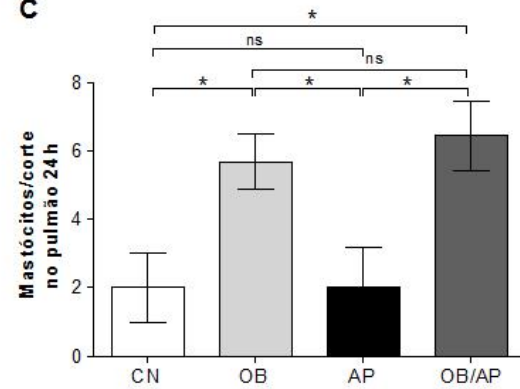


Figura 14: Avaliação do número de mastócitos na traquéia e no pulmão. Imagem representativa de mastócitos no traquéia, seta em vermelho (A), corados com Azul de Toluidina; Número de mastócitos na traquéia (B) e no tecido pulmonar (C) em 24h após o último desafio com a OVA. Os dados são expressos como média +/- EPM. * $p < 0.05$; n.s., não significativo. As barras representam a média +/- EPM. (n=5).

4.2.5 Contagem de células caliciformes no epitélio pulmonar

As células caliciformes são células produtoras de muco, localizadas no epitélio das vias aéreas, sendo que a hiperplasia e a metaplasia dessas células é considerada uma característica marcante do remodelamento tecidual ocorrido na asma (EVANS et al., 2009). No presente estudo, os resultados demonstraram que houve aumento no número de células caliciformes no epitélio pulmonar dos animais dos grupos AP, tanto em 24 horas quanto em 48 horas após o último desafio com a OVA, quando comparado ao grupo CN (Figura 15A, 15B e 15C). Verificou-se também que em ambos os tempos, os animais do grupo OB/AP apresentaram um aumento significativo de células produtoras de muco, quando comparado aos animais do grupo AP (Figuras 15A, 15B e 15C). Além disso, os resultados demonstraram que houve uma maior produção de muco em 48 horas quando comparado a 24 horas, tanto no grupo AP quanto para o grupo OB/AP (Figuras 15B e 15C).

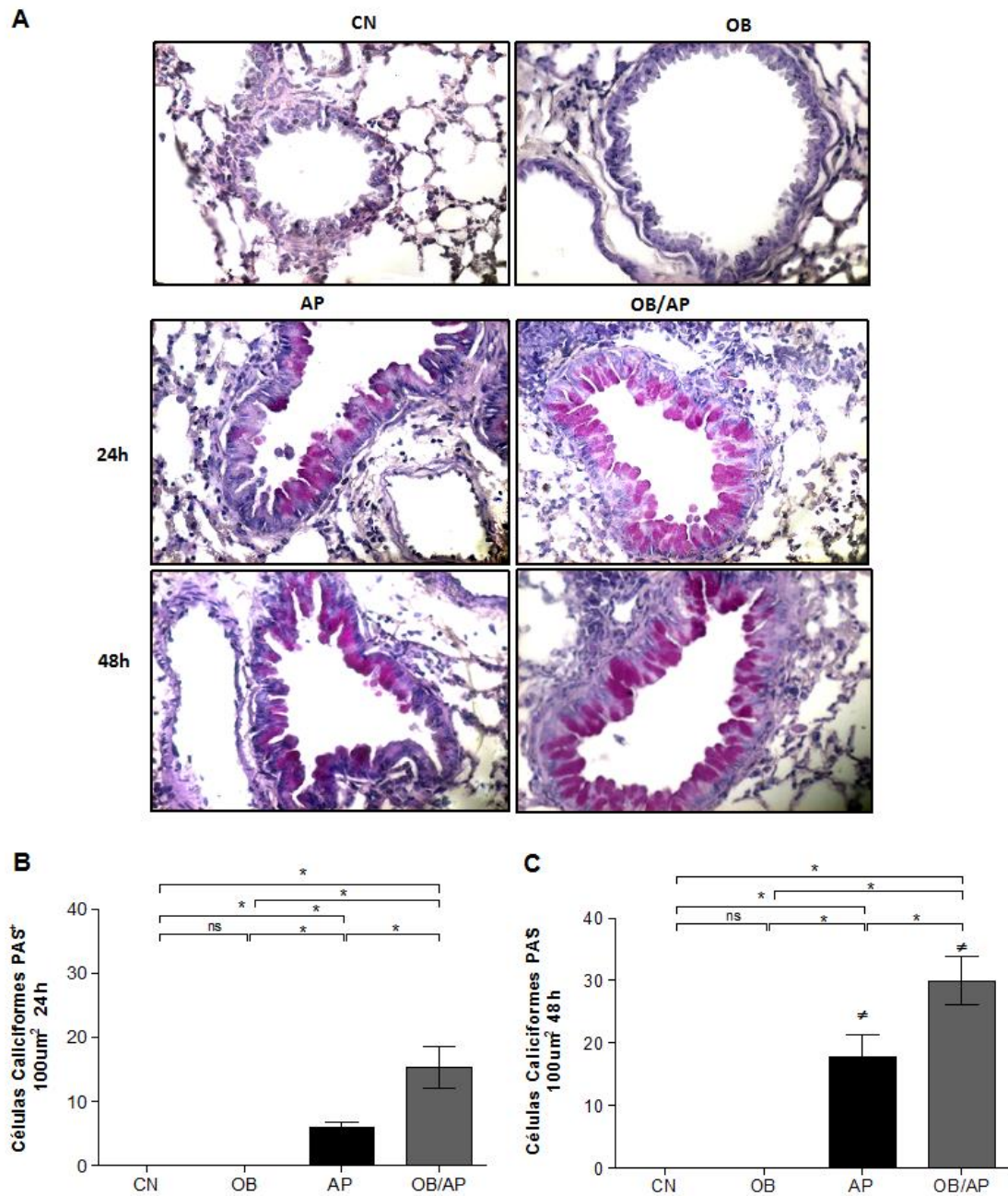


Figura 15: Avaliação do número de células caliciformes produtoras de muco no epitélio pulmonar. Imagem representativa do epitélio pulmonar nos grupos CN, OB, AP, OB/AP em 24h e 48h após o último desafio com a OVA (A); Número de células caliciformes PAS⁺ em 24h (B) e 48h (C) após o último desafio com a OVA. Os dados são expressos como média +/- EPM. * $p < 0.05$; n.s., não significativo. # $p < 0.05$ AP e OB/AP em 48h comparados a AP e OB/AP em 24h. As barras representam a média +/- EPM. (n=5).

4.2.6 Expressão da enzima arginase em macrófagos alveolares

O número elevado de macrófagos, no LBA, revelou uma importante questão, se estas células seriam macrófagos alternativamente ativados (M2) ou macrófagos classicamente ativados (M1), uma vez que ambos os tipos celulares estão envolvidos na resposta imune alérgica, porém em diferentes fenótipos de asma, tanto em modelo experimental (DRAIJER et al., 2013) quanto em humanos (BHAVSAR et al., 2008; SIDDIQUI et al., 2013). A alta expressão da enzima arginase em macrófagos, induzida principalmente pela ação das citocinas IL-4 e IL-13, pode ser utilizada como marcador fenotípico de macrófagos alternativamente ativados ou M2 (REDENTE et al., 2010; BARRON et al., 2013). Baseado nisso, a expressão da enzima arginase foi utilizada no presente estudo para identificar macrófagos M2 presentes no parênquima pulmonar e na região peribroncovascular nos diferentes grupos analisados, em 24 e 48 horas após o último desafio com OVA. Na análise de 24 horas, foi observado na região peribroncovascular e no parênquima pulmonar dos animais do grupo AP e OB/AP um aumento significativo no número de macrófagos positivos para arginase-(Mac-Arg⁺), quando comparado ao grupo CN, porém não houve diferença entre os dois grupos (Figuras 16B e 16D). Em 48 horas, o número de Mac-Arg⁺, permaneceu elevado somente na região peribroncovascular no grupo AP quando comparado ao grupo CN (Figura 16E), porém na análise entre os tempos, foi observada uma redução em 48 horas no número de células Mac-Arg⁺ em ambas regiões analisadas no pulmão dos animais do grupo AP, quando comparado a 24 horas (Figura 16C e 16E). Em relação ao grupo OB/AP foi observada, em 48 horas, uma redução no número de Mac-Arg⁺ nos animais do grupo OB/AP na região perivascular, quando comparado ao grupo AP (Figura 16E). A análise comparativa entre os tempos demonstrou que houve uma redução no número de Mac-Arg⁺ tanto no parênquima pulmonar (Figura 16C) quanto na região peribroncovascular (Figura 16E) dos animais do grupo OB/AP.

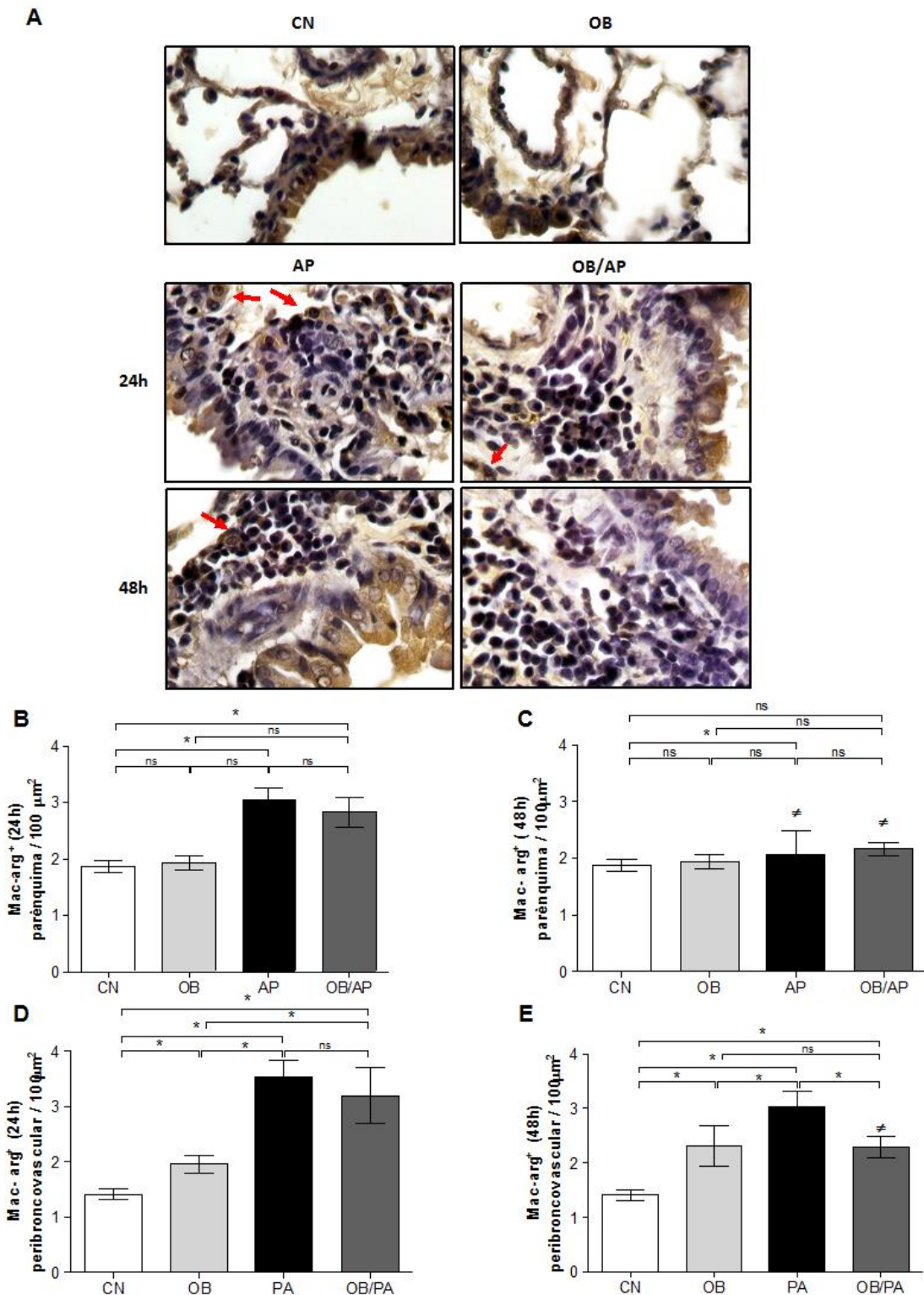


Figura 16: Avaliação da expressão da enzima arginase em macrófagos alveolares (Mac-Arg⁺). Imagem representativa da expressão da enzima arginase em macrófagos alveolares nos grupos CN, OB, AP e OB/AP em 24h e 48h após o último desafio com a OVA. Número de Mac-Arg⁺ na região peribroncovascular em 24h (A) e 48h (B); Número de Mac-Arg⁺ no parênquima pulmonar em 24h (C) e 48h (D) após o último desafio com a OVA. Os dados são expressos como média +/- EPM. * $p < 0.05$, n.s., não significativo; # $p < 0.05$ AP e OB/AP em 48h comparados a AP e OB/AP em 24h. As barras representam a média +/- EPM. (n=5).

4.2.7 Expressão da enzima iNOS em macrófagos alveolares

A enzima óxido nítrico sintase (iNOS), que controla a produção de óxido nítrico em macrófagos ativados, pode ser utilizada como marcador fenotípico de macrófagos classicamente ativados ou M1 (REDENTE et al., 2010). Neste sentido, a expressão da enzima iNOS foi utilizada para identificar a presença de macrófagos M1 no parênquima pulmonar e na região peribroncovascular nos diferentes grupos analisados, em 24 e 48 horas após o último desafio com OVA. Em 24 horas (Figura 17D) e em 48 horas (Figura 17E) foi observado um aumento de macrófagos Mac-iNOS⁺ na região peribroncovascular no pulmão dos animais do grupo AP.

Já nos animais do grupo OB/AP, em 24 horas um aumento significativo no número de Mac-iNOS⁺ no parênquima pulmonar quando comparado ao grupo AP (Figura 17B). Na região peribroncovascular, houve aumento no número dessas células, porém não houve diferença em relação ao grupo AP (Figura 17D). A análise de 48 horas, após o último desafio com a OVA, demonstrou um aumento significativo de Mac-iNOS⁺ no parênquima pulmonar (Figura 17C) e na região peribroncovascular (Figura 17E) no pulmão dos animais do grupo OB/AP quando comparado ao grupo AP. E ainda, os resultados da análise comparativa entre os tempos demonstraram um aumento significativo de Mac-iNOS⁺, em 48 horas, em ambas as regiões analisadas quando comparado a 24 horas (Figuras 17C e 17E).

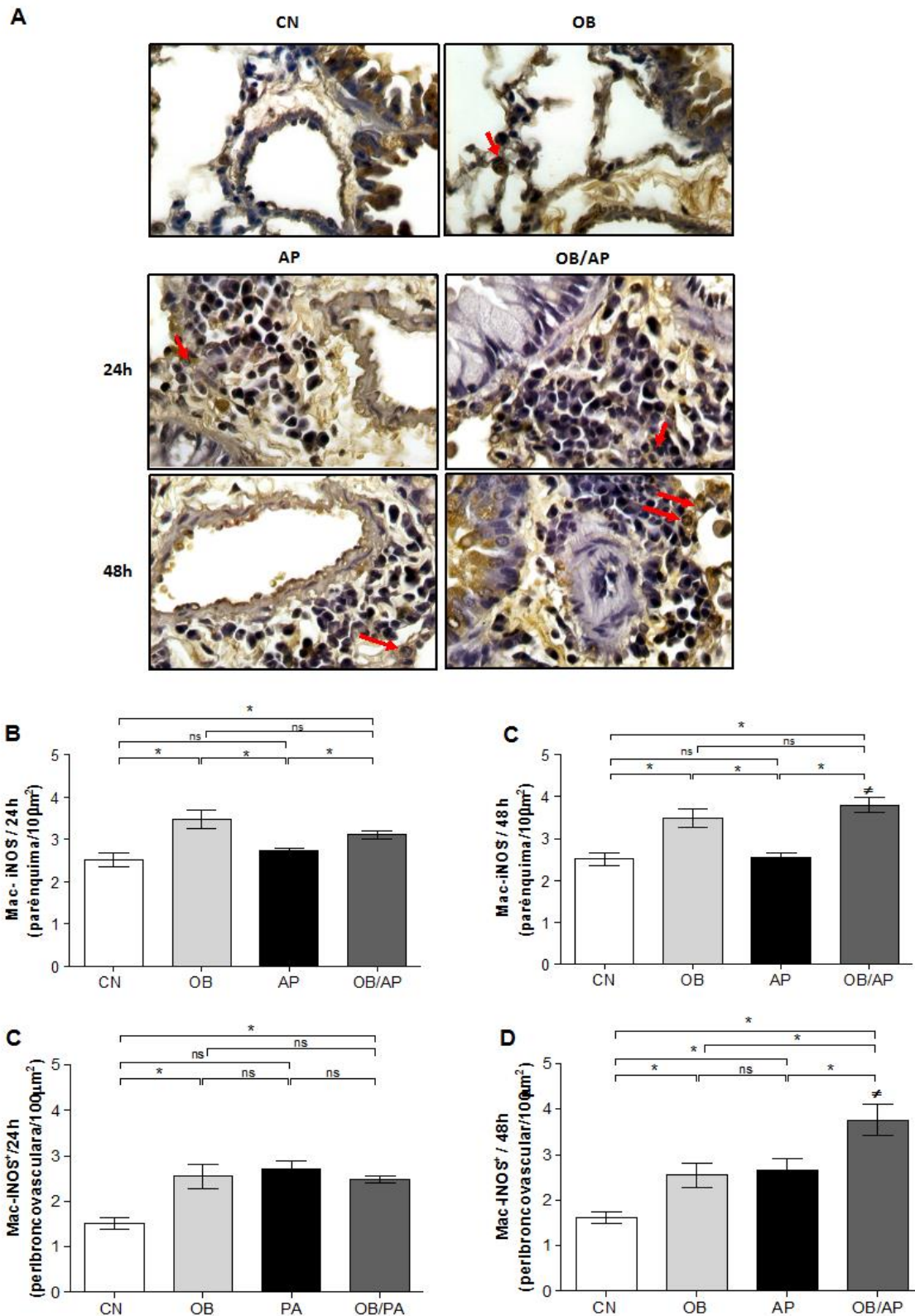


Figura 17: Avaliação da expressão da enzima iNOS em macrófagos alveolares (Mac-iNOS⁺). Imagem representativa da expressão da enzima iNOS⁺ em macrófagos alveolares nos grupos CN, OB, AP e OB/AP em 24h e 48h após o último desafio com a OVA. Número de Mac-iNOS⁺ na região peribroncovascular em 24h (A) e em 48h (B); Número de iNOS⁺ no parênquima pulmonar em 24h (C) e 48h (D) após o último desafio com a OVA. Os dados são expressos como média +/- EPM. **p*<0.05; n.s., não significativo; # *p*<0.05 AP e OB/AP em 48h comparados a AP e OB/AP em 24h As barras representam a média +/- EPM. (n=5).

4.2.8 Avaliação da atividade da enzima peroxidase eosinofílica (EPO).

Com relação à atividade EPO, sabe-se que esta enzima está presente em grande quantidade no interior dos grânulos dos eosinófilos e pode contribuir para a inflamação alérgica pulmonar (ACHARYA e ACKERMAN, 2014). Dessa forma, a sua atividade foi avaliada no presente trabalho como medida indireta do influxo eosinofílico no pulmão em 24 e 48 horas após o último desafio com a OVA. Correlacionando, com o número de eosinófilos encontrado no pulmão dos animais do grupo AP, foi observado um aumento significativo nos níveis de EPO em ambos os tempos analisados neste grupo quando comparado ao grupo CN (Figuras 18A e 18B). A análise comparativa entre os tempos demonstrou que em 48 horas, houve uma redução nos níveis dessa enzima no pulmão dos animais do grupo AP quando comparado aos níveis observados em 24 horas (Figura 18B).

Nos animais do grupo OB/AP, a atividade da EPO foi menor em relação ao grupo AP em 24 horas, porém não houve diferença entre os dois grupos em 48 horas após o último desafio com a OVA (Figuras 18A e 18B). Além disso, foi observado uma redução nos níveis dessa enzima no pulmão dos animais do grupo OB/AP, em 48 horas, quando comparado a 24 horas (Figura 18B).

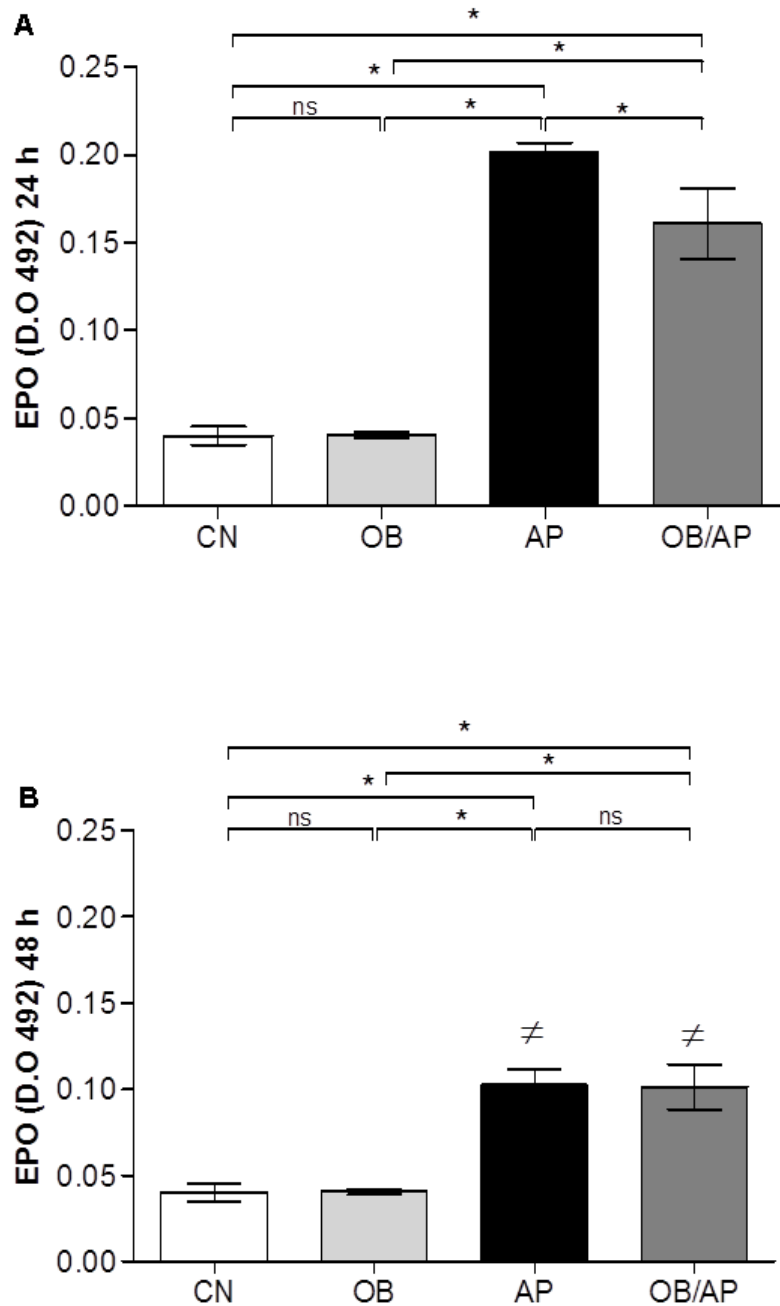


Figura 18: Avaliação da atividade de EPO no pulmão. Atividade da EPO em 24h (A) e 48h (B) após o último desafio com a OVA. Os dados são expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$; n.s., não significativo; # $p < 0.05$ AP e OB/AP em 48h comparados a AP e OB/AP em 24h. D.O, densidade ótica. As barras representam a média \pm EPM. (n=5).

4.2.9 Avaliação dos níveis da quimiocina CCL11

A quimiocina CCL11 é uma eotaxina indutora do recrutamento de eosinófilos para as vias aéreas (DENT et al., 2004). A análise da expressão desta quimiocina demonstrou, em conformidade com o aumento de eosinófilos encontrados no LBA e no tecido pulmonar, um aumento nos níveis de CCL11 no pulmão dos animais do grupo AP em 24 e 48 horas após o último desafio com OVA (Figura 19A e 19B). Contudo, na análise comparativa entre os tempos, foi observada que em 48 horas houve uma redução nos níveis de CCL11 no pulmão dos animais do grupo AP quando comparado a 24 horas (Figura 19B).

Em relação ao grupo OB/AP, os animais deste grupo apresentaram níveis menores de CCL11 comparado ao grupo AP em 24 horas após o último desafio com a OVA (Figura 19A). Porém, verificou-se que, em 48 horas não houve diferença entre os dois grupos AP e OB/AP (Figura 19B).

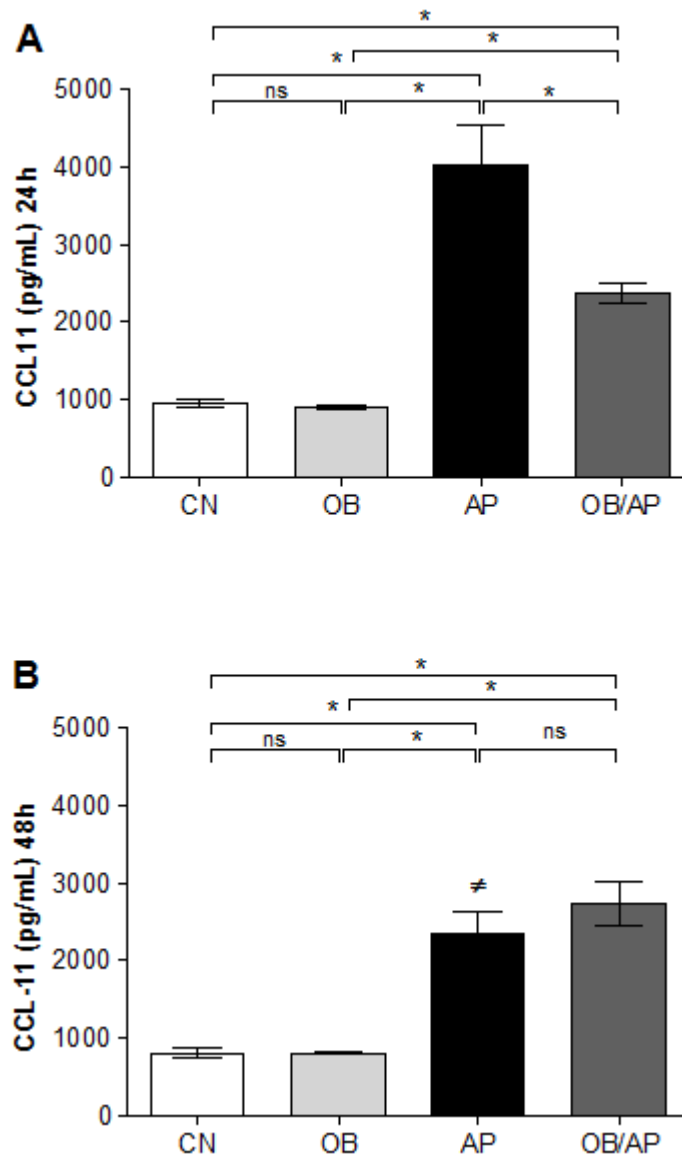


Figura 19: Avaliação dos níveis de CCL11 no homogenato do tecido pulmonar. Níveis de CCL11 em 24h (A) e em 48h (B), após o último desafio com a OVA. * $p < 0.05$. n.s., não significativo. # $p < 0.05$ AP e OB/AP em 48h comparados a AP e OB/AP em 24h. As barras representam a média \pm EPM (n=5).

4.2.10 Avaliação do número de eosinófilos e neutrófilos na medula óssea

Diante dos resultados obtidos e visto que já foi relatado, em literatura, que a obesidade acarreta um atraso no infiltrado inflamatório eosinofílico pulmonar em camundongos da linhagem C57BL/6 (CALIXTO et al., 2010), foi realizada a contagem de granulócitos na medula óssea dos animais estudados 24 e 48 horas após o último desafio com a OVA, na hipótese de haver uma produção alterada dessas células nesse órgão. Em conformidade com os resultados anteriores e confirmando a indução do modelo de alergia pulmonar, verificou-se que, em 24 horas houve um aumento significativo no número de eosinófilos e de neutrófilos na medula óssea dos animais do grupo AP (20A e 20C). Em 48 horas, o número de eosinófilos permaneceu elevado na medula óssea dos animais do grupo AP, quando comparado ao grupo CN (Figura 20B). Além disso, foi observada pela análise comparativa entre os tempos que houve uma declínio no número de eosinófilos em relação a 24 horas (Figuras 20B e 20D).

Já na medula óssea dos animais do grupo OB/AP, constatou-se que estes animais apresentaram um número elevado de eosinófilos em relação ao grupo CN, porém, o número dessas células foi menor, em 24 horas quando comparado ao grupo AP (Figura 20A). A análise de 48 horas demonstrou que não houve diferença no número dessas células entre os dois grupos (Figuras 20A e 20B). Além disso, constatou-se em 48 horas, que houve uma significativa redução no número de eosinófilos na medula óssea dos animais do grupo AP e um aumento no número dessas células no grupo OB/AP (Figura 20B) quando comparado a 24 horas.

Em relação ao número de neutrófilos na medula óssea foi observado que não houve diferença entre os grupos em 24 horas após o último desafio com OVA (Figura 20C). Contudo, foi observado, em 48 horas, um aumento significativo no número de neutrófilos somente nos animais do grupo OB/AP quando comparado ao grupo AP (Figura 20D). Em relação a análise comparativa entre os tempos, foi observado um aumento significativo no número dessas células, em 48 horas, no grupo OB/AP quando comparado com o tempo de 24 horas (Figura 20D).

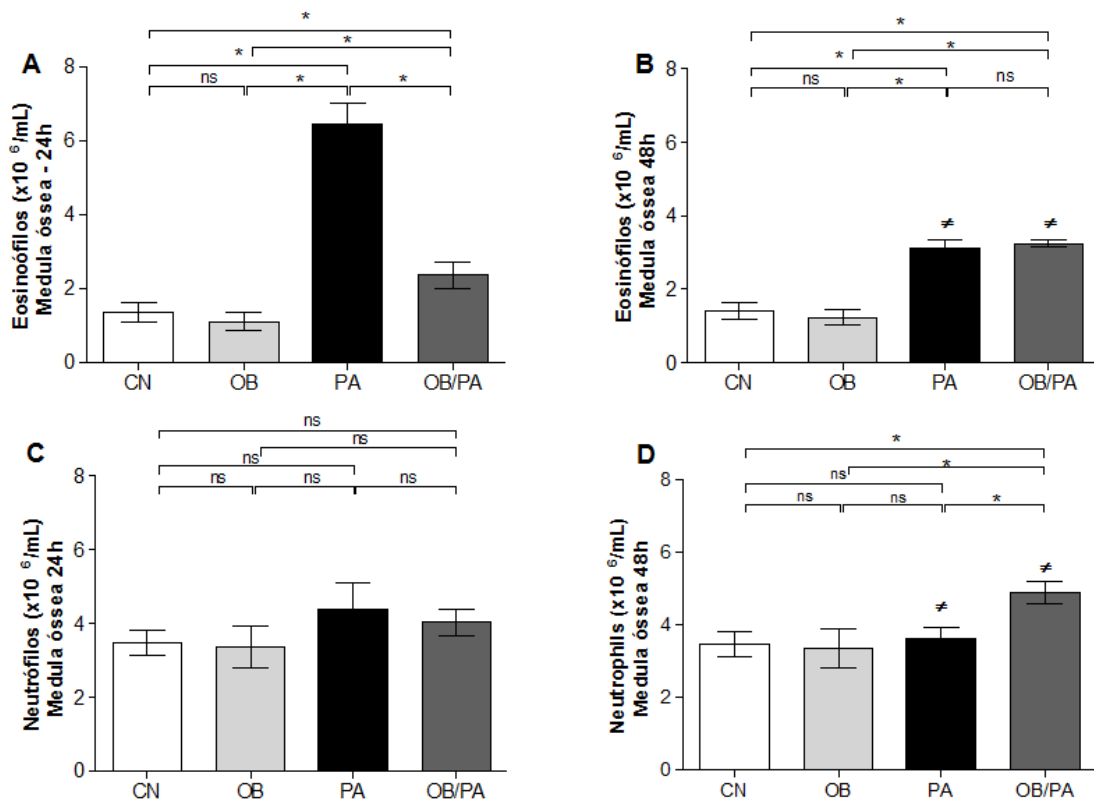


Figura 20: Avaliação do número de eosinófilos e neutrófilos na medula óssea. Número de eosinófilos em 24h (A) e em 48h (B); Número de neutrófilos em 24h (C) e em 48h (D) na medula óssea após o último desafio com a OVA. Os dados são expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$; n.s., não significativo. # $p < 0.05$ AP e OB/AP em 48h comparados a AP e OB/AP em 24h. As barras representam a média \pm EPM. (n=5).

4.2.11 Avaliação do número de neutrófilos no tecido pulmonar

Como foi observado um aumento no número de neutrófilos na medula óssea dos animais do grupo OB/AP em 48 horas, foi avaliado se estas células também estariam presentes em maior número no pulmão destes animais. Como esperado, houve um aumento significativo no número de neutrófilos no tecido pulmonar dos animais que foram sensibilizados e desafiados com a OVA, grupos AP e OB/AP quando comparados ao grupo CN, porém não houve diferença significativa entre os dois grupos analisados em 24 horas após o último desafio com a OVA (Figura 21B). Em 48 horas, os animais do grupo OB/AP apresentaram um número significativamente maior de neutrófilos quando comparado ao grupo AP (Figura 21C). A análise comparativa entre os tempos demonstrou que houve um aumento significativo no número de neutrófilos nos animais do grupo OB/AP em 48 horas quando comparado ao tempo de 24 horas (Figura 21C).

Em adição, foi observado que os animais do grupo OB apresentaram um pequeno aumento, mais significativo, no número de neutrófilos quando comparado ao número dessas células nos animais do grupo CN (Figuras 21B e 21C).

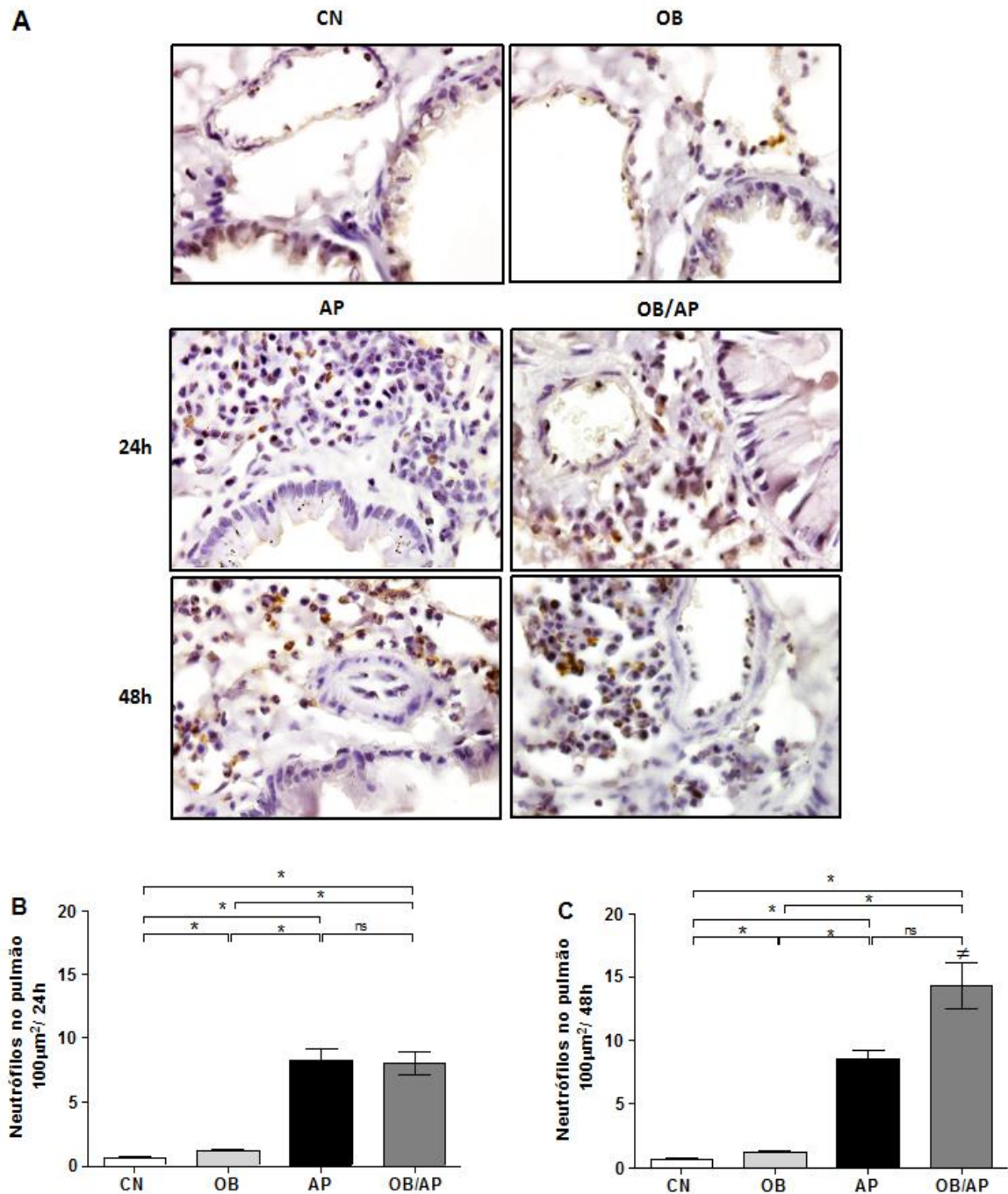


Figura 21: Avaliação do número de neutrófilos no pulmão. Imagem representativa da presença de neutrófilos MPO⁺ nos grupos CN, OB, AP, OB/AP em 24h e 48h após o último desafio com a OVA (A); Número de neutrófilos MPO⁺ em 24h (B) e 48h (C) após o último desafio com a OVA. Os dados são expressos como média +/- EPM. * $p < 0.05$; n.s., não significativo. # $p < 0.05$ AP e OB/AP em 48h comparados a AP e OB/AP em 24h. As barras representam a média +/- EPM. (n=5).

4.2.12 Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

Como foi observado um aumento no número de neutrófilos na medula óssea dos animais do grupo OB/AP em 48 horas, foi avaliado o estado de ativação dessas células através da avaliação da atividade da enzima MPO, uma vez que é a enzima pró-inflamatória mais abundante estocada nos grânulos azurófilos de neutrófilos (PULLI et al., 2013). Os resultados demonstraram que em 24 e 48 horas após o último desafio com a OVA, os níveis de MPO foram maiores nos animais do grupo AP e OB/AP quando comparado aos níveis do grupo CN (Figuras 22A e 22B), porém não houve diferença entre o grupo AP e OB/AP (Figura 22A e 22B). Em 48 horas, nos animais do grupo OB/AP houve diferença significativa nos níveis dessa enzima quando comparado aos níveis apresentados pelos animais do grupo AP (Figura 22B).

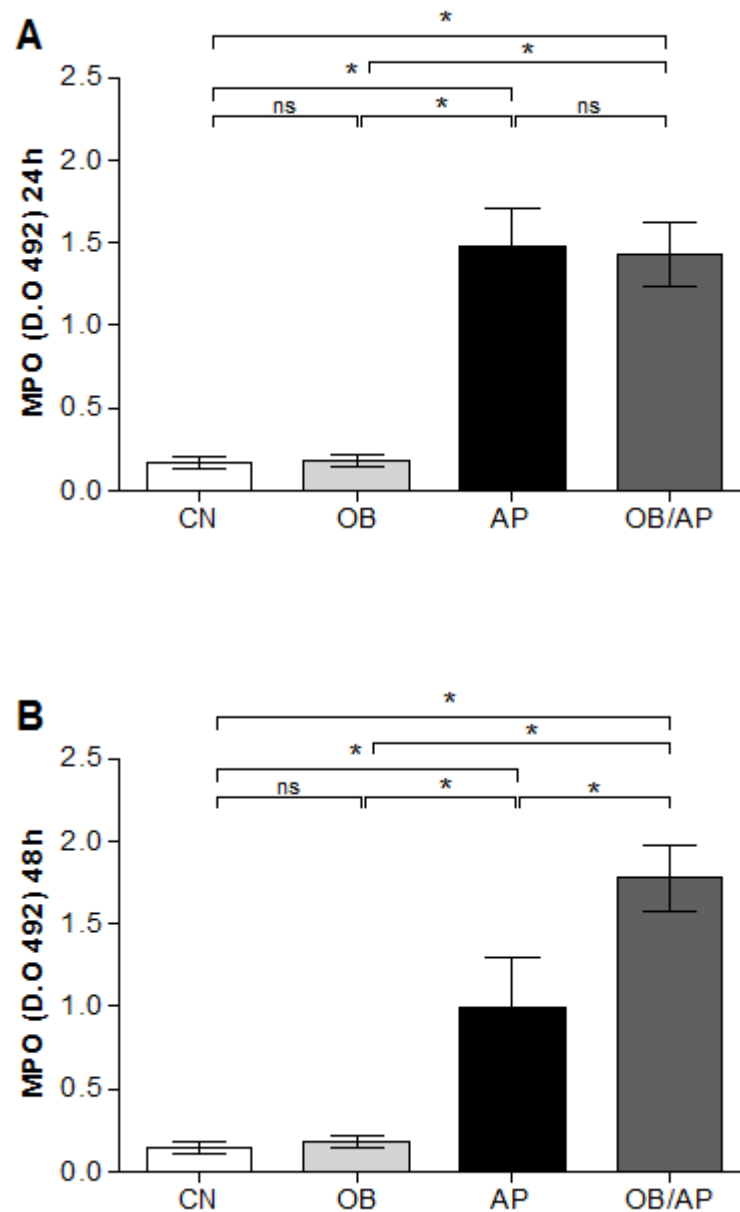


Figura 22: Avaliação dos níveis da atividade da MPO. Atividade de MPO no homogenato do tecido pulmonar em 24 horas (A) e em 48 horas (B) após o último desafio com a OVA. Os dados são expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$; n.s., não significativo; D.O, densidade ótica. # $p < 0.05$ AP e OB/AP em 48h comparados a AP e OB/AP em 24h. As barras representam a média \pm EPM. (n=5).

4.2.13 Avaliação dos níveis séricos de IgE-específica anti-OVA

A presença de níveis elevados de IgE específica para o alérgeno é uma característica importante presente na asma alérgica (WENZEL, 2012). Por isso, no presente estudo foram analisados os níveis de IgE anti-OVA no soro dos animais estudados, 24 horas após o último desafio com o alérgeno. Os resultados demonstraram que os animais dos grupos AP e OB/AP apresentaram níveis elevados de IgE sérica quando comparados aos animais do grupo CN (Figura 23). No entanto, os animais do grupo OB/AP apresentaram níveis séricos significativamente menores quando comparados aos animais do grupo AP (Figura 23).

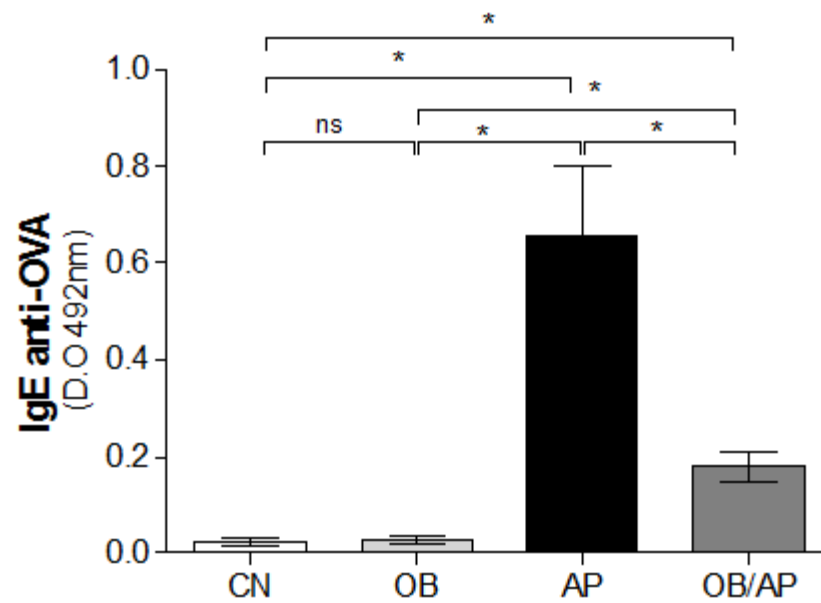


Figura 23: Avaliação dos níveis séricos de IgE específica anti-OVA. A IgE anti-OVA foi quantificada no soro dos animais 24h após o último desafio com a OVA. * $p < 0.05$; n.s., não significativo. Os dados são expressos como média \pm EPM. As barras representam a média \pm EPM. (n=5).

4.2.14 Avaliação dos níveis de leptina no pulmão

Estudos clínicos já demonstraram que asmáticos obesos apresentam alterações nos níveis de leptina tanto no soro quanto no pulmão (HOLGUIM et al., 2011; SIDELEVA et al., 2012). Como objetivo de avaliar se o mesmo estaria ocorrendo no modelo experimental desenvolvido no presente estudo, foram avaliados os níveis de leptina no pulmão dos animais nos diferentes grupos. Os resultados obtidos demonstraram que os animais do grupo OB e OB/AP exibiram níveis mais elevados de leptina no pulmão, quando comparados com os animais dos grupos CN e AP em ambos os tempos analisados (Figuras 24A e 24B). Entretanto, não houve diferença nos níveis de leptina entre os dois grupos. Vale ressaltar que no grupo AP os níveis de leptina foram iguais aos do grupo CN (Figuras 24A e 24B).

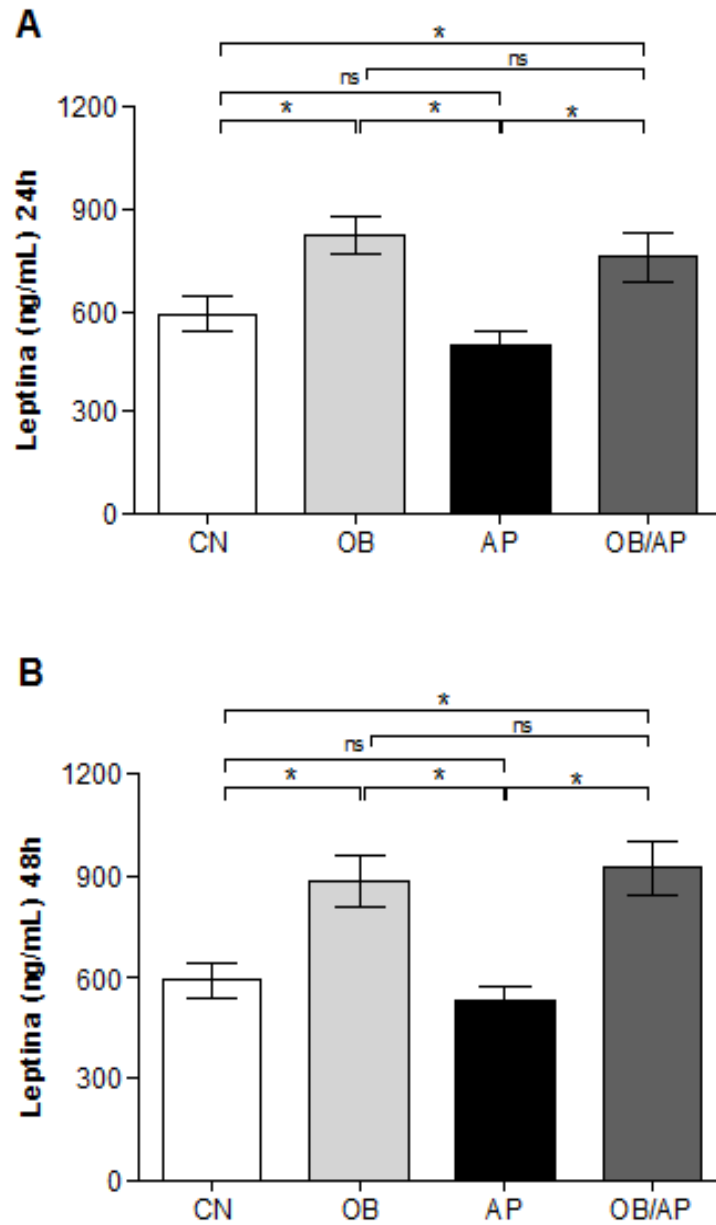


Figura 24: Avaliação dos níveis de leptina no homogenato do tecido pulmonar. Níveis de leptina em 24h (A) e em 48h (B) após o último desafio com a OVA. * $p < 0.05$. n.s., não significativo. As barras representam a média \pm EPM. (n=5)

4.2.15 Avaliação dos níveis de citocinas de perfil Th2, TSLP, IL-25 e IL-33

Para avaliar se a obesidade influencia os níveis de citocinas envolvidas no desenvolvimento e manutenção da resposta alérgica, foram analisadas as citocinas IL-4, IL-5, IL-13 e IL-9 de perfil Th2, além de IL-25, IL-33 e TSLP, considerando-se que estas últimas são liberadas pelo epitélio brônquico durante a fase inicial da resposta imune alérgica (HALLSTRAND et al., 2014).

Em concordância com os dados apresentados anteriormente, as análises confirmaram a indução do modelo de alergia pulmonar induzida pela OVA, uma vez que no pulmão dos animais do grupo AP houve aumento nos níveis de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 em 24 horas após o último desafio com o alérgeno (Figuras 25A, 25C, 25E, 25G). Em 48 horas, com exceção de IL-13 (Figura 25H) todas as demais citocinas de perfil Th2 avaliadas em 24 horas apresentaram níveis mais elevados em relação ao grupo CN (Figuras 25B, 25D, 25F). Além desses resultados, na análise comparativa entre os tempos, foi observado que os animais do grupo AP apresentaram um declínio nos níveis de IL-4, IL-9 e IL-13 em 48 horas após o último desafio com a OVA, quando comparado aos níveis apresentados em 24 horas. Considerando-se que IL-25, TSLP e IL-33 são citocinas que são liberadas precocemente após os desafios com o alérgeno, os seus níveis foram avaliados em 24 horas. Da mesma forma, correlacionando com os níveis das citocinas de perfil Th2, IL-25, IL-33 e TSLP apresentaram níveis maiores no pulmão dos animais do grupo AP quando comparado ao grupo CN (Figuras 26A, 26B e 26C).

Com relação a influência da obesidade sobre os níveis dessas citocinas, os resultados obtidos a partir das análises realizadas em 24 horas após o último desafio com a OVA, indicaram que os animais do grupo OB/AP apresentaram níveis menores de IL-4, IL-5, IL-25 e TSLP (Figuras 25A, 25C, 26A e 26C), sendo que os níveis de IL-9, IL-13 e IL-33 foram similares aos apresentados pelos animais do grupo AP (Figuras 25E, 25G e 26B). Já em 48 horas, constatou-se um aumento significativo na concentração de IL-4, IL-9 e IL-13 nos animais do grupo OB/AP, comparado ao grupo AP (Figuras 25B, 25F e 25H). Em relação análise comparativa entre os tempos, foi observado um aumento nos níveis de IL-4 em 48 horas, quando comparado a 24 horas (25B).

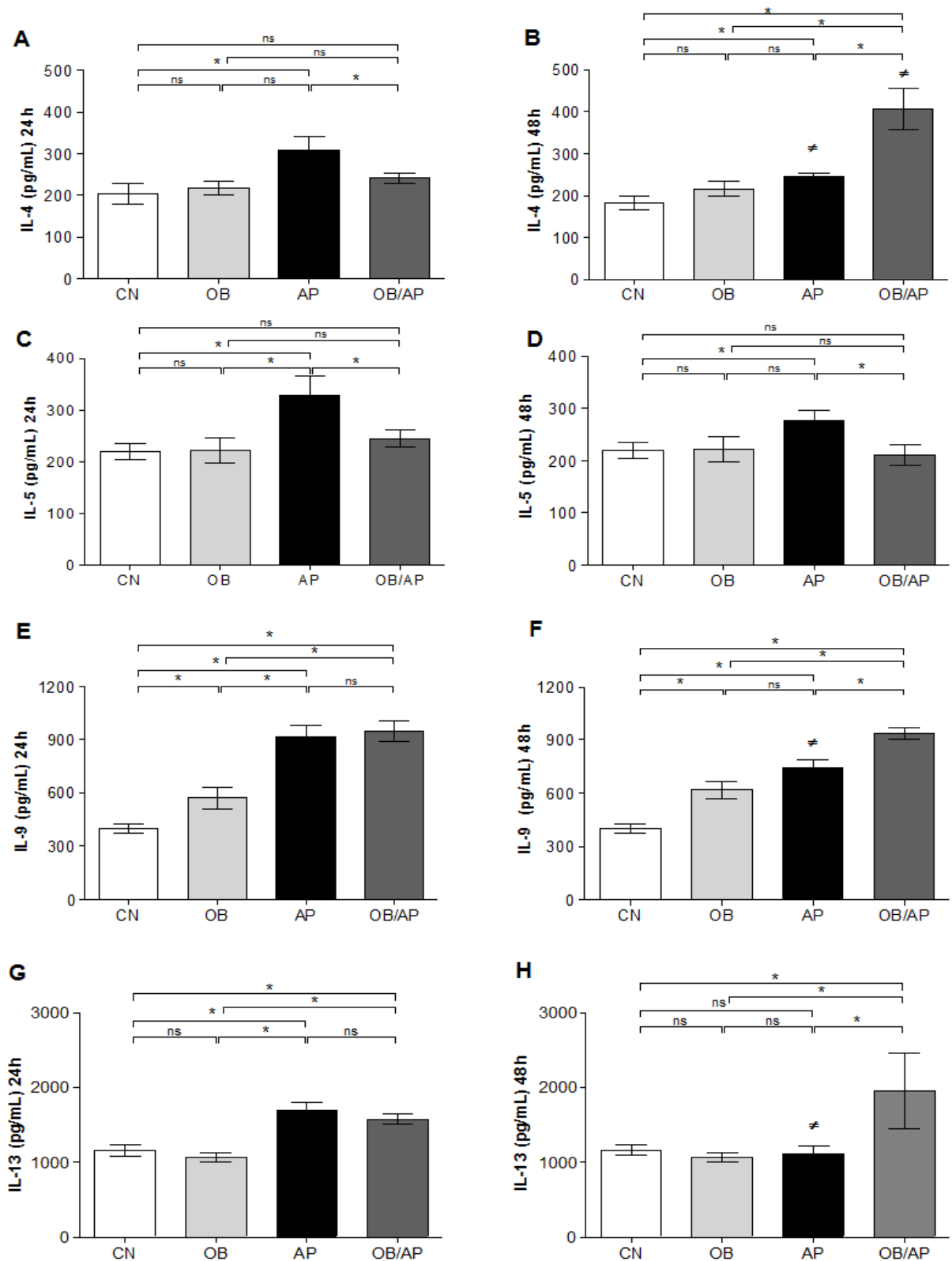


Figura 25: Avaliação dos níveis de citocinas de perfil Th2 no homogenato do tecido pulmonar. Níveis de IL-4 (A/B); IL-5 (C/D); IL-9 (E/F), IL-13 (G/H) em 24 e 48h após o último desafio com a OVA. * $p < 0.05$. n.s., não significativo. # $p < 0.05$ AP e OB/AP em 48h comparados a AP e OB/AP em 24h. As barras representam a média \pm EPM. (n=5).

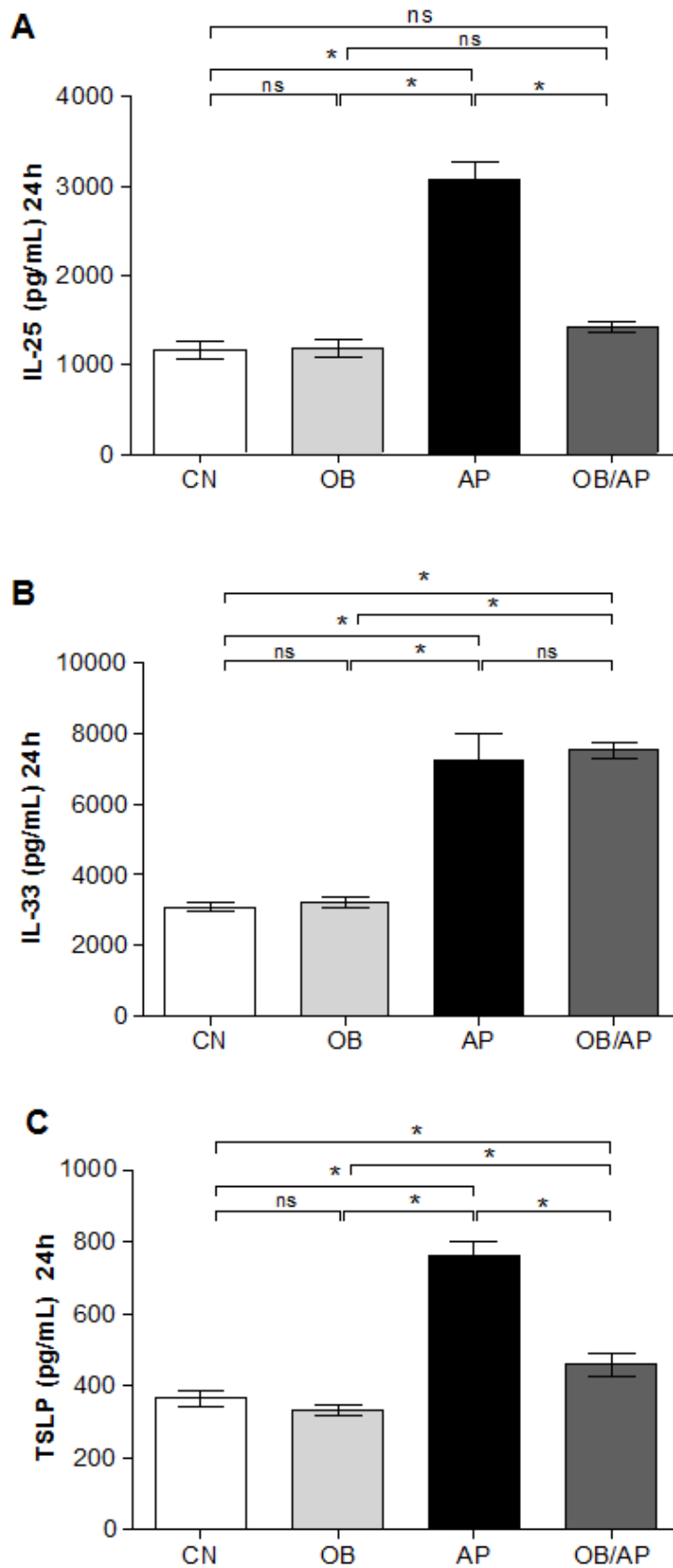


Figura 26: Avaliação dos níveis de citocinas epiteliais no homogenato do tecido pulmonar. Níveis de IL-25 (A); IL-33 (B); TSLP (C) em 24h após o último desafio com a OVA. * $p < 0.05$. n.s., não significativo. As barras representam a média \pm EPM. (n=5).

4.2.16 Avaliação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias

Sabendo-se que a obesidade induz um estado pró-inflamatório sistêmico pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, e que este estágio pode influenciar a resposta imune no pulmão, os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-17A foram avaliadas no homogenato do tecido pulmonar. A análise de 24 horas após o último desafio com a OVA, demonstrou que os animais do grupo AP apresentaram níveis maiores de IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-17A quando comparado aos níveis apresentados pelos animais do grupo CN (Figuras 27A, 27C, 27E, 27G). Em 48 horas após o último desafio com a OVA, com exceção de IL-1 β (Figura 27B), os níveis das citocinas IL-6, TNF- α e IL-17A nos animais do grupo AP permaneceram elevados comparado aos níveis apresentados pelos animais do grupo CN (Figuras 27D, 27F, 27H), no entanto, a análise comparativa entre os tempos demonstrou que IL-1 β (Figura 27B) e IL-17A (Figura 27H) sofreram um declínio quando comparado a 24 horas.

Com relação aos animais do grupo OB/AP, em 24 horas, estes apresentaram níveis menores de IL-1 β e TNF- α comparado ao grupo AP (Figuras 27A e 27E). Já os níveis de IL-6 e IL-17A (Figuras 27C e 27G) foram similares aos do grupo AP. Em 48 horas, IL-1 β (Figura 27B), IL-6 (Figura 27D), TNF- α (Figura 27F) e IL-17A (Figura 27H) apresentaram um aumento significativo em seus níveis quando comparado aos apresentados pelos animais do grupo AP. Além disso, foi observado pela análise comparativa entre os tempos, que os níveis de IL-6, IL-17A e TNF- α apresentaram níveis mais elevados em 48 horas, quando comparado a 24 horas (Figuras 27D, 27G, 27H). Embora, não tenha sido constatado um aumento significativo de IL-1 β comparado a 24 horas, foi observada uma tendência a níveis maiores (Figura 27B).

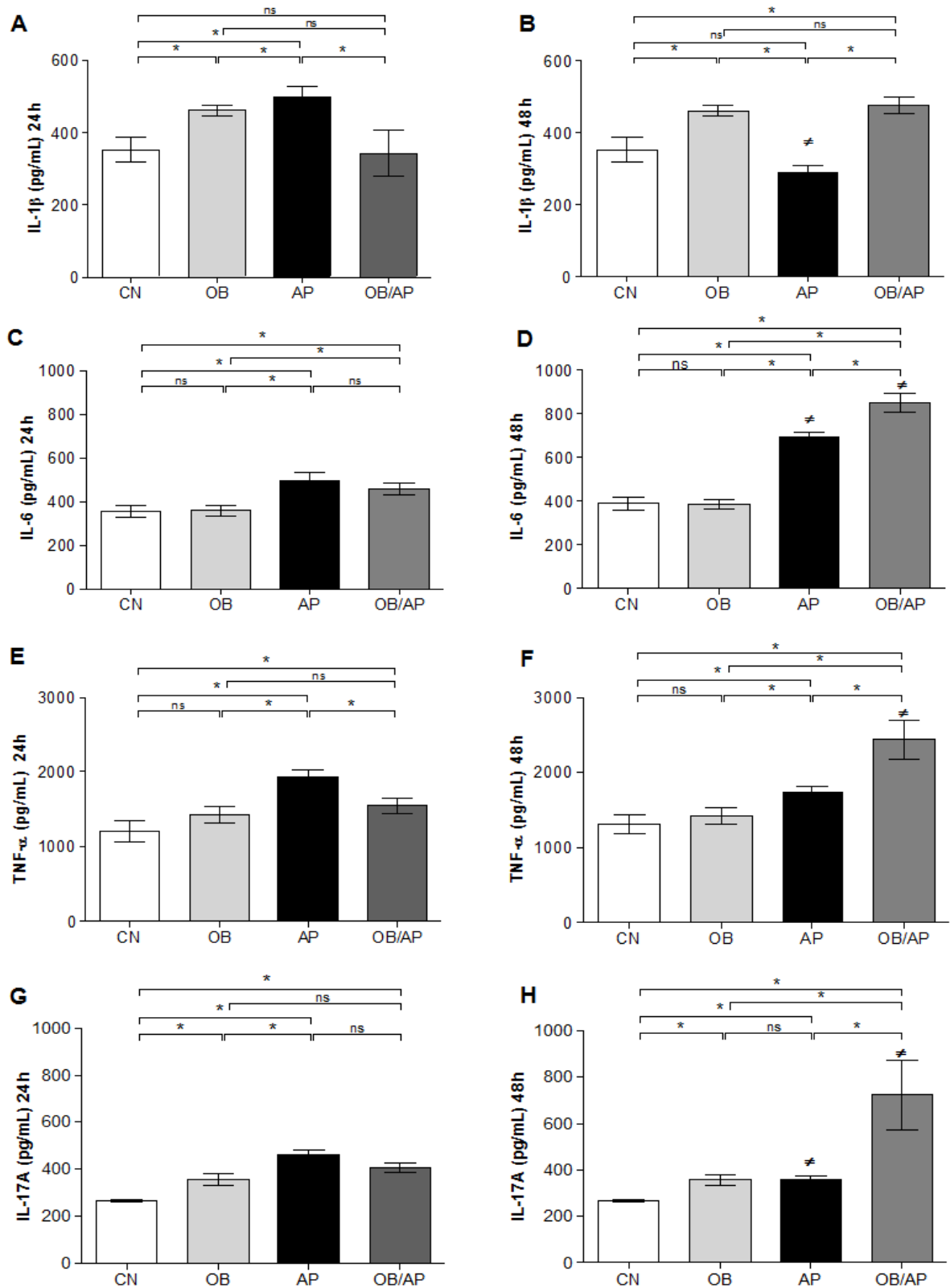


Figura 27: Avaliação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias no homogenato do tecido pulmonar. Níveis de IL-1 β (A/B); IL-6 (C/D); TNF- α (E/F); IL-17A (G/H) em 24 e 48h após o último desafio com a OVA. * $p < 0.05$. n.s., não significativo. # $p < 0.05$ AP e OB/AP em 48h comparados a AP e OB/AP em 24h. As barras representam a média +/- EPM. (n=5).

4.2.17 Avaliação dos níveis de citocinas de perfil de Th1

Considerando que houve um aumento significativo de macrófagos de perfil M1 no tecido pulmonar dos animais do grupo OB/AP e que estas células são estimuladas por citocinas de perfil Th1. Foram avaliados os níveis de IL-12 e IFN- γ no homogenato do tecido pulmonar nos diferentes grupos. Os resultados demonstram que em 24 horas após o último desafio com a OVA não houve aumento nos níveis de IFN- γ (Figura 28A) e de IL-12 (Figura 28C) no pulmão dos animais do grupo AP e OB/AP, quando comparado aos níveis apresentados pelos dos animais do grupo CN.

Em 48 horas, houve um aumento significativo tanto de IL-12 (Figura 28B) quanto de IFN- γ (Figura 28D) no pulmão dos animais do grupo OB/AP, quando comparado ao grupo AP. Além disso, foi observado pela análise comparativa entre os tempos que houve um aumento significativo de ambas as citocinas no pulmão dos animais do grupo OB/AP em 48 horas em relação a 24 horas (Figura 28B e 28D).

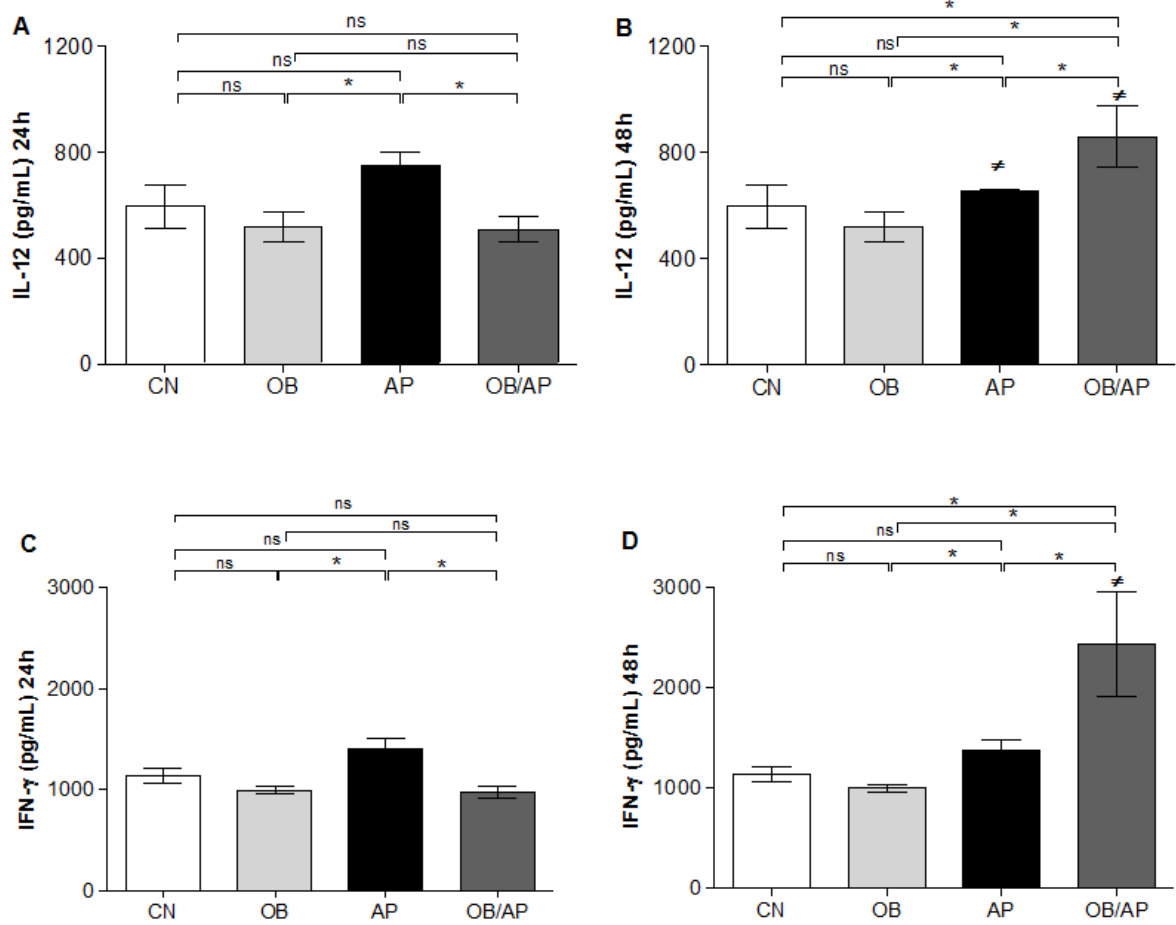


Figura 28: Avaliação dos níveis de citocinas de perfil Th1 no homogenato do tecido pulmonar. Níveis de IL-12 (A/B); IFN- γ (C/D) em 24h e 48h após o último desafio com a OVA. * $p < 0.05$. n.s., não significativo. # $p < 0.05$ AP e OB/AP em 48h comparados a AP e OB/AP em 24h. As barras representam a média \pm EPM. (n=5).

5 DISCUSSÃO

Estudos clínicos e epidemiológicos demonstram uma associação entre a obesidade e o desenvolvimento e agravamento dos sintomas da asma (APPLETON et al., 2006; TAYLOR et al., 2008; FITZPATRICK et al., 2012; GIBEON et al., 2013, HASEGAWA et al., 2014). Embora, seja conhecido que ambas as doenças são condições inflamatórias heterogêneas e de perfis imunológicos opostos (WENZEL, 2012; ROCHA et al., 2008) a interação entre essas duas patologias não é inteiramente compreendida.

Nos últimos anos, dados provenientes de modelos experimentais (JOHNSTON et al., 2007; CALIXTO et al., 2010; SARAIVA et al., 2011; DIETZE et al., 2012; MATTEWS et al., 2014) indicam fortes evidências do papel crucial da resposta imune sobre a influência da obesidade na asma. Contudo, ainda existe na literatura uma escassez de trabalhos que avaliem essa relação em modelos concomitantes de obesidade e asma. Além disso, os resultados já obtidos nesses estudos são contraditórios, provavelmente, devido à utilização de diferentes linhagens de camundongos submetidas a diferentes tipos de protocolos (SHORE et al., 2005; JOHNSTON et al., 2007; CALIXTO et al., 2010; SARAIVA et al., 2011; DIETZE et al., 2012). Baseado nisso, com o objetivo de avaliar a influência da obesidade sobre a resposta inflamatória pulmonar alérgica, foi desenvolvido pela primeira vez um modelo experimental de obesidade e alergia pulmonar em fêmeas de camundongos BALB/c, uma vez que esta linhagem é considerada mais susceptível ao desenvolvimento de uma resposta imune de perfil Th2 e um bom modelo experimental de asma (SAHU et al., 2010).

Inicialmente, os resultados demonstraram que os animais alimentados durante 10 semanas com a dieta hiperlipídica apresentaram características evidentes do estado obeso, como ganho de peso e acúmulo de gordura na região abdominal, que reconhecidamente é o tipo de gordura que está mais envolvida com o processo inflamatório e com as doenças metabólicas que frequentemente acompanham a obesidade (BUCCI et al., 2015). No entanto, foi observado que o ganho de peso nesses animais não foi relacionado à hiperfagia, já que a partir da 2ª semana a ingesta alimentar foi menor, sugerindo que o acúmulo de gordura foi devido a um maior consumo calórico. Estudos anteriores de indução de obesidade

por dieta hiperlipídica em camundongos da linhagem BALB/c obtiveram resultados similares, porém os autores só avaliaram a indução de obesidade a partir de 12 semanas de dieta (KIM et al., 2011; JAMES et al., 2012; PARK et al., 2012; RAMALHO et al., 2012).

Sabe-se que a obesidade é caracterizada por uma inflamação crônica e sistêmica, devido à liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a leptina (ERUSAN et al., 2012). No protocolo desenvolvido no presente estudo, os animais obesos também exibiram níveis séricos elevados de TNF- α e de leptina, corroborando com os resultados de Park e colaboradores (2011) e James e colaboradores (2012). Somado a esses fatores houve aumento nos níveis séricos de colesterol total, colesterol-LDL, triglicérides e glicose em jejum. Em conjunto, esses resultados demonstram que os animais obesos apresentaram características de um processo inflamatório crônico e sistêmico, associado a distúrbios metabólicos, confirmando, portanto, a indução da obesidade em camundongos da linhagem BALB/c.

Uma vez confirmada a indução do modelo de obesidade, a próxima etapa teve como objetivo avaliar a influência dessa patologia sobre a alergia pulmonar. A análise dos resultados em 24 e 48 horas após o último desafio com a OVA demonstrou-se que as sensibilizações e os desafios induziram uma resposta imune de perfil Th2, uma vez que os animais alérgicos não obesos apresentaram características marcantes da alergia pulmonar, como níveis séricos elevados de IgE OVA-específica, número elevado de eosinófilos na medula óssea, presença de infiltrado inflamatório predominantemente eosinofílico no LBA e no pulmão. Correlacionando com o número de eosinófilos, estavam também elevados a atividade da EPO e os níveis da quimiocina CCL11. Paralelamente, houve aumento nos níveis de IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-25, IL-33 e TSLP, citocinas que reconhecidamente estão envolvidas no estabelecimento da resposta imune alérgica (HOLGATE, 2012).

Além disso, os resultados ainda sugerem que provavelmente o pico da resposta imune nos animais alérgicos foi em 24 horas, uma vez que houve um declínio no infiltrado inflamatório no tecido pulmonar, paralelamente a uma redução no número de eosinófilos, linfócitos, neutrófilos e macrófagos no lavado broncoalveolar em 48 horas após o último desafio com o alérgeno. Da mesma forma

os níveis das citocinas IL-4, IL-9 e IL-13 e da quimiocina CCL11 também foram menores nos animais alérgicos em 48 horas quando comparado a 24 horas.

Atualmente, já está bem estabelecido que a obesidade participa da etiologia de várias doenças como o câncer (LARSSON e WOLK, 2007) e aterosclerose (ERUSAN et al., 2012), estando também associada a má cicatrização (GUO e DIPIETRO, 2010) e a uma reduzida resposta a vacinação (HARPER et al., 2014). Além de acarretar uma maior taxa de mortalidade, a obesidade é também considerada um fator de risco para infecções respiratórias causadas por vírus (FEZEU et al., 2011; KERKHOVE et al., 2011). Acredita-se que isso ocorra devido, em parte, aos níveis sistêmicos elevados de citocinas pró-inflamatórias, como a leptina, que podem alterar a resposta imune em alguns órgãos, incluindo o pulmão (ZHANG et al., 2013). De fato, estudos clínicos demonstram que o aumento no índice de massa corporal está associado ao aumento de leptina no sangue e no pulmão, sugerindo que essa citocina possa difundir-se de um compartimento para o outro (HOLGUIM et al., 2011; LUGOGO et al., 2012; SIDELEVA et al., 2012). No presente modelo experimental foi também observado esse fato, uma vez que os animais obesos, alérgicos ou não, apresentaram níveis elevados de leptina, tanto no sangue quanto no pulmão.

Ainda com relação ao efeito da leptina, já foi demonstrado que esta substância contribui para o recrutamento de macrófagos pró-inflamatórios de perfil M1 para o tecido adiposo (GRUEN et al., 2007) além de induzir a produção de citocinas inflamatórias e aumentar a expressão da enzima iNOS nestas células (RASO et al., 2002; GRUEN et al., 2007; CHATTERJEE et al., 2013). Em 2012, Lugogo e colaboradores demonstraram que macrófagos alveolares de humanos obesos asmáticos em resposta a leptina, apresentam um perfil inflamatório e uma maior produção de TNF- α , IL-6, IL-8 e IFN- γ . Recentemente, Kim e colaboradores (2014) encontraram um aumento de macrófagos no pulmão de camundongos C57BL/6 obesos, sendo que essas células apresentaram o perfil clássico de ativação ou M1 e produziram IL-1 β . Ainda neste estudo, foi observado que os níveis elevados de IL-17A detectados foram provenientes de ILC3s estimuladas com IL-1 β . Embora, seja necessário realizar análises adicionais, esses dados sugerem que, no presente trabalho, a leptina possa ter exercido o mesmo efeito, uma vez que os animais obesos apresentaram aumento de macrófagos M1 no pulmão, associado a níveis elevados de IL-1 β e IL-17A. Adicionalmente, também foi observado que houve

aumento de IL-9 no pulmão dos animais obesos. O estudo de Kim e colaboradores (2013) demonstrou que a IL-9 na presença de IL-1 β é capaz de promover a produção de IL-17A em linfócitos TCD4⁺. Esses dados demonstram que os animais obesos apresentaram uma alteração no ambiente pulmonar independentemente de estímulos alergênicos, sugerindo uma resposta imune distinta da apresentada por camundongos não obesos, provavelmente em decorrência da obesidade.

Os níveis elevados de IL-9 juntamente com o aumento no número de mastócitos tanto no pulmão quanto na traquéia dos animais obesos, indicam que esta citocina possa ter contribuído para uma maior proliferação e sobrevivência de mastócitos nesse tecido (KEARLEY et al., 2011). Embora, mastócitos estejam sabidamente envolvidos na patologia das doenças alérgicas (BISCHOFF, 2007), estudos em modelo experimental e *in vitro*, demonstram uma associação de mastócitos com o desenvolvimento da síndrome metabólica (LIU et al., 2009) e com a obesidade (ALTINTAS et al., 2011). Em 2011, Dalmas e colaboradores detectaram níveis séricos elevados de IL-9 em humanos obesos. Um estudo desenvolvido por Vielma e colaboradores (2013) demonstrou que adipócitos induzem a produção de IL-9 em esplenócitos. Estes dados sugerem que no presente trabalho os níveis elevados de leptina possa ter contribuído para o aumento na produção de IL-9 no pulmão e indiretamente pelo aumento no número de mastócitos nos animais obesos. Adicionalmente, é conhecido que a leptina exerce efeitos antiapoptóticos em várias células do sistema imune (PAPATHANOSSOGLU et al., 2006; SUZUKAWA et al., 2011; SUN et al., 2013) e mastócitos expressam receptores para essa adipocina (TAILDEMAN et al., 2009), o que pressupõe-se que a leptina possa também ter contribuído diretamente para o acúmulo dessas células no tecido pulmonar nesses animais.

Sabe-se que a resposta imune de perfil Th2 é a principal responsável pela patologia da asma alérgica (WENZEL, 2012). No entanto, estudos clínicos demonstram que um número significativo de asmáticos não responde adequadamente a terapias direcionadas à inflamação eosinofílica mediada pela resposta imune Th2 (HASTIE et al., 2010; MOORE et al., 2013; SCHLEICH et al., 2013). Geralmente, esses indivíduos apresentam baixos níveis de IgE, ausência ou uma redução de eosinófilos no infiltrado inflamatório pulmonar, associada a sintomas mais graves (HASTIE et al., 2010; AMELINK et al., 2013a/b). Esses dados demonstram que a asma pode apresentar-se com diferentes fenótipos clínicos e

imunológicos e que a resposta aos tratamentos é dependente do perfil celular presente no infiltrado inflamatório (HASTIE et al., 2010; SCHLEICH et al., 2013). Pesquisas clínicas indicam que o mesmo ocorre com relação à asma em obesos, uma vez que estes indivíduos apresentam infiltrado inflamatório pulmonar não eosinofílico, baixos níveis de IgE e correlacionado com um pior prognóstico e resistência a terapias convencionais (APPLETON et al., 2006; FENGER et al., 2012; TELENGA et al., 2012; GIBEON et al., 2013).

No presente estudo, os resultados indicam que a obesidade também alterou o perfil do infiltrado inflamatório nos animais alérgicos, uma vez que eles apresentaram menor número de eosinófilos no LBA, no tecido pulmonar e na medula óssea, associado a menores níveis de IL-5 e CCL11 no pulmão. Modelos experimentais anteriores desenvolvidos em camundongos da linhagem C57BL/6 apresentaram resultados semelhantes (JHONSTHON et al., 2007; VRIES et al., 2009). Calixto e colaboradores (2010) sugerem que a redução de eosinófilos no infiltrado inflamatório pulmonar de animais obesos alérgicos seja decorrente de um atraso na produção e na migração dessas células para as vias aéreas, devido em parte à produção e à liberação tardia de IL-5 e CCL11.

Apesar de claramente os animais obesos alérgicos terem exibido uma alteração na resposta imune após as sensibilizações e os desafios com o alérgeno, principalmente em 48 horas, não se pode descartar a participação de eosinófilos no perfil inflamatório desenvolvido nesses animais, uma vez que estas células também estavam presentes no infiltrado inflamatório pulmonar em ambos os tempos analisados. Além disso, a análise comparativa entre os tempos demonstrou que nos animais obesos alérgicos o infiltrado eosinofílico se manteve em 48 horas, ao contrário do declínio observado nos animais alérgicos não obesos. Um fator que estaria contribuindo para manutenção ou recrutamento de eosinófilos para o pulmão dos animais obesos alérgicos seriam os níveis elevados de leptina. Reconhecidamente, eosinófilos expressam o receptor de leptina e têm sua sobrevivência aumentada na presença desse fator (CONUS et al., 2005). Kato e colaboradores (2011) observaram que eosinófilos migram em direção a níveis elevados de leptina. Hastie e colaboradores (2010) e Moore e colaboradores (2014) identificaram um subgrupo de pacientes apresentando aumento de ambos granulócitos, neutrófilos e eosinófilos no pulmão, embora estes estudos não

estivessem correlacionados com o IMC, os indivíduos apresentaram um quadro mais grave dos sintomas, até mesmo quando comparado a outros fenótipos.

Ensaio clínico demonstram que alguns indivíduos asmáticos desenvolvem a resposta imune somente entre 32 a 56 horas após o desafio com o alérgeno, sendo classificada como uma resposta imune atrasada, com características clínicas e imunológicas diferenciadas da resposta imune clássica, com prolongada hiperresponsividade das vias aéreas e infiltrado inflamatório composto de macrófagos, neutrófilos e linfócitos Th1 (PELIKAN et al., 2012; PELIKAN, 2013). De acordo com esses dados, pode-se supor que esse atraso na resposta imune tenha ocorrido nos animais obesos alérgicos, uma vez que houve aumento das citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF- α e das citocinas de perfil Th1 IL-12 e IFN- γ assim como de IL-17A, somente em 48 horas após o último desafio com o alérgeno.

Reconhecidamente células dendríticas exercem um papel fundamental no desenvolvimento dos diferentes perfis de resposta imune. Chen e colaboradores (2014) identificaram no tecido adiposo de camundongos obesos um subtipo de célula dendrítica que apresenta baixa expressão de moléculas co-estimulatórias como CD40, CD80, MHCI e MHCII e direcionam a resposta imune para o perfil Th-17. Já Ramirez e colaboradores (2014) demonstraram que células dendríticas esplênicas provenientes de camundongos nocautes para a leptina apresentaram maior capacidade de ativar linfócitos T, sugerindo que a leptina atue prejudicando o desenvolvimento da resposta imune celular. Os estudos de Smith e colaboradores (2007) e (2008) avaliaram a influência da obesidade sobre a função dessas células no pulmão, em camundongos obesos submetidos a desafios com diferentes patógenos, onde foi observada uma deficiência no recrutamento e na apresentação do antígeno pelas células dendríticas, acarretando um atraso na produção e liberação de citocinas inflamatórias, bem como na migração de linfócitos T CD8⁺. Além disso, Paich e colaboradores (2013) demonstraram que linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de humanos obesos apresentam danos na sua ativação após exposição ao vírus H1N1. Visto que no presente trabalho os animais obesos, alérgicos ou não, apresentaram níveis elevados de leptina no pulmão, acredita-se que essa citocina tenha influenciado a apresentação do alérgeno pelas células dendríticas, contribuindo tanto para o atraso na produção das citocinas citadas acima, quanto para os menores níveis de IgE encontrados nesses animais.

Com relação a IgE, sabe-se que a ligação do alérgeno ao complexo IgE-FcεRI presente na superfície de mastócitos leva à ativação e degranulação dessas células (GALLI e TSAI, 2008), com a liberação de mediadores inflamatórios responsáveis pelos sintomas agudos da reação de hipersensibilidade imediata. Já foi demonstrado em estudo clínico (DOUGHERTY et al., 2010) e experimental (FUCHS et al., 2012) que o número de mastócitos está associado ao aumento na hiperresponsividade das vias aéreas, na contração da musculatura lisa e na produção de muco. No presente estudo foi observado que os níveis de IgE OVA-específica foram menores nos animais obesos alérgicos, sugerindo que outros fatores possam ter contribuído para a ativação dos mastócitos, presentes em número elevado tanto na traquéia quanto no pulmão desses animais. Entre esses fatores estão os níveis elevados de IL-9 (KEARLEY et al., 2011), IL-13 (KAUR et al., 2006), e trabalhos *in vitro* demonstram que a ligação de IL-33 ao seu receptor ST2L, presente na superfície de mastócitos, resulta na ativação dessas células, com aumento em sua sobrevivência (WANG et al., 2014) e na produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 (ALLAKHVERDI et al., 2007; ENOKSSON et al., 2011) e IL-13 (TUNG et al., 2013).

Considerando-se os resultados das análises de citocinas realizadas em 24 e 48 horas no tecido pulmonar, pode-se supor que em 24 horas tanto IL-9, IL-13 quanto IL-33 possam ter cooperado para ativação de mastócitos que se encontrava em número mais elevado no tecido pulmonar dos animais obesos alérgicos. Além disso, mastócitos ativados podem ter contribuído para o aumento nos níveis das citocinas inflamatórias em 48 horas, assim agravando o processo inflamatório.

Outro tipo celular encontrado em número elevado no pulmão dos animais obesos alérgicos em ambos os tempos analisados, foram os macrófagos. Somado a este fato, foi observada uma redução na expressão da enzima arginase e o aumento na expressão da enzima iNOS por macrófagos recrutados para o tecido pulmonar, sugerindo que houve uma mudança fenotípica de macrófagos alternativamente ativados ou M2 para macrófagos classicamente ativados ou M1. O aumento de macrófagos M1 em 48 horas correlacionou com os níveis de IFN- γ , que é um importante indutor da expressão da enzima iNOS e da ativação dessas células (RATH et al., 2014), além disso outras importantes citocinas como TNF- α e IL-1 β que são liberadas por macrófagos M1 ativados também estavam com os seus níveis elevados (KIM et al., 2014).

Estudos clínicos demonstram que não só o aumento no número de macrófagos na asma é importante, mas também o fenótipo apresentado por elas (BHAVSAR et al., 2008; GOLEVA et al., 2008; FERNANDEZ-BOYANAPALLI, et al., 2013). Em 2008, Goleva e colaboradores e Bhavsar e colaboradores demonstraram que a presença de macrófagos M1 no pulmão, na asma, está associada à resistência ao tratamento com corticosteroides e aumento na gravidade dos sintomas.

Além disso, macrófagos localizados no pulmão podem ser considerados uma importante fonte de IL-17A na asma alérgica. Enfatizando o papel dessas células, Mizutani e colaboradores (2014) demonstraram que a depleção de macrófagos reduz significativamente os níveis de IL-17A e a inflamação neutrofílica mediada por esta citocina, além de inibir o desenvolvimento da hiperresponsividade das vias aéreas após as sensibilizações e desafios com a OVA (KIM et al., 2015). Song e colaboradores (2008) demonstraram que mediadores inflamatórios liberados por mastócitos podem induzir a produção de IL-17A em macrófagos alveolares de camundongos BALB/c. Outro estudo observou que na ausência de IL-4, macrófagos M1 produz IL-17A (HONG et al., 2014). Já foi observado que camundongos deficientes em eosinófilos, mastócitos ativados por IL-33, liberam IL-1 β e IL-6 e promovem a diferenciação de linfócitos para o perfil Th-17 (CHO et al., 2012) e inflamação neutrofílica (JACOBSEN et al., 2014). Recentemente, estudos em modelos experimentais vêm demonstrando um aumento de macrófagos M1 no pulmão de animais obesos (WILLIAMS et al., 2013; KIM et al., 2014), particularmente quando relacionado a níveis elevados de IL-17A (KIM et al., 2014). Estes dados sugerem que no presente estudo, o número reduzido de eosinófilos e os baixos níveis de IL-4 em paralelo ao elevado número de macrófagos M1 encontrados no pulmão dos animais obesos alérgicos possam ter contribuído para os níveis elevados de IL-17A, em um mecanismo envolvendo IL-33 e mastócitos.

Reconhecidamente, linfócitos Th17 são os principais produtores de IL-17A, no pulmão, embora, já tenha sido observada a produção desta citocina também por outros tipos celulares além de macrófagos (SONG et al., 2008; KUDO et al., 2012; RAMIREZ-VELASQUEZ et al., 2013; KIM et al., 2014). E ainda, mais recentemente foi detectada em pacientes asmáticos, a presença de linfócitos T CD4⁺ de memória com o perfil Th2/Th17 (COSMI et al., 2010; WANG et al., 2010; IRVIN et al., 2014), produzindo concomitantemente IL-4 e IL-17A, sendo que o aumento no número

dessas células estava diretamente associado à gravidade dos sintomas. Experimentalmente, Wang e colaboradores (2010) demonstraram que ocorreu um aumento no número linfócitos Th2/Th17 no pulmão, em 48 horas após o desafio com *Aspergillus oryzae*. No presente estudo, visto que, também em 48 horas, foi encontrado um aumento nos níveis tanto de IL-4, quanto de IL-17A, no pulmão dos animais obesos alérgicos, acredita-se que essas células podem também estar presentes no infiltrado inflamatório desses animais, embora sejam necessárias análises posteriores para confirmar esse dado.

Estudos clínicos (ZHAO et al., 2009; AGACHE et al., 2010; CHIEN et al., 2013; NANZER et al., 2013) e experimentais (FOLGLI et al., 2013; ANO et al., 2013; KINYANJUI et al., 2013; MANNI et al., 2014) vêm avaliando a contribuição da IL-17A na asma, particularmente quando associada a um fenótipo mais grave da doença e a resistência a terapias. Em modelo experimental de obesidade, Mathews e colaboradores (2014) e Kim e colaboradores (2014) observaram que níveis elevados de IL-17A estão associados ao desenvolvimento da hiperresponsividade das vias aéreas e a gravidade dos sintomas na asma, em um mecanismo envolvendo indução da produção de citocinas Th2 como a IL-13 e IL-33 (LAJOIE et al., 2010; MIZUTANI et al., 2014). No presente estudo, foi observado o aumento de IL-13, IL-33 (dado não mostrado) e de IL-17A em 48 horas, sugerindo que a associação destas citocinas poderia acarretar um aumento da hiperresponsividade das vias aéreas nos animais obesos alérgicos. Somado a essa função, é conhecido que a IL-17A é uma potente indutora do recrutamento de neutrófilos para as vias aéreas (BULLENS et al., 2006; ANO et al., 2013; FOGLI et al., 2013) .

Dados originados de estudos clínicos demonstram que indivíduos obesos asmáticos apresentam um infiltrado predominantemente neutrofílico, correlacionando com o aumento na gravidade dos sintomas e com baixa resposta a terapias (SCOTT et al., 2011; 2012; TELENGA et al., 2012; GIBEON et al., 2013). No pulmão, após ativação, os neutrófilos liberam grânulos contendo mediadores inflamatórios, dentre eles a enzima mieloperoxidase ou MPO, que pode reagir com outros metabólitos causando danos teciduais, ativando o endotélio e o recrutando mais neutrófilos para o local da inflamação (MONTESEIRIM et al., 2009; AROCA et al., 2014). Pacientes asmáticos apresentam maior atividade da MPO, correspondendo a uma maior degranulação de neutrófilos (MONTESEIRIM et al., 2009).

Embora, no presente estudo, não tenha sido detectado um aumento de neutrófilos no LBA, houve aumento no número dessas células na medula óssea e no tecido pulmonar correlacionando com os níveis de IL-17A e com o aumento na atividade da MPO no pulmão dos animais obesos alérgicos, particularmente em 48 horas, sugerindo que a obesidade aumentou o influxo de neutrófilos para o pulmão destes animais mais tardiamente. Uma possível explicação para a não visualização do aumento no número de neutrófilos no LBA, se deve ao fato de que a distribuição de leucócitos no LBA difere da distribuição ocorrida nos diferentes compartimentos no pulmão, e nem sempre o número de leucócitos no LBA corresponde ao número de leucócitos encontrado próximo ao endotélio pulmonar (BARLETTA et al., 2012). Por outro lado, Pelikan (2012) constatou um aumento na expressão de moléculas de adesão em indivíduos asmáticos com uma resposta imune tardia. Além disso, já foi observado que a leptina induz diretamente uma maior expressão de moléculas de adesão no endotélio (MANUEL-APOLINAR et al., 2013). No presente estudo foi visto que os animais obesos alérgicos além de terem apresentado um atraso no desenvolvimento da resposta imune com consequente atraso no recrutamento de neutrófilos para as vias aéreas, eles não apresentavam aumento no número dessas células no LBA, o que sugere que possa ter havido uma maior retenção destas células no tecido pulmonar pelo aumento na expressão de moléculas de adesão induzida pelos altos níveis de leptina.

Alguns fatores no presente estudo que podem ter levado ao aumento no número de neutrófilos nos animais obesos alérgicos está relacionado aos níveis reduzidos de TSLP e de IL-25, em 24 horas. Trabalhos recentes demonstram que a ausência do receptor de TSLP (YADAVA et al., 2014) ou o bloqueio de IL-25 (BARLOW et al., 2011) favorece o desenvolvimento de uma resposta alérgica neutrofílica, com níveis elevados de IL-17A. Considerando-se, que neutrófilos são células mais resistentes a ação de medicamentos utilizados em terapias para a asma (HIRSCH et al., 2012) e que a leptina aumenta a sobrevivência dessas células (SUN et al., 2013), pode se sugerir que o aumento no número e na permanência dessas células no tecido pulmonar assim pode levar a um perfil inflamatório mais grave. Contudo, análises posteriores para identificação dessas células no tecido pulmonar deverão serem realizadas.

Com isso, foi observado no presente estudo que os animais obesos alérgicos apresentaram uma maior produção de muco visualizada pelo aumento na contagem

de células caliciformes no epitélio das vias aéreas. Reconhecidamente a obstrução das vias aéreas por uma elevada produção de muco é considerada uma causa importante de óbito em pacientes asmáticos (KUYPER et al., 2003; GREEN et al., 2010). No presente estudo, apesar da resposta imune inflamatória ter se desenvolvido tardiamente, foi observado uma intensa produção de muco nos animais obesos alérgicos já em 24 horas. Neste sentido, diversos fatores podem ter contribuído para o aumento na produção precoce de muco, particularmente o número elevado de mastócitos ativados encontrado no tecido pulmonar dos animais obesos alérgicos. Além disso, os níveis elevados da IL-1 β , IL-4 (KUPERMAN et al., 2005), IL-6 (CHEN et al., 2003), IL-9 (KEARLEY et al., 2011), IL-17A (FUJISAWA et al., 2009; HEBERT et al., 2013), IL-33 (KONDO et al., 2008) e TNF- α (LORA et al., 2005), encontrados em 48 horas após o último desafio, podem ter potencializado a produção de muco pelo epitélio das vias aéreas iniciada precocemente pelos mastócitos. Somado a todos esses fatores, estudos demonstraram *in vitro* e *in vivo* que a leptina pode promover a proliferação de células epiteliais das vias aéreas, induzindo a produção de muco, ocasionando um aumento na hiperresponsividade brônquica (BRUNO et al., 2009; WOO et al., 2010).

Apesar do presente estudo não ter avaliado a hiperresponsividade das vias aéreas, em conjunto os resultados indicam que a obesidade acentuou a resposta inflamatória pulmonar nos animais alérgicos. Um provável mecanismo envolvido nesse processo está associado aos níveis elevados de leptina, tanto no sangue, quanto no pulmão, dos animais obesos. Acredita-se que já na fase de sensibilização ao alérgeno, os animais obesos já apresentavam uma resposta imune alterada, uma vez que eles exibiam um maior número de mastócitos e mudança fenotípica de macrófagos alveolares para o perfil M1. Após os desafios, constatou-se que a obesidade afetou o desenvolvimento da resposta alérgica clássica, acarretando uma persistente inflamação eosinofílica, atraso na liberação de citocinas inflamatórias e possivelmente um maior influxo de neutrófilos para o tecido pulmonar. Estes eventos levaram a uma potencialização na produção de muco iniciada precocemente levando a uma piora do quadro inflamatório (Figura 28).

Considerando que os diferentes fenótipos de asma encontrados em humanos podem refletir diretamente na intensidade e na gravidade dos sintomas da asma, assim como nas respostas aos tratamentos, a avaliação da resposta imune na associação obesidade e asma, no presente modelo, torna-se uma importante

ferramenta para o estudo dos mecanismos imunológicos envolvidos nessa associação. Visto que, os resultados obtidos com o presente estudo sugerem que a resposta imune desenvolvida em fêmeas obesas da linhagem BALB/c representou um fenótipo inflamatório de asma similar à observada em humanos obesos.

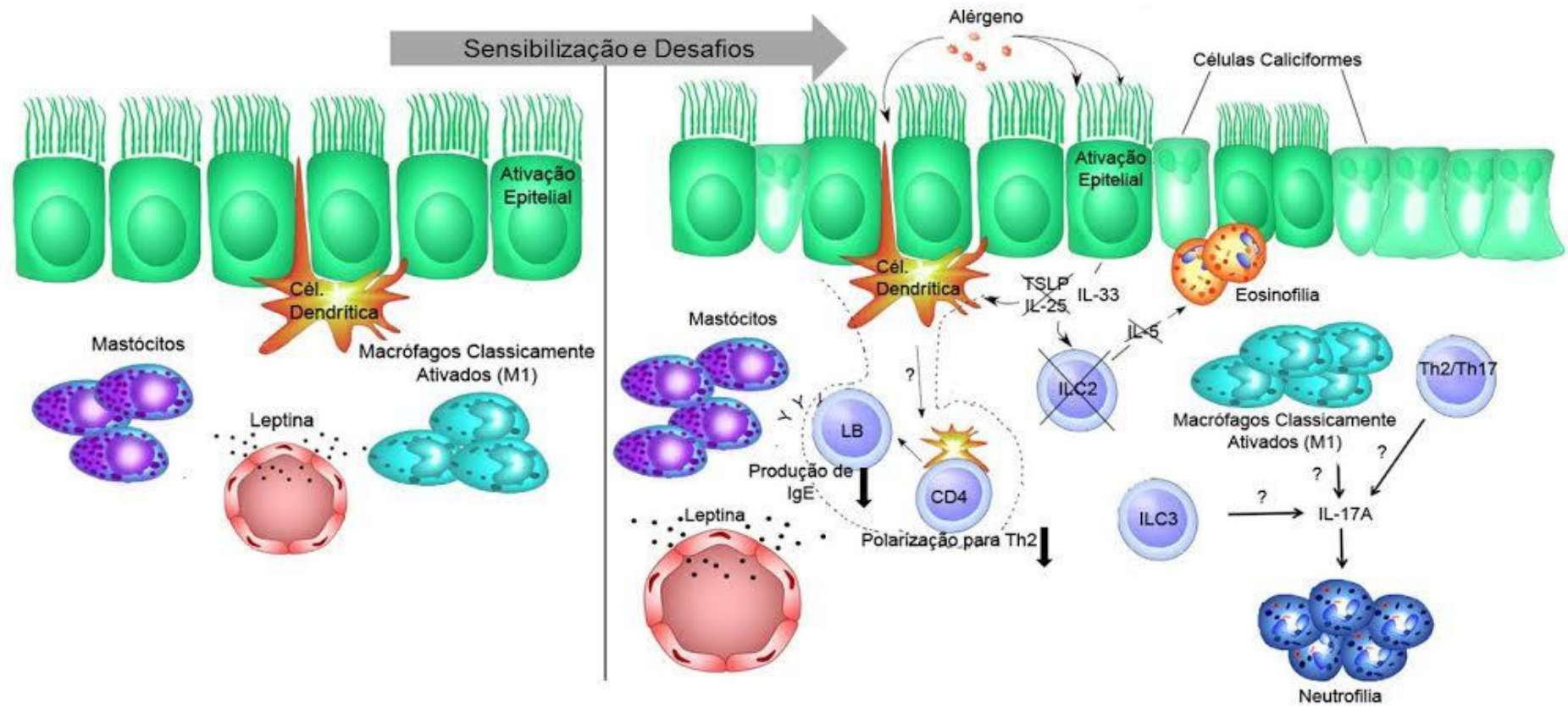


Figura 28: Hipótese do efeito da obesidade na resposta imune desenvolvida no pulmão de camundongos BALB/c fêmeas antes e depois das sensibilizações e desafios com OVA. Durante o desenvolvimento da obesidade antes das sensibilizações e desafios com o alérgeno foram encontrados níveis elevados de leptina no pulmão dos animais. Provavelmente a leptina tenha induzido uma modificação fenotípica nos macrófagos alveolares, do perfil M2 para M1, além de aumentar o número de mastócitos, pode ter acarretado danos no epitélio das vias aéreas e na apresentação do antígeno pelas células dendríticas aos linfócitos T. Conseqüentemente, após as sensibilizações e os desafios com a OVA, o epitélio não produziu IL-25 e TSLP, causando danos no desenvolvimento da resposta imune Th2, permitindo o desenvolvimento de uma resposta mediada por IL-17A tardiamente, com conseqüente aumento no recrutamento de neutrófilos. O número elevado de células caliciformes produtoras de muco correlacionou com o elevado número de mastócitos localizados no tecido pulmonar dos animais obesos alérgicos.

6 CONCLUSÃO

- A obesidade levou a uma alteração na resposta imune no pulmão dos animais antes da indução do modelo de alergia pulmonar a OVA, provavelmente, um efeito mediado pela presença de leptina nesse órgão.
- A obesidade interferiu no desenvolvimento de uma resposta imune alérgica clássica, após as sensibilizações e desafios com a OVA, levando a um quadro característico de resposta imune tardia mediada pela presença de IL-17A e aumento de neutrofilia.
- Independentemente da resposta imune desenvolvida no pulmão dos animais obesos alérgicos, a elevada produção de muco indica um pior prognóstico e maior gravidade no processo inflamatório na asma.

7 REFERÊNCIAS

- AGACHE, I.; CIOBANU, C.; AGACHE, C.; ANGHEL, M. 2010. Increased serum IL-17 is an independent risk factor for severe asthma. **Respiratory Medicine**, **104 (8)**: 1131-1137.
- ACHARYA, K. R.; ACKERMAN, S. J. 2014. Eosinophil Granule Proteins: Form and Function. **The Journal of Biological Chemistry**, **289 (25)**: 17406-17415.
- AGRAWAL, S.; GOLLAPUDI, S.; SU, H.; GUPTA, S. 2011. Leptin activates human B cells to secrete TNF- α , IL-6, and IL-10 via JAK2/STAT3 and p38MAPK/ERK1/2 signaling pathway. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, **31 (3)**: 472-478.
- ALLAKHVERDI, Z.; SMITH, D. E.; COMEAU, M. R.; DELESPESE, G. 2007. Cutting Edge: The ST2 ligand il-33 potently activates and drives maturation of human mast cells. **Journal Immunology**, **179 (4)**: 2051-2054.
- ALTINTAS, M. M.; AZAD, A.; NAYER, B.; CONTRERAS, G.; ZAIAS, J.; FAUL, C.; REISER, J.; NAYER, A. 2011. Mast cells, macrophages, and crown-like structures distinguish subcutaneous from visceral fat in mice. **Journal of Lipid Research**, **52 (3)**: 480-488.
- AMELINK, M.; NIJS, S. B.; GROOT, J. C.; VAN TILBURG, P. M. B.; P. I.; VAN-SPIEGE, P. I.; F. KROUWELS, H.; LUTTER, R.; ZWINDERMAN, A. H.; WEERSINK, E. J. M BRINKE, A. T.; STERK, P. J.; BEL. E. H. 2013. Three phenotypes of adult-onset asthma. **European Journal of Allergy Clinical Immunology**, **68 (5)**: 674-680.
- AMELINK, M.; GROOT, J. C.; NIJS, S. B.; LUTTER, R.; ZWINDERMAN, A. H.; STERK, P. J.; BRINKE, A. T.; BEL. E. H. 2013. Severe adult-onset asthma: A distinct phenotype. **Journal Allergy Clinical Immunology**, **132 (2)**: 336-341.
- ANO, S.; MORISHIMA, Y.; ISHII, Y.; YOH, K.; YAGETA, Y.; OHTSUKA, S.; MATSUYAMA, M.; KAWAGUCHI, M.; SATORU TAKAHASHI, S.; HIZAWA, N. 2013. Transcription Factors GATA-3 and ROR γ t are important for determining the phenotype of allergic airway inflammation in a murine model of asthma. **The Journal of Immunology**, **190 (3)**: 1056-1065.
- ANTO, J. M. 2011. Recent advances in the epidemiologic investigation of risk factors for asthma: A Review of the 2011 Literature. **Current Allergy Asthma Rep**, **12 (3)**: 1-9.
- APOLINAR, L. M.; ROMERO, R. L.; ZARATE, A.; DAMASIO, L.; RUIZ, M.; HERNÁNDEZ. C. C.; GUEVARA, G.; JIMÉNEZ. E. M. 2013. Leptin mediated *ObRb* receptor increases expression of adhesion intercellular molecules and cyclooxygenase 2 on murine aorta tissue inducing endothelial dysfunction. **International Journal Clinical Experimental Medicine**, **6 (3)**: 192-196.
- APPLETON, S. L.; ADAMS, R. J.; WILSON, D. H.; TAYLOR, A. W.; RICHARD, E.; RUFFIN, E. E. 2006. Central obesity is associated with nonatopic but not atopic

asthma in a representative population sample. **Clinical Immunology**, **118**: 1284-1291.

AROCA, R.; CHAMORRO, C.; VEJA, A.; VENTURA, I.; GOMEZ, E.; PEREZ-CANO, R.; BLANCA, M.; MONTESEIRIN, J. 2014. Immunotherapy reduces allergen-mediated cd66b expression and myeloperoxidase levels on human neutrophils from allergic patients. **Plos One**, **9 (4)**: 1-8.

BAINES, K. J.; SIMPSON, J. L.; WOOD, L. G.; SCOTT, R. J.; GIBSON, P. G. 2007. Transcriptional phenotypes of asthma defined by gene expression profiling of induced sputum samples. **Journal Allergy Clinical Immunology**, **127 (1)**:153-60.

BALLANTYNE, S. J.; BARLOW, J. L.; JOLIN, H. E.; NATH, P.; WILLIAMS, A. S. CHUNG, K. F.; STURTON, G.; WONG, S. H.; MCKENZIE, A. N. J. 2007. Blocking IL-25 prevents airway hyperresponsiveness in allergic asthma. **Journal Allergy Clinical Immunology**, **120 (6)**:1324-31.

BALHARA, J.; GOUNNI, A. S. 2012. The alveolar macrophages in asthma: a double-edged sword. **Mucosal Immunology**, **5 (6)**: 605-609.

BANG, B.R.; CHUN, E.; SHIM, E. J.; LEE, H.S.; LEE, S.Y.; CHO, S. H.; MIN, K. U.; KIM, Y.Y. PARK, H. W. 2011. Alveolar macrophages modulate allergic inflammation a murine model of asthma. **Experimental Molecular Medicine**, **43 (5)**: 275-280.

BARCZYK, A.; PIERZCHALA, W.; CARAMORI, G.; WIADERKIEWICZ, R.; KAMINSKI, M.; BARNES, P. J.; ADCOCK, I. M. 2014. Decreased percentage of CD4(+)Foxp3(+)TGF- β (+) and increased percentage of CD4(+) IL-17(+) cells in bronchoalveolar lavage of asthmatics. **Journal of Inflammation**, **11 (22)**: 1-9.

BARLETTA, K. E.; CAGNINA, C. E.; WALLACE, K. L.; RAMOS, S. I.; MEHRAD, B.; LINDEN, J.; 2012. leukocyte compartments in the mouse lung: distinguishing between marginated, interstitial, and alveolar cells in response to injury. **Immunology Methods**, **375 (1-2)**: 100–110.

BARLOW, J. L.; FLYNN, R. J.; BALLANTYNE, S. J.; MCKENZIE, A. N. J. 2011. Reciprocal expression of IL-25 and IL-17A is important for allergic airways Hyperreactivity. **Clinical & Experimental Allergy**, **41 (10)**: 1447–1455.

BARRON, L.; SMITH, A. M.; EL KASMI, K. C.; QUALLS, J. E.; HUANG, X.; CHEEVER, A.; BORTHWICK, L. A.; WILSON, M. S.; MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. 2013. Role of arginase 1 from myeloid cells in th2-dominated lung inflammation. **Plos One**, **8 (4)**: 1-11.

BARROS, L. L.; MACHADO, A. S.; CORRÊA, L.B.; SANTOS, J. S.; CRUZ, C.; LEITE, M.; CASTRO, L.; COELHO, A.C.; ALMEIDA, B. P.; CRUZ, A.A. 2011. Obesity and poor asthma control in patients with severe asthma. **Journal of Asthma**, **48 (2)**:171-176.

- BELLINGHAUSEN, I.; KLOSTERMANN, B.; KNOP, J.; SALOGA, J. 2003. Human CD4+CD25+ T cells derived from the majority of atopic donors are able to suppress TH1 and TH2 cytokine production. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, **111 (4)**: 862-868.
- BERNINK, J. H.; PETERS, C. P.; MUNNEKE, M.; VELDE, A. A. T.; MEIJER, S. L.; WEIJER, K.; HREGGVIDSDOTTIR, H. S.; HEINSBROEK, S. E.; LEGRAND, N.; CHRISTIANNE J BUSKENS, J. C.; BEMELMAN, A. W.; MJÖSBERG, J. M.; SPITS, H. 2013. Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. **Nature Immunology**, **14 (3)**: 221-230.
- BESNARD, A. G.; TOGBE, D.; GUILLOU, N. L.; ERARD, D.; QUESNIAUX, V.; RYFFEL, B. 2011. IL-33-activated dendritic cells are critical for allergic airway inflammation. **European Journal Immunology**, **41 (6)**: 1675-1686.
- BEUTHER, D. A.; SUTHERLAN, E. R. 2007. Overweight, Obesity, and Incident Asthma: A Meta-analysis of prospective epidemiologic studies. **American Journal of Respiratory and Critical Care medicine**, **175 (7)**: 661–666.
- BHAVSAR, P.; HEW, M.; KHORASANI, N.; TORREGO, BARNES, P. J.; I ADCOCK, I.; CHUNG, K. F. 2008. Relative corticosteroid insensitivity of alveolar macrophages in severe asthma compared with non-severe asthma. **Thorax**, **63 (9)**:784-790.
- BISCHOFF, S. C. 2007. Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. **Nature Reviews Immunology**, **7**: 93-104.
- BLACK, M. H.; HUI ZHOU, H.; MIWA TAKAYANAGI, M.; STEVEN J. JACOBSEN, S. J.; KOEBNICK, C.; . 2013. Increased Asthma Risk and Asthma-Related Health Care Complications Associated With Childhood Obesity. **American Journal Epidemiology**, **178 (7)**: 1120-1128.
- BRATT, J. M.; WILLIAMS, K.; RABOWSKY, M. F.; LAST, M .S.; FRANZI, L. M.; LAST, J. A.; KENYON. N. J. 2010. Nitric Oxide Synthase Enzymes in the Airways of Mice Exposed to Ovalbumin: NOS2 Expression Is NOS3 Dependent. **Mediators of Inflammation**, **321061**: 1-15.
- BROOKS, C.; PEARCE, A.N.; DOUWES, A. J. 2013. The hygiene hypothesis in allergy and asthma: an update. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, **13 (1)**: 70-77.
- BRUNO, A.; PACE, E.; CHANEZ, P.; GRAS, D.; VACHIER, I.; CHIAPPARA, G.; LA GUARDIA, M.; GERBINO, G.; PROFITA, M.; GJOMARKA, J. M. 2009. Leptin and leptin receptor expression in asthma. **Journal Allergy Clinical Immunology**, **124 (2)**: 230-237.
- BUCCI, M.; KARMI, A. C.; IOZZO, P. FIELDING, B. A.; VILJANEN, A.; BADEAU, R. M.; BORRA, R.; SAUNAVAARA, V.; PHAM , T.; HANNUKAINEN, J. C.; KALLIOKOSK, K.; HAAPARANTA-SOLIN, M.; VILJANEN, T.; PARKKOLA, R.; FRAYN, K. N.; NUUTILA, P. 2015. Enhanced fatty acid uptake in visceral adipose

tissue is not reversed by weight loss in obese individuals with the metabolic syndrome. **Diabetologia**, **58**:158–164.

BRUUN, J. M.; PEDERSEN, S. B.; KRISTENSEN, K.; RICHELSEN, B. 2002. Effects of proinflammatory cytokines and chemokines on leptin production in human adipose tissue in vitro. **Molecular & Cellular Endocrinology**, **190 (1-2)**: 91-99.

BUETTNER, R.; SCHOLMERICH, J.; BOLLHEIMER, L. C. 2007. High-fat Diets: Modeling the Metabolic Disorders of Human Obesity in Rodents. **Obesity**, **15 (4)**: 798-808.

BULLENS, D. M.; TRUYEN, E.; COTEUR, L.; DILISSEN, E.; HELLINGS, P. W.; DUPONT, L. J.; CEUPPENS, J. L. 2006. IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? **Respiratory Research**, **7 (135)**: 1-9.

BUNTING, M. M.; SHADIE, A. M.; FLESHER, R. P.; NIKIFOROVA, V.; GARTHWAITE, L.; TEDLA, N.; HERBERT, C.; KUMAR, R. K. 2013. Interleukin-33 drives activation of alveolar macrophages and airway inflammation in a mouse model of acute exacerbation of chronic asthma. **BioMed Research International**, **250938**: 1-11.

CAI, Y.; SUGIMOTO, C.; ARAINGA, M.; ALVAREZ, X.; DIDIER, E. S.; KURODA, M. J. 2014. In vivo characterization of alveolar and interstitial lung macrophages in rhesus macaques: implications for understanding lung disease in humans. **The Journal of Immunology**, **192 (6)**: 2821-2829.

CALIXTO, M. C.; LINTOMEN, L.; SCHENKA, A.; SAAD, M. J.; ZANESCO, A.; ANTUNES, E. 2010. Obesity enhances eosinophilic inflammation in a murine model of allergic asthma. **British journal of pharmacology**, **159 (3)**: 617-25.

CANÖZ, M.; ERDENEN, F.; UZUN, H.; MÜDERRISOGLU, C.; AYDIN, S. 2008. The relationship of inflammatory cytokines with asthma and obesity. **Clinical Investigation Medicine**, **31 (6)**: 373-379.

CARROLL, N. G.; MUTAVDZIC, S.; JAMES, A. L. 2002. Increased mast cells and neutrophils in submucosal mucous glands and mucus plugging in patients with asthma. **Thorax** **57**: 677–682.

CHAPMAN, D. G.; IRVIN, C. G.; KAMINSKY, D. A. FORGIONE, P. M.; BATES, J. H. T.; DIXON, A. E. 2014. Influence of distinct asthma phenotypes on lung function following weight loss in the obese. **Respirology**, **19 (8)**: 1-8.

CHATTERJEE, S.; GANINI, D.; TOKAR, E.J.; KUMAR, A.; DAS, S.; CORBETT, J.; KADIISKA, M. B.; WAALKES, M. P.; DIEHL, A. M.; MASON, R. P. 2013. Leptin is key to peroxynitrite-mediated oxidative stress and Kupffer cell activation in experimental non-alcoholic steatohepatitis. **Journal Hepatology**, **58 (4)**: 778-84

CHEN, L.; GRABOWSKI, K. A.; XIN, J.; COLEMAN, J.; HUANG, Z.; ESPIRITU, B.; ALKAN, S.; XIE, H. B.; ZHU, Y.; WHITE, F. A.; CLANCY JR, J.; HUANG, H. 2004. IL-4 induces differentiation and expansion of Th2 cytokine-producing eosinophils. **The Journal of Immunology**, **172 (4)**: 2059-2066.

CHEN, Y.; DALES, R.; JIANG, Y. 2006. The association between obesity and asthma is stronger in nonallergic than allergic adults. **CHEST**, **130**: 890–895.

CHEN, Y.; TIAN, J.; TIAN, X.; TANG, X.; RUI, K.; TONG, J.; LU, L.; XU, H.; WANG, S. 2014. Adipose tissue dendritic cells enhances inflammation by prompting the generation of th17 cells. **Plos One**, **9 (3)**: 1-8.

CHEN, Y.; THAI, P.; ZHAO, Y. H.; HO, Y. S.; DESOUZA, M. M.; WU, R. 2003. Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop. **The Journal of Biological Chemistry**, **278 (19)**: 17036–17043.

CHERRY, W. B.; YOON, J.; BARTEMES, K. R.; IJIMA, K.; KITA, H. 2008. A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potently activates human eosinophils. **Journal Allergy Clinical Immunology**, **121 (6)**: 1484-1490.

CHIEN, J. W.; LIN, C.Y.; YANG, K. D.; LIN, C. H.; KAO, J. K.; TSAI, Y. G. 2013. Increased IL-17A secreting CD4+ T cells, serum IL-17 levels and exhaled nitric oxide are correlated with childhood asthma severity. **Clinical Experimental Allergy**, **43 (9)**: 1018-26.

CHO, K. A.; JE SUH, J. W.; SOHN, J. J. H.; PARK, J. W.; LEE, H.; KANG, J. J.; WOO, S. Y.; CHO, Y. J. IL-33 induces Th17-mediated airway inflammation via mast cells in ovalbumin-challenged mice. **American Journal Physiology Lung Cellular Molecular Physiology**, **302 (4)**: L429–L440.

CINTI, S.; MITCHELL, G.; BARBATELLI, G.; MURANO, I.; CERESI, E.; FALIOIA, E.; WANG, S.; FORTIER, M.; GREENBERG, A.S.; OBIN, M.S. 2005. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. **Journal Lipid Research**, **46 (11)**: 2347–2355.

CIEPIELA, O.; OSTAFIN, M.; DEMKOW, U. 2014. **Respiratory, Fisiology & Neurobiology**, **14**: 1-4.

CLAYCOMBE, K.; KING, L. E.; PAMELA J. FRAKER, P. J. 2008. A role for leptin in sustaining lymphopoiesis and myelopoiesis. **PNAS**, **105 (6)**: 2017–2021.

COLLINS, S.; MARTIN, T.L.; SURWIT, R.S.; ROBIDOUX, J. 2004. Genetic vulnerability to diet induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. **Physiology & Behavior**, **81 (2)**: 243-248.

CONUS, S.; BRUNO, A.; SIMON, H. U. 2005. Leptin is an eosinophil survival factor. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, **116 (6)**: 1228-1234.

COSMI, L.; MAGGI, L.; SANTARLASCI, V.; CAPONE, M.; CARDILICCHIA, E.; FROSALI, F.; QUERCI, V.; ANGELI, R.; MATUCCI, A.; FAMBRINI, M.; LIOTTA, F.; PARRONCHI, P.; MAGGI, E.; ROMAGNANI, S.; ANNUNZIATO, F. 2010. Identification of a novel subset of human circulating memory CD41 T cells that produce both IL-17A and IL-4. **Journal Allergy Clinical Immunology**, **125 (1)**: 222-230.

COOK, E. B.; STAHL, J. L.; SCHWANTES, E. A.; FOX, K. E.; MATHUR, S. K.; 2012. IL-3 and TNF α increase Thymic Stromal Lymphopoietin Receptor (TSLPR) expression on eosinophils and enhance TSLP-stimulated degranulation. **Clinical and Molecular Allergy**, **10 (8)**: 2-9.

COTTRELL, L.; NEAL, W. A.; ICE, C.; PEREZ, M. K.; PIEDIMONTE, G. 2011. Metabolic abnormalities in children with asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, **183 (4)**: 441-448.

DALMAS, E.; ROUAULT, C.; ABDENNOUR, M.; ROVERE, C.; RIZKALLA, S.; BARTHEN, A.; NAHON, J. L.; BOUILLOT, J. L.; GUERRE-MILLO, M.; CLEMENT, K.; POITOU, C. 2011. Variations in circulating inflammatory factors are related to changes in calorie and carbohydrate intakes early in the course of surgery-induced weight reduction. **American Journal Clinical Nutrition**, **94**: 450–458.

DENT, G.; HADJICHARALAMBOUS, C.; YOSHIKAWA, T.; HANDY, R. L. C.; JOHN POWELL, J.; ANDERSON, I. K.; LOUIS, R.; DAVIES, D. E.; RATKO DJUKANOVIC, R. 2004. Contribution of eotaxin-1 to eosinophil chemotactic activity of moderate and severe asthmatic sputum. **American Journal Respiratory Critical Care Medicine**, **169 (10)**: 1110–1117.

DE ROSA, V.; PROCACCINI, C.; CALI, G.; PIROZZI, G.; FONTANA, S.; ZAPPACOSTA, S.; LA CAVA, A.; MATARESE, G. 2007. A key role of leptin in the control of regulatory T cell proliferation. **Immunity**, **26 (2)**: 241-255.

DEIULIIS, J.; SHAH, Z.; SHAH, N.; NEEDLEMAN, B.; MIKAMI, D.; NARULA, V.; PERRY, K.; HAZEY, J.; KAMPFRATH, T.; KOLLENGODE, M.; SUN, Q.; SATOSKAR, A. R.; LUMENG, C.; MOFFATT-BRUCE, S.; RAJAGOPALAN, S. 2011. Visceral adipose inflammation in obesity is associated with critical alterations in Tregulatory cell numbers. **PloS One**, **6 (1)**: e16376.

DIETZE, J.; BÖCKING, C.; HEVERHAGEN, J. T.; VOELKER, M. N.; RENZ, H. 2012. Obesity lowers the threshold of allergic sensitization and augments airway eosinophilia in a mouse model of asthma. **Allergy**, **67 (12)**: 1519-1529.

DIRETRIZES BRASILEIRAS DE OBESIDADE (ABESO, 2009/2010). 3ª Ed. Acessado 07 de agosto 2013.
http://www.abeso.org.br/pdf/diretrizes_brasileiras_obesidade_2009_2010_1.pdf

DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA PARA O MANEJO DA ASMA (2012). **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, **38**: Suplemento 1, S1-S46.

DIXON, A. E.; HOLGUIN, F.; SOOD, A.; SALOME, C. M.; PRATLEY, R. E.; BEUTHER, D. A.; CELEDON, J. C., SHORE, S, S. 2010. An Official American Thoracic Society Workshop Report: Obesity and Asthma. **Proceedings American Thoracic of the Society**, **7 (5)**: 325–335.

DOGANCI, A.; EIGENBROD, T.; KRUG, N.; DE SANCTIS, G. T.; HAUSDING, M.; ERPENBECK, V. J.; HADDAD, E.; SCHMITT, E.; BOPP, T.; KALLEN, K. J.; HERZ,

U.; SCHMITT, S.; LUFT, C.; HECHT, O.; HOHLFELD, J. M.; ITO, H.; NISHIMOTO, N.; YOSHIZAKI, K.; KISHIMOTO, T.; ROSE-JOHN, S.; RENZ, H.; NEURATH, M. F.; GALLE, P. R.; FINOTTO, S. 2005. The IL-6R α -chain controls lung CD4⁺CD25⁺ Treg development and function during allergic airway inflammation in vivo. **The Journal of Clinical Investigation**, **115 (5)**: 313-325.

DOUGHERTY, R. H.; SIDHU, S. S.; RAMAN, K.; SOLON, M. B. A.; SOLBERG, O. D.; CAUGHEY, G. H.; WOODRUFF, P. G.; FAHY, J. V. 2010. Accumulation of intraepithelial mast cells with a unique protease phenotype in Th2-high asthma. **Journal Allergy Clinical Immunology**, **125 (5)**: 1046-1053.

DRAIJER, C ROBBE, P.; BOORSMA, C. E.; HYLKEMA, M. N.; MELGERT, B. N. 2013. Characterization of macrophage phenotypes in three murine models of house-dust-mite-induced asthma. **Mediators of Inflammation**, **632049**: 1-10

DUFFAUT, C.; ZAKAROFF-GIRARD, A.; BOURLIER, V.; DECAUNES.; MAUMUS, M.; CHIOTASSO, P.; SENGENE`S, C.; LAFONTAN, M.; GALITZKY, J.; BOULOUMIE, A. 2009. Interplay between human adipocytes and t lymphocytes in obesity ccl20 as an adipochemokine and t lymphocytes as lipogenic modulators. **Arteriosclerosis Thrombosis Vasular Biology**, **29 (10)**:1608-1614.

ENOKSSON, M.; LYBERG, K.; WESTERBERG, C. M.; FALLON, P. G.; NILSSON, G.; ANDERSSON. C. L. 2011. Mast cells as sensors of cell injury through IL-33 recognition. **The Journal of Immunology**, **186 (4)**: 2523–2528.

ERUSAN, R. R.; NALINI, D.; MANOHAR, G.; MALATHI, R. 2012. Correlation between obesity and inflammation in cardiovascular diseases—evaluation of leptin and inflammatory cytokines. **Open Journal of Endocrine and Metabolic Diseases**, **2**: 7-15.

EVANS, C. M.; KIMA, K.; TUVIMA, M. J.; DICKEYA, B. F. 2009. Mucus hypersecretion in asthma: causes and effects. **Current Opinion Pulmonary Medicine**, **15 (1)**: 4–11.

FAIN, J. N.; TICHANSKY, D. S.; MADAN, A. K. 2005. Transforming growth factor β 1 release by human adipose tissue is enhanced in obesity. **Metabolism**, **54 (11)**: 1546-1551.

FAROOQI, S.; WANGENSTEEN, T.; COLLINS, S.; KIMBER, W.; MATARESE, G.; KEOGH, J. M.; LANK, E.; BOTTOMLEY, B.; LOPEZ-FERNANDEZ, J.; FERRAZ-AMARO, I.; DATTANI, M. T.; ERCAN, O.; MYHRE, A. G.; RETTERSTOL, L.; STANHOPE, R.; EDGE, J. A.; MCKENZIE, S.; NADER LESSAN, N.; GHODSI, M.; DE ROSA, V.; PERNA, F.; FONTANA, S; BARROSO, I.; DAG E. UNDLIEN, D. E.; O'RAHILLY, S. 2007. Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor. **The New England Journal of Medicine**, **356 (3)**: 237-247.

FEARNSIDE, J. F.; DUMAS, M. E.; ROTHWELL, A. R.; WILDER, S. P.; CLOAREC, O. C.; TOYE, A.; BLANCHER, C.; HOLMES, E.; TATOUD, R.; BARTON, R. H.; SCOTT, J.; NICHOLSON, J. K.; GAUGUIER, D. 2008. Phylometabonomic patterns of adaptation to high fat diet feeding in inbred mice. **Plos One**, **3 (2)**: 1-9.

FIGUEIREDO, C. A.; RODRIGUES, L. C.; NEVES, N. M. A.; COOPER, P. J.; AMORIM, L. D.; SILVA, N. B.; CRUZ, A. A.; BARRETO, M. L. Does IFN- γ play a role on the pathogenesis of non-atopic asthma in Latin America children? **Allergy Clinical Immunology**, **8 (1)**: 8-18.

FENGER, R. V.; GONZALEZ-QUINTELA, A.; VIDAL, C.; GUDE, F.; HUSEMOEN, L. L.; AADAHL, M.; BERG, N.; LINNEBERG, D. A. 2012. Exploring the obesity-asthma link: do all types of adiposity increase the risk of asthma? **Clinical & Experimental Allergy**, **42 (8)**: 1237–1245.

FERNANDEZ-BOYANAPALLI, R.; GOLEVA, E.; KOLAKOWSKI, C.; MIN, E.; DAY, B.; LEUNG, D. Y. M.; RICHES, D. W. H.; BRATTON, D. L. SUTHERLAND, E. R. 2013. Obesity impairs apoptotic cell clearance in asthma. **Journal Allergy Clinical Immunology**, **131 (4)**: 1041-1047.

FEZEU, L.; JULIA, C.; HENEGAR, A.; BITU, J.; HU, F. B.; GROBBEE, D. E.; KENGNE, A. P.; HERCBERG, S.; CZERNICHOW, S. 2011. Obesity is associated with higher risk of intensive care unit admission and death in influenza A (H1N1) patients: a systematic review and meta-analysis. **Obesity Review**, **12 (8)**: 653-659.

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

FOLGLI, L. K.; SUNDRUD, M. S.; GOEL, S.; BAJWA, S.; JENSEN, K.; DERUDDER, E.; SUN, A.; COFFRE, M.; UYTENHOVE, C.; SNICK, J.V.; SCHMIDT-SUPPRIAN, M.; RAO, A.; GRUNIG, G.; DURBIN, J.; CASOLA, S. S.; RAJEWSKY, K.; KORALOV, S.B. 2014. T cell-derived IL-17 mediates epithelial changes in the airway and drives pulmonary neutrophilia. **Journal of Immunology**, **191 (6)**: 1-24.

FORTE, G. C.; GRUTCKIA, M. D.; MENEGOTTO, S. M.; PEREIRA, R. P.; ROTH DALCINA, P. T. R. 2013. Prevalence of obesity in asthma and its relations with asthma severity and control. **Revista da Associação Médica Brasileira**, **59 (6)**: 594–599.

FROIDURE, A.; SHEN, C.; GRAS, D.; SNICK, J. V.; P. CHANEZ, P.; C. PILETTE, C. 2014. Myeloid dendritic cells are primed in allergic asthma for Thymic Stromal Lymphopoietin-mediated induction of Th2 and Th9 responses. **European Journal of Clinical Allergy and Clinical Immunology**, **69 (8)**: 1068-1076.

FU, J.J.; BAINES, K.J. WOOD, L.G.; G. GIBSON, P.G. 2013. Systemic inflammation is associated with differential gene expression and airway neutrophilia in asthma. **OMICS A Journal of Integrative Biology**, **17 (4)**: 187-199.

FUCHS, B.; SJÖBERG, L.; WESTERBERG, C. M.; EKOFF, M.; SWEDIN, L.; SAHLÉN, S. E.; ADNER, M. ; NILSSON, G. P. 2012. Mast cell engraftment of the peripheral lung enhances airway hyperresponsiveness in a mouse asthma model. **American Journal Physiology Lung Cellular Molecular Physiology**, **303 (12)**: L1027–L1036.

FUENTES, T.; ARA, I.; GUADALUPE-GRAU, A.; S. LARSEN, S.; STALLKNECHT, B.; H. OLMEDILLAS, H.; SANTANA, A.; HELGE, J. W.; CALBET, J. A. L. B. GUERRA, B. Leptin receptor 170kDa (OB-R170) protein expression is reduced in obese human skeletal muscle: a potential mechanism of leptin resistance.

Experimental Physiology, **95 (1)**: 160–171.

FUJISAWA, T.; VELICHKO, S.; THAI, P.; HUNG, L. Y.; HUANG, F.; WU, R. 2009. Regulation of airway *muc5ac* expression by IL-1 β and IL-17A the NF- κ B paradigm.

The Journal of Immunology, **183 (10)**: 6236-6243.

GALLI, S. J.; TSAI, M.; PILIPONSKY, A. M. 2008. The development of allergic inflammation. **Nature**, **454 (7203)**: 445-454.

GAN, L.; KAIYING GUO, K.; CREMONA, L. M.; MCGRAW, T. E.; LEIBEL, R. L.; ZHANG, Y. 2012. TNF-Up-regulates protein level and cell surface expression of the leptin receptor by stimulating its export via a pkc-dependent mechanism.

Endocrinology, **153 (12)**: 5821–5833.

GERN, J. E.; BUSSE, W. W. 2002. Relationship of viral infections to wheezing illnesses and asthma. **Nature Review Immunology**, **2 (2)**: 132-138.

GIBEON, D.; BATUWITA, K.; OSMOND, M.; HEANEY, L. G.; BRIGHTLING, C. E.; NIVEN, R.; MANSUR, A.; CHAUDHURI, R.; BUCKNALL, C. E.; ROWE, A. R.; GUO, Y.; BHAVSAR, P, K.; CHUNG, K. F.; MENZIES-GOW, A. 2013. Obesity-associated severe asthma represents a distinct clinical phenotype. **CHEST**, **143 (2)**: 406–414.

GIOULEKA, P.; PAPANICOLAOU, G.; LYBEROPOULOS, P.; KARAKATSANI, A.; ALCHANATIS, M.; ROUSSOS, C.; PAPIRIS, S.; LOUKIDES. 2011. Body mass index is associated with leukotriene inflammation in asthmatics. **European Journal of Clinical Investigation** **41 (1)**: 30-38.

Global Initiative for Asthma [on line]. *GINA_Report_2010.pdf*GINA - Ed. 2014. Reino Unido. [acessado em maio de 2014]. Disponível em: <http://www.ginasthma.org>.

GOLEVA, E.; HAUK, P. J.; HALL, C. F.; LIU, A. H.; RICHES, D. W. H. MARTIN, R. J.; LEUNG, D. Y. M. 2008. Corticosteroid Resistant Asthma is Associated with Classical Anti-Microbial Activation of Airway Macrophages. **Journal Allergy Clinical Immunology**, **122 (3)**: 550–559.

GOUVEIA, A.C.C.; BRUGIOLO, A.S.S.; ALVES, C.C.S.; SILVA, F.M.C.; MESQUITA, F.P.; GAMEIRO, J.; FERREIRA, A.P. 2012. Th2 responses in ova-sensitized Balb/c mice are down-modulated by *mycobacterium bovis* BCG treatment. **Journal clinical Immunology**, **33 (1)**: 235-45 33.

GREEN, R. H.; BRIGHTLING, C. E.; WOLTMANN, G.; PARKER, D.; WARDLAW, A. J.; PAVORD, I. D. 2002. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. **Thorax**, **57 (10)**: 875-879.

GREEN, F. H. Y.; WILLIAMS, D. J.; JAMES, A.; MCPHEE, L. J.; MITCHELL, I.; MAUAD; T. 2010. Increased myoepithelial cells of bronchial submucosal glands in fatal asthma. **Thorax**, **65 (1)**: 32–38.

GRI, G.; PICONESI, S.; FROSSI, B.; MANFROI, V.; MERLUZZI, S.; TRIPODO, C.; VIOLA, A.; ODOM, S.; RIVERA, J.; COLOMBO, M. P.; PUCILLO, C. E. 2008. CD4+CD25+ Regulatory T Cells Suppress Mast Cell Degranulation and Allergic Responses through OX40-OX40L Interaction. **Immunity**, **29 (5)**: 771-781.

GROTTA, M. B.; SQUEBOLA-COLA, D. M.; TORO, A. A.; RIBEIRO, M. A. G.; MAZON, S. B.; RIBEIRO, J. D.; ANTUNES, E.; 2013. Obesity increases eosinophil activity in asthmatic children and adolescents. **BMC Pulmonary Medicine**, **13 (39)**: 1-8.

GRUEN, M. L.; HAO, M.; PISTON, D. W.; HASTY, A. H. 2007. Leptin requires canonical migratory signaling pathways for induction of monocyte and macrophage chemotaxis. **American Journal Physiology Cellular Physiology**, **293 (5)**: 1481-1488.

GUEDERS, M. M.; PAULISSEN, G. P.; CRAHAY, C.; QUESADA-CALVO, F.; HACHA, J.; HOVE, C. V.; TOURNOY, K.; LOUIS, R.; FOIDART, J. M.; NOEL, A.; DIDIER, D.; CATALDO, D. D. 2009. Mouse models of asthma: a comparison between C57BL/6 and BALB/c strains regarding bronchial responsiveness, inflammation, and cytokine production. **Inflammatory Research**, **58 (12)**: 845–854.

GUILHERME, A.; VIRBASIS, J. V.; PURI, V.; CZECH, M. P. 2008. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, **9 (5)**: 367-377.

GUO, S.; DIPIETRO, L. A. 2010. Factors Affecting Wound Healing. **Journal Dental Research**, **89 (3)**: 219-229.

HAJRI, T.; TAO, H.; WATTACHERIL, J.; MARKS-SHULMAN, P.; ABUMRAD, N. N. 2011. Regulation of adiponectin production by insulin: interactions with tumor necrosis factor- α and interleukin-6. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, **300 (2)**: E350-E360.

HALDAR, P.; BRIGHTLING, C. E.; HARGADON, B.; GUPTA, S.; MONTEIRO, W.; SOUSA, A.; MARSHALL, R. P.; BRADDING, P.; GREEN, R. H.; WARDLAW, A. J.; PAVORD, I. D. 2009. Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. **The New England Journal of Medicine**, **360 (10)**: 973-984.

HALDAR, P.; PAVORD, I. D.; SHAW, D. E.; BERRY, A. A.; THOMAS, M.; BRIGHTLING, C. E.; WARDLAW, A. J.; GREEN, R. H. 2008. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. **American Journal Respiratory Critical Care Medicine**, **178 (3)**: 218–224.

HALLSTRAND, T. S.; HACKETT, T. L.; ALTEMEIER, W. A.; MATUTE-BELLO, G.; HANSBRO, P. M.; KNIGHT, D. A. 2014. Airway epithelial regulation of pulmonary immune homeostasis and inflammation. **Clinical Immunology**, **151 (1)**: 1–15.

- HALIM, T.Y. F.; STEER, C. A.; MATHA, L.; GOLD, M. J.; GONZALEZ, I. M.; MCNAGNY, K. M.; MCKENZIE, ANDREW, N. J.; TAKEI, F. 2014. Group 2 innate lymphoid cells are critical for the initiation of adaptive t helper 2 cell-mediated allergic lung inflammation. **Immunity**, **40 (3)**: 425–435.
- HAMMAD, H.; CHIEPPA, M.; PERROS, F.; WILLART, M. A.; GERMAIN, R. N. LAMBRECHT, B. N. 2009. House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. **Nature Medicine**, **15 (4)**: 410-416.
- HAN, H.; HEADLEY, M. B.; XU, W.; COMEAU, M. R.; ZHOU, B.; ZIEGLER, S. F.; 2014. Thymic Stromal Lymphopoietin amplifies the differentiation of alternatively activated macrophages. **The Journal of Immunology**, **190 (3)**: 904–912.
- HARPER, D. A.; , ELSE, B. M.; BARTLEY, M. J.; AREY, A. M.; BARNETT, A. L.; ROSEMERGEY, B. E.; PAYNTER, C. A.; VERDENIUS, I.; HARPER, S. M.; HARRIS, G. D. 2014. In a safety net population HPV4 vaccine adherence worsens as BMI increases. **Plos One**, **9 (7)**: 1-9.
- HARWOOD JR, H. J. 2012. The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis. **Neuropharmacology**, **63 (1)**: 57-75.
- HASEGAWA, K.; TSUGAWA, Y.; LOPEZ, B. L.; SMITHLINE, H. A.; SULLIVAN, A. F.; CAMARGO JR. C. A. Jr. 2014. Body mass index and risk of hospitalization among adults presenting with asthma exacerbation to the emergency department. **Ann American Thoracic Sociolgy**, **11 (9)**: 1439-1444.
- HASTIE, A. T.; MOORE, W. C.; MEYERS, D. A.; VESTAL, P. L.; LI, H.; PETERS, S. P.; BLEECKER, E. R. 2010. The National Heart, Lung, and Blood Institute Severe Asthma Research Program Winston-Salem, NC. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, **125 (5)**: 1021-1036.
- HERBERT, C.; SCOTH, M. M.; KIM H.; SCRUTON, K. H.; KEOGH, R. P.; YUAN, K. C.; HSU, K.; SIEGLE, J. S.; TEDLA, N.; FOSTER, P. S.; KUMAR, R. K.. 2010. Alveolar macrophages stimulate enhanced cytokine production by pulmonary cd4 t-lymphocytes in an exacerbation of murine chronic asthma. **American Journal Pathology**, **177 (4)**: 1657–1664.
- HERBERT, C.; SHADIE, A. M.; KUMAR, R. K. 2013. Interleukin-17 signalling in a murine model of mild chronic asthma. **International Archives Allergy Immunology**, **162 (3)**: 253–262.
- HIRSCH, G.; LAMOUREUX, A. L.; BEAUCHAMP, G.; LAVOIE, J. P. 2012. Neutrophils are not less sensitive than other blood leukocytes to the genomic effects of glucocorticoids. **Plos One**, **7 (9)**: 1-11.
- HOYLER, T.; KLOSE, C. S. N.; SOUABNI, A.; TURQUETI-NEVES, A.; PFEIFER, D.; RAWLINS, E. L.; VOEHRINGER, D.; BUSSLINGER, M.; DIEFENBACH, A. 2012. The transcription factor GATA3 controls cell fate and maintenance of type 2 innate lymphoid cells. **Immunity**, **37 (4)**: 634–648.
- HOLGATE, S. T.; DAVIES, D. E.; POWELL, R. M.; HOWARTH, P. H.; HAITCHI, H. M.; HOLLOWAY, J. W. 2007. Local genetic and environmental factors in asthma

disease pathogenesis: chronicity and persistence mechanisms. **European Respiratory Journal**, **29 (4)**: 793-803.

HOLGATE, S. T. Innate and adaptive immune responses in asthma. 2012. **Nature Medicine**, **18 (5)**: 673-683.

HOLGUIN, F.; BLEECKER, E. R.; BUSSE, W. W.; CALHOUN, W. J.; CASTRO, M. E. S. C.; FITZPATRICK, A. M.; GASTON, B.; ISRAEL, E.; JARJOUR, N. N.; MOORE, W. C.; PETERS, S. P.; YONAS, M.; TEAGUE, W. G.; WENZEL, S. E. 2011. Obesity and asthma: an association modified by age of asthma onset. **Journal Allergy Clinical Immunology**, **127**: 1486–1493.

HOLGUIN, F.; ROJAS, M.; BROWN, L.; FITZPATRICK, A. M. 2011. Airway and plasma leptin and adiponectin in lean and obese asthmatics and controls. **Asthma**, **48 (3)**: 217–212.

HONG, J. H.; CHUNG, Y.; STEENROD, J.; CHEN, Q.; LEI, J.; COMSTOCK, A. T.; GOLDSMITH, A. M. BENTLEY, J. K.; SAJJAN, U. S. HERSHENSON, M. B. 2014. Macrophage activation state determines the response to rhinovirus infection in a mouse model of allergic asthma. **Respiratory Research**, **7**: 15:63.

HUSEMOEN, L. L. N.; GLUMER, C.; LAU C. , PISINGER, C.; MØRCH, L. S.; LINNEBERG, A. 2008. Association of obesity and insulin resistance with asthma and aeroallergen sensitization. **Allergy**, **63 (5)**: 575–582.

ITO, K.; HERBERT, C. ; S. SIEGLE, J.S., VUPPUSETTY, C.; HANSBRO, N.; THOMAS, P.S., FOSTER, P.S.; BARNES, P. J.; KUMAR, R. K. 2008. Steroid-resistant neutrophilic inflammation in a mouse model of an acute exacerbation of asthma. **American Journal Respiratory Cellular Molecular Biology**, **39 (5)**: 543–550.

IRVIN, C.; ZAFAR, I.; GOOD, J.; ROLLINS, D.; CHRISTIANSON, C.; GORSKA, M. M.; MARTIN, R. J.; ALAM, R. 2014. Increased frequency of dual-positive TH2/TH17 cells in bronchoalveolar lavage fluid characterizes a population of patients with severe asthma. **Journal Allergy Clinical Immunology**, **134 (5)**: 1-19.

JACOBSEN, E. A.; LESUER, W. E.; WILLETTS, L.; ZELLNER, K. R.; MAZZOLINI, K.; ANTONIOS, N.; BECK, B.; PROTHEROE, C.; OCHKUR, S. I.; COLBERT, D.; LACY, P.; MOQBEL, R.; APPLETON, A.; LEE, N. A.; LEE, J. J. 2013. Eosinophil activities modulate the immune/inflammatory character of allergic respiratory responses in mice. **European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, **69 (3)**: 315–327.

JAMES, B. R.; TOMANEK-CHALKLEY, A.; ASKELAND, E. J.; KUCABA, T.; GRIFFITH, T. S.; NORIAN, L. A. 2012. Diet-induced obesity alters dendritic cell function in the presence and absence of tumor growth. **The Journal of Immunology**, **189 (3)**: 1311-1321.

JANG, A. S.; KIM, T.H.; PARK, J.S.; KIM, K.U.; UH, S.T.; KI-HYUN SEO, K.H.; KIM, Y.H.; LIM, G.I.; PARK, C.S. 2009. Association of serum leptin and adiponectin with obesity in asthmatics. **The Journal of Asthma**, **46 (1)**: 59–63.

JARTTI, T.; SAARIKOSKI, L.; JARTTI, L.; LISINEN, I.; JULA, J.; HUUPPONEN, H.; VIKARI, J.; RAITAKARI, O. T. 2009. Obesity, adipokines and asthma. **Allergy**, **64** (5): 770-777.

JOHANSSON, M. W. 2014. Activation states of blood eosinophils in asthma. **Clinical Experimental Allergy**, **44** (4): 482-498.

JOHNSTON, R.; ZHU, M.; RIVERA-SANCHEZ, Y. M.; LU, F. L.; TODD, A.; THEMAN, T.A.; FLYNT, L.; SHORE, S. A. 2007. Allergic airway responses in obese mice. **Journal of Lipid Research**, **49** (7): 1562–1568.

KANDA, H.; TATEYA, S.; TAMORI, Y.; KOTANI, K.; HIASA, K.; KITAZAWA, R.; KITAZAWA, S.; MIYACHI, H.; MAEDA, S.; EGASHIRA, K.; KASUGA, K. 2006. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. **The Journal of Clinical Investigation**, **116** (6): 1494-1505.

KATO, H.; UEKI, S.; KAMADA, R.; KIHARA, K.; YAMAUCHI, Y.; SUZUKI, T.; TAKEDA, M.; ITOGA, M.; CHIHARA, M.; ITO, W.; KAYABA, H.; CHIHARA, J. 2011. Leptin Has a Priming Effect on Eotaxin-Induced Human Eosinophil Chemotaxis. **International Archives Allergy Immunology**, **155**: 335–344.

KAUR, D.; HOLLINS, F.; WOODMAN, L.; YANG, W.; MONK, P.; MAY, R.; BRADDING, P.; BRIGHTLING, C. E. 2006. Mast cells express IL-13Ra1: IL-13 promotes human lung mast cell proliferation and FcεR1 expression. **Allergy**, **61**(9): 1047–1053.

KEARLEY, J.; ERJEFALT, J. S.; ANDERSSON, C.; BENJAMIN, E.; JONES, C. P.; ROBICHAUD, A.; PEGORIER, S.; BREWAH, Y.; BURWELL, T. J.; BJERMER, L.; KIENER, P. A.; KOLBECK, R.; LLOYD, C. M.; COYLE, A. J.; HUMBLE, A. A. 2011. IL-9 governs allergen-induced mast cell numbers in the lung and chronic remodeling of the airways. **American Journal Respiratory Critical Care Medicine**, **183**: 865–875.

KERKHOVE, V. M. D.; VANDEMAELE, K. A.; SHINDE, V.; JARAMILLO-GUTIERREZ, G.; KOUKOUNARI, A.; DONNELLY, C. A.; CARLINO, L. O.; OWEN, R.; PATERSON, B.; PELLETIER, L.; VACHON, J.; GONZALEZ, C.; HONGJIE, Y.; ZIJIAN, F.; CHUANG, S.K.; AU, A.; BUDA, S.; KRAUSE, G.; HAAS, W.; BONMARIN, I.; TANIGUICHI, K.; NAKAJIMA, K.; SHOBAYASHI, T.; TAKAYAMA, Y.; SUNAGAWA, T.; HERAUD, J.M.; ORELLE, A.; PALACIOS, E.; VAN DER SANDE, M. A.; WIELDERS, C.C.; HUNT, D.; CUTTER, J.; LEE, V. J.; THOMAS, J.; SANTA-OLALLA, P.; SIERRA-MOROS, M. J.; HANSHAOWORAKUL, W.; UNGCHUSAK, K.; PEBODY, R.; JAIN, S.; MOUNTS, A. W.; WHO Working Group for Risk Factors for Severe H1N1pdm Infection. 2011. Risk factors for severe outcomes following 2009 influenza A (H1N1) infection: a global pooled analysis. **Plos One**, **8 (7)**: 1-12.

KIM, E.J.; CHOI, M. R.; PARK, H.; KIM, M.; HONG, J. E.; LEE, J. Y.; CHUN, H. S.; LEE, K. W.; PARK, J. H. Y. 2011. Dietary fat increases solid tumor growth and metastasis of 4T1 murine mammary carcinoma cells and mortality in obesity-resistant BALB/c. **Breast Cancer Research**, **13 (4)**: 1-13.

KIM, H. Y.; LEE, H. J.; CHANG, Y. J.; PICHAVANT, M.; SHORE, S. A., FITZGERALD, K. A.; IWAKURA, Y.; ISRAEL, E.; BOLGER, K.; FAUL, J.; DEKRUYFF, R.; UMETSU, D. T. 2014. Interleukin-17-producing innate lymphoid cells and the NLRP3 inflammasome facilitate obesity-associated airway hyperreactivity. **Nature Medicine**, **20 (1)**: 54-62.

KIM, H. Y.; DEKRUYFF, R. H.; UMETSU, D. T. 2010. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. **Nature Immunology**, **11 (7)**: 577-584.

KIM, H. Y.; CHANG, Y. J.; SUBRAMANIAN, S.; LEE, H. H.; ALBACKER, L. A.; MATANGKASOMBUT, P.; SAVAGE, P. B.; MCKENZIE, A. N. J.; SMITH, D. E.; ROTTMAN, J. B.; DEKRUYFF, R. H.; UMETSU, D. T. 2012. Innate lymphoid cells responding to IL-33 mediate airway hyperreactivity independently of adaptive immunity. **Journal Allergy Clinical Immunology**, **129 (1)**: 216-227.

KIM, J. Y.; SOHN, J. H.; LEE, J. H. PARK, J. W. 2015. Obesity increases airway hyperresponsiveness via the TNF- α pathway and treating obesity induces recovery. **PLoS ONE** **10 (2)**: 1-13.

KIM, M. S.; CHO, K. A.; CHO, Y. J.; WOO, S. W. 2013. Effects of interleukin-9 blockade on chronic airway inflammation in murine asthma models. **Allergy Asthma Immunology Research**, **5 (4)**: 197-206.

KINYANJUI, M. W.; JISHAN, J.; NAKADA, E. M.; QURESHI, S. T.; FIXMAN, E. D. 2013. Dose-dependent effects of IL-17 on IL-13-induced airway inflammatory responses and airway hyperresponsiveness. **The Journal of Immunology**, **190 (3)**: 3859-3868.

KINTSCHER, U.; HARTGE, M.; HESS, K.; FORYST-LUDWIG, A.; CLEMENZ, M.; WABITSCH, M.; FISCHER-POSOVSZKY, P.; BARTH, T. F. E.; DRAGUN, D.; SKURK, T.; HAUNER, H.; BLUHER, M.; UNGER, T.; WOLF, A. M.; KNIPPSCHILD, U.; HOMBACH, V.; MARX, N. 2008. T-lymphocyte infiltration in visceral adipose

tissue. a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, **28**: 1304-1310.

KONDO, Y.; YOSHIMOTO, T.; YASUDA, K.; FUTATSUGI-YUMIKURA, S.; MORIMOTO, M.; HAYASHI, N.; HOSHINO, T.; FUJIMOTO, J.; NAKANISHI, K. 2008. Administration of IL-33 induces airway hyperresponsiveness and goblet cell hyperplasia in the lungs in the absence of adaptive immune system. **International Immunology**, **20 (6)**: 791–800.

KUDO, M.; MELTON, A. C.; CHEN, C.; ENGLER, M. B.; HUANG, K. E.; REN, X.; WANG, Y.; BERNSTEIN, B.; LI, J. T.; ATABAI, K.; HUANG, X.; SHEPPARD, D. 2012. IL-17A produced by $\alpha\beta$ T cells drives airway hyper-responsiveness in mice and enhances mouse and human airway smooth muscle contraction. **Nature Medicine**, **18 (4)**: 549-555.

KUMAR, R. K.; YANG, M.; HERBERT, C.; FOSTER, P. S. 2012. Interferon- γ pulmonary macrophages and airway responsiveness in asthma. **Inflammation & Allergy - Drug Targets**, **11 (4)**: 292-297.

KUPERMAN, D. A.; HUANG, X.; NGUYENVU, L.; HOLSCHER, C.; BROMBACHER, F.; ERLE, D. J. 2005. IL-4 Receptor Signaling in Clara Cells Is Required for Allergen-Induced Mucus Production. **Journal of Immunology**, **175 (6)**: 3746–3752.

KUYPER, L. M.; PARE, P. D.; HOGG, J. C.; LAMBERT, R. K.; IONESCU, D.; WOODS, R.; BAI, T. R. 2003. Characterization of airway plugging in fatal asthma. **American Journal Medicine**, **115 (1)**: 6 –11.

KUROWSKA-STOLARSKA, M.; STOLARSKI, B.; KEWIN, P.; MURPHY, G.; CORRIGAN, C. J.; YING, S.; PITMAN, N.; MIRCHANDANI, A.; RANA, B.; ROOIJEN, N. V.; SHEPHERD, M.; MCSHARRY, C.; MCINNES, I. B.; XU, D.; LEW, Y. F. 2009. IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. **The Journal of Immunology**, **183 (10)**: 6469–6477.

STOLARSKI, B.; KUROWSKA-STOLARSKA, M.; KEWIN, P.; XU, D.; LIEW, F. Y. 2010. IL-33 exacerbates eosinophil-mediated airway inflammation. **The Journal of Immunology**, **185 (6)**: 3472–3480.

LAJOIE, S.; LEWKOWICH, L. P.; SUZUKI, Y.; CLARK, J. R.; SPROLES, A. A.; DIENGER, K.; ALISON L BUDELSKY, A. L.; WILLS-KARP, M. 2010. Complement-mediated regulation of the IL-17A axis is a central genetic determinant of the severity of experimental allergic asthma. **Nature Immunology**, **11 (10)**: 928-936.

LAQUE, A.; ZHANG, Y.; GETTYS, S.; NGUYEN, T.A.; BUI, K.; MORRISON, C. D.; MÜNZBERG, H. 2013. Leptin receptor neurons in the mouse hypothalamus are colocalized with the neuropeptide galanin and mediate anorexigenic leptin action. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, **304 (9)**: E999-E1011.

LAMBRECHT, B. N.; HAMMAD, H. 2013. Asthma: The importance of dysregulated barrier immunity. **European Journal Immunology**, **43 (12)**: 3125–3137.

LARSSON, S. C.; WOLK, A. 2007. Overweight, obesity and risk of liver cancer: a meta-analysis of cohort studies. **British Journal of Cancer**, **97**: 1005 -1008.

LAUZON-JOSET, J. F.; MARSOLAIS, D.; LANGLOIS, A.; BISSONNETTE, E. Y. 2013. Dysregulation of alveolar macrophages unleashes dendritic cell-mediated mechanisms of allergic airway inflammation. **Mucosal Immunology**, **7 (1)**: 155-164.

LAVINSKIENE, S.; BAJORIUNIENE, L.; MALAKAUSKAS, K.; JEROCH, J.; SAKALAUSKAS, R. 2014. Sputum neutrophil count after bronchial allergen challenge is related to peripheral blood neutrophil chemotaxis in asthma patients. **Inflammation Research**, **63 (11)**: 1-9.

LEE, M. J.; WANG, Y.; RICCI, M. R.; SULLIVAN, S.; RUSSELL, C. D.; SUSAN K. FRIED, S. K. 2007. Acute and chronic regulation of leptin synthesis, storage, and secretion by insulin and dexamethasone in human adipose tissue. **American Journal Physiology Endocrinology Metabolism**, **292**: E858–E864.

LEE, M. J.; WU, Y.; FRIED, S. K. 2013. Adipose tissue heterogeneity: Implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. **Molecular Aspects of Medicine**, **34 (1)**: 1-11.

LIU, J.; DIVOUX, A.; SUN, J.; ZHANG, J.; CLÉMENT, K.; GLICKMAN, J. N.; SUKHOVA, G. K.; WOLTERS, P. J.; DU, J.; GORGUN, C. Z.; DORIA, A.; LIBBY, P.; BLUMBERG, R. S.; KAHN, B. B.; HOTAMISLIGIL, G. S.; SHI, G. P. 2009. Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. **Nature Medicine**, **15 (8)**: 940-945.

LORA, J. M.; ZHANG, D. M.; LIAO, S. M.; BURWELL, T.; KING, M.; BARKER, P. A.; SINGH, L.; KEAVENEY, M. MORGENSTERN, J.; GUTIERREZ-RAMOS, J. C.; COYLE, A. J. ; FRASER, C. C. 2005. Tumor Necrosis Factor- triggers mucus production in airway epithelium through an *ib* kinase -dependent mechanism. **The Journal of Biological Chemistry**, **280 (43)**: 36510-36517.

LUGOGO, N. L.; HOLLINGSWORTH, J. W.; HOWELL, D. L.; QUE, L. G.; FRANCISCO, D.; CHURCH T. D.; POTTS-KANT, E. N.; INGRAM, J. L.; WANG, Y.; JUNG, S. H.; KRAFT, M. 2012. Alveolar macrophages from overweight/obese subjects with asthma demonstrate a proinflammatory phenotype. **American Journal Respiratory Critical Care Medicine**, **186 (5)**: 404-411.

LUMENG, C. N.; BODZIN, J. L.; SALTIEL, A. R. 2007. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **Journal Clinical Investigation**, **117 (11)**: 175–184.

MAARSINGH, H.; DEKKERS, B.G.J.; ZUIDHOF, A.B.; BOS, I.S.T.; MENZEN, M.H.; KLEIN, T.; FLIK, G.; ZAAGSMA, J.; MEURS, H. 2011. Increased arginase activity contributes to airway remodelling in chronic allergic asthma. **European Respiratory Journal**, **38 (2)**: 318–328.

MANCUSO, P.; CANETTI, C.; GOTTSCHALK, A.; TITHOF, P. K.; PETERS-GOLDEN, M. 2004. Leptin augments alveolar macrophage leukotriene synthesis by increasing phospholipase activity and enhancing group IVC iPLA₂ (cPLA₂γ) protein expression. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, **287 (3)**: L497-L502.

MANNI, M. L.; TRUDEAU, J. B.; SCHELLE, E. V.; MANDALAPU, S.; ELLOSO, M. M.; KOLLS, J. K.; WENZEL, S. E.; ALCORN, J. F. 2014. The complex relationship between inflammation and lung function in severe asthma. **Nature**, **7 (5)**: 1186-1198.

MANUEL-APOLINAR, L.; LÓPEZ-ROMERO, R.; ZARATE, A.; DAMASIO, L.; RUIZ, M.; CASTILLO-HERNÁNDEZ, C.; GUEVARA, G.; MERA-JIMÉNEZ, E. 2013. Leptin mediated ObRb receptor increases expression of adhesion intercellular molecules and cyclooxygenase 2 on murine aorta tissue inducing endothelial dysfunction. **International Journal Clinical Experimental Medicine**, **6(3)**:192-196.

MATTES, J.; YANG, M.; MAHALINGAM, S; KUEHR, J.; WEBB, D. C.; SIMSON, L.; HOGAN, S. P.; KOSKINEN, A.; MCKENZIE, A. N. J.; DENT, L. A.; ROTHENBERG, M. E.; MATTHAEI, K. I.; YOUNG, L. G.; FOSTER, P. S. 2002. Intrinsic defect in T cell production of interleukin (IL)-13 in the absence of both IL-5 and eotaxin precludes the development of eosinophilia and airways hyperreactivity in experimental asthma. **The Journal of Experimental Medicine**, **195 (11)**: 1433-44.

MATTEWS, J. A.; WURMBRAND, A. P.; RIBEIRO, L.; NETO, F. L.; SHORE, S. A. 2014. Induction of IL-17A precedes development of airway hyperresponsiveness during diet-induced obesity and correlates with complement factor D. **Frontiers in Immunology**, **5 (440)**: 1-9.

MATHIE, S. A.; DIXON, K. L.; S. A. WALKER, S. A.; TYRRELL, V.; MONDHE, M.; O'DONNELL, V. B.; L. G. GREGORY, G.; LLOYD, C. M. 2014. Alveolar macrophages are sentinels of murine pulmonary homeostasis following inhaled antigen challenge. **European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, **70 (1)**: 1-10.

MATTIOLI, B.; STRAFACE, E.; QUARANTA, M. G.; GIORDANI, L.; VIORA, M. 2005. Leptin promotes differentiation and survival of human dendritic cells and licenses them for Th1 priming. **Journal of Immunology**, **174 (11)**: 6820-6828.

MEIJER, K.; VRIES, M.; AL-LAHHAM, S.; BRUINENBERG, M.; WEENING, D.; DIJKSTRA, M.; KLOOSTERHUIS, N.; LEIJ, R. J.V. D.; WANT, H.V.D.; KROESEN, B.J.; VONK, R.; REZAEI, F. 2011. Human Primary Adipocytes Exhibit Immune Cell Function: Adipocytes Prime Inflammation Independent of Macrophages. **Plos One**, **6 (3)**: 1-12.

MEILER, F.; KLUNKER, S.; ZIMMERMANN, M.; AKDIS, C.A.; AKDIS, M. 2008. Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. **Allergy**, **63 (11)**: 1455–1463.

MEYERHOLZ, D. K.; GRIFFIN, M. A.; CASTILOW, E. M.; VARGA, E. M. 2009. Comparison of histochemical methods for murine eosinophil detection in an RSV vaccine-enhanced inflammation model. **Toxicologic Pathology**, **37 (2)**: 249-255.

MITO, N.; KITADA, C.; HOSODA, T.; SATO, K. 2002. Effect of diet-induced obesity on ovalbumin-specific immune response in a murine asthma model. **Metabolism**, **51 (10)**: 1241-1246.

MIZUTANI, N.; NABE, T.; YOSHINO, S. 2013. Interleukin-33 and alveolar macrophages contribute to the mechanisms underlying the exacerbation of IgE-mediated airway inflammation and remodelling in mice. **Immunology**, **139 (2)**: 205-218.

MIZUTANI, N.; NABE, T.; YOSHINO, S. 2014. IL-17A Promotes the Exacerbation of IL-33–Induced Airway Hyperresponsiveness by Enhancing Neutrophilic Inflammation via CXCR2 Signaling in Mice. **The Journal of Immunology**, **192 (4)**: 1372–1384.

MONTGOMERY, M. K.; HALLAHAN, N. L.; BROWN, S. H.; LIU, M.; MITCHELL, T. W.; COONEY, G. J.; TURNER, N. 2013. Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in response to high-fat feeding. **Diabetologia**, **56 (5)**: 1129–1139.

MONTESEIRÍN, J. 2009. Neutrophils and Asthma. **Journal Investigation Allergology Clinical Immunology**, **19 (5)**: 340-354.

MOORE, W. C.; HASTIE, A. T.; LI, X.; LI, H.; BUSSE, W. W.; JARJOUR, N. N.; WENZEL, S. E.; PETERS, S. P.; MEYERS, D. A.; BLEECKER, E. R. 2013. Sputum neutrophil counts are associated with more severe asthma phenotypes using cluster analysis. **Journal Allergy Clinical Immunology**, **133 (6)**: 1557-1563

MORI, M.A.; LIU, M.; BEZY, O.; ALMIND, K.; SHAPIRO, H.; KASIF.; S, KHAN, C.R. 2010. A systems biology approach identifies inflammatory abnormalities between mouse strains prior to development of metabolic disease. **Diabetes**, **59 (11)**: 2960-2971.

MOHSEN, A. H. A.; ALLAM, E. 2012. Relationship between serum levels of resistin and leptin and severity of childhood asthma. **Journal of American Science**, **8 (11)**: 635-641.

MUC, M.; TODO-BOMB, A.; MOTA-PINTO, A.; S. VALE-PEREIRA, S.; C. LOUREIRO. 2014. C. Leptin and resistin in overweight patients with and without asthma. **Allergologia e Immunopathologia**, **42 (5)**: 415-421.

MURANO, G.; BARBATELLI, V.; PARISANI, C.; LATINI, C.; MUZZONIGRO, G.; MASTELLUCCI, G.; CINTI, S. 2008. Dead adipocytes, detected as crown-like structures are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. **Journal Lipid Research**, **49 (7)**: 1562-1568.

NADEEM, A.; SIDDIQUI, N.; ALHARBI, N. O.; ALHARBI, M.M.; IMAM, F. 2014. Acute glutathione depletion leads to enhancement of airway reactivity and

inflammation via p38MAPK-iNOS pathway in allergic mice. **International Immunopharmacology**, **22 (1)**: 222–229.

NANZER, A. M.; CHAMBERS, E. S.; RYANNA, K.; RICHARDS, D. F.; BLACK, C.; TIMMS, P. M.; MARTINEAU, A. R.; GRIFFITHS, C. J.; CORRIGAN, C. J.; HAWRYLOWICZ, C. M. 2013. Enhanced production of IL-17A in patients with severe asthma is inhibited by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 in a glucocorticoid-independent fashion. **Journal Allergy Clinical Immunology**, **132 (2)**: 297-304.

NAURA, A.S., DATTA, R.; HANS, C. P.; ZERFAOUI, M.; REZK, B, M.; ERRAMI, Y.; OUMOUNA, M.; MATROUGUI, K.; BOULARES, A. H. 2009. Reciprocal regulation of iNOS and PARP-1 during allergen-induced eosinophilia. **European Respiratory Journal**, **33 (2)**: 252–256.

NEWSON, R. B.; JONES, B.; FORSBERG, B.; JANSON, C.; BOSSIOS, A.; DAHLEN, S. E.; TOSKALA, E. M.; AL-KALEMJI, A.; KOWALSKI, M. L.; RYMARCZYK, B.; SALAGEAN, E. M.; VAN DRUNEN, C. M.; BACHERT, C.; WEHREND, T.; KRÄMER, U.; MOTA-PINTO, A.; BURNEY, P.; LEYNAERT, B.; JARVIS, D. 2013. **Clinical & Experimental Allergy**, **44 (2)**: 250–260.

NEILL, D. R.; WONG, S. H.; , BELLOSI, A.; , FLYNN, R. J. DALY, M.; THERESA K. A. LANGFORD, T. K. A.; BUCKS, C.; M. KANE, C. M.; FALLON, P. G.; PANNELL, R.; JOLIN, H. E.; MCKENZIE, A. N. J. 2010. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. **Nature**, **464 (29)**: 1367-1371.

NGUYEN, A. M.T.; FAVELYUKIS, S.; NGUYEN, A. K.; REICHART, D.; SCOTT, P. A.; JENN, A.; BRYAN, R. L.; GLASS, C. K.; NEELS, J. G; OLEFSKY, J. M. 2007. 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. **The Journal of Biological Chemistry**, **282 (48)**: 35279-35292.

NISHIMURA, S.; MANABE, I.; NAGASAKI, M.; ETO, C.; YAMASHITA, H.; OHSUGI, M.; OTSU, M.; HARA, K.; UEKI, K.; SUGIURA, S.; YOSHIMURA, K.; KADOWAKI, T.; NAGAI, R. 2009. CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. **Nature Medicine**, **15 (8)**: 914-921.

OSTROUKHOVA, M.; SEGUIN-DEVAUX, C.; RAY, A. 2004. Tolerance induced by inhaled antigen involves CD4⁺ T cells expressing membrane-bound TGF- β and FOXP3. **The Journal of Clinical Investigation**, **114 (1)**: 28-38.

OUCHI, N.; PARKER, J. L.; LUGUS, L. L.; WALSH, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. 2011. **Nature Reviews Immunology**, **11 (2)**: 85-97.

PAICH, H. A.; SHERIDAN, P. A.; HANDY, J.; KARLSSON, E. A.; SCHULTZ-CHERRY, S. T.; HUDGENS, M. G.; NOAH, T. L.; WEIR, S. S.; BECK, M. A. 2013. Overweight and obese adult humans have a defective cellular immune response to pandemic H1N1 influenza a virus. **Obesity**, **21 (11)**: 2377–2386.

PAPATHANASSOGLU, E.; EL-HASCHIMI, K.; LI, X. C.; MATARESE, G.; STROM, T.; MANTZOROS, C. 2006. Leptin receptor expression and signaling in

lymphocytes: kinetics during lymphocyte activation, role in lymphocyte survival, and response to high fat diet in mice. **The Journal of Immunology**, **176 (12)**: 7745-7752.

PARK, H.; KIM, M.; KWON, G. T.; LIM, D.Y.; YU, R.; SUNG, M. K.; LEE, K. W.; DAILY, J. W.; PARK, J. H. 2012. A high-fat diet increases angiogenesis, solid tumor growth, and lung metastasis of CT26 colon cancer cells in obesity-resistant BALB/c mice. **Molecular Carcinogenesis**, **51 (11)**: 869-880.

PAUL, W. E.; ZHU, J. 2010. How are T (H)2-type immune responses initiated and amplified? **Nature Review Immunology**, **10 (4)**: 225-35.

PEGORIER, S.; WAGNER, L. A.; GLEICH, G. J.; PRETOLANI, M. 2006. Eosinophil-derived cationic proteins activate the synthesis of remodeling factors by airway epithelial cells. **The Journal of Immunology**, **177 (7)**: 4861–4869.

PELIKAN, Z. 2012. Delayed type of asthmatic response to allergen challenge and cytokines in the peripheral blood. **Respiration**. **84 (5)**: 385-395.

PELIKAN, Z. 2013. Chemokine profiles in blood associated with delayed asthmatic response to allergen challenge. **Respiratory Medicine**, **107**: 47-59.

PILLAY, J.; BRABER, I. D.; VRISEKOP, N.; KWAST, L. M.; BOER, R. J.; BORGHANS, J. A. M. TESSELAAR, K.; KOENDERMAN, L. In vivo labeling with ²H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. **Blood**, **116 (4)**: 625-627.

POITOU, C.; COUSSIEU, C.; ROUAULT, C.; COUPAYE, M.; CANCELLO, R.; BEDEL, J. F.; GOUILLON, M.; BOUILLOT, J. L.; OPPERT, J. M.; BASDEVANT, A.; CLEMENT, K. 2006. Serum amyloid a: a marker of adiposity induced low-grade inflammation but not of metabolic status. **Obesity**, **14 (2)**: 309-318.

POPE, S. M.; ZIMMERMANN, N.; STRINGER, K. F.; KAROW, M. L.; ROTHENBERG, M. E. 2005. The Eotaxin chemokines and CCR3 are fundamental regulators of allergen-induced pulmonary eosinophilia. **The Journal of Immunology**, **175 (8)**: 5341–5350.

PULLI, B.; ALI, M.; FORGHANI, R.; SCHOB, S.; HSIEH, K. L. C.; WOJTKIEWICZ, G.; LINNOILA, J. L.; CHEN, J. W. 2013. Measuring Myeloperoxidase Activity in Biological Samples. **Plos One**, **8 (7)**: 1-10.

RAMALHO, R.; ALMEIDA, J.; BELTRÃO, M.; A. PIRRACO, A.; R. COSTA, R.; SOKHATSKA, O.; GUARDÃO, L.; PALMARES, L.; J. T. GUIMARÃES, J. T. DELGADO, L.; MOREIR, A.; SOARES, R.; 2012. Substance P antagonist improves both obesity and asthma in a mouse model. **European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, **68**: 48-54.

RAMIREZ, O.; GARZA, K. M. 2014. Leptin deficiency *in vivo* enhances the ability of splenic dendritic cells to activate T cells. **International Immunology**, **26 (11)**: 627–636.

RAMIREZ-VELAZQUEZ, C.; CASTILLO, E. C.; BAYARDO, L. G.; NAVARRETE, V. O. 2013. IL-17-producing peripheral blood CD177+ neutrophils increase in allergic asthmatic subjects. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, **9 (23)**: 1-8.

- RASO, G. M.; PACILIO, M.; ESPOSITO, E.; COPPOLA, A.; DI CARLO, R.; MELI, R. 2002. Leptin potentiates IFN-gamma-induced expression of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2 in murine macrophage J774A.1. **British Journal Pharmacology**, **137 (6)**: 799-804.
- RATH, R.; MÜLLER, I.; KROPF, S.; CLOSS, E. I.; MUNDER, M. 2014. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. **Frontiers in Immunology**, **5 (532)**: 1-10.
- REDENTE, E. F.; HIGGINS, D. M.; DWYER-NIELD, L. D.; ORME, I. M.; GONZALEZ-JUARRERO, M.; MALKINSON, A. M. 2010. Differential polarization of alveolar macrophages and bone marrow-derived monocytes following chemically and pathogen-induced chronic lung inflammation. **Journal Leukocytes Biology**, **88 (1)**: 159–168.
- REYNOLDS, C. M.; MCGILLICUDDY, C. F.; HARFORD, K. A.; FINUCANE, O. M.; MILLS, K. H. G.; ROCHE, H. M. 2012. Dietary saturated fatty acids prime the NLRP3 inflammasome via TLR4 in dendritic cells—implications for diet-induced insulin resistance. **Molecular Nutritional Food Research**, **56(8)**: 1212–1222.
- RING, L. E.; ZELTSER, L. M. 2010. Disruption of hypothalamic leptin signaling in mice leads to early-onset obesity, but physiological adaptations in mature animals stabilize adiposity levels. **The Journal of Clinical Investigation**, **120 (8)**: 2931-2941.
- ROCHA, V. J.; FOLCO, E. J.; SUKHOVA, G.; SHIMIZU, K.; GOTSMAN, I.; VERNON, A. H.; LIBBY, P. 2008. Interferon- γ a Th1 cytokine regulates fat inflammation a role for adaptive immunity in obesity. **Circulation Research**, **103 (5)**: 467-476.
- SAENZ, S.A.; SIRACUSA, M. C.; PERRIGOUE, J. G.; SPENCER, S. P.; URBAN JR, J. F.; TOCKER, J. E.; BUDELSKY, A. L.; KLEINSCHEK, M. A.; KASTELEIN, R. A.; KAMBAYASHI, T.; BHANDoola, A.; ARTIS, D. 2010. IL-25 elicits a multipotent progenitor cell population that promotes TH2 cytokine responses. **Nature**, **464 (29)**: 1362-1367.
- SAHU, N.; MORALES, J. L.; FOWELL, D.; AUGUST, A. 2010. Modeling susceptibility versus resistance in allergic airway disease reveals regulation by tec kinase itk modeling susceptibility versus resistance in allergic. **Plos One**, **5 (6)**: 1-9.
- SANTOS, L. A.; OLIVEIRA, M. A.; FARESIN, S. M.; SANTORO, I. L.; FERNANDES, A. L.; 2007. Direct costs of asthma in Brazil: a comparison between controlled and uncontrolled asthmatic patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **40 (7)**: 943-948.
- SARAIVA, S. A.; SILVA, A. L.; XISTO, D. G.; SORAIA C. ABREU, S. C.; SILVA, J. D.; SILVA, P. L.; TEIXEIRA, T. P. F.; PARRA, E. R.; CARVALHO, A. N.; ANNONI, R.; MAUAD, T.; CAPELOZZI, V. L.; SILVA, P. M. R.; MARTINS, M. A.; ROCCO, P. R. M. 2011. Impact of obesity on airway and lung parenchyma remodeling in

experimental chronic allergic asthma. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, **177**: 141–148.

SAWA, S.; LOCHNER, M.; TAKAYAMA, N. S.; SOPHIE; BÉRARD, D. M.; LEINSCHEK, M.; CUA, D.; SANTO, J. P. D.; EBERL, G. 2011. ROR γ innate lymphoid cells regulate intestinal homeostasis by integrating negative signals from the symbiotic microbiota. **Nature Immunology**, **12 (4)**: 320-328.

SCHATZ, M.; HSU, J. W.Y.; ZEIGER, R. S.; CHEN, W.; DORENBAUM, A.; CHIPPS, B. E.; HASELKORN, T. 2013. Phenotypes determined by cluster analysis in severe or difficult-to-treat asthma. **Journal Allergy Clinical Immunology**, **133 (6)**: 1-8.

SCHAEFFLER, A.; GROSS, P.; BUETTNER, R.; BOLLHEIMER, C.; BUECHLER, C.; NEUMEIER, M.; KOPP, A.; SCHOELMERICH, J.; FALK, W.; 2008. Fatty acid-induced induction of Toll-like receptor-4/nuclear factor-kB pathway in adipocytes links nutritional signalling with innate immunity. **Immunology**, **126 (2)**: 233–245.

SCHLEICH, F. N.; MANISE, M.; SELE, J.; HENKET, M.; SEIDEL, L.; LOUIS, R. 2013. Distribution of sputum cellular phenotype in a large asthma cohort: predicting factors for eosinophilic vs neutrophilic inflammation. **BMC Pulmonary Medicine**, **13 (11)**: 1-8.

SCOTT, H.A.; GIBSON, P.G.; GARG, M.L.; WOOD, L.G. 2011. Airway inflammation is augmented by obesity and fatty acids in asthma. **European Respiratory Journal**, **38 (3)**: 594–602.

SCOTT, H. A.; GIBSON, P. G.; GARG, M. L.; PRETTO, J. J.; MORGAN, P. J.; CALLISTER, R.; WOOD, L. G. 2012. Relationship between body composition, inflammation and lung function in overweight and obese asthma. **Respiratory Research**, **13 (10)**: 1-10.

SELLERS, R. S.; CLIFFORD, C. B.; TREUTING, P. M.; BRAYTON, C. 2012. Immunological variation between inbred laboratory mouse strains: Points to consider in phenotyping genetically immunomodified mice. **Veterinary Pathology**, **49 (1)**: 32-43.

SERGEJEVA, S.; IVANOV, S.; LOTVALL, J.; LINDEN, A. 2005. Interleukin-17 as a recruitment and survival factor for airway macrophages in allergic airway inflammation. **American Journal Respiratory Cellular Molecular Biology**, **33**: 248- 253.

SEARS, M. R. 2014. Trends in the Prevalence of Asthma. **Chest**, **145 (2)**: 219–225.

SHANNON, J.; ERNST, P.; YAMAUCHI, Y.; OLIVENSTEIN, R.; LEMIERE, C.; FOLEY, S.; CICORA, L.; LUDWIG, M.; HAMID, Q.; MARTIN, J. G. 2008. Differences in airway cytokine profile in severe asthma compared to moderate. **CHEST**, **133 (2)**: 420-426.

SHI, L.; LEU, S. W.; XU, F.; ZHOU, X.; YIN, H.; CAI, L.; ZHANG, L. 2008. Local blockade of TSLP receptor alleviated allergic disease by regulating airway dendritic cells. **Clinical Immunology**, **129 (2)**: 202–210.

SHI, H.; KOKOEVA, M.V.; INOUE, K.; TZAMELI, I.; YIN, H.; FLIER, J.S. 2006. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, **116 (11)**: 3015-3025.

SHIN, J.H.; KIM, J.H.; WON YOUNG LEE, W.Y. SHIM, Y.J. 2008. The Expression of adiponectin receptors and the effects of adiponectin and leptin on airway smooth muscle cells. **Yonsei Medicine Journal** **49 (5)**: 804-810.

SHOELSON, S. E. 2011. Immunometabolism: an emerging Frontier. **Nature Reviews Immunology**, **11 (2)**: 81-83.

SHORE, S.A.; SCHWARTZMAN, I.N.; MELLEMA, M.S.; FLYNT, L.; IMRICH, A.; JOHNSTON, R.A. 2005. Effect of leptin on allergic airway responses in mice. **The Journal of allergy and clinical immunology**, **115 (1)**: 103-109.

SITKAUSKIENE, B.; JOHANSSON, A. K.; SERGEJEVA, S.; LUNDIN, S.; SJOSTRAND, M.; LOTVALL, J. 2004. Regulation of bone marrow and airway CD34+ eosinophils by interleukin-5. **American Journal Respiratory Cellular Molecular Biology**, **30 (3)**: 357-378.

SIDELEVA, O.; SURATT, B. T.; BLACK, K. E.; THARP, W. G.; PRATLEY, R. E.; FORGIONE, P.; DIENZ, O.; IRVIN, C. G.; ANNE E. DIXON, A. E. 2012. Obesity and asthma an inflammatory disease of adipose tissue not the airway. **American Journal Respiratory Critical Care Medicine**, **186 (7)**: 598–605.

SIDDIQUI, S.; SECOR JR, E. R.; SILBART, L. K. 2013. Broncho-alveolar macrophages express chemokines associated with leukocyte migration in a mouse model of asthma. **Cellular Immunology** **281 (2)**: 159–169.

SIMPSON, J.L.; GRISSELL, T.V.; DOUWES, J.; J SCOTT, R.J.; BOYLE, M.J; GIBSON, P.G. 2007. Innate immune activation in neutrophilic asthma and bronchiectasis. **Thorax**, **62 (3)**: 211–218.

SMITH, A. G.; SHERIDAN, P. A.; HARP, J. B.; BECK, M. A. 2007. Diet-induced obese mice have increased mortality and altered immune responses when infected with influenza virus. **Nutritional Immunology**, **137 (5)**: 1236-1243.

SMITH, A. G.; SHERIDAN, P. A.; TSENG, R, J.; SHERIDAN, J. F.; BECK, M. A. 2008. Selective impairment in dendritic cell function and altered antigen-specific CD8+ T-cell responses in diet-induced obese mice infected with influenza virus. **Immunology**, **126 (2)**: 268–279.

SONG, C.; LUO, L.; LEI, Z.; LI, B.; LIANG, Z.; LIU, G. LI, D.; ZHANG, G.; HUANG, B.; FENG, Z. H. 2008. IL-17-producing alveolar macrophages mediate allergic lung inflammation related to asthma. **The Journal of Immunology**, **181 (9)**: 6117-6124.

SONNENBERG., G.F.; MONTICELLI, L.A.; M. ELLOSO, M.M.; A. FOUSER, L. A.; ARTIS, D. 2011. CD4⁺ lymphoid tissue inducer cells promote innate immunity in the gut. **Immunity**, **34 (1)**: 122–134.

SOOD, A.; 2010. Obesity, adipokines, and lung disease. **Journal of Applied Physiology**, **108 (3)**: 744-753.

- STRACHAN, D.P. 1989. Hay fever, hygiene, and household size. **BMJ**, **299 (6710)**: 1259-1260.
- STRISSEL, K. J.; DEFURIA, J.; SHAUL, M. E.; BENNETT, G.; GREENBERG, A. S. OBIN, M. S. 2010. T-cell recruitment and Th1 polarization in adipose tissue during diet-induced obesity in C57BL/6 mice. **Obesity**, **18 (10)**: 1918–1925.
- SUN, Z.; DRAGON, S.; BECKER, A.; GOUNNI, A. S. 2013. Leptin Inhibits Neutrophil Apoptosis in Children via ERK/ NF- κ B-Dependent Pathways. **Plos One**, **8 (1)**: 1-9.
- SUGANAMI, T.; NISHIDA, J.; OGAWA, Y. 2005. A Paracrine Loop Between Adipocytes and Macrophages Aggravates Inflammatory Changes. **Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology**, **25 (10)**: 2062-2068.
- SUTHERLAND, T. J. T.; COWAN, J. O.; GOULDING, A.; M. GRANT, A. M.; WILLIAMSON, A.; BRASSETT, K.; HERBISON, G. P.; TAYLOR, R. D. 2008. The association between obesity and asthma interactions between systemic and airway inflammation. **American Journal Respiratory Critical Care Medicine**, **178 (5)**: 469–475.
- SUTHERLAND, E. R.; GOLEVA, E.; KING, T. S.; LEHMAN, E.; STEVENS, A. D.; JACKSON, L. P.; STREAM, A. R.; FAHY, J. V. 2012. Cluster analysis of obesity and asthma phenotypes. **PLoS One**, **7 (5)**: 1-7.
- SUZUKAWA, M.; NAGASE, H.; OGAHARA, I.; HAN, K.; TASHIMO, H.; SHIBUI, A.; KOKETSU, R.; NAKAE, S.; YAMAGUCHI, M.; OHTA, K. 2011. Leptin enhances survival and induces migration, degranulation, and cytokine synthesis of human basophils. **Journal of Immunology**, **186 (9)**: 5254-5260.
- TAILDEMAN, J.; PEREZ-NOVO, C. A.; ROTTIERS, I.; FERDINANDE, L.; WAEYTENS, A.; COLVENAER, V.; BACHERT, C.; DEMETTER, P.; WAELPUT, W.; BRAET, K.; CUVELIER, C. A. 2009. Human mast cells express leptin and leptin receptors. **Histochemistry and Cell Biology**, **131 (6)**: 703-711.
- TAYLOR, B.; MANNINO, D.; BROWN, C.; CROCKER, D.; TWUM-BAAH, N.; HOLGUIN, F. 2008. Body mass index and asthma severity in the National Asthma Survey. **Thorax**, **63 (1)**: 14-20.
- TELENGA, E.D.; TIDEMAN, S.W.; KERSTJENS, H.A.; HACKEN, N.H.; TIMENS, W.; POSTMA D.S.; 2012. Obesity in asthma: more neutrophilic inflammation as a possible explanation for a reduced treatment response. **Allergy, The European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, **67(8)**: 1060-1068.
- TODA, M.; TULIC, M. K.; LEVITT, R. C.; HAMID, Q. 2002. A calcium-activated chloride channel (HCLCA1) is strongly related to IL-9 expression and mucus production in bronchial epithelium of patients with asthma. **Journal Clinical Immunology**, **109**: 246-250.
- TRUJILLO, M. E.; SULLIVAN, S.; HARTEN, I.; SCHNEIDER, S. H.; ANDREW S. GREENBERG, A.; SUSAN K. FRIED, S. K. 2004. Interleukin-6 regulates human adipose tissue lipid metabolism and leptin production *in vitro*. **Journal Clinical Endocrinology Metabolism**, **89 (11)**: 5577–5582.

THUESEN, B. H.; HUSEMOEN, L. L. N.; HERSOUG, L. G.; PISINGER, C.; LINNEBERG, A. 2009. Insulin resistance as a predictor of incident asthma-like symptoms in adults. **Clinical & Experimental Allergy**, **39 (5)**: 700–707.

TUNG, H.Y.; PLUNKETT, B.; HUANG, S. K.; ZHOU, Y. 2014. murine mast cells secrete and respond to interleukin-33. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, **34 (3)**: 141-147.

VEREMEYKO, T.; SIDDIQUI, S.; SOTNIKOV, I.; YUNG, A.; EUGENE, D. PONOMAREV, E. D. 2013. IL-4/IL-13 dependent and independent expression of mir-124 and its contribution to M2 phenotype of monocytic cells in normal conditions and during allergic inflammation. **Plos One**, **8 (12)**: 1-13.

VIELMA, S. A.; KLEIN, R. L.; LEVINGSTON, C. A.; YOUNG, M. R. I. 2013. Adipocytes as immune regulatory cells. **International Immunopharmacology**, **16**: 224–231.

VRIES, A.; HAZLEWOODZ, LFITCH, P. M.; SECKLW, J. R.; FOSTERZ, P.; HOWIE, S. E. M. 2009. High-fat feeding redirects cytokine responses and decreases allergic airway eosinophilia. **Clinical & Experimental Allergy**, **39 (5)**: 731–739.

WANG, B.; WOOD, I. S.; TRAYHURN, P. 2007. Dysregulation of the expression and secretion of inflammation-related adipokines by hypoxia in human adipocytes. **Pflugers Archiv - European Journal of Physiology**, **455 (3)**: 479-492.

WANG, C. Y.; LIAO, J. K. 2012. A Mouse Model of Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance. **Methods Molecular Biology**, **821**: 421–433.

WANG, F.; HE, X. Y.; BAINES, K. J.; GUNAWARDHANA, L. P.; J.L. SIMPSON, J. L.; LI, F.; GIBSON, P. G. 2011. Different inflammatory phenotypes in adults and children with acute asthma. **European Respiratory Journal**, **38 (3)**: 567–574.

WANG, Y. H.; VOO, K. S.; LIU, B.; CHEN, C. Y.; UYGUNGIL, B.; SPOEDE, W.; BERNSTEIN, J. A.; HUSTON, D. P. LIU, Y. J. 2010. A novel subset of CD4⁺ Th2 memory/effector cells that produce inflammatory IL-17 cytokine and promote the exacerbation of chronic allergic asthma. **Journal Experimental Medicine**, **207 (11)**: 2479-2491.

WANG, J. X.; KAIEDA, S.; AMERIA, S.; FISHGAL, N.; DWYER, D.; DELLINGER, A.; KEPLEY, C. L.; GURISH, M. F.; NIGROVICA, P. A. 2014. IL-33/ST2 axis promotes mast cell survival via BCLXL. **PNAS**, **111 (28)**: 10281–10286.

WANG, Y.H.; ANGKASEKWINAI, P.; LU, N.; VOO, K.S.; ARIMA, K.; HANABUCHI, S.; HIPPE, A.; CORRIGAN, C. J.; DONG, C.; HOMEY, B.; YAO, Z.; SUN, Y.; HUSTON, D.P.; LIU, Y.J. 2007. IL-25 augments type 2 immune responses by enhancing the expansion and functions of TSLP-DC – activated Th2 memory cells. **The Journal of Experimental Medicine**, **204 (8)**: 1837-1847.

WEISBERG, S. P.; MCCANN, D.; DESAI, M.; ROSENBAUM, M.; LEIBEL, R. L.; FERRANTE, A. W. JR. 2003. Obesity is associated with macrophage Accumulation in adipose tissue. **The Journal of Clinical Investigation**, **112 (12)**: 1796-1808.

WENZEL, S. E. 2012. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. **Nature Medicine**, **18 (5)**: 716-725.

WHITEHEAD, G. S.; WALKER, J. K. L.; BERMAN, K. G.; FOSTER, W. M.; DAVID A. SCHWARTZ, D. A. 2003. Allergen-induced airway disease is mouse strain dependent. **American Journal Physiology Lung Cellular Molecular Physiology**, **285 (1)**: 32–42.

WILLIAMS, A. S.; CHEN, L.; KASAHARA, D. I.; SI, H.; WURMBRAND, A. P.; SHORE. S. A. 2013. Obesity and airway responsiveness: Role of TNFR2. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, **26 (4)**: 444-454.

WILLS-KARP, M.; SANTELIZ, J.; KARP, C. L. 2001. The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis; **Nature Immunology Review**, **1 (1)**: 69-75.

WINKLER, C. WITTE, L.; MORAW, N.; FAULENBACH, C.; MÜLLER, M.; OHOLZ, O.; SCHAUMANN, F.; HOHLFELD, J. M. 2014. Impact of endobronchial allergen provocation on macrophage phenotype in asthmatics. **Biomed Central Immunology**, **15 (12)**: 1-11.

WINER, S.; CHAN, Y.; PALTSER, G.; TRUONG, D.; TSUI, H.; BAHRAMI, J.; DORFMAN, R.; WANG, Y.; ZIELENSKI, J.; MASTRONARDI, F.; MAEZAWA, Y.; DRUCKER, D. J ENGLEMAN, E.; WINER, D.; DOSCH, M. H. 2009. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. **Nature Medicine**, **15 (8)**: 921-930.

WOLF, A. M.; WOLF, D.; RUMPOLD, H.; ENRICH, B.; TILG, H. 2004. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **323 (2)**: 630-635.

WOO, H. J.; YOO, W. J.; BAE, C. H.; SONG, S. Y.; KIM, Y. W.; SO-YOUNG PARK, S. Y.; KIM, Y. D. 2010. Leptin up-regulates MUC5B expression in human airway epithelial cells via mitogen-activated protein kinase pathway. **Experimental Lung Research**, **36 (5)**: 262–269.

WOOD, L. G.; BAINES, K. J.; FU, J.; SCOTT, H.A.; GIBSON, PG. 2012. The neutrophilic inflammatory phenotype is associated with systemic inflammation in asthma. **CHEST**, **142 (1)**: 86–93.

WOOD, L.G.; GARG, M.L.; GIBSON, P.G. 2011. A high-fat challenge increases airway inflammation and impairs bronchodilator recovery in asthma. **Journal of Allergy Clinical Immunology**, **127 (5)**:1133-1140.

WOODRUFF, P. G.; MODREK, B.; CHOY, D. F.; JIA, G.; ABBAS, A. R.; ELLWANGER, A.; ARRON, J. R.; KOTH, L. L.; FAHY. J. V. 2009. T-helper Type 2–

driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. **American Journal Respiratory Critical Care Medicine**, **180 (5)**: 388–395.

World Health Organization. Obesity and overweight [on line] acessado em 04 de agosto de 2013. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>

WU, D.; MOLOFSKY, A.B.; LIANG, H.E.; RICARDO-GONZALEZ, R.R.; JOUIHAN, A.A.; BANDO, J.K.; CHAWLA, A.; LOCKSLEY, R.M. 2011. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. **Science**, **332 (6026)**: 243-247.

WU, L. C, ZARRIN A. A. 2014. **Nature Reviews Immunology**, **14(4)**: 247-259.

XIAO, C.; PUDDICOMBE, S. M.; FIELD, S.; HAYWOOD, J.; BROUGHTON-HEAD, V.; PUXEDDU, I.; HAITCHI, H. M.; VERNON-WILSON, E.; DAVID SAMMUT, N. B.; CREMIN, C.; SONES, J.; DJUKANOVI, R.; HOWARTH, P. H.; COLLINS, J. E.; HOLGATE, S. T.; MONK, P.; DAVIES, D. E. 2011. Defective epithelial barrier function in asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, **128 (3)**: 549-556.

XING, W.; AUSTEN, K. F.; GURISH, M. F.; JONES, T. G. 2011. Protease phenotype of constitutive connective tissue and of induced mucosal mast cells in mice is regulated by the tissue. **Proceeding of the Nathional Academy of the United States of America**, **108 (34)**: 14210-14215.

YANG, R.; KUMAR, R. K.; FOSTER, P.S. 2009. Interferon- γ and pulmonary macrophages contribute to the mechanisms underlying prolonged airway hyperresponsiveness. **Clinical & Experimental Allergy**, **40 (1)**: 163–173.

YADAVA, K.; MASSACAND, J.; MOSCONI, I.; NICOD, L. P.; HARRIS, M. L.; B. J. MARSLAND, B. J. 2014. Thymic stromal lymphopietin plays divergent roles in murine models of atopic and nonatopic airway inflammation. **European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, **69 (10)**: 1333-1342.

YAMAGUCHI, N.; KUKITAB, T.; LIB, Y. J.; KAMIOC, N.; FUKUMOTOA, S.; NONAKAA, K.; NINOMIYAD, Y.; HANAZAWAE, S.; YAMASHITA, Y. 2008. Adiponectin inhibits induction of TNF- α /RANKL-stimulated NFATc1 via the AMPK signaling. **FEBS Letters**, **582 (3)**: 451–456.

YASUKAWA, A. M.; HOSOKI, K.; TODA, M.; MIYAKE, Y.; MATSUSHIMA, Y.; MATSUMOTO, T.; BOVEDA-RUIZ, D.; GIL-BERNABE, P.; NAGAO, M.; SUGIMOTO, M.; HIRAGUCHI, Y.; TOKUDA, R.; NAITO, M.; TAKAGI, Y.; D'ALESSANDRO-GABAZZA, C. N.; SUGA, S.; KOBAYASHI, T.; FUJISAWA, T.; TAGUCHI, P.; GABAZZA, E. C. 2013. Eosinophils promote epithelial to mesenchymal transition of bronchial epithelial cells. **Plos One**, **8 (5)**: 1-12.

ZEDAN, M.; ATTIA, G.; ZEDAN, M. M.; OSMAN, A.; ABO-ELKHEIR, N.; MAYSARA, N.; BARAKAT, T.; GAMIL, N. 2013. Clinical asthma phenotypes and therapeutic responses. **ISRN Pediatrics**, **1-7**.

ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, J. M. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, **372 (6505)**: 425-432.

ZHANG, A. J. XTO, K. K. W.; LI, C.; LAU, C. C. Y.; POON, V. K. M.; CHAN, C. C.S.; ZHENG, B. J.; HUNG, I. F. LAM, K. S. L.; XU, A.; YUEN, K. Y. 2013. Leptin mediates the pathogenesis of severe 2009 pandemic influenza a (H1N1) infection associated with cytokine dysregulation in mice with diet-induced obesity. **The Journal of Infectious Diseases**, **207**: 1270–1280.

ZHAO, Y.; JIONG YANG, J.; YA-DONG GAO, Y. D.; GUO, W. 2009. Th17 Immunity in Patients with Allergic Asthma. **International Archives Allergy Immunology** ,**151 (4)**: 297–307.