

**MILENA BAPTISTELLA GROTTA**

**EFEITO DA OBESIDADE NA ATIVIDADE EOSINOFÍLICA  
EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES  
ASMÁTICOS ATÓPICOS**

**CAMPINAS, 2011**



---

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**Faculdade de Ciências Médicas**

**EFEITO DA OBESIDADE NA ATIVIDADE EOSINOFÍLICA  
EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES  
ASMÁTICOS ATÓPICOS**

**MILENA BAPTISTELLA GROTTA**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração em Pediatria, sob orientação da **Prof. Dr. José Dirceu Ribeiro** e co-orientação **Prof. Dr. Edson Antunes**

**CAMPINAS, 2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

G916e Grotta, Milena Baptistella, 1976 -  
Efeito da obesidade na atividade eosinofílica  
em crianças e adolescentes asmáticos atópicos. /  
Milena Baptistela Grotta. -- Campinas, SP : [s.n.],  
2011.

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

1. Quimiotaxia. 2. Adesão celular. 3.  
Obesidade. 4. Asma. I. Ribeiro, José Dirceu. II.  
Antunes, Edson. III. Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV.  
Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Effect of obesity on eosinophil activity in atopic asthmatic children and adolescents

**Palavra-chave em inglês:**

Chemotaxis

Adhesion cell

Obesity

Asthma

**Área de concentração:** Saúde da Criança e do Adolescente

**Titulação:** Doutor em Saúde da Criança e do Adolescente

**Banca examinadora:**

José Dirceu Ribeiro [Orientador]

Dirceu Solé

Paulo Augusto Moreira Camargos

Ilma Aparecida Paschoal

Tatiana Rozov

**Data da defesa:** 21-10-2011

**Programa de Pós-Graduação:** Saúde da Criança e do Adolescente

---

# Banca Examinadora de Tese de Doutorado

---

Aluna Milena Baptistella Grotta Silva

---

**Orientador(a): Prof(a). Dr(a). José Dirceu Ribeiro**

---

## Membros:

Professor Doutor José Dirceu Ribeiro

Professor Doutor Paulo Augusto Moreira Camargos

Professor Doutor Dirceu Solé

Professora Doutora Tatiana Rozov

Professora Doutora Ilma Aparecida Paschoat

Curso de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da  
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

**Data: 21/10/2011**

---

Dedico esta tese a toda a minha família,  
pois acredito que sem o apoio verdadeiro das pessoas queridas,  
todo esse trabalho não seria possível:

Aos Meus pais, Warley e Sonia que  
me deram a oportunidade de seguir carreira nos estudos,  
sempre procurando a melhor educação possível sem medir esforços,  
e aos meus irmãos Warley, Ellen e Fernanda que  
aliados ao carinho, compreensão, apoio e incentivos no dia-a-dia,  
permitiram que eu atingisse mais esta vitória em minha vida.

Ao meu marido Henrique,  
que mais do que companheiro é o meu maior incentivador, oferecendo-me todo o  
auxílio, tanto finalizando as figuras e gráficos desta pesquisa,  
quanto distraindo nosso filho nas minhas horas de estudo e, ainda,  
vibrando comigo a cada nova conquista.

Ao meu filho André,  
razão pela descoberta do amor incondicional,  
pela compreensão da ausência da mãe em alguns momentos.

E ao meu querido mestre e amigo, Prof Dr José Dirceu Ribeiro,  
que me acompanha há 10 anos, responsável por toda minha formação como  
pediatra, pneumologista e pós-graduanda.

## AGRADECIMENTOS

---

Essa pesquisa me fez criar grandes laços de amizade que, com certeza, permanecerão para sempre, especialmente com os pesquisadores do laboratório de farmacologia onde realizei os experimentos:

Ao Prof Dr Edson Antunes, chefe do laboratório de farmacologia, que me abriu as portas para a pesquisa experimental. Seus sábios conselhos, sua atenção e dedicação me fizeram mergulhar em um mundo antes desconhecido.

À Dalize Squebola, enfermeira que me ensinou todas as etapas *in vitro*, desde o isolamento de eosinófilos até os ensaios de adesão e quimiotaxia. A sua paciência, compreensão, dedicação e apoio ficarão marcados para sempre na minha memória.

A todos os meus amigos-pesquisadores que de uma forma direta ou indireta me auxiliaram no laboratório: Gláucia, Rafael, Lineu, Marina, Nadia, Leticia, Priscila e Camila.

À Cláudia, funcionária do laboratório de Patologia Clínica, que sempre recebia os exames para análise cordialmente e, quando necessário até coletava o sangue das crianças, cuja alegria contagiante fez nascer uma amizade espontânea.

Às amigas Maria Angela Ribeiro, fisioterapeuta e Silvana, enfermeira do LAFIP (CIPED) que me auxiliaram na realização da coleta de sangue e exames de espirometria dos pacientes.

À Prof Dra Adyléia Dalbo C Toro, minha amiga, incentivadora e protetora que me ajudou a divulgar a pesquisa para seleção dos pacientes.

À Prof Dra Silvia Mazon, patologista clínica que, com todo o seu carinho e atenção, me orientou para realização dos experimentos para dosagem da leptina e adiponectina séricas

**No pódio do primeiro lugar, eu quero agradecer o meu admirável mestre, Prof Dr José Dirceu Ribeiro, a quem eu devo todo o meu saber científico tanto clínico quanto como pesquisadora. É inegável a sua educação, dedicação, sabedoria, carinho, inventivo, apoio, entusiasmo e alegria. É difícil agradecer em poucas palavras uma pessoa de tamanha importância para a minha vida profissional e pessoal. Exemplo de amigo, pediatra, professor e pesquisador a quem tenho a honra de conviver desde o início da minha formação como pediatra. A minha eterna gratidão e admiração!**

E, aos pais e pacientes, que de forma altruísta, aceitaram participar dessa pesquisa, pela confiança depositada em nosso trabalho. Vocês, com certeza, são as peças fundamentais dessa pesquisa.



# RESUMO

**Introdução:** A prevalência da obesidade e da asma tem aumentado muito durante as últimas décadas. Investigações atuais sugerem que a obesidade está associada à asma em numerosos estudos. Os mecanismos pelos quais a obesidade interfere nos sintomas da asma ainda são controversos.

**Objetivo:** avaliar o efeito da obesidade na atividade eosinofílica através da quimiotaxia e adesão em crianças e adolescentes asmáticos e não asmáticos em associação a dosagem das adipocinas séricas. **Método:** Incluídos 32 asmáticos

obesos (AO) e não obesos (ANO), 5 não asmáticos obesos (NAO) e 5 não asmáticos não obesos (NANO). Colhido sangue periférico para isolamento de eosinófilos através do gradiente de Percoll seguido de separação imunomagnética. Para quimiotaxia utilizada câmara de microquimiotaxia com 48 poços em triplicata com MEM (espontânea), eotaxina, PAF (fator de ativação plaquetária) e RANTES (*regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*). Leitura através de filtro com contagem em microscópio óptico.

A adesão foi realizada com placas de fibronectina em triplicata com MEM e eotaxina. Leitura através da absorbância das amostras desconhecidas com as da curva padrão de células. Feito dosagem de leptina e adiponectina por ELISA.

**Resultado:** A quimiotaxia espontânea foi maior entre os AO e ANO ( $p=0,02$ ) e entre os AO e NANO ( $p=0,03$ ). Com eotaxina houve aumento para o grupo AO em relação aos ANO e aos NANO, e do grupo dos NAO em relação aos ANO e NANO ( $p<0,0001$ ). Para o PAF, o grupo AO mostrou-se maior do que NANO ( $p=0,02$ ). O RANTES apresentou significância entre os NAO em relação aos ANO e NANO ( $p=0,01$ ). Na adesão espontânea dos eosinófilos a fibronectina, não foi encontrado relevância entre os grupos. Com eotaxina, houve maior adesão para os AO em relação aos NANO ( $p=0,04$ ). Maior concentração de leptina no grupo dos AO e NAO ( $p=0,0001$ ). Não foi encontrado diferença entre os grupos para adiponectina total. **Conclusão:** Este é o primeiro estudo a demonstrar uma maior atividade eosinofílica (quimiotaxia e adesão) em crianças e adolescentes obesos asmáticos atópicos em relação aos não obesos e aos voluntários saudáveis com associação ao aumento de leptina sérica.

**Palavras-chave:** quimiotaxia, adesão, obesidade e asma.



# **ABSTRACT**

**Background:** The prevalence of obesity and asthma has increased over the past several decades. Recent investigations suggest relationship between asthma and obesity in many studies, but the mechanisms are unclear. The aim of this study was evaluate the obesity effect in eosinophil activity by chemotaxis and adhesion in asthmatic and non-asthmatic children and adolescents in association with serum adipokines measurement **Method:** 32 asthmatic obese (AO) and asthmatic non obese (ANO), 5 non asthmatic obese (NAO) and 5 non asthmatic non obese (NANO) were included. Peripheral blood was collected and eosinophils were purified using a Percoll gradient followed by immunomagnetic cell separator. Chemotaxis was performed with microchemotaxis chamber in triplicate with MEM (spontaneous), eotaxin, PAF (platelet-activating factor) and RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted). The measurement was done by optical microscope count. The adhesion was performed by fibronectin plates in triplicate with MEM and eotaxin. Eosinophilic adhesion was calculated by comparison between absorbance of unknown samples with the standard curve. Leptin and adiponectin were quantified by ELISA. **Results:** spontaneous chemotaxis was higher between AO and ANO ( $p=0.02$ ) and between AO and NANO ( $p=0.03$ ).With eotaxin, the increased was between AO and ANO and between AO and NANO, and between ANO and NANO ( $p<0.0001$ ).With PAF, AO was higher than NANO ( $p=0.02$ ). RANTES was increased among NAO and ANO and NANO ( $p=0.01$ ). In spontaneous adhesion, there was no difference between groups. With eotaxin, the adhesion was higher between AO and NANO ( $p=0.04$ ). Leptin was higher in AO and NAO than the others ( $p=0.0001$ ). There was no difference among groups for total adiponectin. **Conclusion:** This is the first study that showed higher eosinophilic activity (chemotaxis and adhesion) in atopic obese asthmatic children and adolescents in relationship to asthmatic non obese and healthy volunteers.

**Key words:** chemotaxis, adhesion, obesity and asthma.

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>AdipoR1</b>	Receptor da adiponectina 1
<b>AdipoR2</b>	Receptor da adiponectina 2
<b>ANO</b>	Asmático não obeso
<b>ANOVA</b>	Teste estatístico para 2 ou mais variáveis
<b>AO</b>	Asmático obeso
<b>CCR3</b>	Receptor para as quimocinas da classe CC
<b>CD 16</b>	Anticorpos monoclonais marcadores dos linfócitos
<b>CO<sub>2</sub></b>	Gás carbônico
<b>Co</b>	<i>Coporation</i> (corporação)
<b>CVF</b>	Capacidade vital forçada
<b>DP</b>	Desvio padrão
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino
<b>ELISA</b>	Ensaio de imunoadsorção ligado à enzima
<b>EPO</b>	Óxido peroxidase
<b>g</b>	Gramas
<b>G</b>	Unidade de rotação da centrífuga
<b>g/dl</b>	Unidade grama por decilitro

<b>GINA</b>	Iniciativa Global para asma
<b>GM-CSF</b>	Fator de crescimento de granulócitos
<b>HANKS</b>	Solução tampão
<b>HC</b>	Hospital de Clínicas
<b>HDL</b>	<i>High density level</i>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Símbolo químico da água
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Água oxigenada
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Ácido sulfúrico
<b>HRB</b>	Hiper reatividade brônquica
<b>IC</b>	Intervalo de confiança
<b>ICAM-1</b>	Molécula de adesão intercelular
<b>IgE</b>	Imunoglobulina E
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IMC</b>	Índice de massa corpórea
<b>ISAAC</b>	<i>International Study of Asthma and Allergies in Childhood</i>
<b>Kd</b>	Kilodaltons
<b>Kg</b>	Kilograma
<b>KHCO<sub>3</sub></b>	Carbonato de potássio
<b>LDL</b>	<i>Low density level</i>

<b>LepRa</b>	Receptor de leptina forma longa
<b>LepRb</b>	Receptor de leptina forma curta
<b>M</b>	Mol
<b>MCP-1</b>	Proteínas quimioatraentes dos monócitos 1
<b>MEM</b>	<i>Minimum essential médium</i> (meio para controle)
<b>Min</b>	Minutos
<b>ml</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MAC-1</b>	Moléculas de ativação armazenadas em grânulos de granulócitos
<b>NANO</b>	Não asmático não obeso
<b>NAO</b>	Não asmático obeso
<b>NCHS</b>	<i>National Center for Health Statistics</i>
<b>NF-kB</b>	Fator nuclear Kappa B
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	Cloreto de amônia
<b>NHANES III</b>	<i>National Health and Nutrition Examination Survey III</i>
<b>Nm</b>	Nanômetro
<b>NSHG</b>	<i>National Study of Health and Growth</i>
<b>OR</b>	<i>Odds ratio</i> (razão de chances)
<b>PAF</b>	Fator de ativação plaquetária

<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino
<b>PBS/BSA</b>	Tampão fosfato salino com albumina sérica bovina
<b>PCR</b>	Proteína C reativa
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>RANTES</b>	<i>Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i>
<b>RR</b>	Risco relativo
<b>Th1</b>	Linfócito T auxiliar do tipo 1
<b>Th2</b>	Linfócito T auxiliar do tipo 2
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>VCAM-1</b>	Molécula de adesão vascular
<b>VEF1</b>	Volume expiratório forçado no primeiro segundo
<b>VEF1/CVF</b>	Índice de volume expiratório forçado no primeiro segundo/capacidade vital forçada
<b>VLA-4</b>	<i>Very late antigen 4</i> (integrina que se liga a fibronectina)
<b>VLDL</b>	<i>Very low density level</i>

## LISTA DE TABELAS

---

	<b>Pág.</b>
<b>Tabela 1-</b> Fenótipos clínicos da asma e mecanismos fisiopatológicos associados.....	26
<b>Tabela 2-</b> Características dos sujeitos.....	56

## LISTA DE FIGURAS

---

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1-</b> A heterogeneidade da asma.....	36
<b>Figura 2-</b> Modelo fisiopatológico da asma nos obesos.....	39

## LISTA DE QUADRO

---

	<b>Pág.</b>
<b>Quadro 1-</b> Classificação de gravidade da asma.....	46

	Pág.
<b>Gráfico 1-</b> Comparação da quimiotaxia espontânea de eosinófilos entre pacientes asmáticos obesos, asmáticos não obesos, não asmáticos obesos e voluntários saudáveis.....	57
<b>Gráfico 2-</b> Comparação da quimiotaxia de eosinófilos estimulados com eotaxina entre pacientes asmáticos obesos, asmáticos não obesos, não asmáticos obesos e voluntários saudáveis.....	58
<b>Gráfico 3-</b> Comparação da quimiotaxia de eosinófilos estimulados com PAF entre pacientes asmáticos obesos, asmáticos não obesos, não asmáticos obesos e voluntários saudáveis.....	59
<b>Gráfico 4-</b> Comparação da quimiotaxia de eosinófilos estimulados com RANTES entre pacientes asmáticos obesos, asmáticos não obesos, não asmáticos obesos e voluntários saudáveis.....	60
<b>Gráfico 5-</b> Adesão espontânea de eosinófilos humanos à fibronectina <i>in vitro</i> entre pacientes asmáticos obesos, asmáticos não obesos, não asmáticos obesos e não asmáticos não obesos.....	61
<b>Gráfico 6-</b> Adesão de eosinófilos humanos à fibronectina estimulados com eotaxina <i>in vitro</i> de pacientes asmáticos obesos, asmáticos não obesos, não asmáticos obesos e não asmáticos não obesos.....	62

<b>Gráfico 7-</b> Dosagem sérica de leptina pelo método de ELISA de pacientes asmáticos obesos, asmáticos não obesos, não asmáticos obesos e não asmáticos não obesos.....	63
<b>Gráfico 8-</b> Dosagem sérica de adiponectina pelo método de ELISA de pacientes asmáticos obesos, asmáticos não obesos, não asmáticos obesos e não asmáticos não obesos.....	64

	<b>Pág.</b>
<b>RESUMO</b> .....	vii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>1.1- Obesidade</b> .....	23
<b>1.2- Asma</b> .....	24
<b>1.3- Associação asma e obesidade - revisão bibliográfica</b> .....	27
<b>1.4- Mecanismos inflamatórios da obesidade na asma</b> .....	31
1.4.1- Adipocinas.....	32
1.4.1.1- Leptina.....	32
1.4.1.2- Adiponectina.....	34
<b>1.5- Inflamação da asma nos obesos</b> .....	35
<b>1.6- Modelo fisiopatológico da relação asma-obesidade</b> .....	38
<b>2- JUSTIFICATIVA</b> .....	40
<b>3- OBJETIVOS</b> .....	43
<b>3.1- Objetivo geral</b> .....	44
<b>3.2- Objetivos específicos</b> .....	44

<b>4- MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
<b>4.1- Isolamento de eosinófilos.....</b>	<b>48</b>
<b>4.2- Separação imunomagnética dos eosinófilos.....</b>	<b>48</b>
<b>4.3- Quimiotaxia de eosinófilos.....</b>	<b>49</b>
<b>4.4- Adesão dos eosinófilos a fibronectina.....</b>	<b>49</b>
<b>4.5- Dosagem de leptina e adiponectina.....</b>	<b>50</b>
<b>5- ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>52</b>
<b>6- RESULTADOS.....</b>	<b>54</b>
<b>6.1- Características dos sujeitos.....</b>	<b>55</b>
<b>6.2- Quimiotaxia dos eosinófilos.....</b>	<b>57</b>
<b>6.3- Adesão dos eosinófilos.....</b>	<b>61</b>
<b>6.4- Níveis séricos de adipocinas.....</b>	<b>63</b>
<b>7- DISCUSSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>8- CONCLUSÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>73</b>
<b>10- ANEXOS.....</b>	<b>81</b>
<b>11- APÊNDICES.....</b>	<b>89</b>



# 1- INTRODUÇÃO

## 1.1- Obesidade

Globalmente há uma epidemia de obesos com mais de 1,6 bilhão de sobrepesos no mundo, dos quais 400 milhões são adultos obesos. A Organização Mundial de Saúde acredita que 10% da população mundial será obesa em 2015<sup>1</sup>.

A obesidade é também um problema de saúde pública em crianças. Nos Estados Unidos da América (EUA) há 22 milhões de sobrepesos abaixo de 5 anos de idade, e desde 1980, o número de sobrepesos infantis vem dobrando enquanto o número de adolescentes sobrepesos está mais que triplicando<sup>2</sup>.

A prevalência da obesidade nos países europeus tem triplicado nas últimas duas décadas, com aumento significativo nos custos para a economia e para a saúde. No Reino Unido, a obesidade contribui com 30.000 mortes por ano e 5,4 bilhões de dólares com gastos em saúde. Nos EUA, os custos anuais com cuidados em saúde são 36% maiores para os pacientes obesos em comparação com os pacientes com índice de massa corporal (IMC) normal<sup>3</sup>.

No Brasil, assim como em diversos países em desenvolvimento, ocorreu o processo de transição nutricional consistente na redução da desnutrição infantil e no aumento da prevalência do sobrepeso e obesidade<sup>4</sup>.

A prevalência da obesidade no Brasil varia de acordo com a região do país. Segundo Abrantes et al., a prevalência de obesidade é de 8,2% em crianças e 6,6% em adolescentes na região nordeste e 11,9% para crianças e 8,4% para adolescentes na região sudeste<sup>4</sup>.

Evidências epidemiológicas apoiam a teoria de que a relação entre obesidade e risco de desenvolvimento de doenças inicia-se precocemente na vida. Sabe-se que quando o sobrepeso começa na infância aumentam três vezes as probabilidades de obesidade na vida adulta, em comparação com as crianças de peso corporal normal<sup>4</sup>.

O aumento da morbidade e mortalidade associado com a obesidade é relacionado com numerosas condições crônicas, incluindo doenças cardiovasculares e metabólicas, estados de hipercoagulação, osteoartrites e câncer. É também fortemente relacionada com sintomas respiratórios incluindo dispnéia, síndrome da apnéia obstrutiva do sono, síndrome de hipoventilação da obesidade, doença pulmonar obstrutiva crônica, embolia pulmonar e asma<sup>3</sup>.

## 1.2- Asma

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, na qual, muitas células e elementos celulares estão envolvidos. A inflamação crônica associada à hiperresponsividade brônquica leva a episódios recorrentes de chiado, falta de ar, aperto no peito e tosse, particularmente à noite e ao despertar. Esses episódios são associados com obstrução ao fluxo aéreo variável com reversibilidade espontânea ou com tratamento<sup>5</sup>.

A prevalência da asma está aumentando globalmente em crianças e adultos nas últimas duas décadas. É a condição crônica mais comum em crianças e adolescentes afetando 10% destes abaixo de 14 anos e 300 milhões de pessoas no mundo<sup>6</sup>.

Acredita-se que a prevalência da asma seja de 1 a 18% da população em diferentes países apesar da dificuldade de padronização dos métodos nos vários estudos realizados ao redor do mundo<sup>5</sup>.

A asma acomete uma a cada três crianças no mundo e o Brasil é considerado o oitavo país mais prevalente<sup>7</sup>.

De acordo com o grupo brasileiro do ISAAC (*International Study of Asthma and Allergies in Childhood*), as prevalências médias de asma entre os escolares foram: 24,3% para asma ativa, com valores mais elevados em São Paulo; asma grave, 6,1%, com os valores mais elevados em São Paulo e Natal; asma diagnosticada por médico, 10,3% (Manaus e Natal)<sup>8</sup>.

Entre os adolescentes, as prevalências médias foram: asma ativa, 19,0%, com valores mais elevados em Salvador e Vitória da Conquista; asma grave, 4,7%, com valores mais elevados em Vitória da Conquista e Aracaju; asma diagnosticada por médico, 13,6% (Belém, Porto Alegre e Caruaru)<sup>8</sup>.

A asma causa grandes gastos, aproximadamente 10 bilhões de dólares por ano, particularmente em crianças pequenas pela necessidade de uso de serviços de emergências, hospitalizações e medicações. Absenteísmo escolar e perda de dias de trabalho são consequências sociais e econômicas causadas pela asma<sup>9</sup>.

O motivo que explique o aumento da prevalência da asma nos últimos trinta anos é incerto. Várias hipóteses tentam elucidar esse fenômeno. Acredita-se na mudança do estilo de vida, a hipótese da higiene, uso rotineiro de vacinas, exposição maior aos aeroalérgenos, a poluição doméstica e atmosférica<sup>8</sup>.

Segundo dados do ISAAC - grupo brasileiro, os níveis mais elevados de prevalência foram observados nos centros próximos à linha do Equador. Não se documentou relação entre exposição à poluição atmosférica, exposição precoce a infecções respiratórias e gastrointestinais e a prevalência de asma. Tais dados colocam em cheque a validade da hipótese da higiene para a América Latina como um todo<sup>10</sup>.

A asma é uma doença complexa causada por múltiplos fatores ambientais em combinação com mais de 100 genes dominantes e não dominantes suscetíveis correlacionados com várias formas ou fenótipos (Tabela 1). Esses fenótipos incluem asma alérgica, asma grave resistente a corticoides e asma induzida por cigarros, poluição, aspirina, exercícios e o novo fenótipo-obesidade<sup>11</sup>.

Esses diferentes fenótipos coexistem e podem agir com sinergismo nos pacientes, embora mecanismos patogênicos distintos sejam propostos para cada fenótipo diferente<sup>11</sup>.

Segundo Lessard et al., a obesidade pode ser considerada um novo fenótipo da asma. Neste estudo, os obesos relataram maior limitação de atividade física, falta de ar e chiado do que os não obesos traduzindo piora do controle dos sintomas e da gravidade da asma, além da redução da resposta ao tratamento padrão e diminuição da função pulmonar em relação aos não obesos<sup>12</sup>.

**Tabela 1-** Fenótipos clínicos da asma e mecanismos fisiopatológicos associados

<b>Fenótipos clínicos da Asma</b>	<b>Recrutamento de células Th2</b>	<b>Mecanismos ou células efetoras</b>
Alérgica	Sim	IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-25, IL-33, IL-17? CD4 <sup>+</sup> , CD8, eosinófilos, mastócitos, basófilos, células Natural Killer
Infecção viral	Não	IL-13?(citocinas Th2?), macrófagos alveolares, células NK (imunidade inata)
Poluição, cigarros, partículas de diesel, fumaça	Não	IL-17, estresse oxidativo, partículas pequenas, neutrófilos, células NK
Aspirina	Não	Leucotrienos, perda da PG-E2
Obesidade	Sim/não?	Estresse oxidativo, PCR, TNF-alfa, adipocinas??
Resistência aos esteróides	Não	IL-17, neutrófilos, células NK?
Ar frio, exercício	Não	Mudança na osmolaridade da mucosa, citocinas?
Intrínseca	?	Irritabilidade do músculo liso?

Adaptado de Nature Immunology 2010; 11:577-84

### 1.3- Associação asma e obesidade - revisão bibliográfica

A prevalência da obesidade e da asma tem aumentado muito durante as últimas décadas em todo o mundo<sup>13-15</sup>. Cada vez mais as investigações sugerem que a obesidade está associada à asma em diferentes modelos de estudos.

Em modelos transversais encontramos associação positiva em vários estudos:

Von Mutius et al., a partir dos dados de *National Health and Nutrition Examination Survey III* (NHANES III) avaliou a relação do IMC com a asma e atopia numa amostra de crianças americanas de 7 a 14 anos. Verificou-se que a prevalência da asma e da atopia aumenta significativamente em relação ao aumento do índice de massa corporal (IMC), não havendo diferença por gênero e/ou etnia. Os autores concluíram que o IMC pode ser um fator de risco para o desenvolvimento da asma<sup>13</sup>.

Através do programa *National Study of Health and Growth* (NSHG), Figueroa-Muñoz et al., analisaram 14.908 crianças de 4 a 11 anos por questionário padronizado. Concluíram que a obesidade está associada à asma independente da etnia com associação mais forte nas meninas do que nos meninos<sup>14</sup>.

Schachter et al., em estudo epidemiológico, incluíram 5993 crianças caucasianas de 7 a 12 anos de idade após realização de medidas de peso, altura, testes alérgicos para aeroalérgenos comuns e medidas de hiperresponsividade brônquica por inalação com histamina. História de diagnóstico médico de asma, chiado, tosse e uso de medicações foram obtidos por questionário. Após ajuste para sexo, idade, história familiar de atopia e de fumantes, encontraram IMC como um fator de risco para chiado e tosse, mas não para hiperresponsividade brônquica. Somente para as meninas, o IMC foi associado a atopia<sup>15</sup>.

Van Gent et al., (2007) selecionaram 1758 crianças de 7 a 10 anos em quatro grupos: asmáticos obesos e não obesos, saudáveis obesos e não obesos para avaliação da qualidade de vida através de questionário padronizado para asma em pediatria. Comparados com os saudáveis, o *score* diminuiu 25% em crianças com asma e obesidade, 14 % em crianças com asma e IMC normal e apenas 1% nos saudáveis obesos. Concluíram que o ganho de peso excessivo é associado à diminuição da qualidade de vida em crianças asmáticas<sup>16</sup>.

No estudo ISAAC - grupo chinês, Chu et al., incluíram 170.457 estudantes. Utilizando seleção randomizada, 14.654 foram selecionados e completaram os testes de função pulmonar. Concluído após análise dos fatores de risco para asma (atopia, IMC, ser fumante ativo ou passivo e atividade física) que o IMC extremo é associado ao aumento da prevalência da asma e prejuízo da função pulmonar com diminuição de VEF1/CVF em crianças na idade escolar<sup>17</sup>.

Em modelos com grupo controle, dois estudos encontraram associação positiva e dois não identificaram diferenças na prevalência de obesidade em asmáticos:

Luder et al., conduziram um estudo com 209 crianças e adolescentes hispânicas e/ou negras de 2 a 18 anos de idade avaliando se o ganho ponderal de asmáticos diferia dos não asmáticos e se este ganho se associava ao aumento dos sintomas da asma. Concluíram que houve associação significativa entre a gravidade da asma e o risco de sobrepeso. O grupo caso apresentou risco relativo de 1,34 de terem IMC  $\geq 85$  quando comparados ao grupo-controle. As crianças com asma moderada/grave e IMC elevado estavam associadas à diminuição da função pulmonar e ao maior uso de medicações para controle da asma<sup>18</sup>.

Selecionadas 457 crianças de 12 anos participantes da fase 2 do estudo ISAAC para avaliação da relação entre o IMC com sintomas da asma e manifestações atópicas. O grupo-caso era composto por 161 crianças e o grupo-controle por 296. Mai et al., encontraram associação entre o IMC elevado com episódios atuais de sibilância (OR=1,7). IMC  $\geq 75$  associou-se à gravidade da

asma, aos episódios de sibilância nos últimos 12 meses e à presença de eczema atópico nas crianças do grupo-caso<sup>19</sup>.

Em um estudo italiano envolvendo 554 crianças asmáticas (caso) e 625 crianças saudáveis (controle) avaliou-se o desvio padrão (DP) do IMC considerando sobrepeso/obesidade  $IMC \geq 2 DP$ . Não foi encontrado aumento na prevalência de sobrepeso/obesidade em crianças e adolescentes com asma. Observou-se ainda que, crianças e adolescentes com infecção respiratória de repetição sem uso de corticóide inalatório apresentavam  $IMC \leq 2 DP$ <sup>20</sup>.

Brener et al., avaliaram 265 adolescentes asmáticos obesos com idades entre 12 e 21 anos e um grupo-controle com 482 asmáticos na mesma faixa etária. Foi comparada a prevalência da obesidade e sua associação com a classificação de gravidade da asma. Concluíram que não houve diferença na prevalência da obesidade e não houve associação com a gravidade da asma (21% asma moderada/grave, 19% asma leve e 17% controles)<sup>21</sup>.

Em coortes prospectivas, podemos citar dois estudos:

- Oddy et al., investigaram a relação do aleitamento materno com a asma e a influência do IMC para o risco de desenvolvimento de asma. Foram avaliadas 2.165 crianças sendo realizado teste alérgico em 1.596. Confirmado diagnóstico de asma em 17% das crianças. A correlação do IMC com a asma foi significativa somente em meninos. Em relação ao aleitamento materno, quando exclusivo, reduz em 4% o risco de desenvolvimento da asma sendo, portanto, fator protetor<sup>22</sup>.
- Através da coorte KOALA, Eijkemans et al., incluíram 305 crianças acompanhadas desde o nascimento. Informações sobre chiado foram adquiridas através de questionários preenchidos pelos pais nas idades de 7 meses, 1, 2 e 4 a 5 anos correlacionadas com atividade física e IMC. Não encontraram diferenças em relação à atividade física entre as crianças que apresentaram chiado e as que nunca tinham apresentado chiado nos últimos anos<sup>23</sup>.

Estudos de metanálises mostraram forte evidência de que obesidade aumenta o risco de desenvolver asma:

Flaherman & Rutherford incluíram estudos de coorte que avaliaram alto peso ao nascer ou durante a infância e risco futuro de asma. Encontraram risco relativo aumentado de desenvolver asma em relação à obesidade na infância (RR=1,5;IC 95%) e em relação ao alto peso ao nascer (RR=1,2;IC 95%). Porém, os autores discutem as limitações desse estudo como critérios diagnósticos das doenças atópicas, muitas vezes relatadas pelos indivíduos e não diagnosticadas por médicos, a falta de relatos de exposição ao tabagismo e de antecedentes familiares de asma ou atopia<sup>24</sup>.

Beuther & Sutherland avaliaram o IMC e a incidência de asma em adultos através de estudos epidemiológicos prospectivos. Verificaram que o elevado IMC tem efeito dose-resposta na incidência da asma. O OR (*odds ratio*) foi de 1,38 (IC95%, 1,17-1,62) para incidência de asma para peso normal em relação ao sobrepeso e foi mais elevado para peso normal em relação a obesidade (OR 1,92; IC95%, 1,43-2,59,  $p < 0,0001$ ). Concluíram que o sobrepeso e obesidade estão associados com aumentado dose-dependente no OR da incidência de asma em homens e mulheres<sup>25</sup>.

Em revisões sistemáticas são relatados que a obesidade é um fator de risco para asma, porém os fatores causais entre essas duas condições são pouco conhecidos. Discutem-se fatores mecânicos, alterações inflamatórias e imunes presentes na asma e na obesidade.

Dixon et al., foram relatores de um workshop sobre obesidade e asma com o objetivo de reunir os especialistas sobre os dois assuntos para melhor entendimento da associação entre elas e definir direções futuras para pesquisas. Os principais resultados encontrados nos estudos foram que a obesidade é um fator de risco para asma em todos os grupos de estudos demográficos, a asma nos obesos pode representar um fenótipo único, com maior gravidade da doença e pior resposta a terapia convencional. Há uma necessidade urgente de

pesquisas para melhor entendimento dos mecanismos da asma na obesidade e para o desenvolvimento de terapias específicas para esta população de pacientes<sup>26</sup>.

O objetivo dessa revisão sistemática, segundo Noal et al., foi investigar a relação entre o estado nutricional de crianças e a incidência ou persistência da asma durante a adolescência. A pesquisa sistêmica encontrou 1563 artigos sendo selecionados 10 após inspeção criteriosa. Destes, oito mostraram associação positiva entre sobrepeso/obesidade e asma. Dos quais, dois foram independentes do sexo, três encontraram essa relação apenas no sexo masculino e outros três apenas no sexo feminino. Concluíram que há forte evidência de que a obesidade precede e está associada com a persistência e intensidade dos sintomas da asma, embora o papel do sexo não esteja bem esclarecido<sup>27</sup>.

#### **1.4- Mecanismos inflamatórios da obesidade na asma**

O maior desafio é entender a relação natural entre a asma e a obesidade. Os mecanismos pelos quais a obesidade interfere nos sintomas da asma ainda são controversos<sup>28</sup>.

A asma pode estar presente nos obesos devido à influência do estado inflamatório desencadeado pela obesidade através de liberação de interleucinas, quimiocinas e citocinas pelos adipócitos<sup>28</sup>.

O tecido adiposo era considerado inerte para estoque de energia, mas atualmente tem sido reconhecido como um dos responsáveis pela regulação dos processos fisiopatológicos incluindo a modulação da resposta inflamatória e imune<sup>28</sup>.

Os adipócitos produzem e liberam uma variedade de fatores pró e antiinflamatórios, incluindo as adipocinas leptina, adiponectina, resistina, adipina e visfatina, além de citocinas e quimiocinas como fator de necrose tumoral

(TNF- $\alpha$ ), interleucina (IL) 6, IL-1b, proteína C reativa e proteínas quimioatraentes dos monócitos (MCP-1), responsáveis por aumentar a resposta inflamatória local e sistêmica<sup>28,29,30</sup>.

#### 1.4.1- Adipocinas

O tecido adiposo funciona, então, como um órgão endócrino pela elaboração das adipocinas, isto é, hormônios derivados dos adipócitos que são estruturalmente similares as citocinas. As mais estudadas até o momento são: leptina e adiponectina<sup>30</sup>.

##### 1.4.1.1- Leptina

A leptina é uma proteína com 16Kd, tendo o adipócito como sua maior fonte<sup>28</sup>, portanto os seus níveis séricos estão diretamente relacionados com a quantidade de massa adiposa<sup>28,31</sup>.

Originalmente, a leptina foi descrita como o hormônio da saciedade que informa o hospedeiro sobre o estoque de energia e estimula o metabolismo<sup>30</sup>. Interessantemente, em estudos feitos com crianças obesas comparando com crianças não obesas com a mesma faixa etária e sexo, os níveis de leptina estão consistentemente aumentados com correlação ao IMC, provavelmente pela insensibilidade a leptina endógena<sup>31</sup>.

As formas longas (LepRb) e curtas (LepRa) dos receptores da leptina são expressados pelas células brônquicas e alveolares e pelos macrófagos alveolares. Outras células do sistema imune, como os monócitos, neutrófilos, células dendríticas, linfócitos B e T, células *Natural Killer* também expressam esses receptores<sup>32</sup>.

A leptina está sendo descrita como pró-inflamatória<sup>30</sup>. Está associada com a regulação da fagocitose dos macrófagos, produção de citocinas pró-inflamatórias e estimulação da produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12 que também

estão aumentados na asma<sup>28,33</sup>. Estima-se que 25% da IL-6 liberada na circulação seja produzida pelos adipócitos<sup>28</sup>.

A leptina protege os linfócitos T da apoptose e regula a proliferação e ativação das células T. Também influencia a produção de citocinas pelos linfócitos T, geralmente desviando para a resposta Th1<sup>28</sup>. Além de, aumentar a expressão de adesão molecular em células epiteliais<sup>34</sup>.

Estudos em humanos são inconclusivos em confirmar a associação entre os níveis de leptina e o risco para asma<sup>35</sup>. Um grande estudo populacional nos EUA encontrou associação positiva entre altos níveis de leptina e risco para asma em mulheres (OR de 3,2, 95% IC - 1,3 - 7,7)<sup>36</sup>. Porém, outro grande estudo com modelo caso-controle através da coorte *Finnish* não encontrou associação independente entre asma e os níveis de leptina nas idades de 3 a 18 anos e 9 a 24 anos, mas encontrou altos níveis de leptina em adultos asmáticos obesos comparados aos não obesos asmáticos<sup>37</sup>.

Em crianças, estudos transversais mostraram associação positiva entre níveis altos de leptina em asmáticas com peso adequado em relação às crianças saudáveis<sup>33,38</sup>. Análise de regressão múltipla indicou que tanto a asma quanto o IMC são preditores dos níveis de leptina em crianças<sup>33</sup>.

Mai et al., após 12 anos de seguimento de crianças asmáticas com IMC elevados encontraram níveis de leptina significativamente mais altos em crianças asmáticas com sobrepeso comparadas as não asmáticas com sobrepeso<sup>39</sup>. Porém outro estudo realizado por Kim et al., não encontrou associação entre níveis de leptina e manifestações da asma em crianças<sup>40</sup>.

O potencial para leptina contribuir para asma nos obesos existe, mas investigações mais detalhadas são necessárias<sup>31</sup>.

#### 1.4.1.2- Adiponectina

Ao contrário das outras adipocinas, os altos níveis circulantes da adiponectina (a mais abundante adipocina no sangue periférico) estão diminuídos nos obesos<sup>28</sup>.

Estudos têm comprovado que os níveis de adiponectina são significativamente menores nas crianças obesas comparadas as não obesas<sup>41,42,43</sup> e correlaciona negativamente com o IMC<sup>40,41,42,43</sup>.

Sua função mais conhecida é a regulação da sensibilidade à insulina. Administração exógena de adiponectina protege ratos obesos contra diabetes tipo 2 e aterosclerose<sup>44</sup>.

Todos os receptores conhecidos da adiponectina (AdipoR1, AdipoR2, T-cadherin e calreticulin) são expressados nos vários tipos celulares dos pulmões<sup>30,35,44</sup>. Porém a sua ação é anti-inflamatória<sup>28,30,44</sup>.

A adiponectina reduz a produção e atividade do TNF- $\alpha$ , inibe o fator nuclear Kappa B (NF-kB) e a produção de IL-6 acompanhado pela indução de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e antagonista do receptor de IL-1<sup>28,31,35,45</sup>. Além de, reduzir a adesão das moléculas de adesão endotelial (ICAM-1) e moléculas de adesão vascular<sup>46</sup>.

Como na leptina, os estudos atuais em humanos com o objetivo de demonstrar a associação independente dos níveis de adiponectina e asma são inconclusivos<sup>35</sup>. Estudos realizados em crianças e adultos demonstraram um fator protetor entre a concentração de adiponectina e risco para asma, independente do IMC<sup>47,48</sup>. Por outro lado, Jartti et al., através da coorte *Finnish*, com pacientes que reportaram serem portadores de asma, não encontraram associação independente entre a razão de leptina/adiponectina séricas, refletindo o balanço inflamatório das adipocinas<sup>37</sup>.

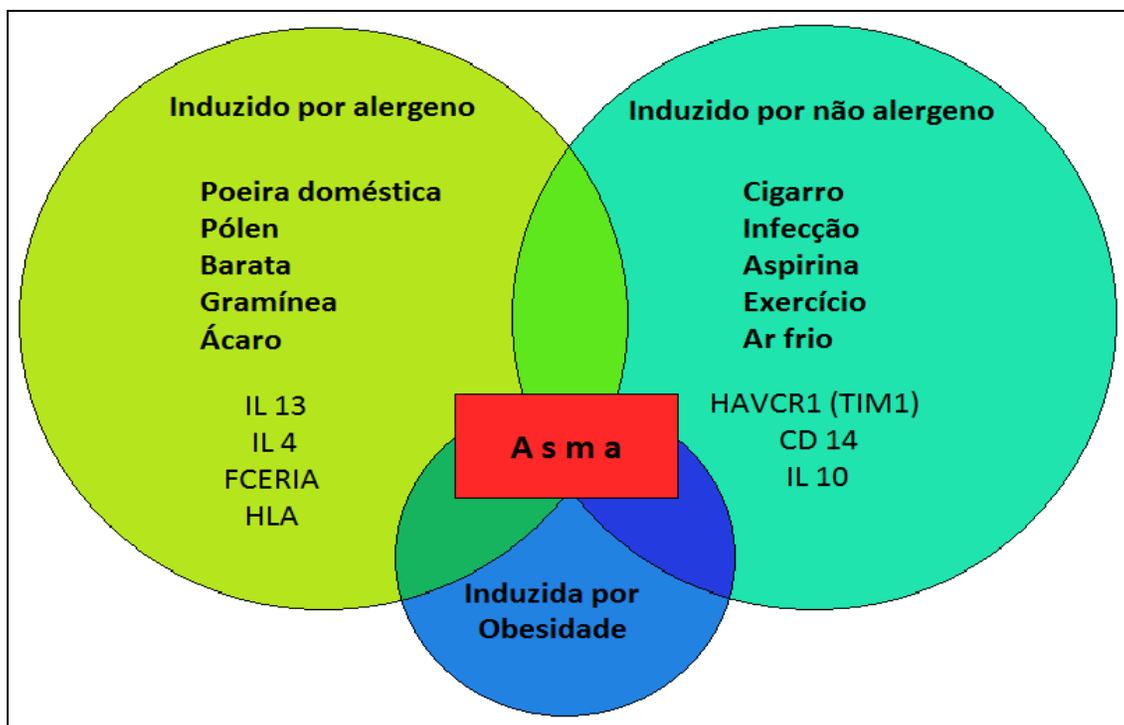
Medoff et al., através de modelo animal, ratos induzidos a asma alérgica crônica, concluíram que, a deficiência de adiponectina leva ao aumento da inflamação pulmonar, hipertrofia grave da artéria pulmonar e hipertensão pulmonar. E mais, a redução dos níveis de adiponectina pode ser um importante mecanismo entre a obesidade e a inflamação pulmonar associado à asma e o remodelamento vascular na hipertensão pulmonar<sup>49</sup>.

### **1.5- Inflamação da asma nos obesos**

A asma pode estar presente via sistema imune adquirido, com o eosinófilo como a célula predominante na via aérea ou via sistema imune inato caracterizado pelo aumento de neutrófilos<sup>50</sup>.

As asma eosinofílica e neutrofílica são ativadas por diferentes estímulos e funcionalmente conduzidas por diferentes vias inflamatórias<sup>31</sup>. A asma eosinofílica é ativada por alérgenos e a via inflamatória é primariamente conduzida pela IL-5 e asma neutrofílica é ativada por vírus, bactérias, poluentes e componentes da dieta tendo a IL-8 como condutora da cascata inflamatória<sup>50</sup>.

A patogênese da asma em crianças obesas não é totalmente conhecida<sup>31</sup>, mantém a discussão eosinofílica, não eosinofílica (Figura 1).



Adaptado do Nature Immunology 2010;11:577-84

**Figura 1-** A heterogeneidade da asma. A asma é uma doença complexa causada por múltiplos fatores. Há diferentes fenótipos da asma e, em alguns pacientes estas formas podem coexistir.

Embora diferentes formas da asma sejam reconhecidas, o maior foco de pesquisa e tratamento nos últimos 25 anos tem sido a asma alérgica, a forma mais comum da asma<sup>11</sup>.

As células T *helper* tipo 2 (Th2) alérgeno-específicas estão presentes nos pulmões da maioria dos pacientes com asma, particularmente com asma alérgica. As células Th2 produzem citocinas que regulam a síntese de imunoglobulinas E (IgE) alérgeno-específicas<sup>11</sup>. A citocina IL-4 regula síntese de IgE, IL-5 controla recrutamento de eosinófilos, IL-9 recrutamento e crescimento de mastócitos, e IL-13 responsável pela hiper-reatividade brônquica (HRB), o evento central da asma<sup>11,51,52</sup>.

Entendimento do papel da alergia e das células Th2 na asma tem sido demonstrado através de modelos animais. As células Th2 alérgeno-específicas podem ser induzidas em ratos, e quando recrutadas para os pulmões causam o desenvolvimento de inflamação eosinofílica e HRB<sup>53</sup>. No entanto, o processo de sensibilização alérgica em ratos pode não refletir o processo natural que ocorre em humanos, que até hoje não é totalmente compreendido<sup>11</sup>.

A transferência de células alérgeno-específicas Th1 abole a eosinofilia de vias aéreas e a produção de muco, embora o desenvolvimento de HRB não diminua. Interessantemente, a nova polarização Th1 pode produzir IL-9 e IL-13 quando tratados com IL-18<sup>11</sup>.

O que se sabe atualmente é que, os eosinófilos são os granulócitos predominantes nos sítios da inflamação alérgica<sup>11,51,52</sup>. Após estimulação, os eosinófilos têm um papel pró-inflamatório importante pela produção de leucotrienos, bem como citocinas Th1 (Interferon gama e IL-12) e citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e fator de necrose tumoral), além da liberação de substâncias pré e neoformadas (proteína catiônica eosinofílica (ECP), peroxidase eosinofílica (EPO), proteína X eosinofílica (EPX) e neurotoxina derivada do eosinófilo (EDN)<sup>11,51</sup>.

O mecanismo que promove o recrutamento de eosinófilos para o sítio inflamatório nos obesos ainda não está completamente esclarecido<sup>53</sup>, porém evidências apontam para o envolvimento de citocinas (IL-3, IL-5 e GM-CSF -fator de crescimento de granulócitos) e adipocinas (leptina e adiponectina) nesse processo<sup>49,54</sup>.

A migração dos eosinófilos no processo inflamatório da asma depende da concentração de quimioatraentes para penetrarem na circulação pulmonar e espaço intersticial<sup>52,55</sup>. Os eosinófilos podem ampliar a cascata inflamatória produzindo agentes quimiotáticos como eotaxina, PAF (fator de ativação plaquetária) e RANTES (*regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*)<sup>55</sup>.

A eotaxina é a quimocina mais específica para quimiotaxia dos eosinófilos na resposta alérgica. Seu receptor (CCR3) é expressado nas células T *helper* 2 quando co-localizados com os eosinófilos<sup>56</sup>.

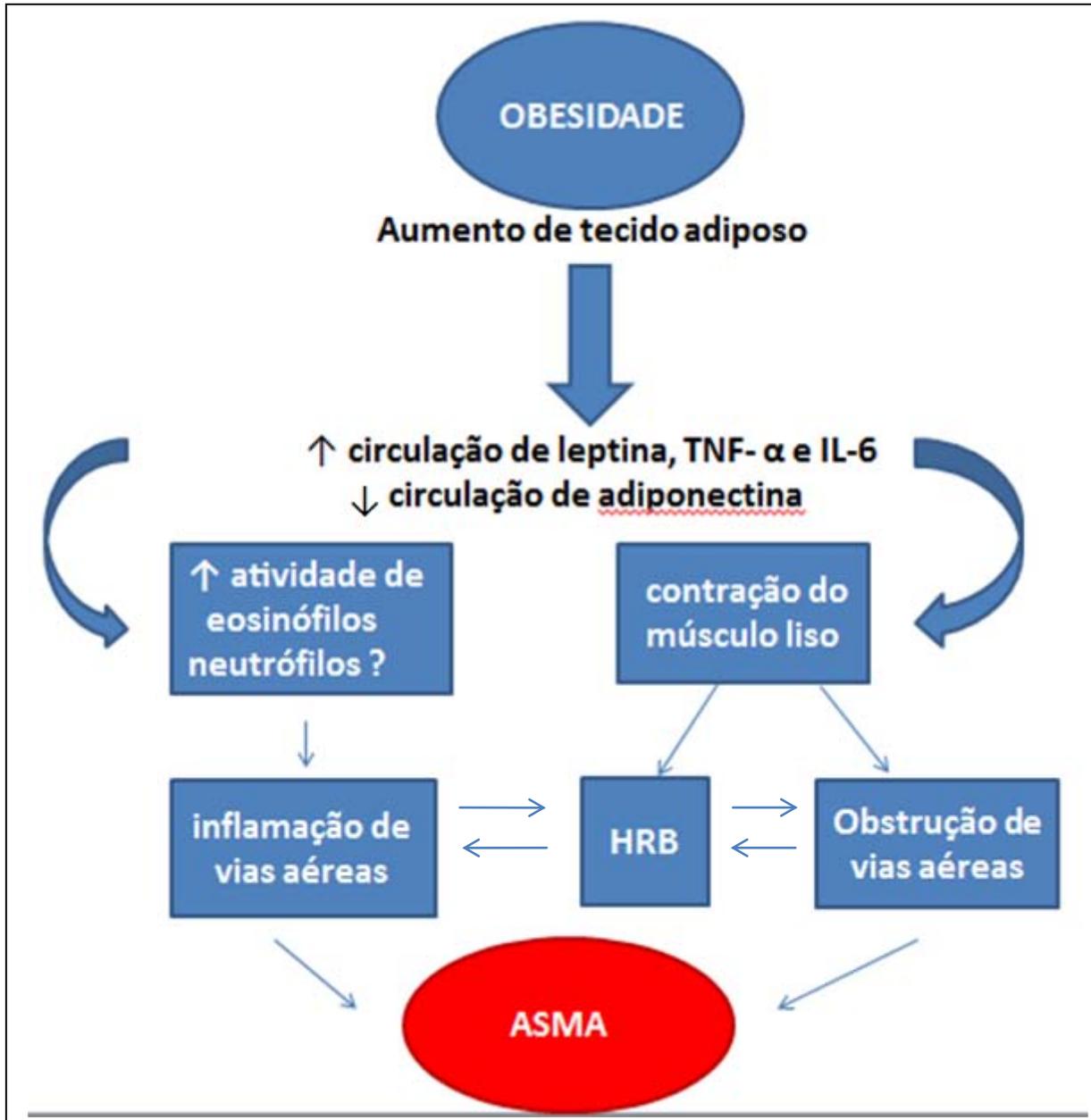
O PAF é produzido pelos eosinófilos através da acetilação de éster fosfolipídico (forma estocada precursora do PAF). É um dos mais potentes agentes seletivos de quimiotaxia para os eosinófilos<sup>52</sup>.

Os níveis de RANTES, um produto das células T ativadas, encontram-se elevados nas vias aéreas de asmáticos atópicos e não-atópicos, promovendo infiltração de eosinófilos e células T. A expressão de RANTES tem sido localizada no músculo liso brônquico, nos eosinófilos e células T da submucosa<sup>55</sup>.

## **1.6- Modelo fisiopatológico da relação asma-obesidade**

Há evidências de que a inflamação sistêmica da criança com asma pode ser exacerbada pelo processo inflamatório sistêmico causado pela obesidade<sup>31</sup>.

O processo inflamatório crônico criado pelo excesso de adipócitos tem sido responsável por numerosas condições<sup>28</sup> e pode ser o fator da patogênese da asma nos obesos. Acredita-se que o aumento dos mediadores inflamatórios sistêmicos associados à obesidade exacerbe a inflamação pulmonar, componente direto da fisiologia da asma.



Adaptado de Paediatr Resp Rev 2011 [Epub ahead of print]

TNF- fator de necrose tumoral, IL-6- interleucina6 e HRB- hiper-reatividade brônquica

**Figura 2-** Modelo fisiopatológico da asma nos obesos. Excesso de adipócitos aumentam a inflamação sistêmica, com subsequente aumento da inflamação pulmonar e contribuição para patogênese da asma.



## **2- JUSTIFICATIVA**

A incidência e prevalência da obesidade estão aumentando em crianças em todas as partes do mundo. Dentre todas as complicações da obesidade infantil, a doença respiratória é a mais negligenciada por médicos e pacientes.

Embora os efeitos mecânicos estejam tradicionalmente associados com a fisiopatologia da relação asma-obesidade, há evidências de que a inflamação desencadeada pela obesidade influencia a doença respiratória.

A asma, reconhecida como doença inflamatória crônica, está presente nos obesos com aumento da prevalência, gravidade e duração dos sintomas devido às alterações do processo inflamatório desencadeados pela liberação de substâncias pró e anti-inflamatórias pelos adipócitos como as adipocinas leptina, adiponectina, resistina, adiposina e visfatina, além de citocinas e quimocinas como fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucina (IL) 6, IL-1b, proteína C reativa e proteínas quimioatraentes dos monócitos (MCP-1).

Os níveis de leptina estão aumentados na obesidade alterando a expressão de moléculas de adesão e de quimocinas, assim como liberação de mediadores inflamatórios (IL1-b, IL-6, IL-8, MCP-1) em eosinófilos humanos. A adiponectina que inibe a produção de TNF- $\alpha$ , IL-6, fator nuclear K $\beta$ , moléculas de adesão endotelial, moléculas de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e moléculas de adesão vascular-1 (VCAM-1), além de IL-10 e antagonista do receptor de IL-1, está diminuída na obesidade e, portanto, aumenta os níveis dos coadjuvantes inflamatórios citados.

No entanto, o mecanismo pelo qual a obesidade pode aumentar a expressão clínica da asma relacionada a essas mudanças fisiológicas não está bem estudado. Maiores esclarecimentos das similaridades e diferenças entre as características inflamatórias da obesidade e asma podem aumentar o entendimento do impacto da obesidade na asma.

Este é o primeiro estudo em avaliar a inflamação eosinofílica na associação asma-obesidade através da atividade dos eosinófilos periféricos por quimiotaxia e adesão *in vitro*, além da dosagem sérica de leptina e adiponectina.

Isto porque sabemos que somente a contagem de eosinófilos no sangue periférico não se altera em crianças asmáticas obesas, mas até o presente momento, não conhecemos estudos sobre a atividade dos eosinófilos nessas crianças obesas.

Acreditamos, desta forma, buscar uma maior compreensão desse novo fenótipo da asma que apresenta resistência ao tratamento padrão com perda de função pulmonar e piora da qualidade de vida.



## **3- OBJETIVOS**

### **3.1- Geral**

- Avaliar o efeito da obesidade na atividade eosinofílica em crianças e adolescentes asmáticos atópicos e os marcadores clínicos e laboratoriais relacionados à obesidade.

### **3.2- Específicos**

- Avaliar a atividade dos eosinófilos nos pacientes asmáticos atópicos obesos e não obesos através dos ensaios de quimiotaxia e adesão *in vitro*.
- Caracterizar os pacientes asmáticos obesos e não obesos quanto as dosagens séricas dos hormônios da obesidade leptina e adiponectina, do colesterol e frações, triglicérides, IgE total, eosinófilos e glicemia de jejum.



## **4- MATERIAL E MÉTODOS**

Realizou-se um estudo analítico do tipo corte transversal com avaliação clínica e laboratorial em crianças e adolescentes de 6 a 18 anos com diagnóstico de asma atópica atendidos no Ambulatório de Pneumologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas - Unicamp.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa pela Faculdade de Ciências Médicas do HC-Unicamp (número: 352/2010). O termo de consentimento livre e esclarecido foi obtido de cada paciente antes do início da pesquisa.

O diagnóstico de asma foi estabelecido de acordo com os critérios da Sociedade Americana de Tórax e Sociedade Respiratória Européia (ATS-ERS)<sup>57</sup>. A asma foi classificada de acordo com o GINA<sup>5</sup> como intermitente, persistente leve, persistente moderada e persistente grave (Quadro 1).

**Quadro 1-** Classificação da gravidade da asma

	<b>Persistente</b>			
	<b>Intermitente</b>	<b>Leve</b>	<b>Moderada</b>	<b>Grave</b>
Sintomas	raros	Semanais	Diários	Diários ou contínuos
Despertares noturnos	raros	Mensais	Semanais	Quase diários
Necessidade de beta-2 para alívio	rara	Eventual	Diária	Diária
Limitação de atividades	nenhuma	Presente nas exacerbações	Presente nas exacerbações	Contínua
Exacerbações	raras	Afeta atividades e o sono	Afeta atividades e o sono	Frequentes
VEF1 ou PFE	≥80% predito	≥80% predito	60-80% predito	≤60% predito
Variação VEF1 ou PFE	<20%	<20-30%	>30%	>30%

Todos os pacientes eram atópicos com eosinofilia e imunoglobulina (Ig)E elevada, sensibilizados para os aeroalérgenos comuns avaliados através de testes cutâneos de hipersensibilidade imediata.

Foram considerados obesos os indivíduos que apresentaram IMC (peso (Kg)/altura<sup>2</sup> (m)) acima do percentil 95 na curva de IMC do NCHS (*National Center for Health Statistics; Anexo 1*).

Selecionados 4 grupos: asmáticos obesos (AO), asmáticos não obesos (ANO), não asmáticos obesos (NAO) e não asmáticos não obesos, isto é, voluntários saudáveis (NANO). Os grupos de asmáticos foram classificados de acordo com a gravidade em intermitente, persistente leve, moderado e grave.

Foram excluídas as crianças menores de 6 anos por falta de condição técnica para realização de exames como espirometria; as que apresentaram outras co-morbidades ou infecções no último mês antes da entrada na pesquisa e as que não aderiram ao tratamento clínico da asma no ambulatório segundo a gravidade clínica.

Todos foram medicados com anti-helmíntico Albendazol, na dose preconizada para idade, um mês antes da realização dos exames para exclusão da eosinofilia secundária a parasitose.

Para cada sujeito foram coletados 30ml de sangue venoso, sendo 10ml para análises clínicas de colesterol total e frações, triglicérides, glicemia de jejum, IgE e hemograma para contagem de eosinófilos de acordo com os padrões de análises do Laboratório de Análises Clínicas do HC-Unicamp e 20ml na presença de citrato de sódio para avaliação *in vitro* da atividade eosinofílica realizada no laboratório de farmacologia do HC-Unicamp nas etapas de quimiotaxia e adesão explicadas a seguir passo a passo:

#### **4.1- Isolamento de eosinófilos**

O sangue foi diluído (1:1;v/v) com PBS (pH 7,2-7,4). Alíquotas de 35 ml de sangue já diluídos foram colocadas sobre 15 ml de solução isotônica de Percoll (9,5ml de Percoll, 4,0 ml de água e 1,5ml de HANKS concentrado 10x; densidade  $1,082\pm 0,005\text{g/ml}$ ; pH 7,4; 340mOs/Kg  $\text{H}_2\text{O}$  de osmolaridade; Sigma Chem. Co., EUA) em tubos plásticos graduados de 50ml. Após centrifugação (23min; 1000g;  $4^\circ\text{C}$ ), a camada de células mononucleares foi descartada, e o pellet contendo eritrócitos, neutrófilos e eosinófilos foi aspirado e transferido para um tubo limpo. Os eritrócitos foram lisados (13minutos;  $0^\circ\text{C}$ ) por adição de 5 volumes de solução isotônica gelada de cloreto de amônia ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  155mM,  $\text{KHCO}_3$  10mM e EDTA 0,1mM) para 1 volume do pellet. Após a lise, a suspensão celular foi centrifugada (10min; 400g;  $4^\circ\text{C}$ ) e o pellet resultante foi lavado 1x (10min; 400g;  $4^\circ\text{C}$ ) em PBS. Em seguida, feita nova lise hipotônica com água destilada (colocados 3ml de água destilada e após 25 segundos acrescentado 1ml de salina 3,6%). Centrifugado novamente a 400g por 10min a  $4^\circ\text{C}$  e feita a contagem de células com corante Turk em câmara de Neubauer<sup>58</sup>.

#### **4.2- Separação imunomagnética de eosinófilos**

Utilizamos o sistema magnético de separação celular (MACS; MiltenyiBiotec, Alemanha; e Becton-Dickinson, Reino Unido). Inicialmente a coluna foi lavada 4x com PBS/BSA 0,5% e, posteriormente, incubada com PBS/BSA 0,5% a temperatura ambiente por 1 hora. Imediatamente antes do uso, a coluna foi resfriada por meio de 4 lavagens com PBS/BSA 0,5% gelado. A mistura de neutrófilos/eosinófilos foi incubada com microbeads revestidos com anticorpo anti-CD16, por 30 min ( $6-12^\circ\text{C}$ ;  $32\mu\text{l}$  de microbeads/ $5\times 10^7$  células). PBS/BSA gelado (q.s.p.1ml) foi então adicionado a suspensão de células, a qual foi transferida para o alto da coluna, sob campo magnético. Após aplicarmos a suspensão celular na coluna, mais 3 volumes (1ml) de tampão

PBS/BSA foram passados pela mesma. As células CD16+ (neutrófilos) permanecerão presas a coluna, ao passo que as células CD16- (eosinófilos) serão coletados (volume de eluição de 30ml). As células CD16- foram centrifugadas (10min; 400g; 4<sup>o</sup>C) antes dos testes funcionais<sup>58</sup>. A determinação total de células foi realizada usando-se a câmara de Neubauer, obtendo o número de células x 10<sup>6</sup>/ml. A pureza da preparação final foi maior que 95%. As células foram ajustadas na concentração desejada para cada ensaio.

### **4.3- Quimiotaxia de eosinófilos**

Os ensaios de quimiotaxia *in vitro* foram realizados usando-se câmara de microquimiotaxia com 48 poços. Aos poços da câmara foram adicionados 28µl do agente quimiotático (eotaxina 100ng/ml, RANTES 100ng/ml e PAF 10<sup>-5</sup>M) e, em seguida, o filtro de policarbonato (poro 5µm; Nuclepore Pleasanton, EUA) foi posicionado na placa sobre os poços. Adicionamos 50µl da suspensão de eosinófilos (4x10<sup>6</sup> células/ml) na parte superior de cada poço. A quimiotaxia espontânea foi verificada substituindo-se o agente quimiotático por MEM (Minimum essential medium). A câmara foi incubada por 1 hora em estufa (5% de CO<sub>2</sub>, 37<sup>o</sup>C). Após a incubação, a suspensão celular restante na parte superior do filtro foi fixada em metanol 70%, corados (Diff-Quik®; Baxter Healthcare Corporation, EUA) e colocados sobre lâminas de microscopia. A migração dos eosinófilos foi determinada quantificando-se o no de células que migraram através do filtro, em 5 campos aleatórios (central, norte, sul, leste, oeste) usando-se objetiva de imersão<sup>59</sup>.

### **4.4- Adesão de eosinófilos a fibronectina**

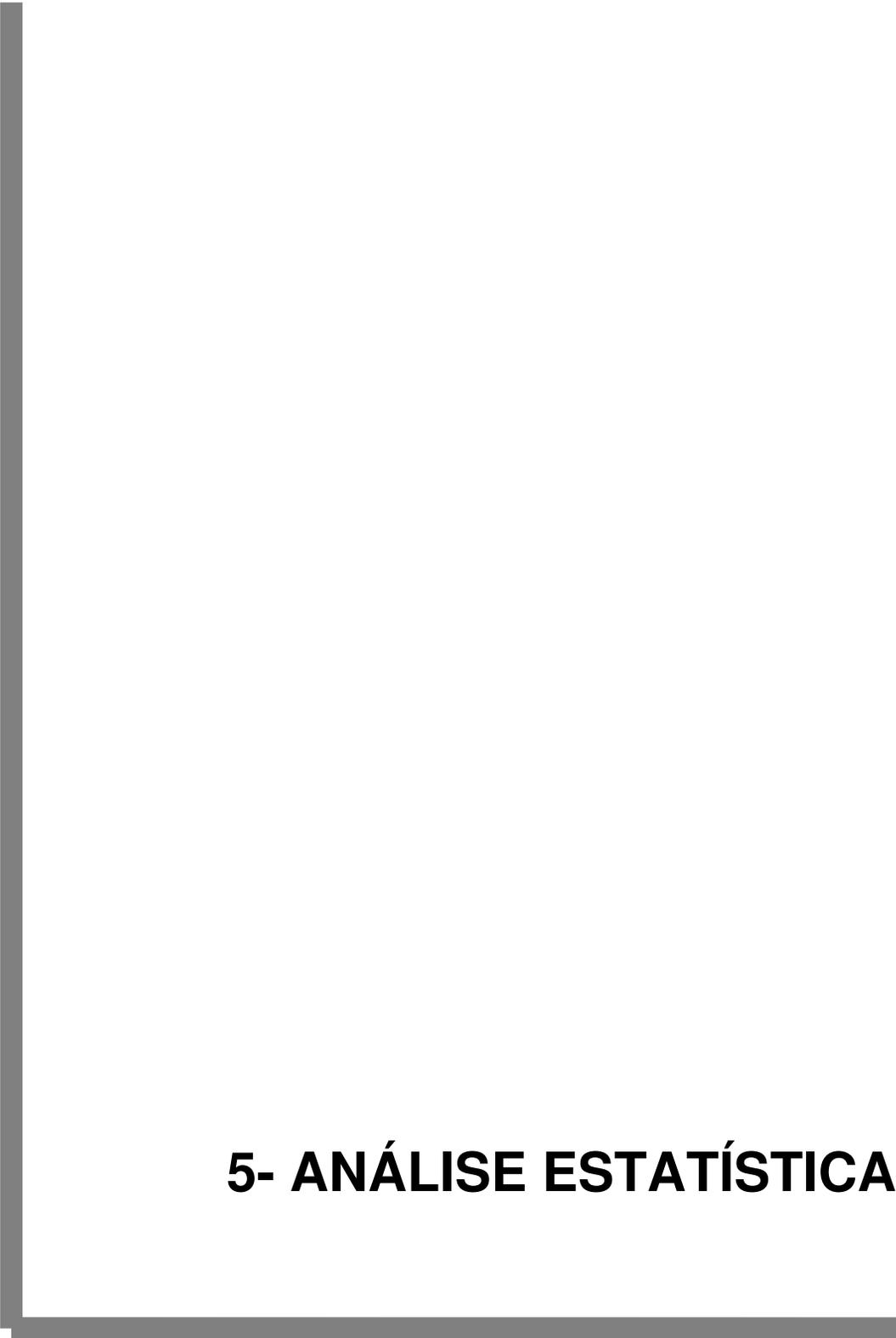
Placas de 96 poços foram revestidos com 60µl de uma solução de fibronectina (20µg/ml em PBS) e incubados overnight a 4<sup>o</sup>C. No dia seguinte os poços foram lavados 2 vezes com 200µl de PBS e, em seguida, foram tratados por

1 hora (37<sup>0</sup>C) com uma solução de BSA 0,1% em PBS (100µl/poço) para bloqueio das ligações inespecíficas. Após a incubação, os poços foram novamente lavados com PBS e as placas deixadas em estufa (37<sup>0</sup>C) para secagem dos poços. Enquanto isso foram feitas as incubações dos eosinófilos em MEM e eotaxina. Posteriormente às incubações, foram adicionados 50µl da suspensão de eosinófilos (7x10<sup>4</sup> células/ml) a cada poço. Em seguida, a placa foi incubada por 30 minutos em estufa (37<sup>0</sup>C, 5% CO<sub>2</sub>) para permitir a adesão das células. As células não aderidas foram removidas e os poços lavados delicadamente 2 vezes com PBS. 50µl de MEM foram adicionados a cada poço previamente recoberto com fibronectina e, aos poços não recobertos, foram adicionadas concentrações variadas da suspensão celular original (em MEM) para a formação de uma curva padrão de células. A adesão dos eosinófilos foi calculada através da medida da atividade da EPO das células aderidas<sup>56</sup>. Foi adicionado 50µl do substrato da EPO (1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1mM OPD e 0,1% Triton X-100 em tampão Tris, pH 8) a cada poço. Após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente, adicionamos a cada poço 25µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4M para interromper a reação. A absorbância foi medida a 490nm no leitor de microplaca (Multiscan MS, Labsystems, USA). A adesão foi calculada através da comparação da absorbância das amostras (desconhecidas), com as da curva padrão de células<sup>60</sup>.

#### **4.5- Dosagem de leptina e adiponectina**

Após a centrifugação, 2ml de soro eram congelados a -60<sup>0</sup>C em câmara fria. As dosagens séricas de leptina e adiponectina foram realizadas através do Kit para ensaio imunoenzimático (ELISA), seguindo as instruções do fabricante<sup>61</sup> (Millipore, St Charles, Missouri, USA). As medidas de leptina e adiponectina permaneceram na faixa de 0,5 a 100ng/mL e 1,56 a 100ng/mL, respectivamente. O controle de qualidade alto e baixo foi realizado em paralelo com cada ensaio. A leitura das medidas das adipocinas foi realizada por espectrofotometria (absorbância de 450nm-590nm).

O grupo controle foi composto de voluntários saudáveis, sem critérios diagnósticos de asma e obesidade com espirometria normal. O grupo de não asmáticos obesos também não apresentava critérios diagnósticos de asma, porém com IMC acima do percentil 95. Para isso foram necessários 60ml de sangue para realização dos mesmos testes *in vitro* devido ao menor número de eosinófilos em sangue periférico desses pacientes. Por questões éticas, foi permitida a inclusão de 5 indivíduos em cada um desses grupos pela quantidade de sangue necessária para os testes.



## **5- ANÁLISE ESTATÍSTICA**

O cálculo amostral foi derivado de um projeto piloto com necessidade de 16 sujeitos por grupo. O estudo foi desenhado para um poder amostral de 80% para detectar significância entre os obesos e não obesos com um erro de 5%.

Os dados são apresentados como medianas. Foi utilizado o programa GraphPad software e SAS System for Windows (Statistical Analysis System), versão 9.2 SAS institute Inc, 2002-2008, Cary, NC, EUA para as análises estatísticas.

A ANOVA de uma via foi utilizada para analisar os parâmetros de colesterol, triglicérides, glicemia de jejum, IgE sérica, eosinófilos séricos, quimiotaxia e adesão de eosinófilos e níveis séricos de leptina e adiponectina. ANOVA seguida de teste de Tukey foi necessária para localizar as diferenças entre os grupos para colesterol, IgE total, eosinófilos séricos, quimiotaxia com MEM, eotaxina, PAF e RANTES, adesão de eosinófilos e níveis séricos de leptina. Os níveis de adiponectina foram analisados por ANOVA seguido de Kruskal-Wallis.

O valor de  $p < 0,05$  foi aceito como significativo.



## **6- RESULTADOS**

## 6.1- Características dos sujeitos (Tabela 2)

Foram incluídos 42 crianças e adolescentes sendo 16 asmáticos atópicos obesos (AO) e 16 não obesos (ANO), 5 não asmáticos obesos (NAO) e 5 não asmáticos não obesos (NANO).

A idade variou de 6 a 17 anos (média 10,2 anos), sendo 16 do gênero masculino e 16 do gênero feminino para o grupo dos asmáticos.

A dosagem sérica de colesterol total foi maior entre o grupo dos obesos (asmáticos e não asmáticos) quando comparados com os indivíduos não obesos (asmáticos e não asmáticos;  $p=0,0009$ ).

Não foi constatado significância entre os grupos quando comparamos as frações do colesterol (HDL, VLDL) triglicérides e glicemia de jejum. Para a fração LDL houve diferença significativa para o grupo dos obesos ( $p=0,036$ ).

Os níveis de IgE foram maiores entre os grupos dos asmáticos (obesos e não obesos) em relação ao grupo dos não asmáticos (obesos e não obesos;  $p=0,0007$ ).

A contagem de eosinófilos no sangue periférico também foi maior no grupo dos asmáticos (obesos e não obesos) quando comparados com os não asmáticos (obesos e não obesos;  $p=0,024$ ).

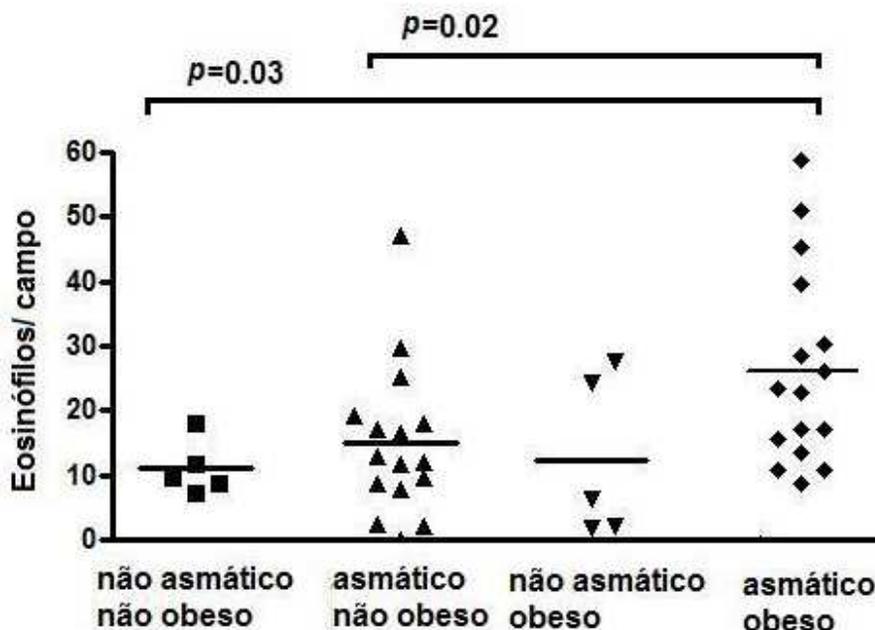
**Tabela 2-** Características dos indivíduos

	<b>Asmático obeso (AO)</b>	<b>Não asmático obeso (NAO)</b>	<b>Asmático não obeso (ANO)</b>	<b>Não asmático não obeso (NANO)</b>	<b>Valor P</b>
N	16	5	16	5	
Idade (anos)	10	11	9,5	18	0,6804
Sexo (% masculino)	56%	40%	62,5%	40%	0,7832
GINA classificação (n)					
Intermitente	4	4	4	4	
Persistente leve	4	4	4	4	
Persistente moderado	4	4	4	4	
Persistente grave	4	4	4	4	
Colesterol total	176	214,2	136,75	111,8	0,0009
HDL	42,5	40,2	46,94	48	0,2919
VLDL	15,5	24	17	14,4	0,2356
LDL	82,0	146,6	90,38	71	0,0360
Triglicérides	77,0	120,8	76,88	83,6	0,1617
Glicose (g/dl)	81,0	79	79,81	81,6	0,7901
IgE (U/ml)	653,5	84,8	862,67	89,8	0,0007
Eosinofilia (%)	7,05	5,06	8,31	1,52	0,0024

Informações apresentadas como medianas ou porcentagem (%) dos sujeitos como fator específico.

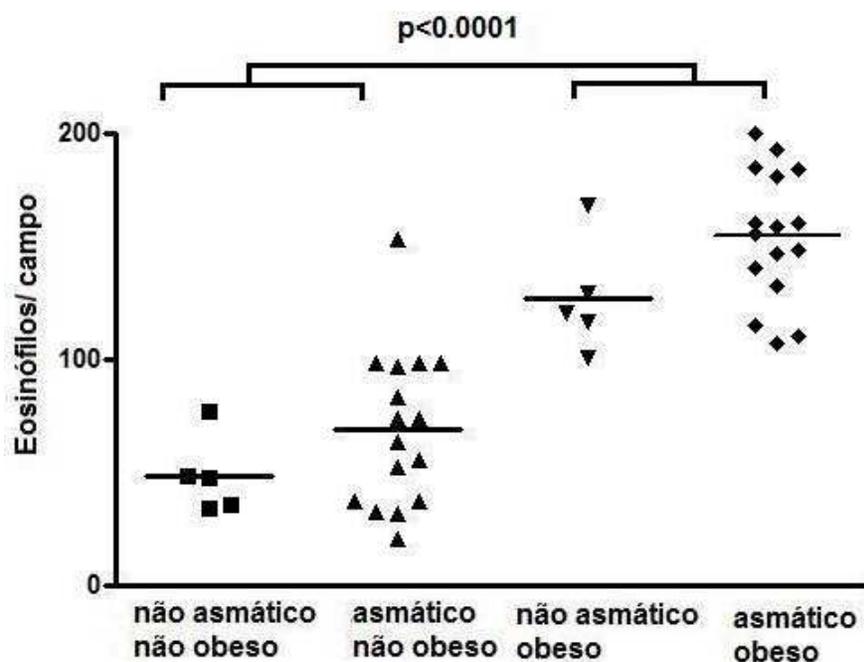
## 6.2 - Quimiotaxia dos eosinófilos

A quimiotaxia espontânea dos eosinófilos foi maior no grupo dos asmáticos obesos em relação aos grupos dos não obesos ( $p=0,02$  para ANO e  $p=0,03$  para NANO) com IC 95% (Gráfico 1).



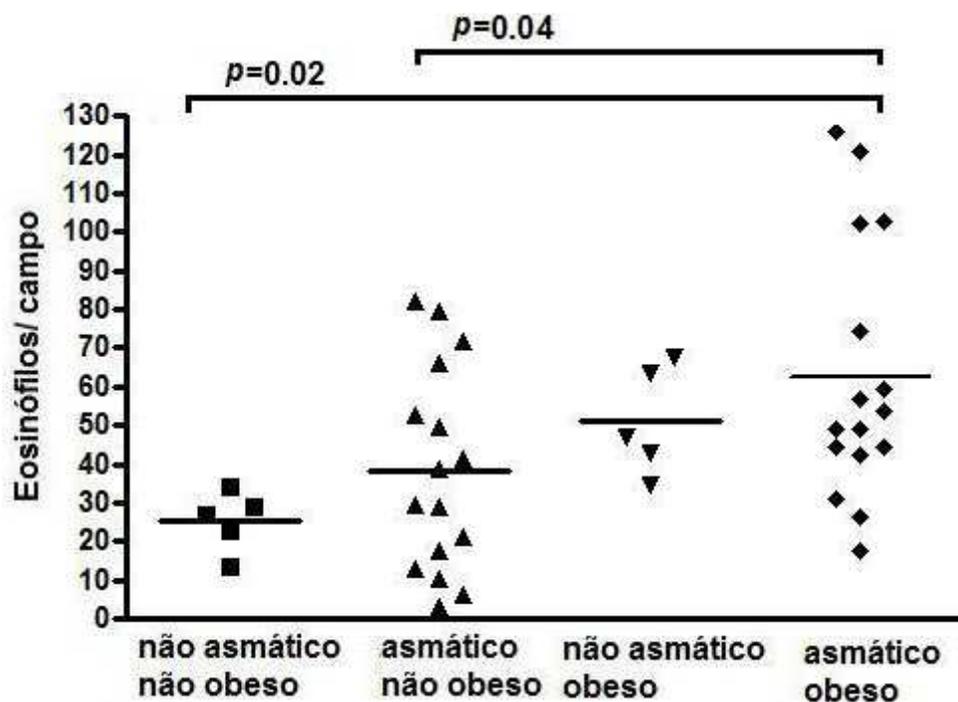
**Gráfico 1-** Comparação da quimiotaxia espontânea (MEM) de eosinófilos entre pacientes asmáticos obesos, asmáticos não obesos, não asmáticos obesos e voluntários saudáveis. Eosinófilos ( $4 \times 10^6$ /ml/50 $\mu$ l/poço) foram colocados em câmara de microquimiotaxia por 1 hora a 37°C, os filtros corados (Diff-Quik®; BaxterHealthcare Corporation, EUA) e colocados sobre lâminas de microscopia. A migração dos eosinófilos foi determinada quantificando-se o n° de células que migraram através do filtro, em 5 campos aleatórios, usando-se objetiva de imersão. Os resultados são expressos como média do número de células que migraram  $\pm$ EPM.

Os eosinófilos ativados com eotaxina (300ng/ml) resultaram em maior contagem de células após quimiotaxia no grupo dos obesos (asmáticos e não asmáticos) quando comparados com os grupos dos não obesos (asmáticos e não asmáticos;  $p < 0,0001$ ) com IC 95% (Gráfico 2).



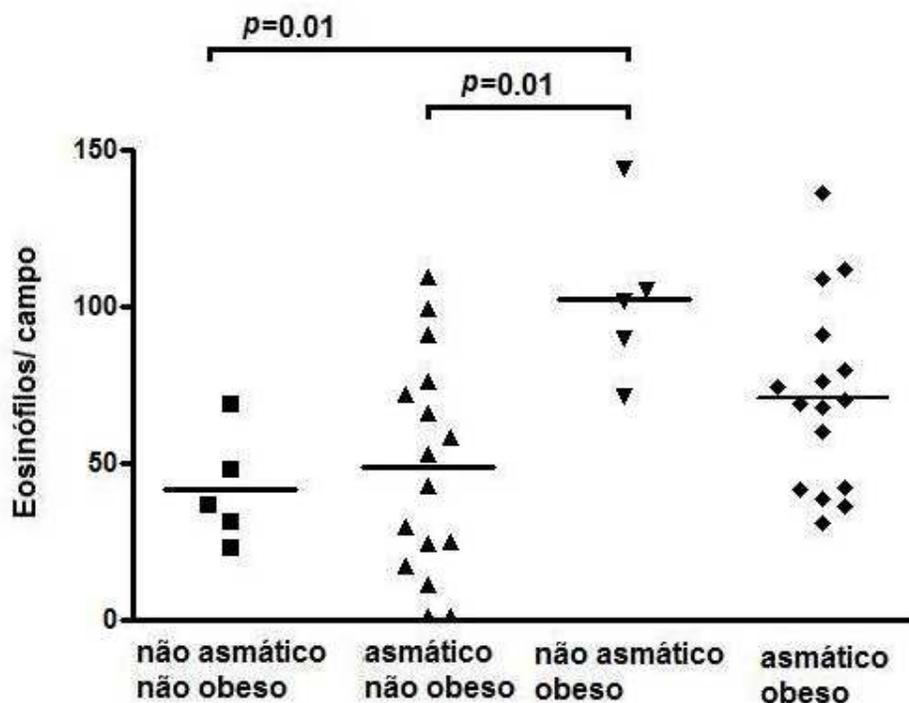
**Gráfico 2-** Comparação da quimiotaxia de eosinófilos estimulados com eotaxina entre pacientes asmáticos obesos, asmáticos não obesos, não asmáticos obesos e voluntários saudáveis. Eosinófilos ( $4 \times 10^6$ /ml/50 $\mu$ l/poço) foram colocados em câmara de microquimiotaxia por 1 hora a 37<sup>0</sup>C, os filtros corados (Diff-Quik®; Baxter Healthcare Corporation, EUA) e colocados sobre lâminas de microscopia. A migração dos eosinófilos foi determinada quantificando-se o n° de células que migraram através do filtro, em 5 campos aleatórios, usando-se objetiva de imersão. Os resultados são expressos como média do número de células que migraram  $\pm$ EPM.

Eosinófilos ativados com PAF (10 $\mu$ M), também apresentaram maior quimiotaxia no grupo AO do que nos grupos dos não obesos ( $p=0,04$  para ANO e  $p=0,02$  para NANO) (Gráfico 3).



**Gráfico 3-** Comparação da quimiotaxia de eosinófilos estimulados com PAF entre pacientes asmáticos obesos, asmáticos não obesos, não asmáticos obesos e voluntários saudáveis. Eosinófilos ( $4 \times 10^6$ /ml/50 $\mu$ l/poço) foram colocados em câmara de microquimiotaxia por 1 hora a 37 $^{\circ}$ C, os filtros corados (Diff-Quik®; Baxter Healthcare Corporation, EUA) e colocados sobre lâminas de microscopia. A migração dos eosinófilos foi determinada quantificando-se o n $^{\circ}$  de células que migraram através do filtro, em 5 campos aleatórios, usando-se objetiva de imersão. Os resultados são expressos como média do número de células que migraram  $\pm$ EPM.

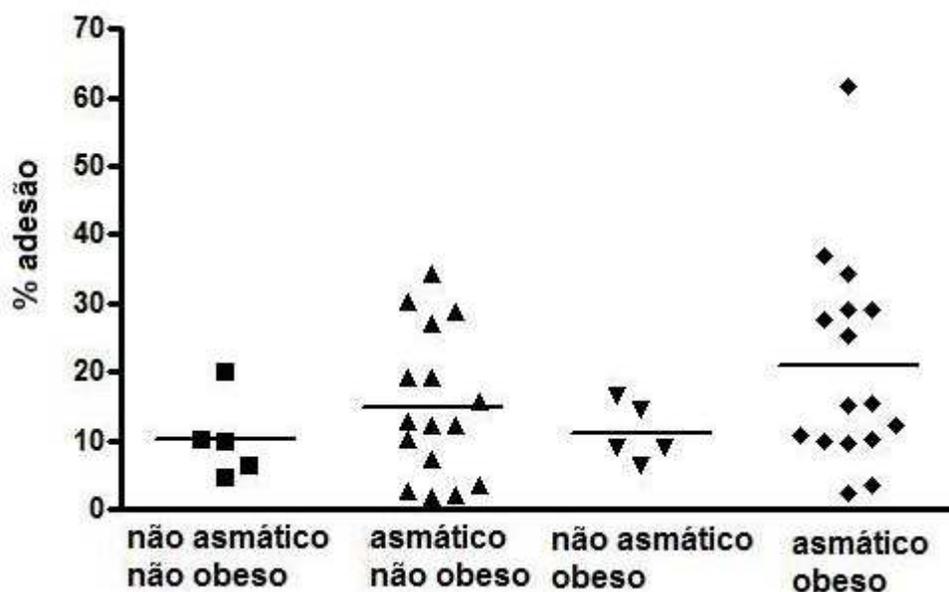
Eosinófilos estimulados com RANTES (100ng/ml) aumentou a quimiotaxia no grupo NAO quando comparados com os grupos ANO e NANO ( $p=0,01$ ) (Gráfico 4).



**Gráfico 4-** Comparação da quimiotaxia de eosinófilos estimulados com RANTES entre pacientes asmáticos obesos, asmáticos não obesos, não asmáticos obesos e voluntários saudáveis. Eosinófilos ( $4 \times 10^6$ /ml/50 $\mu$ l/poço) foram colocados em câmara de microquimiotaxia por 1 hora a 37<sup>0</sup>C, os filtros corados (Diff-Quik®; Baxter Healthcare Corporation, EUA) e colocados sobre lâminas de microscopia. A migração dos eosinófilos foi determinada quantificando-se o n° de células que migraram através do filtro, em 5 campos aleatórios, usando-se objetiva de imersão. Os resultados são expressos como média do número de células que migraram  $\pm$ EPM.

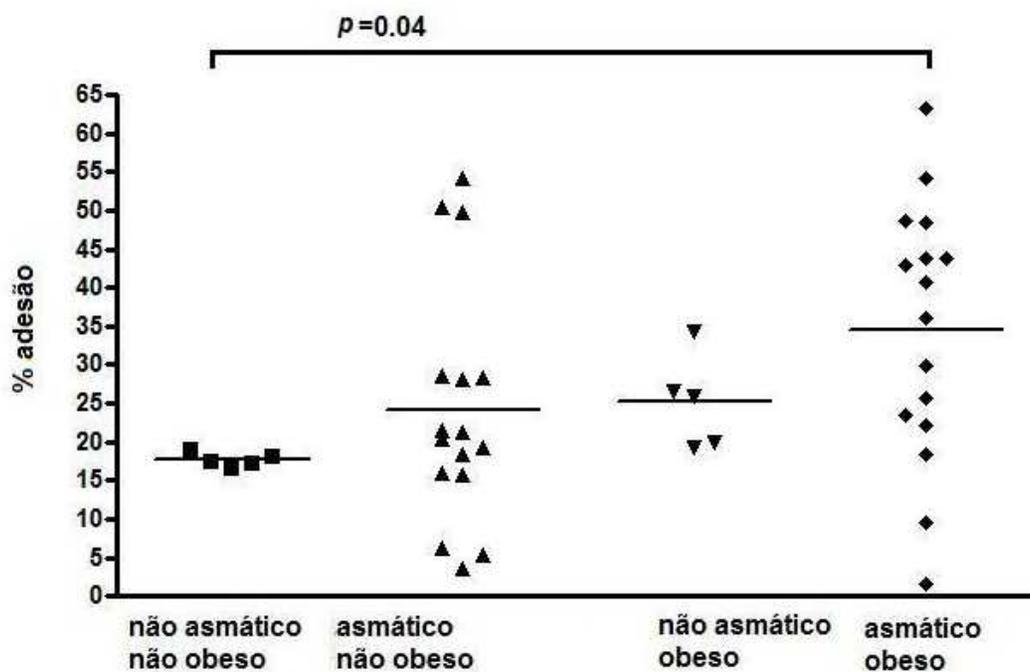
### 6.3- Adesão de eosinófilos a fibronectina

A adesão espontânea de eosinófilos a fibronectina foi similar entre os grupos (Gráfico 5).



**Gráfico 5-** Adesão espontânea de eosinófilos humanos à fibronectina *in vitro*. Eosinófilos ( $7 \times 10^4$  células/ml) de pacientes asmáticos obesos, asmáticos não obesos, não asmáticos obesos e não asmáticos não obesos foram colocados a aderir em poços tratados com fibronectina por 30 min. Os resultados foram expressos como porcentagem de células aderentes em relação ao número total de células  $\pm$ SEM.

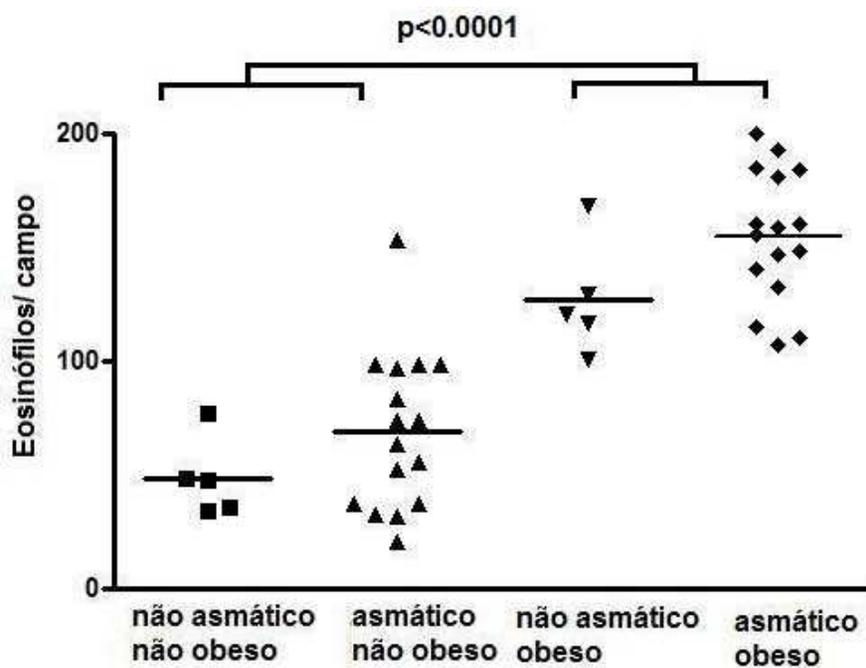
Eosinófilos ativados com eotaxina (100ng/ml) aumentaram significativamente a adesão a fibronectina no grupo AO quando comparados com NANO ( $p=0,04$ ) (Gráfico 6).



**Gráfico 6-** Adesão de eosinófilos humanos à fibronectina estimulados com eotaxina *in vitro*. Eosinófilos ( $7 \times 10^4$  cél/ml) de pacientes asmáticos obesos, asmáticos não obesos, não asmáticos obesos e não asmáticos não obesos foram colocados a aderir em poços tratados com fibronectina por 30 min. Os resultados foram expressos como porcentagem de células aderentes em relação ao número total de células  $\pm$ SEM.

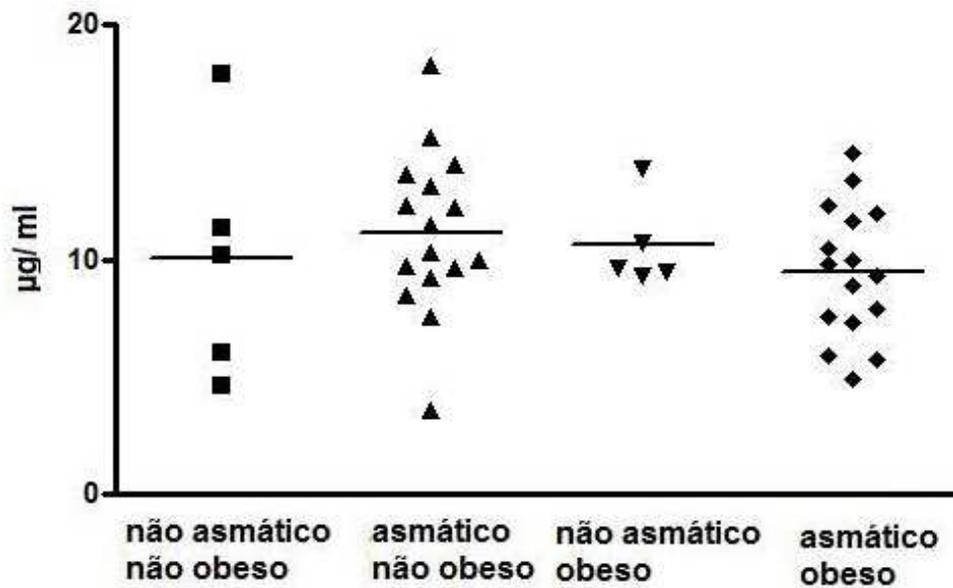
#### 6.4- Níveis séricos de adipocinas

A dosagem sérica de leptina foi maior nos indivíduos obesos (asmáticos e não asmáticos) em relação aos grupos não obesos (asmáticos e não asmáticos;  $p < 0,0001$ ) (Gráfico 7).

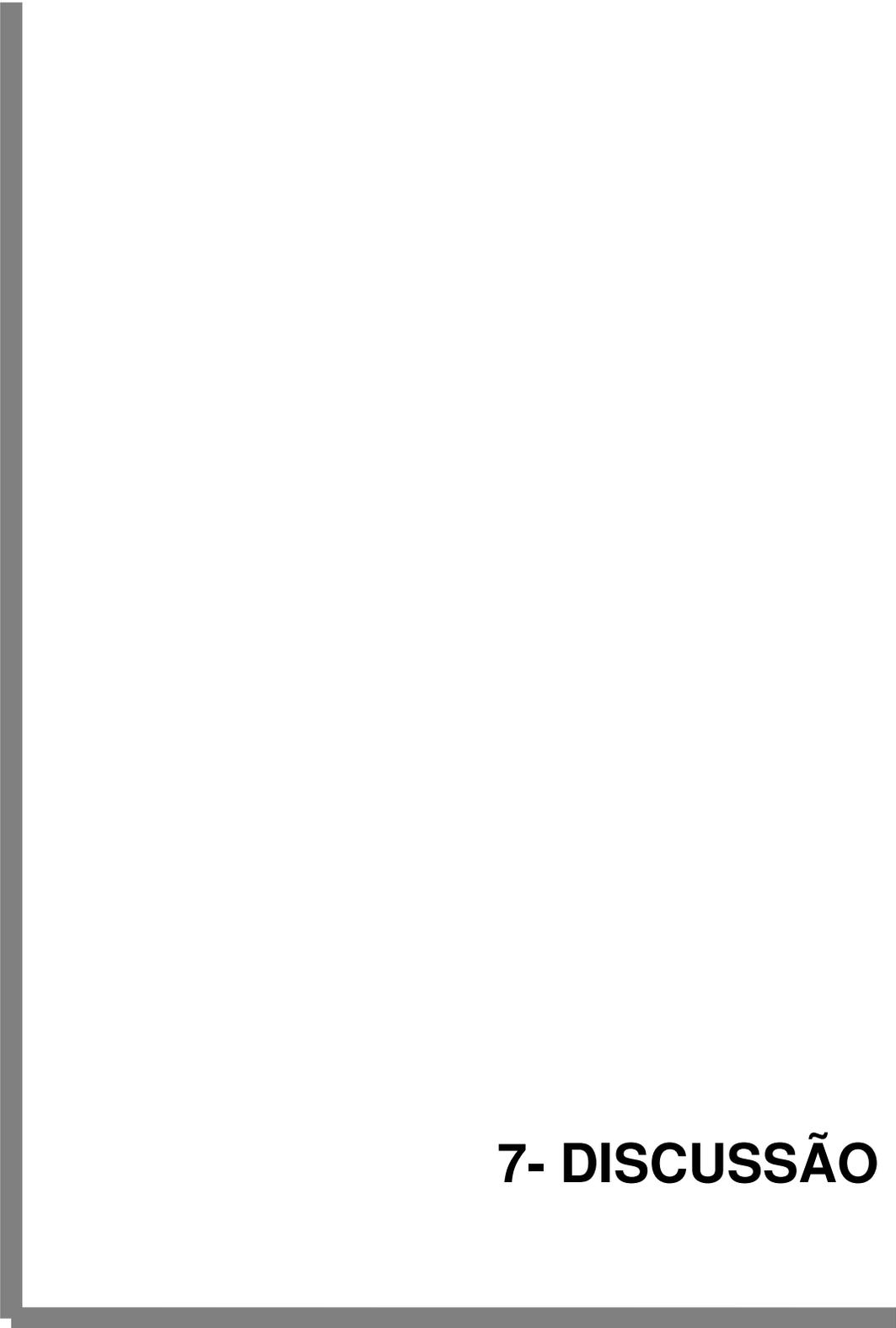


**Gráfico 7-** Dosagem sérica de leptina pelo método de ELISA de pacientes asmáticos obesos, asmáticos não obesos, não asmáticos obesos e não asmáticos não obesos. Os resultados foram expressos por ng/ml.

A adiponectina não apresentou associação entre os grupos ( $p=0,524$ ) (Gráfico 8).



**Gráfico 8-** Dosagem sérica de adiponectina pelo método de ELISA de pacientes asmáticos obesos, asmáticos não obesos, não asmáticos obesos e não asmáticos não obesos. Os resultados foram expressos por µg/ml.



## **7- DISCUSSÃO**

Este é o primeiro estudo a demonstrar um aumento da atividade inflamatória dos eosinófilos através da quimiotaxia e adesão em crianças e adolescentes asmáticos obesos com aumento dos níveis séricos de leptina em comparação aos asmáticos não obesos e saudáveis.

A obesidade é considerada um fator de risco para desenvolvimento da asma em ambos os sexos e diferentes etnias<sup>27</sup>. No entanto, o mecanismo básico responsável por esta associação em humanos ainda não está bem estabelecido.

Discutem-se vários fatores causais<sup>44</sup> como: mecânicos com diminuição da complacência por redução dos volumes pulmonares (volume de reserva expiratória), capacidade vital forçada (CVF) e volume expiratório forçado em 1 segundo (VEF<sub>1</sub>) caracterizando restrição e não obstrução<sup>61</sup>; obstrução de vias aéreas superiores<sup>62</sup>; co-morbidades como doença do refluxo gastroesofágico e apneia do sono<sup>63</sup>, genéticos<sup>64</sup> e o estado inflamatório sistêmico causado pela obesidade<sup>28</sup>.

Eosinófilos ativados com eotaxina resultaram em quimiotaxia elevada no grupo dos asmáticos obesos comparados aos sujeitos não obesos (asmáticos e não asmáticos). A quimiotaxia espontânea (células não ativadas) também estava mais elevada nos grupos dos asmáticos obesos. Surpreendentemente, o grupo dos não asmáticos obesos apresentou maior quimiotaxia dos eosinófilos quando comparados com o grupo dos asmáticos não obesos.

No ensaio de adesão a fibronectina, nós também encontramos maior adesão dos eosinófilos estimulados com eotaxina no grupo dos asmáticos obesos em comparação com NANO. As integrinas MAC-1 e VLA-4 expressadas nos eosinófilos podem se ligar a matriz extracelular como a fibronectina. A adesão dos eosinófilos a fibronectina é mediada através da ligação do VLA-4 expressado nos eosinófilos a região do segmento 1 de conexão da fibronectina<sup>66</sup>.

A eotaxina é o mais específico e mais importante fator que pode afetar a função dos eosinófilos. O efeito da eotaxina pode ser observado em cada estágio do ciclo dos eosinófilos e por isso tem um papel importante no desenvolvimento da reação alérgica<sup>56</sup>.

É responsável pelo retardo na apoptose dos eosinófilos e a sua interação seletiva com o receptor CCR3 leva a ativação e degranulação dessas células. A contagem de eosinófilos que infiltram um órgão como o pulmão é proporcional à concentração de eotaxina neste sítio<sup>56</sup>. Portanto, maior concentração de eotaxina, maior infiltração de eosinófilos no sítio inflamatório, e maior atividade dessas células com liberação de mediadores pré e neoformados, com piora do controle da asma e gravidade dos sintomas<sup>55</sup>.

Outros quimioatraentes como PAF também apresentaram quimiotaxia elevada dos eosinófilos no grupo dos asmáticos obesos em comparação com os grupos dos não obesos.

O PAF é produzido pelos eosinófilos através da acetilação de éster fosfolipídico (forma estocada precursora do PAF). É um dos mais potentes agentes seletivos de quimiotaxia para os eosinófilos<sup>52</sup>.

Eosinófilos ativados com RANTES aumentaram significativamente a quimiotaxia no grupo dos não asmáticos obesos. Os níveis de RANTES, um produto das células T ativadas, encontram-se elevados nas vias aéreas de asmáticos atópicos e não-atópicos, promovendo a infiltração de eosinófilos e células T. A expressão de RANTES tem sido localizada no músculo liso brônquico, nos eosinófilos e células T da submucosa<sup>52</sup>.

Interessantemente, a quimiotaxia dos eosinófilos estimulados com eotaxina e RANTES foi maior para o grupo dos não asmáticos obesos em relação aos asmáticos não obesos demonstrando que a obesidade neste estudo foi um fator determinante para o aumento da função eosinofílica através da quimiotaxia. E, não houve diferença entre os grupos dos asmáticos não obesos e voluntários saudáveis tanto na espontânea quanto com os estímulos.

O processo inflamatório crônico pelo excesso de adipócitos tem sido associado com a fisiopatologia de numerosas co-morbidades e pode ser um fator da patogênese da asma. A hipótese é que o aumento de mediadores inflamatórios

sistêmicos associados a obesidade exacerba a inflamação pulmonar, um componente direto da fisiopatologia da asma<sup>28</sup>.

Acreditamos que a liberação das substâncias pró-inflamatórias pelos adipócitos nos obesos como interleucinas, adipocinas, PCR e TNF- $\alpha$  sejam os responsáveis pelo incremento da função eosinofílica quando estimulados.

Um recente estudo conduzido com ratos desafiados com ovoalbumina mostrou que a obesidade induzida por dieta aumenta a passagem de eosinófilos da medula óssea para o tecido pulmonar, e retarda o trânsito de eosinófilos para o lúmen das vias aéreas, permitindo que essas células permaneçam mais tempo no tecido conectivo ao redor dos brônquios e bronquíolos segmentares dos pulmões<sup>53</sup>. Os níveis de IL-5, eotaxina, TNF- $\alpha$  e IL-10 no lavado brônquio-alveolar dos ratos obesos foram significativamente maiores do que nos ratos magros<sup>53</sup>.

Quando analisamos as dosagens de leptina sérica realizadas nos indivíduos deste estudo confirmamos os dados da literatura com aumento estatisticamente significativo nos grupo dos obesos<sup>28,30,33</sup>.

Estudos em crianças são inconclusivos na associação entre leptina sérica e risco para asma<sup>35</sup>. As pesquisas atuais são com números pequenos de indivíduos: algumas com associação positiva<sup>33,47</sup> e outra com associação negativa<sup>40</sup>.

Wong et al., avaliaram os mecanismos imunopatológicos da ativação de eosinófilos humanos pela leptina no processo inflamatório de voluntários saudáveis. Os resultados sugerem que a leptina regula a apoptose de eosinófilos, melhora a expressão de superfície de ICAM-1 e CD18 e diminui de ICAM-3 e L-selectina. Induz quimiotaxia mediada por RANTES em eosinófilos ativados pela leptina. Acreditam que a leptina pode induzir eosinofilia e acúmulo nos sítios de inflamação como pulmão e vias aéreas pelo aumento de adesão de eosinófilos em células epiteliais brônquicas e subsequente migração para os sítios de inflamação<sup>54</sup>.

Além de ativar propriedades quimiocinéticas pela liberação de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e MCP-1 de eosinófilos mediados pela ativação das vias MAPK, JAK e NF-kB. Concentrações de leptina devem ser significativamente maiores no local da inflamação do que na circulação. Portanto, a leptina ativa os eosinófilos no sítio da inflamação e não na circulação sanguínea<sup>54</sup>.

Essas informações em associação com o efeito anti-apoptótico da leptina sobre os eosinófilos, fornecem novas dicas para elucidação dos mecanismos imunopatológicos da inflamação eosinofílica alérgica relacionada com a obesidade<sup>54</sup>.

A adiponectina, outra adipocina estudada, não apresentou diferença estatística entre os grupos. A adiponectina é secretada pelos adipócitos como forma de baixo peso molecular, como uma combinação de duas isoformas de médio peso molecular ou como seis isoformas de alto peso molecular. As de alto peso molecular são predominantes e são as formas ativas em sangue humano<sup>67</sup>. Então, em estudos futuros, poderia ser interessante realizar a dosagem da adiponectina de alto peso molecular.

Todos os nossos pacientes estavam em seguimento regular no ambulatório de pneumologia pediátrica em uso diário de corticóide inalatório de acordo com a classificação de gravidade com controle clínico da asma segundo critérios do GINA<sup>6</sup>. E apesar desse controle clínico e espirométrico, constatamos o aumento da quimiotaxia e adesão dos eosinófilos periféricos nos indivíduos obesos.

A obesidade parece representar um fenótipo único da asma, caracterizado pelo aumento da utilização dos serviços de saúde, aumento da gravidade, diminuição do controle da doença e da resposta ao uso de corticóides<sup>12</sup>.

Estudos atuais têm demonstrado que a perda de peso é acompanhada de redução da leptina em 19%, PCR em 30%, IL-6 em 25% e aumento da adiponectina em 15%. Mas não existem estudos investigando o impacto da perda de peso em crianças e adolescentes asmáticos<sup>31</sup>.

Novas medicações e marcadores de controle da doença podem surgir relacionados com o entendimento da fisiopatologia do processo inflamatório da obesidade interferindo na asma.

Pesquisas futuras com foco na inflamação, imunologia e genética podem melhor caracterizar esses asmáticos obesos.

Há uma necessidade urgente de melhorarmos o entendimento dos mecanismos envolvidos na relação entre a asma e a obesidade para desenvolvermos estratégias de tratamento e acompanhamento desses pacientes obesos com asma.



## **8- CONCLUSÃO**

Apesar da limitação do estudo pelo tamanho amostral e pela desproporção entre os quatro grupos, concluímos que:

- 1-** A obesidade aumenta a atividade dos eosinófilos pelo ensaio de quimiotaxia em crianças e adolescentes tanto com estímulos de eotaxina, PAF e RANTES, quanto na espontânea;
- 2-** A obesidade aumenta a adesão dos eosinófilos com estímulo da eotaxina em crianças e adolescentes asmáticos;
- 3-** As crianças e adolescentes obesos apresentam maiores níveis de leptina sérica e colesterol total, mas não encontramos diferenças significativas quanto às dosagens de triglicérides, glicemia de jejum e de adiponectina sérica.



## **9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 1- World Health Organization Obesity and overweight. Fact Sheet No 311. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.htm>1. Updated Sep 2006. Last access: 2011 May 15.
- 2- McClean KM, Kee F, Young IS, Elborn JS. Obesity and the lung: 1. Epidemiology. Thorax. 2008;63:649-654.
- 3- Zammit C, Liddicoat H, Moonsie I, Makker H. Obesity and respiratory diseases. Int J Gen Med 2010;3:335-343.
- 4- Camilo DF, Ribeiro JD, Toro AD, Baracat EC, Barros Filho AA. Obesity and asthma: association or coincidence? J Pediatr (Rio J) 2010;86:6-14.
- 5- Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA) [www.ginasthma.org](http://www.ginasthma.org). Date last updated: December 2010. Date last accessed: July 1 2011.
- 6- Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. Global Burden of Asthma: Global Initiative for Asthma;2004.
- 7- Annesi-Maesano I. Epidemiology of asthma in the world and in France. Rev Prat 2011;61:329-35.
- 8- Solé D, Wandalsen GF, Camelo-Nunes IC, Naspitz CK; ISAAC - Grupo Brasileiro. Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and atopic eczema among Brazilian children and adolescents identified by the International Study of Asthma and Allergies (ISAAC) - Phase 3. J Pediatr. 2006;825:341-6.
- 9- Mannino DM, Homa DM, Akinbami LJ, Moorman JE, Gwynn C, Redd SC. Surveillance for asthma: United States, 1980-1999. MMWR Surveill Summ 2002;51:1-13.
- 10- Mallol J, Solé D, Asher I, Clayton T, Stein R, Soto-Quiroz M. Prevalence of asthma symptoms in Latin America: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). Pediatr Pulmonol. 2000;30:439-44.

- 11- Kim HY, DeKruyff R, Umetsu DT. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nature Immunol* 2010;11:577-84.
- 12- Lessard A, Turcotte H, Cormier Y, Boulet LP. Obesity and asthma: a specific phenotype? *Chest* 2008;134:317-23.
- 13- Von Mutius E, Schwartz J, Neas LM, Dockery D, Weiss ST. Relation of body mass index to asthma and atopy in children: the National Health and Nutrition Examination Study III. *Thorax*.2001;56:835-8.
- 14- Figueroa-Munõz JI, Chinn S, Rona RJ. Association between obesity and asthma in 4-11 year old children in the UK. *Thorax* 2001;56:133-7.
- 15- Schachter LM, Peat JK, Salome CM. Asthma and atopy in overweight children. *Thorax*. 2003;58:1031-5.
- 16- van Gent R, van der Ent CK, Rovers MM, Kimpen JL, van Essen-Zandvliet LE, de Meer G. Excessive body weight is associated with additional loss of quality of life in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119:591-6.
- 17- Chu YT, Chen WY, Wang TN, Tseng HI, Wu JR, Ko YC. Extreme BMI predicts higher asthma prevalence and is associated with lung function impairment in school-aged children. *Pediatr Pulmonol* 2009;44:472-9.
- 18- Luder E, Melnik TA, DiMaio M. Association of being overweight with greater asthma symptoms in inner city black and Hispanic children. *J Pediatr*. 1998;132:699-703.
- 19- Mai XM, Nilsson L, Axelson O, Bråbäck L, Sandin A, Kjellman NI, et al. High body mass index, asthma and allergy in Swedish schoolchildren participating in the International Study of Asthma and Allergies in Childhood: Phase II. *Acta Paediatr*. 2003;92:1144-8.
- 20- Vignolo M, Silvestri M, Parodi A, Pistorio A, Battistini E, Rossi GA, et al. Relationship between body mass index and asthma characteristics in a group of Italian children and adolescents. *J Asthma*. 2003;42:185-9.

- 21- Brenner JS, Kelly CS, Wenger AD, Brich SM, Morrow AL. Asthma and obesity in adolescents: is there an association? *J Asthma*. 2001;38:509-15.
- 22- Oddy WH, Sherriff JL, de Klerk NH, Kendall GE, Sly PD, Beilin LJ, et al. The relation of breastfeeding and body mass index to asthma and atopy in children: a prospective cohort study to age 6 years. *Am J Public Health*. 2004;94:1531-7.
- 23- Eijkemans M, Mommers M, de Vries SI, van Buuren S, Stafleu A, Bakker I, et al. Asthmatic symptoms, physical activity, and overweight in young children: a cohort study. *Pediatrics* 2008;121:666-72.
- 24- Flaherman V, Rutherford GW. A meta-analysis of the effect of high weight on asthma. *Arch Dis Child*. 2006;91:334-9.
- 25- Beuther DA, Sutherland ER. Overweight, obesity and incident asthma: a meta-analysis of prospective epidemiologic studies. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:661-6.
- 26- Dixon AE, Holguin F, Sood A, Salome CM, Pratley RE, Beuther DA, et al. On behalf of the American Thoracic Society Ad Hoc. An Official American Thoracic Society Workshop Report: Obesity and Asthma. Subcommittee on Obesity and Lung Disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2010 Sep;7:325-5.
- 27- Noal RB, Menezes AM, Macedo SE, Dumith SC. Childhood body mass index and risk of asthma in adolescence: a systematic review. *Obes Rev* 2011; 12:93-104.
- 28- Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:911-19.
- 29- Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw* 2006;17:4-12.

- 30- Mancuso P. Obesity and lung inflammation. *J Appl Physiol* 2010;108:722-8.
- 31- Jensen ME, Collins CE, Gibson PG, Wood LG. The obesity phenotype in children with asthma. *Paediatr Resp Rev* 2011 [Epub ahead of print].
- 32- Bruno A, Pace E, Chanez P, Gras D, Vachler I, Chiappara G, et al. Leptin and leptin receptor expression. In asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124:230-37.
- 33- Guler N, Kirerleri E, Ones U, Tamay Z, Salmayenli N, Darendeliler F. Leptin: does it have any role in childhood asthma? *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:254-9.
- 34- Harle P, Straub RH. Leptin is a link between adipose tissue and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1069:454-62.
- 35- Sood, A. Obesity, adipokines and lung disease. *J Appl Physiol* 2010; 108:744-53.
- 36- Sood A, Camargo CA, Ford ES. Association between leptina and asthma in adults. *Thorax* 2006;61:300-5.
- 37- Jartti T, Saarikoski, Jartti L, Lisinen I, Jula A, Huupponen R, et al. Obesity, adipokines and asthma. *Allergy* 2009;64:770-7.
- 38- Gurkan F, Atamer Y, Ece A, Kocyigit Y, Tuzun H, Mete N. Serum leptin levels in asthmatic children treated with an inhaled corticosteroid. *Am Allergy Asthma Immunol* 2004;93:277-80.
- 39- Mai X-M, Bötcher M, Leijon I. Leptin and asthma in overweight children at 12 years of age. *Pediatr Allergy Immunol* 2004;15:523-30.
- 40- Kim KW, Shin YH, Lee KE, Kim ES, Sohn MH, Kim KE. Relationship between adipokines and manifestations of childhood asthma. *Pediatr Allergy Immunol* 2008;19:535-40.
- 41- Valle M, Martos R, Gascón F, Cañete R, Zafra M, Morales R. Low-grade systemic inflammation, hypoadiponectinemia and a high concentration of leptin are present in very young children, and correlate of metabolic syndrome. *Diabetes Metab* 2005; 31:55-62.

- 42- Balagopal P, George D, Yarandi H, Funanagre V, Bayne E. Reversal of obesity-related hypoalbuminemia by lifestyle inversion: a controlled, randomized study in obese adolescents. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:6192-7.
- 43- Shin JY, Kim SY, Jeung MJ, Eun SH, Woo CW, Yoon S-Y, et al. Serum adiponectin, C-reactive protein and TNF-alpha levels in obese Korean children. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2008;19:535-40.
- 44- Shore SA. Obesity and asthma: possible mechanisms. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:1087-93
- 45- Shore SA, Terry RD, Flynt L, Xu A, Hug C. Adiponectin attenuates allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness in mice. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:389-95.
- 46- Tilg H, Wolf AM. Adiponectin: a Key fat-derived molecule regulating inflammation. *Expert Opin Ther Targets* 2005;9:245-51.
- 47- Nagel G, Koenig W, Rapp K, Wabitsch M, Zoellner I, Welland SK. Associations of adipokines with asthma, rhinoconjunctivitis, and eczema in German schoolchildren. *Pediatr Allergy Immunol* 2009;20:81-8.
- 48- Sood A, Cui X, Qualls C, Beckett WS, Gross MD, Steffes MW, et al. Association between asthma and serum adiponectin concentration in women. *Thorax* 2008;63:877-82.
- 49- Medoff BD, Okamoto Y, Leyton P, Weng M, Sandal BP, Raheer MJ, et al. Adiponectin deficiency increases allergic airway inflammation and pulmonary vascular remodeling. *Am J Resp Cell Mol Biol* 2009;41:397-406.
- 50- Wood L, Scott H, Garg M, Gibson P. Innate immune mechanisms linking non-esterified fatty acids and respiratory disease. *Prog Lipid Res* 2009;48:27-43.
- 51- Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature* 2008;454:445-54.

- 52- Park YM, Bochner BS. Eosinophil survival and apoptosis in health and disease. Review. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2010;2:87-101.
- 53- Calixto MC, Lintomen L, Schenka A, Saad MJ, Zanesco A, Antunes E. Obesity enhances eosinophilic inflammation in a murine model of allergic asthma. *British J Pharmacol* 2010;159:617-25.
- 54- Wong CK, Cheung PFY, Lam CWK. Leptin-mediated cytokine release and migration of eosinophils: implications for immunopathophysiology of allergic inflammation. *Eur J Immunol* 2007;37:2337-48.
- 55- Kampen GT, Stafford S, Adachi T, Jinquan T, Quan S, Grant JA, et al. Eotaxin induces degranulation and chemotaxis of eosinophils through the activation of ERK2 and p38 mitogen-activated protein kinases. *Blood* 2000;95:1911-7.
- 56- Chu YT, Chiang W, Wang TN, Hung CH, Jong YJ, Wu JR. Changes in serum eotaxin and eosinophil cationic protein levels, and eosinophil count during treatment of childhood asthma. *J Microbiol Immunol Infect* 2007;40:162-7.
- 57- National Asthma Education and Prevention Program. NAEP expert panel report guidelines for the diagnosis and management of asthma-update on selected topics 2002. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110(5 Suppl):S141-S219.
- 58- Hansel TT, De Vries IJM, Iff T. An improved immunomagnetic procedure for the isolation of highly purified human blood eosinophils. *J Immunol Methods* 1991;145:105-10.
- 59- Richards KL, McCullough J. A modified microchamber method for chemotaxis and chemokines. *Immunol Commum.* 1984;13:49-62.
- 60- Nagata M, Swdgwick JB, Bates ME. Eosinophil adhesion to vascular cell adhesion molecule-1 activates superoxide anion generation. *J Immunol.* 1995;155:2194-202.
- 61- The expertise of Upstate, Chemicon & Linco. Millipore Company. [www.millipore.com](http://www.millipore.com). Date last updated 2011. Date last accessed: Jan 10 2011.

62- Sin DD, Sutherland ER. Obesity and the lung:4 - Obesity and asthma. Thorax 2008;63:1018-23.

63- Consilvio NP, Di Pillo S, Verini M, de Giorgis T, Cingolani A, Chiavaroli V, et al. The reciprocal influences of asthma and obesity on lung function testing, AHR, and airway inflammation in pre pubertal children. Pediatr Pulmonol 2010;29:1-8.

64- Sood A, Verhulst SJ, Varma A, Eagleton LE, Henkle JQ, Hopkins-Price P. Association of excess weight and degree of airway responsiveness in asthmatics and non-asthmatics. J Asthma 2006;43:447-52.

65- Szczepankiewicz A, Breborowicz A, Sobkowiak P, Popiel A. Are genes associated with energy metabolism important in asthma and BMI? J Asthma 2009;46:53-68.

66- Sung K-LP, Yang L, Kim J, Ko D, Stachnick G, Castaneda D, et al. Eotaxin induces a sustained reduction in the functional adhesive state of very late antigen 4 for the connecting segment 1 region of fibronectin. J Allergy Clin Immunol 2000, 106:933-940.

67- Lecke SB, Morsch DM, Spritzer PM. Leptin and adiponectin in the female life course. Braz J Med Biol Res 2011;44:381-7.



## **10- ANEXOS**





## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A obesidade está causando aumento do número de pessoas com asma, além de aumentar a gravidade das crises e a persistência dos sintomas.

Por isso estamos fazendo um estudo para avaliar a asma de seu filho(a) associada com a obesidade.

A gravidade da asma será considerada através da história clínica e do teste de espirometria que seu filho(a) já está acostumado a fazer no CIPED. A medicação para asma usada diariamente não será alterada durante a pesquisa.

A obesidade será avaliada através do índice de massa corporal que é calculado pelo peso dividido pela altura<sup>2</sup>.

Em uma mesma coleta serão colhidos 5ml de sangue para dosagem de IgE (anticorpo responsável pela alergia), colesterol total e frações, triglicérides, glicemia de jejum, leptina (hormônio aumentado na obesidade que piora as crises de asma) e adiponectina (substância que está diminuída na obesidade e pode piora os sintomas da asma); e mais 20ml de sangue para testes laboratoriais que irão avaliar a atividade dos eosinófilos, células presentes no sangue que estão aumentadas nas pessoas alérgicas e são responsáveis pela liberação de substâncias que desencadeiam os sintomas da asma quando em contato com alergenos como pó, ácaros, pêlos e penas, dentre outros.

Esses eosinófilos podem estar com suas atividades aumentadas devido a obesidade. Isto porque, as células de gordura liberam substâncias inflamatórias para corrente sanguínea que podem ser responsáveis pela piora das suas crises de asma.

Estas informações poderão ajudar a entender melhor sobre a relação da asma com a obesidade e poderá ajudar seu filho(a) e outras crianças em reduzir os sintomas desta doença.

Você tem todo direito em aceitar ou recusar em participar deste projeto. A recusa ou necessidade de sair do projeto em qualquer momento não implicará no comprometimento do atendimento de seu filho(a) no ambulatório de Pneumologia infantil do HC- Unicamp.

Contamos com a sua colaboração.

**Para menores de 18 anos**

Eu \_\_\_\_\_  
autorizo meu filho(a) \_\_\_\_\_  
portador do HC \_\_\_\_\_ a participar do projeto de pesquisa sobre a relação  
da asma com a obesidade descrito acima.

Campinas, \_\_\_\_\_ 2010

\_\_\_\_\_  
Pai ou responsável legal

**Para maiores de 18 anos**

Eu \_\_\_\_\_  
portador do HC \_\_\_\_\_ concordo em participar do projeto de pesquisa  
sobre a relação da asma com a obesidade descrito acima.

Campinas, \_\_\_\_\_ 2010

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Telefones para contato:

Dra Milena B. Grottaou, Dr José Dirceu Ribeiro (19)3521-7646

Comitê de Ética em pesquisa (19)3521-8846

## FICHA DE COLETA DE DADOS

### 1- Identificação:

Nome \_\_\_\_\_

HC \_\_\_\_\_ Idade \_\_\_\_\_

### 2- Asma brônquica:

Classificação: \_\_\_\_\_

Quadro clínico: \_\_\_\_\_

Antecedentes familiares: \_\_\_\_\_

Medicação em uso: \_\_\_\_\_

Dosagem de IgE: \_\_\_\_\_

Espirometria: CVF: \_\_\_\_\_ VEF1 \_\_\_\_\_ CVF/FEV1 \_\_\_\_\_ FEF 25-75 \_\_\_\_\_

Pós BD: CVF: \_\_\_\_\_ VEF1 \_\_\_\_\_ CVF/FEV1 \_\_\_\_\_ FEF 25-75 \_\_\_\_\_

### 3- Obesidade:

IMC: \_\_\_\_\_ Percentil da curva de IMC \_\_\_\_\_

Dosagem sérica: Colesterol total \_\_\_\_\_ HDL \_\_\_\_\_ VLDL \_\_\_\_\_ LDL \_\_\_\_\_

Triglicérides: \_\_\_\_\_

Glicemia de jejum: \_\_\_\_\_

Curva glicêmica: \_\_\_\_\_

Leptina: \_\_\_\_\_

Adiponectina: \_\_\_\_\_

### 4- Fase laboratorial:

Contagem de eosinófilos: \_\_\_\_\_

Adesão: \_\_\_\_\_

Quimiotaxia: \_\_\_\_\_

## PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

☎ [www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

CEP, 28/06/10  
(Grupo III)

PARÊCER CEP: N° 352/2010 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)  
CAAE: 0269.0.146.000-10

### I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO EOSINOFÍLICA EM ESCOLARES E ADOLESCENTES ASMÁTICOS ATÓPICOS OBESOS E NÃO OBESOS NOS VÁRIOS FENÓTIPOS DE GRAVIDADE DA ASMA".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Milena Baptistella Grotta

INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 03/05/2010

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 28/06/11 (O formulário encontra-se no site acima)

### II - OBJETIVOS

Avaliar a atividade inflamatória dos obesos em crianças asmáticas atópicas comparando com as crianças asmáticas não obesas.

### III - SUMÁRIO

Estudo de caso controle com avaliação clínica e laboratorial em crianças e adolescentes obesas e não obesas com asma brônquica atópica, seguidas no Ambulatório de Pneumologia Infantil do HC-Unicamp. Serão incluídos os pacientes de 6 a 20 anos com diagnóstico de asma brônquica atópica confirmada por história clínica e serão excluídas as crianças menores de 6 anos. Serão colhidos 20 ml de sangue para as provas laboratoriais.

### IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

### V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

---

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP  
Rua: Teófilo Vieira de Camargo, 126  
Caixa Postal 6118  
13083-887 Campinas - SP

FONE (019) 3521-0936  
FAX (019) 3521-7187  
cep@fcm.unicamp.br



## VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delimitada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

## VII- DATA DA REUNIÃO

Homologado na V Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 25 de maio de 2010.

  
**Profa. Dra. Carmén Silvia Bertuzzo**  
VICE-PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP



## **11- APÊNDICES**

## CARTA DE ACEITE PARA O CONGRESSO EUROPEU DE PNEUMOLOGIA-2011



Thursday 22 September 2011

Dear Dr. Baptistella Grotta,

We are pleased to inform you that your abstract entitled: "**Chemotaxis and adhesion from peripheral eosinophils in atopic asthmatic children with and without obesity**" has been selected for presentation in Thematic Poster Session entitled "**Biological correlates and comorbidities of childhood asthma/allergy**" at the ERS Amsterdam 2011 Congress. The session will be held on **Tuesday, 27.09.2011** from 12:50 to 14:40 in "**Hall 2-37**".

Read carefully the instructions on how to prepare your abstract presentation on our website:  
[www.ersnet.org/instructions-A2011](http://www.ersnet.org/instructions-A2011)

In order to increase the visibility of your abstract during the congress, authors of an accepted abstract will be encouraged to create an electronic version of their work, called E-Poster. A database with all E-Posters will be accessible throughout the congress at the E-Poster area onsite. A personal **password and login** (that will be sent to [milgrotta@hotmail.com](mailto:milgrotta@hotmail.com)) to access the link and create your E-Poster online will be sent to you in July as well as E-Poster creation guidelines and poster models to help you in the process. Every delegate can access the platform, consult and comment your E-Poster during the Congress. *N.B. the creation of E-Poster is mandatory for author presenting their abstract in a Poster Discussion session.*

We would like to point out that:

1. At least one of the authors (the presenting author) must be a registered participant at the Congress. In order to register, please go to: [www.erscongress2011.org/index.php/home/registration.html](http://www.erscongress2011.org/index.php/home/registration.html).
2. No changes can be made to the abstracts.
3. Real or perceived conflicts of interest that relate to your presentation have to be disclosed when presenting your abstract (on poster or on slide presentation) and on your E-Poster.
4. If, for any reason, you have to cancel your presentation, it is important that you notify us immediately. Please use the following contact details:
  - To cancel your abstract presentation both in the *Final Programme* and the *Abstract Book*: ERS Scientific Dept. in Lausanne, by fax: +41 21 213 01 03; or by e-mail: [scientific@ersnet.org](mailto:scientific@ersnet.org)
  - To cancel your registration to the Congress: KIT Group by e-mail: [ers2011registration@kit-group.org](mailto:ers2011registration@kit-group.org)

If you will not be the one presenting the abstract, we would be grateful if you could pass on the information in this letter to the person concerned.

Yours sincerely,  
ERS Scientific Activities department on behalf of

Laurent-Pierre Nicod, Scientific Committee Chair

**N.B. No-shows:**

Every year, a number of authors with accepted abstracts fail to attend the Congress or to present their work. We wish to remind you that if you do not show up, or do not have a co-author present in your place, you may not be invited to present your work at future ERS meetings.

Thursday 22 September 2011

Dear Dr. Baptistella Grotta,

We are pleased to inform you that your abstract entitled: "**Chemotaxis and adhesion from peripheral eosinophils in atopic asthmatic children with and without obesity**" has been selected for presentation in Thematic Poster Session entitled "**Biological correlates and comorbidities of childhood asthma/allergy**" at the ERS Amsterdam 2011 Congress. The session will be held on **Tuesday, 27.09.2011** from **12:50 to 14:40** in "**Hall 2-37**".

Read carefully the instructions on how to prepare your abstract presentation on our website:  
[www.ersnet.org/instructions-A2011](http://www.ersnet.org/instructions-A2011)

In order to increase the visibility of your abstract during the congress, authors of an accepted abstract will be encouraged to create an electronic version of their work, called E-Poster. A database with all E-Posters will be accessible throughout the congress at the E-Poster area onsite. A personal **password** and **login** (that will be sent to [milgrotta@hotmail.com](mailto:milgrotta@hotmail.com)) to access the link and create your E-Poster online will be sent to you in July as well as E-Poster creation guidelines and poster models to help you in the process. Every delegate can access the platform, consult and comment your E-Poster during the Congress. *N.B. the creation of E-Poster is mandatory for author presenting their abstract in a Poster Discussion session.*

We would like to point out that:

1. At least one of the authors (the presenting author) must be a registered participant at the Congress.

In order to register, please go to: [www.erscongress2011.org/index.php/home/registration.html](http://www.erscongress2011.org/index.php/home/registration.html).

2. No changes can be made to the abstracts.

3. Real or perceived conflicts of interest that relate to your presentation have to be disclosed when presenting your abstract (on poster or on slide presentation) and on your E-Poster.

4. If, for any reason, you have to cancel your presentation, it is important that you notify us immediately.

Please use the following contact details:

- To cancel your abstract presentation both in the *Final Programme* and the *Abstract Book*:

ERS Scientific Dept. in Lausanne, by fax: +41 21 213 01 03; or by e-mail: [scientific@ersnet.org](mailto:scientific@ersnet.org)

- To cancel your registration to the Congress: KIT Group by e-mail: [ers2011registration@kit-group.org](mailto:ers2011registration@kit-group.org)

If you will not be the one presenting the abstract, we would be grateful if you could pass on the information in this letter to the person concerned.

Yours sincerely,

ERS Scientific Activities department on behalf of



Laurent-Pierre Nicod, Scientific Committee Chair

**N.B. No-shows:**

Every year, a number of authors with accepted abstracts fail to attend the Congress or to present their work. We wish to remind you that if you do not show up, or do not have a co-author present in your place, you may not be invited to present your work at future ERS meetings.

## APRESENTAÇÃO NO CONGRESSO BRASILEIRO DE ASMA



# Certificado

Certificamos que o trabalho intitulado

QUIMIOTAXIA E ADEÇÃO DE EOSINÓFILOS PERIFÉRICOS EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES ASMÁTICOS COM E SEM OBESIDADE. de autoria de MILENA BAPTISTELLA GROTTA; JOSE DIRCEU RIBEIRO; SILVIA DE BARROS MAZON; ADYLEIA APARECIDA DALBO CONTRERA TORO; DALIZE SQUEBOLA; EDSON ANTUNES foi apresentado durante o VIII Congresso Brasileiro de Asma, IV Congresso Brasileiro de DPOC e IV Congresso Brasileiro de Tabagismo.

Porto de Galinhas - PE, 27 de agosto de 2011.

  
Roberto Stirbulov  
Presidente da SBPT

  
Sociedade Brasileira de  
Pneumologia e Tisiologia

Realização:

  
Gerriando Lundgren  
Presidente dos Congressos

  
Apoio:

  
Patrocínio: **NOVARTIS**

## COMPROVANTE DE SUBMISSÃO AO EUROPEAN RESPIRATORY JOURNAL

ScholarOne Manuscripts http://mc.manuscriptcentral.com/erj

[Edit Account](#) | [Instructions & Forms](#) | [Log Out](#)

[Main Menu](#) - [Author Dashboard](#) - [Submission Confirmation](#) You are logged in as Milena Grotta

### Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *European Respiratory Journal*.

Manuscript ID: ERJ-01598-2011  
Title: Obesity increases eosinophil activity in asthmatic children and adolescents  
Authors: Grotta, Milena  
Ribeiro, Jose  
Squebola, Dalize  
Ribeiro, Maria  
Toro, Adyleia  
Mazon, Silvia  
Antunes, Edson  
Date Submitted: 14-Sep-2011

ScholarOne Manuscripts™ v4.7.0 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2011. All Rights Reserved.  
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.

[Follow ScholarOne on Twitter](#)

[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#)