



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

Edith Bastos Gandra Tavares

EFEITOS DO TRATAMENTO COM RESOLVINA D1 NA
INFLAMAÇÃO ALÉRGICA EOSINOFÍLICA EM
CAMUNDONGOS MAGROS E OBESOS

CAMPINAS

2017

Edith Bastos Gandra Tavares

Efeitos do tratamento com resolvina D1 na inflamação alérgica
eosinofílica em camundongos magros e obesos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos para obtenção do Título de
Mestra em Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Edson Antunes

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA EDITH BASTOS GANDRA TAVARES,
E ORIENTADO PELO PROF. DR. EDSON ANTUNES.

CAMPINAS
2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 131095/2014-5

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

T197e Tavares, Edith Bastos Gandra, 1986-
Efeitos do tratamento com resolvina D1 na inflamação alérgica eosinofílica em camundongos magros e obesos / Edith Bastos Gandra Tavares. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Edson Antunes.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Asma. 2. Obesidade. 3. Resolvinas. I. Antunes, Edson, 1960-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effects of resolvins D1 treatment on eosinophilic allergic inflammation in lean and obese mice

Palavras-chave em inglês:

Asthma

Obesity

Resolvins

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Mestra em Farmacologia

Banca examinadora:

Edson Antunes [Orientador]

Heloísa Helena de Araújo Ferreira

Maria Elisa Lopes Pires

Data de defesa: 10-02-2017

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

EDITH BASTOS GANDRA TAVARES

ORIENTADOR: PROF. DR. EDSON ANTUNES

MEMBROS:

- 1. PROF. DR. EDSON ANTUNES**
- 2. PROF. DR^a HELOÍSA HELENA DE ARAÚJO FERREIRA**
- 3. PROF. DR. ^a MARIA ELISA LOPES PIRES**

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

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica da aluna.

Data: 10 DE FEVEREIRO DE 2017

Dedicatória

A Deus por guiar meus passos e iluminar meu caminho. Em todos os momentos foi Sua força que me fez superar as dificuldades e chegar até aqui.

A minha mãe Marina por me incentivar diariamente, pelo carinho, amizade, confiança e doçura. Obrigada por ser simplesmente você.

Ao meu pai Paulo por seu exemplo de dedicação e amor. Obrigada pela confiança e pelo cuidado constante.

A minha irmã Júlia que sempre esteve ao meu lado. Obrigada por cuidar de mim e ser meu porto seguro.

Ao Thalís, por me fazer ver as coisas de uma forma mais tranquila. Seu carinho e amor foram fundamentais.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Edson Antunes meu enorme agradecimento por todo ensinamento, incentivo, paciência e compreensão. Obrigada pela oportunidade de realizar este trabalho em seu laboratório.

À Dra. Marina Calixto, meu mais sincero agradecimento pela amizade construída, pelos ensinamentos divididos, apoio, incentivo e acolhimento. Você é peça fundamental nessa conquista e tenho muita alegria em dividi-la com você.

A Diana pelas oportunidades, ensinamentos, ajuda, pelo carinho e amizade. Obrigada por estar sempre presente, você se tornou uma grande amiga.

Ao Cristiano, pela amizade e pela colaboração na realização da técnica TUNEL.

À Dra. Gláucia, agradeço pela amizade construída, a ajuda em todos os momentos, as conversas, conhecimentos divididos e apoio.

Ao professor Dr. Marco Antônio de Oliveira pelos ensinamentos e ajuda na técnica de histologia.

Às amigas do Departamento de Farmacologia, Carol Naime, Gisele, Maria Elisa, pela amizade, carinho e por tornar minha vida bem mais alegre e divertida.

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

Aos animais, seres fundamentais para a realização dos protocolos experimentais.

Ao CNPq pelo importantíssimo apoio financeiro.

A tia Carminha por estar comigo em todos os momentos e me querer tão bem. Obrigada por me receber em sua casa e tornar minha chegada em Campinas mais leve. Você se tornou uma segunda mãe.

A toda minha família de Campinas, principalmente aos primos Gui, Nádia, Laura, Léo e Vicente por alegrarem meus dias e estarem sempre presentes.

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

RESUMO

Asma é um problema de saúde pública com alta prevalência mundial. É uma doença crônica das vias aéreas, caracterizada por acúmulo de células inflamatórias, especialmente eosinófilos. Obesidade é considerada uma doença de proporções alarmantes, sendo fator agravante para a asma pré-existente. Ainda não há consenso sobre a causalidade e os mecanismos envolvidos nessa relação. Durante a inflamação, o ácido docosahexaenóico (DHA), um derivado do ômega-3, passa por transformações enzimáticas originando mediadores pró-resolução, incluindo as resolvinas da série-D. Estudos demonstraram que a Resolvina D1 (RvD1) é capaz de inibir a atividade de neutrófilos e a produção de citocinas, apresentando ação anti-inflamatória e pró-resolução nas vias aéreas de camundongos asmáticos. Sabe-se que o perfil inflamatório de camundongos asmáticos magros e obesos é diferente, e que o processo de resolução no animal obeso encontra-se prejudicado. No presente estudo propomos estudar o efeito do tratamento com RvD1 na exacerbação da asma em camundongos obesos por indução de dieta hiperlipídica. Foram utilizados camundongos C57BL/6 alimentados com dieta padrão (grupo controle) ou dieta hiperlipídica por 12 semanas (grupo obeso). Na 10^a e 11^a semanas, os animais foram sensibilizados com ovalbumina (OVA). Posteriormente os animais foram desafiados durante 4 dias com OVA na 12^a semana. Grupos de camundongos obesos e controles foram tratados com RvD1 (5 µg/kg via intraperitoneal, durante os 4 dias de desafio). A coleta do lavado broncoalveolar (LBA) e pulmão para análises histológicas foi realizada 4 e 8 dias após o desafio com OVA. Nossos resultados mostraram que nos animais magros, após 4 dias do término do tratamento, RvD1 diminuiu o infiltrado de células inflamatórias totais e eosinófilos nos compartimentos perivascular e peribronquiolar do tecido pulmonar, e concomitante aumento do infiltrado eosinofílico no LBA. Aos 8 dias foi observada diminuição no infiltrado inflamatório nos 3 compartimentos. Os níveis de IL-5, eotaxina e IL-10, assim como o número de células apoptóticas no tecido pulmonar desses animais diminuíram de forma significativa. Nos animais obesos tratados com RvD1 não foi observada alteração no infiltrado celular total no compartimento perivascular após 4 dias, enquanto após 8 dias houve aumento. No compartimento peribronquiolar, aos 4 dias, houve aumento no infiltrado celular total seguido de diminuição após 8 dias. O tratamento não modificou o infiltrado celular total no LBA em 4 e 8 dias. A avaliação do infiltrado eosinofílico aos 4 dias mostrou redução no compartimento perivascular, e aumento aos 8 dias. No compartimento peribronquiolar, o infiltrado eosinofílico foi maior em relação aos animais obesos em 4 e 8 dias. Quanto ao LBA é observado aumento após 8 dias do tratamento. Os níveis de IL-5, IL4 e IL-10 no LBA assim com o número de células apoptóticas no tecido pulmonar de obesos não foram alterados pelo tratamento com RvD1. Baseado em nossos resultados e somado aos dados já relatados anteriormente na literatura, podemos sugerir que a RvD1 (5 µg/kg), quando usada em camundongos magros com inflamação alérgica eosinofílica, apresenta ação anti-inflamatória e pró-resolução. Entretanto, em camundongos obesos, a resposta ao mesmo tratamento é diferente, levantando novas hipóteses para o entendimento da relação asma e obesidade.

Palavras-chave: Asma; obesidade; resolvinas.

ABSTRACT

Asthma is a public health problem with high global prevalence. It is a chronic disease of the airways, characterized by accumulation of inflammatory cells, especially eosinophils. Obesity is considered a disease of alarming proportions, being an aggravating factor for pre-existing asthma. There is still no consensus on the causality and mechanisms involved in this relationship. During inflammation, docosahexaenoic acid (DHA), an omega-3 derivative, undergoes enzymatic transformations leading to generation of resolution mediators, including D-series resolvins. A previous study in asthmatic mice has shown that resolvin D1 (RvD1) inhibits neutrophils and production of cytokines, thus exhibiting anti-inflammatory and pro-resolution actions in the airways. It is known that the inflammatory profile in obese asthmatic mice greatly differ from the lean group, suggesting that the resolution process in obese animal is impaired. In the present study we propose to study the effect of treatment with RvD1 on the exacerbation of asthma in high fat diet-fed obese mice. We used C57BL / 6 mice fed with standard diet (control group) or high fat diet for 12 weeks (obese group). At the 10th and 11th weeks, the animals were sensitized with ovalbumin (OVA). Next, the animals were challenged for 4 days with OVA at week 12. Groups of obese mice and controls were treated with RvD1 (5 µg / kg intraperitoneally, concomitant with the 4-days OVA challenge). The collection of bronchoalveolar lavage (BAL) and lung for histological analysis was performed at 4 and 8 days after OVA challenge. Our results showed that in lean animals at 4 days, RvD1 significantly decreased the infiltration of total inflammatory cells and eosinophils in the perivascular and peribronchiolar compartments of the lung tissue, and concomitantly increased the eosinophilic infiltrate in BAL. At 8 days, a significant decrease of the inflammatory infiltrate was observed in the three compartments studied (perivascular, peribronchiolar and BAL). The levels of IL-5, eotaxin and IL-10 as well as the number of apoptotic cells in the lung tissue of lean mice decreased significantly by RvD1 treatment. In obese mice, RvD1 treatment had no significant effect in the total cell infiltrate in the perivascular compartment at 4 days, while at 8 days there was increase in this parameter. In the peribronchiolar compartment at 4 days there was increase in total cellular infiltrate and a decrease at 8 days. The treatment with RvD1 did not modify the total cellular infiltrate in BAL at 4 and 8 days. With regard the eosinophilic infiltrate at 4 days there was a reduction by RvD1 in the perivascular compartment, increasing significantly at 8 days. In the peribronchiolar compartment, the eosinophilic infiltrate significantly increased by RvD1 at 4 and 8 days. Regarding BAL, an increase was observed at 8 days. Levels of IL-5, IL4 and IL-10 in BAL as well as the number of apoptotic cells in lung tissue of obese mice were not altered by RvD1 treatment. Taken together, we suggest that RvD1 display anti-inflammatory and pro-resolution action in airways of allergic lean mice. On the other hand, in obese mice, RvD1 treatment generally enhanced the allergic airways responses. New hypothesis may be raised to explain the influence of RvD1 in the asthma of obese individuals.

Keywords: Asthma; obesity; resolvins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Biossíntese e estrutura das resolvinas, protectinas e maresinas geradas enzimaticamente a partir do DHA.....	26
Figura 2: Protocolo de sensibilização e desafio com ovalbumina (OVA) em camundongos controles e obesos, tratados ou não com RvD1 (5 µg/kg, intraperitoneal, I.P.).....	31
Figura 3: Número de células inflamatórias totais nas regiões perivascular e peribronquiolar no tecido pulmonar e lavado broncoalveolar (LBA) de camundongos magros, tratados ou não com resolvina D1 (RvD1; dose 5 µg/kg).....	35
Figura 4: Número de eosinófilos nas regiões perivascular e peribronquiolar do tecido pulmonar e LBA de camundongos magros, tratados ou não com resolvina D1 (RvD1; dose 5 µg/kg).....	36
Figura 5: Fotomicrografia representativa do efeito do tratamento com resolvina D1 (RvD1; 5 µg/kg) sobre o número de células inflamatórias e eosinófilos no tecido pulmonar de camundongos magros aos 4 dias após tratamento.....	37
Figura 6: Efeito do tratamento com resolvina D1 (RvD1; 5 µg/kg) sobre o número de células apoptóticas no tecido pulmonar de camundongos magros aos 4 dias após tratamento.....	38
Figura 7: Efeito do tratamento com resolvina D1 (RvD1; 5 µg/Kg) nos níveis de IL-4 (Painel A), IL-5 (Painel B), eotaxina (Painel C) e IL-10 (Painel D) no lavado broncoalveolar (LBA) de camundongos magros.....	39
Figura 8: Número de células inflamatórias totais nas regiões perivascular e peribronquiolar no tecido pulmonar e lavado broncoalveolar (LBA) de camundongos obesos, tratados ou não com resolvina D1 (RvD1; dose 5 µg/kg).....	41
Figura 9: Número de eosinófilos nas regiões perivascular e peribronquiolar do tecido pulmonar e LBA de camundongos obesos, tratados ou não com resolvina D1 (RvD1; dose 5 µg/kg).....	42
Figura 10: Fotomicrografia representativa do efeito do tratamento com resolvina D1 (RvD1; 5 µg/kg) sobre o número de células inflamatórias e eosinófilos no tecido pulmonar aos 4 dias após o tratamento.....	43

Figura 11: Efeito do tratamento com resolvina D1 (RvD1; 5 µg/kg) no número de células apoptóticas no tecido pulmonar de camundongos obesos aos 4 dias após tratamento.....44

Figura 12: Efeito do tratamento com resolvina D1 (RvD1; 5 µg/Kg) nos níveis de IL-4 (Painel A), IL-5 (Painel B), eotaxina (Painel C) e IL-10 (Painel D) no lavado broncoalveolar (LBA) de camundongos obesos.....45

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AAS	Ácido acetilsalicílico
AGPI	Ácidos graxos poliinsaturados
ALA	Ácido alfa-linolênico
ALX	Receptor de lipoxina
BSA	Albumina bovina sérica
FRP2	N-formyl peptide receptor 2
CCR3	Receptor para eotaxina
CD 34+	Cluster of Differentiation 34
COX-2	Ciclooxigenase 2
CRTH2	Chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2
DHA	Ácido docosahexaenóico
DP/DP1	Receptor D prostanóide
ECP	Proteína catiônica do eosinófilo
EDN	Neurotoxina derivada do eosinófilo
EPA	Ácido eicosapentaenóico
EPO	Peroxidase do eosinófilo
EROS	Espécies reativas de oxigênio
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
IgE	Imunoglobulina E
IL1- β	Interleucina 1- β
IL-4	Interleucina 4

IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-9	Interleucina 9
IL-13	Interleucina 13
IL-10	Interleucina 10
IMC	Índice de massa corpórea
LBA	Lavado broncoalveolar
LC/MS/MS	Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas
LXA4	Lipoxina A4
MBP	Proteína básica principal
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos1
OVA	Ovalbumina
PGD2	Prostaglandina D2
PGDS	Prostaglandina D2 sintase
PGE2	Prostaglandina E2
PMN	Polimorfonucleares
RvD1	Resolvina D1
Th2	T helper 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
TP	Receptor de tromboxano A2
TUNEL	Terminal deoxinucleotidil transferase Uracil Nick End Labeling

PROCEDÊNCIA DAS SUBSTÂNCIAS

Ácido acético glacial	J.T. Baker (Eldorado, México)
Ácido cítrico	CETUS (Santo Amaro, Brasil)
Ácido Sulfúrico	Labsynth (Diadema, Brasil)
Álcool (70% - 100%)	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Al(OH) ₃	Sanofi-synthelabo (Rio de Janeiro, Brasil)
Bovine serum albumin.	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
CaCl ₂ .2H ₂ O	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Corante hematológico	Laboclin Ltda (Pinhais, Brasil)
Cristal de violeta	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Ethylenediamine tetraacetic acid	J.T. Baker (Phillipsburg, USA)
Formaldeído (37%)	CETUS (Santo Amaro, Brasil)
Fosfato de potássio	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
HCl	CETUS (Santo Amaro, Brasil)
H/E	Laboclin Ltda (Pinhais, Brasil)
H ₂ O ₂	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
H ₂ SO ₄	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
KCl	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
KH ₂ PO ₄	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Kit mouse Eotaxina	R&D Systems™ (Minneapolis, EUA)
Kit mouse IL-4	R&D Systems™ (Minneapolis, EUA)
Kit mouse IL-5	R&D Systems™ (Minneapolis, EUA)

Kit mouse IL-10	R&D Systems™ (Minneapolis, EUA)
Kit TUNEL	Merck Millipore, (Darmstadt – Alemanha)
Leitor de microplacas	Multiscan Labsystems (USA)
Metanol	Merck (Darmstadt, Alemanha)
NaCl	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Na ₂ CO ₃	Merck (Darmstadt, Alemanha)
NaHCO ₃	Merck (Darmstadt, Alemanha)
NaHPO ₄	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Na ₂ HPO ₄	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Óleo de imersão p/ microscopia	Merck (Darmstadt, Alemanha)
OVA (grau V)	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Paraformaldeído	Sigma (EUA)
Resolvina D1	Cayman Chemical (EUA)
Solução fisiológica 0,9%	EQUIPLEX® (Aparecida de Goiânia, Brasil)
Tris	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Tween 20	Sigma (EUA)
Xilol	Labsynth (Diadema, Brasil)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Asma	17
1.1.1. Patogênese da asma	18
1.1.2. Eosinófilos e asma	19
1.2. Obesidade	19
1.3. Obesidade e asma	21
1.4. Processo inflamatório e resolução	22
1.5. Mediadores lipídicos	24
1.6. Resolvinas	26
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivos específicos	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1. Animais	30
3.2. Indução da obesidade com dieta hiperlipídica	30
3.3. Sensibilização com ovalbumina (OVA) e desafio intranasal	30
3.4. Tratamento com Resolvina D1	31
3.5. Coleta e contagem das células no LBA	32
3.6. Análise morfológica	32
3.7. Teste de TUNEL	33
3.8. Dosagens de citocinas e quimiocinas no LBA	33
3.9. Análise estatística	33
4. RESULTADOS	34
4.1. CAMUNDONGOS MAGROS	34
4.1.1. Camundongos <u>magros</u> tratados com RvD1: Número de células totais	34
4.1.2. Camundongos <u>magros</u> tratados com Resolvina D1: Número de eosinófilos	34
4.1.3. Avaliação da apoptose no tecido pulmonar em camundongos <u>magros</u>	37
4.1.4. Avaliação dos níveis de Il-4, IL-5,IL-10 e eotaxina no LBA em camundongos magros	37
4.2. CAMUNDONGOS OBESOS	40
4.2.1. Camundongos <u>obesos</u> tratados com RvD1: Número de células totais	40
4.2.2. Camundongos <u>obesos</u> tratados com RvD1: Número de eosinófilos	40
4.2.3. Avaliação da apoptose no tecido pulmonar em camundongos <u>obesos</u>	43

4.2.4. Avaliação dos níveis de IL-4, IL-5, IL-10 e eotaxina no LBA	43
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÕES	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
8. ANEXO	71

1. INTRODUÇÃO

1.1 Asma

A asma é considerada uma das doenças inflamatórias crônicas mais comuns, sendo um problema de saúde pública mundial, atingindo 300 milhões de indivíduos de todas as idades. A prevalência da doença e os custos com esta doença são elevados, representando de 1% a 2% do orçamento da saúde em países desenvolvidos (1).

Os países da América Latina, incluindo o Brasil, vêm sofrendo com o rápido processo de mudança na população, que inclui urbanização, migração, desenvolvimento econômico e a adoção do moderno estilo de vida. Neste contexto, a asma e as doenças alérgicas estão entre os principais problemas de saúde pública em ascensão, principalmente na população infantil (2,3). No Brasil, estima-se que cerca de 18 milhões de indivíduos sejam asmáticos (aproximadamente 10% da população). Conforme dados do DATASUS (4), em 2008 a asma foi a 3ª causa de internações hospitalares pelo SUS, com cerca de 300 mil hospitalizações. O subdiagnóstico ao lado do tratamento inadequado levam a morbidade e mortalidade significativos.

A elevada prevalência da doença tem sido atribuída à urbanização, caracterizada pela poluição, tabagismo passivo, dieta desequilibrada, e outras mudanças no estilo de vida (5). Além disso, o sobrepeso/obesidade tem sido associado a um maior fator de risco para o desenvolvimento de asma (6).

As crises de asma podem não ser constantes ao longo do curso de vida do paciente, podendo existir períodos de remissão (7). As razões para essa variabilidade não são claras, mas há evidência que idade, sexo e uso de cigarro desempenham papel fundamental neste processo (7).

A asma alérgica é uma doença heterogênea complexa, e caracteriza-se por obstrução e inflamação das vias aéreas além de hiperreatividade brônquica a vários estímulos, sendo reversível espontaneamente ou por meio de tratamento farmacológico (8,9). A resposta inflamatória é mediada por células auxiliares do tipo 2 (Th2) e envolve a ativação de linfócitos, neutrófilos, mastócitos e especialmente eosinófilos, que desempenham funções importantes (9,10). A ativação destas células leva à liberação de mediadores pró-inflamatórios e citocinas, os quais causam aumento da permeabilidade vascular, contração da musculatura

brônquica, infiltração de células inflamatórias, hipersecreção de muco, hiperreatividade das vias aéreas e por último remodelamento das vias aéreas (10). Estas mudanças são expressas clinicamente como chiado, respiração curta e ofegante, dispnéia, tosse e deposição de muco.

1.1.1 Patogênese da asma

A patogênese da asma ainda não está completamente esclarecida. Sabe-se que a sensibilização do indivíduo representa a primeira etapa para o desenvolvimento do quadro asmático. Os alérgenos inalados entram em contato com a mucosa respiratória e são capturados por células dendríticas presentes no epitélio brônquico. Estas células são capazes de reconhecer, processar e apresentar o antígeno aos linfócitos T naive. Uma vez sensibilizadas, as células T são diferenciadas em linfócitos Th2 e tornam-se secretoras de citocinas como, interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6), interleucina 9 (IL-9), e interleucina 13 (IL-13) (8). As citocinas IL-4 e IL-13 induzem linfócitos B a produzirem anticorpos do tipo IgE específico ao antígeno (11,12). Estes anticorpos (IgE) se difundem localmente, alcançam os vasos linfáticos e posteriormente a circulação sanguínea, onde são distribuídos sistemicamente. Após ganhar acesso ao fluido intersticial, os anticorpos IgE antígeno-específicos se ligam a receptores de alta afinidade em mastócitos residentes no tecido das vias aéreas (13-16).

A partir dessa sensibilização, nos próximos contatos com agentes desencadeantes, a maioria dos pacientes asmáticos desenvolve uma fase imediata e uma fase tardia. A fase imediata se instala em poucos minutos, sendo caracterizada por obstrução das vias aéreas. A fase tardia ocorre a partir de cerca de 3 horas de contato com o alérgeno, podendo durar por vários dias. Nesta fase há um forte processo inflamatório decorrente de uma intensa migração de células como macrófagos, basófilos, neutrófilos e principalmente eosinófilos para as vias aéreas, contribuindo com a secreção de mediadores inflamatórios (9,17).

1.1.2 Eosinófilos e asma

Avanços na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da asma levaram ao reconhecimento de diversos fenótipos da doença, sendo a asma eosinofílica responsável por cerca de 50% a 60 % dos casos. (18). Achados obtidos em pacientes asmáticos indicaram que o número de eosinófilos no sangue e nas vias respiratórias (escarro, lavado broncoalveolar ou mucosa brônquica) encontra-se aumentado e em constante ativação (19).

Há mais de cem anos, foi publicado pelo médico Paul Ehrlich o primeiro relato da presença de eosinófilos em pólipos nasais e em escarro asmático (20) e sua importância foi enfatizada pelos achados que correlacionavam o grau de eosinofilia no sangue e lavado broncoalveolar (LBA) com o grau de hiperreatividade brônquica e gravidade da asma (21).

Eosinófilos derivam de células progenitoras hematopoiéticas CD 34+ na medula óssea que, sob ação da IL-3, IL-5 e GM-CSF, se diferenciam em eosinófilos a partir de seus precursores mielóides (22,23). Em resposta a diversos estímulos, os eosinófilos são recrutados da circulação para o local inflamado, onde modulam a resposta inflamatória (22). Eosinófilos ativados liberam substâncias citotóxicas, como espécies reativas de oxigênio (EROS) e proteínas tóxicas como a proteína básica principal (MBP), proteína catiônica do eosinófilo (ECP), neurotoxina derivada do eosinófilo (EDN) e peroxidase do eosinófilo (EPO), além de produzirem e liberarem vários mediadores pró-inflamatórios, incluindo citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos (24,25).

Dentre as citocinas, a IL-5 é a mais específica para a linhagem eosinofílica sendo responsável pelo crescimento, diferenciação, ativação e sobrevivência desses leucócitos (26-28). A eotaxina exerce atração específica sobre os eosinófilos, atuando predominantemente em receptores CCR-3 (28). Os mecanismos responsáveis pelo recrutamento de eosinófilos para o sítio inflamatório ainda não estão completamente elucidados; porém, evidências apontam para o envolvimento de IL-3, GM-CSF, IL-5 e quimiocinas, principalmente a eotaxina (19,29). Supõe-se que a IL-5 e a eotaxina ajam cooperativamente neste evento, onde a IL-5 atuaria ativando e aumentando o número de eosinófilos em resposta à eotaxina (30-32).

1.2 Obesidade

A obesidade, doença crônica caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal (33), é considerada um dos principais problemas de saúde pública mundial estando

relacionada a 2,8 milhões de mortes ao ano. Nas últimas décadas houve um aumento considerável na prevalência mundial da obesidade, chegando a atingir cerca de 1 em cada 10 pessoas, com consequentes gastos entre 1-7% dos recursos destinados a saúde (34,35). Estima-se que em 2025 cerca de 2-3 bilhões de adultos estejam com sobrepeso e mais de 700 milhões obesos (36). Na Europa a prevalência da obesidade triplicou nas últimas duas décadas (33), enquanto no Brasil, pesquisas do ministério da saúde, em 2014, estimam que 52,5 % da população apresenta excesso de peso sendo 17% considerada obesa (37). O número de indivíduos com sobrepeso já ultrapassa o número de pessoas desnutridas, um dado que reflete a aceitação de alimentos ricos em gorduras, porém carente de vitaminas e micronutrientes (38).

Dentre as causas da doença destaca-se o crescente consumo de alimentos com alta densidade energética, pobres em nutrientes, ricos em gorduras saturadas e açúcares, além da redução na prática de atividade física, levando a um desequilíbrio entre a ingestão alimentar e o gasto energético (33). As causas deste desequilíbrio devem-se à interação entre fatores genéticos, metabólicos, hormonais e ambientais, que ainda não foram totalmente esclarecidos. Por outro lado, a facilidade de acesso e o baixo custo de alimentos altamente palatáveis e de grande densidade calórica, contribuíram para elevar a prevalência de obesidade (39,40).

A obesidade é considerada um importante fator de risco para diversas outras doenças como diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral, hipertensão, esteatose hepática, câncer, apneia do sono e asma brônquica (33,41).

Embora seja tema de muitos estudos, a obesidade ainda hoje permanece sem tratamento farmacológico satisfatório. Assim, a ênfase atual está focada na compreensão das correlações moleculares entre obesidade e as doenças metabólicas crônicas. Neste contexto, a inflamação crônica de baixo grau, mediada principalmente por células do sistema imune inato e adaptativo, surgiu como um elo importante entre obesidade e alterações metabólicas (42,43).

Apesar de a fisiopatologia da obesidade não estar completamente elucidada, muito do que se sabe hoje foi possível devido aos avanços da biologia molecular (44). Estudos recentes têm demonstrado que o tecido adiposo não deve mais ser considerado apenas como um órgão de estoque de energia, mas sim que possui funções endócrinas e imunológicas importantes (45). Na obesidade, existe um estado constante de inflamação crônica de baixo grau caracterizada por ativação e infiltração de células com perfil pró-inflamatório e produção

desregulada de citocinas pró-inflamatórias (46), exercendo efeitos significativos no sistema imunológico, modificando e perpetuando a inflamação (45-49).

1.3 Obesidade e Asma

Nos últimos 30 anos, a incidência de obesidade cresceu de forma dramática em todo o mundo enquanto que a prevalência de asma triplicou (50). Ainda permanece incerto se esta associação é causal ou acidental e estudos recentes têm mostrado que o ganho de peso pode preceder o desenvolvimento da asma (51,52). Sendo assim, o maior desafio na compreensão da natureza desta relação é determinar se a obesidade realmente modifica o risco da asma ou o seu fenótipo, dificultando seu controle e interferindo na qualidade de vida de pacientes asmáticos (53-60).

Diversos estudos prospectivos, tanto em adultos quanto em crianças, indicam que o risco relativo da incidência de asma aumenta proporcionalmente com o IMC (61-63). Estudo realizado em 2005 mostrou que a obesidade aumenta 2,7 vezes o risco de asma e o sobrepeso em 2,0 vezes, em comparação a pacientes de peso normal (64). Este estudo indicou ainda uma piora na qualidade de vida dos pacientes asmáticos obesos com consequência resistência aos tratamentos farmacológicos e maior número de hospitalizações (64).

As observações de que a perda de peso, seja cirúrgica ou por indução de dieta, proporciona melhora de diversos aspectos da asma, incluindo prevalência, gravidade, uso de medicamentos e hospitalizações, reforçam a relação entre a obesidade e a asma (65-68).

Os resultados dos estudos epidemiológicos sugerem uma relação causal entre a obesidade e asma, indicando algumas etiologias comuns, principalmente em suas bases genéticas (69); entretanto, é possível que existam outros mecanismos biológicos por meio dos quais a obesidade possa ser tanto a responsável pela causa ou pelo agravamento da asma (70,71).

Dados obtidos de modelos animais também sustentam esta relação entre obesidade e asma (72-77). Camundongos obesos vêm sendo utilizados na investigação de potenciais mecanismos através dos quais a obesidade possa modular a inflamação das vias aéreas e/ou sua função. O modelo mais frequentemente utilizado nestes estudos é o de obesidade genética, incluindo camundongos geneticamente deficientes na produção de leptina (camundongos ob/ob) (76), ou no receptor de leptina (camundongos db/db) (76).

Outro modelo utilizado para esta avaliação são camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica, sensibilizados e desafiados com ovalbumina (OVA) (74). Neste modelo, há eosinopoiese acelerada, aumento do recrutamento de eosinófilos da medula óssea para o tecido pulmonar e diminuição da velocidade de trânsito desses eosinófilos através do epitélio até o lúmen das vias aéreas (74). Dessa forma, os eosinófilos permanecem por mais tempo na região peribronquiolar exercendo suas funções citotóxicas. Estes resultados também foram encontrados em camundongos *ob/ob*, deficientes de leptina (76).

1.4 Processo inflamatório e Resolução

A fim de impedir a permanência de patógenos em seu organismo, os mamíferos são capazes de recorrer a um vasto arsenal de resposta de defesa, constituindo assim a reação inflamatória. A inflamação aguda é uma resposta vital à infecção que é iniciada em segundos após a detecção de patógenos (78). Os granulócitos são rapidamente recrutados para os sítios de infecção, onde se tornam ativos, aumentando a capacidade do tecido infectado de eliminar o patógeno, levando à reparação tecidual, retomando assim o seu estado inicial (79,80).

Os eventos iniciais da resposta do hospedeiro à infecção são essenciais para sua sobrevivência e manutenção da homeostasia, sendo coordenados por diversas famílias de mediadores pró-inflamatórios, incluindo mediadores lipídicos (prostaglandinas, leucotrienos e fator ativador de plaquetas), citocinas e quimiocinas. Tais mediadores possuem funções sobrepostas e distintas, levando inicialmente ao aumento da permeabilidade vascular e recrutamento de leucócitos (78). A fase de iniciação é acompanhada pelos sinais cardinais da inflamação, relatados pelas civilizações antigas como calor, rubor, inchaço e dor (81). O repertório de edema, infiltração de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) e acúmulo de macrófagos no tecido resultam em uma sequência característica de eventos durante o início da resposta inflamatória aguda. Na ausência da depuração adequada de fagócitos e presença contínua de leucócitos ativados nos tecidos, há amplificação e persistência da inflamação, prejudicando o processo natural de resolução com consequente cronificação da doença e perda de função tecidual (82).

A inflamação crônica é associada classicamente a doenças como artrite, asma, distúrbios neurológicos degenerativos, diabetes, obesidade e doenças cardiovasculares (83-87).

A resposta inflamatória é normalmente bem regulada para que não haja danos excessivos ao hospedeiro; é auto-limitante e entra em processo de resolução rapidamente. Os mecanismos envolvidos no controle do número de leucócitos no exsudato inflamatório e a organização dos eventos de sinalização para resolução sempre despertaram muito interesse. Acreditava-se que o processo de resolução e retorno à homeostase se dava através da dissipação dos sinais quimiotáticos iniciadores da resposta inflamatória aguda, além de uma auto-regulação envolvendo a ativação de mecanismos de *feedback* negativo, como a secreção de citocinas anti-inflamatórias, inibição de cascatas de sinalização pró-inflamatórias e ativação de células reguladoras (81).

No entanto, além do decréscimo na concentração de mediadores pró-inflamatórios, amplas evidências indicam que a resolução da inflamação é um processo bioquímico ativamente programado, regulado pela biossíntese temporal de novos mediadores químicos durante a fase de resolução. Tais mediadores atuam na regulação de genes inflamatórios e limitam a migração excessiva de PMN, além de estimularem a eliminação de células apoptóticas e detritos celulares (88-91). Estas descobertas sugerem que a resolução prejudicada de um quadro inflamatório seria responsável pela inflamação persistente do tecido, estando assim associada à inflamação crônica (92,93). A resolução a nível tecidual encontra-se definida como a diminuição do infiltrado leucocitário em resposta a sinais quimiotáticos, apoptose e depuração de PMN por ação de macrófagos (92,94).

Estudos por espectrometria de massa (LC-MS / MS) envolvendo a análise de exsudados inflamatório em modelos animais e células humanas isoladas identificaram um novo gênero de mediadores bioativos compreendendo quatro famílias de estruturas distintas, a saber: lipoxinas, protectinas, maresinas e resolvinas, sendo todas biossintetizadas durante a fase de resolução da inflamação aguda (88-90,95). Esses mediadores ativam mecanismos pró-resolução, sendo que sua identificação comprovou que a fase de resolução é um processo ativo de biossíntese (91).

1.5 Mediadores lipídicos

O início da inflamação aguda é controlado por uma diversidade de mediadores inflamatórios, destacando-se os derivados lipídicos. Verificou-se que existe um interruptor temporal na produção dos mediadores lipídicos desde a fase inicial da inflamação até sua resolução. Isto é, diferentes mediadores lipídicos são gerados em momentos diferentes durante a evolução da resposta inflamatória (91). Exemplificando, níveis elevados de prostaglandina E2 (PGE₂) e prostaglandina D2 (PGD₂), mediadores de caráter inflamatório, estimulam a produção de lipoxina A4 (LXA4), que aparece no exsudado no mesmo momento em que o infiltrado de PMN diminui. Aparentemente, a LXA4 atua como um sinal de interrupção da quimiotaxia celular, sendo classificada como um mediador pró-resolução (91). Assim, a sinalização envolvida no processo de resolução está intimamente relacionada à fase inicial da inflamação, isto é, o início programa o fim da inflamação.

Como dito anteriormente, dentre os mediadores lipídicos especializados pró-resolução, existem famílias variadas, como lipoxinas, protectinas, maresinas e resolvinas, que diferem quanto à sua constituição química e funções podendo atuar por diminuição da infiltração de PMN e da produção de mediadores inflamatórios (eicosanóides e citocinas), além de estimular a captação de células apoptóticas por macrófagos (96,97).

Estes novos mediadores endógenos têm sua origem em ácidos graxos essenciais, sendo as lipoxinas derivadas do ômega-6 ao passo que protectinas, maresinas e resolvinas são derivadas do ômega-3 (98).

Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), ômega-6 e ômega-3 (AGPI n-6 e n-3), são precursores de uma gama de mediadores lipídicos bioativos. Sua nomenclatura baseia-se na posição da primeira ligação dupla contada à partir da extremidade metilo (ômega) do respectivo ácido graxo poliinsaturado (99). O ácido araquidônico, um ácido graxo poliinsaturado de 20 carbonos (100) é precursor de uma diversidade de mediadores lipídicos bioativos e desempenha papel importante nos processos inflamatórios, destacando-se a família dos eicosanóides (prostaglandinas, leucotrienos e tromboxano).

Os mecanismos moleculares da transdução de sinal de mediadores lipídicos derivados de ácidos graxos n-6 e seus efeitos sobre o organismo têm sido relativamente bem caracterizados (101). Entretanto, estudos com ácidos graxos n-3 foram negligenciados por

muitos anos. O interesse nestes compostos surgiu a partir de observações em esquimós da Groenlândia que apresentam mortalidade por doença coronariana em apenas 10% daquelas registradas em estudos epidemiológicos para dinamarqueses e americanos (102,103). Um fato interessante apresentado por esses estudos é que mesmo sendo praticamente igual a quantidade de gordura total na dieta de esquimós e americanos, a gordura na dieta de esquimós era rica em ácidos graxos n-3 (104). Estudos subsequentes confirmaram a importância dos ácidos graxos n-3 como o ácido docosahexaenóico (DHA) e ácido docosapentaenóico (EPA) na prevenção de doenças cardiovasculares e diminuição da mortalidade atribuída às mesmas (105). Além da doença coronariana, a população de esquimós da Groenlândia apresentou uma menor prevalência de outras doenças, como psoríase, doença inflamatória intestinal, asma, artrite reumatóide e outras doenças autoimunes (106-109). O contexto inflamatório destas doenças levou à suposição de que os derivados do ácido graxo n-3 podem atuar através de *downregulation* de estímulos inflamatórios.

Estudos em animais também mostraram efeito anti-inflamatório de derivados do ômega-3 em uma variedade de modelos de inflamação. Em animais transgênicos com concentrações teciduais elevadas de ômega-3 foi observada melhora em quadros de inflamação alérgica das vias aéreas, colite, hepatite, pancreatite e hepatite (110-115).

Os principais representantes da família dos ácidos graxos n-3 são o ácido α -linolênico ou ALA (18:3n-3), o EPA (20:5n-3) e DHA (22:6n-3). Estes caracterizam-se por possuir a última ligação dupla entre os carbonos de números 3 e 4 na cadeia de hidrocarboneto, contando o terminal metilo como de número um. Por serem essenciais, compõe uma classe de moléculas que não são geradas pelo organismo, mas que são necessárias ao seu funcionamento, provindo da alimentação ou suplementação (116). As principais fontes de ácidos graxos essenciais são as plantas terrestres e aquáticas, sendo os fitoplanctons, as algas e os óleos de peixe as maiores fontes do ácido linolênico. Os fitoplanctons, base da cadeia alimentar dos oceanos, sintetizam EPA e DHA, que são encontrados em grande quantidade em óleos de peixes e em peixes de águas frias e profundas (117). Os ácidos graxos poli-insaturados EPA e DHA são sintetizados através de seus precursores no retículo endoplasmático liso, especialmente no fígado, por sucessivas reações de dessaturações (oxidação com formação de duplas ligações) e alongamento (inserção de dois átomos de carbono na cadeia principal) (118). Estudos *in vivo* em humanos mostraram

que ~5% do ALA é convertido em EPA, mas apenas 0,5% é convertido em DHA. Portanto, considera-se importante a ingestão de alimentos ou suplementos ricos em DHA (119).

O ácido docosahexaenoico (4,7,10,13,16,19-22:6, DHA) é um ácido graxo ômega-3 de 22 carbonos e 6 insaturações. É encontrado principalmente nas membranas neurais do córtex cerebral e na retina (120,121), onde 25-35% encontram-se esterificados em aminofosfolípídios como a fosfatidilserina, e a fosfatidiletanolamina (122,127).

Estudos indicam que a oxidação enzimática de ácidos graxos gera compostos específicos com atividade anti-inflamatória, os quais podem estar envolvidos nos mecanismos de proteção mediados por DHA (128-131). Entre os compostos com atividade anti-inflamatória destacam-se as resolvinas da série D, as protectinas e maresinas (131).

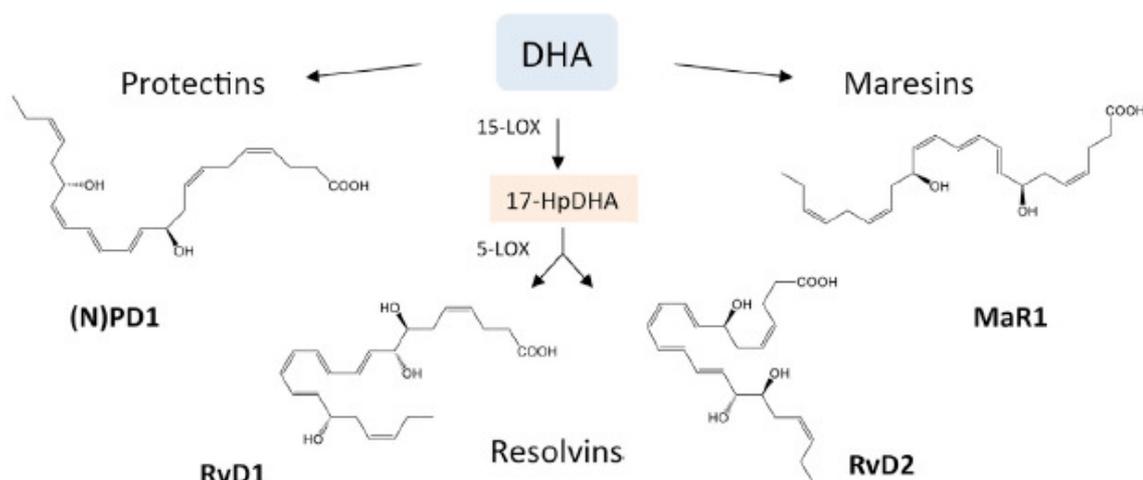


Figura 1: Biossíntese e estrutura das resolvinas, protectinas e maresinas geradas enzimaticamente a partir do DHA (98).

1.6 Resolvinas

As resolvinas da série D apresentam como substrato para sua biossíntese o DHA, exercendo ações pró-resolução e citoprotetoras potentes (88). Esta família de mediadores é por sua vez, dividida em dois grupos (resolvinas D17S e D17R), de acordo com a rota biossintética em que são produzidas durante a resolução da inflamação. A D17S é convertida em resolvinas da série D (RvD1-RvD6) através de vias bioquímicas distintas, envolvendo etapas iterativas de lipoxigenação, formação de epóxido, e hidrólises enzimáticas. Alternativamente, a conversão de D17R em resolvinas da série D (AT- RvD1-4) é

desencadeada pelo ácido acetilsalicílico (AAS), através da COX-2 acetilada e subsequentes transformações enzimáticas (131,132).

A síntese de resolvinas a partir dos AGPI ômega-3 desempenha papéis imunorregulatórios em uma série de tecidos e tem relevância em doenças de natureza inflamatória (artrite reumatóide, asma e periodontal), cardiovascular, e neurodegenerativas, estando também implicadas no diabetes e na obesidade (88,91,133,134). Uma série de estudos vem tentando elucidar o mecanismo de ação destas novas moléculas imunorregulatórias em diferentes tecidos e processos inflamatórios. As resolvinas da série D são de particular interesse uma vez que as membranas de células do cérebro e da retina são muito ricas em DHA. Um estudo recente demonstrou que estas resolvinas são capazes de diminuir a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1- β em micróglia após danos neurais (135). Outros estudos mostraram ainda que as resolvinas derivadas do DHA também atuam reduzindo a peritonite e a inflamação cutânea, protegendo os órgãos das lesões de reperfusão e neovascularização (132).

Foi evidenciado ainda que a RvD1, assim como seu precursor, estavam presentes no tecido adiposo de camundongos obesos (136). A RvD1 foi capaz de induzir uma mudança no perfil dos macrófagos do tecido adiposo, ou seja, trazendo de um perfil clássico pró-inflamatório para um alternativo estado anti-inflamatório. Este fenótipo de mudança foi acompanhado pela inibição da secreção de adipocinas pró-inflamatórias MCP-1 e IL-6 em células do tecido adiposo. Além disso, este estudo demonstrou que a RvD1 exerce potente ação anti-inflamatória em macrófagos por promover a fagocitose, um passo crítico para a proteção do tecido e resolução do processo inflamatório (137).

Estudos relacionando asma e resolvinas indicaram que mediadores pró-resolução são gerados nas vias aéreas de pacientes asmáticos a partir do DHA (138) e que durante as reações alérgicas tais mediadores podem promover a depuração de eosinófilos e células T (138-140). Evidências epidemiológicas revelaram uma relação significativa entre a ingestão de peixe na dieta e uma menor prevalência de alergia e asma. Além disso, foi demonstrado que os níveis de DHA da mucosa das vias aéreas são menores em indivíduos asmáticos, particularmente em relação aos níveis de ácido araquidônico (141).

Recentemente mostrou-se que RvD1 é capaz de inibir a ativação de neutrófilos, de regular a produção de citocinas e de atuar de forma benéfica na lesão pulmonar (142-146).

Em outro estudo recente foi demonstrado que a RvD1 possui atividade anti-inflamatória e efeito pró-resolução na inflamação das vias respiratórias, diminuindo o recrutamento e ativação de eosinófilos, a produção de citocinas de perfil Th2, a hipersecreção de muco e a hiper-reatividade brônquica (147). Esses resultados apontam para possibilidade terapêutica das resolvinas na asma alérgica.

Justificativa

Os mecanismos fisiopatológicos da exacerbação da asma no obeso ainda são pouco compreendidos. Em camundongos asmáticos controles (magros), a RvD1 foi capaz de diminuir o recrutamento e ativação de eosinófilos, a produção de citocinas de perfil Th2, a hipersecreção de muco e a hiper-reatividade brônquica (147). Entretanto, nenhum estudo procurou avaliar os efeitos da RvD1 na exacerbação da asma no modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica em camundongos sensibilizados e desafiados com OVA. Nossa hipótese é que a RvD1 é capaz de modular a resposta inflamatória alérgica eosinofílica das vias aéreas em camundongos obesos asmáticos em comparação com animais magros.

2. OBJETIVOS

O trabalho tem com objetivo avaliar os efeitos do tratamento com RvD1 sobre a inflamação pulmonar eosinofílica em camundongos obesos alimentados com dieta hiperlipídica.

2.1 Objetivos específicos

Em camundongos magros e obesos, imunizados e desafiados com ovalbumina (OVA), tratados ou não com RvD1, foram avaliados:

- I- Infiltrado celular total e eosinofílico no LBA;
- II- Infiltrado eosinofílico nas regiões peribronquiolar e perivascular do tecido pulmonar;
- III- Apoptose no tecido pulmonar;
- IV- Dosagem dos níveis de citocinas (IL-4, IL-5, IL-10 e eotaxina) no LBA

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos com 4 semanas de idade da linhagem C57BL6/J. Os animais foram fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP e mantidos a 24°C, com um período de iluminação diária de 12 h, com água e alimentação *ad libitum* no Departamento de Farmacologia da FCM/UNICAMP. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) – IB – UNICAMP sob protocolo de nº 3493-1.

3.2 Indução da obesidade com dieta hiperlipídica

A obesidade foi induzida através da substituição da dieta padrão por dieta AIN-93 modificada para hiperlipídica (148), que consiste em 46,5% de lipídeo, 38,5% de carboidrato e 15% de proteína, durante 12 semanas, conforme estudo prévio (74). Os grupos controles receberam dieta comercial padrão para roedores de acordo com o AIN-93G, da marca NUVILAB. As dietas e a água foram oferecidas *ad libitum*.

3.3 Sensibilização com ovalbumina (OVA) e desafio intranasal

A sensibilização com OVA teve início na 12^o semana de tratamento com dieta hiperlipídica (ou dieta padrão). No dia zero (12^a. semana), cada camundongo recebeu injeção subcutânea de OVA (100 µg de OVA, 1,6 mg de Al(OH)₃ em 0,4 ml de soro fisiológico) no dorso. No dia 7, os animais receberam novamente uma injeção subcutânea de OVA (100 µg de OVA, 1,6 mg de Al(OH)₃ em 0,4 ml de soro fisiológico). Nos dias 14, 15, 16 e 17, os animais foram desafiados com OVA por via intranasal (10 µg de OVA em 50 µl de soro fisiológico), 1 vez ao dia (4 dias sequenciais). Após 4 e 8 dias do último do desafio intranasal, os animais foram anestesiados, exsanguinados, e submetidos aos procedimentos experimentais citados abaixo. A figura 2 mostra o esquema de sensibilização e desafio com OVA nos camundongos magros e obesos.

3.4 Tratamento com RvD1

Camundongos obesos e controles (magros), sensibilizados e desafiados com OVA, foram tratados com RvD1 (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) por via intraperitoneal (i.p) 1 hora antes de cada desafio durante os 4 dias (147). Os animais sensibilizados, não tratados, receberam 0,2 mL de salina (i.p). O início do tratamento ocorreu concomitantemente com o primeiro desafio. A figura 2 mostra o esquema de tratamento com RvD1 no curso do desafio com OVA.

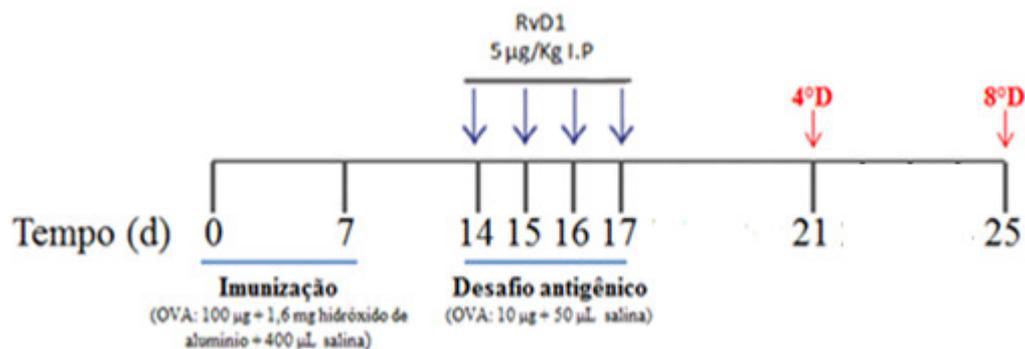


Figura 2. Protocolo de sensibilização e desafio com ovalbumina (OVA) em camundongos controles e obesos, tratados ou não com resolvina D1 (RvD1) (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, intraperitoneal, I.P).

Para a análise dos parâmetros propostos, os animais foram divididos em quatro grupos experimentais, a saber:

- i- Sensibilizado controle (SC)
- ii- Sensibilizado obeso (SO)
- iii- Sensibilizado controle + Resolvina D1 (SC + RvD1)
- iv- Sensibilizado obeso + Resolvina D1 (SO + RvD1)

Os protocolos experimentais foram realizados com esses 4 grupos aos 4 e 8 dias após o término do desafio.

3.5 Coleta e contagem das células no LBA

Os animais foram anestesiados com isoflurano 2% por via inalatória. Em seguida, os camundongos tiveram a traqueia exposta com o auxílio de material cirúrgico (pinça e tesoura pequenas); a traqueia foi então delicadamente canulada com um cateter (24G). Em seguida, amarrou-se delicadamente uma linha em volta da traqueia para que o cateter não se movesse e nem saísse do interior da traquéia. Posteriormente, através da cânula já fixada à traqueia, foram feitas 5 lavagens broncoalveolares com 300 mL de tampão fosfato-salino (PBS) gelado. Ao término do método, recuperou-se um volume aproximado de 1,5 mL de LBA por camundongo. Após a coleta, o LBA foi centrifugado à 4°C (500 × g por 10 minutos) e o sobrenadante foi coletado e estocado a -80°C. O *pellet* foi ressuspenso em 200 mL de PBS e utilizado para contagem total de células em câmara de Neubauer, para confecção de lâmina em citocentrífuga e posterior contagem diferencial dos leucócitos. A contagem diferencial foi realizada por contagem de 100 células (em triplicata) por lâmina, diferenciadas em eosinófilos, neutrófilos e células mononucleares (linfócitos e macrófagos), de acordo com critérios morfológicos celulares normais. Os dados foram expressos como nº de leucócitos x 10⁶/LBA.

3.6 Análise morfológica

Para a análise histológica, os pulmões foram retirados e embebidos em formalina (10%) por 24 h e em seguida em álcool 70% até inclusão em parafina. Posteriormente, esses pulmões foram seccionados em segmentos de 4 a 5 µm os quais foram corados com hematoxilina-eosina (H-E). Para cada animal, as contagens de leucócitos totais e diferenciais foram determinadas ao microscópio, em uma área de 40 µm² circunjacente aos bronquíolos e vasos. Os valores representam a média de 5 bronquíolos e 5 vasos examinados de forma aleatória. As imagens representativas foram registradas em aumento de 400× produzida em microscópio óptico (Leica DM5000 B, QWin Plus Software, Alemanha).

3.7 Teste de TUNEL

Os pulmões foram retirados, fixados em uma solução de formalina (10% em PBS) por 24 horas, e conservados em etanol (70%); e posteriormente embebidos em xilol até a inclusão em parafina. Foram feitos cortes histológicos de 5 μ m e submetidos ao kit FragEL DNA Fragmentation Detection Kit colorimetric – TdT enzyme - (Merck Millipore, Darmstadt – Alemanha). A quebra do DNA genômico, que ocorre no processo de apoptose, origina fragmentos de DNA. Estes podem ser identificados por marcação das terminações 3'-OH livres, através de uma reação enzimática que catalisa a incorporação de nucleotídeos modificados (marcados com fluoresceína). As células com características morfológicas apoptóticas bem como com núcleos castanhos foram consideradas apoptóticas. O ensaio de TUNEL foi realizado conforme estudo prévio em pulmão (149).

3.7 Dosagens de citocinas e quimiocinas no LBA

A suspensão celular obtida do LBA foi centrifugada por 10 minutos à 500 g. O sobrenadante foi utilizado para dosar IL-5, IL-4, IL-10 e eotaxina através de kits ELISA (R&D, Minneapolis, E.U.A).

3.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão das médias (EPM) de n experimentos. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas utilizando-se teste t de *Student* não pareado. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

Com intuito de avaliar o efeito do tratamento com Resolvina D1 (5 µg/kg) na inflamação pulmonar alérgica, realizamos a quantificação de células inflamatórias totais e de eosinófilos no tecido pulmonar através de análises morfológicas da região perivascular e peribronquiolar. Realizamos também a quantificação de células totais e eosinófilos no LBA aos 4 e 8 dias após o desafio com OVA

4.1 CAMUNDONGOS MAGROS

4.1.1 *Camundongos magros tratados com RvD1: Número de células totais*

O tratamento com RvD1 reduziu de modo significativo o infiltrado celular total nos compartimentos perivascular (Figura 3A e B) e peribronquiolar (Figura 3C e D) após 4 e 8 dias do término do tratamento.

Quanto ao LBA (Figura 3E e F) não foi observada diferença aos 4 dias, mas aos 8 dias houve redução significativa no infiltrado celular total.

4.1.2. *Camundongos magros tratados com RvD1: Número de eosinófilos*

A figura 4A-D mostra que o tratamento com RvD1 reduziu de modo significativo o infiltrado eosinofílico nos compartimentos perivascular e peribronquiolar aos 4 e 8 dias do término do tratamento.

Quanto ao LBA (Figura 4E e F), aos 4 dias observou-se aumento significativo no número de eosinófilos no LBA, enquanto no 8º dia observou-se redução significativa no infiltrado eosinofílico.

A Figura 5 mostra fotos representativas de histologia pulmonar para os grupos magros tratados e não tratados com RvD1. Nota-se grande infiltrado celular no tecido pulmonar dos animais magros em relação aos animais magros tratados com RvD1.

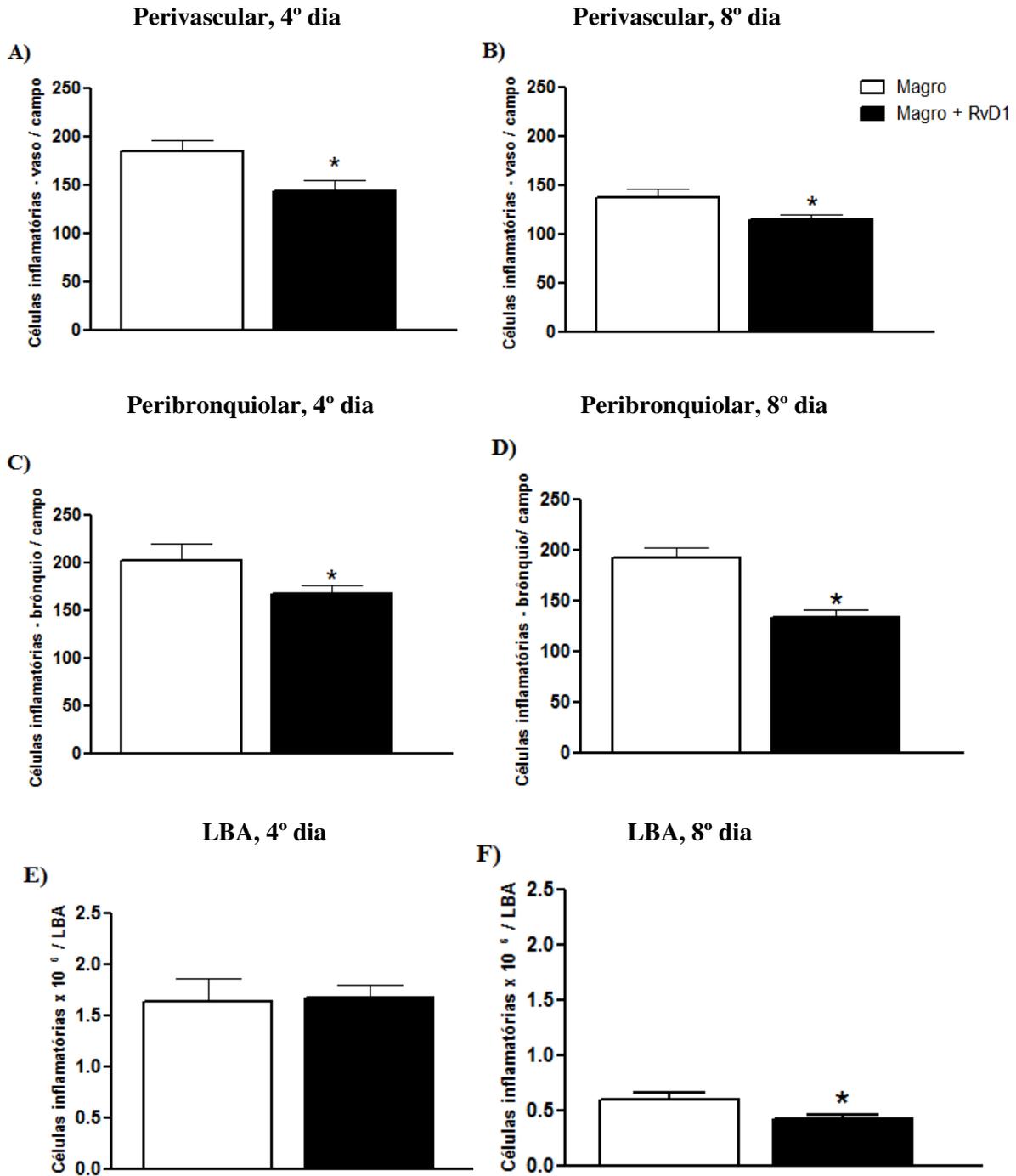


Figura 3: Número de células inflamatórias totais nas regiões perivascular e peribronquiolar no tecido pulmonar e lavado broncoalveolar (LBA) de camundongos magros, tratados ou não com resolvina D1 (RvD1; dose 5 µg/kg). Painel A: 4º dia, perivascular; Painel B: 8º dia, perivascular; Painel C: 4º dia, peribronquiolar; Painel D: 8º dia, peribronquiolar; Painel E e F: LBA nos dias 4 e 8. A quantificação das células inflamatórias presentes no tecido (40 µm²) foi expressa como nº de células inflamatórias/campo de contagem (média de 5 campos aleatórios). Os dados representam a média ± erro padrão da média (n = 6 animais/grupo). *P < 0,05 comparado ao grupo controle.

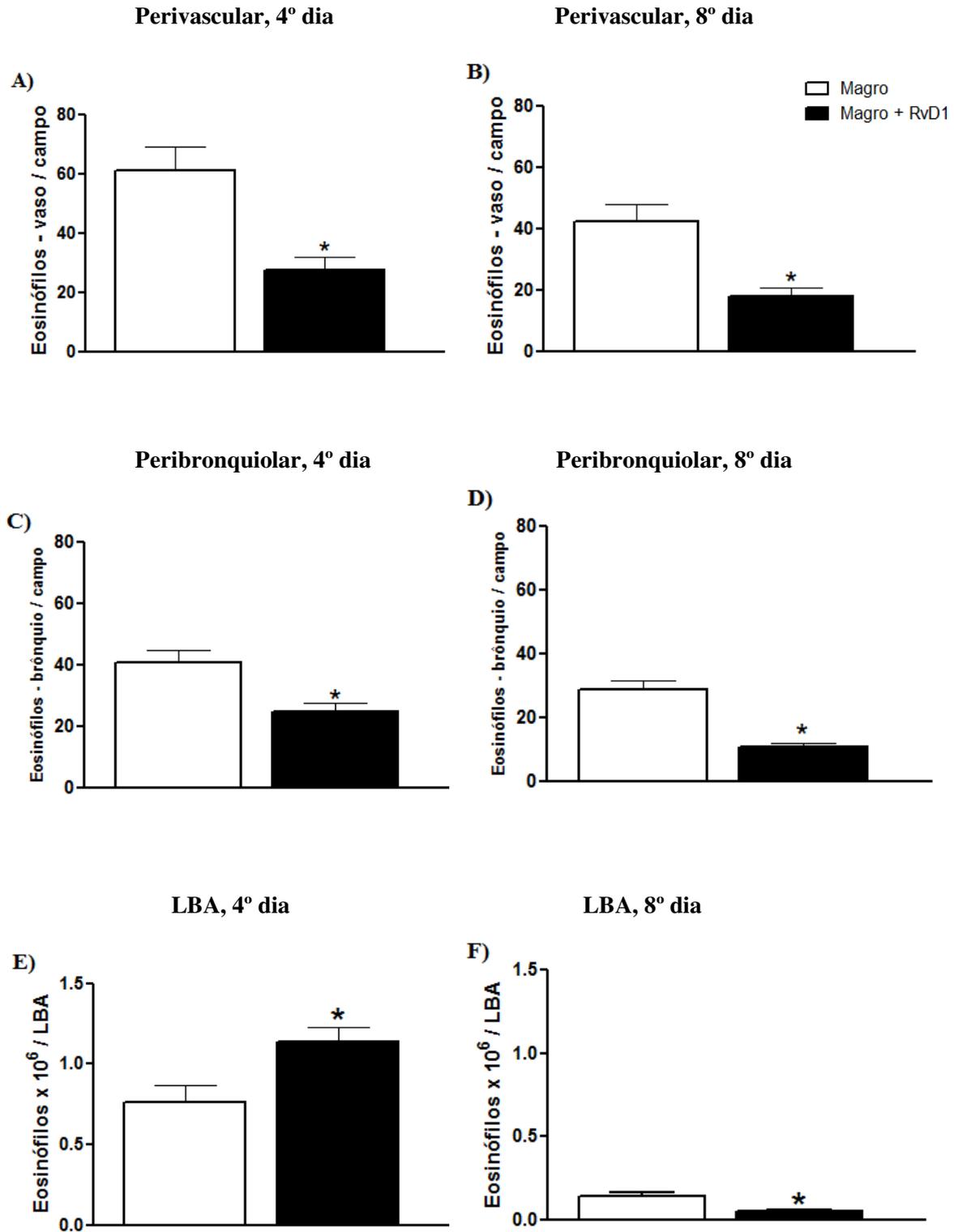


Figura 4: Número de eosinófilos nas regiões perivascular e peribronquiolar do tecido pulmonar e LBA de camundongos magros, tratados ou não com resolvina D1 (RvD1; dose 5 µg/kg). Paineis A: 4º dia, perivascular; Painel B: 8º dia perivascular; Painel C: 4º dia, peribronquiolar; Painel D: 8º dia peribronquiolar. Paineis E e F lavado broncoalveolar (LBA) nos dias 4 e 8. A quantificação da frequência de eosinófilos presentes no tecido (40 µm²) foi expressa como nº de eosinófilo/campo de contagem (média de 5 campos aleatórios). Os dados representam a média ± erro padrão da média; n = 6 animais/grupo. *P < 0,05 comparado ao grupo controle.

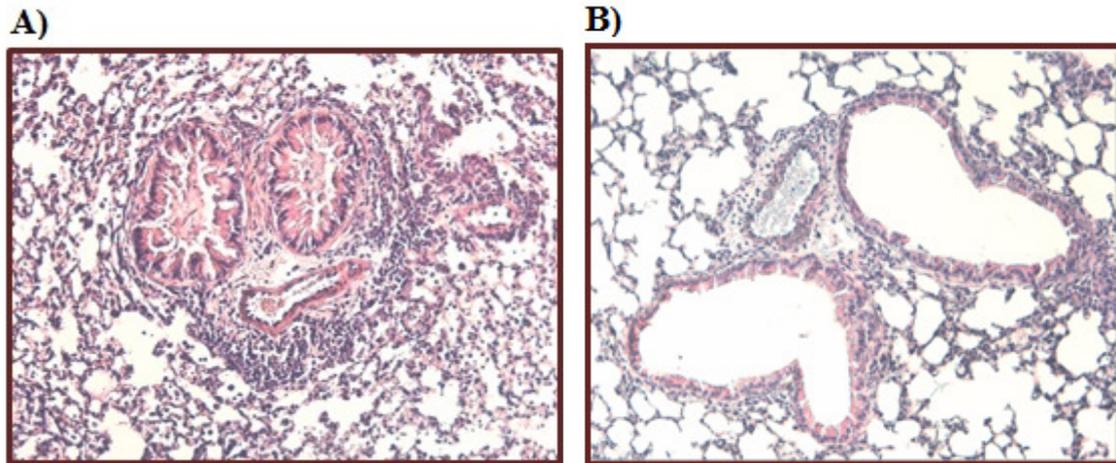


Figura 5: Fotomicrografia representativa do efeito do tratamento com resolvina D1 (RvD1; 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) sobre o número de células inflamatórias e eosinófilos no tecido pulmonar de camundongos magros aos 4 dias após tratamento. Painel A: Animais desafiados magros e painel B: Animais desafiados magros tratados. As fotos representam cortes de pulmões em aumento de 200 vezes.

4.1.3 Avaliação da apoptose no tecido pulmonar em camundongos magros

A figura 6 mostra que o tratamento com RvD1 reduz de modo significativo a apoptose pulmonar no grupo magro (avaliada aos 4 dias após o último desafio).

4.1.4. Avaliação dos níveis de IL-4, IL-5, IL-10 e eotaxina no LBA em camundongos magros

A Figura 7 mostra os níveis de eotaxina (painel A) e IL-5 (painel B) no LBA de animais magros, tratados ou não com RvD1. Aos 4 dias após término do desafio, os níveis de IL-5 e eotaxina mostraram-se significativamente menores no grupo tratado em relação ao grupo controle. O tratamento com RvD1 diminuiu a concentração de IL-5 e eotaxina no LBA de camundongos magros. Os níveis de IL-4 (painel C) não foram significativamente diferentes entre os grupos controle e tratados. Os níveis de IL-10 (painel D) nos animais tratados foram significativamente maiores em relação ao grupo controle.

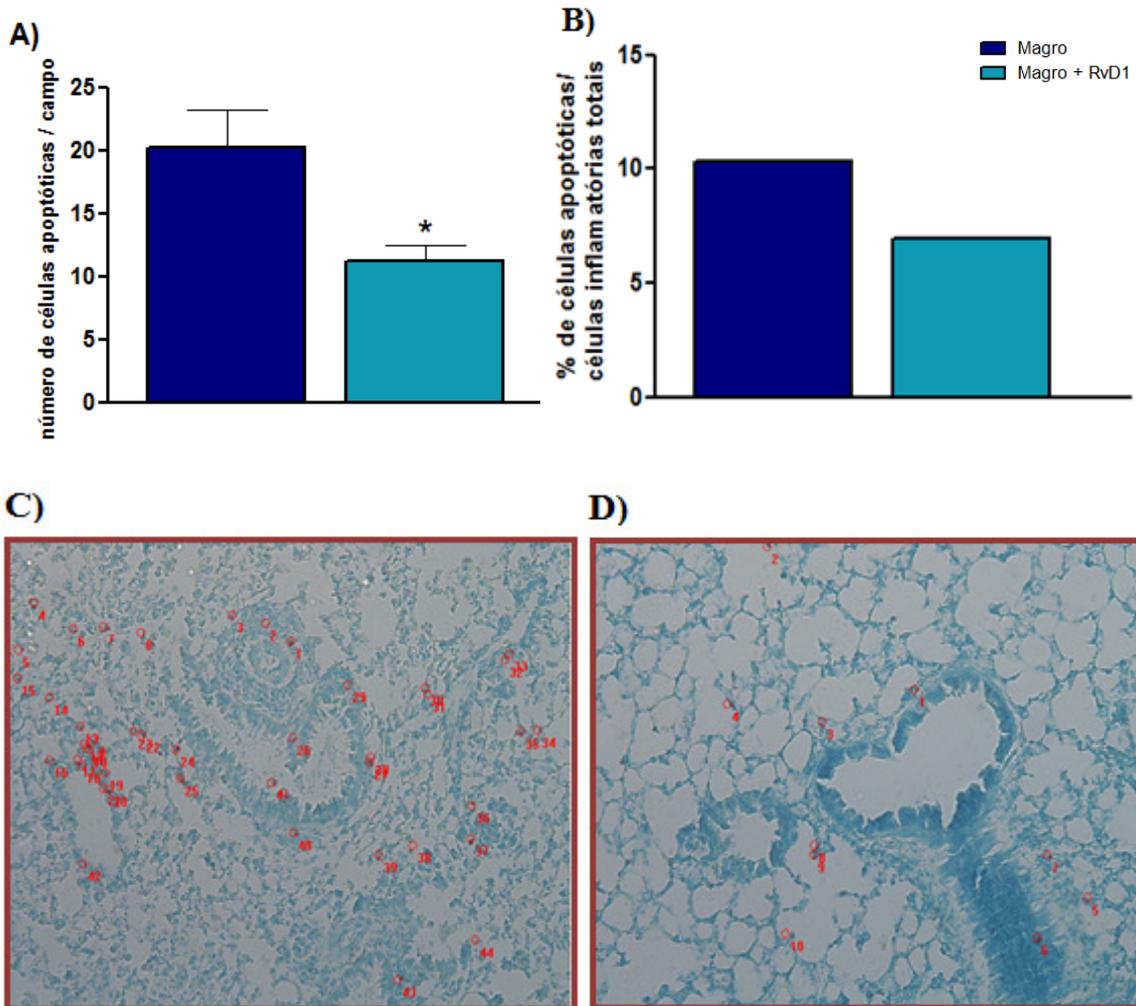


Figura 6: Efeito do tratamento com resolvina D1 (RvD1; 5 µg/kg) sobre o número de células apoptóticas no tecido pulmonar de camundongos magros aos 4 dias após tratamento. Painel A: número de células apoptóticas por campo; Painel B: porcentagem de células apoptóticas; Painel C: tecido pulmonar dos animais magros com as células apoptóticas destacadas em vermelho; Painel D: tecido pulmonar dos animais magros tratados, com as células apoptóticas destacadas em vermelho. Os dados representam a média ± erro padrão da média; n = 6 animais/grupo. *P < 0,05 comparado ao grupo controle.

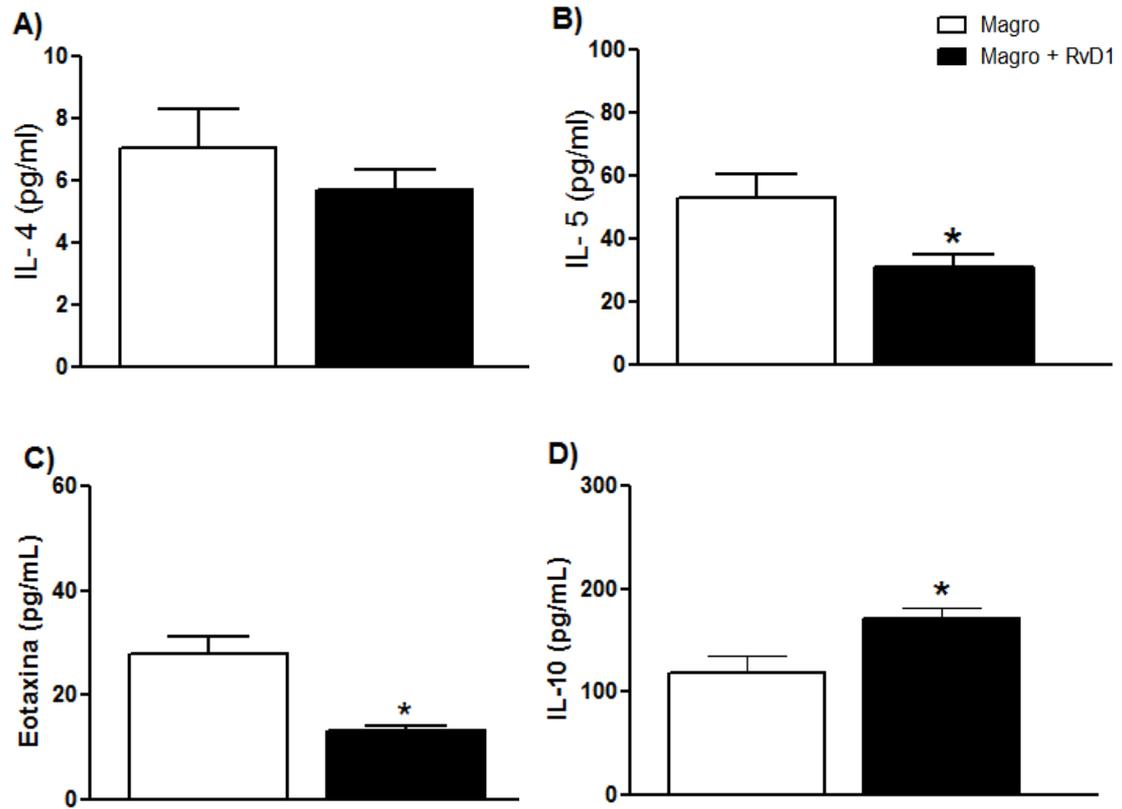


Figura 7. Efeito do tratamento com resolvina D1 (RvD1; 5 μ g/Kg) nos níveis de IL-4 (Painel A), IL-5 (Painel B), eotaxina (Painel C) e IL-10 (Painel D) no lavado broncoalveolar (LBA) de camundongos magros. O LBA foi coletado aos 4 dias após o término do desafio com OVA. Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média; n= 6 animais/grupo. *P < 0.05 comparado ao grupo controle.

4.2 CAMUNDONGOS OBESOS

4.2.1. *Camundongos obesos tratados com RvD1: Número de células totais*

O tratamento com RvD1 em animais obesos resultou em um padrão de resposta bastante diferente daquele de animais magros. Não foi observada alteração no infiltrado celular total no compartimento perivascular após 4 dias do tratamento (Figura 8A), enquanto após 8 dias houve aumento significativo no infiltrado celular total (Figura 8B).

Quanto ao compartimento peribronquiolar no 4º dia após o término do tratamento houve aumento significativo no infiltrado celular total seguido de diminuição após 8 dias (Figura 8C e D).

O tratamento com RvD1 não modificou o infiltrado celular total no LBA em 4 e 8 dias após o tratamento (Figura 8E e F).

4.2.2. *Camundongos obesos tratados com RvD1: Número de eosinófilos*

A figura 9A-D mostra que o tratamento com RvD1 também apresenta padrão de resposta diferente daquele em animais magros quando comparado o infiltrado eosinofílico. No compartimento perivascular, aos 4 dias, há redução significativa do infiltrado eosinofílico pela RvD1, enquanto aos 8 dias o infiltrado eosinofílico é maior no grupo tratado com RvD1 (Figura 9A e B).

No compartimento peribronquiolar o infiltrado eosinofílico dos animais obesos tratados com RvD1 é significativamente maior em relação aos animais obesos não tratados (Figura 9C e D).

Quanto ao LBA (Figura 9E e F), aos 4 dias, não foi observada diferença significativa entre os dois grupos, e após 8 dias é observado um aumento no infiltrado eosinofílico dos animais obesos tratados.

A Figura 10 mostra fotos representativas de histologia pulmonar para os dois grupos experimentais. Nota-se grande infiltrado celular no tecido pulmonar dos animais desafiados obesos em relação aos animais desafiados obesos tratados com RvD1.

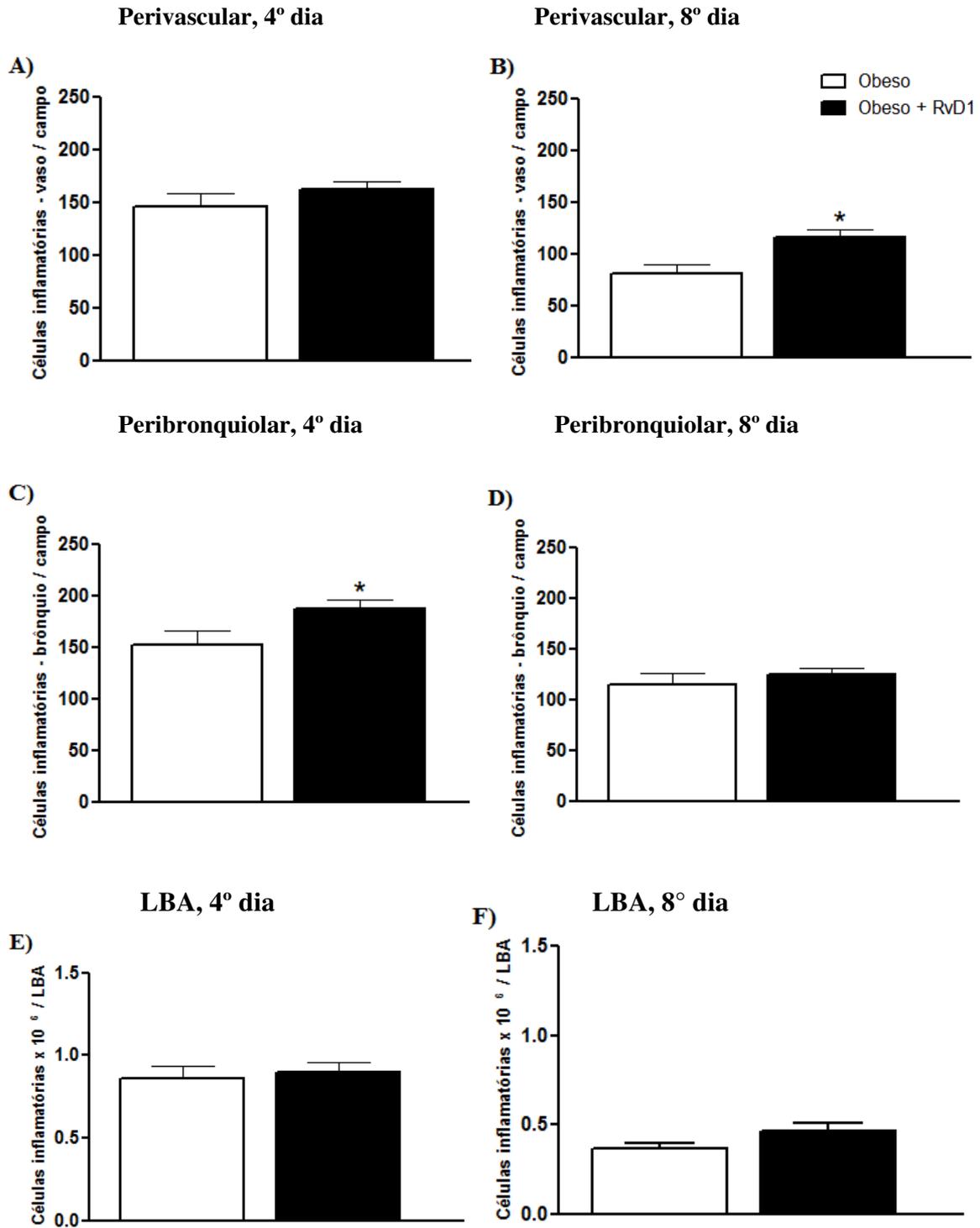


Figura 8: Número de células inflamatórias totais nas regiões perivascular e peribronquiolar no tecido pulmonar e lavado broncoalveolar (LBA) de camundongos obesos, tratados ou não com resolvina D1 (RvD1; dose 5 µg/kg). Painel A: 4º dia, perivascular; Painel B: 8º dia, perivascular; Painel C: 4º dia, peribronquiolar; Painel D: 8º dia, peribronquiolar; Painel E e F: LBA nos dias 4 e 8. A quantificação das células inflamatórias presentes no tecido (40 µm²) foi expressa como nº de células inflamatórias/campo de contagem (média de 5 campos aleatórios). Os dados representam a média ± erro padrão da média (n = 6 animais/grupo). *P < 0,05 comparado ao grupo controle.

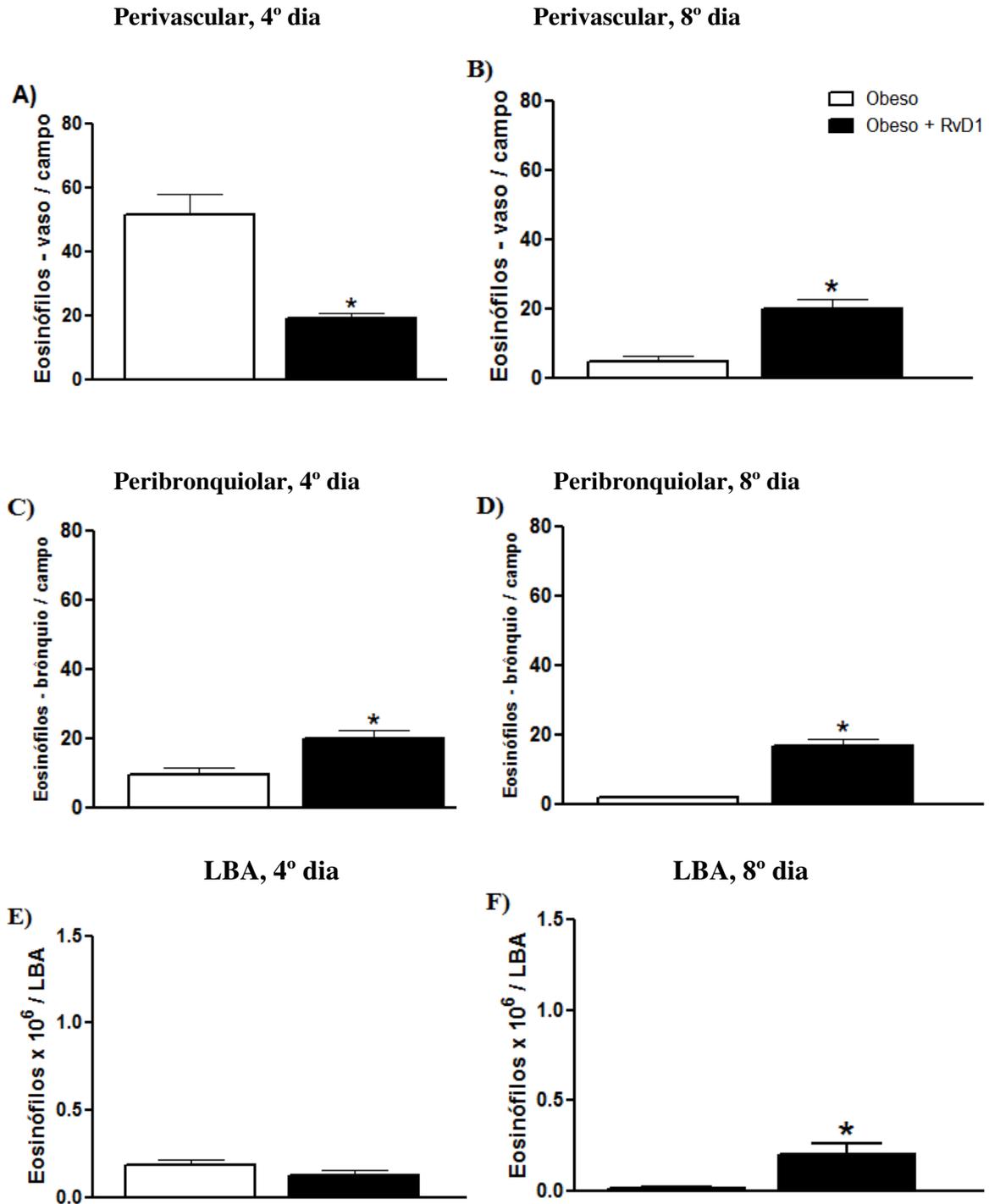


Figura 9: Número de eosinófilos nas regiões perivascular e peribronquiolar do tecido pulmonar e LBA de camundongos obesos, tratados ou não com resolvina D1 (RvD1; dose 5 µg/kg). Painel A: 4º dia, perivascular; Painel B: 8º dia perivascular; Painel C: 4º dia, peribronquiolar; Painel D: 8º dia peribronquiolar. Painel E e F lavado broncoalveolar (LBA) nos dias 4 e 8. A quantificação da frequência de eosinófilos presentes no tecido (40 µm²) foi expressa como nº de eosinófilo/campo de contagem (média de 5 campos aleatórios). Os dados representam a média ± erro padrão da média; n = 6 animais/grupo. *P < 0,05 comparado ao grupo controle.

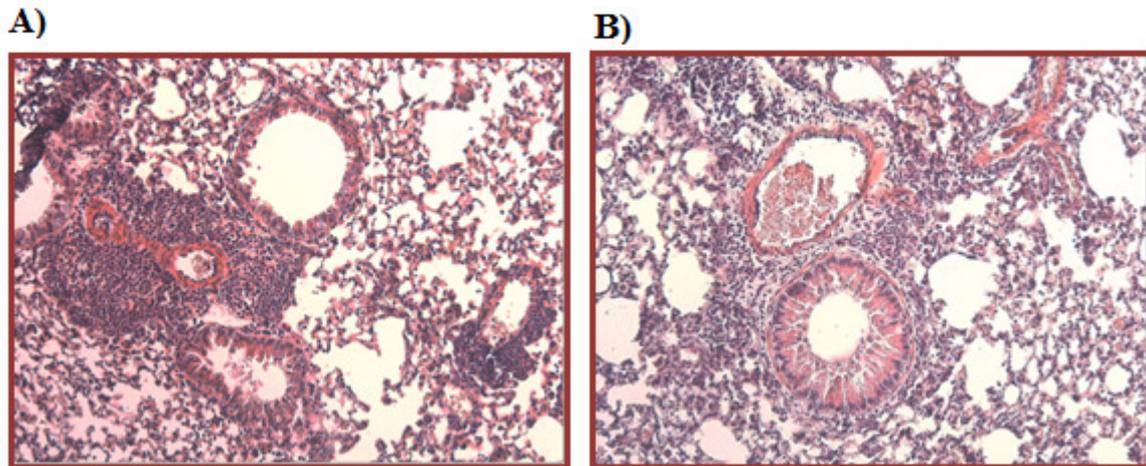


Figura 10: Fotomicrografia representativa do efeito do tratamento com resolvina D1 (RvD1; 5 μ g/kg) sobre o número de células inflamatórias e eosinófilos no tecido pulmonar de camundongos obesos aos 4 dias após o tratamento. Painel A: Animais desafiados obesos e painel B: Animais desafiados obesos tratados. As fotos representam cortes de pulmões em aumento de 200 vezes.

4.2.3 Avaliação da apoptose no tecido pulmonar em camundongos obesos

A figura 11 mostra que o tratamento com RvD1 não interferiu na apoptose pulmonar no grupo obeso (avaliada aos 4 dias após o último desafio).

4.2.4 Avaliação dos níveis de IL-4, IL-5, IL-10 e eotaxina no LBA

A Figura 12 mostra que os níveis de IL-4 (painel A) IL-5 (painel B) e IL-10 (painel D) no LBA de animais obesos não modificaram significativamente entre grupos tratados e não tratados com RvD1. Por outro lado, os níveis de eotaxina aos 4 dias, foram significativamente menores no grupo tratado em relação ao grupo controle.

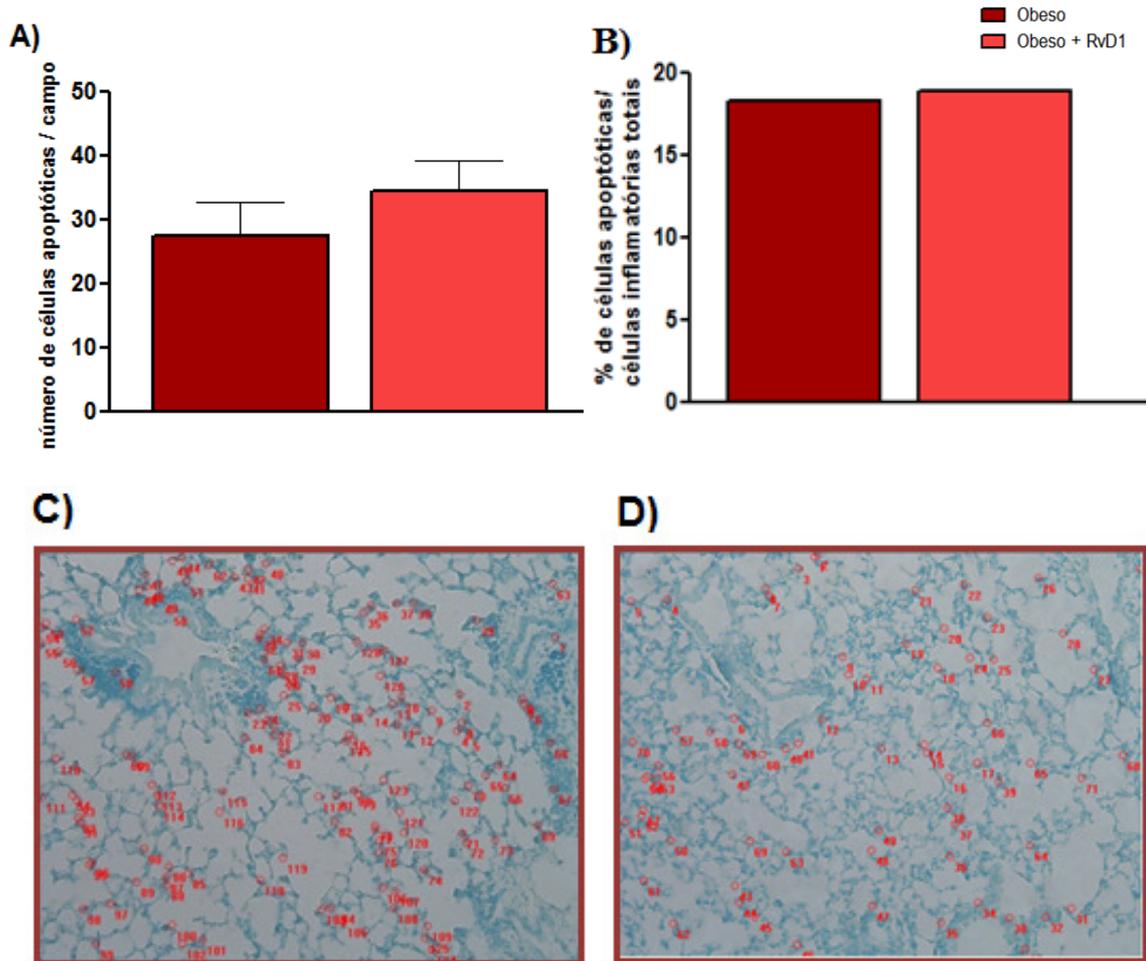


Figura 11: Efeito do tratamento com resolvin D1 (RvD1; 5 µg/kg) sobre o número de células apoptóticas no tecido pulmonar de camundongos obesos aos 4 dias após tratamento. Painel A: número de células apoptóticas por campo; Painel B: porcentagem de células apoptóticas; Painel C: tecido pulmonar dos animais obesos com as células apoptóticas destacadas em vermelho; Painel D: tecido pulmonar dos animais obesos tratados com as células apoptóticas destacadas em vermelho. Os dados representam a média ± erro padrão da média; n = 6 animais/grupo.

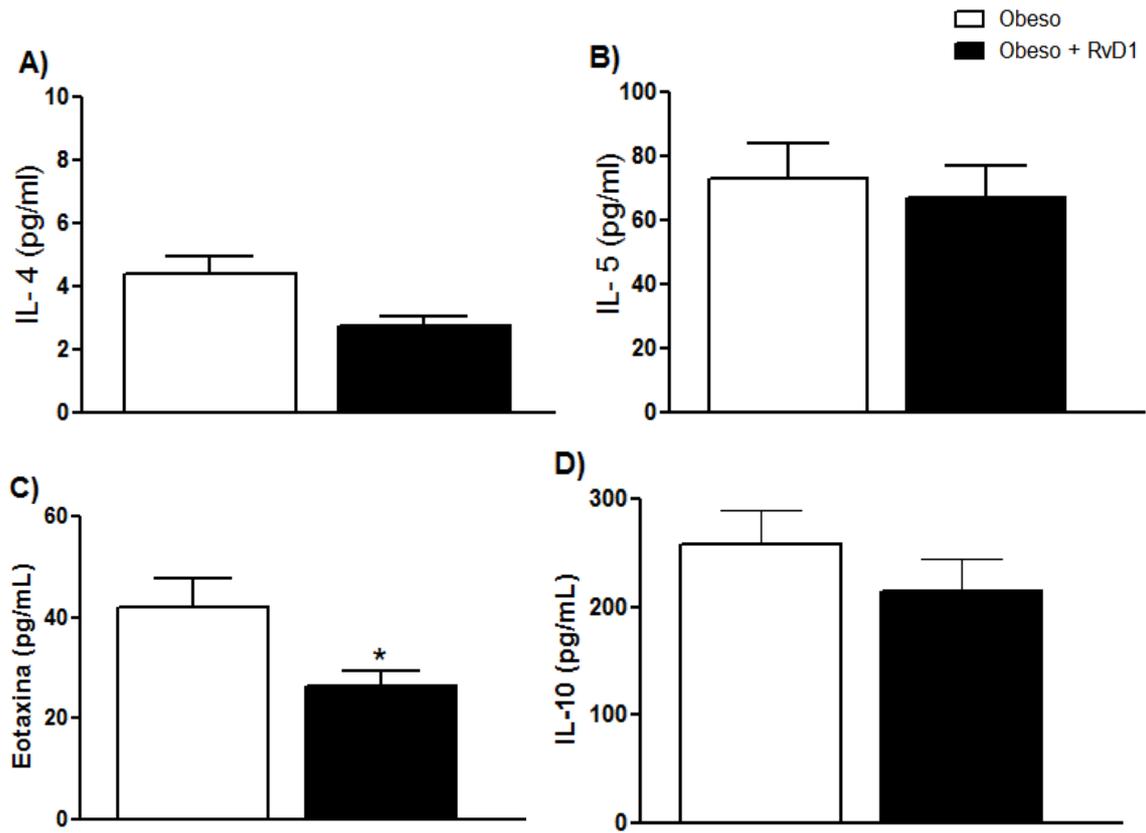


Figura 12. Efeito do tratamento com resolvina D1 (RvD1; 5 μ g/Kg) nos níveis de IL-4 (Painel A), IL-5 (Painel B), eotaxina (Painel C) e IL-10 (Painel D) no lavado broncoalveolar (LBA) de camundongos obesos. O LBA foi coletado aos 4 dias após o término do desafio com OVA. Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média; n= 6 animais/grupo. *P< 0.05 comparado ao grupo controle.

5.0 DISCUSSÃO

A asma e obesidade são doenças crônicas de elevada prevalência, sendo consideradas sérios problemas de saúde pública, uma vez que se associam a elevada morbidade e custos crescentes para o sistema de saúde. A relação entre essas duas doenças tem sido bem documentada em estudos epidemiológicos (51-60). Todavia, a natureza e a causalidade desta associação não estão claramente esclarecidas e suscitam acalorada discussão. Estudos recentes têm relatado o uso de modelos de obesidade em murinos para se investigar a relação entre obesidade e asma (72-77).

A obesidade é uma doença inflamatória crônica caracterizada por aumento anormal do tecido adiposo, levando a alterações das suas funções imunes, podendo repercutir em um estado de inflamação sistêmica (150). Nota-se que algumas das citocinas aumentadas na inflamação sistêmica relacionada à obesidade, como TNF- α , IL-6 e IL-10, estão também associadas à asma (151).

Diversos estudos têm mostrado que as células inflamatórias exercem um papel central tanto no processo inflamatório da asma quanto no remodelamento das vias aéreas, e que ambos os fatores estão associados à obstrução brônquica (152-155). Estudos clínicos e modelos experimentais de asma mostram elevação dos níveis de citocinas do tipo Th2 no LBA (21-29), os quais se assemelham aos resultados também encontrados em nosso presente trabalho.

Os mecanismos implicados no processo de resolução da resposta inflamatória vêm ganhando destaque como possível foco no tratamento da asma. Estudo comprovou que a resolução é um processo biologicamente ativo, no qual mediadores pró-resolução desempenham papel crucial na reversão da doença (91). Os mediadores gerados nessa fase são derivados dos ácidos graxo ômega-3 como EPA e DHA, sendo classificados como protectinas, maresinas e resolvinas das séries E e D (88-90,95).

Estudo recente demonstrou que a RvD1 possui atividade anti-inflamatória e efeito pró-resolução na inflamação das vias respiratórias, diminuindo o recrutamento e ativação de eosinófilos, a produção de citocinas de perfil Th2, a hipersecreção de muco e a hiperreatividade brônquica (147), confirmando a possibilidade terapêutica das resolvinas na asma.

No presente estudo, camundongos magros e obesos desafiados com OVA que receberam o tratamento com RvD1 (5 μ g/kg), foram avaliados aos 4 dias e 8 dias após o

término do esquema terapêutico. Os padrões de resposta para RvD1 foram muito diferentes em magros e obesos, como discutido a seguir.

Em animais magros, a RvD1, já aos 4 dias, reduziu a resposta alérgica induzida pela OVA, evidenciada pela diminuição significativa do número de células inflamatórias totais e de eosinófilos nas regiões perivascular e peribronquiolar do tecido pulmonar. O tratamento com RvD1 também diminuiu os níveis de IL-5 no LBA, principal citocina responsável pela maturação, diferenciação e recrutamento de eosinófilos, e da eotaxina, que também está envolvida na migração, ativação e desgranulação de eosinófilos durante a resposta inflamatória alérgica (156-158). A RvD1 também promoveu aos 4 dias aumento significativo do número de eosinófilos no LBA e dos níveis de IL-10, uma citocina com perfil pró resolútorio no LBA. Com base nestes dados podemos propor que os níveis elevados de IL-10 nos animais que receberam a RvD1 possa ser um dos mecanismos de resolução no sentido de diminuir o estado inflamatório, visto que uma de suas funções é inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias (159-161).

Sabe-se que os granulócitos retidos no tecido pulmonar são removidos de forma eficiente por meio do egresso dessas células do epitélio brônquico para o lúmen das vias aéreas (162,163), contribuindo grandemente para a resolução do processo inflamatório pulmonar (164). Sabe-se também que a retenção de eosinófilos no tecido pulmonar permite que estas células exerçam suas funções efetoras por mais tempo, dificultando o processo de resolução (74). Dessa forma, é provável que o aumento do número de eosinófilos no LBA de camundongos magros tratados com RvD1 seja fruto do aumento da transmigração dessas células da região perivascular e peribronquiolar até o lúmen das vias respiratórias.

A RvD1 atua como agonista no receptores ALX/FRP2, amplamente expressos nas células epiteliais das vias respiratórias e macrófagos alveolares, sendo dinamicamente regulados durante a resposta alérgica das vias respiratórias (142,143,165,166). Sendo assim, o tratamento com RvD1 favorece o processo de resolução.

A apoptose é definida como uma forma programada ou fisiológica de morte celular por um mecanismo altamente controlado. Durante a apoptose a célula sofre encolhimento, condensação da cromatina e fragmentação nuclear, e em algumas linhagens celulares ocorre a formação dos corpos apoptóticos (167).

Estudo demonstrou o envolvimento de numerosos genes e seus produtos e de vários elementos das vias bioquímicas na apoptose (168). Durante a apoptose, a ativação de endonucleases endógenas resulta na clivagem da cromatina, resultando na fragmentação do ácido desoxirribonucléico (DNA). Além disso, células apoptóticas expressam moléculas de fosfatidilserina na superfície externa da membrana plasmática, e apresentam alterações em moléculas presentes na membrana que permitem o seu reconhecimento por fagócitos e sua subsequente remoção do tecido (169, 170). A morte celular por apoptose desempenha papel fundamental na maioria dos processos biológicos sendo a desregulação desse mecanismo um importante fator na patogênese e progressão de muitas doenças de caráter inflamatório (171). Assim, excessiva morte celular por apoptose ou mesmo ausência de apoptose tem sido associada com desenvolvimento de doenças.

Mecanismos promotores de proliferação celular, necessários à reparação que ciclicamente ocorre na asma, podem condicionar a inibição da apoptose, favorecendo uma vida mais prolongada das células inflamatórias, com conseqüente agravamento da asma brônquica (172).

A apoptose e subsequente depuração de eosinófilos do tecido por macrófagos e células residentes compreendem um mecanismo importante para resolução da inflamação local, estando claramente prejudicados na asma em conseqüência dos níveis elevados de IL-5 e GM-CSF, citocinas de caráter inflamatório (173,174). Estudo *in vitro* mostrou que estas citocinas podem prolongar a sobrevivência de eosinófilos durante várias semanas, porém o mecanismo envolvido ainda não foi completamente esclarecido (174).

Nosso estudo mostrou que animais magros tratados com RvD1, avaliados 4 dias após término do desafio com OVA, apresentaram uma diminuição significativa no número de células apoptóticas no tecido pulmonar comparado aos animais não tratados. Este resultado indica que a RvD1 acelera o processo de resolução, onde o número de eosinófilos no tecido brônquico está diminuído. Além disso, estudos já mostraram que tratamento com resolvinas é capaz de estimular a fagocitose de células apoptóticas, justificando novamente a diminuição dessas células nos animais tratados (147).

Há pouca informação sobre o curso do tempo da resolução natural da inflamação alérgica das vias aéreas. Para determinação dessa cinética de resolução, estudo anterior avaliou o número de leucócitos no LBA em diferentes dias após camundongos serem submetidos a desafios antigênicos com OVA (175). O intervalo de resolução foi definido

como o tempo necessário para que o número de células diminuísse para 50% do máximo apresentado no pico da inflamação (175,176). O estudo indicou um intervalo de resolução natural de aproximadamente 4,5 dias para esses animais.

Em nosso trabalho, a avaliação dos parâmetros inflamatórios após 8 dias do término do desafio com OVA confirmou novamente que animais magros tratados com RvD1 apresentam redução significativa no número de células inflamatórias totais e de eosinófilos nos três compartimentos (perivascular, peribrônquiolar e LBA), quando comparados a animais magros não tratados. Os animais tratados com RvD1, após 8 dias, apresentam infiltrado celular similar a animais *naive*, indicando o sucesso do processo de resolução.

A obesidade encontra-se em proporções alarmantes, atingindo cerca de 641 milhões de adultos no mundo (36). Nas últimas décadas, estudos vêm mostrando uma forte associação entre a asma e obesidade, provavelmente em função de mudanças no estilo de vida e rápida urbanização (177). De fato, a obesidade, considerada uma inflamação sistêmica crônica de baixo grau, é também um fator agravante para a asma pré-existente (46).

O tecido adiposo é caracterizado por acúmulo de células inflamatórias como macrófagos M1, leucócitos e mastócitos com consequente elevação na concentração de mediadores inflamatórios neste tecido (46). Além disso, indivíduos obesos e asmáticos apresentam maior número de crises e internações, sendo muitos deles resistentes aos medicamentos disponíveis na clínica, particularmente glicocorticóides inalados (178). Apesar das crescentes evidências para a associação de asma com a obesidade, não há consenso sobre a causalidade e os mecanismos envolvidos (149).

Dados obtidos de modelos animais também apóiam a relação estreita entre obesidade e asma (72, 74, 76). Nosso grupo mostrou que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica por períodos de 10 semanas aumenta a eosinopoiese e o recrutamento de eosinófilos da medula óssea para o tecido pulmonar, assim como retarda o trânsito destas células do epitélio até o lúmen das vias aéreas (74). Dessa forma, os eosinófilos parecem permanecer por mais tempo na região peribrônquiolar exercendo suas funções citotóxicas.

Em nosso presente trabalho, tínhamos como objetivo propor uma alternativa terapêutica com RvD1 para a asma associada à obesidade. Resultados favoráveis do tratamento com RvD1 em camundongos asmáticos magros motivaram este estudo (147). Entretanto, nossos resultados apontam para uma piora (ou manutenção) da resposta inflamatória pulmonar alérgica nos animais obesos tratados com RvD1.

A avaliação do número de células inflamatórias totais indicou que o tratamento com RvD1 promoveu um aumento do infiltrado celular no compartimento perivascular após 8 dias do desafio, indicando a manutenção do recrutamento celular e do processo inflamatório. Quanto ao número de células inflamatórias no LBA não foram observadas diferenças significativa aos 4 e 8 dias após término do desafio.

Passando à avaliação do infiltrado eosinofílico no compartimento perivascular, aos 4 dias, notamos redução significativa do infiltrado eosinofílico, enquanto aos 8 dias o infiltrado permanece maior que nos animais não tratados. No compartimento peribronquiolar, aos 4 e 8 dias, o tratamento com RvD1 aumentou o infiltrado eosinofílico dos animais obesos em relação aos animais obesos não-tratados. No infiltrado eosinofílico do LBA, foi observado aumento significativo aos 8 dias em animais obesos tratados. No conjunto, o tratamento com RvD1 parece piorar o infiltrado celular no tecido pulmonar, possibilitando que estas células exerçam suas funções efetoras por mais tempo o que dificultando o processo de resolução.

A avaliação dos níveis de IL-4 e IL-5 no LBA dos animais obesos tratados mostrou que a RvD1 não foi capaz de diminuir a concentração desses mediadores, que favoreceria a manutenção do estado inflamatório. Quanto à eotaxina, houve diminuição significativa nos animais tratados, provavelmente em função do caráter pró-resolução apresentado pela RvD1. Quanto à IL-10, não houve diferença nos níveis dos animais obesos e animais obesos tratados. Quanto aos níveis de apoptose tecidual, também não foi observado diferenças significativas entre os animais não-tratados e tratados com RvD1.

A fim de compreender as diferenças observadas na ação da RvD1 em camundongos magros e obesos na inflamação alérgica eosinofílica despertou-nos o interesse a via da prostaglandina D2 (PGD2) e seu receptor CRTH2. A PGD2 é o principal mediador lipídico resultante da ação sequencial das enzimas cicloxigenase-2 (COX-2) e PGD2 sintase (PGDS) sobre o ácido araquidônico (180). Esta prostaglandina é sintetizada principalmente em mastócitos, podendo ser também encontrada em células Th2 e macrófagos em resposta à exposição a antígenos (180).

O papel da PGD2 em processos inflamatórios ainda é pouco claro, mas estudos atuais vêm correlacionando a PGD2 com a asma, onde o mesmo contribuiria para a broncoconstrição, eosinofilia e produção de muco. Estudo recente avaliou o papel da RvD1 na inflamação pulmonar induzida por LPS, indicando papel bifásico desse mediador lipídico. Em 6h após o tratamento houve diminuição da expressão da COX-2 e consequente diminuição na

produção de PGD2. Entretanto a avaliação após 48h identificou aumento na expressão de COX-2 e concentração da PGD2 (181). Por isso, aventamos a hipótese que a COX-2/PGD2 possa estar envolvida nos efeitos da RvD1 em obesos.

A PGD2 interage com três tipos de receptores, a saber: DP/DP1 9 (receptor D prostanóide), CRTH2 (chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2) e TP (receptor de tromboxano A2). Os receptores CRTH2, por sua vez, são expressos em células do sistema imune, incluindo células Th2, eosinófilos e basófilos. A interação entre a PGD2 e o CRTH2 provoca quimiotaxia celular e liberação de citocinas Th2 como IL-4, IL-5 e IL-13 (180). Além disso, a expressão elevada da COX-2 e da enzima PGDS, aliada a concentrações maiores de PGD2 e número elevado de células CRTH2+ caracterizam o tecido pulmonar asmático, confirmando a relação existente entre a via PGD2-CRTH2 e asma alérgica (180).

A obesidade altera as funções metabólicas e endócrinas do tecido adiposo, que pode levar à desregulação e doenças metabólicas, além do aumento da liberação de ácidos graxos e do número de macrófagos com perfil inflamatório com consequente aumento na liberação de citocinas pró-inflamatórias (182,183). Há acúmulo de células imunes no tecido adiposo, alterando o meio, contribuindo para a rede inflamatória complexa na obesidade (184).

Mastócitos são células mononucleares, apresentam citoplasma repleto de grânulos e possuem em sua superfície receptores específicos para IgE. Os mastócitos são conhecidos pelo seu papel na anafilaxia e respostas alérgicas assim como pela secreção de histamina após a sua ativação. Progenitores de mastócitos estão abundantemente presentes nos tecidos adiposos (185), onde se diferenciam e amadurecem em mastócitos e interagem com adipócitos para recrutar células inflamatórias (186). O aumento da inflamação, diferenciação e maturação de mastócitos, além de sua infiltração no tecido adiposo, sugerem que estas células contribuem para as complicações da obesidade. Além disso, os níveis de protease de mastócitos em plasma, uma indicação de ativação de mastócitos, e da gordura visceral em camundongos obesos, são mais elevados comparados com camundongos magros (187).

Sabendo-se que a ativação de mastócitos é fundamental na asma devido à liberação de PGD2 e que na obesidade também há aumento na quantidade e ativação desse tipo celular, sugere-se que a dificuldade de resolução da inflamação alérgica eosinofílica em

camundongos obesos tratados com RvD1 se dá pela manutenção do requerimento celular sustentado pela via PGD2-CRTH2.

Baseado em nossos resultados e somado aos dados já relatados anteriormente na literatura podemos sugerir que a RvD1 quando usada em camundongos magros com inflamação alérgica eosinofílica, apresenta ação anti-inflamatória e pró-resolução. Em camundongos obesos a resposta ao mesmo tratamento tende a piorar, levantando novas hipóteses para o entendimento da relação asma e obesidade.

6.0 CONCLUSÕES

No presente estudo mostramos que o tratamento com RvD1 em camundongos magros e obesos e sensibilizados com OVA:

Camundongos Magros

- Diminui a inflamação alérgica eosinofílica (regiões perivascular, peribronquiolar e/ou LBA) no tecido, acelerando a resolução do processo inflamatório.
- Diminui a concentração de IL-5 e eotaxina no LBA.
- Aumenta a concentração de IL-10 no LBA.
- Diminui o número de células apoptóticas no tecido pulmonar.

Camundongos obesos

- Aumenta a inflamação alérgica eosinofílica (regiões perivascular, peribronquiolar e/ou LBA) no tecido, prejudicando o processo resolutório.
- Diminui a concentração de eotaxina no LBA.
- Não interfere nas concentrações de IL-4, IL-5 e IL-10 no LBA.
- Não interfere no número de células apoptóticas no tecido pulmonar.

A RvD1 atua de forma eficaz em nos animais magros asmáticos acelerando a resolução da inflamação. Por outro lado, em animais asmáticos obesos, intensifica a inflamação. Sendo assim, a suplementação com derivados do ômega-3 parece não favorecer o quadro asmático em obesos; entretanto estudos adicionais são necessários para se esclarecer este aspecto.

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Global Initiative National for Asthma-2012.
2. Cooper PJ, Chico ME, Vaca MG, Rodriguez A, Alcântara-Neves NM, Genser B, et al. Risk factors for asthma and allergy associated with urban migration: background and methodology of a cross-sectional study in Afro-Ecuadorian school children in Northeastern Ecuador (Esmeraldas-SCAALA Study). *BMC Pulm Med.* 2006;6: 24.
3. Pearce N, Douwes J. The Latin American exception: why is childhood asthma so prevalent in Brazil? *J Pediatr (Rio J).* 2006;82(5):319-21.
4. DATASUS, 2010.
5. Eder W, Ege MJ, Von Mutius E. The asthma epidemic. *N Engl J Med.* 2006; 355:2226-35.
6. Papoutsakis C, Priftis KN, Drakouli M, Prifti S, Konstantaki E, Chondronikola M, et al. Childhood overweight/obesity and asthma: is there a link? A systematic review of recent epidemiologic evidence. *J Acad Nutr Diet.* 2013;113:77-105.
7. Butland BK, Strachan DP. Asthma onset and relapse in adult life: the British 1958 birth cohort study. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2007;98:337–43.
8. Lemanske RF, Busse WW. Asthma: clinical expression and molecular mechanisms. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2 Suppl 2): S95-02.
9. Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy.* 2008;38(6): 872-97.
10. Fahy JV. Type 2 inflammation in asthma — present in most, absent in many. *Nat. Rev. Immunol.* 2015; 15: 57–65.
11. Snapper CM, Paul WE. B cell stimulatory factor-1 (interleukin 4) prepares resting murine B cells to secrete IgG1 upon subsequent stimulation with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol.* 1987; 139: 10-7.
12. Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, McKenzie AN, Menon S, Zurawski G, et al. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 3730-4.

13. Holgate ST, Djukanović R, Casale T, Bousquet J. Anti-immunoglobulin E treatment with omalizumab in allergic diseases: an update on anti-inflammatory activity and clinical efficacy. *Clin Exp Allergy*. 2005; 35(4): 408-16.
14. Afshar R, Medoff BD, Luster AD. Allergic asthma: a tale of many T cells. *Clin Exp Allergy*. 2008; 12: 1847-57.
15. Galli SJ, Tsai M. IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med*. 2012 4;18(5):693-04.
16. Killeen K, Skora E. Pathophysiology, diagnosis, and clinical assessment of asthma in the adult. *Nurs Clin N Am*. 2013; 48:11–23.
17. O'Byrne P. Asthma pathogenesis and allergen-induced late responses. *J Allergy Clin Immunol*. 1998;102(5):S85-9.
18. Aleman F, Lim HF, Nair P. eosinophilic endotype of asthma. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2016;36(3):559-68.
19. Uhm TG, Kim BS, Chung IY. Eosinophil development, regulation of eosinophil-specific genes, and role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2012;4(2):68-79.
20. Erlich P. Ueber die specifischen Granulationen des Blutes. *Arch Anat Physiol* 1879;3:571–9.
21. Szefler SJ, Wenzel S, Brown R, Erzurum SC, Fahy JV, Hamilton RG, et al. Asthma outcomes: biomarkers. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129.
22. Chu VT, Frohlich A, Steinhauser G, Scheel T, Roch T, Fillatreau S, et al. Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. *Nature Immunol* 2011;12:151-9.
23. Nussbaum JC, Van Dyken SJ, Von Moltke J, Cheng LE, Mohapatra A, Molofsky AB, et al. Type 2 innate lymphoid cells control eosinophil homeostasis. *Nature* 2013; 502:245-48.
24. Hogan SP, Rosenberg HF, Moqbel R, Phipps S, Foster PS, Lacy P, et al. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy*. 2008;38(5):709-50.
25. Kawa A, Christer J, Jonas B. Role of Eosinophil Granulocytes in Allergic Airway Inflammation endotypes. *Scandinavian Journal of Immunology* 2016; 84 (2):75-58.

26. Sanderson CJ. Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood* 1992;79(12):3101-9.
27. Collins PD, Marleau S, Griffiths Johnson DA, Jose PJ, Williams TJ. Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo. *J Exp Med* 1995;182:1169-74.
28. Barnes, PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest* 2008; 118: 3546–3556.
29. Rosenberg HF, Phipps S, Foster PS. Eosinophil trafficking in allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:1303-10.
30. Mould AW, Matthaei KI, Young IG, Foster PS. Relationship between Interleukin-5 and Eotaxin in Regulating Blood and Tissue Eosinophilia in Mice. *J. Clin. Invest.* 1997; 99:1064-71.
- 31 Palframan RT, Collins PD, Williams TJ, Rankin SM. Eotaxin Induces a Rapid Release of Eosinophils and Their Progenitors From the Bone Marrow. *Blood* 1998; 91: 2240-48.
32. Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol* 2006;24:147-74.
33. World Health Organization. 2004. Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health.
34. The 17th international symposium in obesity; targeting the gut to treat obesity and its metabolic comorbidities. *International Journal of Obesity Supplements*2006; 6, S1- S2.
35. Duijvenbode DC , Hoozemans MJM , Poppel MNM, Proper KI. The relationship between overweight and obesity, and sick leave: a systematic review. *International Journal of Obesity* 2009;33,807–16.
36. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. 2016. Diretrizes Brasileiras de Obesidade.
37. Vitigal – MS, 2014.
38. Finucane MM; Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ, et al. Global burden of metabolic risk factors of chronic diseases collaborating group (Body Mass Index). National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9·1 million participants. *Lancet.* 2011; 377(9765): 557-67.

39. Van de Sande-Lee S, Velloso LA. Disfunção hipotalâmica na obesidade. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2012;56-6.
40. Oswal A, Yeo GSH. The leptin melanocortin pathway and control of body weight: lessons from human and murine genetics. *Obes Rev* 2007;4: 293-06.
41. Field, AE, Coakley EH, Must A, Spadano JL, Laird N, Dietz WH, et al. Impact of overweight on the risk of developing common chronic diseases during a 10-year period. *Arch Intern Med* 2001;161:1581-86.
42. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006; 444: 860-867.
43. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol.* 2010;72:219-246.
44. Sanchez MB. Genes y la obesidad. *An Esp Pediatr* 1997;46: 1-2.
45. Guzik, TJ, Mangalat D, Korbust R. Adipocytokines - novel link between inflammation and vascular function? *J Physiol Pharmacol* 2006;57:505-28.
46. Apostolopoulos V, Courten MPJ, Stojanovska L, Blatch GL, Tangalakis K, Courten B. The complex immunological and inflammatory network of adipose tissue in obesity. *Mol. Nutr. Food Res.* 2016;60, 43–57.
47. Trujillo ME, Scherer PE, Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. *Endocr Rev* 2006; 27: 762-78.
48. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 772-83.
49. Tanaka A, Nomura Y, Matsuda A, Ohmori K, Matsuda H. Mast cells function as an alternative modulator of adipogenesis through 15-deoxy-delta-12, 14-prostaglandin J2. *Am J Physiol Cell Physiol.*2011;301(6):C1360-7.
50. Mannino DM, Homa DM, Akinbami LJ, Moorman JE, Gwynn C, Redd SC. Surveillance for asthma—United States, 1980-1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2002;51:1-13.4.
51. Thomsen SF, Ulrik CS, Kyvik KO, Larsen K, Skadhauge LR, Steffensen IE, et al., The incidence of asthma in young adults. 2005; 127: 1928-34.

52. Thomsen SF, Ulrik CS, Kyvik KO, Larsen K, Skadhauge LR, Steffensen IE, et al., Risk factors for asthma in young adults: a co-twin control study, *Allergy*. 2006;61: 229-33.
53. Mosen DM, Schatz M, Magid DJ, Camargo CA. The relationship between obesity and asthma severity and control in adults. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122(3):507-11.
54. Shimizu K, Konno S, Shimizu K, Isada A, Takahashi A, Hattori T, et al. Prevalence in adult asthma and allergic rhinitis in Kamishihoro town, Hokkaido – association with smoking habit and obesity. *Alerugi*. 2008;57(7):835-42.
55. Colombo BM, Murdaca G, Ciprandi G, Sormani MP. Body mass index in Th1 and Th2 disease. *Immunology Letters*. 2008;117(1):119-20.
56. Kusunoki T, Morimoto T, Nishikomori R, Heike T, Ito M, Hosoi S, Nakahata T. Obesity and the prevalence of allergic diseases in schoolchildren. *Pediatr Allergy Immunol*. 2008; 19(6):527-34.
57. Ciprandi G, Pistorio A, Tosca M, Ferraro MR, Cirillo I. Body mass index, respiratory function and bronchial hyperreactivity in allergic rhinitis and asthma. *Respiratory Medicine*. 2008;103(2):1-7.
58. Johnston RA, Theman TA, Shore SA. Augmented responses to ozone in obese carboxypeptidase E- deficient mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006; 290(1):126-33.
59. McClean KM, Kee F, Young IS, Elborn JS. Obesity and the lung: Epidemiology. *Thorax* 2008;63(7):649-54.
60. Shore SA. Obesity and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121(5):1087-93.
61. Shaheen SO, Sterne JA, Montgomery SM, Azima H. Birth weight, body mass index and asthma in young adults. *Thorax*. 1999;54(5):396-402.
62. Thomson CC, Clark S, Camargo CA Jr; MARC Investigators. Body mass index and asthma severity among adults presenting to the emergency department. *Chest*. 2003;124(3):795-802.

63. Pakhale S, Doucette S, Vandemheen K, Boulet LP, McIvor RA, Fitzgerald JM, et al. A comparison of obese and nonobese people with asthma: exploring an asthma-obesity interaction. *Chest*. 2010;137(6):1316-23.
- 64 Rönmark E, Andersson C, Nyström L, Forsberg B, Järholm B, Lundbäck B. Obesity increases the risk of incident asthma among adults. *Eur Respir J*. 2005;25(2):283-8.
65. Hakala K, Stenius-Aarniala B, Sovijärvi A. Effects of weight loss on peak flow variability, airways obstruction, and lung volumes in obese patients with asthma. *Chest*. 2000;118(5):1315-21.
66. Ford ES. Asthma, body mass index, and C-reactive protein among US adults. *J Asthma*. 2003;40(7):733-9.
67. Beuther DA., Weiss ST, Sutherland ER. Obesity and asthma. *Am J Resp Crit Care Med* . 2006; 174: 112-19.
68. Sikka N, Wegienka G, Havstad S, Genaw J, Carlin AM, Zoratti E. Respiratory medication prescriptions before and after bariatric surgery. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2010;104(4):326-30.
69. Gruchała-Niedoszytko M, Małgorzewicz S, Niedoszytko M, Gnacińska M, Jassem E. The influence of obesity on inflammation and clinical symptoms in asthma. *Adv Med Sci*. 2013. 58(1):15-21.
70. Luder E, Melnik TA, DiMaio M. Association of being overweight with greater asthma symptoms in inner city Black and hispanic children. *J Pediatr*, 1998;132:699-03.
71. Weiss ST. Insight into origins of asthma. *Nat Immunol*. 2005;6:537-39.
72. Shore SA, Johnston RA. Obesity and asthma. *Pharmacology & Therapeutics*. 2006; 110: 83-102.
73. Shore SA. Obesity and asthma: lessons from animal models. *J Appl Physiol*. 2007; 102(2):516-28.
74. Calixto MC, Lintomen L, Schenka A, Saad MJ, Zanasco A, Antunes E. Obesity enhances eosinophilic inflammation in a murine model of allergic asthma. *Br J Pharmacol*; 2010; 1;159(3):617-25.

75. Calixto MC, Lintomen L, André DM, Leiria LO, Ferreira D, Lellis-Santos C, et al. Metformin attenuates the exacerbation of the allergic eosinophilic inflammation in high fat-diet-induced obesity in mice. *Plos One*. 2013; 8(10): e76786.
76. Lintomen L, Calixto MC, Schenka A, Antunes E. Allergen-induced bone marrow eosinophilopoiesis and airways eosinophilic inflammation in leptin-deficient ob/ob mice. *Obesity*. 2012; 20: 1959-65.
77. André DM, Calixto MC, Sollon C, Alexandre EC, Leiria LO, Tobar N, et AL. Therapy with resveratrol attenuates obesity-associated allergic airway inflammation in mice. *International Immunopharmacology*. 2016; 38: 298–05.
78. Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature*. 2002; 420:846–52.
79. Vaporciyan AA, DeLisser HM, Yan HC, Mendiguren II, Thom SR, Jones ML, et al. Involvement of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment in vivo. *Science*. 1993; 262:1580–82.
80. Mizgerd JP. Acute lower respiratory tract infection. *New Engl. J. Med.* 2008: 358, 716–27.
81. Majno G, Joris I. *Cells, Tissues, and Disease: Principles of General Pathology*. New York: Oxford University Press, 2004.
82. Calder PC, Albers R, Antoine JM, Blum S, Bourdet-Sicard R, Ferns GA, et al. J. Inflammatory Disease Processes and Interactions with Nutrition. *British Journal of Nutrition* 2009;101: S1.
83. Serhan CN, Ward PA, Gilroy DW. Resolution of acute inflammation and wound healing. In *Fundamentals of Inflammation*. New York: Cambridge University Press, 2010.
84. Karp CL, Serhan CN, Ward PA, Gilroy DW. Links between innate and adaptive immunity. In *Fundamentals of Inflammation*. New York: Cambridge University Press, 2010.
85. Ward PA, Serhan CN, Gilroy DW. Acute and chronic inflammation. In *Fundamentals of Inflammation*. New York: Cambridge University Press, 2010.
86. Nathan C, Ding A. Nonresolving inflammation. *Cell*. 2010; 140:871–82.
87. Tabas I, Glass CK. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. *Science*. 2013; 339:166-72.

88. Serhan CN, Clish CB, Brannon J, Colgan SP, Chiang N, Gronert K. Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J Exp Med.* 2000; 192(8): 1197-204.
89. Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K, Serhan CN. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat.Immunol.* 2001; 2: 612–619.
90. Serhan CN, Hong S, Gronert K, Colgan SP, Devchand PR, Mirick G, Moussignac RL. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J. Exp. Med.* 2002; 196: 1025–37.
91. Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature Immunol.* 2005; 6: 1191–97.
92. Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, O’Neill LA, et al. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J.* 2007; 21:325–32.
93. Buckley CD, Gilroy DW, Serhan CN. Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. *Immunity.* 2014; 40:315–27.
94. Serhan CN, Arita M, Hong S, Gotlinger K. Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their endogenous aspirin-triggered epimers. *Lipids.* 2004; 39:1125–32.
95. Hong S, Gronert K, Devchand PR, Moussignac RL, Serhan CN. Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain human blood and glial cells. Autacoids in antiinflammation. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 14677-87.
96. Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat. Immunol.* 2005;6:1191–97.
97. Chiang N, Fredman G, Backhed F, Oh SF, Vickery T, Schmidt BA., Serhan CN. Infection regulates pro-resolving mediators that lower antibiotic requirements. *Nature.* 2012; 484:524–28
98. Spite M, Clària J, Serhan CN. Resolvins, Specialized Proresolving Lipid Mediators, and Their Potential Roles in Metabolic Diseases *Cell Metab.* 2014;19(1):21-36.

99. Appolinário PP, Derogis PBMC, Yamaguti TH, Miyamoto S. Metabolismo, Oxidação e implicações biológicas do ácido docosahexaenoico em doenças neurodegenerativas *Quim. Nova*, 2011;34,8:1409-16.
100. Von Euler US. Further studies of prostaglandin, the physically active substance of certain genital glands. *Skand Arch Physiol* 1939;81:65–80.
101. Weylandt KH, Chiu CY, Gomolka B, Waechter SF, Wiedenmann B. Omega-3 fatty acids and their lipid mediators: Towards an understanding of resolvin and protectin formation
Omega-3 fatty acids and their resolvin/protectin mediators
102. Bang HO, Dyerberg J, Hjoorne N. The composition of food consumed by Greenland Eskimos. *Acta Med Scand* 1976;200(1–2):69–73.
103. Dyerberg J, Bang HO, Stoffersen E, Moncada S, Vane JR. Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis? *Lancet* 1978;2(8081):117–9.
104. Leaf A. Historical overview of n-3 fatty acids and coronary heart disease. *AmJ Clin Nutr.* 2008;87(6):1978S–80S.
105. Marchioli R. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. *Lancet* 1999;354(9177):447–55.
106. Kromann N, Green A. Epidemiological studies in the Upernavik district Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950–1974. *Acta Med Scand.* 1980;208(5):401–6.
107. Belluzzi A, Boschi S, Brignola C, Munarini A, Cariani G, Miglio F. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory bowel disease. *Am J Clin Nutr.* 2000;71(1Suppl.):339S–42S.
108. Gilbert JA, Sartor VE. Regional enteritis: disease pattersens and medical management. *Can Med Assoc J.* 1964;91:23–7.
109. Horrobin DF. Low prevalences of coronary heart disease (CHD), psoriasis, asthma and rheumatoid arthritis in Eskimos: are they caused by high dietary intake of eicosapentaenoic acid (EPA), a genetic variation of essential fatty acid (EFA) metabolism or a combination of both? *Med Hypotheses.* 1987;22(4):421–8.

110. Bilal S, Haworth O, Wu L, Weylandt KH, Levy BD, Kang JX. Fat-1 transgenic mice with elevated omega-3 fatty acids are protected from allergic airway responses. *Biochim Biophys Acta* 2011;1812(9):1164–9.
111. Hudert CA, Weylandt KH, Lu Y, Wang J, Hong S, Dignass A, et al. Transgenic mice rich in endogenous omega-3 fatty acids are protected from colitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(30):11276–81.
112. Schmocker C, Weylandt KH, Kahlke L, Wang J, Lobeck H, Tiegs G, et al. Omega-3 fatty acids alleviate chemically induced acute hepatitis by suppression of cytokines. *Hepatology* 2007;45(4):864–9.
113. Weylandt KH, Krause LF, Gomolka B, Chiu CY, Bilal S, Nadolny A, et al. Suppressed liver tumorigenesis in fat-1 mice with elevated omega-3 fatty acids is associated with increased omega-3 derived lipid mediators and reduced TNF- α . *Carcinogenesis* 2011;32(6):897–903.
114. Nowak J, Weylandt KH, Habbel P, Wang J, Dignass A, Glickman JN, et al. Colitis-associated colon tumorigenesis is suppressed in transgenic mice rich in endogenous n-3 fatty acids. *Carcinogenesis* 2007;28(9):1991–5.
115. Weylandt KH, Nadolny A, Kahlke L, Kohnke T, Schmöcker C, Wang J, et al. Reduction of inflammation and chronic tissue damage by omega-3 fatty acids in fat-1 transgenic mice with pancreatitis. *Biochim Biophys Acta* 2008;1782(11):634–41.
116. Youdim KA, Martin A, Joseph JA. Essential Fatty Acids and the Brain: possible health implications. *Int J Dev. Neuroscience* 2000; 18:383-99.
117. Connor WE. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *Am J Clin Nutr*; 2000;7(suppl):171-5.
118. Cabre E, Gassul MA. Polyunsaturated fatty acid deficiency in liver diseases: pathophysiological and clinical significance. *Nutrition* 1996;12:542-8.
119. Plourde M, Cunnane SC, *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 2007; 32, 619.
120. Horrocks LA, Farooqui AA. Prostaglandins Leukot. *Essent. Fatty Acid.* 2004; 70,361.

121. Lauritzen L, Hansen HS, Jørgensen MH, Michaelsen KF. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina *Progr. Lipid Res.* 2001; 40, 1-94.
122. Kim HY. Novel Metabolism of Docosahexaenoic Acid in Neural Cell; *J. Biol. Chem.* 2007; 282:18661-65.
123. Salem N, Litman B, Kim HY, Gawrisch K. Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. *Lipids.* 2001 Sep;36(9):945-59.
- 124 Gamoh S, Hashimoto M, Sugioka K, Shahdat Hossain M, Hata N, Misawa Y, et al. Chronic administration of docosahexaenoic acid improves reference memory-related learning ability in young rats. *Neuroscience* 1999; 93; 237-41.
125. McGahon BM, Martin DS, Horrobin DF, Lynch MA. Age-related changes in synaptic function: analysis of the effect of dietary supplementation with omega-3 fatty acids. *Neuroscience.* 1999;94(1):305-14.
126. Gordon WC, Bazan NG. Docosahexaenoic acid utilization during rod photoreceptor cell renewal. *J Neurosci.* 1990;10(7):2190-202.
127. Mirnikjoo B, Brown SE; Kim HFS, Marangell LB, Sweatt JD, Weeber EJ. Protein kinase inhibition by omega-3 fatty acids. *J Biol Chem.* 2001; 6;276(14):1088.
- 128 Isobe Y, Arita M, Matsueda S, Iwamoto R, Fujihara T, Nakanishi H, et al. Identification and structure determination of novel anti-inflammatory mediator resolvin E3, 17,18-dihydroxyeicosapentaenoic acid. *J. Biol. Chem.* 2012; 287: 10525–534.
129. Lands WEM. *Fish, Omega-3 and Human Health* 2nd edn. Champaign, Illinois: AOCS Press; 2005.
130. Serhan CN, Chiang N. Resolution phase lipid mediators of inflammation: agonists of resolution. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2013; 13: 632–40.
131. Seki H, Sasaki T, Ueda T, Arita M (2010). Resolvins as Regulators of the Immune System. *ScientificWorldJournal.* 2010;4;10:818-31.
132. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol.* 2008 8(5):349-61.

133. Schwab JM., Chiang N, Arita M, Serhan CN(2007). Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature*. 2007;14;447(7146):869-74.
134. Kalupahana NS, Claycombe KJ, Moustaid-Moussa N. (n-3) Fatty Acids Alleviate Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance: Mechanistic Insights. *American Society for Nutrition*. 2011; 2(4):304-16.
135. Serhan CN, Gotlinger K, Hong S, Lu Y, Siegelman J, Baer T, Yang R, Colgan SP, Petasis NA. Anti-inflammatory actions of neuroprotectin D1/protectin D1 and its natural stereoisomers: assignments of dihydroxy-containing docosatrienes”. *Journal of immunology* 2006; 176(3):1848-1859.
136. González-Periz, A, Horrillo R, Ferre N, Gronert K, Dong B, Morán-Salvador E, et al. Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by omega-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. *FASEB J* 2009; 23:1946–57.
137. Titos E, Rius B, González-Pérez A, López-Vicario C, Morán-Salvador E, Martínez-Clemente M, et al. Polarization toward an M2-Like Phenotype Inflammation by Eliciting Macrophage Acid Promote Resolution of Adipose Tissue Resolvin D1 and Its Precursor Docosahexaenoic. *The Journal of Immunology*. 2011; 187(10): 5408-18.
138. Levy BD, Kohli P, Gotlinger K, Haworth O, Hong S, Kazani S, et al. Protectin D1 is generated in asthma and dampens airway inflammation and hyperresponsiveness. *J. Immunol*. 2007;178:496–502.
139. Bilal S, Haworth O, Wu L, Weylandt KH, Levy BD, Kang JX. Fat-1 transgenic mice with elevated omega-3 fatty acids are protected from allergic airway responses. *Biochim. Biophys. Acta*. 2011; 1812: 1164–69.
140. Ariel A, Fredman G, Sun YP, Kantarci A, Van Dyke TE, Luster AD et al.. Apoptotic neutrophils and T cells sequester chemokines during immune response resolution through modulation of CCR5 expression. *Nat. Immunol*. 2006; 7: 1209–16.
141. Schwartz J, Weiss SP. The relationship of dietary fish intake to level of pulmonary function in the first National Health and Nutrition Survey (NHANES I). *Eur. Respir. J*. 1994; 7: 1821–24.

142. Krishnamoorthy S., Recchiuti A, Chiang N, Yacoubian S, Lee CH, Yang R, et al. Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence for proresolving receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010; 107: 1660–65.
143. Norling LV, Dalli J, Flower RJ, Serhan CN, Perretti M. Resolvin D1 limits PMN recruitment to inflammatory loci: receptor dependent actions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(8):1970.
144. Sun YP, Oh SF, Uddin J, Yang R, Gotlinger K, Campbell E, et al. Resolvin D1 and its aspirin-triggered 17R-epimer. Stereochemical assignments, anti-inflammatory properties, and enzymatic inactivation. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 9323–34.
145. Recchiuti A, Krishnamoorthy S, Fredman G, Chiang N, and Serhan CN. MicroRNAs in resolution of acute inflammation: identification of novel resolvin D1-miRNA circuits. *FASEB J.* 2011; 25: 544–560.
146. Tian H, Lu Y, Sherwood AM, Hongqian D, Hong S. Resolvins E1 and D1 in choroid-retinal endothelial cells and leukocytes: biosynthesis and mechanisms of anti-inflammatory actions. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(8):3613-20.
147. Rogerio AP, Haworth O, Croze R, Oh SF, Uddin M, Carlo T, et al. Resolvin D1 and Aspirin-Triggered Resolvin D1 Promote Resolution of Allergic Airways responses. *The Journal of Immunology*, 2012, 189: 1983–91.
148. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993; 123: 1939-51.
149. Song L, Liu D, Wu S, Yang J, Ren F, Li Y. Antibody to mCLCA3 suppresses symptoms in a mouse model of asthma. *PLoS One.* 2013; 9;8(12):e82367.
150. Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115(5):911-9.
151. Sin DD, Sutherland ER. Obesity and the lung: Obesity and asthma. *Thorax* 2008; 63:1018-23.

152. Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, et al. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 1992; 326:298-304.
153. Robinson DS, Bentley AM, Hartnell A, Kay AB, Durham SR. Activated memory T helper cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with atopic asthma: relation to asthma symptoms, lung function, and bronchial responsiveness. *Thorax* 1993; 48:26-32.
154. Georas SN, Guo J, De Fanis U, Casolaro V. T-helper cell type-2 regulation in allergic disease. *Eur Respir J* 2005; 26:1119-37.
155. Kariyawasam HH, Robinson DS. The role of eosinophils in airway tissue remodelling in asthma. *Curr Opin Immunol* 2007; 19:681-86.
156. Yamaguchi Y, Suda T, Suda J, Eguchi M, Miura Y, Harada N, et al. Purified interleukin 5 supports the terminal differentiation and proliferation of murine eosinophilic precursors. *J Exp Med* 1988; 167:43-56.
157. Lopez AF, Sanderson CJ, Gamble JR, Campbell HD, Young IG, Vadas MA. Recombinant human interleukin 5 is a selective activator of human eosinophil function. *J Exp Med* 1988; 167:219-224.
158. Broide, DH. Immunologic and inflammatory mechanisms that drive asthma progression to remodeling. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121:560-570.
159. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol*. 1991; 147:3815-3822.
160. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:683-65.
161. Esposito K, Pontillo A, Giugliano F, Giugliano G, Marfella R, Nicoletti G, et al. Association of low interleukin-10 levels with the metabolic syndrome in obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:1055-1058.
162. Person C, Uller L. Transepithelial exit of leucocytes: inflicting, reflecting or resolving airway inflammation? *Thorax*. 2010; 65(12): 1111-15.

163. Persson C. Role of primary necrosis/lysis of submucosal eosinophils in obese individuals with asthma. *Am J Resp Crit Care*. 2013; 188 (12): 1468.
164. Uller L, Persson CG, Erjefält JS. Resolution of airway disease: removal of inflammatory cells through apoptosis, egression or both? *Trends Pharmacol Sci*. 2006; 27(9): 461-66.
165. Krishnamoorthy S, Recchiuti A, Chiang N, Fredman G, Serhan CN. Resolvin D1 receptor stereoselectivity and regulation of inflammation and proresolving microRNAs. *Am. J. Pathol*. 2012; 180: 2018–27.
166. Perretti M., Chiang N, La M, Fierro IM, Marullo S, Getting SJ, et al. Endogenous lipid- and peptide-derived anti-inflammatory pathways E generated with glucocorticoid and aspirin treatment activate the lipoxin A4 receptor. *Nat. Med.*2002; 8: 1296–1302.
167. Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(12):965-75.
168. Kiechle FL, Zhang X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. *Clin Chim Acta.*2002; 326(1-2):27-45.
169. Maderna P, Godson C. Phagocytosis of apoptotic cells and the resolution of inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1639(3):141-51.
170. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell*. 2004; 23; 116(2):205-19.
171. Nicholson DW. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature*. 200; 407(6805):810-6.
172. Simon H. Targeting apoptosis in the control of inflammation. *Eur Respir J*. 2003; 22(suppl 44):20s-1s.
173. Shen ZJ, Malter JS. Determinants of eosinophil survival and apoptotic cell death. *Apoptosis.*2015;20(2):224-34.
174. Ilmarinen P, Moilanen E, Kankaanranta H.Regulation of Spontaneous Eosinophil Apoptosis - A Neglected Area of Importance. *J Cell Death.*2014; 10;7:1-9.

175. Haworth, O, M. Cernadas, R. Yang, C. N. Serhan, and B. D. Levy. 2008. Resolvin E1 regulates interleukin 23, interferon-gamma and lipoxin A4 to promote the resolution of allergic airway inflammation. *Nat. Immunol.* 9: 873–879.
176. Bannenberg GL, Chiang N, Ariel A, Arita M, Tjonahen E, Gotlinger KH, et al. Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. *J. Immunol.* 2005; 174: 4345–55.
177. Van Cleave J, Gortmaker SL, Perrin JM, Dynamics of obesity and chronic health conditions among children and youth. *JAMA*, 2010; 303, 623–30.
178. Camargo CA Jr, Weiss ST, Zhang S, Willett WC, Speitzer FE. Prospective study of body mass index, weight change, and risk of adult onset asthma in women. *Arch Intern Med.* 1999; 159: 2582-88.
179. Quinto KB, Zuraw BL, Poon KY, Chen W, Schatz M, Christiansen SC. The association of obesity and asthma severity and control in children. *J Allergy Clin Immunol*, 2011; 128, 964–69.
180. Farne H, Jackson DJ, Johnston L. Are emerging PGD2 antagonists a promising therapy class for treating asthma? *Expert Opin Emerg Drugs.* 2016;21(4):359-364.
181. Wu D, Zheng S, Li W, Yang L, Liu Y, Zheng X. Novel Biphasic Role of Resolvin D1 on Expression of Cyclooxygenase-2 in Lipopolysaccharide-Stimulated Lung Fibroblasts Is Partly through PI3K/AKT and ERK2 Pathways. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013: 964012.
182. Sam S, Mazzone T., Adipose tissue changes in obesity and the impact on metabolic function. *Transl. Res.* 2014; 164; 284–92.
- 183 Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 2003;112: 1796–08.
184. Clidir G, Akincilar SC, Tergaonkar V, Chronid adipose tissue inflammation: all immune cells on the stage. *Trends in Mol. Med.* 2013; 19: 487–500.
185. Liu J, Divoux A, Sun J, Zhang J, Clément K, Glickman JN, et al., Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nat. Med.* 2009; 15: 940–45.

186. Poglio S, De Toni-Costes F, Arnaud E, Laharrague P, Espinosa E, Casteilla L, et al, Adipose tissue as a dedicated reservoir of functional mast cell progenitors. *Stem Cells* 2010; 28: 2065–72.
187. Altintas MM, Rossetti MA, Nayer B, Puig A, Zagallo P, Ortega LM, et al., Apoptosis, mastocytosis, and diminished adipocytokine gene expression accompany reduced epididymal fat mass in long-standing diet-induced obese mice. *Lipids Health Dis.* 2011; 10: 198–207.

8.0 ANEXO



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Efeitos do tratamento com Resolvinas D-1, D-2 e com o precursor DHA na inflamação pulmonar alérgica em camundongos obesos" (protocolo nº 3493-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Edson Antunes / Edith Bastos Gandra Tavares, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em **28 de outubro de 2014**.

Campinas, 28 de outubro de 2014.

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva