



DIANA MAJOLLI ANDRÉ

EFEITO DO POLIFENOL RESVERATROL NA INFLAMAÇÃO PULMONAR ALÉRGICA
EM CAMUNDONGOS OBESOS

CAMPINAS

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

DIANA MAJOLLI ANDRÉ

EFEITO DO POLIFENOL RESVERATROL NA INFLAMAÇÃO PULMONAR ALÉRGICA
EM CAMUNDONGOS OBESOS

ORIENTAÇÃO: Prof. Dr. Edson Antunes

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção de título de Mestra em Farmacologia.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA POR
DIANA MAJOLLI ANDRÉ E ORIENTADA PELO
PROF. DR. EDSON ANTUNES.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2014

iii

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

An25e André, Diana Majolli, 1986-
Efeito do polifenol, resveratrol, na inflamação pulmonar alérgica de camundongos obesos / Diana Majolli André. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

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

1. Inflamação. 2. Resveratrol. 3. Asma. 4. Obesidade. 5. Estresse oxidativo. I. Antunes, Edson, 1960-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effect polyphenol, resveratrol, allergic pulmonary inflammation of obese mice

Palavras-chave em inglês:

Inflammation

Resveratrol

Asthma

Obesity

Oxidative stress

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Mestra em Farmacologia

Banca examinadora:

Edson Antunes [Orientador]

Soraia Kátia Pereira Costa

Alessandra Gambero

Data de defesa: 21-08-2014

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

DIANA MAJOLLI ANDRÉ

Orientador (a) PROF(A). DR(A). EDSON ANTUNES

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). EDSON ANTUNES

2. PROF(A). DR(A). ALESSANDRA GAMBERO

3. PROF(A). DR(A). SORAIA KÁTIA PEREIRA COSTA

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

Data: 21 de agosto de 2014

DEDICATÓRIA

A Deus, por estar sempre ao meu lado, mostrando sua força maior e realizando maravilhas em minha vida.

A minha mãe, Aparecida, pela dedicação, carinho, amor em todos os momentos, tornando mais fácil a concretização de mais uma etapa da minha vida. Muito obrigada.

A meu pai, Denis, o meu grande mestre, meu maior exemplo, muito obrigada pelo apoio incansável, dedicação, compreensão, carinho e amor. Minha eterna gratidão a você.

AGRADECIMENTOS

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

Ao prof. Dr Gabriel Anhê pela colobaração com toda a estrutura de western blotting.

A Carol Solon pela disponibilidade, boa vontade e dedicação nos experimentos de western blotting, seu apoio foi de extrema importância.

À Dra. Marina Calixto, meu profundo agradecimento pela amizade, apoio, incentivo, acolhimento e toda a sua paciência em passar seus ensinamentos a mim. Sem você não seria possível a realização desse trabalho.

Ao Eduardo Alexandre, pela amizade e pela colaboração na realização da técnica de medida de ânion superóxido.

Aos colegas de laboratório Célula e Cascata, Camila, Lineu, Celso, Fábio, Fabiano, Julio, Lorenzo, Luiz Osório, Paulo, Renata e Mariana pela amizade e convivência durante esse período.

Em especial as minhas queridas amigas do Edema (Laboratório de Inflamação) Dra. Gláucia, Dra. Ivani, Dra. Dalize e Edith. Agradeço imensamente a paciência, amizade, carinho, compreensão e pela bela convivência e, finalmente por tudo que aprendi com vocês. Meu muitíssimo obrigada!

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

Aos meus amigos de Americana, Campinas e Piracicaba pela compreensão da ausência em alguns momentos e pelo apoio irrestrito.

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.

À FAPESP e o CNPq pelo importantíssimo apoio financeiro.

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

Obesidade e asma são doenças de grande importância na saúde pública. Nos últimos 30 anos, a incidência de obesidade cresceu de forma dramática em todo o mundo enquanto que a prevalência de asma triplicou. Um número crescente de estudos clínicos e experimentais sugere a existência de uma associação entre a obesidade e asma. A obesidade é um fator de risco para asma, alterando esta doença para um fenótipo de difícil controle. Acredita-se que o estresse oxidativo associado à obesidade desempenha importante papel no desenvolvimento da asma. Estudo clínico mostrou uma correlação inversa entre a ingestão de polifenóis e incidência de asma. O resveratrol é um fitocomposto polifenólico capaz de reduzir a hiperreatividade das vias aéreas e o infiltrado eosinofílico, supostamente por ação antioxidante por meio da ativação da sirtuína 1 (SIRT 1) via fator de transcrição forkhead O (FOXO). O resveratrol é também capaz de ativar AMPK (proteína quinase ativada por AMP) e de inibir a fosfodiesterase do tipo 4 (PDE4), elevando os níveis de AMPc. Em vista disso, no presente estudo propomos estudar o efeito do tratamento do resveratrol 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 para induzir obesidade (grupo obeso). Na 10ª semana, os animais foram sensibilizados e desafiados com ovalbumina (OVA). A coleta do LBA e pulmão para análise histológicas foi realizada 48 h após o desafio com OVA. Camundongos obesos e controles foram tratados com resveratrol (100 mg/kg, gavagem, 2 últimas semanas de dieta). Nossos resultados mostraram que o ganho ponderal, peso da gordura epididimal, níveis de glicose em jejum e taxa de desaparecimento de glicose (Kitt) foram significativamente maiores nos animais obesos em relação àqueles alimentados com dieta comercial padrão. O tratamento com resveratrol nos animais obesos promoveu reduções significativas do peso da gordura epididimal, dos níveis de glicose e do Kitt, não interferindo no peso corpóreo desses animais. O infiltrado pulmonar de células inflamatórias e eosinófilos dos camundongos obesos em resposta ao desafio com OVA foi 70% maior ($P < 0,05$) do que nos animais controles. Contrariamente, no LBA dos animais obesos notamos número marcadamente menor de células inflamatórias totais e eosinófilos em relação aos controles. O tratamento com resveratrol preveniu de maneira significativa a elevação do infiltrado celular no parênquima pulmonar bem como a redução do número de células no LBA. Níveis elevados de TNF- α no LBA e de iNOS no tecido pulmonar foram encontrados no grupo obeso, sendo prevenidos pelo resveratrol. No tecido pulmonar de camundongos obesos, encontramos níveis menores de SOD e níveis maiores de espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo ambos prevenidos pelo resveratrol. Os níveis de GSH total não foram modificados em nenhum grupo estudado. O resveratrol reduziu a expressão p47 phox e elevou a expressão da SOD-1 no pulmão de animais obesos. Em relação à AMPK, notamos que o resveratrol aumenta significativamente a expressão dessa enzima no pulmão dos obesos. Além disso, notamos redução da expressão da SIRT 1 a qual foi prevenida pelo resveratrol. Quanto à PDE-4, o resveratrol diminuiu a expressão da mesma tanto nos pulmões dos animais controle quanto obesos. No conjunto, sugerimos que o resveratrol ativa a AMPK em camundongos obesos, prevenindo a resistência à insulina e a exacerbação da resposta inflamatória pulmonar e produção de EROs. Ao corrigir a resistência à insulina nos camundongos obesos há aceleração do processo de resolução da inflamação pulmonar alérgica, possivelmente pela diminuição do estresse oxidativo em resposta à ativação de SIRT 1.

ABSTRACT

Obesity and asthma are diseases of great importance in public health. Over the past 30 years, the incidence of obesity has grown dramatically around the world while the prevalence of asthma tripled. An increasing number of clinical and experimental studies suggest the existence of an association between obesity and asthma. Obesity is a risk factor for asthma, altering this disease to a phenotype difficult to control. It is believed that oxidative stress associated with obesity plays an important role in the development of asthma. Clinical study showed an inverse correlation between the intake of polyphenols and incidence of asthma. Resveratrol is a polyphenolic compound able to reduce airway hyperresponsiveness and eosinophilic infiltrate, supposedly by antioxidant action through activation of sirtuin 1 (SIRT 1) via forkhead transcription factor (FOXO). Resveratrol is also able to activate AMPK (AMP-activated protein kinase) and inhibit phosphodiesterase type 4 (PDE4) by increasing cAMP levels. In view of this, in this study we propose to study the effect of resveratrol in asthma exacerbation observed in sensitized obese-induced high fat diet mice. The study was conducted with C57BL / 6 mice fed with standard diet (control group) or high fat diet for 12 weeks to induce obesity (obese group). In 10th week, the animals were sensitized and challenged with ovalbumin (OVA). The collection of BALF and lung tissue for histological analysis was performed 48 h after OVA challenge. Obese and control mice were treated with resveratrol (100 mg / kg, oral gavage during the last 2 weeks of diet). Our results showed that the weight gain, weight of epididymal fat, fasting glucose levels and insulin tolerance test (Kitt) were significantly higher in obese animals compared to those fed a standard commercial diet. Treatment with resveratrol in obese animals reduced significantly the weight of epididymal fat, glucose levels and Kitt, no changes in body weight of these animals was observed. The lung infiltration of inflammatory cells and eosinophils of obese mice in response to challenge with OVA was 70% greater ($P < 0.05$) than in control animals. In contrast, in BALF of obese animals noticed markedly lower number of total inflammatory cells and eosinophils compared to controls. The treatment with resveratrol significantly prevented the elevation of cellular infiltrate in pulmonary parenchyma as well as reducing the number of cells in BALF. Elevated levels of TNF- α in the BALF and iNOS in lung tissue observed in the obese group is prevented by resveratrol. In lung tissue of obese mice, we found lower levels of SOD and increased levels of reactive oxygen species (ROS), both prevented by resveratrol. The total GSH levels were not modified in any group studied. Resveratrol reduced the p47 phox expression and increased expression of SOD-1 in lung of obese animals. Regarding AMPK, we note that resveratrol significantly increases the expression of this enzyme in the lungs of obese mice. Furthermore, we noticed a reduction in expression of SIRT 1 which was prevented by resveratrol. As for the PDE 4, resveratrol decrease the expression in lungs of control and obese animals. Overall, we suggest that resveratrol activates AMPK in obese mice, preventing insulin resistance and exacerbation of pulmonary inflammatory response and ROS production. When correcting insulin resistance in obese mice accelerates the resolution of allergic airway inflammation, possibly by reducing oxidative stress in response to activation of SIRT 1.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	Adenosina 5'-monofosfato
AMPC	Adenosina 5'-monofosfato cíclico
AMPK	Proteína quinase ativada por adenosina 5'-monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina bovina sérica
CCR3	Receptor para eotaxina
ECP	Proteína catiônica do eosinófilo
EDN	Neurotoxina derivada do eosinófilo
EDTA	Ácido etilenodiaminatetracético
EOS	Eosinófilos
EPM	Erro padrão da média
EPO	Peroxidase eosinofílica
EROS	Espécies reativas de oxigênio
DHE	Hidroetidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GM-CSF	Fator estimulante de colônia granulócito-macrófago
H/E	Hematoxilina/eosina
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IgE	Imunoglobulina E
I κ B	Inibidor do fator nuclear- κ B
IL	Interleucina
IL-5	Interleucina 5
IMC	Índice de massa corporal
INF- γ	Interferon-gama
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
ITT	Teste de tolerância à insulina
KITT	Constante de decaimento da glicose
LBA	Lavado broncoalveolar
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
Mac-1	Macrophage adhesion molecule-1

MBP	Proteína básica principal
NF-kB	Fator de transcrição nuclear kB
NO	Óxido nítrico
NOx	Metabólitos do óxido nítrico (nitrito e nitrato)
OVA	Ovalbumina
PBS	Tampão salina-fosfato
PGC-1	Co-ativador do receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo 1
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
Rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Reação transversa da polimerase em cadeia
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
Th2	T helper 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
TRIS	Tri(hidroximetil)-aminometano
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VLA-4	Very late antigen-4

LISTA DE MATERIAIS

<i>Susbtância</i>	<i>Procedência</i>
Ácido acético glacial	J.T.Baker (Eldorado, México)
Ácido cítrico	CETUS (Santo Amaro, Brasil)
Al(OH) ₃	Sanofi-synthelabo (RJ, Brasil)
Álcool (70% - 100%)	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Anti-AMPK	Cell Signaling (Danvers, MA, EUA)
Anti- fosfo-AMPK	Abcam (Cambridge, MA, EUA)
Anti-iNOS	Abcam (Cambridge, MA, EUA)
Anti –PDE 4	Biorbyt (Cambridge, Reino Unido)
Anti-p47 phox	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Anti- SIRT 1	Santa Cruz (Texas, EUA)
Anti-SOD 1	Biorbyt (Cambridge, Reino Unido)
Azida sódica	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
β- Actina	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
BSA	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Corante hematológico	Laboclin Ltda (Pinhais, Brasil)
Cristal de violeta	Merck (Darmstadt, Alemanha)
EDTA	J.T.Baker (Phillipsburg, EUA)
DHE	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Formaldeído (37%)	CETUS (Santo Amaro, Brasil)
Fosfato de potássio	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
H/E	Laboclin Ltda (Pinhais, Brasil)
H ₂ O ₂	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
H ₂ SO ₄	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
HCl	CETUS (Santo Amaro, Brasil)
HEPES	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Insulina recombinante humana de ação rápida	Lilly (Fegersheim – França)
Isoforine	Cristália (Itapira, Brasil)
KCl	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
KH ₂ PO ₄	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Kit Glutaciona para camundongo	Cayman Chemical (Michigan, EUA)

Kit Superóxido Dismutase para camundongo	Cayman Chemical (Michigan, EUA)
Kit TNF- α	R&D Systems (Minneapolis, EUA)
Metanol	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Na_2HPO_4	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
NaCl	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
NaHCO_3	Merck (Darmstadt, Alemanha)
NaHPO_4	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Óleo de imersão para microscopia	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Ortovanadato de sódio	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
OVA (grau V)	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Paraformaldeído	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Pirofosfato de sódio	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Solução fisiológica 0,9%	Equiplax (Ap. de Goiânia, Brasil)
Tris	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Trizol	Invitrogen (Grand Island, EUA)
Tween 20	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Xilol	Labsynth (Diadema, Brasil)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo da função da SOD.....	28
Figura 2. Esquema do protocolo de sensibilizações, desafios e tratamento com resveratrol para camundongos obesos e controles.....	34
Figura 3. Efeito do tratamento com resveratrol sobre o número de células inflamatórias totais e eosinófilos no tecido pulmonar.....	38
Figura 4. Fotomicrografia representativa do efeito do tratamento com resveratrol sobre o número de células inflamatórias e eosinófilos no tecido pulmonar 48 h após o desafio intranasal com OVA.....	39
Figura 5. Efeito do tratamento com resveratrol sobre o número de células inflamatórias totais e eosinófilos no LBA.....	41
Figura 6. Efeito do tratamento com resveratrol no ganho de peso ponderal, no peso da gordura epididimal, glicemia em jejum e curva de tolerância a insulina (ITT) em camundongos obesos e controles.....	44
Figura 7. Efeito do tratamento com resveratrol na concentração de SOD e GSH no tecido pulmonar.....	45
Figura 8. Efeito do tratamento com resveratrol sobre a produção de O_2^- no tecido pulmonar.....	47
Figura 9. Efeito do tratamento com resveratrol na concentração de $TNF-\alpha$	48
Figura 10. Efeito do tratamento com resveratrol sobre a expressão da iNOS no pulmão.....	49
Figura 11. Efeito do tratamento com resveratrol sobre a expressão da subunidade p47 phox no pulmão.....	50
Figura 12. Efeito do tratamento com resveratrol sobre a expressão da SOD1 no pulmão.....	51
Figura 13. Efeito do tratamento com resveratrol sobre a expressão da PDE 4 no pulmão.....	52
Figura 14. Efeito do tratamento com resveratrol sobre a expressão da p- AMPK no pulmão.....	53
Figura 15. Efeito do tratamento com resveratrol sobre a expressão de SIRT1 no pulmão.....	54
Figura 16. Esquema representativo do mecanismo de ação do resveratrol na inflamação pulmonar alérgica em camundongos.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de neutrófilos e células mononucleares no lavado broncoalveolar de camundongos controle e obesos tratados ou não com resveratrol.....	42
--	----

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
LISTA DE MATERIAIS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE TABELAS	xvi
1.1. ASMA.....	19
1.1.1. Patogênese da asma alérgica	19
1.1.2. Eosinófilos e asma	20
1.2. OBESIDADE.....	22
1.3. OBESIDADE E ASMA.....	24
1.4. ESTRESSE OXIDATIVO.....	25
1.5. ESTRESSE OXIDATIVO, OBESIDADE E ASMA	27
1.5.1. Esquema representativo da função da SOD.....	28
1.6. RESVERATROL.....	29
2. OBJETIVOS.....	31
2.1. Objetivos específicos	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. Animais.....	32
3.2. Indução da obesidade com dieta hiperlipídica.....	32
3.3. Sensibilização com OVA e desafio intranasal.....	32
3.4. Medida de gordura epididimal e ganho ponderal	33
3.5. Teste de tolerância à insulina (ITT).....	33
3.6. Tratamento com resveratrol.....	33
3.7. Coleta e contagem de células no LBA.....	34
3.8. Análise morfológica	34
3.9. Dosagens de TNF- α no LBA e SOD e GSH no tecido pulmonar	35
3.10. Medida de espécies reativas de oxigênio (EROs)	35
3.11. Western blotting	35
3.12. Análise estatística	36
4. RESULTADOS.....	37

4.1. Efeito do tratamento com resveratrol na inflamação pulmonar alérgica em camundongos obesos e asmáticos	37
4.1.1. Parênquima pulmonar	37
4.1.2. LBA.....	39
4.2. Efeito do tratamento com resveratrol sob a adiposidade, glicemia e resistência à insulina	42
4.3. Efeito do tratamento com resveratrol sobre os níveis de SOD e GSH	45
4.4. Efeito do tratamento com resveratrol sobre a produção de EROs.....	47
4.5. Efeito do tratamento com resveratrol sobre os níveis de TNF- α no LBA.....	49
4.6. Efeito do tratamento com resveratrol sobre a expressão da iNOS no pulmão de camundongos obesos	50
4.7. Efeito do tratamento com resveratrol sobre a expressão da subunidade p47 phox no pulmão de camundongos obesos	52
4.8. Efeito do tratamento com resveratrol sobre a expressão da SOD 1 no pulmão de camundongos obesos	53
4.9. Efeito do tratamento com resveratrol sobre a expressão da fosfodiesterase 4 (PDE4) no pulmão de camundongos obesos	54
4.10. Efeito do tratamento com resveratrol sobre a expressão de AMPK no pulmão de camundongos obesos e asmáticos.....	55
4.11. Efeito do tratamento com resveratrol sobre a expressão de SIRT 1 no pulmão de camundongos obesos	56
5. DISCUSSÃO.....	57
6. CONCLUSÕES.....	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

INTRODUÇÃO

1.1. ASMA

A asma é uma das principais doenças responsáveis por elevada morbidade e mortalidade em todo o mundo. Há evidências de que sua prevalência tem aumentado consideravelmente ao longo dos últimos 20 anos (*Global Initiative National for Asthma*, 2012). De 2001 a 2009, o número de pessoas diagnosticadas com asma aumentou em 4,3 milhões no mundo. O custo com o tratamento da asma cresceu cerca de 6% entre 2002 e 2007. Em 2010, estimou-se em 18,7 milhões de adultos (com idade ≥ 18 anos) e 17,0 milhões de crianças com asma (com idades entre 0 a 17 anos) no mundo.

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas acompanhada de hiperreatividade brônquica frente a vários estímulos, sendo reversível espontaneamente ou com tratamento farmacológico (Lemanske e Busse, 2010; Holgate, 2012). Embora não se saiba a causa exata, a asma parece envolver interações com fatores externos e genéticos (Vargaftig, 1999; Cooper et al., 2006). Estímulos (fatores de risco) comuns para a asma incluem a exposição a alérgenos (ácaros, pêlo de animais, baratas, pólen e fungos), irritantes ocupacionais, fumaça de cigarro, infecção respiratória (viral), exercícios e medicamentos (*Global Initiative National for Asthma*, 2012).

A asma é episódica, alternando episódios de chiado, falta de ar, aperto no peito e tosse, com períodos assintomáticos. Embora seja rara, uma crise aguda pode levar à morte (McFadden e Gilbert, 1992). A exposição a agentes causadores inicia uma resposta imune em indivíduos suscetíveis, desencadeando uma cascata inflamatória e obstrução das vias aéreas. O processo inflamatório na asma é multifatorial, e envolve a participação de vários tipos celulares presentes no trato respiratório, bem como outros órgãos, incluindo medula óssea e sistemas vascular e nervoso (Killeen e Skora, 2013).

1.1.1. Patogênese da asma alérgica

A patogênese da asma não é totalmente compreendida e não há prevenção ou cura para esta doença. Em meados da década de 1980 surgiu o paradigma que linfócitos CD4+ tipo 2 (células Th2) são importantes na patogênese da asma alérgica, o qual tem dominado a pesquisa nos últimos 30 anos (Hansbro et al., 2011).

O processo de 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. A interação destas células com os linfócitos T faz com que os linfócitos B sejam estimulados, produzindo imunoglobulina E (IgE), que, liberada na circulação, se liga à receptores de alta afinidade presentes em mastócitos (Holgate et al, 2005; Afshar et al., 2008; Galli e Tsai, 2012; Killeen e Skora, 2013).

Um aspecto fundamental da asma associada à sensibilização alérgica é a habilidade das vias aéreas em reconhecer os alérgenos ambientais e gerar uma resposta do tipo Th2. Uma vez sensibilizados, os linfócitos T, não somente migram das vias aéreas para o local de apresentação do antígeno, mas também se tornam potentes produtores de diversas citocinas, como IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13 e fator estimulante de colônia de macrófago-granulócito (GM-CSF) (Afshar et al., 2008; Holgate, 2008). Por meio da produção de citocinas, as células T são capazes de recrutar células efetoras secundárias, como macrófagos, basófilos, neutrófilos e principalmente eosinófilos para a zona inflamada, onde se tornam primadas e subseqüentemente ativadas para a secreção de mediadores inflamatórios (Simson e Foster, 2000; Hogan et al., 2008; Holgate, 2012). Estes mediadores causam aumento da permeabilidade vascular, contração da musculatura brônquica, infiltração de células inflamatórias, hipersecreção de muco, hiperreatividade e remodelamento das vias aéreas. Nos próximos contatos com o agente desencadeante, a maioria dos pacientes asmáticos desenvolve uma fase imediata e uma fase tardia de broncoconstrição. A fase imediata se instala em poucos minutos, sendo caracterizada por obstrução das vias aéreas de curta duração. A fase tardia ocorre após cerca de 3 horas de contato com o alérgeno, podendo durar por vários dias. Nesta fase, há um amplo processo inflamatório decorrente de intensa migração celular para as vias aéreas (O'Byrne, 1998; Holgate, 2008, 2012).

1.1.2. Eosinófilos e asma

Indivíduos asmáticos possuem número elevado de eosinófilos no sangue e nas vias aéreas e infiltrado inflamatório pulmonar rico em células ativadas, incluindo eosinófilos. Achados obtidos de pacientes asmáticos, bem como de modelos de asma experimental, mostram que os eosinófilos desempenham papel importante nesta doença. Acredita-se que o acúmulo seletivo e

ativação destas células na mucosa brônquica são considerados eventos críticos na patogênese da asma (Furuta et al., 2014; Acharya e Ackerman, 2014). Os eosinófilos encontrados nas vias aéreas são comumente associados com aumento do risco de exacerbação da asma, gravidade e piora do prognóstico (Esnault et al., 2013).

A função efetora dos eosinófilos está relacionada à liberação de proteínas granulares tóxicas como a proteína básica principal (MBP), proteína catiônica do eosinófilo (ECP), neurotoxina derivada do eosinófilo (EDN) e peroxidase do eosinófilo (EPO). A função do eosinófilo está também relacionada à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), e de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas e mediadores lipídicos (Hogan et al., 2008; Possa et al., 2013).

Os eosinófilos são granulócitos circulantes produzidos na medula óssea. São considerados os principais tipos celulares recrutados para sítios inflamatórios sob ação da IL-3, IL-5 e GM-CSF (Boyce et al., 1995; Trivedi e Lloyd, 2007; Lin et al., 2014). Como consequência da exposição ao antígeno, a liberação de eosinófilos da medula óssea é influenciada principalmente pela IL-5 e quimiocinas específicas, como a eotaxina (Brightling et al., 2008; Lin et al., 2014).

A IL-5 é a mais específica para a linhagem eosinofílica, sendo responsável pelo crescimento, diferenciação, ativação e sobrevivência desses leucócitos (Barnes, 2008; Lin et al., 2014). A eotaxina exerce atração específica sobre os eosinófilos, atuando predominantemente em receptores CCR-3 (Barnes, 2008). Os mecanismos responsáveis pelo recrutamento de eosinófilos para o sítio inflamatório ainda não estão completamente elucidados; porém, evidências apontam para o envolvimento de IL-3, GM-CSF, IL-5 e quimiocinas, principalmente a eotaxina (Uhm et al., 2012). Supõe-se que a IL-5 e a eotaxina ajam cooperativamente neste evento, onde a IL-5 atuaria ativando e aumentando a resposta eosinofílica frente à eotaxina (Mould et al., 1997, Palframan et al., 1998; Rothenberg e Hogan, 2006).

Acredita-se que o recrutamento de eosinófilos para as vias aéreas exacerbe a asma, contribuindo para o caráter crônico desta doença (Barnes, 2011). A migração de eosinófilos para o tecido inflamado é um processo complexo, regulado por numerosos fatores, incluindo citocinas, quimiocinas, óxido nítrico (NO) e interações com moléculas de adesão (Simson e Foster, 2000; Foster et al., 2001).

O NO tem sido apontado como importante mediador na inflamação asmática (Sugiura e Ichinose, 2011). Trabalho prévio mostrou níveis elevados de NO no ar exalado em primatas alérgicos 24 h após o desafio com antígeno (Young et al., 1999). Nestes animais, o número de

eosinófilos presentes no lavado broncoalveolar (LBA) persiste elevado por muitas semanas após três desafios com o antígeno. Os níveis de eotaxina mostraram-se também elevados após o desafio, sugerindo que a eotaxina e NO podem ser bons marcadores da inflamação alérgica pulmonar (Young et al., 1999). Outro estudo conduzido em pacientes asmáticos mostrou uma correlação positiva entre o número de eosinófilos nas vias aéreas e a fração do NO exalado (FENO), que, por sua vez, está associado com aumento na expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e, conseqüentemente, produção elevada de NO nas vias aéreas (Roos et al., 2014). A inibição aguda da síntese de NO pelo L-NAME (inibidor não seletivo da NOS) está associada à redução de eosinófilos nas vias aéreas e no parênquima pulmonar de animais desafiados com ovalbumina (OVA), mostrando que o NO desempenha uma importante função no recrutamento eosinofílico (Ferreira et al., 1998).

O NO pode reagir com o ânion superóxido (O_2^-), ou com o oxigênio, levando à formação de espécies reativas de óxido de nitrogênio. Estas reações indiretas do NO costumam ocorrer na presença de concentrações elevadas deste mediador, causando nitração de proteínas (Zhang et al., 2014). O NO pode levar à formação de intermediários altamente reativos, como o peroxinitrito ($ONOO^-$), o qual induz modificações covalentes do resíduo de tirosina em diversas proteínas (nitração), causando alterações estruturais e biológicas, além de dano ao DNA celular, e inibir a cadeia respiratória mitocondrial (Figura 1) (Folkerts et al., 2001; Andreadis et al., 2003; Roberts et al., 2009; Sugiura e Ichinose, 2011). Estudo prévio sugeriu a existência de nitração no tecido pulmonar do asmático, a qual seria mediada pelo $ONOO^-$ (Sugiura e Ichinose, 2011). Além de o $ONOO^-$ modular a migração de eosinófilos induzida pela eotaxina, há relato da formação de 3-nitrotirosina e aumento na expressão de iNOS em eosinófilos no LBA (Sato et al., 2000; Iijima et al., 2001).

1.2. OBESIDADE

A OMS prevê que até 2015 cerca de 2,3 bilhão de adultos estarão com sobrepeso ($IMC > 25$) e mais de 700 milhões serão obesos ($IMC > 30$). Na Europa, a prevalência de obesidade triplicou nas últimas duas décadas. Sobrepeso e obesidade são as doenças pediátricas crônicas mais comuns na Europa. A obesidade infantil é um forte fator de risco para obesidade na idade adulta, estando associada a aumento da mortalidade e incapacidade de trabalho (Gruchała-Niedoszytko et al., 2013).

O excesso de peso e a obesidade têm também crescido no Brasil. Pesquisa realizada em 2012 pelo Ministério da Saúde revelou, pela primeira vez, que o percentual de pessoas com excesso de peso supera mais da metade da população brasileira. A pesquisa mostra que 51% da população acima de 18 anos está acima do peso ideal. Em 2006, o índice era de 43%. Atualmente, em homens e mulheres o excesso de peso atinge 54% e 48%, respectivamente (Ministério da Saúde, 2014). O número de indivíduos com sobrepeso já ultrapassa o número de pessoas desnutridas, uma estatística que, em parte, reflete a aceitação global de alimentos ricos em gorduras, porém carente de vitaminas e micronutrientes (Finucane et al., 2011).

A obesidade é um importante fator de risco para uma série de doenças, incluindo diabetes tipo 2, hipertensão arterial, doenças cardíacas, esteatose hepática, câncer, distúrbios do trato urinário e asma (Kelly e Goodpaster, 2001; Lee et al., 2005; Berrington de Gonzalez, et al., 2010; Agrawal et al., 2011). Dados do Ministério da Saúde revelam que o Sistema Único de Saúde (SUS) gasta anualmente R\$ 488 milhões com o tratamento de doenças associadas à obesidade.

A obesidade é caracterizada por um aumento do número de adipócitos e lípidos devido a processos de mitogênese e diferenciação destas células, que são regulados por fatores genéticos, endócrinos, metabólicos, neurológicos, farmacológicos, ambientais e nutricionais (Unger e Zhou, 2001; Farmer e Auwerx, 2004; Fu et al., 2005). Dentre as causas da obesidade, destacam-se as mudanças alimentares da população com o excessivo consumo energético, composto por alimentos pobres em nutrientes e ricos em gordura saturada e açúcares, acompanhado de redução da atividade física (WHO, 2004).

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 (Hotamisligil, 2006; Olefsky e Glass, 2010).

Estudos mostram que a obesidade e o estresse oxidativo estão intimamente ligados (Codõner-Franch et al., 2011). Quando a ingestão calórica excede o gasto de energia, o aumento induzido pela atividade do ciclo de Krebs gera um excesso de EROs (Codõner-Franch et.al., 2011). Além disso, uma refeição rica em gordura e em carboidratos é capaz de induzir estresse oxidativo e resposta inflamatória mais intensa e prolongada com maior geração de EROs em pacientes obesos, quando comparados a indivíduos com peso normal (Codõner-Franch, et.al.,

2011). Embora a relação causal subjacente a esta associação permaneça incerta, o acúmulo de gordura é considerado uma fonte de estresse oxidativo (Weisberg et al, 2003; Furukawa et al, 2004; Chang et.al, 2013).

O estresse oxidativo sistêmico mediado pelo tecido adiposo e a inflamação sistêmica podem ser secundários a aumento dos níveis de leptina e diminuição dos níveis de adiponectina (Holguin e Fitzpatrick, 2009). Porém, existem várias outras fontes para o estresse oxidativo secundário à obesidade. Algumas são inerentemente relacionadas ao aumento da adiposidade e distribuição de gordura, ao passo que outras são resultado de comorbidades ou mudanças comportamentais associadas ao ganho de peso. Aumento do tecido adiposo e, em particular, a adiposidade visceral são significativamente correlacionadas com níveis sistêmicos elevados de biomarcadores do estresse oxidativo (Holguin e Fitzpatrick, 2010). No entanto, evidências recentes sugerem que, em vez de consequência, o estresse oxidativo é um pré-requisito para a adipogênese (Tormos et al, 2011; Chang et al, 2013). A obesidade está associada com a produção elevada de ânion superóxido (O_2^-) produzido em macrófagos ativados pela atividade da NADPH oxidase (Liu et al., 2013).

Há também evidências de que a obesidade está associada à expressão reduzida de várias proteínas antioxidantes. De fato, manter um estilo de vida saudável com dieta rica em antioxidantes e atividade física está associado à redução do estresse oxidativo. Infelizmente, esses hábitos não estão presentes de forma efetiva entre os obesos, que são mais sedentários e costumemente têm uma dieta rica em gordura e açúcares (Holguin e Fitzpatrick, 2010).

1.3. OBESIDADE E ASMA

No final da década de noventa, Camargo e colaboradores (1999) reportaram o primeiro estudo prospectivo associando a obesidade e o risco do desenvolvimento de asma em adultos. Numerosos estudos populacionais conduzidos em todo mundo indicam que a prevalência de asma é maior em indivíduos obesos *versus* magros. Além disso, diversos estudos prospectivos, tanto em adultos quanto em crianças, indicam que o risco relativo da incidência de asma aumenta proporcionalmente com o IMC (Shaheen et al., 1999; Thomson et al., 2003; Pakhale et al., 2010).

Um estudo recente em pacientes com asma persistente mostrou que os indivíduos obesos são significativamente mais propensos do que aqueles com IMC normal a terem piora na qualidade de vida relacionada à asma, tendo ainda maior número de hospitalizações relacionadas à asma (Gruchała-Niedoszytko et al, 2013). As observações de que a perda de peso, seja cirúrgica

ou por indução de dieta, proporciona melhora das diversas consequências da asma, incluindo prevalência, gravidade, uso de medicamentos e hospitalizações, reforçam a relação entre a obesidade e a asma (Hakala et al., 2000; Ford et al., 2003; Beuther et al., 2006; Sikka et al., 2010; Sideleva et al., 2013).

Tem sido sugerido que a obesidade e a asma apresentam algumas etiologias comuns, principalmente em suas bases genéticas, entretanto, é possível que existam outros mecanismos biológicos através dos quais a obesidade possa ser tanto a responsável pela causa ou pelo agravamento da asma (Luder et al., 1998; Weiss, 2005).

Dados obtidos de modelos animais também sustentam esta relação entre obesidade e asma (Shore e Johnston, 2006; Shore, 2007; Calixto et al., 2010, 2013; Lintomen et al., 2012). Na tentativa de se avaliar os mecanismos responsáveis pela associação entre obesidade e asma, camundongos obesos vêm sendo utilizados para se investigar os potenciais mecanismos através dos quais a obesidade pode modular a inflamação das vias aéreas e/ou sua função. Camundongos obesos apresentam aumento na resposta pulmonar ao ozônio (O₃), incluindo aumento da resistência pulmonar, hiperreatividade das vias aéreas e inflamação pulmonar (Shore, 2007). Estas observações já foram observadas em humanos obesos, os quais também respondem ao O₃ com aumento significativo da reatividade e diminuição da função pulmonar comparados a indivíduos magros (Alexeeff et al., 2007; Bennett et al., 2007).

Estudo conduzido por Calixto e colaboradores (2010) mostrou que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica acelera a eosinopoiese, aumenta o recrutamento de eosinófilos da medula óssea para o tecido pulmonar, e retarda seu trânsito através do epitélio até o lúmen das vias aéreas. Dessa forma, os eosinófilos permanecem por mais tempo na região peribronquiolar exercendo suas funções citotóxicas. Estes resultados também foram encontrados em camundongos *ob/ob*, deficientes de leptina (Lintomen et al., 2012).

1.4. ESTRESSE OXIDATIVO

Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (ERNs), muitas vezes designadas como radicais livres, são moléculas altamente reativas que apresentam elétrons desemparelhados capazes de reagir rapidamente com outros compostos químicos, alterando sua estrutura e função (Vincent et al., 2007; Stephens et al., 2009).

A produção de radicais livres ocorre como parte do metabolismo normal, e um certo grau de formação destes radicais parece ser necessário para a manutenção da homeostase do organismo. Logo, baixas concentrações de EROs e ERNs são necessárias para um estado redox celular normal (Codõner-Franch et al., 2011).

Há um refinado balanço entre a produção de radicais livres e a proteção exercida pelos antioxidantes, os quais incluem mecanismos não enzimáticos (antioxidantes da dieta) e enzimáticos (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) (Holguin e Fitzpatrick, 2010; Sugiura e Ichinose, 2011). Entre as EROs e ERNs mais importantes encontram-se o O_2^- , radicais hidroxila ($OH^\cdot$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), O_3 , $ONOO^-$, NO e ácido hipocloroso ($NaClO$), que podem ter origem exógena (do meio ambiente) ou endógena. Quanto os sistemas antioxidantes não inativam o excesso de EROs, estas espécies podem reagir com os componentes celulares, incluindo lípidos, proteínas e ácidos nucleicos, produzindo modificações irreversíveis (Codõner-Franch et al., 2011).

Os pulmões estão na interface com o ambiente externo, e assim são frequentemente expostos a gases e partículas oxidantes, favorecendo danos celulares. Níveis aumentados de oxidantes e danos celulares têm sido implicados em muitas doenças pulmonares, incluindo a asma e outras doenças alérgicas (Ciencewicky et al., 2008). O estresse oxidativo pode ser desencadeado em diversos tipos celulares presentes no pulmão, como macrófagos, eosinófilos, neutrófilos e mastócitos (Sugiura e Ichinose, 2008).

Entre as EROs, o O_2^- desempenha um papel central na inflamação. A enzima SOD neutraliza o O_2^- , transformando-o em H_2O_2 , impedindo assim a formação de compostos altamente agressivos, como $ONOO^-$ e $OH^\cdot$.

O complexo NADPH-oxidase (NOX) é a fonte primária de O_2^- . NADPH oxidases são complexos multi-subunidades, que incluem vários homólogos NOX que servem como local de transferência de elétrons da NADPH para o oxigênio molecular para gerar o O_2^- . A ativação da NOX requer associação com várias proteínas citosólicas, Rac, p47phox e p67phox (Kinkade et al., 2013). No estado de repouso, a gp91phox e p22phox formam um complexo inativo na membrana, enquanto que as outras subunidades inativas formam um trímero no citosol com p67phox ligando p47phox e p40phox (Lapouge et al., 2002; Bedard e Krause, 2007; Sumimoto, 2008). A fosforilação da gp91phox pela proteína quinase C (PKC) ativa a Rac, p47phox e p40phox, permitindo a translocação dessas subunidades citosólicas para a membrana formando uma enzima ativa, capaz de produzir O_2^- (Bedard e Krause, 2007; Sumimoto, 2008; Raad et al.,

2009). Camundongos com deficiência de p47phox são protegidos da inflamação do tecido adiposo induzida por dieta hiperlipídica e da resistência à insulina sistêmica (Xu et al., 2010).

1.5. ESTRESSE OXIDATIVO, OBESIDADE E ASMA

As características principais da asma, que são inflamação e a hiperreatividade brônquica, podem ser supostamente desencadeadas por agentes oxidantes. Estudos mostram que pacientes asmáticos apresentam produção elevada de EROs, proveniente de macrófagos, eosinófilos e neutrófilos, levando ao aumento de H_2O_2 , 8-isoprostano, monóxido de carbono e NO nos gases exalados condensados (Tiwari et al., 2014).

A literatura mostra uma ampla variedade de eventos associando o estresse oxidativo à obesidade. O aumento de tecido adiposo, principalmente nas vísceras, está relacionado a níveis sistêmicos elevados de biomarcadores do estresse oxidativo (Urakawa et al., 2003; Fujita et al., 2006). A obesidade pode aumentar o estresse oxidativo das vias aéreas por vários mecanismos. Um deles seria pelo desbalanço de adipocitocinas, que é caracterizado pelo aumento dos níveis de leptina e diminuição dos níveis de adiponectina, o qual tem sido associado ao aumento do estresse oxidativo sistêmico e nas vias aéreas (Holguin e Fitzpatrick, 2010). A leptina ativa células mononucleares periféricas e aumenta o *burst* oxidativo e a resposta inflamatória (Shirshev e Orlova, 2005). Em macrófagos alveolares murinos, a leptina aumenta a liberação de ácido araquidônico, de PGE2 e de leucotrienos via ativação da fosfolipase A₂ (Mancuso et al., 2004). O aumento dos níveis de ácido araquidônico e leucotrienos pode levar ao estresse oxidativo como resultado do aumento da resposta inflamatória, com consequente mudanças no balanço redox de glutathiona no pulmão (Holguin e Fitzpatrick, 2010).

A mitocôndria desempenha um papel importante na produção de O_2^- e H_2O_2 , conforme ilustrado na figura 1. O estresse oxidativo e nitrativo leva à perda de atividade da SOD e eventos *downstream* característicos da asma, incluindo apoptose, descamação do epitélio e hipereatividade brônquica (Zuo et al., 2013). Ao contrário, a SOD extracelular diminui a inflamação e a obstrução das vias aéreas (Comhair et al., 2005).

1.5.1. Esquema representativo da função da SOD

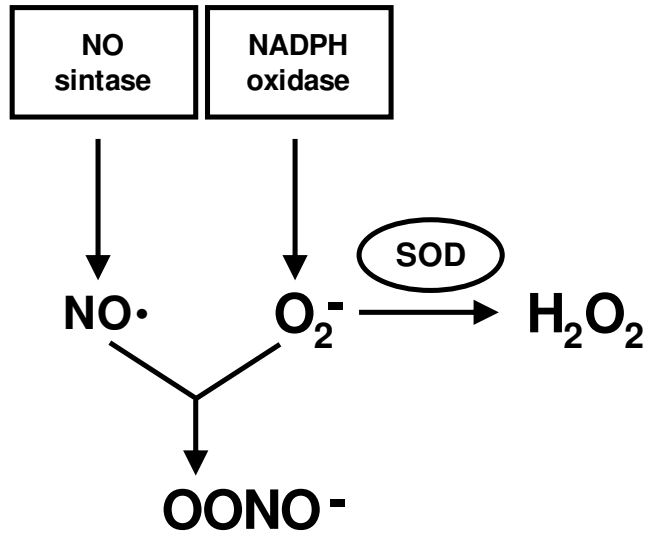


Figura 1: Função da SOD. NO: óxido nítrico, OONO⁻: peroxinitrito, H₂O₂: peróxido de hidrogênio, O₂⁻: ânion superóxido

1.6. OBESIDADE, RESISTÊNCIA À INSULINA E ASMA

A resistência dos tecidos metabólicos, como tecido adiposo, fígado e músculo às ações anabólicas da insulina é denominado resistência à insulina, uma característica das disfunções metabólicas induzidas pela obesidade (Kahn e Flier, 2000). A resistência à insulina manifesta-se como disponibilidade de glicose deficiente no músculo e aumento da lipólise de triglicerídeos no tecido adiposo, que resulta em hiperinsulinemia, hiperglicemia e hiperlipidemia (Kim et al., 1996; Shulman, 2000). A resistência periférica à insulina em tecidos metabólicos induz aumento da secreção de insulina pelas células beta pancreáticas, um processo denominado hiperinsulinemia compensatória. No entanto, com o agravamento da resistência à insulina, ocorre a exaustão da célula β , resultando em hiperglicemia sustentada e diabetes tipo 2 (Kahn e Flier, 2000; Shulman, 2000).

A resistência à insulina associada à obesidade parece desempenhar importante papel no desenvolvimento da asma, explicando, ao menos em parte, a associação entre asma e obesidade (Thuesen et al., 2009; Agrawal et al., 2011). Relatos recentes indicam uma alta prevalência de resistência à insulina em pacientes obesos e asmáticos *versus* obesos não asmáticos, sugerindo

que a resistência à insulina possa contribuir para este fenótipo (Gulcan et al., 2009; Thuesen et al., 2009; Arshi et al., 2010; Ma et al., 2010).

A via do NO parece dar suporte à relação entre asma e resistência à insulina. A iNOS, que é induzida por uma variedade de estímulos inflamatórios, sintetiza elevados níveis de NO, que, na presença de EROs, conduz à geração de ERNs mais tóxicas, como o ONOO⁻ (Mabalirajan et al., 2010). O estresse nitrosativo leva a modificações covalentes e inibição de várias proteínas fundamentais na sinalização da insulina (Carvalho-Filho et al., 2006; Pilon et al., 2010).

Estudo recente do nosso grupo conduzido em camundongos obesos mostrou que a metformina (ativador de proteína quinase ativada por AMP; AMPK) suprime a resistência à insulina e reduz significativamente o tráfego de eosinófilos para o lúmen aéreo, bem como reduz os níveis de eotaxina, TNF- α e NOx no LBA em animais desafiados com OVA (Calixto et al., 2013). Isto indica que a ativação da AMPK melhora o quadro asmático em camundongos obesos.

1.6. RESVERATROL

O resveratrol (trans-resveratrol) é um fitocomposto polifenólico da família de estilbeno. É produzido por plantas onde atua como molécula antimicrobiana. Pode ser encontrado na casca das uvas vermelhas, amora e amendoim (Albani et al., 2010; Hori et al., 2013).

Estudo prévio mostrou englobando mais de 10.000 pacientes uma correlação inversa entre a ingestão de polifenóis e incidência de asma (Knekt et al., 2002). Na asma experimental, o tratamento com resveratrol reduz significativamente a hiperreatividade das vias aéreas em resposta à metacolina e o número de eosinófilos no tecido pulmonar, assim como a hipersecreção do muco nas vias em animais sensibilizados com OVA. O resveratrol também foi capaz de reduzir os níveis de IgE total, IgE OVA-específico, IL-4 e IL-5 no soro e LBA de camundongos (Lee et al., 2009). O tratamento com resveratrol diminui os níveis de H₂O₂ e de malondialdeído, assim como aumenta os biomarcadores antioxidantes (atividades da SOD e catalase) em tecido pulmonar de camundongos expostos ao LPS (Zhang et al., 2009). O resveratrol também aumenta os níveis de glutathiona, e protege contra o estresse oxidativo induzido pela fumaça de cigarro em células epiteliais de pulmão humano (Kode et al., 2008; Zhang et al., 2009).

Os efeitos biológicos do resveratrol em mamíferos são em grande parte atribuídos à sua capacidade em ativar a SIRTUINA 1 (SIRT1) (Howitz et al., 2003). A SIRT1 regula uma grande variedade de processos biológicos, como o silenciamento de genes, envelhecimento, diferenciação celular e metabolismo (Blander e Guarente, 2004; Hori et al., 2013; Jimenez-

Gomez et al., 2013). Ativadores da SIRT1 têm sido desenvolvidos como promissores agentes terapêuticos, sendo que alguns deles estão em fase 1 e 2 de ensaios clínicos para o tratamento de doenças metabólicas, inflamatórias e cardiovasculares (Baur et al., 2012).

A ativação da SIRT1 por mecanismo dependente de NAD⁺, leva à diminuição significativa dos níveis de EROs, favorecendo a sobrevivência celular em condições de estresse oxidativo. A SIRT1 exerce sua função antioxidante através da ativação dos fatores de transcrição *forkhead O* (FOXO), especialmente FOXO 1, FOXO 3a, e FOXO 4. Estes fatores de transcrição também são importantes para a sobrevivência da célula, por meio de transativação de enzimas EROs-desintoxicantes como SOD2/MnSOD e catalase (Hori et al., 2013).

O resveratrol, por meio da ativação de SIRT1, medeia a desacetilação da subunidade p65 (RelA) do fator de transcrição nuclear kappaB (NF-kB) na lisina 310, que contribui para a regulação negativa da atividade de transcrição NF-kB, levando à diminuição da resposta inflamatória (Yeung et al., 2004) e aumento da sensibilidade à insulina em adipócitos e macrófagos (Yoshizaki et al., 2009; 2010). O resveratrol ativa também outra importante proteína reguladora do metabolismo corporal, a AMPK (Baur et al., 2006; Canto' et al., 2009; Um et al., 2010). Camundongos deficientes de AMPK são resistentes aos efeitos metabólicos do resveratrol, confirmando que a AMPK é um mediador chave para os efeitos benéficos produzidos por este polifenol (Canto' et al., 2010; Um et al., 2010). O resveratrol é também capaz de inibir diretamente alguns tipos de fosfodiesterases, em especial a fosfodiesterase do tipo 4, a qual promove aumento dos níveis de AMPc, e ativação da proteína Epac1, que causa ativação da AMPK e SIRT1 (Park et al., 2012). Em modelo de asma alérgica induzida por OVA, o resveratrol reduz a produção de citocinas, a eosinofilia, a hiperreatividade das vias aéreas e hipersecreção de muco (Lee et al., 2009).

Os mecanismos fisiopatológicos da exacerbação da asma no obeso ainda são pouco estudados. Nenhum estudo procurou avaliar os efeitos do resveratrol no modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica em camundongos sensibilizados e desafiados com OVA. Por isso, propomos, no presente estudo, a estudar o efeito do tratamento do resveratrol na exarcebação da asma em camundongos obesos. Nossa hipótese é que o resveratrol diminua o estresse oxidativo nas vias aéreas, assim melhorando a inflamação pulmonar em camundongos obesos.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é investigar o efeito do resveratrol sobre a inflamação pulmonar alérgica em camundongos obesos alimentados por dieta hiperlipídica.

2.1. Objetivos específicos

- I. Avaliar o efeito do tratamento crônico com resveratrol na resistência sistêmica à insulina em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica;
- II. Avaliar o efeito do tratamento com resveratrol sobre o número de eosinófilos no tecido pulmonar e no LBA de camundongos obesos e asmáticos;
- III. Avaliar o efeito do tratamento com resveratrol sobre o nível de TNF- α no LBA de camundongos obesos e asmáticos;
- IV. Avaliar o efeito do tratamento com resveratrol sobre a produção de O_2^- no tecido pulmonar de camundongos obesos e asmáticos;
- V. Avaliar o efeito do tratamento com resveratrol sobre os níveis de SOD e glutathione no tecido pulmonar de camundongos obesos e asmáticos;
- VI. Avaliar o efeito do tratamento com resveratrol sobre a expressão da p-AMPK, p47 phox, SOD 1, PDE4, iNOS e SIRT1 no tecido pulmonar de camundongos obesos e asmáticos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos de 4 semanas de idade da linhagem C57BL/6. Os animais foram fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP e mantidos à 24°C, com um período de iluminação diária de 12 h, com água e alimentação *ad libitum*, no Biotério do Departamento de Farmacologia da FCM/UNICAMP. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) - UNICAMP sob protocolo de nº 2709-1.

3.2. Indução da obesidade com dieta hiperlipídica

A obesidade foi induzida através da substituição da dieta padrão por dieta AIN-93 modificada para hiperlipídica (Reeves et al., 1993), que consiste em 46,5% de lipídeo, 38,5% de carboidrato e 15% de proteína, durante 12 semanas, conforme estudo prévio (Calixto et al., 2010). 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 OVA e desafio intranasal

A sensibilização com OVA foi realizada na 10ª semana de tratamento com a dieta hiperlipídica. Na 10ª. e 11ª. semana, cada camundongo recebeu injeção subcutânea de OVA no dorso, na dose de 100 µg, dissolvida em 1,6 mg de Al(OH)₃ em 0,4 ml de soro fisiológico. Uma semana após a última sensibilização com OVA, os animais foram desafiados por via intranasal com este alérgeno, na dose de 10 µg em 50 µl de soro fisiológico. Foram realizados 4 desafios com OVA com intervalos de 6 h entre os mesmos. 48 h após o último desafio, os animais foram anestesiados, exsanguinados, e submetidos aos diversos procedimentos experimentais descritos abaixo.

3.4. Medida de gordura epididimal e ganho ponderal

Os animais foram pesados semanalmente. Após anestesia e exsanguinação dos animais, toda gordura epididimal foi retirada e pesada em uma balança analítica (TE 214S, Sartorius, Alemanha).

3.5. Teste de tolerância à insulina (ITT)

Camundongos alimentados com dieta hiperlipídica ou dieta comercial padrão para roedores (controle) e os respectivos animais tratados com resveratrol foram mantidos em jejum por 6 h. Após o jejum, coletou-se o sangue da veia caudal, e o nível de glicose foi avaliado utilizando-se glicosímetro (Accu-Chek Performa, Roche Diagnostics, E.U.A).

Em experimentos separados, após o jejum, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de insulina (1 U/Kg). Coletou-se o sangue da cauda dos nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 min, para medida dos níveis de glicose. Calculou-se em seguida a taxa de decaimento da glicose através da curva de regressão linear do logaritmo neperiano da glicose *versus* o tempo. Este valor foi assumido como a constante de decaimento de glicose após o ITT (K_{ITT}) e expresso como porcentagem por minuto.

3.6. Tratamento com resveratrol

Camundongos obesos e controles (magros) foram tratados com resveratrol (100 mg/kg) (Rieder et al., 2012) diariamente por gavagem, durante duas semanas. O início do tratamento ocorreu concomitantemente com a primeira imunização e os desafios sucederam-se nos dois dias finais do tratamento. A coleta do LBA e pulmão foi realizada 48 h após o primeiro desafio, conforme ilustrado na figura 2.

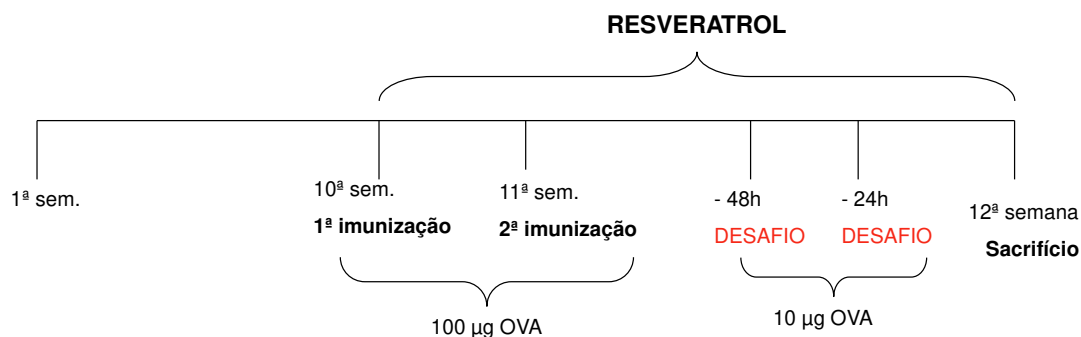


Figura 2. Protocolo de sensibilização e desafio com ovalbumina (OVA) em camundongos controles e obesos tratados com resveratrol (100 mg/kg por 14 dias).

Para a análise dos parâmetros propostos, os animais foram divididos em quatro grupos, sendo eles:

- SC (sensibilizado, controle)
- SO (sensibilizado, obeso)
- SC + RESVERATROL (sensibilizado, controle e tratado com resveratrol)
- SO + RESVERATROL (sensibilizado, obeso e tratado com resveratrol)

3.7. Coleta e contagem de células no LBA

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

3.8. 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, os pulmões

foram seccionados em segmentos de 4 a 5 μm e corados com hematoxilina-eosina (H-E). Para cada animal, as contagens de leucócitos totais e diferenciais foram realizadas em 5 campos de grande aumento com auxílio de um microscópio Nikon Eclipse E200. As imagens foram captadas com uma câmera digital Leica DM 5000B e a análise morfométrica foi realizada utilizando-se o *Leica Q Win Image Processing and Analysis Software* (V 3.2.0, Cambridge, Reino Unido).

3.9. Dosagens de TNF- α no LBA e SOD e GSH no tecido pulmonar

A suspensão celular obtida do LBA foi centrifugada por 10 minutos à 500 g e o sobrenadante foi utilizado para dosar TNF- α (R&D, Minneapolis, E.U.A.). E o homogenato pulmonar foi utilizado para dosagens de SOD e GSH de acordo com o fabricante (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, E.U.A.).

3.10. Medida de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Os pulmões foram removidos e colocados em meio para congelamento (TCA). Em seguida, foram congeladas em nitrogênio líquido. Os tecidos foram cortados (14 μM) em criostato e colocados em lâminas com silanina, e colocados em placa quente (37° C) por 20 min. Os cortes foram circulados com caneta hidrofóbica e incubados com tampão fosfato por 10 min à 37° C em câmara úmida. O tampão fosfato foi retirado. Os cortes foram incubados com hidroetidina (DHE, 10 μM), diluída em tampão fosfato por 30 minutos à 37° C em câmara úmida. Os cortes foram observados em microscópio de fluorescência (Eclipse 80i, Nikon, Japão) e câmera (com filtro para rodamina, usando-se uma objetiva de 10 vezes. A quantificação foi feita pelo *image J Software* (National Institute of Health, Bethesda-MD, EUA).

3.11. Western blotting

Os pulmões foram homogeneizadas com um Polytron (Kinematica, Suíça) em tampão de extração (SDS 1%, Tris pH 7,4 contendo 100 mM, pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 100 mM) e incubadas à 96°C por 10 min. Após centrifugação, foi removido o material insolúvel. Parte do sobrenadante foi utilizado para determinação do conteúdo protéico por espectrofotometria com reagente Bradford (Biorad, CA, EUA) e o restante foi acrescido de tampão Laemmli 5X e incubado à 96°C por 10 min. A mesma

quantidade de proteínas totais de cada amostra tratada com Laemmli foi fracionada em SDS-PAGE (2,6 %C e 8-12 %T) em aparelho para minigel (Bio-Rad, CA, EUA). Após separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, CA, EUA). As membranas foram então bloqueadas com uma solução contendo BSA 5%, Tris-Base, NaCl e Tween-20 por 2 horas à temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com anticorpos específicos contra p-AMPK, iNOS, SOD 1, PDE4, p47 phox e β -actina por 4 horas à temperatura ambiente. Após marcação com anticorpo primário, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado à peroxidase por 1 hora à temperatura ambiente (GE Healthcare, EUA). Antes da detecção, as membranas foram incubadas por 1 minuto com uma solução contendo luminol, ácido p-cumárico e H_2O_2 e, então, expostas durante tempos variados a filmes de raio-X. Depois de revelados, esses filmes foram submetidos à análise de densitometria óptica pelo *Software Scion Image* (Scioncorp, NIH, EUA). Os valores de intensidade óptica obtidos na leitura das bandas após a incubação com os anticorpos de interesse foram corrigidos pela intensidade óptica da leitura das bandas incubadas com o anticorpo anti- β -actina. Esta proteína é constitutiva e sua expressão não é alterada em função das intervenções, podendo deste modo atuar como um fator de correção na análise semi-quantitativa obtida pela técnica de Western blot.

3.12. Análise estatística

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

4. RESULTADOS

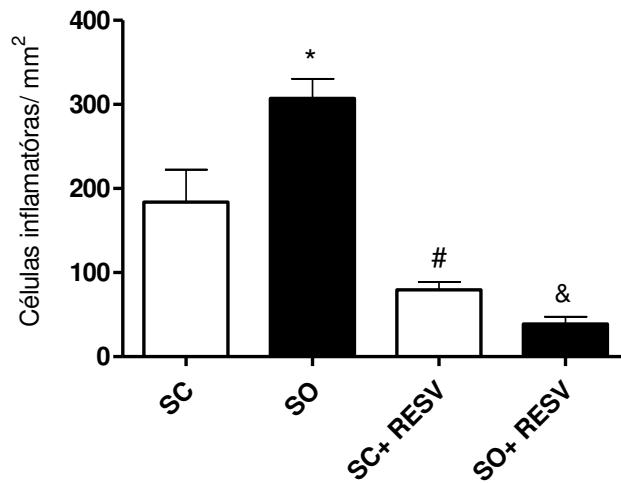
4.1. Efeito do tratamento com resveratrol na inflamação pulmonar alérgica em camundongos obesos e asmáticos

4.1.1. Parênquima pulmonar

Com intuito de avaliar o efeito do tratamento com resveratrol (100 mg/kg/dia) na inflamação pulmonar, realizamos a quantificação de células inflamatórias totais e de eosinófilos no tecido pulmonar através de análises morfológicas.

O desafio com OVA aumentou significativamente o infiltrado de células inflamatórias na região peribronquiolar dos camundongos obesos (SO) em relação aos controles (SC) (184 ± 39 e 307 ± 23 cels/mm² para controle e obesos, respectivamente). Aproximadamente 14% desse infiltrado é composto por eosinófilos, sendo significativamente maior no grupo obeso em relação ao controle ($25,8 \pm 2,7$ e $42,2 \pm 4,0$ cels/mm² para animais controles e obesos, respectivamente). O tratamento com resveratrol diminuiu de maneira significativa o número de células totais e de eosinófilos no tecido pulmonar dos camundongos controles e obesos, não havendo diferenças estatísticas entre ambos os grupos tratados com resveratrol (Figura 3A e B).

A.



B.

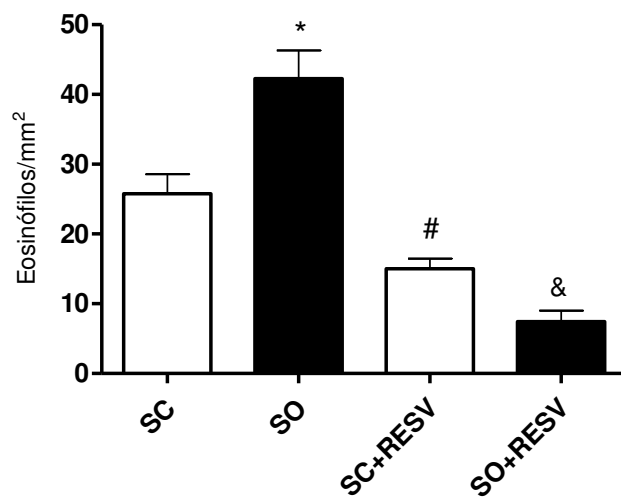


Figura 3. Efeito do tratamento com resveratrol (100 mg/kg/dia, 2 semanas) sobre o número de células inflamatórias totais e eosinófilos no tecido pulmonar em resposta ao desafio com ovalbumina (OVA). Os gráficos mostram o número de células inflamatórias totais (A) e eosinófilos (B) no tecido pulmonar obtidos de camundongos sensibilizados controles (SC), sensibilizados obesos (SO), sensibilizados controle tratados com resveratrol (SC+ RESV) e sensibilizados obesos tratados com resveratrol (SO+RESV) 48 h após o desafio intranasal com OVA. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M para $n=6$. * $P<0,05$ comparado com SC; # $P<0,05$ comparado com o grupo SC; & $P<0,05$ comparado com o grupo SO.

A Figura 4 mostra fotos representativas de histologia pulmonar para os quatro grupos experimentais. Nota-se grande infiltrado celular na região peribronquiolar dos animais obesos (SO) em relação aos controles (SC), sendo tal infiltrado marcadamente reduzido pelo tratamento com resveratrol.

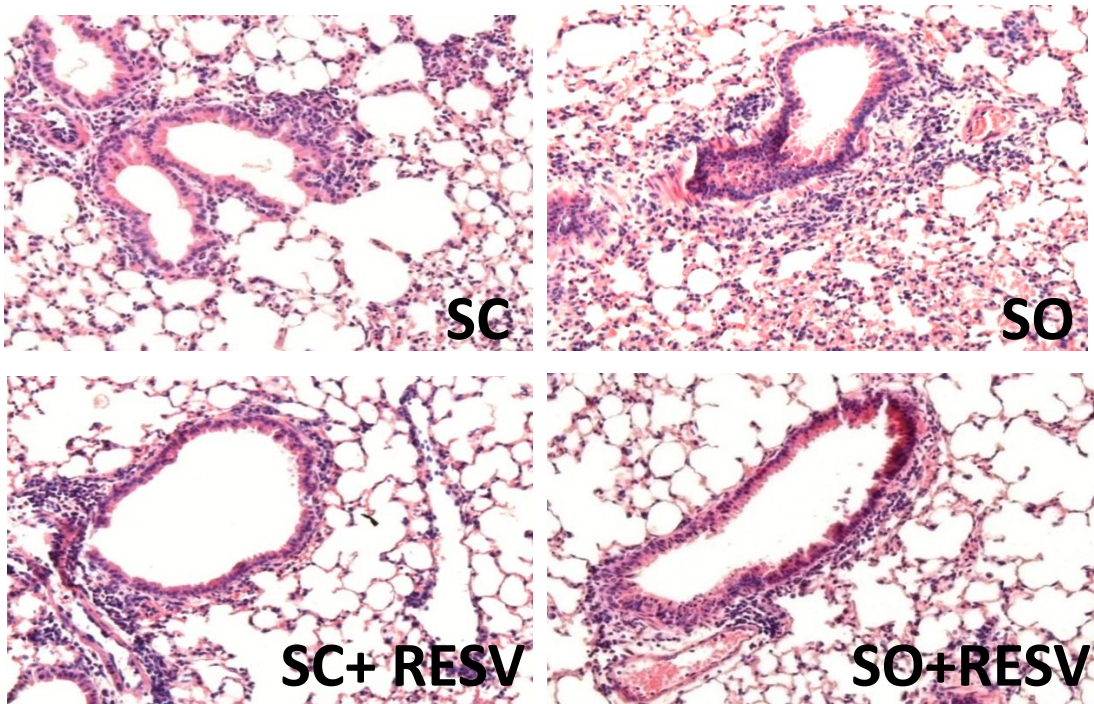


Figura 4: Fotomicrografia representativa do efeito do tratamento com resveratrol (100 mg/kg/dia) sobre o número de células inflamatórias e eosinófilos no tecido pulmonar 48 h após o desafio intranasal com ovalbumina (OVA). As fotos representam cortes de pulmões obtidos dos grupos sensibilizado controle (SC); sensibilizado obeso (SO), sensibilizado controle + resveratrol (SC+ RESV) e sensibilizado obeso + resveratrol (SO+ RESV). Aumento 200 vezes.

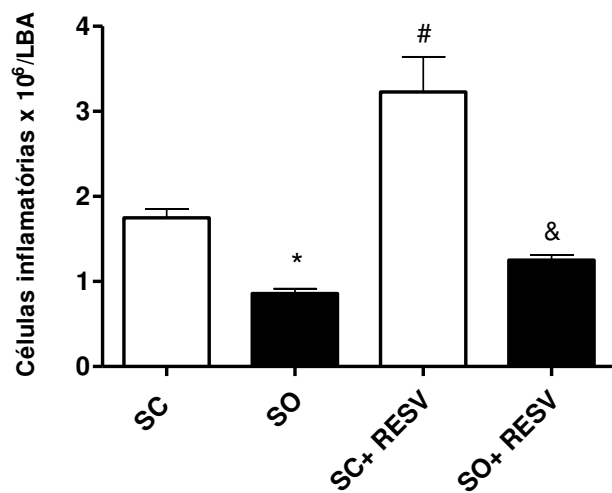
4.1.2. LBA

Realizamos também a quantificação de células totais e eosinófilos no LBA no tempo de 48 h após o desafio com OVA.

A Figura 5A e B mostra que o número de células inflamatórias totais e eosinófilos no LBA é menor ($P < 0,05$) em camundongos obesos em relação ao grupo controle, confirmando trabalho prévio do grupo (Calixto et al., 2010). O tratamento com resveratrol (100 mg/kg/dia) aumentou significativamente e em ambos os grupos o número de células inflamatórias e de eosinófilos no LBA. Entretanto, o número de células inflamatórias e de eosinófilos em camundongos obesos tratados com resveratrol continuou menor comparado com camundongos controles tratados com resveratrol.

O número de neutrófilos no LBA dos animais obesos foi menor em relação ao grupo controle, e o tratamento com resveratrol não corrigiu esta diferença (Tabela 1). Em relação às células mononucleares, não houve diferença estatística entre os grupos experimentais (Tabela 1).

A.



B.

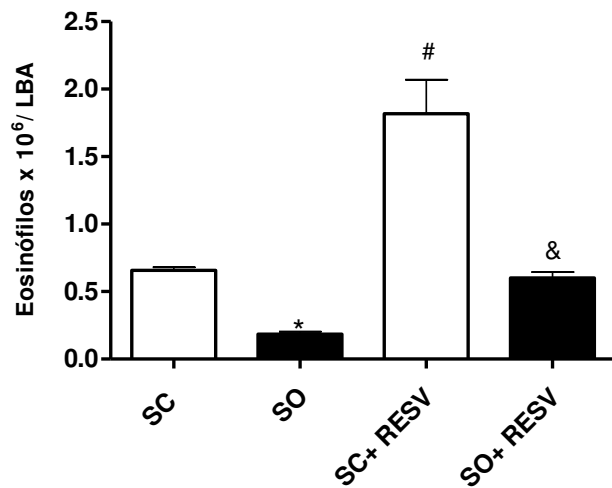


Figura 5. Efeito do tratamento com resveratrol (100 mg/kg/dia) sobre o número de células inflamatórias totais e eosinófilos no lavado broncoalveolar em resposta ao desafio

com ovalbumina (OVA). Os gráficos mostram o número de células inflamatórias totais (A) e eosinófilos (B) no LBA obtidos de camundongos sensibilizados controles (SC), sensibilizados obesos (SO), sensibilizados controle tratados com resveratrol (SC+ RESV) e sensibilizados obesos tratados com resveratrol (SO+RESV) 48 h após o desafio intranasal com OVA. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M para n=6. *P<0,05 comparado com SC; #P<0,05 comparado com o grupo SC; &P<0,05 comparado com o grupo SO.

Tabela 1. Número de neutrófilos e células mononucleares no lavado broncoalveolar (LBA) de camundongos sensibilizados controle e obesos, tratados ou não com resveratrol (100 mg/kg/dia).

Grupo	Neutrófilos ($\times 10^6$ /LBA)	Mononucleares ($\times 10^6$ /LBA)
SC	0,08 $\pm$ 0,02	1,01 $\pm$ 0,11
SO	0,02 $\pm$ 0,00 *	0,70 $\pm$ 0,12
SC+ RESV	0,09 $\pm$ 0,01	0,81 $\pm$ 0,04
SO+ RESV	0,02 $\pm$ 0,01	0,6 $\pm$ 0,07

Os dados foram obtidos de animais sensibilizados controles (SC), sensibilizados obesos (SO), sensibilizados controles + resveratrol (SC + RESV), e sensibilizados obesos + resveratrol (SO + RESV). Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M para n=6. *P<0,05 comparado com SC; #P<0,05 comparado com o grupo SC; &P<0,05 comparado com o grupo SO.

4.2. Efeito do tratamento com resveratrol sob a adiposidade, glicemia e resistência à insulina

Camundongos C57BL/6J desenvolvem obesidade acompanhada de intolerância à glicose quando alimentados com dieta hiperlipídica (Calixto et al., 2010). Nesse estudo, avaliamos se camundongos alimentados com dieta hiperlipídica apresentam intolerância à insulina após se tornarem obesos e se o tratamento diário com resveratrol, por um período de 14 dias, reverte este quadro.

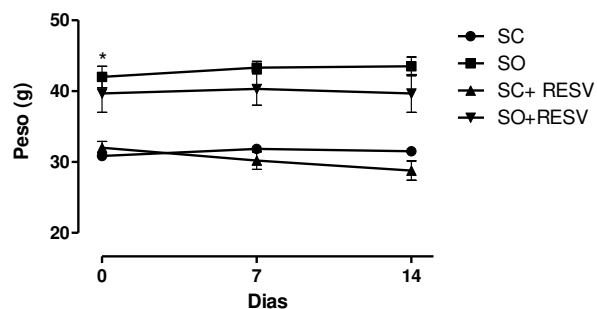
Animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram ganho ponderal e peso da gordura epididimal significativamente maiores do que animais alimentados com dieta comercial

padrão. O ganho de peso não foi alterado pelo tratamento com resveratrol, nem no grupo controle nem no grupo obeso (Figura 6A). Contudo, o tratamento com resveratrol diminuiu discretamente (porém de modo significativo) o peso da gordura epididimal nos camundongos obesos (Figura 6B).

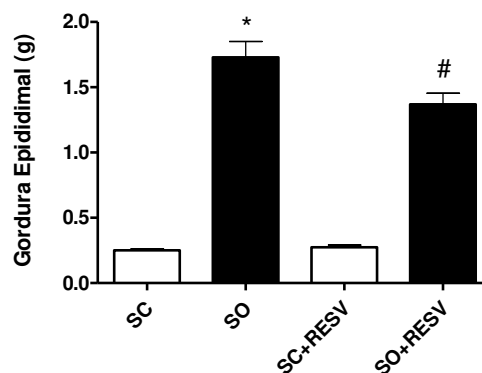
Os níveis de glicose em jejum foram maiores no grupo obeso em relação ao controle. O tratamento com resveratrol reduziu significativamente a glicemia de jejum no grupo obeso, não modificando este parâmetro no grupo controle (Figura 6C).

A taxa de queda de glicose em resposta a 1 UI/kg de insulina recombinante foi avaliada através do cálculo da constante de captação de glicose (K_{ITT}). Este parâmetro foi menor no grupo obeso em relação ao grupo controle, sendo revertido pelo tratamento com resveratrol. Não existe diferença significativamente nos valores de K_{ITT} entre os grupos obeso e controle tratados com resveratrol (Figura 6D). Estes dados indicam que o resveratrol reverte a resistência à insulina induzida pela obesidade.

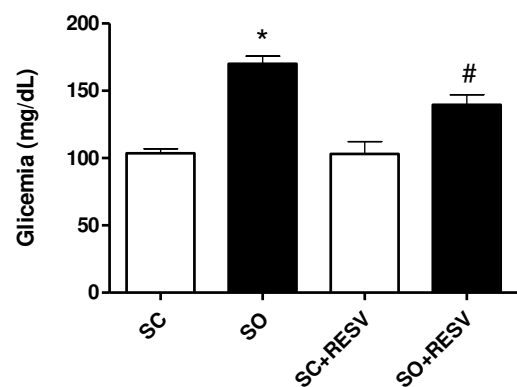
A.



B.



C.



D.

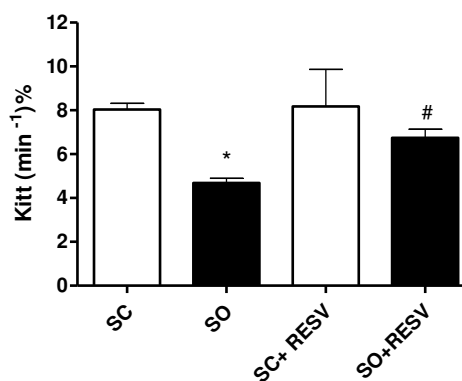


Figura 6: Efeito do tratamento com resveratrol (100 mg/kg/dia) sobre o peso ponderal (A), peso da gordura epididimal (B), glicemia em jejum (C) e K_{ITT} (D) em camundongos obesos e controles. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M para n=7-12. *P<0,05 comparado com controle (SC), #P<0,05 comparado com obeso (SO). Grupos sensibilizado controle (SC); sensibilizado obeso (SO), sensibilizado controle + resveratrol (SC+RESV) e sensibilizado obeso + resveratrol (SO+RESV).

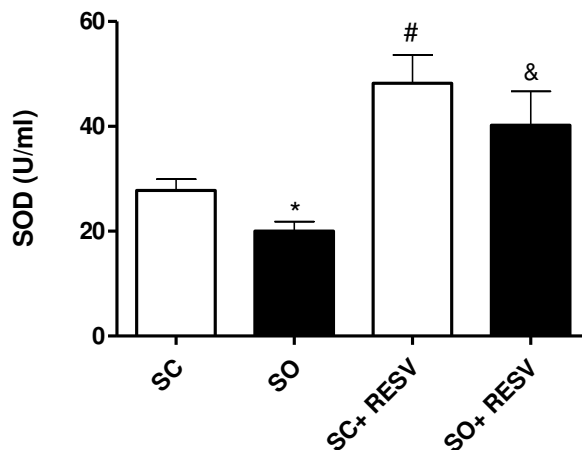
4.3. Efeito do tratamento com resveratrol sobre os níveis de SOD e GSH

Para avaliar se camundongos obesos e asmáticos apresentam níveis alterados das enzimas antioxidantes, realizamos ensaios de dosagens de SOD e GSH no tecido pulmonar de camundongos desafiados com OVA.

Os níveis de SOD em camundongos obesos foram significativamente menores comparado ao grupo controle. O tratamento com resveratrol aumentou significativamente ($P<0,05$) a concentração de SOD nos camundongos asmáticos obesos e controle (Figura 7A).

O tratamento com resveratrol não afetou as concentrações de GSH total em nenhum grupo estudado (Figura 7B).

A.



B.

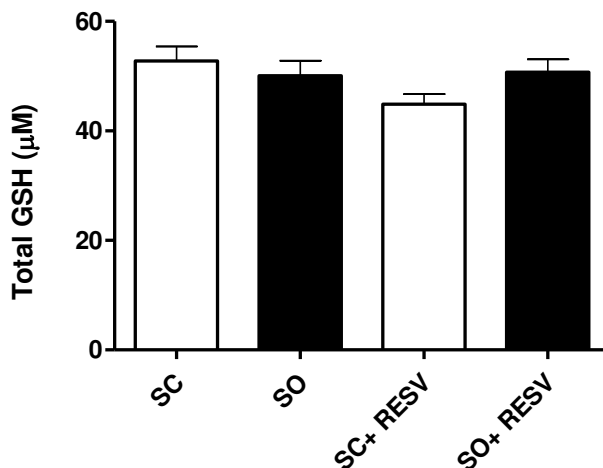


Figura 7. Efeito do tratamento com resveratrol (100 mg/kg/dia) na concentração de SOD e GSH no tecido pulmonar de camundongos desafiados com ovalbumina (OVA). Os

gráficos representam GSH (A) e a SOD (B) obtidos de camundongos sensibilizados controle e obesos, tratados ou não com resveratrol. Os dados estão expressos como média $\pm$ E.P.M para n=6. *P<0,05 comparado com controle (SC) #P<0,05 comparado com controle não tratado (SC); &P<0,05 comparado com obeso não tratado (SO). Grupos sensibilizado controle (SC); sensibilizado obeso (SO), sensibilizado controle + resveratrol (SC+ RESV) e sensibilizado obeso + resveratrol (SO+ RESV).

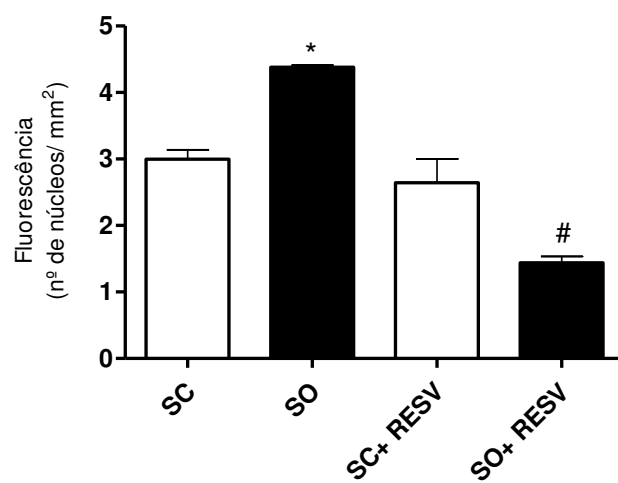
4.4. Efeito do tratamento com resveratrol sobre a produção de EROs

Para avaliar o efeito antioxidante do resveratrol na inflamação pulmonar em camundongos obesos, realizamos a quantificação da produção de EROs no tecido pulmonar, através da coloração de hidroetidina (DHE). Na presença de O_2^- , a DHE é transformada em brometo de etídio, que se liga ao DNA, exibindo fluorescência vermelha no núcleo (Sato et al., 2009; Lin et al., 2012; Pernomian et al., 2012).

No pulmão dos camundongos obesos houve um aumento significativo na produção de EROs em comparação ao respectivo controle (Figura 8A). O tratamento de 14 dias com resveratrol diminuiu a produção de EROs no pulmão de camundongo obeso, sem interferir com a produção do mesmo no grupo controle (Figura 8A).

A Figura 8B mostra as fotos representativas das lâminas silanizadas utilizadas para a análise da produção de EROs. Note aumento da produção de EROs nos pulmões de camundongos obesos em comparação com os animais controle. O resveratrol diminuiu a produção de EROs no tecido pulmonar de camundongos obesos, porém não tem efeito significativo em camundongos controle.

A.



B.

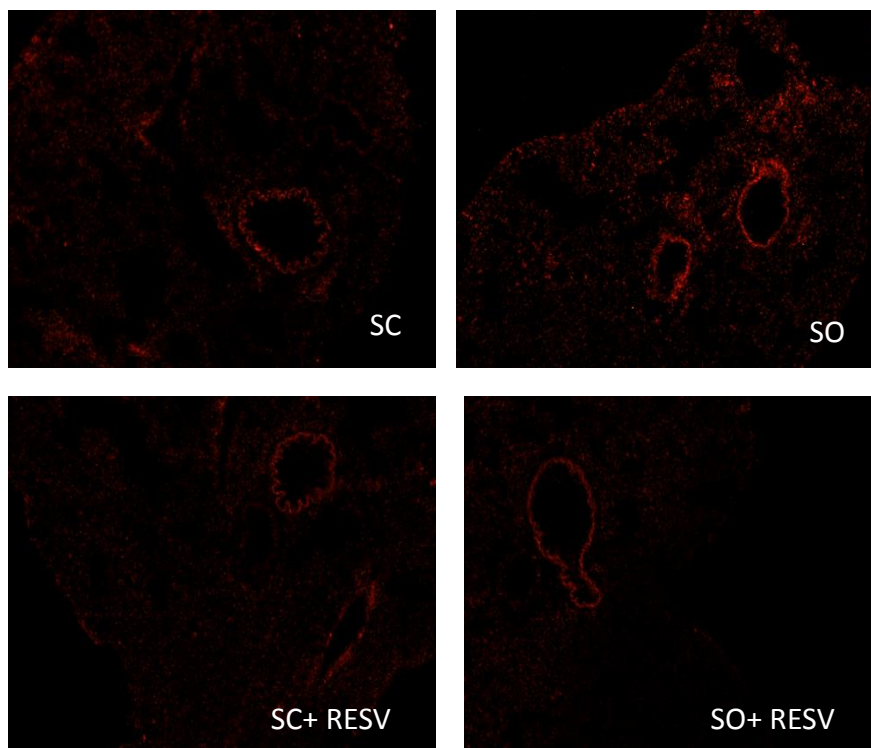


Figura 8: Efeito do tratamento com resveratrol (100 mg/kg/dia) sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) no tecido pulmonar em resposta ao desafio com

ovalbumina (OVA). O gráfico mostra a produção de EROs no tecido pulmonar (Painel 8A). O painel B mostra fotomicrografias representativas do efeito do tratamento com resveratrol sobre a produção de EROs em cortes de pulmões obtidos dos grupos sensibilizado controle (SC); sensibilizado obeso (SO), sensibilizado controle + resveratrol (SC+ RESV) e sensibilizado obeso + resveratrol (SO+ RESV). Utilizamos objetiva de 10 vezes. Os dados estão expressos como média $\pm$ E.P.M para n=6. *P<0,05 comparado com controle (SC); #P<0,05 comparado com obeso não tratado (SO).

4.5. Efeito do tratamento com resveratrol sobre os níveis de TNF- α no LBA

Os camundongos desafiados alimentados com dieta hiperlipídica mostraram um aumento da concentração de TNF- α no LBA em comparação com camundongos controle (Figura 9). O tratamento com resveratrol diminuiu de forma significativa a concentração de TNF- α no grupo obeso, não modificando a concentração desta citocina no grupo controle (Figura 9).

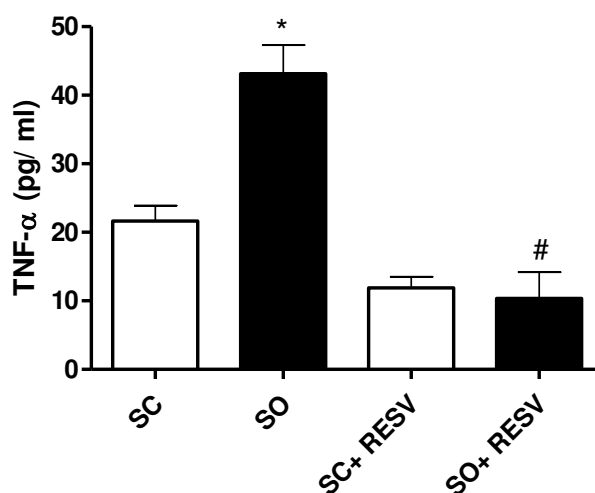


Figura 9. Efeito do tratamento com resveratrol (100 mg/kg/dia) na concentração de TNF- α no lavado broncolaveolar em resposta ao desafio com ovalbumina (OVA). O gráfico representa a dosagem dos níveis do fator de necrose tumoral α (TNF- α) no lavado broncolaveolar de camundongos sensibilizados controle e obesos, tratados ou não com resveratrol. Os dados estão expressos como média $\pm$ E.P.M para n=6. *P<0,05 comparado com SC; #P<0,05 comparado com SO. Grupos sensibilizado controle (SC); sensibilizado obeso (SO), sensibilizado controle + resveratrol (SC+ RESV) e sensibilizado obeso + resveratrol (SO+ RESV).

4.6. Efeito do tratamento com resveratrol sobre a expressão da iNOS no pulmão de camundongos obesos

A expressão da iNOS no tecido pulmonar foi determinada através da técnica de Western blotting. O resultado mostrou que animais obesos apresentam um aumento significativo na expressão pulmonar de iNOS em comparação com o grupo controle. O tratamento com resveratrol reduziu de forma significativa a expressão de iNOS nos animais obesos, porém não alterou a expressão dessa enzima no pulmão dos animais controle (Figura 10).

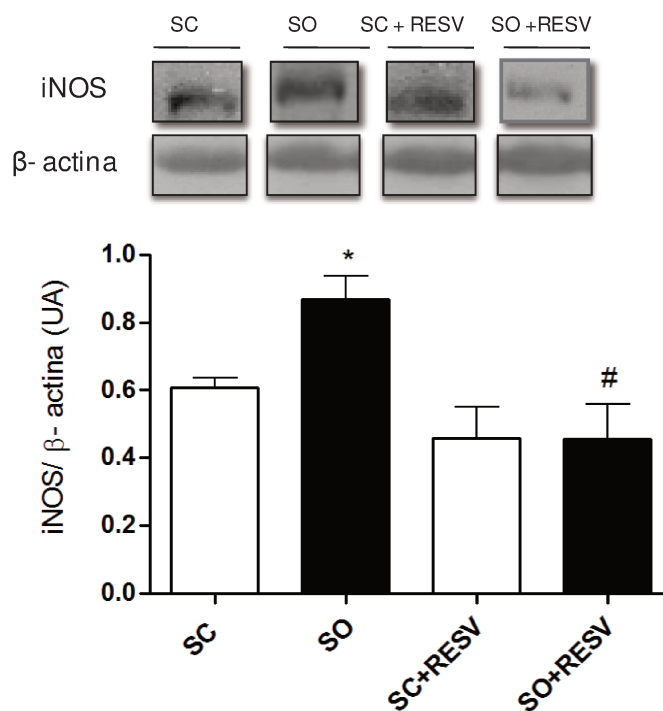


Figura 10. Efeito do tratamento com resveratrol (100 mg/kg/dia) sobre a expressão da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) no tecido pulmonar em resposta ao desafio com ovalbumina (OVA). O gráfico representa a expressão da iNOS nos pulmões. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M para $n = 5-6$. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo SC; # $P < 0,05$ comparado com SO. Os valores da expressão da iNOS de cada grupo foram normalizados por β -actina e expressos por unidades arbitrárias (UA). Grupos sensibilizado controle (SC);

sensibilizado obeso (SO), sensibilizado controle + resveratrol (SC+ RESV) e sensibilizado obeso + resveratrol (SO+ RESV).

4.7. Efeito do tratamento com resveratrol sobre a expressão da subunidade p47 phox no pulmão de camundongos obesos

A análise da expressão da subunidade p47 phox no tecido pulmonar mostrou que o grupo obeso não apresenta diferença em relação ao grupo controle. Entretanto, o tratamento com resveratrol reduziu de forma significativa a expressão dessa proteína nos animais obesos. O tratamento não alterou a expressão de p47 phox no pulmão dos animais controle (Figura 11).

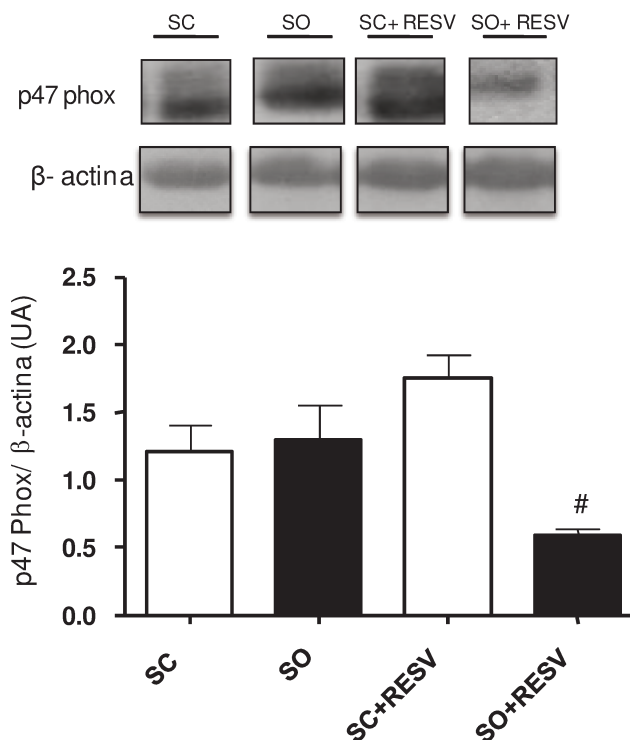


Figura 11. Efeito do tratamento com resveratrol (100 mg/kg/dia) sobre a expressão da subunidade p47 phox no tecido pulmonar em resposta ao desafio com ovalbumina (OVA). O gráfico representa a expressão da p47 phox nos pulmões dos grupos sensibilizado controle (SC); sensibilizado obeso (SO), sensibilizado controle + resveratrol (SC+ RESV) e sensibilizado obeso + resveratrol (SO+ RESV). Os dados representam a média $\pm$ E.P.M para n= 5-6. [#]P<0,05 comparado com SO. Os valores da expressão da p47 phox de cada grupo foram normalizados por β -actina e expressos por unidades arbitrárias (UA).

4.8. Efeito do tratamento com resveratrol sobre a expressão da SOD 1 no pulmão de camundongos obesos

A expressão da SOD 1 foi determinada através da técnica de Western blotting. O resultado mostrou que a expressão dessa enzima no grupo obeso não é estatisticamente diferente do grupo controle. O tratamento com resveratrol aumentou de forma significativa a expressão dessa proteína em ambos os grupos (Figura 12).

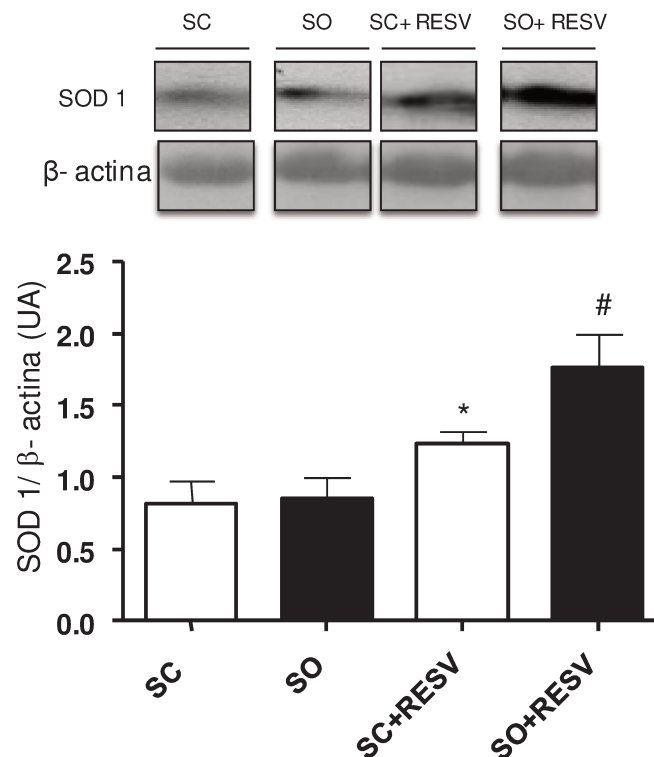


Figura 12. Efeito do tratamento com resveratrol (100 mg/kg/dia) sobre a expressão da SOD 1 no tecido pulmonar em resposta ao desafio com ovalbumina (OVA). O gráfico representa a expressão da SOD 1 nos pulmões dos grupos sensibilizado controle (SC); sensibilizado obeso (SO), sensibilizado controle + resveratrol (SC+ RESV) e sensibilizado obeso + resveratrol (SO+ RESV). Os dados representam a média $\pm$ E.P.M para $n = 5-6$. * $P < 0,05$ comparado com o grupo SC; # $P < 0,05$ comparado com SO. Os valores da expressão da SOD 1 de cada grupo foram normalizados por β -actina e expressos por unidades arbitrárias (UA).

4.9. Efeito do tratamento com resveratrol sobre a expressão da fosfodiesterase 4 (PDE4) no pulmão de camundongos obesos

A expressão da enzima PDE4 foi determinada através da técnica de Western blotting, com intuito de verificar se o resveratrol é capaz de inibir essa via de sinalização. O resultado mostrou que o grupo obeso não difere significativamente do grupo controle. O tratamento com resveratrol diminuiu de forma significativa a expressão dessa enzima no pulmão dos animais obesos e controle (Figura 13).

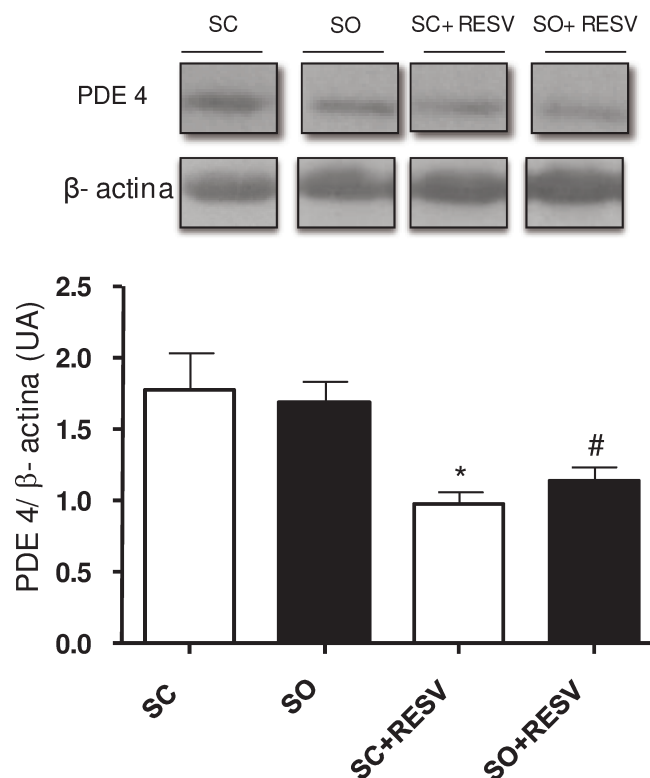


Figura 13. Efeito do tratamento com resveratrol (100 mg/kg/dia) sobre a expressão da PDE4 no tecido pulmonar em resposta ao desafio com ovalbumina (OVA). O gráfico representa a expressão da PDE4 nos pulmões dos grupos sensibilizado controle (SC); sensibilizado obeso (SO), sensibilizado controle + resveratrol (SC+ RESV) e sensibilizado obeso + resveratrol (SO+ RESV). Os dados representam a média $\pm$ E.P.M para n= 5-6. *P<0,05 comparado com o grupo SC; #P<0,05 comparado com SO. Os valores da expressão da PDE4 de cada grupo foram normalizados por β -actina e expressos por unidades arbitrárias (UA).

4.10. Efeito do tratamento com resveratrol sobre a expressão de AMPK no pulmão de camundongos obesos e asmáticos

Para confirmar a participação da AMPK na inflamação pulmonar, quantificamos a expressão da p-AMPK no tecido pulmonar de camundongos obesos e controles, tratados ou não com resveratrol (100 mg/kg/dia). A Figura 14 mostra que não há diferenças significativas na expressão de p-AMPK no tecido pulmonar entre os grupos controle e controle tratados. Porém, o tratamento com resveratrol aumentou significativamente a expressão de p-AMPK nos camundongos obesos, sem interferir com o grupo controle.

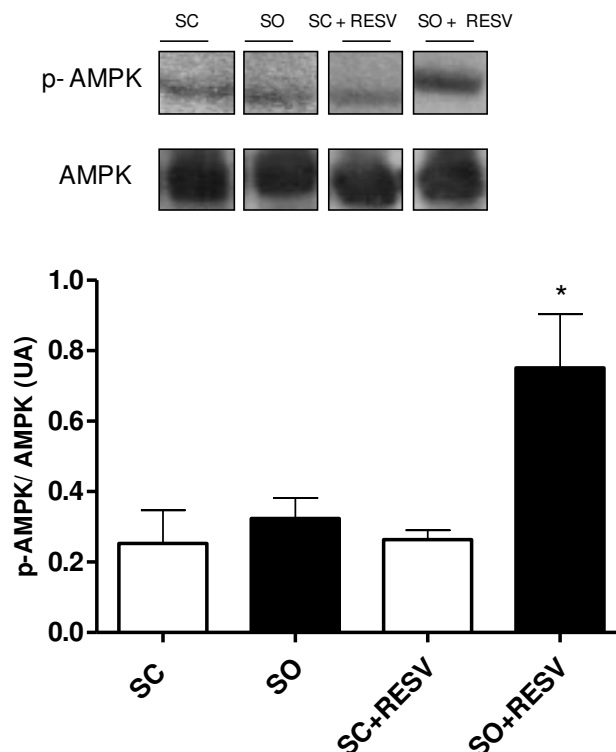


Figura 14. Efeito do tratamento com resveratrol (100 mg/kg/dia) sobre a ativação da AMPK no tecido pulmonar em resposta ao desafio com ovalbumina (OVA). O gráfico representa a ativação de AMPK nos pulmões dos grupos sensibilizado controle (SC); sensibilizado obeso (SO), sensibilizado controle + resveratrol (SC+ RESV) e sensibilizado obeso + resveratrol (SO+ RESV). Os dados representam a média $\pm$ E.P.M para $n = 6-7$. * $P < 0,05$ comparado com o grupo SO. Os valores da p-AMPK de cada grupo foram normalizados por AMPK total e expressos por unidades arbitrárias (UA).

4.11. Efeito do tratamento com resveratrol sobre a expressão de SIRT 1 no pulmão de camundongos obesos

Como já descrito na literatura, o resveratrol é um potente ativador de SIRT 1. Recentemente, foi mostrado que essa ativação acontece de maneira indireta por meio da ativação de cascata de sinalização da AMPK. Assim, para confirmar essa via de sinalização pelo resveratrol, quantificamos a expressão de SIRT 1 no tecido pulmonar de camundongos obesos e tratados com resveratrol (100 mg/kg/dia).

A Figura 15 mostra que a expressão de SIRT1 é significativamente menor no grupo obeso comparado ao controle. O tratamento com resveratrol previne a redução da SIRT 1 no grupo obeso, sem interferir com a expressão desta proteína no grupo controle.

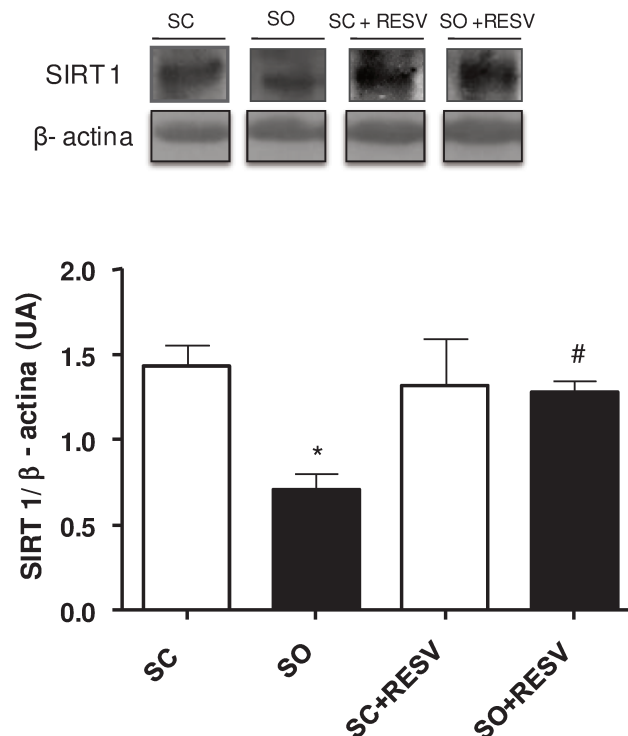


Figura 15. Efeito do tratamento com resveratrol (100 mg/kg/dia) sobre a expressão de SIRT 1 no tecido pulmonar em resposta ao desafio com ovalbumina (OVA). O gráfico representa a expressão de SIRT 1 nos pulmões dos grupos sensibilizado controle (SC); sensibilizado obeso (SO), sensibilizado controle + resveratrol (SC+ RESV) e sensibilizado obeso + resveratrol (SO+ RESV). Os dados representam a média $\pm$ E.P.M para $n = 6-7$. * $P < 0,05$ comparado com o grupo SC; # $P < 0,05$ comparado com SO. Os valores da expressão de SIRT 1 de cada grupo foram normalizados por β -actina e expressos por unidades arbitrárias (UA).

5. 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. Todavia, a natureza e a causalidade desta associação não estão claramente esclarecidas e suscitam acalorada discussão. Mecanismos inflamatórios, disfunção oxidativa, alterações na mecânica respiratória e resistência periférica à insulina têm sido investigados para se entender a relação entre asma e obesidade.

Trabalho prévio mostrou que, modelo de asma alérgica causada pela OVA, o resveratrol, administrado na dose de 30 mg/kg, exerce ação benéfica em camundongos controle, através da redução dos níveis de IgE e de citocinas Th2 (IL- 4 e IL-5) no plasma e no LBA, bem como redução de secreção de muco e eosinofilia (Lee et al., 2009). Outro estudo mostrou que este polifenol inibe a transcrição de iNOS e COX-2, a expressão de GM-CSF e a secreção de IL-8 em células epiteliais de pulmão humano (Donnelly et al., 2004).

No presente estudo, em camundongos obesos e desafiados com OVA, mostramos que o resveratrol diminui significativamente o infiltrado de eosinófilos no tecido pulmonar peribronquiolar, os níveis de TNF- α no LBA e a expressão da iNOS no tecido pulmonar. O resveratrol também promove aumento significativo do número de eosinófilos no LBA, além de diminuir o estresse oxidativo pulmonar. Assim, é provável que o aumento no número de eosinófilos no LBA de camundongos obesos tratados com resveratrol seja fruto do aumento na transmigração dessas células da região peribronquiolar até o lúmen das vias respiratórias. É sabido 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 (Persson e Uller, 2010; Persson, 2013), contribuindo grandemente para a resolução do processo inflamatório pulmonar (Uller et al., 2006).

No presente estudo, a análise morfológica do tecido pulmonar mostrou que o resveratrol diminui marcadamente o número de eosinófilos retidos na região peribronquiolar de camundongos obesos e desafiados com OVA. De acordo com Calixto e colaboradores (2010), a obesidade promove retenção de eosinófilos na região peribronquiolar, permitindo que estas células exerçam suas funções efetoras por mais tempo. Entretanto, os mecanismos que determinam a retenção de granulócitos no tecido pulmonar de camundongos obesos ainda não estão esclarecidos. É possível que o estresse oxidativo / nitrosativo desempenhe papel importante

neste processo, pois estudos prévios já mostraram que o estresse oxidativo e nitrosativo contribuem em diversos aspectos para o fenótipo obeso, tal como a resistência à insulina (Houstis et al., 2006; Scherer, 2006), podendo estar associado à asma (Kirkham e Rahman, 2006; Holguin e Fitzpatrick, 2010). Em nosso estudo, o tratamento crônico com resveratrol diminuiu a glicemia em jejum e aumentou a captação de glicose (K_{ITT}) em resposta à insulina dos camundongos obesos. Estes achados vão ao encontro da literatura mostrando que o resveratrol melhora a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina em camundongos obesos induzidos por dieta hiperlipídica (Baur et al., 2006; Lagouge et al., 2006) e em humanos obesos (Timmers et al., 2011). Além disso, estudos recentes mostram uma alta prevalência de resistência à insulina em pacientes obesos e asmáticos comparado a obesos não asmáticos (Arshi et al., 2010; Ma et al., 2010). Em cobaias diabéticas do tipo 1 sensibilizadas há uma diminuição do número de eosinófilos no LBA comparados com cobaias diabéticas não sensibilizadas. O tratamento com insulina restaurou a população de eosinófilos nos animais sensibilizados diabéticos, reforçando, assim, nosso resultado de K_{ITT} e co-relação entre resistência à insulina e exacerbação da inflamação eosinofílica (Kolahian et al., 2011).

A AMPK é uma serina/treonina quinase composta por uma subunidade catalítica (α) e duas subunidades reguladoras (β, γ), que protegem as células contra a depleção de ATP. A AMPK regula uma ampla variedade de processos fisiológicos, como o metabolismo de substratos, metabolismo de lipídios, síntese de proteínas, proliferação celular e apoptose (Hardie et al., 2012). A AMPK também controla o metabolismo de glicose sendo que sua ativação resulta em bloqueio da gliconeogênese hepática (Stallings et al., 2014; Cicerchi et al., 2014).

Estudos mostram que o tratamento com resveratrol aumenta a expressão e fosforilação da AMPK em camundongos obesos (Ito-Nagahata et al., 2013; Andrade et al., 2014). Por isso, podemos propor que a redução dos níveis glicêmicos no grupo obeso pelo resveratrol é, ao menos em parte, devida ao aumento da atividade de p-AMPK. Existe uma vasta literatura mostrando que a ativação de AMPK inibe a resposta inflamatória induzida por diferentes insultos, ao passo que a diminuição da sua atividade está associada a aumento da resposta inflamatória (Nath et al., 2005; Steinberg et al., 2006; Sag et al., 2008; Zhao et al., 2008; Ko et al., 2009; Bai et al., 2010; Myerburg et al., 2010; Gauthier et al., 2011). Trabalho recente de nosso grupo mostra que a via de sinalização da AMPK é um importante regulador da inflamação eosinofílica nos pulmões de animais obesos (Calixto et al., 2013). Dessa forma, é possível que a diminuição da ativação da AMPK em camundongos obesos esteja relacionada à piora da inflamação alérgica pulmonar. É

interessante que a expressão de AMPK é inversamente relacionada aos níveis de NF- κ B e TNF- α no pulmão (Nath et al., 2005; Steinberg et al., 2006; Sag et al., 2008; Zhao et al., 2008; Ko et al., 2009; Bai et al., 2010; Myerburg et al., 2010; Gauthier et al., 2011; Jing et al., 2014).

Em um estudo usando camundongos *knockout* para AMPK, o resveratrol não foi capaz de reduzir o tecido adiposo em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, nem foi capaz de aumentar a sensibilidade à insulina, a biogênese mitocondrial e a resistência física, sugerindo que a AMPK é um alvo central no efeito metabólico do resveratrol (Um et al., 2010). Outro estudo realizado com ativadores da AMPK em camundongos mostrou que a ativação dessa enzima melhora a inflamação e a hiperreatividade das vias aéreas induzida por tolueno, além de diminuir a produção de EROs e de citocinas Th2 (Park et al., 2012). Estes dados corroboram com nossos resultados mostrando que o resveratrol aumenta a expressão de p-AMPK nos camundongos sensibilizados obesos.

Para avaliar a ação antioxidante do resveratrol, analisamos a atividade das enzimas antioxidantes SOD e GSH, assim como a produção de O_2^- no tecido pulmonar. Nesses experimentos, verificamos que camundongos controle têm níveis de SOD maiores em comparação a camundongos obesos. Além disso, a produção de EROs é maior (técnica de DHE) no pulmão dos camundongos obesos em relação aos camundongos controles. Dessa forma, o estresse oxidativo nos camundongos sensibilizados obesos parece ocorrer por desbalanço entre a produção de espécies reativas e a detoxificação pelas enzimas antioxidantes, ou seja, aumento na produção de O_2^- e diminuição na concentração da SOD. O tratamento com resveratrol aumentou a atividade de SOD (mas não de GSH) e diminuiu os níveis de EROs no pulmão dos animais obesos. Além disso, o tratamento com resveratrol aumentou a expressão de SIRT1 nos pulmões de camundongos obesos. Acreditamos que a expressão maior dessa enzima seja devida à ativação do fator de transcrição FOXO, a qual explicaria os efeitos antioxidantes do resveratrol mostrados nesse trabalho. De fato, o efeito da SIRT1 parece estar ligado à função do fator de transcrição FOXO. A SIRT1 pode regular este fator de transcrição por meio de ligação direta e/ou desacetilação (Yun et al., 2012). É possível que a SIRT1 aumente a atividade do FOXO por sua translocação nuclear, regulando a transcrição de genes específicos (Kops et al., 2002; Brunet et al., 2004; Nemoto et al., 2004; Kobayashi et al., 2005). A translocação de FOXO3a do citoplasma para o núcleo é induzida por deacetilação da SIRT1 em resposta ao estresse oxidativo (Brunet et al., 2004; Van Der Heide et al., 2004). Entre a família FOXO, o FOXO3a é conhecido

por proteger células quiescentes do estresse oxidativo, aumentando diretamente as quantidades de RNA mensageiro e de proteínas MnSOD (Yun et al., 2012).

Estudos revelam que FOXO3a representa um importante mecanismo *downstream* que medeia a obesidade e o diabetes, por meio de modificação do estresse oxidativo (Barthel, 2005; van der Horst e Burgering, 2007). Existem evidências que o resveratrol suprime a geração de EROs por meio de inibição da atividade da NADPH-oxidase (Chow et al., 2007), de ativação da FOXO3a (Park et al., 2009) e regulação positiva da expressão de MnSOD, via ativação SIRT1 (Ungvari et al., 2009).

Estudos anteriores demonstraram que níveis elevados de glicose causado pela obesidade reduz a expressão SIRT1, levando a aumento da p53 e acetilação de FOXO3a, que leva a aumento de EROs (Nemoto et al., 2004). Ao contrário, o resveratrol aumenta o consumo de oxigênio e oxidação de lipídios, que reduz a produção de EROs (Um et al., 2010; Park, 2012). Isto pode explicar a diminuição na produção de O_2^- e aumento da expressão de SOD 1 nos camundongos obesos tratados com resveratrol.

O TNF- α exerce importante papel na asma (Brightling et al., 2008). Por exemplo, níveis elevados de TNF- α são encontrados no LBA e no escarro de pacientes asmáticos (Obase et al., 2001; Matera et al., 2010). A inalação de TNF- α em indivíduos saudáveis aumenta a hiperreatividade das vias aéreas e o número de neutrófilos no escarro (Thomas et al., 1995). Em pacientes asmáticos, a inalação de TNF- α causa hiperreatividade acompanhada de neutrofilia e eosinofilia no escarro (Thomas et al., 2002). O TNF- α é uma citocina capaz de induzir migração, proliferação e ativação de leucócitos, provavelmente via regulação positiva na expressão de moléculas de adesão, facilitando a migração dessas células (Chai et al., 2005; Yoshifuku et al., 2007; Babu et al., 2011). Assim, o aumento dos níveis circulantes do TNF- α na obesidade parece contribuir para exacerbação da asma. Em animais obesos desafiados com OVA, o tratamento dos animais com anticorpo monoclonal anti-TNF- α atenua a inflamação eosinofílica (Calixto et al., 2013). Em nossos experimentos, os níveis de TNF- α no LBA mostraram-se maiores em animais obesos, sendo restaurada pelo tratamento com resveratrol. Existem observações que o resveratrol reduz a liberação de TNF- α , por mecanismo relacionado a aumento da atividade de SIRT1 em células inflamatórias dos pulmões de ratos (Yang et al., 2007). Além disso, a deacetilase de SIRT1 bloqueia a upregulação da via de sinalização do NF- κ B pelo TNF- α em macrófagos *in vitro* e em pulmões de ratos *in vivo* (Yang et al., 2007). A diminuição dos níveis de sirtuínas (envolvido no processo de deacetilação) está associada ao aumento da ativação da subunidade

RelA/p65 do NF- κ B e aumento da liberação de citocina pró-inflamatória. O resveratrol parece modular a produção de EROs, a taxa NAD/NADH e vias de sinalização de NF- κ B, que podem estar diretamente envolvidos com a SIRT1 (Yang et al., 2007). Isto explicaria nossos resultados mostrando diminuição nos níveis de TNF- α no LBA de camundongos sensibilizados obesos após o tratamento com resveratrol.

A NOX é uma família de enzimas produtoras de EROs, sendo reconhecida como a principal fonte de EROs nas células. Existem sete isoformas identificadas de NOX, sendo que cada isoforma se distingue pela distribuição nos tecidos, estrutura e modo de ativação (Pendyala e Natarajan, 2010; Sareila et al., 2011). A NOX 2, conhecida como gp91phox, foi a primeira isoforma descoberta, sendo o membro da NOX mais estudado. A ativação de NOX2 é regulada pela subunidade catalítica gp91phox e pelas subunidades reguladoras (p67phox, p47phox, p40phox e pequena GTPase, RAC). A enzima catalisa a transferência de elétrons da NADPH para a molécula de oxigênio, gerando o O_2^- . A NOX 2 é principalmente expressa em fagócitos, sendo também expressa em outras células, como epitélio pulmonar (Al Ghouleh et al., 2011; Rosanna e Salvatore, 2012). Evidências mostram que a NADPH oxidase exerce função central na modulação da inflamação pulmonar (Sharma et al., 2014).

Como mencionado acima, o resveratrol é capaz de ativar o fator de transcrição FOXO3a, o qual diminui a expressão da subunidade p47 phox, diminuindo, assim, a geração de O_2^- , e consequentemente, o estresse oxidativo. De fato, nossos resultados de western blotting mostram uma diminuição significativa da expressão da subunidade p47 phox nos pulmões de camundongos obesos e tratados com resveratrol.

A ativação do NF- κ B pelo TNF- α aumenta a transcrição da iNOS e, subsequentemente a produção de NO, que por sua vez recruta células inflamatórias para o tecido pulmonar, as quais aumentarão a produção de NO e de ONOO $^-$, exacerbando o processo inflamatório nos obesos (Khan et al., 2014; Landgraf et al., 2014). Para confirmarmos os efeitos inibitórios do resveratrol, avaliamos a expressão da iNOS através de western blotting. Verificamos que o tratamento com resveratrol reverte o aumento na expressão de iNOS nos camundongos obesos. Além disso, o resveratrol diminui os níveis de TNF- α no tecido pulmonar dos camundongos obesos, que pode resultar em diminuição da expressão de iNOS, via diminuição da ativação de NF- κ B. Lei e colaboradores (2012) revelaram que o resveratrol inibe a expressão de iNOS em condrócitos pela ativação da SIRT1 podendo assim suprimir a atividade do NF- κ B.

Outra atividade do resveratrol está ligada à sua ação nos níveis de AMPc. Os níveis intracelulares de AMPc são determinadas pela atividade da adenilil ciclase, que sintetizam AMPc a partir de ATP, e pela atividade das PDEs, que hidrolisam AMPc ou GMPc para AMP ou GMP, respectivamente. A superfamília de PDEs é composta por 11 tipos de PDEs (PDE1-11) (Park et al., 2012). Entre essas iso-enzimas, a PDE4 é altamente específica para o AMPc sendo a principal enzima presente nas vias aéreas (Soto e Hanania, 2005). Além disso, a PDE4 é a isoforma dominante em células inflamatórias. Inibidores específicos de PDE4 agem como broncodilatadores, sendo útil para doenças pulmonares inflamatórias, como a asma (Méhats et al., 2008). Estudos mostram que o resveratrol aumenta os níveis de AMPc pela inibição competitiva das PDEs. Estes achados confirmam nossos resultados mostrando diminuição da expressão de PDE 4 em pulmão de camundongos controle e obesos tratados com resveratrol.

É descrito na literatura a ação anti-obesidade do resveratrol. Ao nível celular, o resveratrol reduz a atividade e/ou expressão de PPAR γ em adipócitos (Floyd et al., 2008; Costa et al., 2011; Chen et al., 2011; Lasa et al., 2012). Além disso, o resveratrol inibe a expressão de enzimas envolvidas na lipogênese através da ativação da AMPK em adipócitos (Chen et al., 2011). O tratamento com resveratrol *downregula* também a expressão de várias enzimas lipogênicas no tecido adiposo (Alberdi et al., 2011). De fato, uma grande parte dos metabólitos do resveratrol são encontrados no tecido adiposo (Andres-Lacueva et al., 2012). Esses estudos parecem corroborar com nossos resultados de ganho ponderal e de gordura epididimal, mostrando que o resveratrol reduz o ganho de peso, a gordura epididimal de camundongos obesos em comparação com animais obesos não tratados.

O conjunto de resultados descritos nesta tese sugerem que a resistência à insulina, resultante da obesidade, é responsável pela exacerbação da resposta inflamatória pulmonar observada em animais obesos. A reversão da resistência à insulina pelo resveratrol em camundongos obesos permite que animais obesos entrem em processo de resolução da inflamação tal como camundongos controles. Isto é evidenciado pela normalização do trânsito dos eosinófilos do tecido pulmonar até o lúmen das vias aéreas. Essa normalização seria essencialmente mediada pela ativação da AMPK e, conseqüentemente, toda a sua cascata de sinalização no pulmão, passando pela ativação de SIRT1, que diminui a produção de EROs por essa via metabólica. Além disso, a ativação da AMPK pelo resveratrol diminui as concentrações de TNF- α no LBA e a produção de O $_2^-$ no tecido pulmonar, como conseqüência da inibição da iNOS, possivelmente pela redução de NF- κ B, que deixa de ser ativado pelo TNF- α . A figura 16

procura ilustrar nossa hipótese de proteção do resveratrol sobre a inflamação alérgica pulmonar do animal obeso.

A literatura acumula estudos relatando que a asma em obesos é mais grave e de difícil controle. Obesos asmáticos não respondem de forma efetiva aos medicamentos disponíveis na clínica para o tratamento da asma ou requerem doses elevadas dos mesmos. Desta forma, drogas que controlem as desordens metabólicas secundárias à obesidade, tal como a resistência à insulina, poderiam se tornar coadjuvantes no tratamento da asma.

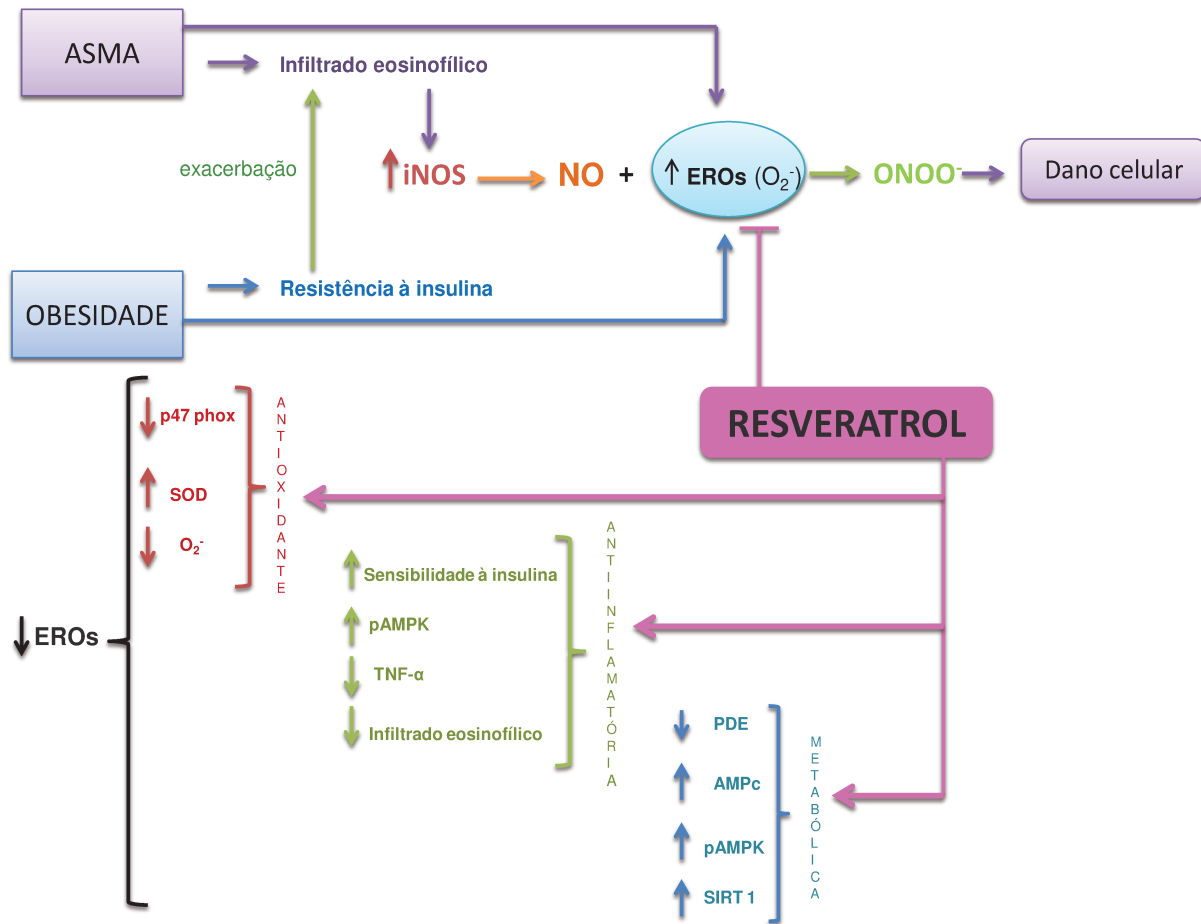


Figura 16: Esquema sugestivo mostrando a junção dos resultados dessa tese, e a possível ação do resveratrol. A obesidade e a asma causam a produção de EROs. A obesidade exacerba a asma, causando um aumento nas espécies reativas de oxigênio/ nitrogênio, levando ao dano das vias aéreas. E o resveratrol diminui as ERO/ERNs, por três diferentes vias, antioxidante, antiinflamatória e metabólica, levando assim, a uma melhora no quadro asmático de camundongos obesos. O₂⁻: ânion superóxido, ONOO⁻: peroxinitrito, iNOS: óxido nítrico sintase induzível, NO: óxido nítrico, EROs: espécies reativas de oxigênio, SOD: superóxido dismutase, pAMPK, Proteína quinase ativada por adenosina 5'-monofosfato fosforilada, TNF-α: Fator de necrose tumoral-alfa, PDE: fosfodiesterase, AMPc: Adenosina 5'-monofosfato cíclico, SIRT 1: sirtuína 1.

6. CONCLUSÕES

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

- Reverte a resistência à insulina sistêmica;
- Aumenta a expressão da p-AMPK e SOD1 no tecido pulmonar;
- Diminui o infiltrado de células inflamatórias no tecido pulmonar, em especial de eosinófilos na região peribronquiolar;
- Diminui os níveis de TNF- α no LBA e de O₂⁻ no tecido pulmonar;
- Diminui a expressão da iNOS, PDE 4 e da subunidade p47 phox no pulmão;
- Aumenta a concentração de SOD no tecido pulmonar;

No conjunto, após a ativação da AMPK através do tratamento com resveratrol, camundongos obesos deixam de ser resistentes à ação da insulina, passando a apresentar diminuição da exacerbação da resposta inflamatória pulmonar e produção de EROs. Dessa forma, ao se corrigir a resistência à insulina sistêmica nos camundongos obesos há aceleração do processo de resolução da inflamação pulmonar alérgica, possivelmente pela diminuição do estresse oxidativo causado pela ativação de SIRT1.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acharya, K.R.; Ackerman, S.J. Eosinophil Granule Proteins: Form and Function. *J Biol Chem*. 2014; doi: 10.1074.

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

Agrawal, A.; Mabalirajan, U.; Ahmad, T.; Ghosh, B. Emerging interface between metabolic syndrome and asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011; 44(3): 270-275.

Al Ghouleh, I.; Khoo, N.K.; Knaus, U.G.; Griendling, K.K.; Touyz, R.M. Oxidases and peroxidases in cardiovascular and lung disease: new concepts in reactive oxygen species signaling. *Free Radic Biol Med*. 2011; 51: 1271–1288.

Albani, D.; Polito, L.; Signorini, A.; Forloni, G. Neuroprotective properties of resveratrol in different neurodegenerative disorders. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*. 2010; 36 (5): 370–376.

Alberdi, G.; Rodri'guez, V.M.; Miranda, J.; Macarulla, M.T.; Arias, N.; Andre's-Lacueva, C.; Portillo, M.P. Changes in white adipose tissue metabolism induced by resveratrol in rats. *Nutr Metab*. 2011; 8: 29.

Alexeeff, S.E.; Litonjua, A.A.; Suh, H.; Sparrow, D.; Vokonas, P.S.; Schwartz, J. Ozone exposure and lung function: effect modified by obesity and airways hyperresponsiveness in the VA normative aging study. *Chest*. 2007; 132(6): 1890-1897.

Andrade, J.M.O.; Paraíso, A.F.; Garcia, Z.M.; Ferreira, A.V.M.; Sinisterra, R.D.M.; Sousa, F. B.; Guimarães, A.L.S.; Paula, A.M.B.; Campagonole-Santos, M.J.; Santos, R.A.; Santos, S.H.S. Cross talk between angiotensin-(1–7)/Mas axis and sirtuins in adipose tissue and metabolism of high-fat feed mice. *Peptides*. 2014; 55: 158-165.

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

Andres-Lacueva, C.; Macarulla, M.T.; Rotches-Ribalta, M.; Boto- Ordo'n'ez, M.; Urpi-Sarda, M.; Rodri'guez, V.M.; Portillo, M.P. Distribution of resveratrol metabolites in liver, adipose tissue, and skeletal muscle in rats fed different doses of this polyphenol. *J Agric Food Chem*. 2012; 60: 4833–4840.

Arshi, M.; Cardinal, J.; Hill, R.J.; Davies, P.S.; Wainwright, C. Asthma and insulin resistance in children. *Respirology*. 2010; 15(5): 779-784.

Babu, S.K.; Puddicombe, S.M.; Arshad, H.H.; Wilson, S.J.; Ward, J.; Gozzard, N.; Higgs, G.; Holgate, S.T.; Davies, D.E. Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) autoregulates its expression and induces adhesion molecule expression in asthma. *Clin Immunol*. 2011; 140(1): 18-25.

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

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

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

Barthel, A. FoxO proteins in insulin action and metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2005; 16: 183–189.

Baur, J.A.; Pearson, K.J.; Price, N.L.; Jamieson, H.A.; Lerin, C.; Kalra, A.; Prabhu, V.V.; Allard, J.S.; Lopez-Lluch, G.; Lewis, K. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature.* 2006; 444: 337–342.

Baur, J.A.; Ungvari, Z.; Minor, R.K.; Le Couteur, D.G.; de Cabo, R. Are sirtuins viable targets for improving healthspan and lifespan? *Nat Rev Drug Discov.* 2012; 11(6): 443-61.

Bedard, K.; Krause, K.H. The NOX family of ros-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. *Physiological reviews.* 2007; 87: 245–313.

Bennett, W.D.; Hazucha, M.J.; Folinsbee, L. J.; Bromberg, P. A.; Kissling, G.E.; London, S.J. Acute pulmonary function response to ozone in young adults as a function of body mass index. *Inhal Toxicol.* 2007; 19: 1147-1154.

Berrington de Gonzalez, A.; Hartge, P.; Cerhan, J.R.; Flint, A.J.; Hannan, L.; MacInnis, R.J.; Moore, S.C.; Tobias, G.S.; Anton-Culver, H.; Freeman, L.B.; Beeson, W.L.; Clipp, S.L.; English, D.R.; Folsom, A.R.; Freedman, D.M.; Giles, G.; Hakansson, N.; Henderson, K.D.; Hoffman-Bolton, J.; Hoppin, J.A.; Koenig K.L.; Lee, I.M.; Linet, M.S.; Park, Y.; Pocobelli, G.; Schatzkin, A.; Sesso, H.D.; Weiderpass, E.; Willcox, B.J.; Wolk, A.; Zeleniuch-Jacquotte, A.; Willett W.C.; Thun, M.J. Body-mass index and mortality among 1.46 million white adults. *N Engl J Med.* 2010; 363: 2211–2219.

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

Birrell, M.A.; McCluskie, K.; Wong, S.; Donnelly, L.E.; Barnes, P.J.; Belvisi, M.G. Resveratrol, an extract of red wine, inhibits lipopolysaccharide induced airway neutrophilia and inflammatory mediators through an NF-kappaB-independent mechanism. *FASEB J.* 2005; 19: 840–841.

Blander, G.; Guarente, L. The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu Rev Biochem.* 2004; 73: 417–435.

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

Brennan, M.; Wu, W.; Fu, X.; Shen, Z.; Song, W.; Frost, H. A tale of two controversies: defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. *J Biol Chem.* 2002; 277: 17415-17427.

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

Brunet, A.; Sweeney, L.B.; Sturgill, J.F.; Chua, K.F.; Greer, P.L.; Lin, Y. Stress dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science.* 2004; 303: 2011–2015.

Calixto, M.C.; Lintomen, L.; André, D.M.; Leiria, L.O.; Ferreira, D.; Lellis-Santos, C.; Anhê, G.F.; Bordin, S.; Landgraf, R.G.; Antunes, E. Metformin attenuates the exacerbation of the allergic eosinophilic inflammation in high fat-diet-induced obesity in mice. *Plos One.* 2013; 8(10): e76786.

Calixto, M.C.; Lintomen, L.; Schenka, A.; Saad, M.J.; Zanesco, A.; Antunes, E. Obesity enhances eosinophilic inflammation in a murine model of allergic asthma. *Br J Pharmacol.* 2010; 159(3): 617-625.

Camargo, C.A. Jr.; Weiss, S.T.; Zhang, S.; Willett, W.C.; Speizer, F.E. Prospective study of body mass index, weight change, and risk of adult-onset asthma in women. *Arch Intern Med.* 1999; 159: 2582-2588.

Canto', C.; Gerhart-Hines, Z.; Feige, J.N.; Lagouge, M.; Noriega, L.; Milne, J.C.; Elliott, P.J.; Puigserver, P.; Auwerx, J. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature.* 2009; 458: 1056–1060.

Canto', C.; Jiang, L.Q.; Deshmukh, A.S.; Matak, C.; Coste, A.; Lagouge, M.; Zierath, J.R.; Auwerx, J. Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle. *Cell Metab.* 2010; 11: 213–219.

Carvalho-Filho, M.A.; Ueno, M.; Carvalheira, J.B.; Velloso, L.A.; Saad, M.J. Targeted disruption of iNOS prevents LPS-induced S-nitrosation of IRbeta/IRS-1 and Akt and insulin resistance in muscle of mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006; 291(3): E476-E482.

Chai, O.H.; Lee, H.K.; Lee, Y.C.; Lee, M.S.; Han, E.H.; Kim, H.T.; Song, C.H. Roles of TNF- α and IgE in the late phase of contact hypersensitivity induced by trimellitic anhydride. *Exp Mol Med.* 2005; 37: 408-417.

Chang, Y-C.; Yu, Y-H.; Shew, J-Y.; Lee, W-J.; Hwang, J-J.; Chen, Y-H.; Chen, Y-R.; Wei, P-C.; Chuang, L-M.; Lee, W-H. Deficiency of NPGPx, an oxidative stress sensor, leads to obesity in mice and human. *EMBO Mol Med.* 2013; 5 (8): 1165-1179.

Chen, S.; Li, Z.; Li, W.; Shan, Z.; Zhu, W. Resveratrol inhibits cell differentiation in 3T3-L1 adipocytes via activation of AMPK. *Can J Physiol Pharmacol.* 2011; 89: 793–799.

Cheng, H.L.; Mostoslavsky, R.; Saito, S.; Manis, J.P.; Gu, Y.; Patel, P. Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci.* 2003; 100: 10794–10799.

Cherla, R.P.; Ganju, R.K. Stromal cell-derived factor 1 α -induced chemotaxis in T cells is mediated by nitric oxide signaling pathways. *J Immunol.* 2001; 166: 3067-3074.

Chow, S.E.; Hshu, Y.C.; Wang, J.S.; Chen, J.K. Resveratrol attenuates oxLDL-stimulated NADPH oxidase activity and protects endothelial cells from oxidative functional damages. *J Appl Physiol.* 2007; 102(4): 1520–1527.

Cicerchi, C.; Li, N.; Kratzer, J.; Garcia, G.; Roncal-Jimenez, C.A.; Tanabe, K.; Hunter, B.; Rivard, C.J.; Sautin, Y.Y.; Gaucher, E.; Johnson, R.J.; Lanaspa, M.A. Uric acid-dependent inhibition of AMP kinase induces hepatic glucose production in diabetes and starvation: evolutionary implications of the uricase loss in hominids. *FASEB J.* 2014; 28: 2-12.

Ciencewicky, J.; Trivedi, S.; Kleeberger, S.R. Oxidants and the pathogenesis of lung diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2008; 122(3): 456-468.

Codóner-Franch, P.; Valls-Bellés, V.; Arilla-Codóner, A.; Alonso-Iglesias, E. Oxidant mechanisms in childhood obesity: the link between inflammation and oxidative stress. *Transl Res.* 2011; 158(6): 369-384.

Comhair, S.A.; Ricci, K.S.; Arroliga, M.; Lara, A.R.; Dweik, R.A.; Song, W.; Hazen, S.L.; Blecker, E.R.; Busse, W.W.; Chung, K.F.; Gaston, B.; Hastie, A.; Hew, M.; Jarjour, N.; Moore, W.; Peters, S.; Teague, W.G.; Wenzel, S.E.; Erzurum, S.C. Correlation of systemic superoxide dismutase deficiency to airflow obstruction in asthma. *Am J Resp Crit Care.* 2005; 172: 306-313.

Cooper, P.J.; Chico, M.E.; Vaca, M.G.; Rodriguez, A.; Alcântara-Neves, N.M.; Genser, B.; Pontes-de-Carvalho, L.; Stein, R.T.; Cruz, A.A. 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.

Costa, C.S.; Rohden, F.; Hammes, T.O.; Margis, R.; Bortolotto, J.W.; Padoin, A.V.; Mottin, C.C.; Guaragna, R.M. Resveratrol upregulated SIRT1, FOXO1, and adiponectin and downregulated PPARc1-3 mRNA expression in human visceral adipocytes. *Obes Surg.* 2011; 21: 356–361.

Donnelly, L.E.; Newton, R.; Kennedy, G.E.; Fenwick, P.S.; Leung, R.H.; Ito, K. Anti-inflammatory effects of resveratrol in lung epithelial cells: molecular mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004; 287: L774–L783.

Duguet, A.; Iijima, H.; Eum, S.Y.; Hamid, Q.; Eidelman, D.H. Eosinophil peroxidase mediates protein nitration in allergic airway inflammation in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 164: 1119-1126.

Esnault, S.; Kelly, E.; Schwantes, E.; Liu, L.; DeLain, L.; Hauer, J.; Bochkov, Y.; Denlinger, L.; Malter, J.; Mathur, S.; Jarjour, N. Identification of genes expressed by human airway eosinophils after an in vivo allergen challenge. *Plos one*. 2013; 8(7): e67560.

Farmer, S.R.; Auwerx, J. Adipose tissue: new therapeutic targets from molecular and genetic studies. IASO Stock Conference 2003 report. *Obes Rev*. 2004; 5: 189-196.

Ferreira, H.H.A.; Bevilacqua, E.; Gaglioti, S.M.; De Luca, I.M.S.; Zanardo, R.C.O.; Teixeira, C.E.; Sannomiya, P.; Antunes, E.; De Nucci, G. Nitric oxide modulates eosinophil infiltration in antigen-induced airway inflammation in rats. *Eur J Pharmacol*. 1998; 358: 253-259.

Finucane, M.M.; Stevens, G.A.; Cowan, M. J.; Danaei, G.; Lin, J.K.; Paciorek, C. J.; Singh, G.M.; Gutierrez, H.R.; Lu, Y.; Bahalim, A.N.; Farzadfar, F.; Riley, L.M.; Ezzati, M. Global burden of metabolic risk factors of chronic diseases collaborating group (Body Mass Index). National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet*. 2011; 377(9765): 557-567.

Floyd, Z.E.; Wang, Z.Q.; Kilroy, G.; Cefalu, W.T. Modulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma stability and transcriptional activity in adipocytes by resveratrol. *Metabolism*. 2008; 57: S32-S38.

Folkerts, G.; Kloek, J.; Muijsers, R.B.; Nijkamp, F.P. Reactive nitrogen and oxygen species in airway inflammation. *Eur J Pharmacol*. 2001; 429(1-3): 251-256.

Ford, E.S. Asthma, body mass index, and C-reactive protein among US adults. *J Asthma*. 2003; 40(7): 733-739.

Foster, P.S., Mould, A.W., Yang, M., Mackenzie, J., Mattes, J., Hogan, S.P., Mahalingam, S., Mckenzie, A.N.J., Rothenberg, M.E., Young, I.G., Matthaei, K.I., Webb, D.C. Elemental signals regulating eosinophil accumulation in the lung. *Immunol Rev*. 2001; 179: 173-181.

Fu, J.; Oveisi, F.; Gaetani, S.; Lin, E.; Pionelli, D. Oleoylethanolamide, na endogenous PPAR-alpha agonist, lowers body weight and hyperlipidemia in obese rats. *Neuropharmacology*. 2005; 48: 1147-1153.

Fujita, K.; Nishizawa, H.; Funahashi, T.; Shimomura, I.; Shimabukuro, M. Systemic oxidative stress is associated with visceral fat accumulation and the metabolic syndrome. *Circ J*. 2006; 70(11): 1437-1442.

Fukuyama, N.; Takebayashi, Y.; Hida, M.; Ishida, H.; Ichimori, K.; Nagazawa, H. Clinical evidence of peroxynitrite formation in chronic renal failure patients with septic shock. *Free Radic Biol Me*. 1997; 22: 771-774.

Furukawa, S.; Fujita, T.; Shimabukuro, M.; Iwaki, M.; Yamada, Y.; Nakajima, Y.; Nakayama, O.; Makishima, M.; Matsuda, M.; Shimomura, I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2004; 114: 1752-1761.

Furuta, G.T.; Atkins, F.D.; Lee, N.A.; Lee, J.J. Changing roles of eosinophils in health and disease. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2014; 1-6.

Galili, N.; Davis, R.J.; Fredericks, W.J.; Mukhopadhyay, S.; Rauscher, F.J.; Emanuel, B.S. Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nat Genet.* 1993; 5: 230–235.

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

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

Global Initiative National for Asthma-2012.

Gruchała-Niedoszytko, M.; Małgorzewicz, S.; Niedoszytko, M.; Gnacińska, M.; Jassem, E. The influence of obesity on inflammation and clinical symptoms in asthma. *Advances in Medical Sciences.* 2013; 58(1).

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): 1315-1321.

Hansbro, P.M.; Kaiko, G.E.; Foster, P.S. Cytokine/anti-cytokine therapy—novel treatments for asthma? *Br J Pharmacol.* 2011; 163: 81–95.

Hardie, D.G.; Ross, F.A.; Hawley, S.A. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012; 13: 251-262.

Hogan, S.P.; Rosenberg, H.F.; Moqbel, R.; Phipps, S.; Foster, P.S. Eosinophils: Biological Properties and Role in Health and Disease. *Clin Exp Allergy.* 2008; 38: 709–750.

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

Holgate, S. T. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy.* 2008; 38(6): 872-897.

Holgate, S.T.; 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): 408-416.

Holguin, F; Fitzpatrick, A. Obesity, asthma, and oxidative stress. *J Appl Physiol.* 2010; 108(3): 754-759.

Hori, Y.S.; Kuno, A.; Hosoda, R.; Horio, Y. Regulation of FOXOs and p53 by SIRT1 Modulators under Oxidative Stress. *Plos one.* 2013; 8(9): e73875.

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

Houstis, N.; Rosen, E.D.; Lander, E.S. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature*. 2006; 440: 944-948.

Howitz, K.T.; Bitterman, K.J.; Cohen, H.Y.; Lamming, D.W.; Lavu, S.; Wood, J.G.; Zipkin, R.E.; Chung, P.; Kisielewski, A.; Zhang, L.L. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*. 2003; 425: 191–196.

Iijima, H.; Duguet, A; Eum, S.Y.; Hamid, Q; Eidelman, D.H. Nitric oxide and protein nitration are eosinophil dependent in allergen-challenged mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 163: 1233-1240.

Ito-Nagahata, T.; Kurihara, C.; Hasebe, M.; Ishii, A.; Yamashita, K.; Iwabuchi, M.; Sonoda, M.; Fukuhara, K.; Sawada, R.; Matsuoka, A.; Fujiwara, Y. Stilbene analogs of resveratrol improve insulin resistance through activation of AMPK. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2013; 77 (6): 1229-1235.

Jimenez-Gomez, Y.; Mattison, J.A.; Pearson, K.J.; Martin-Montalvo, A.; Palacios, H.H.; Sossong, A.M.; Ward, T.M.; Younts, C.M.; Lewis, K.; Allard, J.S.; Longo, D.L.; Belman, J.P.; Malagnon, M.M.; Navas, P.; Sanghvi, M.; Moaddel, R.; Tilmont, E.M.; Herbert, R.L.; Morrell, C.H.; Egan, J.M.; Baur, J.A.; Ferrucci, L.; Bogan, J.S.; Bernier, M.; Cabo, R. Resveratrol improves adipose insulin signaling and reduces the inflammatory response in adipose tissue of rhesus monkeys on high-fat, high-sugar diet. *Cell metab*. 2013; 18: 533–545.

Jing, H.; Yao, J.; Liu, X.; Fan, H.; Zhang, F.; Li, Z.; Tian, X.; Zhou, Y. Fish-oil emulsion (omega-3 polyunsaturated fatty acids) attenuates acute lung injury induced by intestinal ischemia-reperfusion through Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase-sirtuin1 pathway. *J Surg Res*. 2014; 187(1): 252-261.

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

Kelly, D.E.; Goodpaster, B.H. Skeletal muscle triglyceride an aspect of regional adiposity and insulin resistance. *Diabetes Care*. 2001; 24: 933-941.

Khan, M.; Patrick, A.L.; Fox-Robichaud, A.E. Development of a murine model of early sepsis in diet-induced obesity. *Bio Med Res*. 2014; 2014: 1-11.

Killeen, K.; Skora, E. Pathophysiology, diagnosis, and clinical assessment of asthma in the adult. *Nurs Clin North Am*. 2013; 48: 11-23.

Kim, J.K.; Wi, J.K.; Youn, J.H. Metabolic impairment precedes insulin resistance in skeletal muscle during high-fat feeding in rats. *Diabetes*. 1996; 45(5): 651-658.

Kinkade, K.; Steeter, J.; Miller, F.J. Inhibition of NADPH oxidase by apocynin attenuates progression of atherosclerosis. *Int J Mol Sci*. 2013; 14(8): 17017-17028.

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

Knekt, P.; Kumpulainen, J.; Jarvinsen, R.; Rissanen, H.; Heliovaara, M.; Reunanen, A.; Hakulinen, T.; Aromaa, A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr.* 2002; 76: 560-568.

Ko, H.J.; Zhang, Z.; Jung, D.Y.; Jun, J.Y.; Ma, Z.; Jones, K.E.; Chan, S.Y.; Kim, J.K. Nutrient stress activates inflammation and reduces glucose metabolism by suppressing AMP-activated protein kinase in the heart. *Diabetes.* 2009; 58: 2536–2546.

Kobayashi, Y.; Furukawa-Hibi, Y.; Chen, C.; Horio, Y.; Isobe, K.; Ikeda, K. SIRT1 is critical regulator of FOXO-mediated transcription in response to oxidative stress. *Int J Mol Med.* 2005; 16: 237–243.

Kode, A.; Rajendrasozhan, S.; Caito, S.; Yang, S.R.; Megson, I.L.; Rahman, I. Resveratrol induces glutathione synthesis by activation of Nrf2 and protects against cigarette smoke-mediated oxidative stress in human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008; 294: L478-L488.

Kolahian, S.; Asadi, F.; Nassiri, S.M. Airway inflammatory events in diabetic-antigen sensitized guinea pigs. *Eur J Pharmacol.* 2011; 659(2-3): 252-258.

Kops, G.J.; Dansen, T.B.; Polderman, P.E.; Saarloos, I.; Wirtz, K.W.; Coffey, P.J. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature.* 2002; 419: 316–321.

Lagouge, M.; Argmann, C.; Gerhart-Hines, Z.; Meziane, H.; Lerin, C.; Daussin, F.; Messadeq, N.; Milne, J.; Lambert, P.; Elliott, P. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell.* 2006; 127: 1109–1122.

Landgraf, M.A.; Silva, R.C.; Corrêa-Costa, M.; Hiyane, M.I.; Carvalho, M.H.C.; Landgraf, R.G.; Câmara, N.O.S. Leptin Downregulates LPS-Induced Lung Injury: Role of Corticosterone and Insulin. *Cell Physiol Biochem.* 2014; 33: 835-846.

Langley, E.; Pearson, M.; Faretta, M.; Bauer, U.M.; Frye, R.A.; Minucci, S. Human SIRT2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *EMBO J.* 2002; 21: 2383–2396.

Lapouge, K.; Smith, S.J.; Groemping, Y.; Rittinger, K. Architecture of the p40-p47-p67phox complex in the resting state of the NADPH oxidase. A central role for p67phox. *J Bio Chem.* 2002; 277: 10121–10128.

Lasa, A.; Churrua, I.; Eseberri, I.; Andre's-Lacueva, C.; Portillo, M.P. Delipidating effect of resveratrol metabolites in 3T3-L adipocytes. *Mol Nutr Food Res.* 2012; 56: 1559–1568.

Lasa, A.; Schweiger, M.; Kotzbeck, P.; Churrua, I.; Simo'n, E.; Zechner, R.; Del Puy Portillo, M. Resveratrol regulates lipolysis via adipose triglyceride lipase. *J Nutr Biochem.* 2012; 23: 379–384.

- Lee, M.; Kim, S.; Kwon, O.K.; Oh, S.R.; Lee, H.K.; Ahn, K. Anti-inflammatory and anti-asthmatic effects of resveratrol, a polyphenolic stilbene, in a mouse model of allergic asthma. *Int Immunopharmacol.* 2009; 9(4): 418-424.
- Lee, W.J.; Koh, E.H.; Won, J.C.; Kim, M.S.; Park, J.Y. Lee, K.U. Obesity: the role of hypothalamic AMP- activated protein kinase in body weight regulation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005; 37: 2254-2259.
- Lei, M.; Wang, J.G.; Xiao, D.M.; Fan, M.; Wang, D.P.; Xiong, J.Y.; Chen, Y.; Ding, Y; Liu, S.L. Resveratrol inhibits interleukin 1beta-mediated inducible nitric oxide synthase expression in articular chondrocytes by activating SIRT1 and thereby suppressing nuclear factor-kappaB activity. *Eur J Pharmacol.* 2012; 674: 73-79.
- Lemanske, R.F.Jr.; Busse, W.W. Asthma: clinical expression and molecular mechanisms. *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 125: S95-S102.
- Li, H.; Liu, J.P. Signaling on telomerase: a master switch in cell aging and immortalization. *Biogerontology.* 2002; 3: 107–116.
- Lin, C-H.; Shen, M-L.; Zhou, N.; Lee, C-C.; Kao, S-T. Protective effects of the polyphenol sesamin on allergen-induced T_H2 responses and airway inflammation in mice. *Plos One.* 2014; doi: 10.1371.
- Lintomen, L.; Calixto, M.C.; Schenka, A.; Antunes, E. Allergen-induced bone marrow eosinophilopoiesis and airways eosinophilic inflammation in leptin-deficient ob/ob mice. *Obesity.* 2012; 20: 1959-1965.
- Liu, Y.; Qi, W.; Richardson, A.; Remmen, H.V.; Ikeno, Y.; Salmon, A.B. Oxidative damage associated with obesity is prevented by overexpression of CuZn- or Mn-superoxide dismutase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013; 438: 78-83.
- Luder, E.T.; Melnik, A.; DiMaio, M. Association of being overweight with greater asthma symptoms in inner city black and hispanic children. *J Pediatr.* 1998; 132: 699-703.
- Luo, J.; Nikolaev, A.Y.; Imai, S.; Chen, D.; Su, F.; Shiloh, A. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell.* 2001; 19:137–148.
- Ma, J.; Xiao, L.; Knowles, S.B. Obesity, insulin resistance and the prevalence of atopy and asthma in US adults. *Allergy.* 2010; 65(11): 1455-1463.
- Mabalarajan, U.; Ahmad, T.; Leishangthem, G.D.; Joseph, D.A.; Dinda, A.K.; Agrawal, A; Ghosh, B. Beneficial effects of high dose of L-arginine on airway hyperresponsiveness and airway inflammation in a murine model of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 125(3): 626-635.
- Mancuso, P.; Canetti, C.; Gottscholk, A.; Tithof, P.K. Peters-Golden, M. Leptin augments alveolar macrophage leukotriene synthesis by increasing phospholipase activity and enhancing

group IVC i PLA2 (c PLA2 gamma) protein expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004; 284: L497-502.

Matera, M.G.; Calzetta, L.; Cazzola, M. TNF-alpha inhibitors in asthma and COPD: we must not throw the baby out with the bath water. *Pulm Pharmacol Ther*. 2010; 23(2): 121-128.

McFadden, E.R.; Gilbert, I.A. Asthma. *N Engl J Med*. 1992; 327: 1928-1937.

Méhats, C.; Franco-Montoya, M.; Boucherat, O.; Lopez, E.; Schmitz, T.; Zana, E.; Evain-Brion, D.; Bourbon, J.; Delacourt, C.; Jarreau, P.H. Effects of phosphodiesterase 4 inhibition on alveolarization and hyperoxia toxicity in newborn rat s. *Plos One*. 2008; 3(10): e3445.

Ministério da Saúde, 2014. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/portal-dcnt/noticias-portal-dcnt/6118-mais-da-metade-da-populacao-brasileira-tem-excesso-de-peso>. Acessado em 20 de fevereiro de 2014.

Mould, A.W.; Matthaei, K. I.; Young, I.G.; Foster, P.S. Relationship between interleukin-5 and eotaxin in regulating blood and tissue eosinophilia in mice. *J Clin Invest*. 1997; 99: 1064–1071.

Myerburg, M.M.; King, J.D.Jr.; Oyster, N.M.; Fitch, A.C.; Magill, A.; Baty, C.J.; Watkins, S.C.; Kolls, J.K.; Pilewski, J.M.; Hallows, K.R. AMPK agonists ameliorate sodium and fluid transport and inflammation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010; 42: 676–684.

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

Nemoto, S.; Fergusson, M.M.; Finkel, T. Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway. *Science*. 2004; 306: 2105–2108.

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

O'Byrne, P. Asthma pathogenesis and allergen-induced late responses. *J Allergy Clin Immunol*. 1998; 102(5): S85-S89.

Olefsky, J.M.; Glass, C.K. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol*. 2010; 72: 219-246.

Pakhale, S.; Doucette, S.; Vandemheen, K.; Boulet, L.P.; McIvor, R.A.; Fitzgerald, J.M.; Hernandez, P.; Lemiere, C.; Sharma, S.; Field, S.K.; Alvarez, G.G.; Dales, R.E.; Aaron, S. D. A comparison of obese and nonobese people with asthma: exploring an asthma-obesity interaction. *Chest*. 2010; 137(6): 1316-1323.

Palframan, R.T.; Collins, P.D.; Severs, N.J.; Rothery, S.; Williams, T.J.; Rankin, S.M. Mechanisms of acute eosinophil mobilization from the bone marrow stimulated by interleukin 5: the role of specific adhesion molecules and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Exp Med*. 1998; 188(9): 1621-1632.

Park, D.W.; Baek, K.; Kim, J.R.; Lee, J.J.; Ryu, S.H.; Chin, B.R. Resveratrol inhibits foam cell formation via NADPH oxidase 1-mediated reactive oxygen species and monocyte chemotactic protein. *Exp Mol Med*. 2009; 41(3): 171–179.

Park, S.J.; Ahmad, F.; Philp, A.; Baar, K.; Williams, T.; Luo, H.; Ke, H.; Rehmann H.; Taussig, R.; Brown, A.L.; Kim, M. K.; Beaven, M.A.; Burgin, A.B.; Manganiello, V.; Chung, J.H. Resveratrol Ameliorates Aging-Related Metabolic Phenotypes by Inhibiting cAMP Phosphodiesterases. *Cell*. 2012; 148: 421–433.

Pendyala, S.; Natarajan, V. Redox regulation of Nox proteins. *Respir Physiol Neurobiol*. 2010; 174: 265–271.

Pereira, L.; Me´trich, M.; Ferna´ndez-Velasco, M.; Lucas, A.; Leroy, J.; Perrier, R.; Morel, E.; Fischmeister, R.; Richard, S.; Be´nitah, J.P. The cAMP binding protein Epac modulates Ca²⁺ sparks by a Ca²⁺/calmodulin kinase signalling pathway in rat cardiac myocytes. *J Physiol*. 2007; 583: 685–694.

Pernomian, L.; Santos Gomes, M.; Baraldi, C.A.R.; Ramalho, L.N.Z.; Tirapelli, C.R.; Oliveira, A.M. The role of reactive oxygen species in the modulation of the contraction induced by angiotensin II in carotid artery from diabetic rat. *Eur J Pharmacol*. 2012; 678 (1-3): 15-25.

Person, C.; Uller, L. Transepithelial exit of leucocytes: inflicting, reflecting or resolving airway inflammation? *Thorax*. 2010; 65(12): 1111-1115.

Persson, C. Role of primary necrosis/lysis of submucosal eosinophils in obese individuals with asthma. *Am J Resp Crit Care*. 2013; 188 (12): 1468.

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

Possa, E.; Leick, E.; Prado, C.; Martins, M.; Tibério, I. Eosinophilic inflammation in allergic asthma. *Front. Pharmacol*. 2013; 4 (46): 1-9.

Raad, H.; Paclet, M.H.; Boussetta, T.; Kroviarski, Y.; Morel, F.; Quinn, M.T.; Gougerot-Pocidalo, M.A.; Dang, P.M.; El-Benna, J. Regulation of the phagocyte NADPH oxidase activity: Phosphorylation of gp91phox/nox2 by protein kinase c enhances its diaphorase activity and binding to rac2, p67phox, and p47phox. *FASEB J*. 2009; 23: 1011–1022.

Reeves, P.G.; Nielsen, F.H.; Fahey, G.C.Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 1993; 123: 1939-1951.

Rieder, S.A.; Nagarkatti, P.; Nagarkatti, M. Multiple anti-inflammatory pathways triggered by resveratrol lead to amelioration of staphylococcal enterotoxin B-induced lung injury. *Br J Pharmacol*. 2012; 167: 1244–1258.

Roberts, R.A.; Laskin, D.L.; Smith, C.V.; Robertson, F.M.; Allen, E.M.; Doorn, J.A. Nitrate and oxidative stress in toxicology and disease. *Toxicol Sci*. 2009; 112: 4-16.

Roos, A.B.; Mori, M.; Gronneberg, R.; Osterlund, C.; Claesson, H-E.; Wahlstro, J.; Grunewald, J.; Eklund, A.; Erjefalt, J.S.; Lundberg, J.O.; Nord, M. Elevated Exhaled Nitric Oxide in Allergen-Provoked Asthma Is Associated with Airway Epithelial iNOS. *Plos One*. 2014; 9 (2): e90018.

Rosanna, D.P.; Salvatore, C. Reactive oxygen species, inflammation, and lung diseases. *Curr Pharm Des*. 2012; 18(26): 3889–3900.

Rothenberg, M.E.; Hogan, S.P. The eosinophil. *Annu Rev Immunol*. 2006; 24: 147-174.

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

Sareila, O.; Kelkka, T.; Pizzolla, A.; Hultqvist, M.; Holmdahl, R. NOX2 complex-derived ROS as immune regulators. *Antioxid Redox Signal*. 2011; 15: 2197–2208.

Sato, E.; Simpson, K.L.; Grisham, M.B.; Koyama, S.; Robbins, R.A. Reactive nitrogen and oxygen species attenuate interleukin-8- induced neutrophil chemotactic activity in vitro. *J Biol Chem*. 2000; 275: 10826-10830.

Sato, S.; Kawamura, H; Takemoto, M. Halofuginone prevents extracellular matrix deposition in diabetic nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 379 (2): 411-416.

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

Shaheen, S.O.; Sterne, J.A.; Montgomery, S.M.; Azima, H. Birth weight, body mass index and asthma in young adults. *Thorax*. 1999; 54(5): 396-402.

Sharma, A.K.; Mulloy, D.P.; Le, L.T.; Laubach, V.E. NADPH oxidase mediates synergistic effects of IL-17 and TNF- α on CXCL1 expression by epithelial cells after lung ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014; 306(1): L69-L79.

Shirshev, S.V.; Orlova, E.G. Molecular mechanisms of regulation of functional activity of mononuclear phagocytes by leptin. *Biochemistry*. 2005; 70: 841-847.

Shore, S.A. Obesity and asthma: lessons from animal models. *J Appl Physiol*. 2007; 102(2): 516-528.

Shore, S.A.; Johnston, R.A. Obesity and asthma. *Pharmacol Therapeut*. 2006; 110: 83-102.

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

Sideleva, O.; Black, K.; Dixon, A.E. Effects of obesity and weight loss on airway physiology and inflammation in asthma. *Pulm Pharmacol Ther.* 2013; 26: 455-458.

Signorelli, P.; Ghidoni, R. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *J Nutr Biochem.* 2005; 16: 449–466.

Sikka, N.; Wegienka, G.; Havstad, S.; Genaw, J.; Carlin, A. M.; Zoratti, E. Respiratory medication prescriptions before and after bariatric surgery. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2010; 104(4): 326-330.

Simson, L.; Foster, P.S. Chemokine and cytokine cooperativity: Eosinophil migration in the asthmatic response. *Immunol Cell Biol.* 2000; 78: 415–422.

Soto, F.J.; Hanania, N.A. Selective phosphodiesterase-4 inhibitors in chronic obstructive lung disease. *Curr Opin Pulm Med.* 2005; 11(2): 129-134.

Stallings, M.T.; Cardon, B.R.; Hardman, J.M.; Bliss, T.A.; Brunson, S.E.; Hart, C.M.; Swiss, M.D.; Hepworth, S.D.; Christensen, M.J.; Hancock, C.R. A high isoflavone diet decreases 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase activation and does not correct selenium-induced elevations in fasting blood glucose in mice. *Nutr Res.* 2014; 34(4): 308-317.

Steinberg, G.R.; Michell, B.J.; van Denderen, B.J.W.; Watt, M.J.; Carey, A.L.; Fam, B.C.; Andrikopoulos, S.; Proietto, J.; Gorgun, C.Z.; Carling, D.; Hotamisligil, G.S.; Febbraio, M.A.; Kay, T.W.; Kemp, B.E. Tumor necrosis factor α -induced skeletal muscle insulin resistance involves suppression of AMP-kinase signaling. *Cell Metab.* 2006; 4: 465–474.

Stephens, J.W.; Khanolkar, M.P.; Bain, S.C. The biological relevance and measurement of plasma markers of oxidative stress in diabetes and cardiovascular disease. *Atherosclerosis.* 2009; 202: 321–329.

Sugiura, H.; Ichinose, M. Forum Review: oxidative and nitrative stress in bronchial asthma. *Antioxid Redox Sign.* 2008; 10(4): 785-797.

Sugiura, H.; Ichinose, M. Nitrative stress in inflammatory lung diseases. *Nitric Oxide.* 2011; 25(2): 138-144.

Sumimoto, H. Structure, regulation and evolution of nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *The FEBS journal.* 2008; 275: 3249–3277.

Thomas, P.S.; Yates, D.H.; Barnes, P.J. Tumor necrosis factor- α increases airway responsiveness and sputum neutrophilia in normal human subjects. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995; 152(1): 76-80.

Thomas, P.S.; Heywood, G. Effects of inhaled tumour necrosis factor α in subjects with mild asthma. *Thorax.* 2002; 57(9): 774-778.

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

Thuesen, B.H.; Husemoen, L.L.; Hersoug, L.G.; Pisinger, C.; Linneberg, A. Insulin resistance as a predictor of incident asthma-like symptoms in adults. *Clin Exp Allergy*. 2009; 39(5): 700-707.

Timmers, S.; Konings, E.; Bilet, L.; Houtkooper, R.H.; van de Weijer, T.; Goossens, G.H. Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. *Cell Metab*. 2011; 14: 612–622.

Tiwari, M.; Dwivedi, U.N.; Kakkar, P. *Tinospora cordifolia* extract modulates COX-2, iNOS, ICAM-1, pro-inflammatory cytokines and redox status in murine model of asthma. *J Ethnopharmacol*. 2014; 153: 326–337.

Tormos, K.V.; Anso, E.; Hamanaka, R.B.; Eisenbart, J.; Joseph, J.; Kalyanaraman, B.; Chandel, N.S. Mitochondrial complex III ROS regulate adipocyte differentiation. *Cell Metab*. 2011; 14: 537-544.

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

Uhm, T.G.; Kim, B.S.; Chung, I.Y. Eosinophil development, regulation of eosinophil-specific genes, and role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2012; 4(2): 68-79.

Uller, L.; Persson, C.G.; Erjefält, J.S. Resolution of airway disease: removal of inflammatory cells through apoptosis, egression or both? *Trends Pharmacol Sci*. 2006; 27(9): 461-466.

Um, J.H., Park, S.J., Kang, H., Yang, S., Foretz, M., McBurney, M.W., Kim, M.K., Viollet, B.; Chung, J.H. AMP-activated protein kinase-deficient mice are resistant to the metabolic effects of resveratrol. *Diabetes*. 2010; 59: 554–563.

Unger, R.H.; Zhou, Y.T. Lipotoxicity of beta-cells in obesity and in other causes of fatty acid spillover. *Diabetes*. 2001; 50: S118-S121.

Ungvari, Z.; Labinskyy, N.; Mukhopadhyay, P.; Pinto, J.T.; Bagi, Z.; Ballabh, P. Resveratrol attenuates mitochondrial oxidative stress in coronary arterial endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009; 297(5): H1876–H1881.

Urakawa, H.; Katsuki, A.; Sumida, Y.; Gabazza, E.C.; Murashima, S.; Morioka, K.; Maruyama, N.; Kitagawa, N.; Tanaka, T.; Hori, Y. Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88: 4673-4676.

Van Der Heide, L.P.; Hoekman, M.F.; Smidt, M.P. The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO transcription and transcriptional regulations. *Biochem J*. 2004; 380: 297–309.

van der Horst, A.; Burgering, B.M.T. Stressing the role of FOXO proteins in lifespan and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8: 440-450.

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

Vaziri, H.; Dessain, S.K.; Ng, E.E.; Imai, S.I.; Frye, R.A.; Pandita, T.K. hSIR2 (SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell*. 2001; 19: 149–159.

Vincent, H.K.; Innes, K.E.; Vincent, K.R. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes Obes Metab*. 2007; 9: 813–839.

Wehrens, X.H.; Lehnart, S.E.; Reiken, S.R.; Marks, A.R. Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res*. 2004; 94: e61-e70.

Weisberg, S.P.; McCann, D.; Desai, M.; Rosenbaum, M.; Leibel, R.L.; Ferrante, A.W.Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003; 112: 1796-1808.

Weiss, S.T. Insight into origins of asthma. *Nat Immunol*. 2005; 6: 537-539.

World Health Organization. Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health. 2004.

Xu, X.; Yavar, Z.; Verdin, M.; Ying, Z.; Mihai, G.; Kampfath, T.; Wang, A.; Zhong, M.; Lippmann, M.; Chen, L.C.; Rajogopalan, S.; Sun, Q. Effect of early particulate air pollution exposure on obesity in mice: role of P47phox. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010; 30: 2518–2527.

Yang, S-R.; Wright, J.; Bauter, M.; Seweryniak, K.; Kode, A.; Rahman, I. Sirtuin regulates cigarette smoke-induced proinflammatory mediator release via RelA/p65 NF-κB in macrophages in vitro and in rat lungs in vivo: implications for chronic inflammation and aging. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007; 292: L567-L576.

Yeung, F.; Hoberg, J.E.; Ramsey, C.S.; Keller, M.D.; Jones, D.R.; Frye, R.A.; Mayo, M.W. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J*. 2004; 23: 2369–2380.

Yoshifuku, K.; Matsune, S.; Otori, J.; Sagara, Y.; Fukuiwa, T.; Kurono, Y. IL-4 and TNFalpha increased the secretion of eotaxin from cultured fibroblasts of nasal polyps with eosinophil infiltration. *Rhinology*. 2007; 45: 235-241.

Yoshizaki, T.; Milne, J.C.; Imamura, T.; Schenk, S.; Sonoda, N.; Babendure, J.L.; Lu, J.C.; Smith, J.J.; Jirousek, M.R.; Olefsky, J.M. SIRT1 exerts anti-inflammatory effects and improves insulin sensitivity in adipocytes. *Mol Cell Biol*. 2009; 29: 1363–1374.

Yoshizaki, T.; Schenk, S.; Imamura, T.; Babendure, J.L.; Sonoda, N.; Bae, E.J.; Oh, D.Y.; Lu, M.; Milne, J.C.; Westphal, C. SIRT1 inhibits inflammatory pathways in macrophages and modulates insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010; 298: E419–E428.

Young, S.S.; Ritacco, G.; Skeans, S.; Chapman, R. W. Eotaxin and nitric oxide production as markers of inflammation in allergic cynomolgus monkey. *Int Arch Allergy Immunol.* 1999; 120(3): 209-217.

Yun, J-M.; Chien, A.; Jialal, I.; Devaraj, S. Resveratrol up-regulates SIRT1 and inhibits cellular oxidative stress in the diabetic milieu: mechanistic insights. *J Nutr Biochem.* 2012; 23: 699-705.

Zhang, H-X.; Duan, G-L.; Wang, C-N.; Zhang, Y-Q.; Zhu, X-Y.; Liu, Y-J. Protective effect of resveratrol against endotoxemia-induced lung injury involves the reduction of oxidative/nitrative stress. *Pulm Pharmacol Ther.* 2014; 27(2): 150-155.

Zhang, J.; Lee, S.; Shannon, S. The type III histone deacetylase Sirt 1 is essential for maintenance of T cell tolerance in mice. *J Clin Invest.* 2009; 119(10): 3048-3058.

Zhang, R.; Shih, A.; Rinna, A.; Forman, H.J. Resveratrol and 4-hydroxynonenal act in concert to increase glutamate cysteine ligase expression and glutathione in human bronchial epithelial cells. *Arch Biochem Biophys.* 2009; 481: 110-115.

Zhao, X.; Zmijewski, J.W.; Lorne, E.; Liu, G.; Park, Y.J.; Tsuruta, Y.; Abraham, E. Activation of AMPK attenuates neutrophil proinflammatory activity and decreases the severity of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008; 295(3): L497-L504.

Zuo, L.; Otenbaker, N.P.; Rose, B.A.; Salisbury, K.S. Molecular mechanisms of reactive oxygen species- related pulmonary inflammation and asthma. *Mol Immunol.* 2013; 56(1-2): 57-63.