

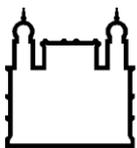
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

**EFEITO DO GLUCAGON SOBRE A CONTRAÇÃO DA
MUSCULATURA LISA DAS VIAS AÉREAS DE CAMUNDONGOS A/J**

DANIELLA BIANCHI REIS INSUELA

Rio de Janeiro
2013



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

DANIELLA BIANCHI REIS INSUELA

Efeito do glucagon sobre a contração da musculatura lisa das vias aéreas de camundongos A/J

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Imunologia e Farmacologia.

Orientador : Prof. Dr. Vinicius de Frias Carvalho

RIO DE JANEIRO

2013

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

I59 Insuela, Daniella Bianchi Reis

Efeito do glucagon sobre a contração da musculatura lisa das vias aéreas de camundongos A/J / Daniella Bianchi Reis Insuela. – Rio de Janeiro, 2013.

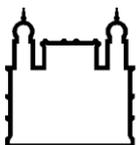
xx,100 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2013.

Bibliografia: f. 73-91

1. Asma. 2. Ciclooxigenase. 3. Glucagon. 4. Músculo liso. 5. Óxido nítrico. I. Título.

CDD 616.238061



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

DANIELLA BIANCHI REIS INSUELA

**EFEITO DO GLUCAGON SOBRE A CONTRAÇÃO DA MUSCULATURA LISA
DAS VIAS AÉREAS DE CAMUNDONGOS A/J**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Vinicius de Frias Carvalho

Aprovada em: 23/05/ 2013

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Marco Aurélio Martins - Presidente
Prof. Dra. Christianne Bandeira de Melo
Prof. Dr. Giles Alexander Rae
Prof. Dra. Adriana Ribeiro Silva
Prof. Dra. Patrícia Gonçalves Trentin

Rio de Janeiro, 23 de maio de 2013

À minha família,

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar saúde, família, amigos, e oportunidade de estudar;

Aos meus pais, Patricia e José Luís, e irmã Julia, pelo apoio, incentivo, carinho, amor, compreensão;

Aos meus avôs, José Maria e Rosa Bianchi, por todo amor, dedicação, e por tudo que fizeram por mim quando estavam vivos;

A minha avó, Rosa Insuela, por todo carinho, preocupação, amor e por estar presente na minha caminhada até hoje;

As minhas amigas dos tempos de colégio, especialmente Adriana Menucci, que apesar de terem seguido caminhos profissionais diferentes, continuam a ser verdadeiras amigas e sempre me apoiam e acreditam em mim;

As grandes amizades que criei na UNIRIO e que sempre estiveram ao meu lado, não só nos momentos de estudo e diversão;

A todos do Laboratório de Inflamação da Fiocruz, pelo carinho com que fui recebida e por todo apoio ao longo da realização desse trabalho, principalmente aos amigos Jéssika, Caio, Suzana, Rafael Torres, Yago, Diego, Katharinne, Patrícia Trentin, Dani Matheus, que sempre estiveram ao meu lado e foram muito importantes na etapa de finalização dessa pesquisa;

A Dra. Adriana Ribeiro por ter aceitado carinhosamente ser a revisora deste trabalho e ser membro integrante da banca examinadora;

Ao Dr. Giles Rae e as Dras. Christianne Bandeira de Melo e Patrícia Trentin, por gentilmente terem aceitado o convite para integrarem a banca examinadora e pelas contribuições a esta dissertação;

Ao Dr. Marco Aurélio Martins pela oportunidade de participação no Laboratório de Inflamação e por ter aceitado o convite de ser o presidente da banca examinadora;

Ao Dr. Renato Cordeiro e à Dr^a Patrícia Silva, por terem me aceitado no laboratório e pelo exemplo de pesquisadores bem sucedidos;

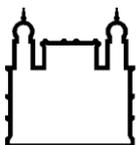
Ao Dr. Júlio Daleprane por toda a ajuda, por ter me ensinado a técnica de *Western blot* e principalmente por ter me mostrado que além dessa técnica ser muito útil também pode ser prazerosa;

A Dra. Magda Serra, por todos os ensinamentos, apoio, ajuda, companheirismo e sem esquecer as caronas;

A Dra. Luciana Coelho pela paciência e carinho com que me ensinou a técnica do sistema de órgão isolado;

Ao Dr. Vinicius Carvalho, pela dedicação, compreensão, paciência, amizade, apoio, ajuda, ensinamentos, confiança e excelente orientação desde a iniciação científica;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado e ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular da Fiocruz pela oportunidade da realização desse mestrado.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EFEITO DO GLUCAGON SOBRE A CONTRAÇÃO DA MUSCULATURA LISA DAS VIAS AÉREAS DE CAMUNDONGOS A/J

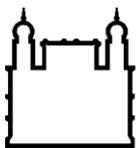
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Daniella Bianchi Reis Insuela

O glucagon é um hormônio hiperglicêmico cuja expressão do receptor foi detectada em pulmões de camundongos, mas pouco é conhecido sobre suas ações nesse órgão. Neste estudo, investigamos o efeito do glucagon sobre a contratilidade do músculo liso das vias aéreas em camundongos A/J e possível mecanismo envolvido. Brônquios e traqueias foram estabelecidos num sistema de banho de órgão isolado, e a resposta contrátil ao carbacol foi medida na presença ou ausência de glucagon (0,1 ou 1 μM) *in vitro*. Em alguns experimentos, as traqueias foram incubadas com antagonistas do receptor do glucagon (des-His¹-[Glu⁹] glucagon amida; 1 μM) ou dos adrenoreceptores β (propranolol; 1 μM); ou inibidores de NOS (L-NAME; 100 μM), COX (indometacina; 10 μM) ou HO (ZnPP IX; 10 μM), 30 min antes da exposição ao glucagon. Ademais, o epitélio de algumas traqueias foi removido antes do tratamento com glucagon *in vitro*. A expressão do receptor do glucagon nos pulmões e traqueias com ou sem epitélio foi avaliada por *Western blot*. O efeito do glucagon sobre a obstrução das vias aéreas provocada pela metacolina em camundongos foi testada *in vivo* utilizando pletismografia não-invasiva e invasiva. Em alguns experimentos, os camundongos receberam L-NAME (20 mg/Kg) ou indometacina (10 mg/Kg) i.p. 30 min antes do glucagon. Um tratamento com glucagon (0,1 – 10 $\mu\text{g/Kg}$, i.n. ou i.p.) foi realizado durante 7 ou 14 dias, uma vez ao dia, e os níveis de glicose foram avaliados 24 h depois do último dia de tratamento. O efeito do glucagon sobre a hiper-reatividade das vias aéreas à metacolina em camundongos sensibilizados e desafiados com OVA foi avaliado em pletismografia invasiva 24 h após o último desafio. Os animais foram provocados com OVA i.n. (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) durante 2 dias consecutivos e o glucagon foi administrado i.n. 1 h antes ou 1 ou 6 h após cada provocação. O tratamento com glucagon inibiu a contração de brônquios e traqueias induzida pelo carbacol *in vitro*. A administração de glucagon (1 $\mu\text{g/Kg}$) inibiu a broncoconstrição induzida pela metacolina 1 e 3 h após o tratamento. O glucagon (1 $\mu\text{g/Kg}$, i.n.) impediu alterações na resistência e complacência dinâmica pulmonares promovidas pela metacolina. O antagonista do receptor do glucagon inibiu o efeito anti-espasmódico do glucagon *in vitro*. Ademais, esse efeito do glucagon foi abolido pela remoção epitelial. O receptor do glucagon foi expresso em pulmões e traqueias com o epitélio intacto, mas não em traqueias desepitelizadas. A pré-incubação com propranolol ou ZnPP IX não inibiu a ação anti-espasmódica do glucagon *in vitro*. Ambos L-NAME ou indometacina aboliram o efeito do glucagon *in vitro* e *in vivo*. A administração diária com glucagon não interferiu nos níveis circulantes de glicose. Finalmente, o tratamento com glucagon 1 h antes ou depois do desafio com OVA inibiu a hiper-reatividade das vias aéreas à metacolina. Nossos resultados mostram que o glucagon apresenta um efeito anti-espasmódico na contração do músculo liso das vias aéreas, e essa ação ocorre de forma indireta, através da ativação do seu receptor presente no epitélio com consequente liberação de NO e produtos da ativação de COX.

Palavras-chave: Asma; Ciclooxigenase; Glucagon; Músculo liso; Óxido nítrico.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EFFECT OF GLUCAGON ON AIRWAY SMOOTH MUSCLE CONTRACTION OF A/J MICE

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Daniella Bianchi Reis Insuela

Glucagon is a hyperglycemic hormone whose receptor expression was detected in lungs of mice, but little is known about their actions in this organ. In this study, we investigated the effect of glucagon on airway smooth muscle contractility in A/J mice and possible mechanism involved. Bronchi and tracheas were set up in an isolated organ bath system, and the contractile response to carbachol was measured in the presence or absence of glucagon (0.1 or 1 μM) *in vitro*. In some experiments, the tracheas were incubated with antagonists of the glucagon receptor (des-His¹-[Glu⁹] glucagon amide; 1 μM) or β -adrenoceptors (propranolol; 1 μM); or inhibitors of NOS (L-NAME; 100 μM), COX (indomethacin; 10 μM) or HO (ZnPP IX; 10 μM), 30 min before exposure to glucagon. Moreover, the epithelium of some tracheas was removed before glucagon treatment *in vitro*. The expression of glucagon receptor in lungs and tracheas with or without epithelium was evaluated by Western blot. The effect of glucagon (0.1 – 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, i.n) on methacholine-provoked airway obstruction in mice was tested *in vivo* using noninvasive and invasive plethysmography. In some experiments, the mice received L-NAME (20 mg/Kg) or indomethacin (10 mg/Kg) i.p. 30 min before glucagon. A treatment with glucagon (0.1 - 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, i.n. or i.p.) was performed for 7 or 14 days, once a day, and glucose levels were assessed 24 h after the last day of treatment. The effect of glucagon on airway hyperreactivity to methacholine on mice sensitized and challenged with OVA was evaluated in invasive plethysmography 24 h after the last challenged. The animals were provoked with i.n. OVA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) for 2 consecutive days and glucagon was administered i.n. 1 h before or 1 or 6 h after each provocation. The treatment with glucagon inhibited bronchus and trachea contraction induced by carbachol *in vitro*. The administration of glucagon (1 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) inhibited methacholine-induced bronchoconstriction 1 and 3 h after treatment. Glucagon (1 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, i.n.) prevented alterations in lung resistance and dynamic compliance promoted by methacholine. The glucagon receptor antagonist inhibited the anti-spasmodic effect of glucagon *in vitro*. Moreover, this effect of glucagon was abrogated by epithelial removal. Glucagon receptor was expressed in lungs and tracheas with intact epithelium but not in denuded tracheas. The pre-incubation with propranolol or ZnPP IX did not inhibit the anti-spasmodic action of glucagon *in vitro*. Either L-NAME or indomethacin abrogated the effect of glucagon *in vitro* and *in vivo*. The daily administration of glucagon did not interfere with the circulating levels of glucose. Finally, the treatment with glucagon 1 h before or after challenge with OVA inhibited airway hyperreactivity to methacholine. Our results show that glucagon presents an anti-spasmodic effect on airway smooth muscle contraction, and this action occurs in an indirectly way, through activation of its receptor present in epithelium with consequent release of NO and products of COX activation.

Keywords: Asthma; Cyclooxygenase; Glucagon; Smooth muscle; Nitric oxide.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AA – (*Arachidonic acid*) – Ácido Araquidônico
- AC – (*Adenylate Cyclase*) – Adenilato Ciclase
- ACh – (*Acetylcholine*) – Acetilcolina
- AChE – (*Acetylcholinesterase*) – Acetilcolinesterase
- AMPC – (*Cyclic Adenosine Monophosphate*) – Monofosfato de Adenosina Cíclico
- ANOVA – (*Analysis of Variance*) – Análise de Variância
- APC – (*Antigen Present Cell*) – Célula Apresentadora de Antígenos
- BCA – (*Bicinchoninic Acid*) – Ácido Bicincônico
- BK_{Ca} – (*Large-Conductance Calcium-Activated Potassium*) – Canal de Potássio de Alta Condutância Ativado por Cálcio
- BSA – (*Bovine Serum Albumin*) – Albumina de Soro Bovino
- BuChE – (*Butyrylcholinesterase*) – Butirilcolinesterase
- CAT – (*Choline Acetyltransferase*) – Colina- Acetiltransferase
- Cdyn – (*Dynamic Lung Compliance*) – Complacência Pulmonar Dinâmica
- CECAL – Centro de Criação de Animais de Laboratório
- CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratórios
- COX – (*Cyclooxygenase*) -- Ciclooxigenase
- DAG – (*Diacylglycerol*) – Diacilglicerol
- DC – (*Dendritic Cell*) – Célula Dendrítica
- DPP-4 – (*Dipeptidyl Peptidase-4*) – Dipeptidil Peptidase-4
- DMSO – (*Dimethyl Sulfoxide*) – Dimetilsulfóxido
- DPOC – (*Chronic Obstructive Pulmonary Disease*) – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
- ECP – (*Eosinophil Cationic Protein*) – Proteína Eosinofílica Catiônica
- EDTA – (*Ethylenediamine Tetraacetic Acid*) – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
- Emax – (*Maximal Contractile Response*) – Resposta Contrátil Máxima

EP – (*Prostaglandin E₂ Receptor*) – Receptor para Prostaglandina E₂

Epac – (*Exchange protein directly activated by cAMP*) – Proteína de Troca Diretamente Ativada pelo AMPc

EPM – Erro Padrão da Média

EPO – (*Eosinophil Peroxidase*) – Peroxidase Eosinofílica

FceRI – (*High Affinity IgE Receptor*) – Receptor de Alta Afinidade para IgE

GABA – (*Gamma Aminobutyric Acid*) – Ácido Gama-Aminobutírico

GCGR – (*Glucagon Receptor*) – Receptor do Glucagon

GCs – (*Soluble Guanylate Cyclase*) – Guanilato Ciclase Solúvel

GLP – (*Glucagon-Like Peptide*) – Peptídeo Semelhante ao Glucagon

GMPc – (*Cyclic Guanosine Monophosphate*) – Monofosfato de Guanosina Cíclico

GPCR – (*G Protein Coupled Receptor*) – Receptor Acoplado a Proteína G

GRK – (*G Protein Coupled Receptor Kinase*) – Cinase do Receptor Acoplado a Proteína G

GRPP – (*Glicentin-Related Pancreatic Polypeptide*) – Polipeptídeo Pancreático Relacionado com a Glicentina

GTP – (*Guanosine Triphosphate*) – Trifosfato de Guanosina

HO – (*Heme Oxygenase*) – Heme Oxigenase

IgE – (*Immunoglobulin E*) – Imunoglobulina E

IL-4 – (*Interleukin-4*) – Interleucina- 4

IL-13 – (*Interleukin-13*) – Interleucina- 13

IL-17 – (*Interleukin-17*) – Interleucina- 17

IP – (*Prostacyclin Receptor*) – Receptor de Prostaciclina

IP3 – (*Inositol 1,4,5-Trisphosphate*) – Inositol 1,4,5 Trifosfato

L-NAME – (*N^o-Nitro-L-Arginine Methyl Ester*) – N^o-Nitro-L-Arginina Metil Ester

M₁₋₅ – (*Muscarinic Receptor Subtypes*) – Subtipos de Receptores Muscarínicos

MBP – (*Major Basic Protein*) – Proteína Básica Principal

MG – (*Miniglucagon*) – Miniglucagon

MGE – (*Miniglucagon-Generating Endopeptidase*) – Endopeptidase Geradora de Miniglucagon

MLC- (*Regulatory Myosin Light Chain*) – Cadeia Leve Reguladora da Miosina

MLCK – (*Myosin Light Chain Kinase*) – Cinase de Cadeia Leve de Miosina

MLCP – (*Myosin Light Chain Phosphatase*) – Fosfatase de Cadeia Leve de Miosina

mRNA – (*Messenger RNA*) – RNA Mensageiro

NOS – (*Nitric Oxide Synthase*) – Óxido Nítrico Sintase

OVA – (*Ovalbumin*) - Ovoalbumina

PACAP – (*Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide*) – Polipeptídeo Ativador da Adenilato Ciclase Pituitária

PBS – (*Phosphate Buffered Saline*) – Solução Salina Tamponada com Fosfato

PC – (*Prohormone Convertase*) – Pró-hormônio Convertase

pEC50 – (*Negative Logarithm of the Agonist Concentration that Produces 50% of the Maximal Effect*) – Logaritmo Negativo da Concentração do Agonista que produz 50% do Efeito Máximo

Penh – (*Enhanced Pause*) – Pausa Aumentada

PEP – (*Peak Expiratory Pressure*) – Pico de Pressão Expiratória

PGD₂ – (*Prostaglandin D₂*) – Prostaglandina D₂

PGE₂ – (*Prostaglandin E₂*) – Prostaglandina E₂

PGF_{2α} – (*Prostaglandin F_{2α}*) – Prostaglandina F_{2α}

PGG₂ – (*Prostaglandin G₂*) – Prostaglandina G₂

PGH₂ – (*Prostaglandin H₂*) – Prostaglandina H₂

PGI₂ – (*Prostacyclin*) – Prostaciclina

PIP – (*Peak Inspiratory Pressure*) – Pico de Pressão Inspiratória

PKA – (*Protein Kinase A*) – Proteína Cinase A

PKC – (*Protein Kinase C*) – Proteína Cinase C

PKG – (*Protein Kinase G*) – Proteína Cinase G

PLC – (*Phospholipase C*) – Fosfolipase C

PP – (*Pancreatic Polypeptide*) – Polipeptídeo Pancreático

Proteína Gi – (*Inhibitory G Protein*) – Proteína G Inibitória

Proteína Gq – (*Quiescent G Protein*) – Proteína G Quiescente

Proteína Gs – (*Stimulatory G Protein*) – Proteína G Estimulatória

PSA – Persulfato de Amônio

QSP – Quantidade Suficiente Para

Raw – (*Airway Resistance*) – Resistência das Vias Aéreas

RL – (*Lung Resistance*) – Resistência Pulmonar

Rti – (*Tissue Resistance*) – Resistência Tecidual

ROCK – (*Rho-Associated Protein Kinase*) – Cinase Associada à Rho

ROS – (*Reactive Oxygen Species*) – Espécies Reativas de Oxigênio

SDS- PAGE – (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide*) – Dodecil Sulfato de Sódio de Poliacrilamida

SNC – (*Central Nervous System*) – Sistema Nervoso Central

SNP – (*Peripheral Nervous System*) – Sistema Nervoso Periférico

SOC – (*Store-Operated Calcium Channel*) – Canal de Cálcio Operado por Armazenamento

SUS – Sistema Único de Saúde

TBS – (*Tris Buffered Saline*) – Tampão Tris Salina

TBST – (*Tris Buffered Saline-Tween20*) – Tampão Tris Salina Tween20

Temed – (*Tetramethylethylenediamine*) – Tetrametiletlenodiamina

TXA₂ – (*Thromboxane A₂*) – Tromboxano A₂

TCR – (*T Cell Receptor*) – Receptor da Célula T

Th₂ – (*T Helper 2*) – T Auxiliar 2

Th₁₇ – (*T Helper 17*) – T Auxiliar 17

VIP – (*Vasoactive Intestinal Peptide*) – Peptídeo Intestinal Vasoativo

ZnPP IX – (*Zinc Protoporphyrin-IX*) – Zinco Protoporfirina IX

LISTA DE QUADROS E TABELAS

	Pág.
Quadro 3.1 - Lista de reagentes ou drogas e suas fontes de obtenção.....	30
Tabela 4.1 - Efeito do glucagon sobre o Emax e pEC50 do carbacol na musculatura lisa de brônquio e traqueia.....	36
Tabela 4.2 - Níveis circulantes de glicose de camundongos A/J após 7 e 14 dias de tratamento i.n. diário com glucagon.....	39
Tabela 4.3 - Níveis circulantes de glicose de camundongos A/J após 7 e 14 dias de tratamento i.p. diário com glucagon.....	39

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.1 - Sequencia de aminoácidos dos membros da superfamília da secretina..1	
Figura 3.1 - Registro dos efeitos contráteis isométricos de brônquio e traqueia induzidos por concentrações crescentes de carbacol (C1- C9) <i>in vitro</i>18	
Figura 4.1 – Influência do glucagon sobre a resposta contrátil de brônquio (A) e traqueia (B) isolados de camundongos ao carbacol.....35	
Figura 4.2 - Efeito da administração i.n. de glucagon sobre a broncoconstrição induzida por aerolização de concentrações crescentes de metacolina (6,25 – 50 mg/mL) em camundongos A/J.....37	
Figura 4.3 - Efeito da administração i.n. de glucagon sobre as alterações da RL e Cydn de camundongos A/J induzidas por metacolina.....38	
Figura 4.4 - Efeito do antagonista do GCGR (des-His1-[Glu9] glucagon amida) sobre a ação anti-espasmódica do glucagon na contração da musculatura lisa de traqueia induzida por carbacol <i>in vitro</i>41	
Figura 4.5 - Envolvimento do epitélio no efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração da musculatura lisa de traqueia induzida por carbacol <i>in vitro</i>43	
Figura 4.6 - Expressão do GCGR em traqueia com epitélio intacto, traqueia desepitelizada e pulmão de camundongos A/J.....44	
Figura 4.7 – Efeito do propranolol sobre a ação anti-espasmódica do glucagon na contração da musculatura lisa de traqueia induzida por carbacol <i>in vitro</i>47	
Figura 4.8 – Efeito do L-NAME sobre a ação anti-espasmódica do glucagon na contração da musculatura lisa de traqueia induzida por carbacol <i>in vitro</i>48	

Figura 4.9 – Efeito da indometacina sobre a ação anti-espasmódica do glucagon na contração da musculatura lisa de traqueia induzida por carbacol <i>in vitro</i>	49
Figura 4.10 – Efeito da ZnPP IX sobre a ação anti-espasmódica do glucagon na contração da musculatura lisa de traqueia induzida por carbacol <i>in vitro</i>	50
Figura 4.11 – Efeito do L-NAME sobre a ação anti-espasmódica do glucagon na contração da musculatura lisa das vias aéreas induzida por metacolina <i>in vivo</i>	53
Figura 4.12 – Efeito da indometacina sobre a ação anti-espasmódica do glucagon na contração da musculatura lisa das vias aéreas induzida por metacolina <i>in vivo</i>	54
Figura 4.13 – Efeito do tratamento i.n. com glucagon sobre a resposta de hiperreatividade das vias aéreas à metacolina no modelo de asma aguda de 2 dias em camundongos A/J.....	56
Figura 6.1 – Representação esquemática do possível mecanismo molecular envolvido no efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração da musculatura lisa das vias aéreas de camundongos A/J.....	72

SUMÁRIO

	Pág.
Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	viii
Lista de Quadros e Tabelas.....	xii
Lista de Figuras.....	xiii
1. Introdução.....	1
1.1. Glucagon.....	1
1.2. Asma.....	5
1.3. Músculo liso das vias aéreas.....	8
2. Objetivos.....	16
2.1. Objetivo Geral.....	16
2.2. Objetivos Específicos.....	16
3. Material e Métodos.....	17
3.1. Animais.....	17
3.2. Avaliação da contratilidade da musculatura lisa das vias aéreas <i>in vitro</i>	17

3.2.1. Sistema de banho de órgão isolado.....	17
3.2.2. Avaliação do efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração da musculatura lisa de brônquio e traqueia <i>in vitro</i>	18
3.2.3. Avaliação da participação do epitélio no efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração da musculatura lisa de traqueia <i>in vitro</i>	19
3.2.4. Estudo dos mecanismos moleculares associados ao efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração da musculatura lisa de traqueia <i>in vitro</i>	19
3.3. Avaliação da função pulmonar.....	19
3.3.1. Avaliação não invasiva do efeito do glucagon sobre a contração da musculatura lisa das vias aéreas <i>in vivo</i>	19
3.3.2. Avaliação invasiva do efeito do glucagon sobre a contração da musculatura lisa das vias aéreas <i>in vivo</i>	20
3.4. Quantificação de glicose sanguínea.....	21
3.5. Avaliação da expressão do GCGR em pulmão e em traqueia com epitélio intacto ou desepitelizada.....	21
3.5.1. Obtenção e processamento dos tecidos.....	21
3.5.2. Quantificação de proteínas totais.....	22
3.5.3. <i>Western blot</i>	23
3.6. Avaliação do efeito do tratamento com glucagon sobre a hiper-reatividade das vias aéreas.....	24

3.6.1. Procedimentos de sensibilização e desafio antigênico.....	24
3.6.2. Tratamento com glucagon.....	24
3.6.3. Avaliação invasiva da hiper-reatividade das vias aéreas à metacolina.....	25
3.7. Soluções.....	25
3.7.1. Solução final de Krebs.....	25
3.7.2. Solução de EDTA 100 mM.....	25
3.7.3. Solução salina não estéril (0,9%).....	26
3.7.4. Solução de perfusão (salina não estéril 0,9% + EDTA 20 mM).....	26
3.7.5. PBS 1X.....	26
3.7.6. Tampão de lise.....	26
3.7.7. Tampão de amostra <i>SDS-PAGE</i>	27
3.7.8. Soluções de Tris HCl 1,5 M pH 8,8 e de Tris HCl 0,5 M pH 6,8.....	27
3.7.9. Solução de PSA 10%.....	28
3.7.10. Géis de poliacrilamida.....	28
3.7.11. Tampão de corrida 10X.....	28
3.7.12. Tampão de transferência 1X	28
3.7.13. Tampão tris salina (TBS) 10X.....	29

3.7.14. TBST.....	29
3.8. Drogas.....	29
3.9. Fonte de obtenção dos reagentes e das drogas.....	30
3.10. Análise estatística.....	31
4. Resultados.....	33
4.1. Efeito do glucagon sobre a contração da musculatura lisa de brônquio e traqueia induzida por carbacol <i>in vitro</i>	33
4.2. Efeito do tratamento com glucagon sobre a contração das vias aéreas induzida por metacolina <i>in vivo</i>	33
4.3. Efeito do glucagon sobre a glicemia de camundongos A/J após 7 e 14 dias de tratamento.....	34
4.4. Envolvimento do GCGR no efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração da musculatura lisa de traqueia <i>in vitro</i>	40
4.5. Envolvimento do epitélio no efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração da musculatura lisa de traqueia <i>in vitro</i>	42
4.6. Estudo dos mecanismos moleculares associados ao efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração da musculatura lisa das vias aéreas.....	45
4.7. Efeito do tratamento com glucagon sobre a hiper-reatividade das vias aéreas.....	55
5. Discussão.....	57
6. Conclusão.....	71

7. Referências Bibliográficas.....	73
8. Anexos.....	92
8.1. Artigo publicado durante o período do mestrado.....	92
8.2. Anotações.....	101

1. Introdução

1.1. Glucagon

O glucagon foi descoberto em 1922 pelos pesquisadores Charles Kimball e John Murlin, durante uma pesquisa cujo objetivo era aperfeiçoar a extração e purificação de insulina a partir de um extrato aquoso do pâncreas. Nesse experimento, Kimball e Murlin observaram que quando administravam uma determinada preparação do extrato pancreático em cachorros que tiveram o pâncreas removido, ocorria um rápido aumento nos níveis sanguíneos de glicose desses animais, antes de acontecer a esperada redução da glicemia. Eles nomearam essa substância com efeito hiperglicemiante de glucagon (1, 2).

O glucagon é um hormônio polipeptídico constituído por 29 aminoácidos que pertence à superfamília da secretina, na qual são incluídos outros peptídeos como a secretina, o peptídeo intestinal vasoativo (VIP), o polipeptídeo ativador da adenilato ciclase pituitária (PACAP), os peptídeos semelhantes ao glucagon (GLP) -1 e -2, dentre outros (3, 4). Todos esses hormônios possuem um resíduo de histidina na posição um e apresentam elevada similaridade entre suas sequências de aminoácidos (5, 6) (Figura 1.1).

	5	10	15	20	25	30	35	40																															
GLUCAGON.....	H	S	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	R	A	Q	D	F	V	Q	W	L	M	N	T										
GLP-1(7-37)....	H	A	E	G	T	F	T	S	D	V	S	S	Y	L	E	G	Q	A	A	K	E	F	I	A	W	L	V	K	G	R	G								
SECRETIN.....	H	S	D	G	T	F	T	S	E	L	S	R	L	R	E	G	A	R	L	Q	R	L	L	Q	G	L	V	NH ₂											
GLP-2.....	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D						
PACAP-38.....	H	S	D	G	I	F	T	D	S	Y	S	R	Y	R	K	Q	M	A	V	K	K	Y	L	A	A	V	L	G	K	R	Y	K	Q	R	V	K	N	K	NH ₂
PACAP-27.....	H	S	D	G	I	F	T	D	S	Y	S	R	Y	R	K	Q	M	A	V	K	K	Y	L	A	A	V	L	NH ₂											
VIP.....	H	S	D	A	V	F	T	D	N	Y	T	R	L	R	K	Q	M	A	V	K	K	Y	L	N	S	I	L	NH ₂											

FIGURA 1.1: Sequencias de aminoácidos dos membros da superfamília das secretinas. Todas as sequencias apresentadas referem-se aos peptídeos humanos. Os resíduos de aminoácidos sombreados são aqueles idênticos aos resíduos presentes no glucagon. O padrão de abreviaturas utilizado para os aminoácidos são os de uma única letra (IUPAC-IUB Comissão em Nomenclatura Bioquímica): A, Ala; C, Cys; D, Asp; E, Glu; F, Phe; G, Gly; H, His; I, Ile; K, Lys; L, Leu; M, Met; P, Pro; Q, Gln; R, Arg; S, Ser; T, Thr; V, Val; W, Trp; e Y, Tyr. *Modificado de Kiefer e cols. (1999) (7).*

O glucagon é sintetizado a partir de um precursor de 160 aminoácidos denominado pró-glucagon que é expresso nas células alfa (α) pancreáticas e L

intestinais, e no cérebro. O processamento do pró-glucagon ocorre de forma tecido-específica, através da ação de enzimas pró-hormônio convertases (PCs). Nas células α do pâncreas predomina a expressão da enzima PC2, que cliva o pró-glucagon em glucagon e em outros produtos como o fragmento principal do pró-glucagon e polipeptídeo pancreático relacionado com a glicentina (GRPP). Já no intestino e no cérebro, a clivagem do pró-glucagon é catalisada principalmente pela enzima PC1/3, o que leva à formação de GLP-1, GLP-2, glicentina, oxintomodulina e GRPP (8, 9).

O glucagon é secretado pelas células α das Ilhotas de Langerhans do pâncreas. Além das células α , as ilhotas são integradas por células beta (β) que secretam insulina, delta (δ) que secretam somatostatina, e células secretoras do polipeptídeo pancreático (PP). Nos seres humanos, as células α representam 33 a 46% do número total de células das ilhotas, as β compreendem 48 a 59%, as δ constituem menos de 10% e as células secretoras do PP correspondem a menos de 1% (10).

A secreção de glucagon é estimulada pela hipoglicemia, ativação do sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático, aumento da disponibilidade de ácidos graxos e de alguns aminoácidos como arginina, alanina e glutamina, e pelo próprio glucagon (10). Por outro lado, a hiperglicemia, insulina, somatostatina, íons zinco, o neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA) e o GLP-1 inibem sua secreção (11, 12).

O papel fundamental do glucagon é proteger o organismo contra a hipoglicemia e, assim como a insulina, ele participa da regulação dos níveis de glicose sanguínea. Para exercer essa função, o glucagon atua principalmente no fígado ativando a glicogenólise e gliconeogênese e inibindo a glicólise e glicogênese, o que antagoniza as ações da insulina e promove um aumento na glicemia. Esse efeito hiperglicemiante do glucagon é importante durante o jejum, pois a hipoglicemia pode causar danos especialmente ao sistema nervoso central (SNC), e em condições normais a glicose é a única fonte de energia utilizada por esse sistema (13). Além da ação sobre o fígado, o glucagon promove efeitos extra-hepáticos, tais como, estimulação da lipólise no tecido adiposo, relaxamento do músculo liso do trato gastrointestinal e aumento da contratilidade cardíaca (14).

Os efeitos do glucagon são produzidos pela ativação do seu receptor (GCGR) que é altamente expresso no fígado e nos rins, e que também está presente em diversos outros órgãos e tecidos incluindo coração, trato gastrointestinal, tecido

adiposo e pâncreas (15). O GCGR foi descrito pela primeira vez em 1971 por Rodbell e colaboradores que o definiram como sendo uma entidade de ligação do glucagon à membrana plasmática de hepatócitos, funcionalmente acoplada à enzima adenilato ciclase (AC). Esses pesquisadores também demonstraram que o trifosfato de guanosina (GTP) era necessário para que ocorresse a ativação da AC pelo glucagon *in vitro* e que a ligação do glucagon ao GCGR era afetada por esse nucleotídeo. Esses estudos com o glucagon e o GCGR foram um passo importante para a posterior identificação das proteínas G como componentes da transdução de sinal de receptores presentes na membrana plasmática das células e que foram nomeados como receptores acoplados à proteína G (GPCRs) (16).

Os GPCRs são glicoproteínas que contém 7 domínios transmembranares e um sítio de ligação à proteína-G. O GCGR pertence à classe B da família dos GPCRs, que compreende 15 membros, incluindo os receptores para secretina, VIP, PACAP, GLP-1 e GLP-2. A característica em comum dos receptores pertencentes à classe B da família dos GPCRs é que a ativação deles promove um aumento nos níveis intracelulares de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), e além disso, todos os ligantes desses receptores são hormônios peptídicos que contém mais de 27 resíduos de aminoácidos (17, 18).

Além disso, o GCGR também pode sinalizar uma elevação nos níveis intracelulares de cálcio (Ca^{+2}) através de um mecanismo dependente da enzima fosfolipase C (PLC). Porém, esse mecanismo ainda não é bem compreendido (19).

Assim como ocorre com outros membros da família dos GPCRs, já foi demonstrado que o GCGR perde a sua capacidade de resposta quando é estimulado de forma prolongada pelo glucagon, num processo denominado dessensibilização, que é importante para evitar a superestimulação dos GPCRs. A primeira etapa na dessensibilização do GCGR é iniciada pela ligação do glucagon, o que desencadeia a fosforilação citoplasmática desse receptor pelas cinases dos receptores acoplados a proteína G (GRKs) ou pela proteína cinase C (PKC). Essa fosforilação permite que a proteína β -arrestina se ligue ao GCGR, e esse complexo é internalizado através da endocitose dependente da proteína clatrina, o que forma vesículas citoplasmáticas contendo o GCGR (20, 21). A partir desse momento, o GCGR pode ter dois destinos: ou ele segue o caminho da reciclagem, no qual esse receptor retorna à membrana plasmática, num mecanismo dependente das proteínas Rab-4 e Rab-11, onde é reinserido e recupera sua atividade; ou o GCGR é levado até os lisossomos onde é degradado (22).

Ainda não são bem conhecidos os mecanismos responsáveis pela degradação e depuração do glucagon no organismo, embora não existam dúvidas na literatura de que o fígado e os rins são os principais tecidos envolvidos nesses processos. Uma das informações existentes sobre os mecanismos de clivagem do glucagon no fígado, é que ela pode ocorrer por diversas formas, sendo uma dependente da ligação do glucagon ao seu receptor, e as outras formas independentes dessa ligação. Quanto à degradação do glucagon nos rins, estudos sugerem a participação da enzima dipeptidil peptidase-4 (DPP-4) nesse processo (16). A enzima DPP-4 é uma protease que cliva preferencialmente dipeptídeos da terminação N de cadeias polipeptídicas que contém os aminoácidos prolina ou alanina na penúltima posição e que também exerce papel importante na inativação dos GLP-1 e GLP-2 (23). A clivagem do glucagon pela DPP-4 resulta na produção de fragmentos proteolíticos que possuem baixa afinidade para o GCGR, como foi demonstrado em experimentos que avaliaram a estimulação da AC e a ligação competitiva ao GCGR (16).

Apesar da taxa de proteólise do glucagon ser maior no fígado e nos rins, esse hormônio também pode ser degradado no sangue, principalmente através da ação da enzima DPP-4. A maioria das DPP-4 ativas no sistema circulatório é encontrada ligada à membrana plasmática, por isso, o grau de degradação do glucagon no sangue é maior na parede dos vasos sanguíneos do que no plasma (16). Dentre os processos de clivagem do glucagon, nem todos levam à sua eliminação do organismo, como é o caso do processamento realizado por uma protease denominada endopeptidase geradora de miniglucagon (MGE) e que ocorre no fígado, sangue e coração. A MGE cliva o glucagon no sítio das argininas localizadas na décima sétima e décima oitava posições, o que origina um fragmento biologicamente ativo denominado miniglucagon (MG) que promove seus efeitos sem ativar a enzima AC (24, 25). Em concentrações picomolares, o MG inibe o canal de Ca^{+2} da membrana plasmática de hepatócitos e a secreção de insulina induzida pela glicose e exerce efeito inotrópico negativo na contração de miócitos cardíacos (16, 25). Porém, em níveis nanomolares, o MG potencia a ação inotrópica positiva do glucagon no coração (16).

O glucagon já é utilizado clinicamente e sua principal aplicação é no tratamento emergencial de reações hipoglicêmicas severas em pacientes diabéticos insulino-dependentes. Ademais, por ser capaz de promover um aumento nos níveis intracelulares de AMPc no coração, o glucagon é utilizado como terapia nos

envenenamentos causados por fármacos cardioprotetores, incluindo β -bloqueadores. O glucagon também auxilia o exame de radiografia do íleo, pois, como mencionado anteriormente, ele relaxa o músculo liso intestinal (26).

Embora já tenha sido relatada a presença do GCGR nos pulmões de camundongos (16), pouco ou nada se conhece sobre os efeitos desse hormônio no tecido pulmonar. O que se encontra na literatura sobre esse assunto são alguns estudos sobre uma possível ação broncodilatadora do glucagon em pacientes asmáticos. Porém, esses estudos são poucos e controversos uma vez que alguns autores sugerem que o glucagon é capaz de relaxar a musculatura lisa das vias aéreas desses pacientes (27, 28), enquanto outros autores não observam efeito algum (29, 30).

1.2. Asma

A asma é uma doença inflamatória pulmonar crônica caracterizada por hiperreatividade, obstrução variável e remodelamento das vias aéreas (31). Essa doença se desenvolve a partir da combinação de fatores genéticos com a exposição a fatores ambientais, tais como alérgenos, infecções virais, exercício físico, poluição e uso de anti-inflamatórios não-esteroidais (32). Devido à existência dessa variedade de fatores, a manifestação clínica da asma é bem heterogênea (33), porém, episódios de falta de ar, tosse e sibilo, são considerados sintomas clássicos dessa doença (34).

A asma é uma das doenças inflamatórias crônicas mais comuns no mundo, que afeta mundialmente cerca de 300 milhões de pessoas de todas as idades e é responsável pela morte de 250 mil indivíduos por ano. A prevalência dessa doença é crescente tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento, e estima-se que em 2025 existirão aproximadamente 400 milhões de pessoas com asma em todo o mundo (35, 36). O Brasil ocupa a oitava posição mundial em prevalência de asma, com 15 milhões de pacientes asmáticos. Anualmente, ocorrem em média 350.000 internações por asma no nosso país, o que constitui a quarta causa de hospitalização pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (37, 38). Estima-se que os custos econômicos associados à asma sejam um dos mais elevados entre as doenças crônicas e que esses gastos continuem a aumentar apesar dos avanços na terapia da asma. As despesas com essa doença incluem tanto os custos diretos, que são os gastos com medicamentos e hospitalizações, quanto os custos indiretos

que são os dias perdidos de trabalho ou escola e a perda de lucros potenciais em virtude da morbidade e mortalidade dos pacientes asmáticos (39, 40).

A inflamação das vias aéreas exerce um papel fundamental na fisiopatologia da asma. O processo inflamatório que ocorre nessa doença é marcado por um aumento no número de mastócitos, eosinófilos e linfócitos T auxiliar 2 (Th₂) nas vias aéreas (41). Esse processo se inicia quando indivíduos geneticamente suscetíveis inalam pela primeira vez um alérgeno que penetra nas vias aéreas onde é fagocitado e processado por células apresentadoras de antígeno (APCs), incluindo a célula dendrítica (DC). As APCs migram até os linfonodos e apresentam o antígeno para os linfócitos T CD4⁺, o que culmina na diferenciação desses linfócitos para o perfil Th₂. As células Th₂ ativadas secretam uma grande variedade de citocinas, entre elas as interleucinas-4 e -13 (IL-4 e IL-13) que estimulam os linfócitos B a proliferarem e sintetizarem imunoglobulina E (IgE). A IgE é secretada e se fixa a receptores de alta afinidade para IgE (FceRI) expressos na membrana plasmática de mastócitos localizados nos tecidos e de basófilos presentes no sangue. Toda essa resposta desencadeada pela primeira exposição ao alérgeno caracteriza a fase de sensibilização da asma (42).

A re-exposição ao alérgeno dá origem à fase efetora da asma, na qual o alérgeno se liga a IgE acoplada aos FceRI na superfície dos mastócitos, e assim ativa essas células, o que resulta na liberação de mediadores inflamatórios como histamina, prostaglandinas, leucotrienos cisteínicos, proteases, citocinas, entre outros. Esses mediadores induzem secreção de muco; broncoconstrição; edema; recrutamento e ativação de células inflamatórias, incluindo, linfócitos Th₂, eosinófilos, neutrófilos, basófilos e macrófagos, e também estimulam a ativação de células estruturais dos pulmões, dentre elas, células epiteliais, fibroblastos e células musculares lisas.

Após o início dessa fase efetora, os eosinófilos passam a ser considerados células cruciais no desenvolvimento da resposta inflamatória na asma, e, além disso, a severidade da doença está associada com o acúmulo dessas células nos pulmões dos asmáticos (33, 43). Os eosinófilos liberam diversas substâncias como: a proteína básica principal (MBP), a proteína eosinofílica catiônica (ECP), a peroxidase eosinofílica (EPO), citocinas do perfil Th₂, fatores de crescimento, prostaglandinas, leucotrienos, espécies reativas de oxigênio (ROS), entre outras, que causam dano ao tecido pulmonar e estão envolvidas com o desencadeamento do fenômeno da hiper-reatividade das vias aéreas (40, 44).

Além dos eosinófilos, as células Th₂ possuem um papel central na fisiopatologia da asma, visto que secretam uma variedade de citocinas que desencadeiam efeitos tanto na fase de sensibilização quanto na fase efetora e dessa forma coordenam a resposta inflamatória asmática. Dentre esses efeitos, incluem-se estimulação da síntese de IgE, promoção da sobrevivência de mastócitos, eosinófilos e das próprias células Th₂, indução da maturação de eosinófilos e mastócitos e estimulação do recrutamento de basófilos (45).

Recentemente, foi sugerido que outro perfil de células T também esteja envolvido no processo inflamatório da asma. Esse outro perfil é constituído por linfócitos T auxiliar 17 (Th₁₇) que são células que secretam principalmente a interleucina-17 (IL-17) que promove o recrutamento de neutrófilos para as vias aéreas. Os níveis de IL-17 encontram-se aumentados nos pulmões dos pacientes com asma severa, o que permite associar a presença de Th₁₇, IL-17 e o aumento do número de neutrófilos nas vias aéreas à severidade da doença e à existência de asmáticos denominados esteróide-resistentes em virtude do tratamento com glicocorticoides não ser eficaz em controlar a inflamação pulmonar nesses indivíduos (45, 46).

No processo inflamatório da asma, além do envolvimento das células inflamatórias, as células residentes estruturais das vias aéreas, como células epiteliais, fibroblastos e células musculares lisas, tem importante participação, pois também secretam inúmeros mediadores pró-inflamatórios. Dessa forma, as ações das células inflamatórias, em conjunto com as das células residentes, perpetuam a inflamação crônica na asma (47).

A inflamação contínua das vias aéreas está associada ao fenômeno de hiper-reatividade das mesmas, que é uma das principais características da asma e que provoca os sintomas clássicos dessa doença (48). A hiper-reatividade é definida como sendo um estreitamento exagerado das vias aéreas em resposta a uma variedade de estímulos químicos, físicos ou farmacológicos, que provocariam apenas uma constricção limitada em indivíduos normais (49, 50). A célula muscular lisa das vias aéreas é apontada como sendo a principal responsável pela broncoconstricção e pelos episódios de hiper-reatividade nos indivíduos asmáticos (51). Além de ser um bom teste diagnóstico para a asma, a medição da capacidade de resposta das vias aéreas também permite acompanhar o controle dessa doença e a redução da função pulmonar dos asmáticos, visto que o grau de hiper-

reatividade é proporcional à severidade da asma (52, 53), e que a forma crônica de hiper-reatividade reflete o processo de remodelamento das vias aéreas (54).

O remodelamento das vias aéreas é desencadeado pela inflamação crônica e é caracterizado por mudanças estruturais em suas paredes, incluindo metaplasia e perda da integridade das células epiteliais brônquicas, hiperplasia das células *goblet*, fibrose subepitelial, angiogênese, hiperplasia e hipertrofia da musculatura lisa (41, 55). Dentre essas alterações, o aumento da massa do músculo liso das vias aéreas é considerado uma das características mais marcantes do remodelamento, sendo inclusive, correlacionado com a severidade da asma (49, 55).

Como descrito acima, a célula muscular lisa das vias aéreas tem ação importante nos eventos característicos da asma que são inflamação, obstrução, hiper-reatividade e remodelamento das vias aéreas. Nesse contexto, além de ser interessante considerá-la como um alvo terapêutico para a asma (50), é relevante que em primeiro lugar, se compreenda sua fisiologia.

1.3. Músculo liso das vias aéreas

O músculo liso está presente tanto nas vias aéreas centrais quanto nas periféricas, envolvendo-as circunferencialmente num padrão helicoidal (56). As vias aéreas centrais são constituídas pela traqueia, brônquios e bronquíolos maiores (57, 58), e apresentam diâmetro interno maior que 2 mm, suporte cartilaginoso e epitélio pseudoestratificado cilíndrico ciliado com células produtoras de muco. Elas exercem função condutora no sistema respiratório e não participam da troca gasosa. As vias aéreas periféricas são formadas pelos bronquíolos respiratórios, ductos alveolares e alvéolos, possuem diâmetro interno menor que 2 mm, epitélio que varia de cubóide a pavimentoso simples e parede composta por pouco a nenhum suporte cartilaginoso (59, 60). Nas vias aéreas periféricas, o músculo liso é encontrado nos bronquíolos respiratórios, onde é o constituinte principal da parede, e nos ductos alveolares (61). As vias aéreas periféricas compõem a porção respiratória do sistema respiratório, cuja principal função é realizar a troca gasosa nos pulmões (59, 60). A espessura da musculatura lisa das vias aéreas em relação ao diâmetro interno das mesmas aumenta em direção à periferia, porém a quantidade absoluta de músculo liso é maior nas vias aéreas centrais do que nas periféricas (56).

O papel do músculo liso das vias aéreas no organismo em condições normais ainda é desconhecido, porém algumas hipóteses sugerem que, através da sua

propriedade contrátil, ele é importante para manter o tônus das vias aéreas, controlar a distribuição do fluxo de ar nos pulmões, modular o grau de compressão das vias aéreas durante a tosse, o que ajuda a expelir possível material estranho, e mediar a respiração profunda (56, 61).

Tanto a contração como o relaxamento do músculo liso das vias aéreas são fenômenos que influenciam dois elementos importantes da mecânica respiratória denominados resistência pulmonar (RL) e complacência dinâmica pulmonar (Cdyn) (62, 63). A RL é definida como a oposição ao fluxo de ar no sistema respiratório, e é subdividida em resistência das vias aéreas (Raw) e resistência tecidual (Rti). A Raw representa 80% da RL e é caracterizada como sendo a dificuldade da passagem do ar nas vias aéreas. A Raw é expressa como a razão entre o gradiente de pressão necessário para levar o ar do ambiente até os alvéolos e o fluxo de ar. Alguns fatores como o comprimento das vias aéreas, a viscosidade do gás e o calibre dos diversos segmentos da árvore traqueobrônquica, podem influenciar a Raw (60, 64). Um exemplo disso é que quando o músculo liso das vias aéreas se contrai, ele reduz o diâmetro dessas vias, o que dificulta o fluxo do ar e dessa forma aumenta a Raw (62). A Rti é determinada pelas perdas energéticas geradas pela viscosidade referente à movimentação das moléculas que constituem o pulmão (60, 64).

A RL varia com o fluxo aéreo e com o volume pulmonar. No sistema respiratório, a velocidade do fluxo gasoso diminui conforme o ar se desloca das vias aéreas centrais para as periféricas, chegando a quase zero nos bronquíolos respiratórios. Conforme o fluxo aéreo fica mais lento, a pressão de condução do ar e a RL diminuem, e isso explica o fato das vias aéreas centrais contribuírem com a maior parcela da RL (59, 60).

A Cdyn é caracterizada como a capacidade de estiramento ou distensibilidade do pulmão a uma determinada pressão (65). Quando a Cdyn aumenta, o pulmão se distende com facilidade, porém, uma Cdyn reduzida indica que o pulmão tem dificuldade em se expandir (66). A Cdyn é influenciada principalmente pela elasticidade do tecido pulmonar, porém também pode ser regulada pela contração do músculo liso (63), pois já foi demonstrado um aumento da Cdyn em associação com o relaxamento da célula muscular lisa, e uma redução desse parâmetro da mecânica respiratória em paralelo com a contração desse músculo (67).

O músculo liso das vias aéreas pode ser contraído diretamente por substâncias que ativam receptores na superfície das células musculares lisas, como a acetilcolina (ACh) e outros agonistas colinérgicos, a histamina, os leucotrienos

cisteínicos, o tromboxano A_2 (TXA₂) e as prostaglandinas $F_{2\alpha}$ e D_2 (PGF₂ α e PGD₂, respectivamente), ou indiretamente por agentes químicos ou físicos que induzem outras células a liberarem essas substâncias constritoras, como é o caso do alérgeno (agente químico) e da perda de calor e/ou água pelas vias aéreas durante um exercício (agente físico), que estimulam a liberação de histamina pelos mastócitos (68, 69).

A ACh é o principal neurotransmissor excitatório parassimpático do sistema respiratório, onde exerce as funções de regular o tônus broncomotor e a secreção de muco. Além disso, recentemente, tem sido descrito que a ACh também participa da regulação da resposta inflamatória e do remodelamento das vias aéreas que ocorrem em doenças inflamatórias pulmonares (70).

A ACh é produzida através de uma reação entre a colina e a acetil-coenzima A catalisada pela enzima colina-acetiltransferase (CAT). Essa síntese é realizada por células neuronais e por diversos tipos celulares não neuronais, o que sugere que além de neurotransmissor, a ACh também possa exercer um papel de hormônio com ação autócrina e parácrina (71, 72). Nas vias aéreas, além das células neuronais, é sugerido que a ACh também pode ser gerada e liberada pelas células epiteliais, músculo liso, fibroblastos, mastócitos, macrófagos, dentre outras células, em virtude dessas células expressarem a enzima CAT (71, 73).

A ACh atua através da ativação de dois tipos de receptores presentes na membrana plasmática: os nicotínicos, que são canais iônicos operados por ligantes, e os muscarínicos, que são membros da família dos GPCRs. Tanto os receptores nicotínicos quanto os muscarínicos são expressos no SNC, no sistema nervoso periférico (SNP) e em tecidos não-inervados (74).

Os receptores nicotínicos são estruturas pentaméricas constituídas por cinco subunidades proteicas transmembranares que são classificadas em α , β , δ , gama (γ) e epsilon (ϵ) (75), na qual a subunidade α possui 10 membros (α_1 - α_{10}), a subunidade β , 4 membros (β_1 - β_4), e as subunidades δ , γ e ϵ possuem um membro cada. A maioria dos receptores nicotínicos são heteropentâmeros, pois contêm dois ou mais tipos de subunidades proteicas, porém, também são encontrados no organismo receptores homopentâmeros que são aqueles formados por uma subunidade proteica específica (76).

Os receptores nicotínicos nas vias aéreas além de estarem presentes nos nervos parassimpáticos, também são encontrados em células não-neuronais, incluindo, macrófagos, eosinófilos, linfócitos, mastócitos, células epiteliais e músculo

liso. Os efeitos desencadeados pelos receptores nicotínicos no músculo liso das vias aéreas ainda não são conhecidos, apesar de essa célula expressar o receptor nicotínico de subtipo α_7 que em outros tipos celulares do sistema respiratório que também o expressam parece ser capaz de desempenhar ação anti-inflamatória (71).

Os receptores muscarínicos são divididos em cinco subtipos (M_1 , M_2 , M_3 , M_4 e M_5), entre os quais os subtipos M_1 , M_3 e M_5 estão acoplados à proteína-G quiescente (G_q) e assim induzem a ativação da enzima PLC, enquanto os subtipos M_2 e M_4 estão acoplados à proteína G inibitória (G_i) cuja ativação promove a inibição da enzima AC (77).

Nas vias aéreas, existe a predominância dos subtipos de receptores muscarínicos M_1 , M_2 e M_3 , dentre os quais um ou mais são expressos nos nervos parassimpáticos, nas células estruturais, incluindo células epiteliais, músculo liso e fibroblastos, e nas células inflamatórias. Além dos efeitos já bem estabelecidos dos receptores muscarínicos nas vias aéreas, como a estimulação da secreção de muco pelas células mucosas através da ativação do subtipo M_3 e a contração do músculo liso mediada por esse mesmo subtipo, dados recentes sugerem que os receptores muscarínicos possam ter ações pró-inflamatórias nas células estruturais e inflamatórias. Dessa forma, através dos receptores muscarínicos, a ACh parece ser capaz de modular a inflamação e o remodelamento das vias aéreas que ocorrem nas doenças pulmonares obstrutivas, incluindo a asma e a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (70, 71).

O músculo liso das vias aéreas expressa os receptores muscarínicos M_2 e M_3 , porém não expressa o subtipo M_1 . Apesar dos receptores M_2 serem os predominantes na célula muscular lisa das vias aéreas, eles não contribuem de forma direta para a contração dessa célula, pois a ação desses receptores no músculo liso é o de inibir o efeito de agentes que induzem relaxamento proveniente da ativação da enzima AC (78).

Os receptores M_3 são os que medeiam diretamente à contração do músculo liso das vias aéreas induzida pela ACh e outros agonistas colinérgicos. A estimulação dos receptores M_3 pela ACh ativa a enzima PLC, que catalisa a hidrólise de um componente da membrana denominado fosfatidilinositol 4,5 bifosfato, o que leva à formação de inositol 1,4,5 trifosfato (IP3) e de diacilglicerol (DAG). O IP3 promove a mobilização de Ca^{+2} do retículo sarcoplasmático (RE), o que culmina no aumento dos níveis citoplasmáticos de Ca^{+2} , e o DAG ativa a PKC (72).

A contração é iniciada quando o Ca^{+2} se liga à proteína calmodulina e forma o complexo cálcio-calmodulina que ativa a enzima cinase de cadeia leve de miosina (MLCK). Em seguida, a MLCK fosforila a cadeia leve reguladora da miosina (MLC), o que permite o início dos ciclos de interação da miosina com a actina, que resultam na contração do músculo liso (62). A redução da reserva de Ca^{+2} no RE estimula a abertura de canais de Ca^{+2} operados por armazenamento (SOCs), localizados na membrana plasmática e que promovem a entrada de Ca^{+2} extracelular, e, dessa forma, a contração da célula muscular lisa é mantida (79). Quando o estímulo contrátil cessa, a enzima fosfatase de cadeia leve de miosina (MLCP) desfosforila a MLC, desfazendo a ligação da miosina com a actina e com isso, o músculo liso retorna ao seu estado basal (51). A PKC também desempenha papel importante no início e na modulação da contração do músculo liso das vias aéreas, pois quando ativada, a PKC estimula a saída de Ca^{+2} do RE, promove a entrada de Ca^{+2} extracelular na célula muscular lisa (72) e reduz a atividade da enzima MLCP (68).

A ação da ACh cessa quando ela é hidrolisada em ácido acético e colina pelas enzimas acetilcolinesterase (AChE) ou pela butirilcolinesterase (BuChE) também conhecida como pseudocolinesterase. Além de ser expressa nas células neuronais, já foi descrito que a AChE também está presente em células não-neuronais, incluindo nas células epiteliais das vias aéreas (71).

As substâncias que promovem o relaxamento do músculo liso das vias aéreas podem agir de duas formas: atuam sobre receptores presentes na célula muscular lisa, como é o caso dos agonistas β -adrenérgicos, ou estimulam as células epiteliais das vias aéreas a liberarem alguns mediadores químicos relaxantes do músculo liso respiratório, tais como óxido nítrico (NO), prostaglandina E_2 (PGE_2), prostaciclina (PGI_2) (80, 81) e monóxido de carbono (CO) (81, 82).

Os agonistas β -adrenérgicos, a PGE_2 e a PGI_2 exercem seu efeito relaxante na musculatura lisa das vias aéreas através do mesmo mecanismo de sinalização celular que se caracteriza pelo aumento dos níveis intracelulares de AMPc (83). Por outro lado, a elevação dos níveis intracelulares de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) é a via de sinalização celular envolvida no relaxamento do músculo liso das vias aéreas ocasionado tanto pelo NO quanto pelo CO (82). Três subtipos de receptores β adrenérgicos (β_1 , β_2 e β_3) já foram identificados, e todos eles pertencem à família dos GPCRs e estão acoplados a proteína proteína-G estimulatória (Gs), dessa forma, a ativação deles culmina no aumento dos níveis intracelulares de AMPc. O subtipo de receptor β que é predominantemente expresso nas células

musculares lisas das vias aéreas é o β_2 (84), ao passo que ainda não foi detectado nenhum nível de RNA mensageiro (mRNA) do receptor β_3 nesse tipo celular (85, 86). Apesar de ter sido descrita a presença do receptor β_1 no músculo liso das vias aéreas, apenas ao subtipo β_2 são atribuídas às funções de regulação do tônus muscular e de relaxamento desse tecido das vias aéreas (85, 87). É por esse motivo, que os agonistas β_2 constituem, junto com os glicocorticóides, a terapia padrão para a asma (83).

As prostaglandinas são ácidos graxos insaturados que contém na sua estrutura 20 átomos de carbonos. Elas são sintetizadas a partir do ácido araquidônico (AA) formado pela hidrólise, catalisada pela enzima fosfolipase A2, dos fosfolípidios presentes nas membranas celulares (88). Após ser liberado das membranas celulares, o AA é convertido em prostaglandina G_2 (PGG_2) pela atividade oxigenase da enzima ciclooxigenase (COX), e em seguida, através da sua atividade peroxidase, essa mesma enzima, forma prostaglandina H_2 (PGH_2) a partir de PGG_2 (89). A enzima COX existe em três isoformas. A COX-1, que é expressa constitutivamente na maioria das células, é a principal fonte de prostanóides quando o organismo é encontrado em homeostasia. A COX-2, cuja expressão é induzida por diversos estímulos, incluindo, mediadores inflamatórios, hormônios e fatores de crescimento, e é a via mais importante de produção de prostanóides em doenças inflamatórias e proliferativas. Apesar dessas diferenças, tanto a COX-1 quanto a COX-2 produzem PGH_2 e contribuem para a síntese dos prostanóides no período de homeostasia corporal e durante uma resposta inflamatória. A terceira isoforma, denominada COX-3, foi a última a ser descoberta, é derivada do gene da COX-1 que sofre *splicing* alternativo e por isso é considerada uma variante da COX-1. Nos seres humanos, a COX-3 é altamente expressa no córtex cerebral, e também é encontrada presente no coração e no músculo esquelético. Apesar disso, a sua função biológica ainda não foi determinada (90, 91). O que se sabe é que a COX-3 tem uma atividade enzimática reduzida, é menos potente, produz menos prostaglandinas e é mais sensível ao acetaminofeno do que as COX-1 e COX-2 (92).

A PGH_2 é um substrato em comum para diversas enzimas sintases, porém, os produtos originados são diferentes, como é o caso da PGE_2 que é formada pela enzima PGE_2 sintase e da PGI_2 que é produzida pela enzima PGI_2 sintase, ambas a partir da PGH_2 . A PGE_2 exerce suas ações fisiológicas através da ativação da família dos receptores para PGE_2 (EP) que é dividida em quatro subtipos (EP_1 , EP_2 ,

EP₃ e EP₄), sendo todos eles GPCRs. O subtipo EP₁ está acoplado à proteína Gq, portanto sua ativação culmina no aumento dos níveis intracelulares de Ca⁺². Já a estimulação dos subtipos EP₂ e EP₄ resulta na elevação dos níveis intracelulares de AMPc, pois esses receptores estão acoplados a proteína Gs. O subtipo EP₃ pode ser encontrado associado à proteína Gi e com isso ocorre a inibição da formação de AMPc, ou então ele está acoplado a proteína G₁₂ (90), o que desencadeia a ativação da proteína RhoA que em seguida estimula a cinase associada à Rho (ROCK) que é responsável pela inativação da MLCP (93). O músculo liso das vias aéreas dos seres humanos expressa os receptores EP₂, EP₃ e EP₄, sendo descrito um efeito relaxante da PGE₂ nesse músculo através da ativação dos subtipos EP₂ e EP₄ e uma ação contrátil da PGE₂ mediada pela estimulação do subtipo EP₃ (88, 94). Apesar de não ter sido observada a presença do subtipo EP₁ na célula muscular lisa das vias aéreas de humanos, a expressão desse receptor nesse mesmo tipo celular já foi detectada em outras espécies, onde foi demonstrado que esse receptor estimula contração (83). Outra prostaglandina que também é capaz de relaxar o músculo liso das vias aéreas é a PGI₂ (95). Ela exerce suas ações no organismo através da ligação a um receptor específico conhecido como IP, que é membro da família dos GPCRs e está acoplado à proteína-Gs (83, 90).

O NO é produzido a partir da L-arginina pelas três isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS): NOS-1, NOS-2 e NOS-3. As isoformas NOS-1 e NOS-3 são expressas constitutivamente, necessitam de Ca⁺² para serem ativadas e produzem NO em concentrações picomolares, enquanto a NOS-2 é induzida em resposta a mediadores inflamatórios, não depende do Ca⁺² para ser ativada e gera NO em níveis nanomolares (89, 96). Nas vias aéreas, a NOS-1 está presente nos neurônios não-adrenérgicos não-colinérgicos, a NOS-2 é expressa principalmente nos macrófagos e nas células epiteliais, e a NOS-3 é encontrada no epitélio e endotélio (97). O NO promove o relaxamento do músculo liso através da ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), presente no citosol dessa célula, que converte GTP em GMPc (98).

A produção de CO endógeno ocorre predominantemente através da degradação do grupamento heme pela enzima heme oxigenase (HO). Na literatura, são descritas três isoformas de HO (HO-1, HO-2 e HO-3), sendo que a HO-3 é encontrada somente no tecido cerebral de ratos (99). As isoformas HO-2 e HO-3 são expressas constitutivamente, enquanto a isoforma HO-1 é considerada a forma induzida da HO, pois ela é encontrada em níveis basais baixos na maioria dos

tecidos e sua expressão é aumentada pela exposição ao seu substrato (grupamento heme), a ROS (como por exemplo, peróxido de hidrogênio) ou a agentes que estimulam o estresse oxidativo (que é o caso do lipopolissacarídeo presente na membrana externa da parede celular de bactérias gram negativas) (100). Nas vias aéreas, as isoformas HO-1 e HO-2 estão presentes nas células epiteliais, no músculo liso, no endotélio, nos gânglios parassimpáticos e nos macrófagos (101, 102). O mecanismo pelo qual o CO relaxa a musculatura lisa das vias aéreas é semelhante ao mecanismo do NO, ou seja, o CO também ativa a enzima GCs presente no citosol da célula muscular lisa, o que culmina na elevação da concentração intracelular de GMPc (82).

O AMPc, assim como o GMPc, relaxa o músculo liso das vias aéreas por meio de dois mecanismos: redução dos níveis intracelulares de Ca^{+2} e dessensibilização das proteínas contráteis ao Ca^{+2} (103). Para produzir esses efeitos, o AMPc ativa a proteína cinase A (PKA), enquanto que o GMPc ativa a proteína cinase G (PKG). Ambas as proteínas cinases quando estimuladas induzem a recaptação de Ca^{+2} pelo RE, fosforilam a MLCK, os canais para potássio de alta condutância ativados por Ca^{+2} (BK_{Ca}) e os receptores acoplados à proteína Gq (83, 98, 104, 105). A fosforilação dessas proteínas resulta, respectivamente, na diminuição da afinidade da MLCK pela calmodulina, na ativação dos BK_{Ca} e na inibição da sinalização pelos GPCRs associados à proteína Gq, em especial da PLC. Os BK_{Ca} ativados hiperpolarizam a célula muscular lisa, o que induz o fechamento dos canais de Ca^{+2} tanto da membrana plasmática quanto do RE (68, 83).

Recentemente tem sido descrito que a ação relaxante do AMPc também pode ser mediada pelo seu outro efetor denominado proteínas de troca diretamente ativadas pelo AMPc (Epac), cuja ativação pode ser realizada pela PKA ou diretamente pelo AMPc. Ainda não foram claramente identificados os mecanismos envolvidos na ação relaxante promovida pelas Epac no músculo liso das vias aéreas, mas é sugerido que essas proteínas são capazes de inibirem a fosforilação da MLC e de reduzirem a atividade da proteína RhoA (83). Considerando que a ativação do GCGR, cuja expressão já foi descrita em pulmões de camundongos, induz elevação dos níveis intracelulares de AMPc, delineamos o presente estudo visando compreender as ações do glucagon nas vias aéreas, especialmente sobre a célula muscular lisa.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do glucagon sobre a contração da musculatura lisa das vias aéreas de camundongos A/J.

2.2. Objetivos Específicos

- i. Avaliar o efeito do glucagon sobre a contração da musculatura lisa das vias aéreas induzida por estímulo colinérgico *in vitro*;
- ii. Avaliar o efeito do glucagon sobre a contração da musculatura lisa das vias aéreas induzida por estímulo colinérgico *in vivo*;
- iii. Determinar os possíveis mecanismos moleculares associados ao efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração da musculatura lisa das vias aéreas induzida por estímulo colinérgico *in vitro* e *in vivo*;
- iv. Avaliar o efeito do glucagon sobre a hiper-reatividade das vias aéreas induzida por estímulo colinérgico *in vivo* em modelo murino de asma aguda.

3. Material e Métodos

3.1. Animais

Os animais utilizados neste trabalho foram obtidos do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratório (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz (Licença LW – 23/11). Foram utilizados camundongos A/J, de ambos os sexos, pesando entre 18 e 25 g. Todos os animais foram mantidos em sala com temperatura controlada entre 23 a 25° C e acesso livre à ração e água.

3.2. Avaliação da contratilidade da musculatura lisa das vias aéreas *in vitro*

3.2.1. Sistema de banho de órgão isolado

Os animais machos ou fêmeas foram submetidos a eutanásia numa câmara saturada de dióxido de carbono (CO₂) e, imediatamente após, o tórax foi aberto, a traqueia e os brônquios foram retirados e separados da gordura aderente e do tecido conjuntivo em torno deles. Em seguida, duas hastes metálicas de sustentação foram introduzidas na luz dos órgãos, e esse conjunto foi então transferido para um sistema de banho de órgão isolado formado por cubas de vidro contendo 10 mL de solução de Krebs (que nutriu os órgãos para que suas funções permanecessem viáveis), mantida a 37° C e borbulhada com 95% de gás oxigênio (O₂) e 5% de CO₂. Uma das hastes fixou o brônquio ou a traqueia na base da cuba e a outra os conectou a um transdutor isométrico (*UGO BASILE, COMERIO, ITÁLIA*) acoplado a um Programa de Aquisição de Dados de Órgão Isolado (*LETICA, SOFTWARE PROTO 5, VERSÃO 7.33, BARCELONA, ESPANHA*), para registro de contrações isométricas. Os órgãos foram submetidos a uma tensão basal de 1 g e calibrados para que os mesmos apresentassem a mesma tensão de contração inicial.

A preparação permaneceu em repouso por cerca de 30 a 60 min para a estabilização da linha de base. Após esse período de estabilização, foi medida a contração em resposta ao carbacol (2,5 µM) para se verificar a viabilidade dos órgãos. Quando as contrações atingiram um platô, cada preparação foi lavada

repetidas vezes até o relaxamento total da musculatura lisa e, as avaliações subsequentes puderam ser iniciadas.

3.2.2. Avaliação do efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração da musculatura lisa de brônquio e traqueia *in vitro*

Após ter sido realizada a medida da contração de brônquio e traqueia em resposta ao carbacol 2,5 μM , esses órgãos foram tratados com glucagon (0,1 μM ou 1 μM) ou salina estéril, durante 30 min, *in vitro*. Em seguida e ainda em presença do glucagon, os mesmos foram expostos a concentrações crescentes de carbacol (0,01 – 100 μM) e as respostas contráteis a cada uma dessas concentrações foram registradas (Figura 3.1) e expressas como porcentagem da contração induzida pelo carbacol 2,5 μM . Além disso, nesse experimento os valores de E_{max} e pEC_{50} do carbacol foram calculados.

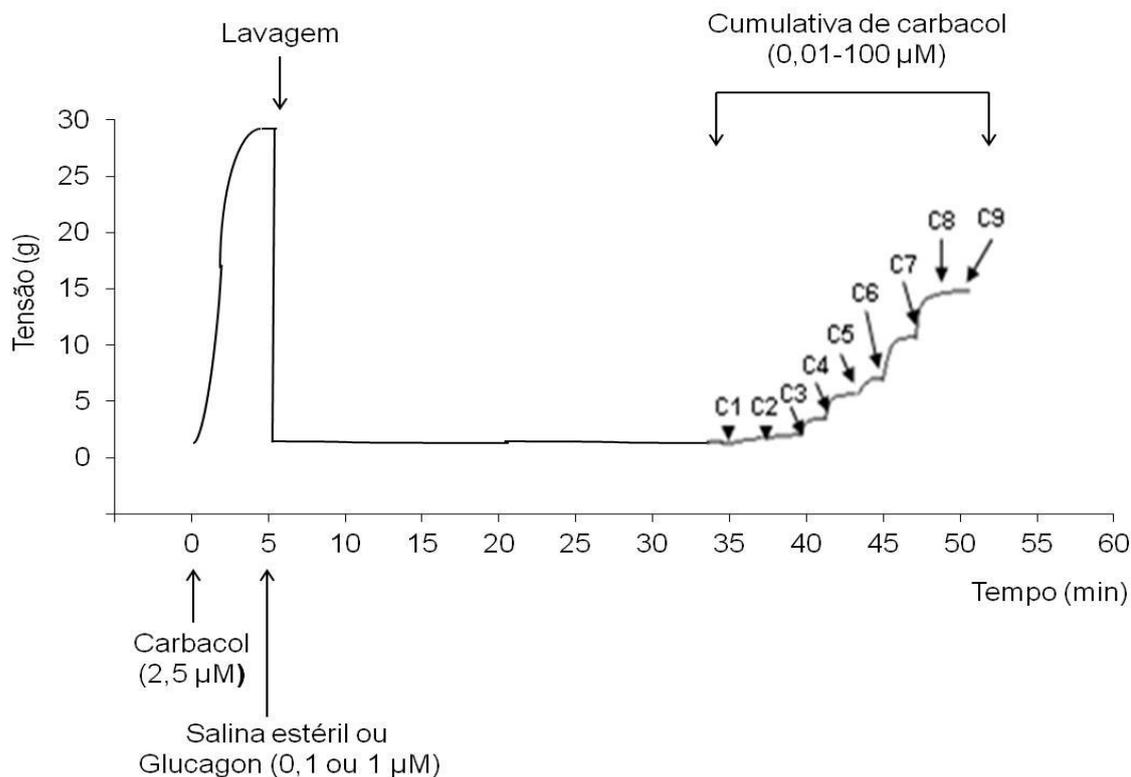


FIGURA 3.1: Registro dos efeitos contráteis isométricos de brônquio e traqueia induzidos por concentrações crescentes de carbacol (C1 - C9) *in vitro*. Os órgãos foram isolados de camundongos A/J, inseridos num sistema de banho de órgão isolado onde foram pré-tratados com glucagon (0,1 ou 1,0 μM) ou salina estéril 30 min antes da adição da cumulativa de carbacol *in vitro*.

3.2.3. Avaliação da participação do epitélio no efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração da musculatura lisa de traqueia *in vitro*

Para essa análise, antes de terem sido transferidas para o sistema de banho de órgão isolado, algumas preparações tiveram seus epitélios removidos mecanicamente através da fricção da superfície interna traqueal com uma pinça fina de prata, como descrito por Wu e colaboradores em 2004 (106), enquanto as restantes permaneceram com seu epitélio intacto. Em seguida, todas as preparações foram inseridas no sistema de banho de órgão isolado conforme descrito anteriormente, e os mesmos procedimentos realizados no item 3.2.2 foram realizados.

3.2.4. Estudo dos mecanismos moleculares associados ao efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração da musculatura lisa de traqueia *in vitro*

Para investigar os possíveis mecanismos de ação envolvidos na ação anti-espasmódica do glucagon, preparações de traqueia foram incubadas durante 30 min com: des-His¹-[Glu⁹] glucagon amida (1 µM), um antagonista do GCGR; N^o-nitro-L-arginina metil Ester (L-NAME, 100 µM), um inibidor da enzima NOS; indometacina (10 µM), um inibidor da enzima COX; zinco-protoporfirina IX (ZnPP IX, 10 µM), um inibidor da enzima HO; propranolol (1 µM), um antagonista não-seletivo dos receptores β-adrenérgicos, ou dimetilsulfóxido (DMSO, 0,1%), veículo da ZnPP IX e indometacina. Em seguida, os mesmos procedimentos realizados no item 3.2.2 foram realizados.

3.3. Avaliação da função pulmonar

3.3.1. Avaliação não invasiva do efeito do glucagon sobre a contração da musculatura lisa das vias aéreas *in vivo*

Camundongos A/J machos foram tratados com salina estéril (0,9%, i.n.) ou glucagon (1 µg/Kg, i.n.), e 1, 3 e 6 h após o tratamento foram inseridos individualmente, sob condição de não-anestesia e não-imobilização, em câmaras pletismográficas pertencentes a um sistema não invasivo de pletismografia

barométrica de corpo inteiro (*Buxco Electronics, Sharon, CT*). Nesse sistema, as diferenças de pressão entre a câmara contendo o animal e uma câmara de referência foram medidas e denominadas sinal de pressão da caixa. Esse sinal foi gerado pelas mudanças de volume e de pressões da câmara contendo o camundongo durante cada ciclo respiratório do mesmo.

Nesse pletismógrafo não-invasivo, os camundongos foram expostos a aerolização de concentrações crescentes de metacolina (6,25; 12,5; 25 e 50 mg/mL), cada uma durante 2 min e a broncoconstrição em resposta a essas concentrações foi determinada pela medida de um parâmetro adimensional denominado pausa aumentada (*Penh*) realizada por 5 min após a aerolização de cada uma dessas concentrações de metacolina. O *Penh* foi definido como sendo as alterações no formato da onda do sinal de pressão da caixa nos picos de pressão expiratória (PEP) e inspiratória (PIP) combinadas com o tempo de comparação da expiração recente com a tardia (Pausa). Os valores de *Penh* foram calculados pela fórmula: $Penh = Pausa \times (PEP / PIP)$ (107). Os valores basais do *Penh* foram obtidos pela exposição durante 2 min a aerossóis de solução salina tamponada com fosfato (PBS).

3.3.2. Avaliação invasiva do efeito do glucagon sobre a contração da musculatura lisa das vias aéreas *in vivo*

Os camundongos A/J machos foram tratados com salina estéril (0,9%, i.n.) ou glucagon (0,1; 1 ou 10 µg/Kg, i.n.) e 3 h após o tratamento, foram anestesiados com pentobarbital sódico (60 mg/Kg, i.p.) e tiveram sua atividade neuromuscular bloqueada através da administração i.p. de brometo de pancurônio (Pavulon®, 1 mg/Kg). Em seguida, foi realizada uma traqueostomia para a introdução de uma cânula e a partir daí os animais puderam ser inseridos num sistema de pletismografia barométrica de corpo inteiro invasivo (Sistema *Buxco, UK*) que permitiu a avaliação da função pulmonar através da análise dos parâmetros de RL (cmH₂O / mL / s) e C_{dyn} (mL / cmH₂O).

No sistema de pletismografia barométrica de corpo inteiro invasivo, os camundongos foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma cama aquecida, para que a temperatura corporal fosse mantida, e foram submetidos à ventilação mecânica. Para a coleta de dados do fluxo respiratório, a cânula introduzida na traqueia foi conectada a um pneumotacógrafo acoplado à câmara do pletismógrafo.

Além disso, um cateter preenchido com água foi inserido por via oral para possibilitar a medida da pressão esofágica. Após a estabilização no sistema, os animais foram submetidos sequencialmente a aerossóis de PBS e de concentrações crescentes de metacolina (3; 9 e 27 mg/mL), de forma que o PBS e cada uma dessas concentrações de metacolina foram aerolizados durante 30 seg e agiram durante 5 min.

Os dados de pressão esofágica e pressão resultante do fluxo de ar foram coletados e, através de um transdutor ligado a câmara do plestimógrafo, foram transferidos para o *software BioSystem XA* que processou esses dados e forneceu os parâmetros de RL e Cdyn por ciclo respiratório. Em alguns experimentos, os camundongos foram pré-tratados com L-NAME (20 mg/Kg, i.p.), indometacina (10 mg/kg, i.p.) ou DMSO (0,33%, i.p., veículo da indometacina) 30 min antes do tratamento com salina estéril (0,9%, i.n.) ou glucagon (1 µg/Kg, i.n.).

3.4. Quantificação de glicose sanguínea

Camundongos A/J machos foram tratados com glucagon (0,1; 1 ou 10 µg/Kg) ou salina estéril (0,9%) por via i.p. ou i.n. durante 14 dias, uma vez ao dia. Vinte e quatro horas após o 7^o e 14^o dia de tratamento, os animais foram mantidos em jejum durante 6 h e após esse período, o sangue foi coletado da veia caudal e a partir dele foi realizada a quantificação dos níveis de glicose através da utilização de um aparelho medidor de glicose (*Johnson & Johnson*).

3.5. Avaliação da expressão do GCGR em pulmão e em traqueia com epitélio intacto ou desepitelizada

3.5.1. Obtenção e processamento dos tecidos

Camundongos A/J machos foram submetidos a eutanásia através da administração i.p. do barbitúrico tiopental em dosagem letal (50 mg/mL). Logo após, a cavidade peritoneal foi aberta e a artéria aorta abdominal foi cortada para a liberação do sangue retido. O sangue presente no pulmão e na traqueia foi removido através da técnica de perfusão, na qual, o coração foi exposto e no ventrículo direito foi inserido um escalpe por onde foi introduzida à solução de perfusão constituída por salina não estéril (0,9%) e ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA; 20 mM). O

pulmão e a traqueia foram retirados dos animais e inseridos em tubos *ependorf* de 2 mL que em seguida foram submetidos ao congelamento em nitrogênio líquido e armazenados a temperatura de -80°C até o uso. Em alguns experimentos, antes de ser congelada a traqueia teve seu epitélio removido através do procedimento já descrito no item 3.2.3.

Para o processamento dos tecidos, os mesmos foram retirados da temperatura de -80°C e homogeneizados em gelo da seguinte forma: foram adicionados 500 μL de um tampão de lise gelado constituído por um coquetel de inibidores de proteases (*Complete*) e 0,1% de Triton X-100 em PBS 1X em cada tubo *ependorf* contendo um pulmão. Além disso, 6 traqueias com o epitélio intacto ou 6 traqueias desepitelizadas foram colocadas num mesmo tubo *ependorf* e a esse tubo foram adicionados 300 μL desse mesmo tampão de lise gelado. Os macerados foram centrifugados a $13.000 \times g$ durante 10 min a 4°C e os sobrenadantes foram recolhidos em tubos *ependorf* de 1,5 mL, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a temperatura de -80°C até serem utilizados.

3.5.3. Quantificação de proteínas totais

Utilizando o sobrenadante obtido como descrito no item acima, a quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método de BCA (*Sigma-Aldrich Corp., St Louis, EUA*). Esse método colorimétrico foi descrito por Smith e colaboradores em 1985 e se baseia na capacidade das proteínas de reduzirem o íon cobre (II) (Cu^{+2}) a íon cobre (I) (Cu^{+1}) em meio alcalino, e desse Cu^{+1} interagir com o ácido bicínico (BCA) formando um complexo de coloração púrpura. Esse complexo é estável, solúvel em água, possui absorvância máxima a 562 nm e a intensidade da sua cor aumenta de forma diretamente proporcional à concentração de proteínas (108).

Numa placa de 96 poços transparente de fundo chato foram pipetados em duplicata 20 μL de água destilada e 5 μL de amostra ou de padrão. O padrão foi constituído de 4 diluições de albumina de soro bovino (BSA, 0,25; 0,5; 1 e 2 mg/mL) e do branco (somente água destilada). Em seguida, foram adicionados em cada poço 200 μL de uma solução denominada reagente C que foi formada pela mistura de dois reagentes: a solução do BCA (*kit Sigma Aldrich*) com a solução de sulfato de Cobre (II) (4%), na proporção de 50:1, respectivamente. A placa foi acondicionada em uma estufa a 60°C durante 15 min, e após esse tempo, foi lida numa leitora de

placas (*SpectraMax M5* – Molecular Devices) no comprimento de onda de 562 nm. A concentração de proteínas presentes no sobrenadante foi determinada por comparação com a curva padrão da BSA.

3.5.4. Western blot

Após a quantificação de proteínas totais dos sobrenadantes (descrita no item acima), 50 µg de proteínas totais de cada amostra foram adicionados a um tampão de amostra dodecil sulfato de sódio de poliacrilamida (*SDS-PAGE*) e esse conjunto foi aquecido a 95° C por 5 min. Em seguida, essas amostras contendo o tampão *SDS-PAGE* foram aplicadas em géis de poliacrilamida 10% situados num sistema de corrida eletroforética (*Bio- Rad Laboratories Inc.*, China) preenchido com o tampão corrida, e a eletroforese das proteínas foi realizada através da ação de um campo elétrico de 70 V no decorrer de 90 min. Após serem separadas pela corrida eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (*GE Healthcare, Little Chalfont, UK*) por meio de um sistema de transferência semi-úmida (*Bio- Rad Laboratories Inc.*, China) no qual foram colocados, na parte inferior do aparelho, 3 papéis de filtro finos (*Bio- Rad Laboratories Inc.*, China) embebidos num tampão de transferência 1X. Sobre esses papéis foi inserida a membrana de nitrocelulose também umedecida com o mesmo tampão de transferência, e em cima desta membrana foi depositado o gel com 2 papéis de filtro sobrepostos a ele, sendo que esses 3 últimos componentes também tinham sido umidificados com o tampão de transferência. Após essa montagem, o sistema de transferência foi submetido a uma corrente elétrica de 70 A por membrana e uma tensão constante de 25 V durante 75 min.

Os sítios não específicos das proteínas foram bloqueados com uma solução de leite sem gordura (5%) em tampão tris salina-*Tween-20* (TBST) por 1 h a temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBST a temperatura ambiente, sendo a primeira lavagem no tempo de 10 min e as outras duas por 5 min cada, e foram incubadas com os anticorpos primários policlonal de coelho para o GCGR ou monoclonal de camundongo para a β -actina (1:500 e 1:1000, respectivamente, em TBST; Santa Cruz *Biotechnology*, CA, EUA) *overnight* a 4° C sob agitação suave. No dia seguinte, foi realizado o mesmo procedimento de lavagem das membranas com TBST já descrito acima e os anticorpos secundários anti-coelho ou anti-camundongo conjugados à enzima

peroxidase (1:10.000 em TBST; *R&D Systems, MN, EUA*) foram incubados por 1 h a temperatura ambiente e sob movimentação suave.

Após esse período de incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBST durante 10 min cada lavagem e a expressão das proteínas foi detectada em uma câmara escura onde as membranas foram tratadas com um reagente de quimioluminescência (*SuperSignal West Dura, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, EUA*), e em sequência expostas a um filme fotossensível (*Kodak, Perkin Elmer Life Sciences, EUA*) que capturou a luz emitida pela reação de quimioluminescência. Por fim, os filmes foram escaneados (*HP Officejet Pro 8500 A910, EUA*) e a expressão do GCGR foi analisada em conjunto com a expressão da proteína constitutiva β -actina.

3.6. Avaliação do efeito do tratamento com glucagon sobre a hiper-reatividade das vias aéreas

3.6.1. Procedimentos de sensibilização e desafio antigênico

Camundongos A/J machos foram sensibilizados com uma injeção s.c. de 50 μ g de ovoalbumina (OVA) combinados com 5 mg de hidróxido de alumínio $Al(OH)_3$. Após 14 dias, foi realizado um reforço na sensibilização seguindo o mesmo procedimento. No 19º dia após a sensibilização, os animais foram submetidos ao desafio i.n. com OVA (1 μ g/ μ L) durante 2 dias consecutivos, uma vez ao dia, e as análises foram realizadas 24 h após o último desafio com OVA, no 21º dia.

3.6.2. Tratamento com glucagon

Nos animais submetidos aos procedimentos de sensibilização e desafio antigênico (item 3.6.1) foram utilizados os protocolos de tratamento preventivo, no qual os camundongos receberam glucagon (1 μ g/Kg, i.n.) ou salina estéril (0,9%, i.n.) 1 h antes de cada desafio com OVA, ou de tratamento controlador, em que a administração de glucagon (1 μ g/Kg, i.n.) ou salina estéril (0,9%, i.n.) foi realizada 1 ou 6 h após cada desafio antigênico com OVA.

3.6.3. Avaliação invasiva da hiper-reatividade das vias aéreas à metacolina

Vinte e quatro horas após o último desafio antigênico com OVA, o anestésico pentobarbital sódico (60 mg/Kg i.p.) e o bloqueador neuromuscular brometo de pancurônio (Pavulon®, 1 mg/Kg, i.p.) foram administrados nos camundongos e em seguida, a traqueia desses animais foi exposta e nela foi introduzida uma cânula. Os camundongos com a cânula traqueal foram inseridos no sistema de pletismografia barométrica de corpo inteiro invasivo (Sistema *Buxco, UK*) e os procedimentos nesse pletismógrafo foram efetuados da mesma forma que foi descrita no item 3.3.2.

3.7. Soluções

3.7.1. Solução final de Krebs

A solução final de Krebs é composta por NaCl (118 mM); KCl (4,8 mM); CaCl₂ (2,5 mM); MgSO₄ (1,2 mM); KH₂PO₄ (1,2 mM); NaHCO₃ (24 mM) e glicose (11mM) dissolvidos em água destilada.

3.7.2. Solução de EDTA 100 mM

Para o preparo de 200 mL de solução de EDTA 100 mM, foram pesados em balança de precisão 0,07 g de EDTA e em seguida foram adicionados 180 mL de água destilada. A solubilização do EDTA na água destilada foi realizada em temperatura em torno de 50° C.

Uma vez confirmada a dissolução do EDTA, foi esperado que a temperatura da solução retornasse ao valor de temperatura ambiente. A partir disso, o pH foi aferido em um pHmetro digital (*Orion 3 Star, Thermo Scientific, Singapore*) e ajustado com ácido clorídrico (HCl) até o valor de 7,0. Por fim, a água destilada foi adicionada em q.s.p. 200 mL de solução que foi então armazenada em recipiente apropriado e permaneceu na geladeira (temperatura de aproximadamente 4° C) até ser utilizada.

3.7.3. Solução salina não estéril (0,9%)

Seis litros de solução de salina não estéril (NaCl 0,9%) foram preparados pesando-se, em balança de precisão, 54 g de NaCl e em seguida adicionando-se água destilada em q.s.p. 6 L de solução, que foi então armazenada em recipiente apropriado e mantida em temperatura ambiente até sua utilização.

3.7.4. Solução de perfusão (salina não estéril 0,9% + EDTA 20 mM)

Em uma proveta de 500 mL, foram adicionados 100 mL da solução de EDTA 100 mM (descrita no item 3.7.2.) e 400 mL de salina não estéril (0,9%) (descrita no item acima) o que gerou uma solução de perfusão com EDTA 20 mM que foi utilizada imediatamente após o seu preparo.

3.7.5. PBS 1X

Para a obtenção de uma solução PBS 1X, primeiro foi preparada uma solução estoque através da pesagem em balança de precisão de: 0,51 g de fosfato de sódio monobásico monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 11,86 g de fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4) e 17,53 g de NaCl. Depois, foram adicionados 180 mL de água destilada, o pH foi aferido em pHmetro digital (*Orion 3 Star, Thermo Scientific Singapore*) e ajustado com hidróxido de sódio (NaOH) até o valor de 7,4. Por fim, a água destilada foi adicionada em q.s.p. 200 mL de tampão, foram feitas alíquotas de 5 mL que foram mantidas no freezer (temperatura aproximadamente -20°C) até serem utilizadas.

50 mL de PBS 1X foram preparados adicionando-se 5 mL dessa solução estoque e 45 mL de água destilada, em uma proveta de 50 mL. O tampão PBS 1X foi utilizado imediatamente após o seu preparo.

3.7.6. Tampão de lise

50 mL de tampão de lise foram produzidos através da adição de 0,05 mL de Triton X-100 em 49,95 mL de PBS 1X (descrito no item acima), o que fez com que a concentração final de Triton X-100 ficasse 0,1%. Em seguida, uma pastilha de *Complete*, que é um coquetel de inibidores de proteases, foi adicionada à solução de

PBS 1X e Triton X-100 0,1%, o que gerou o tampão de lise. O tampão de lise foi mantido no gelo durante sua utilização que ocorreu imediatamente após a sua preparação.

3.7.7. Tampão de amostra SDS-PAGE

Para o preparo de 8 mL de tampão de amostra *SDS-PAGE*, primeiro foram feitas separadamente as soluções de SDS 10%, azul de bromofenol 0,5% e glicerina 10%. Para isso, foram pesados individualmente em balança de precisão 0,5 g de SDS e 0,025 g de azul de bromofenol, e em cada um desses reagentes foi adicionada água bidestilada em q.s.p. 5 mL de solução. Além disso, num tubo de hemólise foram adicionados 0,2 mL de glicerina e 1,8 mL de água bidestilada. Por fim, foram misturados 0,4 mL de água bidestilada; 1,6 mL da solução de Tris HCl 0,5M pH 6,8 (que será descrita no item 3.7.9.); 3,2 mL da solução de SDS 10%; 0,8 mL de β -mercaptoetanol; 0,4 mL da solução de azul de bromofenol 0,5% e 1,6 mL da solução de glicerina 10%. Dessa forma, as concentrações finais de cada reagente no tampão amostra foram: 0,1 M de Tris HCl pH 6,8; SDS 4%; β -mercaptoetanol 0,2%; azul de bromofenol 0,2% e glicerina 2%. O tampão amostra foi armazenado em recipiente apropriado e permaneceu no freezer (temperatura de aproximadamente -20° C) até sua utilização.

3.7.8. Soluções de Tris HCl 1,5 M pH 8,8 e de Tris HCl 0,5 M pH 6,8

500 mL de cada uma dessas soluções foram preparados pesando-se, em balança de precisão, 90,85 e 30,85 g de Tris (para as soluções de Tris HCl 1,5 M pH 8,8 e 0,5 M pH 6,8, respectivamente) e adicionando-se 450 mL de água bidestilada em cada. O pH foi aferido em um pHmetro digital (*Orion 3 Star, Thermo Scientific, Singapore*) e ajustado com HCl até o valor de 8,8 para a solução de Tris HCl 1,5 M pH 8,8 e até o valor de 6,8 para a solução de Tris HCl 0,5 M pH 6,8. Em seguida, a cada solução foi adicionada água bidestilada em q.s.p. 500mL. Essas soluções foram então armazenadas em recipientes apropriados e mantidas na geladeira (temperatura de aproximadamente 4°C) até serem utilizadas.

3.7.9. Solução de PSA 10%

Uma solução contendo persulfato de amônio (PSA) na concentração final de 10% foi preparada através da pesagem, em balança de precisão, de 0,05 g de PSA e adição de 0,5 mL de água bidestilada, imediatamente antes da sua utilização.

3.7.10. Géis de poliacrilamida

a) Gel de corrida de poliacrilamida 10%

4 géis de corrida de poliacrilamida 10% foram preparados adicionando-se em um tubo de plástico de 50 mL: 7 mL de bis-acrilamida 30%, 7 mL da solução Tris HCl 1,5 M pH 8,8 (descrita no item 3.7.9.), 7 mL de água destilada, 0,01 mL de tetrametiletilenodiamina (Temed) e 0,2 mL da solução de PSA 10% (descrita no item acima).

b) Gel de empacotamento de poliacrilamida 3%

Em um tubo plástico de 50 mL, foram adicionados 1 mL de bis-acrilamida 30%; 1,875 mL da solução Tris HCl 0,5 M pH 6,8 (descrita no item 3.7.9.); 4,8 mL de água destilada; 0,01 mL de Temed e 0,1 mL da solução de PSA 10% (descrita no item 3.7.10.), o que resultou na produção de 4 géis de empacotamento de poliacrilamida 3%.

3.7.11. Tampão de corrida 10X

Para o preparo de 1 L de tampão de corrida 10X, foram pesados em balança de precisão: 30 g de Tris base, 144 g de glicina e 10 g de SDS. Em seguida, foi adicionada água bidestilada em q.s.p. 1L de solução, que foi então armazenada em recipiente apropriado e permaneceu na geladeira (temperatura de aproximadamente 4°C) até ser utilizada.

3.7.12. Tampão de transferência 1X

O tampão de transferência 1X foi preparado através da pesagem, em balança de precisão, de 3 g de Tris base e 14,4 g de glicina e da adição de 200 mL de

metanol e de água bidestilada em q.s.p. 1L de solução. O tampão foi então armazenada em recipiente apropriado e mantido na geladeira (temperatura de aproximadamente 4° C) até sua utilização.

3.7.13. Tampão tris salina (TBS) 10X

Em uma balança de precisão foram pesados 24,2 g de Tris base e 80 g de NaCl e em seguida, foram adicionados 900 mL de água bidestilada. O pH foi aferido em um pHmetro digital (*Orion 3 Star, Thermo Scientific, Singapore*) e ajustado com HCl até o valor de 7,6. Por fim, adicionou-se água bidestilada em q.s.p. 1L de TBS 10 X, que foi armazenado em recipiente apropriado e permaneceu na geladeira (temperatura de aproximadamente 4° C) até seu uso.

3.7.14. TBST

Para o preparo de 1 L de TBST, primeiro o tampão TBS 10X (descrito no item 3.7.14.) foi diluído 10X em água bidestilada para produzir o tampão TBS 1X. Em seguida, foram adicionados 1 mL de tween-20 a 999 mL de TBS 1X, tornando a concentração final de *tween-20* 0,1% e formando o tampão TBST. O tampão TBST foi armazenado em recipiente apropriado e permaneceu na geladeira (temperatura de aproximadamente 4° C) até ser utilizado.

3.8. Drogas

O glucagon, o antagonista do GCGR (des-His¹-[Glu⁹] glucagon amida), o carbacol, o L-NAME, a OVA, o propranolol e o brometo de pancurônio foram diluídos em salina estéril (0,9%). A indometacina e a ZnPP IX foram diluídos em DMSO a 0,1% nos ensaios *in vitro*, enquanto que nos experimentos *in vivo* a indometacina foi diluída em DMSO a 0,33%. Além disso, o tiopental, o pentobarbital sódico e a BSA foram diluídos em água destilada e a metacolina em PBS 1X. Todas as drogas foram preparadas imediatamente antes do uso, sendo que a preparação e utilização da ZnPP IX foram realizadas ao abrigo de luz.

3.9. Fonte de obtenção dos reagentes e das drogas

Quadro 3.1 – Lista de reagentes ou drogas e suas fontes de obtenção

Reagente/ Droga	Fonte de Obtenção
β -mercaptoetanol	<i>Sigma Aldrich (St. Louis, EUA)</i>
HCl	ISO FAR (RJ, Brasil)
Anticorpo primário monoclonal de camundongo para a β -actina	<i>Santa Cruz Biotechnology (CA, EUA)</i>
Anticorpo primário policlonal de coelho para o GCGR	<i>Santa Cruz Biotechnology (CA, EUA)</i>
Anticorpo secundário anti-camundongo conjugado à enzima peroxidase	<i>R&D Systems (MN, EUA)</i>
Anticorpo secundário anti-coelho conjugado à enzima peroxidase	<i>R&D Systems (MN, EUA)</i>
Azul de bromofenol	<i>Merck (Darmstad, Alemanha)</i>
NaHCO_3	<i>Merck (Darmstad, Alemanha)</i>
Bis-acrilamida 30%	<i>(Bio-Rad Laboratories, EUA)</i>
Brometo de Pancurônio (Pavulon®)	Cristália (SP, Brasil)
BSA	<i>Sigma Aldrich (St. Louis, EUA)</i>
Carbacol	<i>Sigma Aldrich (St. Louis, EUA)</i>
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	<i>Merck (Darmstad, Alemanha)</i>
KCl	<i>Merck (Darmstad, Alemanha)</i>
NaCl	<i>Merck (Darmstad, Alemanha)</i>
<i>Complete</i>	<i>Roche (SP, Brasil)</i>
D-(+) glicose	<i>Sigma Aldrich (St. Louis, EUA)</i>
Des-His ¹ -[Glu ⁹] glucagon amida (antagonista GCGR)	<i>Sigma Aldrich (St. Louis, EUA)</i>
DMSO 100%	<i>Sigma Aldrich (St. Louis, EUA)</i>
SDS	<i>Sigma Aldrich (St. Louis, EUA)</i>
EDTA	<i>Sigma Aldrich (St. Louis, EUA)</i>
Filme fotossensível (<i>Kodak</i>)	<i>Perkin Elmer Life Sciences (EUA)</i>
KH_2PO_4	<i>Merck (Darmstad, Alemanha)</i>
Na_2HPO_4	<i>Merck (Darmstad, Alemanha)</i>

NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	<i>Sigma Aldrich (St. Louis, EUA)</i>
Glicerina	Vetec Química Fina (RJ, Brasil)
Glicina	<i>(Bio-Rad Laboratories, EUA)</i>
Glucagon	<i>Sigma Aldrich (St. Louis, EUA)</i>
Al(OH) ₃	<i>Sigma Aldrich (St. Louis, EUA)</i>
NaOH	<i>Merck (Darmstad, Alemanha)</i>
Indometacina	<i>Sigma Aldrich (St. Louis, EUA)</i>
L-NAME	<i>Sigma Aldrich (St. Louis, EUA)</i>
Leite sem gordura	Nestlé (Brasil)
Metacolina	<i>Sigma Aldrich (St. Louis, EUA)</i>
Metanol	ISO FAR (RJ, Brasil)
OVA	<i>Sigma Aldrich (St. Louis, EUA)</i>
Pentobarbital sódico	<i>Sigma Aldrich (St. Louis, EUA)</i>
PSA	<i>(Bio-Rad Laboratories, EUA)</i>
Propranolol	<i>Sigma Aldrich (St. Louis, EUA)</i>
Reagente de quimioluminescência <i>(SuperSignal West Dura)</i>	<i>Thermo Fisher Scientific Inc. (Rockford, EUA)</i>
Salina estéril 0,9%	Bio-Manguinhos (FIOCRUZ, Brasil)
Solução de sulfato de Cobre (II)	<i>Merck (Darmstad, Alemanha)</i>
Solução de BCA	<i>Sigma Aldrich (St. Louis, EUA)</i>
MgSO ₄ .7H ₂ O	<i>Merck (Darmstad, Alemanha)</i>
Temed	<i>(Bio-Rad Laboratories, EUA)</i>
Tiopental	Cristália (SP, Brasil)
Tris	<i>Sigma Aldrich (St. Louis, EUA)</i>
Tris base	<i>Sigma Aldrich (St. Louis, EUA)</i>
Triton X-100	<i>Sigma Aldrich (St. Louis, EUA)</i>
<i>Tween-20</i>	<i>Sigma Aldrich (St. Louis, EUA)</i>
ZnPP IX	<i>Frontier Scientific (Utah, EUA)</i>

3.10. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M) e analisados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo teste de comparação múltipla de *Bonferroni*, exceto para os resultados

dos valores de Emax e pEC50 do carbacol e da glicemia, em que foram realizadas a ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de *Student Newman-Keuls*, e para os dados obtidos no sistema não-invasivo de pletismografia barométrica de corpo inteiro que foram analisados estatisticamente pelo teste t múltiplo. Para todos os casos, os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4. Resultados

4.1. Efeito do glucagon sobre a contração da musculatura lisa de brônquio e traqueia induzida por carbacol *in vitro*

A estimulação de brônquio e traqueia isolados de camundongos A/J com carbacol induziu contração da musculatura lisa *in vitro* de forma concentração-dependente. Em ambos os casos, o efeito máximo do carbacol foi evidenciado na concentração de 10^{-5} M. A incubação prévia com glucagon foi capaz de inibir as contrações induzidas pelo carbacol *in vitro*, tanto no brônquio como na traqueia, nas duas concentrações testadas. Apesar de não ter sido observada diferença estatística entre os efeitos das 2 concentrações de glucagon testadas, a concentração de 1 μ M apresentou melhor resposta em ambas as situações (Figura 4.1). Além disso, calculamos os valores de E_{max} e pEC_{50} do carbacol e observamos que tanto no brônquio quanto na traqueia isolada as duas concentrações de glucagon reduziram os valores de E_{max} , porém não alteraram os valores de pEC_{50} do carbacol (Tabela 4.1).

4.2. Efeito do tratamento com glucagon sobre a contração das vias aéreas induzida por metacolina *in vivo*

Utilizando o sistema de pletismografia barométrica de corpo inteiro não-invasivo observamos que a metacolina, promoveu broncoconstricção de forma concentração-dependente. Esse efeito da metacolina foi demonstrado pelo aumento nos valores de *Penh*, em todos os tempos analisados (1, 3 e 6 h após a administração intranasal de salina), sendo que foi melhor evidenciado após 3 h da instilação de salina (Figura 4.2). A administração i.n. com glucagon (1 μ g/Kg) foi capaz de inibir, após 1 h do tratamento, o aumento de *Penh* induzido por 12,5 e 25 mg/mL de metacolina (Figura 4.2A). Resultados semelhantes foram obtidos, após 3 h da administração de glucagon, que inibiu o aumento nos valores de *Penh* causado por todas as concentrações de metacolina utilizadas (Figura 4.2B). Mas, após 6 h do tratamento, o glucagon não modificou a broncoconstricção causada pelo agonista muscarínico (Figura 4.2C).

No sistema de pletismografia barométrica de corpo inteiro invasivo, a metacolina induziu aumento na RL e redução na Cdyn de camundongos A/J de forma concentração-dependente (3; 9 e 27 mg/mL). O tratamento i.n. com glucagon (0,1; 1 e 10 µg/Kg), após 3 h da administração desse hormônio, foi capaz de inibir esse aumento na RL na concentração de 27 mg/mL de metacolina. No entanto, somente a dose de 1 µg/Kg de glucagon impediu o aumento na RL também na concentração de 9 mg/mL de metacolina (Figura 4.3A). Além disso, apenas as doses de 0,1 e 1 µg/Kg de glucagon administradas i.n. foram capazes de inibir a redução na Cdyn induzida pela metacolina, sendo que a dose de 0,1 µg/Kg exerceu esse efeito apenas na concentração de 3 mg/mL de metacolina, enquanto que a dose de 1 µg/Kg de glucagon apresentou valores maiores de Cdyn já na aerolização com PBS 1X, e também impediu a redução da Cdyn em todas as concentrações de metacolina utilizadas (3; 9 e 27 mg/mL). A dose de 10 µg/Kg de glucagon não apresentou nenhuma ação sobre a diminuição da Cdyn induzida pela aerolização de concentrações crescentes de metacolina (Figura 4.3B).

4.3. Efeito do glucagon sobre a glicemia de camundongos A/J após 7 e 14 dias de tratamento

Como observado na Tabela 4.2, os animais que foram tratados com glucagon (0,1; 1 e 10 µg/Kg, i.n.) uma vez ao dia não apresentaram alteração na glicemia após 7 ou 14 dias de tratamento em relação ao grupo controle que recebeu salina estéril (0,9%, i.n.) durante o mesmo período de tratamento. O mesmo ocorreu no experimento em que foi realizado tratamento i.p. diário com glucagon (0,1; 1 e 10 µg/Kg) ou salina estéril (0,9%) durante 7 e 14 dias, ou seja, a administração i.p. de glucagon também não foi capaz de interferir nos níveis circulantes de glicose dos animais em nenhum dos tempos analisados quando comparado com o grupo salina (Tabela 4.3).

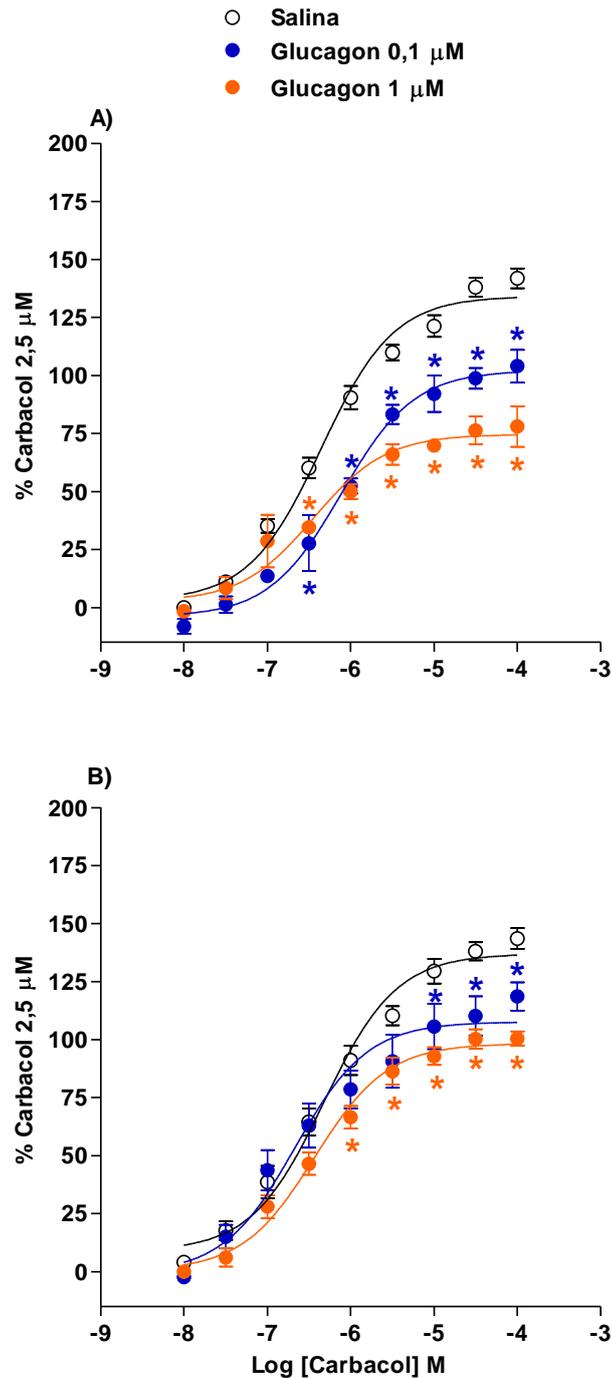


Figura 4.1: Influência do glucagon sobre a resposta contrátil de brônquio (A) e traqueia (B) isolados de camundongos ao carbacol. O tratamento com glucagon foi realizado 30 min antes da adição de concentrações crescentes de carbacol *in vitro*. Cada ponto representa a média \pm E.P.M de 3 animais para o experimento com brônquio e 10 animais para o ensaio com traqueia. Todos os resultados foram expressos como porcentagem da resposta contrátil ao carbacol 2,5 μM e analisados estatisticamente através da ANOVA de duas vias seguida pelo teste de comparação múltipla de *Bonferroni*. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo salina *in vitro*.

Tabela 4.1: Efeito do glucagon sobre o Emax e pEC50 do carbacol na musculatura lisa de brônquio e traqueia.

Órgão	Grupo	Emax (% do Carbacol 2,5 µM)	pEC50
Brônquio	Salina	134,2 ± 2,4	6,352 ± 0,05564
	Glucagon (0,1 µM)	102,2 ± 3,3 *	6,112 ± 0,08671
	Glucagon (1 µM)	74,67 ± 3,3 * #	6,443 ± 0,1439
Traqueia	Salina	136,8 ± 3,0	6,327 ± 0,07092
	Glucagon (0,1 µM)	107,7 ± 4,4 *	6,666 ± 0,14170
	Glucagon (1 µM)	98,36 ± 2,5 *	6,429 ± 0,07990

A tabela mostra os valores de Emax e pEC50 calculados a partir dos gráficos da figura 4.1. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M e analisados estatisticamente através da ANOVA de duas vias seguida pelo teste de comparação múltipla de *Student Newman-Keuls*. * p < 0,05 em comparação ao grupo salina *in vitro*. # p < 0,05 em comparação ao grupo pré-tratado com glucagon 0,1 µM *in vitro*. Emax - resposta contrátil máxima induzida pelo carbacol; pEC50 - logaritmo negativo da concentração de carbacol que produz 50% do efeito máximo.

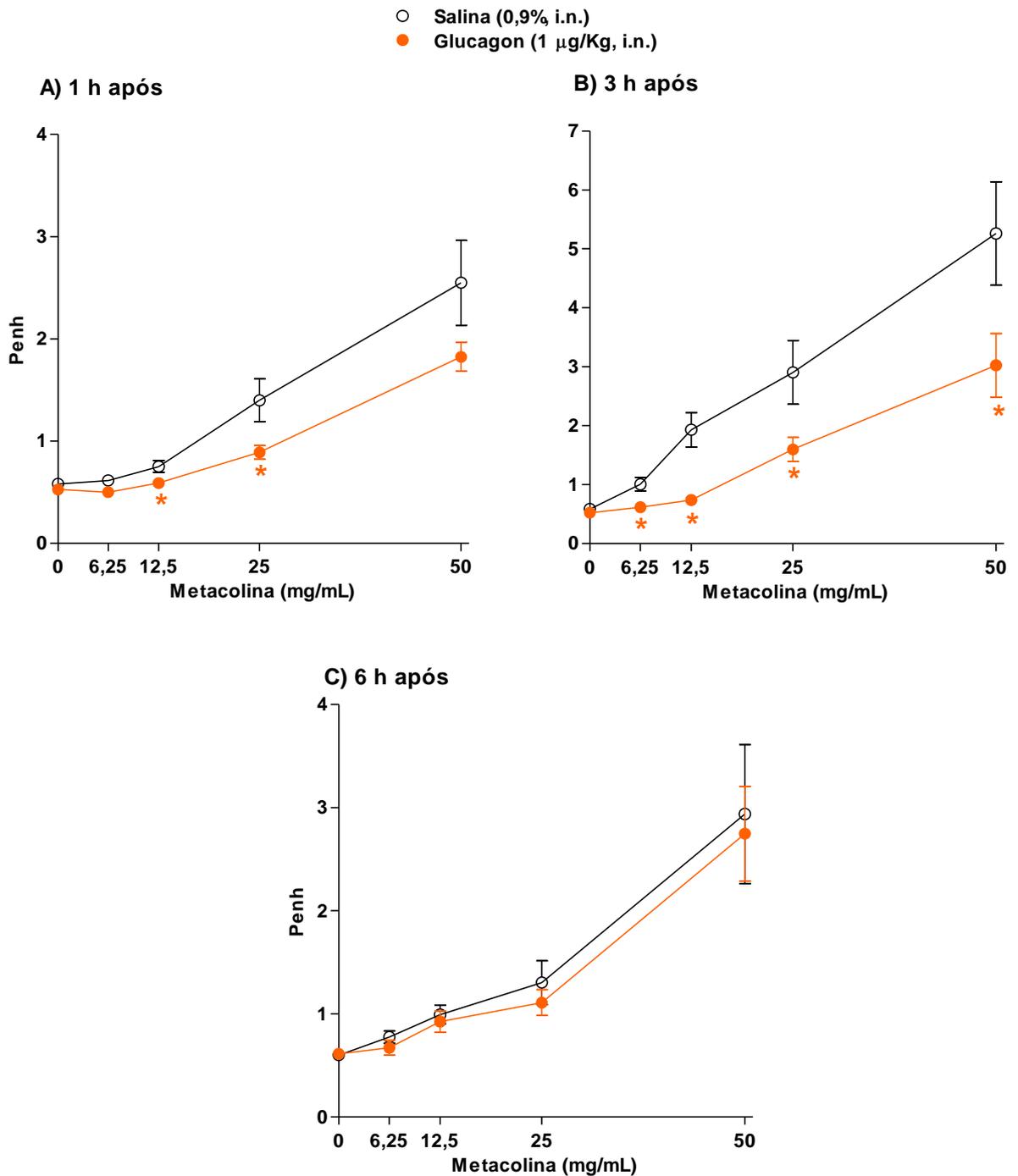


Figura 4.2: Efeito da administração i.n. de glucagon sobre a broncoconstricção induzida por aerolização de concentrações crescentes de metacolina (6,25 – 50 mg/mL) em camundongos A/J. Em A, após 1 h, em B, após 3 h e em C, após 6 h do tratamento com glucagon. Cada ponto representa média ± E.P.M de no mínimo 6 animais. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste t múltiplo. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com salina i.n.

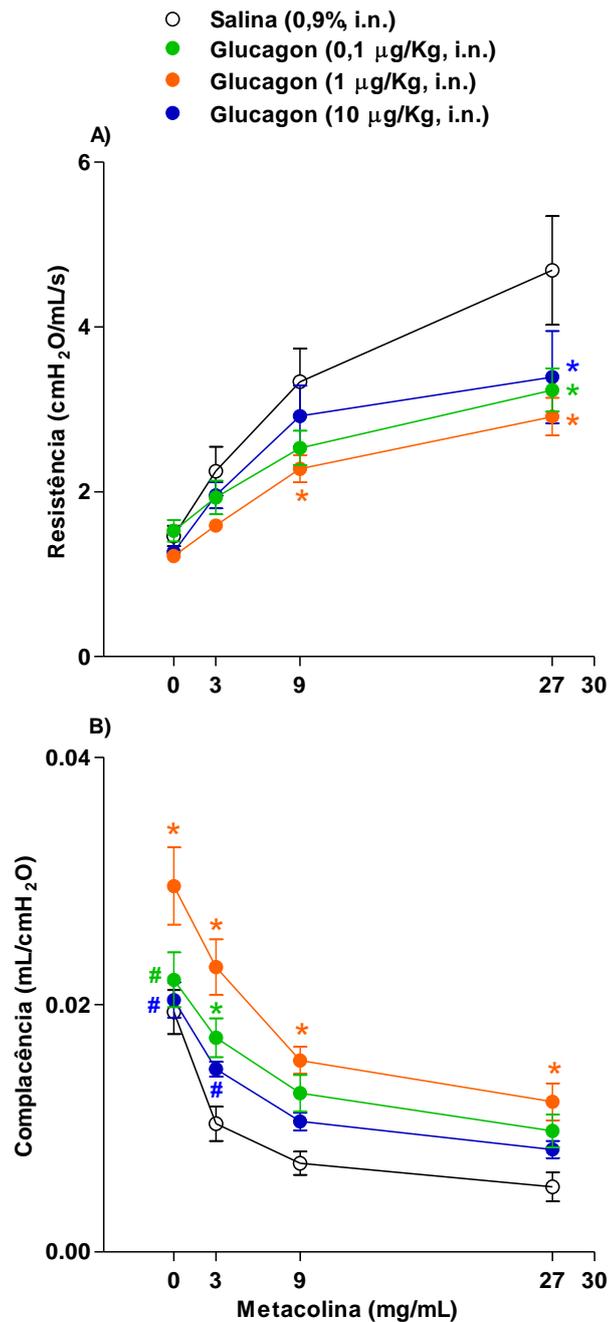


Figura 4.3: Efeito da administração i.n. de glucagon sobre as alterações da RL e Cdyn de camundongos A/J induzidas por metacolina. Em A, curva dose-resposta do efeito do glucagon sobre o aumento da RL induzido por concentrações crescentes de metacolina. Em B, curva dose-resposta do efeito do glucagon sobre a redução da Cdyn induzida por aerolização de concentrações crescentes de metacolina. O tratamento com glucagon foi realizado 3 h antes do estímulo com metacolina. Cada ponto representa média \pm E.P.M de no mínimo 5 animais. Os resultados foram analisados estatisticamente através da ANOVA de duas vias seguida pelo teste de comparação múltipla de *Bonferroni*. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com salina i.n. # $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com glucagon 1 µg/Kg i.n.

Tabela 4.2: Níveis circulantes de glicose de camundongos A/J após 7 e 14 dias de tratamento i.n. diário com glucagon.

Tratamento (i.n.)	Glicemia após 7 dias de tratamento (mg/dL)	Glicemia após 14 dias de tratamento (mg/dL)
Salina 0,9%	126,3 ± 2,8	128 ± 4,9
Glucagon 0,1 µg/Kg	130,5 ± 3,4	140 ± 5,1
Glucagon 1 µg/Kg	132,6 ± 1,8	138,3 ± 4,5
Glucagon 10 µg/Kg	134,0 ± 3,7	134 ± 1,4

Os resultados foram expressos como média ± E.P.M de no mínimo 4 animais e analisados estatisticamente através da ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de *Student Newman-Keuls*.

Tabela 4.3: Níveis circulantes de glicose de camundongos A/J após 7 e 14 dias de tratamento i.p. diário com glucagon.

Tratamento (i.p.)	Glicemia após 7 dias de tratamento (mg/dL)	Glicemia após 14 dias de tratamento (mg/dL)
Salina 0,9%	128,5 ± 3,1	117,6 ± 3,6
Glucagon 0,1 µg/Kg	117,5 ± 5,1	106,5 ± 2,3
Glucagon 1 µg/Kg	115,5 ± 2,6	121,6 ± 4,4
Glucagon 10 µg/Kg	120,8 ± 4,3	118,4 ± 2,9

Os resultados foram expressos como média ± E.P.M de no mínimo 4 animais e analisados estatisticamente através da ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de *Student Newman-Keuls*. A figura é representativa de 2 experimentos idênticos com resultados similares.

4.4. Envolvimento do GCGR no efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração da musculatura lisa de traqueia *in vitro*

Como evidenciado anteriormente, o carbacol promoveu contração da musculatura lisa da traqueia incubada com salina *in vitro* de forma concentração-dependente e, o pré-tratamento com glucagon (1 μM) foi capaz de inibir essa resposta contrátil induzida por carbacol *in vitro*. A pré-incubação da traqueia com o antagonista do GCGR (des-His¹-[Glu⁹] glucagon amida, 1 μM) impediu que o glucagon exercesse seu efeito anti-espasmódico sobre a contração da musculatura lisa traqueal *in vitro*. Inesperadamente, a traqueia que só recebeu o antagonista do GCGR apresentou uma inibição da contração da musculatura lisa induzida por carbacol *in vitro* (Figura 4.4).

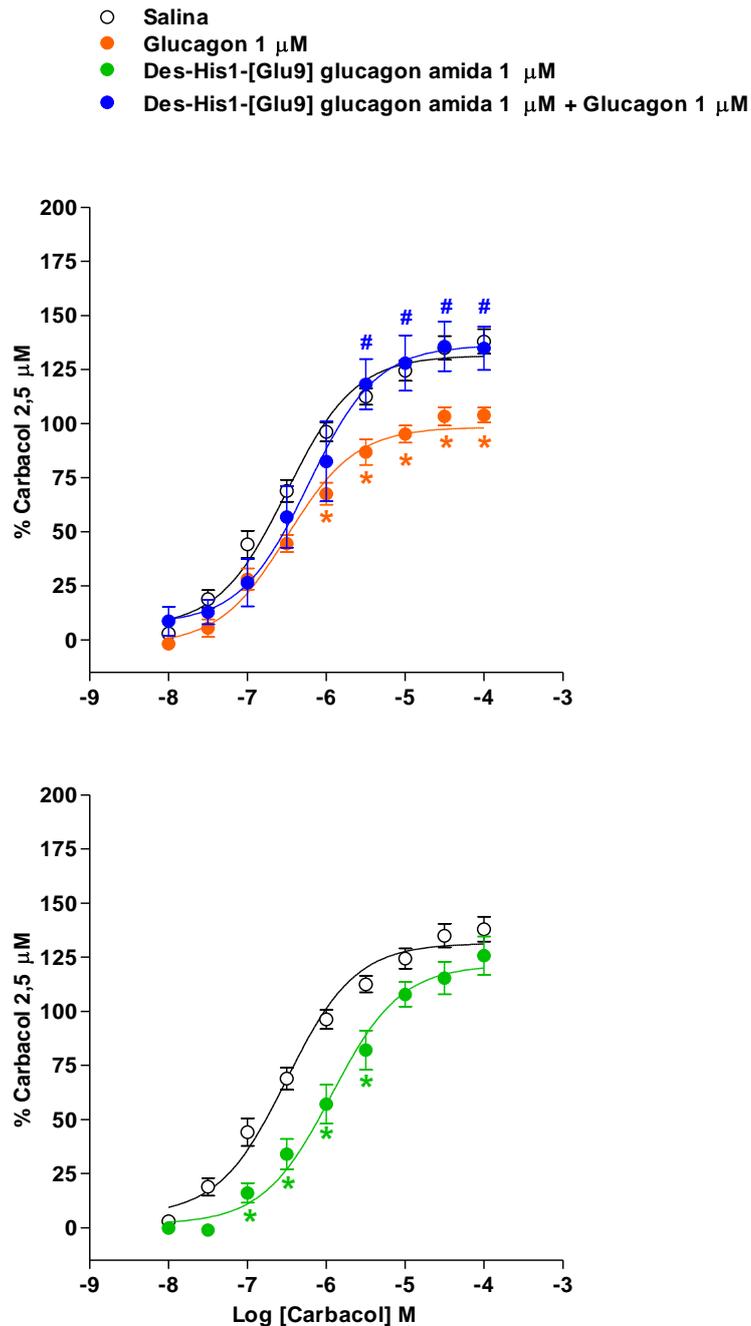


Figura 4.4: Efeito do antagonista do GCGR (des-His¹-[Glu⁹] glucagon amida) sobre a ação anti-espasmódica do glucagon na contração da musculatura lisa de traqueia induzida por carbacol *in vitro*. A traqueia foi incubada com o antagonista do GCGR 30 min antes de ser tratada com glucagon *in vitro*. O tratamento com glucagon (1 μM) foi realizado 30 min antes da adição de concentrações crescentes de carbacol *in vitro*. Cada ponto representa média \pm E.P.M de no mínimo 5 animais. Todos os resultados foram expressos como percentagem da resposta contrátil ao carbacol 2,5 μM e analisados estatisticamente através da ANOVA de duas vias seguida pelo teste de comparação múltipla de *Bonferroni*. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo salina *in vitro*. # $p < 0,05$ em comparação ao grupo pré-tratado com glucagon *in vitro*.

4.5. Envolvimento do epitélio no efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração da musculatura lisa de traqueia *in vitro*

A partir dos resultados anteriores que mostraram que o glucagon exerce efeito anti-espasmódico sobre a contração da musculatura lisa de traqueia induzida por carbacol *in vitro*, fomos avaliar se o efeito do glucagon era dependente da ativação do epitélio. Para isso, removemos mecanicamente o epitélio de algumas traqueias e, em seguida, incubamos essas traqueias com glucagon. Como nos resultados anteriores, o carbacol contraiu de forma concentração-dependente a traqueia em que o epitélio foi mantido integro e que recebeu apenas salina *in vitro*, e o glucagon foi capaz de desempenhar ação anti-espasmódica sobre a contração da musculatura lisa induzida por carbacol *in vitro* em traqueia com o epitélio intacto. Entretanto, o tratamento com glucagon não foi capaz de inibir a contração induzida por carbacol *in vitro* em traqueia desepitelizada. Não foi observada diferença entre a contração do músculo liso promovida pelo carbacol em traqueia não-tratada com glucagon *in vitro* submetida à remoção do epitélio em comparação à traqueia que não sofreu esse procedimento (Figura 4.5).

A partir dos dados acima, que mostraram que o efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração da musculatura lisa de traqueias induzida por carbacol *in vitro* é dependente da ativação do GCGR e do epitélio, nós investigamos, através da técnica de *Western blot*, a expressão do GCGR nas traqueias dos camundongos A/J na presença ou ausência de epitélio. A expressão do GCGR foi detectada nas amostras de pulmão e traqueia com epitélio intacto mas não nas de traqueia submetida ao processo de remoção epitelial (Figura 4.6).

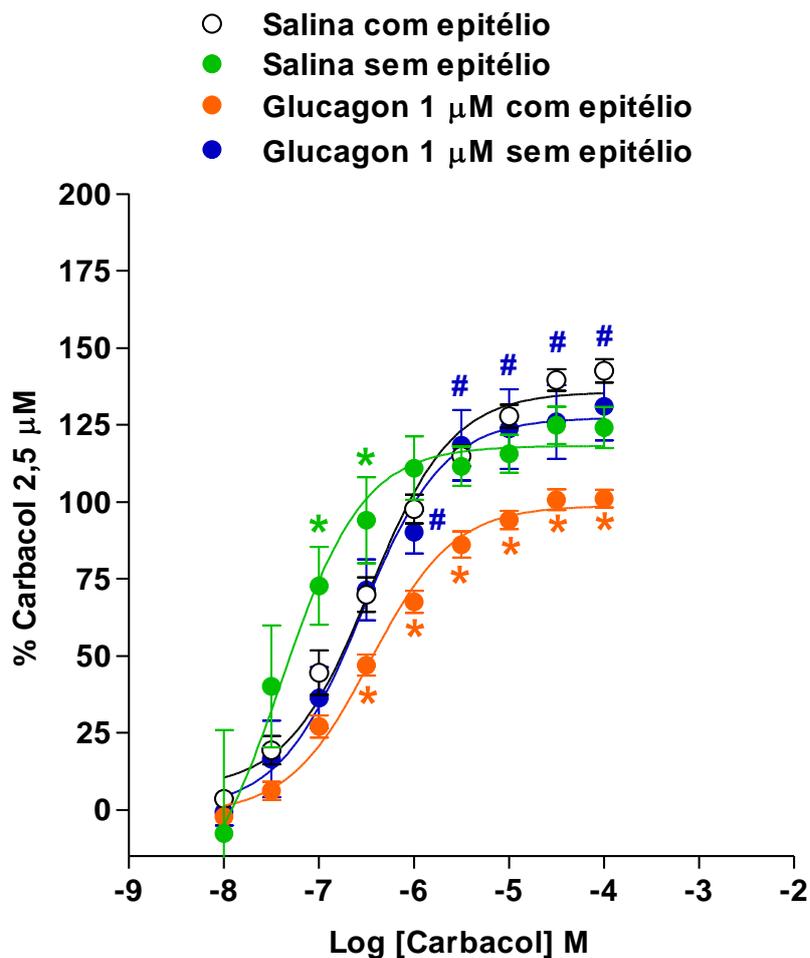


Figura 4.5: Envolvimento do epitélio no efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração da musculatura lisa de traqueia induzida por carbacol *in vitro*. O tratamento com glucagon foi realizado 30 min antes da adição de concentrações crescentes de carbacol *in vitro*. Cada ponto representa média \pm E.P.M de no mínimo 4 animais. Todos os resultados foram expressos como porcentagem da resposta contrátil ao carbacol 2,5 μ M e analisados estatisticamente através da ANOVA de duas vias seguida pelo teste de comparação múltipla de *Bonferroni*. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo salina com epitélio *in vitro*. # $p < 0,05$ em comparação ao grupo pré-tratado com glucagon na presença do epitélio *in vitro*.



Figura 4.6: Expressão do GCGR em traqueia com epitélio intacto, traqueia desepitelizada e pulmão de camundongos A/J. Representação da análise por *Western blot* da expressão do GCGR e do controle constituído pela β -actina. Cada coluna de traqueias é um *pool* de amostras de 6 animais. A coluna do pulmão é amostra de um único animal. Cada coluna é uma imagem representativa de 4 experimentos idênticos com resultados similares.

4.6. Estudo dos mecanismos moleculares associados ao efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração da musculatura lisa das vias aéreas

Para verificarmos que o glucagon realmente não exerce seu efeito anti-espasmódico sobre a contração da musculatura lisa de traqueia induzida por carbacol *in vitro* de forma direta sobre a célula muscular, incubamos algumas traqueias com propranolol (1 μ M), um antagonista não-seletivo dos receptores β -adrenérgicos, e com glucagon (1 μ M). Como já mostrado, o carbacol induziu contração da musculatura lisa traqueal de forma concentração-dependente *in vitro* e o tratamento com glucagon inibiu essa resposta contrátil. Além disso, a traqueia que recebeu propranolol e em seguida glucagon *in vitro*, apresentou contração semelhante ao grupo de traqueias que só foram incubadas com glucagon *in vitro*, ou seja, o propranolol não inibiu o efeito anti-espasmódico do glucagon *in vitro*. Também não foi observada diferença entre a contração da musculatura lisa estimulada pelo carbacol *in vitro* da traqueia apenas incubada com propranolol em relação à traqueia em que foi adicionada salina *in vitro* (Figura 4.7).

Como foi observado que o efeito anti-espasmódico do glucagon só ocorre na presença do epitélio, fomos investigar quais fatores liberados pelo epitélio poderiam estar envolvidos nesse efeito do glucagon. Para isso, algumas traqueias foram tratadas com glucagon na presença de L-NAME (inibidor de NOS; 100 μ M), indometacina (inibidor de COX; 10 μ M) ou ZnPP IX (inibidor da HO; 10 μ M). Nos três procedimentos, o carbacol induziu contração da musculatura lisa da traqueia do grupo salina de forma concentração-dependente *in vitro* e, o pré-tratamento com glucagon foi capaz de inibir essa contração da musculatura lisa traqueal induzida por carbacol *in vitro*. Como constatado na figura 4.8, a traqueia que recebeu somente L-NAME *in vitro* apresentou contração da musculatura lisa semelhante ao grupo salina *in vitro*. O mesmo foi visto para a traqueia pré-incubada com L-NAME e em seguida pré-tratada com glucagon (1 μ M) *in vitro*, o que mostrou que o efeito anti-espasmódico do glucagon foi inibido pelo L-NAME *in vitro*.

Não foi detectada alteração no perfil de resposta contrátil ao carbacol *in vitro* entre a traqueia que foi incubada somente com DMSO 0,1% (veículo da indometacina) em comparação com a tratada com salina *in vitro*, bem como não houve diferença na contração da musculatura lisa estimulada por carbacol *in vitro* da traqueia administrada apenas com indometacina em relação a que recebeu o seu

veículo *in vitro* (Figura 4.9). Contudo, observamos que quando o pré-tratamento com glucagon (1 μ M) é realizado na presença da indometacina, a ação anti-espasmódica do glucagon na musculatura lisa da traqueia *in vitro* é inibida. Porém, quando pré-incubamos a traqueia com ZnPP IX e em seguida pré-tratamos com glucagon (1 μ M) *in vitro*, verificamos que esse grupo de traqueias apresentou contração da musculatura lisa em resposta ao carbacol semelhante aos grupos que foram pré-tratadas com glucagon na presença de salina ou de DMSO 0,1%, o que permitiu afirmar que a ZnPP IX não bloqueou o efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração do músculo liso traqueal estimulada por concentrações crescentes de carbacol *in vitro*. Nesta condição experimental a traqueia que foi incubada somente com ZnPP ou com o seu veículo DMSO 0,1%, apresentou resposta contrátil ao carbacol *in vitro* semelhante à traqueia que foi incubada somente com salina *in vitro* (Figura 4.10).

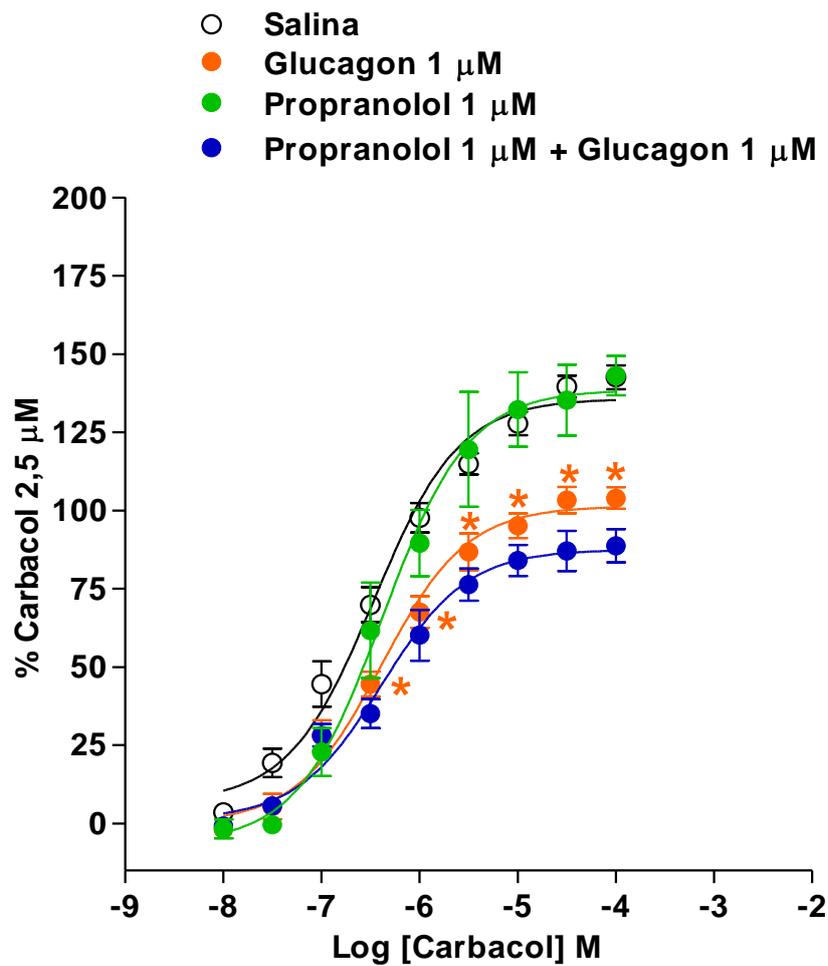


Figura 4.7: Efeito do propranolol sobre a ação anti-espasmódica do glucagon na contração da musculatura lisa de traqueia induzida por carbacol *in vitro*. A traqueia foi incubada com propranolol 30 min antes de ser tratada com glucagon *in vitro*. O tratamento com glucagon foi realizado 30 min antes da adição de concentrações crescentes de carbacol *in vitro*. Cada ponto representa média \pm E.P.M de no mínimo 3 animais. Todos os resultados foram expressos como porcentagem da resposta contrátil ao carbacol 2,5 μ M e analisados estatisticamente através da ANOVA de duas vias seguida pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo salina *in vitro*.

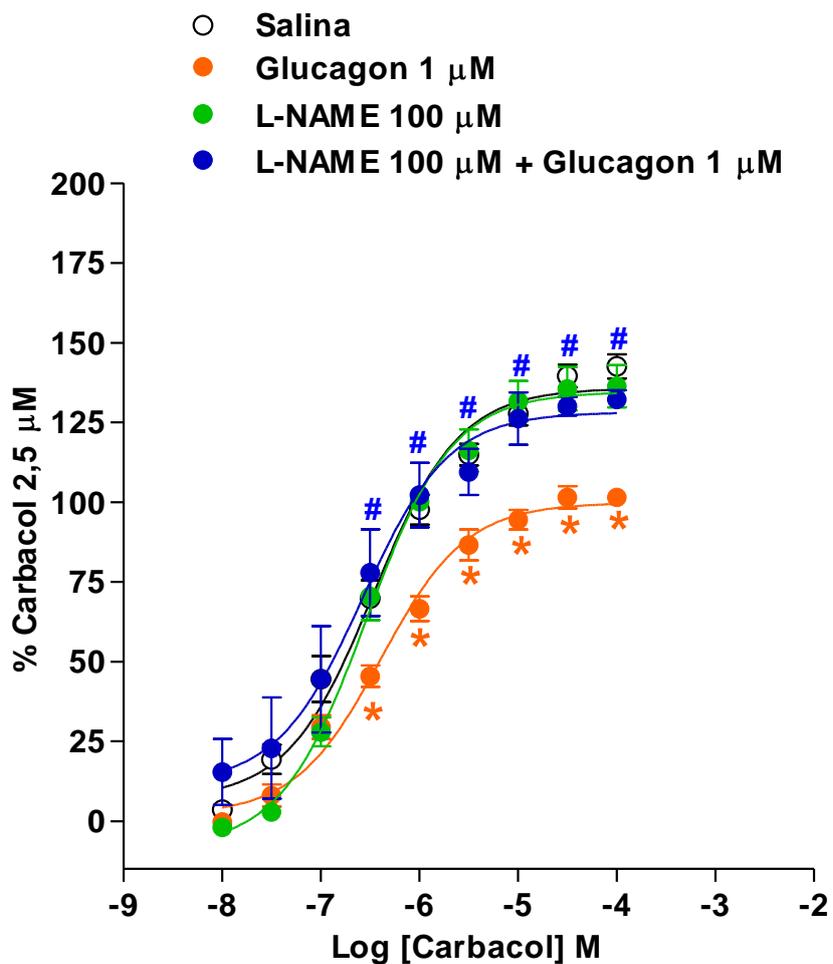


Figura 4.8: Efeito do L-NAME sobre a ação anti-espasmódica do glucagon na contração da musculatura lisa de traqueia induzida por carbacol *in vitro*. A traqueia foi incubada com L-NAME 30 min antes de ser tratada com glucagon *in vitro*. O tratamento com glucagon foi realizado 30 min antes da adição de concentrações crescentes de carbacol *in vitro*. Cada ponto representa média \pm E.P.M de no mínimo 4 animais. Todos os resultados foram expressos como porcentagem da resposta contrátil ao carbacol 2,5 μ M e analisados estatisticamente através da ANOVA de duas vias seguida pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo salina *in vitro*. # $p < 0,05$ em comparação ao grupo pré-tratado com glucagon *in vitro*.

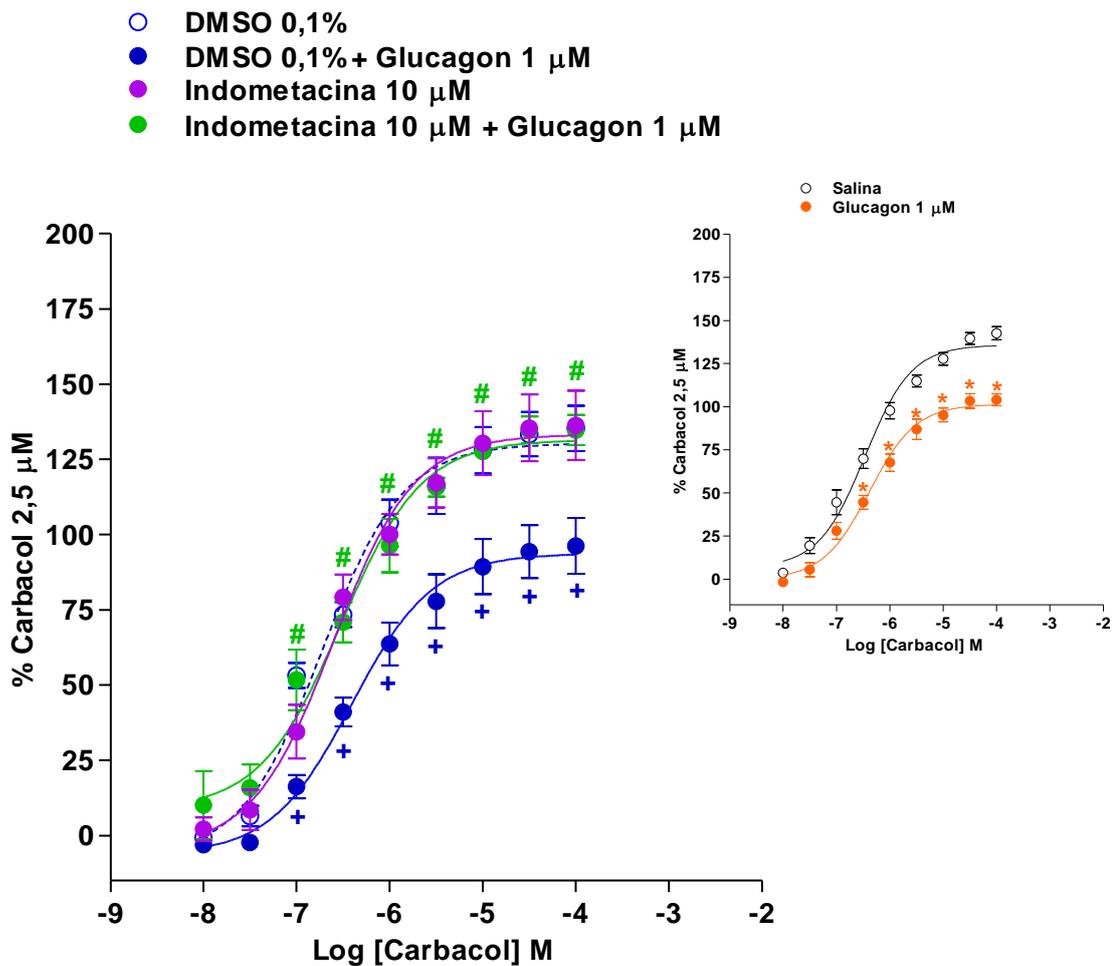


Figura 4.9: Efeito da indometacina sobre a ação anti-espasmódica do glucagon na contração da musculatura lisa de traqueia induzida por carbacol *in vitro*. A traqueia foi incubada com indometacina ou DMSO 30 min antes de ser tratada com glucagon *in vitro*. O tratamento com glucagon foi realizado 30 min antes da adição de concentrações crescentes de carbacol *in vitro*. Cada ponto representa média \pm E.P.M de no mínimo 3 animais. Todos os resultados foram expressos como percentagem da resposta contrátil ao carbacol 2,5 μ M e analisados estatisticamente através da ANOVA de duas vias seguida pelo teste de comparação múltipla de *Bonferroni*. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo salina *in vitro*. + $p < 0,05$ em comparação ao grupo incubado apenas com DMSO *in vitro*. # $p < 0,05$ em comparação ao grupo incubado com DMSO e em seguida tratado com glucagon *in vitro*.

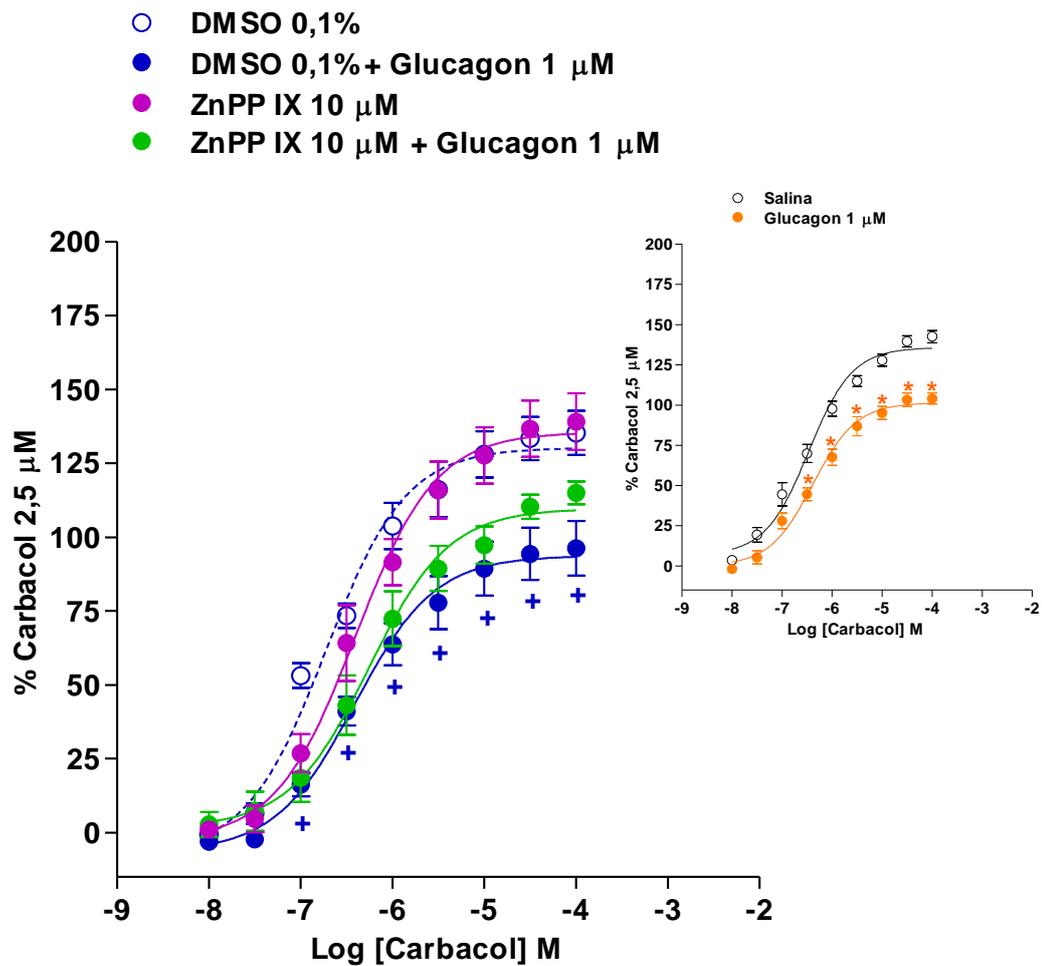


Figura 4.10: Efeito da ZnPP IX sobre a ação anti-espasmódica do glucagon na contração da musculatura lisa de traqueia induzida por carbacol *in vitro*. A traqueia foi incubada com ZnPP IX ou DMSO 30 min antes de ser tratada com glucagon *in vitro*. O tratamento com glucagon foi realizado 30 min antes da adição de concentrações crescentes de carbacol *in vitro*. Cada ponto representa média \pm E.P.M de no mínimo 3 animais. Todos os resultados foram expressos como percentagem da resposta contrátil ao carbacol 2,5 μM e analisados estatisticamente através da ANOVA de duas vias seguida pelo teste de comparação múltipla de *Bonferroni*. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo salina *in vitro*. + $p < 0,05$ em comparação ao grupo incubado apenas com DMSO *in vitro*.

Diante dos resultados descritos acima, em que observamos que o efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração da musculatura lisa da traqueia induzida por carbacol *in vitro* é dependente da ativação de NOS e COX, fomos investigar se a inibição dessas enzimas poderia interferir na ação do glucagon sobre a contração da musculatura lisa das vias aéreas no sistema *in vivo*. No sistema de pletismografia barométrica do corpo inteiro invasivo, novamente a metacolina induziu aumento da RL dos camundongos A/J de forma concentração-dependente (3; 9 e 27 mg/mL), como demonstrado pelos grupos que receberam apenas salina (0,9%, i.n.) ou DMSO (0,33%, i.p.) (Figuras 4.11A e 4.12A, respectivamente). O mesmo foi observado para os animais tratados apenas com L-NAME (20 mg/Kg, i.p.) ou com indometacina (10 mg/Kg, i.p.), como mostrado pelas figuras 4.11A e 4.12A, respectivamente. O tratamento i.n. com glucagon (1 µg/Kg) realizado na ausência (Figura 4.11A) ou após a administração de DMSO (Figura 4.12A) foi capaz de inibir esse aumento da RL nas concentrações de 9 e 27 mg/mL de metacolina. A administração de L-NAME 30 min antes do tratamento i.n. com glucagon inibiu esse efeito do glucagon sobre a RL em ambas as concentrações de metacolina (9 e 27 mg/mL) (Figura 4.11A), enquanto a administração prévia de indometacina inibiu a ação do glucagon sobre a RL apenas na concentração de 27 mg/mL de metacolina (Figura 4.12A).

Além de atuar sobre a RL dos camundongos utilizados, a metacolina também promoveu uma redução na C_{dyn} de forma concentração-dependente nos animais em que foi administrada apenas salina (0,9% i.n.) ou DMSO (0,33%, i.p.), como observado nas Figuras 4.11B e 4.12B, respectivamente. Como no parâmetro da RL, não houve diferença estatística nas respostas à metacolina no parâmetro da C_{dyn} entre os animais tratados apenas com L-NAME ou com indometacina em relação aos seus respectivos controles, salina e DMSO (Figuras 4.11B e 4.12B, respectivamente). O grupo de animais tratados apenas com glucagon i.n. já na situação basal, caracterizada pela aerolização de PBS 1X, possuía valores de C_{dyn} maiores que o seu controle (salina, i.n.). Nesse grupo, o glucagon impediu a redução da C_{dyn} nas concentrações de 3 e 9 mg/mL de metacolina e esse efeito do glucagon na C_{dyn} , tanto no basal quanto nas 2 concentrações de metacolina, foi bloqueado pela administração prévia com L-NAME (Figura 4.11B).

O tratamento i.n. com glucagon realizado 30 min após a administração i.p. de DMSO impediu, em todas as concentrações de metacolina (3; 9 e 27 mg/mL), a redução da C_{dyn} induzida pela mesma. A administração i.p. de indometacina

realizada previamente à administração i.n. de glucagon, aboliu essa ação inibitória do glucagon sobre a Cdyn em todas as concentrações de metacolina (Figura 4.12B).

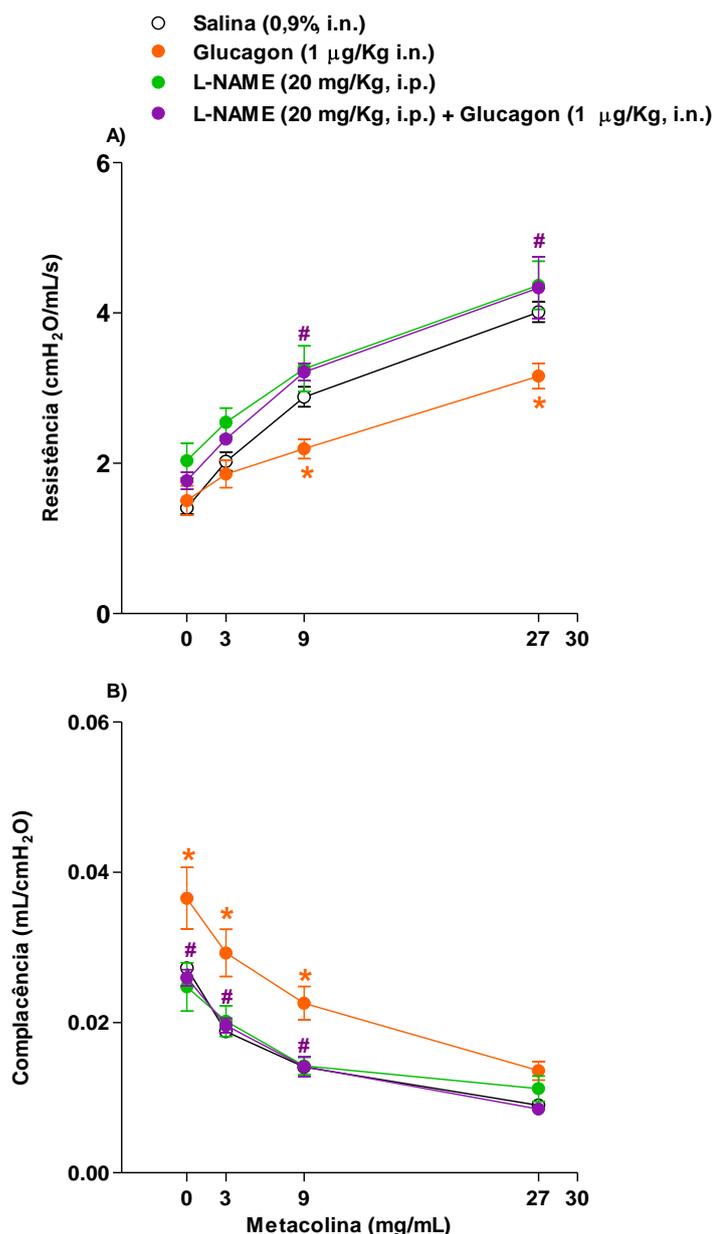


Figura 4.11: Efeito do L-NAME sobre a ação anti-espasmódica do glucagon na contração da musculatura lisa das vias aéreas induzida por metacolina *in vivo*. Em A, efeito do L-NAME sobre a ação do glucagon no aumento da RL induzido por concentrações crescentes de metacolina. Em B, efeito do L-NAME sobre a ação do glucagon na redução da C_{dyn} induzida por concentrações crescentes de metacolina. A administração i.p. do L-NAME foi realizada 30 min antes do tratamento com glucagon. O glucagon foi administrado por via i.n. 3 h antes do estímulo com metacolina. Cada ponto e barras representam média \pm E.P.M de no mínimo 6 animais. A figura é representativa de 2 experimentos idênticos com resultados similares. Os resultados foram analisados estatisticamente através da ANOVA de duas vias seguida pelo teste de comparação múltipla de *Bonferroni*. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com salina i.n. # $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com glucagon i.n.

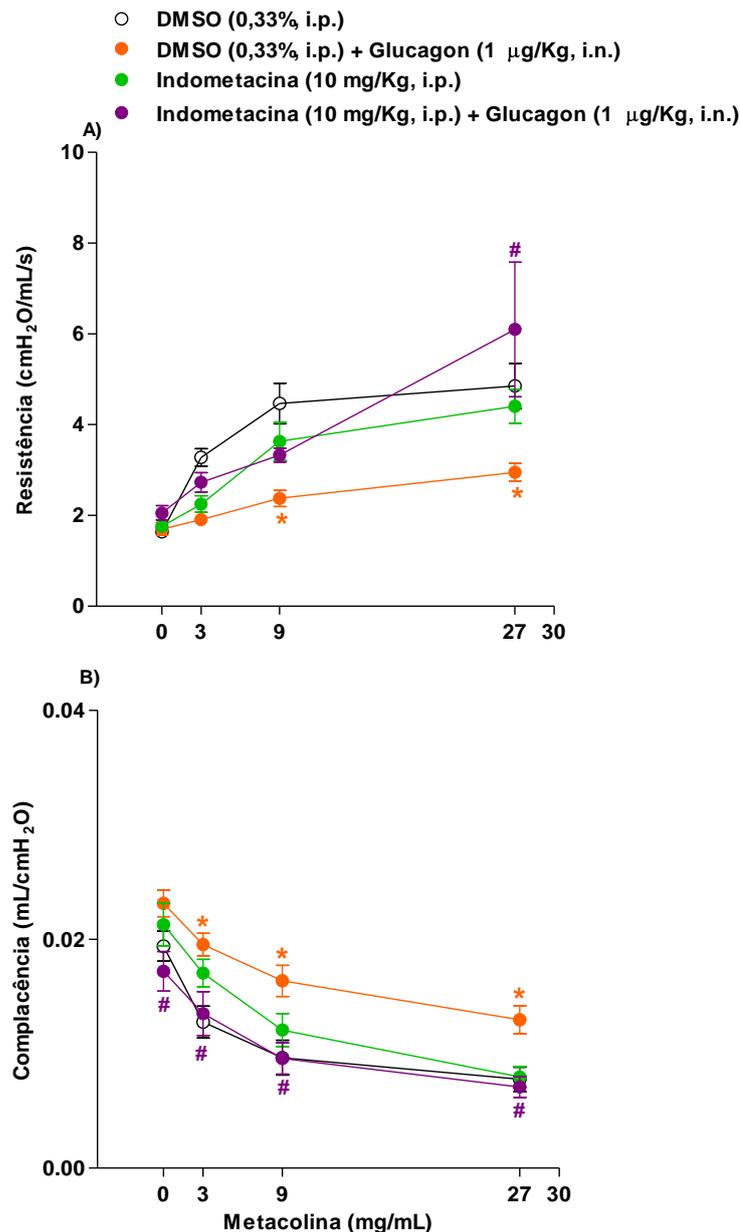


Figura 4.12: Efeito da indometacina sobre a ação anti-espasmódica do glucagon na contração da musculatura lisa das vias aéreas induzida por metacolina *in vivo*. Em A, efeito da indometacina sobre a ação do glucagon no aumento da RL induzido por concentrações crescentes de metacolina. Em B, efeito da indometacina sobre a ação do glucagon na redução da Cdyn induzida por concentrações crescentes de metacolina. A administração i.p. da indometacina foi realizada 30 min antes do tratamento com glucagon. O glucagon foi administrado por via i.n. 3 h antes do estímulo com metacolina. Cada ponto e barras representam média \pm E.P.M de no mínimo 7 animais. A figura é representativa de 2 experimentos idênticos com resultados similares. Os resultados foram analisados estatisticamente através da ANOVA de duas vias seguida pelo teste de comparação múltipla de *Bonferroni*. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com DMSO i.p. # $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com glucagon i.n.

4.7. Efeito do tratamento com glucagon sobre a hiper-reatividade das vias aéreas

Tendo em vista esses resultados que demonstraram que o glucagon apresenta ação anti-espasmódica sobre a contração da célula muscular lisa das vias aéreas e sabendo do importante envolvimento da contração desse tipo celular em algumas doenças, incluindo a asma, decidimos investigar se o glucagon seria capaz de exercer seu efeito anti-espasmódico na musculatura lisa das vias aéreas em modelo murino de asma. Para isso, utilizamos um modelo de asma aguda com 2 desafios antigênicos com OVA (1 µg/µL, i.n.) em camundongos A/J, e avaliamos a hiper-reatividade das vias aéreas desses animais.

Como já descrito anteriormente, a metacolina promoveu aumento da RL e redução da Cdyn de forma concentração-dependente (3; 9 e 27 mg/mL). Esse aumento da RL e diminuição da Cdyn ocorreram de forma mais intensa no grupo de camundongos submetidos ao desafio com OVA do que no grupo que apenas recebeu salina (0,9%, i.n.), o que caracterizou um fenômeno de hiper-reatividade das vias aéreas nesses animais desafiados com OVA. Entre esses dois grupos foi observada diferença estatística nas 2 maiores concentrações de metacolina para o parâmetro da RL (Figura 4.13A), e em todas as concentrações de metacolina na Cdyn (Figura 4.13B).

O tratamento i.n. com glucagon 1 h antes ou 1 h depois do desafio com OVA inibiu a hiper-reatividade das vias aéreas induzida por metacolina no parâmetro da RL, porém só foi observada na concentração de 27 mg/mL de metacolina significância estatística entre os grupos tratados e o que não foi tratado com glucagon (Figura 4.13A). O tratamento com glucagon 6 h após o desafio com OVA não foi capaz de exercer efeito na hiper-reatividade das vias aéreas em nenhum dos parâmetros analisados (RL e Cdyn) (Figura 4.13). Ao analisarmos o fenômeno da hiper-reatividade das vias aéreas através do parâmetro da Cdyn, observamos que tanto o tratamento com glucagon realizado 1 h antes como o 1h depois do desafio antigênico com OVA foram capazes de inibir essa resposta exacerbada das vias aéreas frente ao estímulo de metacolina, sendo que só na concentração de 3 mg/mL de metacolina que houve diferença estatística entre esses grupos de camundongos tratados com glucagon em relação aos animais que foram desafiados mas não receberam nenhum tipo de tratamento (Figura 4.13B).

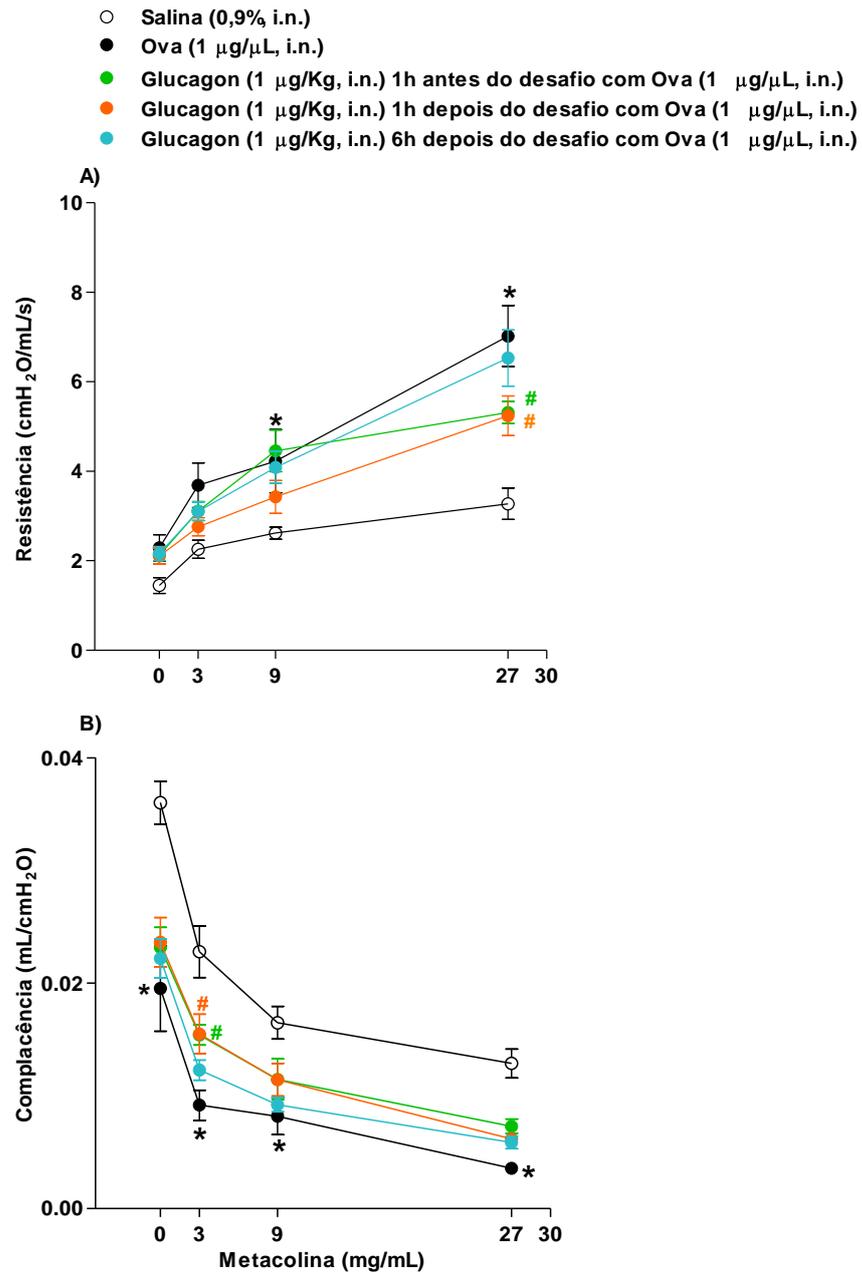


Figura 4.13: Efeito do tratamento i.n. com glucagon sobre a resposta de hiper-reatividade das vias aéreas à metacolina no modelo de asma aguda de 2 dias em camundongos A/J. Em A, efeito do glucagon sobre a hiper-reatividade das vias aéreas avaliada pelo parâmetro de RL. Em B, efeito do glucagon sobre a hiper-reatividade das vias aéreas avaliada pelo parâmetro de Cdyn. O glucagon foi administrado 1 h antes ou 1 ou 6 h depois do desafio i.n. com OVA. As análises foram realizadas 24 h após o último desafio com OVA. Cada ponto e barras representam média \pm E.P.M de no mínimo 5 animais. Os resultados foram analisados estatisticamente através da ANOVA de duas vias seguida pelo teste de comparação múltipla de *Bonferroni*. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com salina i.n. # $p < 0,05$ em comparação ao grupo desafiado com OVA i.n.

5. Discussão

Nesse estudo, nós avaliamos se o glucagon apresenta efeito anti-espasmódico sobre a contração da musculatura lisa das vias aéreas de camundongos, e também investigamos quais os mecanismos moleculares responsáveis por esse efeito. Constatamos que o glucagon é capaz de relaxar o músculo liso das vias aéreas contraído por agentes colinérgicos *in vitro* e *in vivo* e que os possíveis mecanismos envolvidos incluem a liberação de NO e de produtos da ação de COX, através da ativação de seu receptor GCGR presente no epitélio. Além disso, foi possível notar que dois tipos de tratamento relativamente longos com glucagon, nos quais foram utilizadas as vias i.n. ou i.p., não foram capazes de alterar os níveis circulantes de glicose. Por fim, observamos que o tratamento i.n. com glucagon 1 h antes ou 1 h depois do desafio antigênico com OVA foi capaz de inibir a hiper-reatividade das vias aéreas frente ao estímulo com metacolina em modelo murino de asma aguda.

Em primeiro lugar, observamos que o carbacol induziu contração da musculatura lisa de brônquios e traqueias *in vitro* de forma concentração-dependente. Esse resultado já era esperado, visto que já é conhecido que a ACh e diversos outros agonistas colinérgicos, como o carbacol, exercem um efeito espasmódico na musculatura lisa das vias aéreas através da sua ligação a receptores muscarínicos M₃, o que estimula a formação de IP3 e DAG que promovem um aumento na concentração intracelular de Ca⁺², o que resulta na contração do músculo liso (72, 81). Optamos por utilizar o carbacol em vez da ACh pois, embora os dois ativem tanto os receptores muscarínicos quanto os nicotínicos, a ACh é rapidamente degradada pelas colinesterases, enquanto a hidrólise do carbacol é mais lenta, logo a duração do efeito do carbacol é maior do que a da ACh (77, 109), o que nos assegura uma boa margem de tempo para a realização dos nossos experimentos.

O pré-tratamento com glucagon, nas concentrações de 0,1 e 1 µM, reduziu a resposta contrátil do músculo liso de brônquio e traqueia induzida por carbacol *in vitro*. Esses dados se opõem aos de alguns estudos que sugerem que o glucagon não apresenta efeito relaxante significativo na musculatura lisa das vias aéreas em pacientes asmáticos (29, 30). Em contrapartida, nossos resultados vão ao encontro de trabalhos que mostram um efeito relaxante do glucagon no músculo liso bronquiolar de cobaias (110) e nas vias aéreas de pacientes asmáticos (27, 28).

Ademais, VIP e PACAP, que são peptídeos que pertencem à mesma família do glucagon, uma vez que apresentam homologia entre suas sequências de aminoácidos (111), também possuem a capacidade de relaxar o músculo liso das vias aéreas *in vitro* (112, 113). Esses dados podem nos levar a supor que alguma sequência de aminoácidos em comum na estrutura química desses peptídeos possa ser responsável pelo efeito relaxante que ambos apresentam. Apesar do glucagon, VIP e PACAP exercerem efeito semelhante no músculo liso das vias aéreas, possuem homologia nas sequências de aminoácidos tanto das suas estruturas quanto nas dos seus receptores e a ativação desses receptores culminarem na produção de AMPc intracelular (16, 18), o glucagon não reconhece os receptores de VIP e PACAP e nem vice-versa (114), o que sugere que o glucagon não se ligue ao mesmo alvo que esses 2 outros peptídeos para exercer suas ações.

Além disso, observamos que no brônquio e na traqueia, ambas as concentrações de glucagon reduziram os valores de Emax do carbacol, porém não modificaram os valores de pEC50 do agonista, o que nos mostra que o glucagon inibe o efeito máximo mas não altera a potência do carbacol. Esse resultado sugere que o glucagon não atua como modulador ortostérico dos receptores de carbacol presentes no músculo liso das vias aéreas, mas que provavelmente a ação do glucagon ocorra em outro alvo. Porém, também não se descarta a hipótese de que o glucagon possa modular de forma alostérica os receptores muscarínicos M₃, pois já foi observado em GPCRs que moduladores alostéricos podem bloquear o efeito de um agonista sem alterar a afinidade do mesmo pelo receptor (115). Tanto em brônquio quanto em traqueia, a concentração de 1 µM de glucagon foi a que apresentou melhor efeito anti-espasmódico, por isso, nos experimentos seguintes, o pré-tratamento com glucagon *in vitro* foi realizado somente nessa concentração. Além disso, passamos a utilizar somente a traqueia isolada, uma vez que obtivemos semelhante resposta anti-espasmódica do glucagon em ambos os órgãos, e pelo fato de que a maioria dos brônquios não sobrevive após a sua retirada do animal, o que implicaria em uma maior demanda de camundongos a serem utilizados.

No sistema não-invasivo de pletismografia barométrica de corpo inteiro, a metacolina promoveu aumento nos valores de *Penh* de forma concentração-dependente após 1, 3 ou 6 h da instilação com salina. Esse dado é coerente com a literatura, pois a metacolina, assim como o carbacol, induz contração da musculatura lisa das vias áreas através da ativação de receptores M₃ (116), e o *Penh* é um parâmetro utilizado em sistemas barométricos não invasivos como medida indireta

de broncoconstrição, em que normalmente se observa elevação do *Penh* para cada concentração do fármaco contrátil em comparação ao valor do *Penh* obtido após a aerolização de um tampão (63, 117). Nós escolhemos utilizar a metacolina como agente constrictor em vez do carbacol em todos os experimentos voltados para a análise da contração da musculatura lisa das vias aéreas *in vivo*, para tentarmos nos aproximar do que acontece nos testes de broncoprovocação da clínica médica, que são ferramentas empregadas no diagnóstico da asma, e nos quais a metacolina é utilizada como o principal estimulador da broncoconstrição de forma direta (118).

Ainda com relação ao efeito da metacolina sobre o parâmetro *Penh*, verificamos que a broncoconstrição induzida pela metacolina e que foi atribuída ao aumento nos valores do *Penh* ocorreu de forma mais acentuada 3 h após a administração i.n. com salina do que depois de 1 e 6 h dessa administração. Uma possível explicação para isso é que a re-exposição à metacolina no tempo de análise de 3 h pode ter exacerbado a resposta contrátil da musculatura lisa das vias aéreas dos camundongos que já haviam recebido esse estímulo no tempo de 1 h. Após 6 h do tratamento com salina, os animais apresentaram um perfil de contração da musculatura lisa das vias aéreas no pletismógrafo não-invasivo similar ao tempo de análise de 1 h. Essa redução no efeito da metacolina pode ser explicada pelo fato de que nessa última avaliação, esses animais já tinham sido aerolizados com metacolina por 2 vezes, e isso pode ter levado à dessensibilização dos receptores muscarínicos nas vias aéreas. Esses receptores pertencem à família dos GPCRs e dessa forma, quando são ativados continuamente pelos seus agonistas, são fosforilados por GRKs ou outras cinases, o que pode servir de sinal para serem degradados e assim ocorre uma diminuição da resposta gerada por esses receptores (119).

Após 1 e 3 h do tratamento i.n. com glucagon, observamos que esse hormônio inibiu o aumento de *Penh* induzido pela metacolina, ou seja, o glucagon também exerceu ação anti-espasmódica em modelo *in vivo* de contração da musculatura lisa das vias aéreas. Esse resultado reforça a compatibilidade entre os nossos dados e o dos estudos já mencionados que demonstraram que o glucagon melhora a função pulmonar de pacientes asmáticos por conta de uma ação broncodilatadora (27, 28). Percebemos ainda que essa ação anti-espasmódica do glucagon foi mais bem evidenciada no tempo de 3 h após a sua administração do que no tempo de 1 h, e, além disso, depois de 6 h do tratamento, o glucagon não é mais capaz de inibir a broncoconstrição induzida pela metacolina. Apesar do *Penh*

não ser um marcador altamente específico e sensível da responsividade das vias aéreas, essa metodologia não-invasiva é útil porque permite realizar medidas repetitivas ou estudos prolongados no mesmo animal (120). Por isso, utilizamos esse sistema para realizar uma cinética temporal a fim de investigar em qual tempo o glucagon apresentaria efeito anti-espasmódico sobre a contração da musculatura lisa das vias aéreas induzida por metacolina *in vivo*, para a partir daí, elegermos o melhor momento de análise, que de acordo com o resultado acima foi o de 3 h após o tratamento i.n. com glucagon. Acreditamos que 6 h após a administração i.n. do glucagon não tenha sido possível observar uma ação desse hormônio nas vias aéreas porque nesse tempo de análise o glucagon já deve ter sido completamente metabolizado. Essa metabolização pode dar-se através da ação local da enzima DDP-4 que é conhecida por degradar o glucagon nos rins e no sangue (16), mas que também é expressa nos pulmões (121, 122), ou por ele já ter sido completamente absorvido à circulação onde também sofreria ação da DDP-4 e/ou seria clivado pela enzima MGE, o que produziria miniglucagon que não é capaz de promover aumento nos níveis intracelulares de AMPc (24, 25).

Inicialmente, testamos a dose de 1 µg/Kg de glucagon no experimento *in vivo* porque na clínica médica a dose aproximada utilizada para combater quadros de hipoglicemia grave é a de 10 µg/Kg. Porém, na clínica, o glucagon é administrado por via i.v., s.c ou i.m. (123), ou seja, primeiro atinge a circulação, onde pode sofrer proteólise pelas enzimas DPP-4 (16), antes de chegar ao fígado para exercer seu efeito, e isso se diferencia do nosso modelo pois nele, o glucagon é administrado i.n. e assim alcança diretamente o seu local de ação que no caso é o trato respiratório.

Em seguida, utilizamos o sistema de pletismografia barométrica de corpo inteiro invasivo para realizar uma curva dose-resposta do glucagon e assim determinar a melhor dose a ser utilizada nos experimentos subsequentes. Apesar dessa metodologia invasiva apresentar algumas desvantagens, como a necessidade de anestesia e a impossibilidade de realizar testes em diferentes tempos no mesmo animal, ela nos fornece os parâmetros considerados padrão ouro para análise da função pulmonar, que são a RL e a Cdyn, além de permitir a administração dos estímulos broncoconstritores diretamente nos pulmões de forma controlada (124). No nosso estudo, a metacolina induziu um aumento na RL e redução na Cdyn dos camundongos A/J de forma concentração-dependente, o que é compatível com a literatura, que caracteriza a RL como o grau de dificuldade do fluxo de ar no sistema respiratório e que mostra que a contração do músculo liso das vias aéreas é um dos

fatores que obstruem a passagem do ar, o que aumenta a dificuldade da mesma, e como consequência ocorre a elevação da RL(60, 62, 64). Já a Cdyn é definida como a habilidade de expansão dos pulmões, e apesar de ela estar relacionada predominantemente à propriedade elástica do tecido pulmonar, já foi demonstrado que quando a musculatura lisa das vias aéreas contrai, ocorre de forma simultânea uma diminuição na Cdyn (65, 67).

O tratamento i.n. com glucagon em todas as doses (0,1; 1 e 10 µg/Kg) inibiu o aumento de RL promovido pela metacolina, sendo que essa inibição foi estatisticamente significativa apenas na concentração de 27 mg/mL de metacolina. Apenas a dose de 1 µg/Kg de glucagon também apresentou efeito inibitório estatisticamente significativo na concentração de 9 mg/mL de metacolina. Além disso, o tratamento com glucagon nas doses de 0,1 e 1 µg/Kg também foram capazes de inibir a redução da Cdyn induzida por concentrações crescentes de metacolina, porém, enquanto a dose de 0,1 µg/Kg de glucagon só teve efeito na concentração de 3 mg/mL de metacolina, a dose de 1 µg/Kg foi eficaz em todas as concentrações de metacolina (3; 9 e 27 mg/mL). A dose de 10 µg/Kg não apresentou nenhuma ação estatisticamente significativa sobre esse parâmetro. Uma hipótese que justificaria esse resultado é que pode ter ocorrido dessensibilização do GCGR quando a dose 10 µg/Kg foi utilizada, visto que, na família dos GPCRs, a dose do agonista é uma importante forma de regular e prevenir a superestimulação deles. Sendo assim, quando os receptores são altamente ativados por uma determinada dose do seu agonista os mesmos são dessensibilizados, o que reduz a sua habilidade de sinalizar uma determinada resposta (125, 126). Em complemento a essa informação sobre os GPCRs, trabalhos na literatura já apontaram que o GCGR pode ser internalizado caso seja submetido a uma intensa estimulação com seu agonista que é o glucagon (20, 22).

Com base nesses resultados, constatamos que dentre as 3 doses de glucagon testadas, a dose de 1 µg/Kg foi a que apresentou melhor ação tanto na RL quanto na Cdyn, e por isso ela foi escolhida para ser utilizada nos experimentos seguintes. Também notamos que essa dose de glucagon teve um maior efeito sobre as alterações de Cdyn provocadas pela metacolina do que nas de RL. A RL está associada tanto ao estreitamento das vias aéreas condutoras quanto à viscosidade do parênquima pulmonar, e envolve principalmente a participação das vias aéreas centrais. Por outro lado, a Cdyn está relacionada com eventos da periferia do pulmão, com destaque para a elasticidade do parênquima pulmonar (59, 63, 127).

Dessa forma, é postulado na literatura que mudanças na RL refletem alterações nas vias aéreas centrais, enquanto modificações na Cdyn repercutem alterações nas vias aéreas periféricas (127, 128). Com base nesses conceitos de RL e Cdyn e nos resultados descritos acima, podemos inferir que o local de ação do glucagon é situado nas regiões distais das vias aéreas.

Após termos demonstrado através dos sistemas de pletismográfica barométrica de corpo inteiro invasivo e não-invasivo que o glucagon inibe a ação espasmódica da metacolina na musculatura lisa das vias aéreas *in vivo*, fomos investigar se um tratamento longo com glucagon por via i.n. ou i.p. poderia ter algum efeito sobre a glicemia, visto que a principal ação desse hormônio é no fígado, onde ativa a glicogenólise e gliconeogênese e inibe a glicólise e glicogênese, o que culmina no aumento dos níveis de glicose sanguínea (13). No nosso estudo, observamos que tanto após 7 quanto 14 dias de tratamento i.n. ou i.p. com glucagon realizado uma vez ao dia, nenhuma das doses testadas interferiu nos níveis circulantes de glicose. Uma hipótese que justificaria esse resultado é que, na clínica, após 10 min da administração i.m. ou s.c. de glucagon já é notado um aumento na glicemia, com a ocorrência de um pico de resposta em torno de 26 e 30 min para cada via de administração, respectivamente (129). Essas concentrações de glicose permanecem aumentadas apenas por um período limitado, e após 2 h da administração do glucagon, a glicemia já é encontrada no seu nível normal (130, 131), por isso após 24 h dos tratamentos não observamos elevação nos níveis sanguíneos de glicose nos camundongos A/J. Nosso dado é animador visto que o glucagon não promoveu uma hiperglicemia sustentada por nenhuma das vias de administração, o que pode indicar pequenas chances do glucagon produzir efeitos persistentes indesejáveis.

Visto que o glucagon apresenta efeito anti-espasmódico sobre a contração da musculatura lisa das vias aéreas promovida por estímulos colinérgicos *in vitro* e *in vivo*, buscamos determinar se esse efeito ocorre através da ativação do GCGR. Para isso, retornamos ao sistema de banho de órgão isolado, onde observamos que a incubação prévia da traqueia com o antagonista do GCGR (des-His¹-[Glu⁹] glucagon amida) foi capaz de impedir o efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração induzida por carbacol, o que nos leva a crer que a ação anti-espasmódica do glucagon na musculatura lisa das vias aéreas é mediada pela ativação do seu receptor. Esse fenômeno está em concordância com o conhecimento já estabelecido de que o glucagon exerce a maioria das suas atividades no organismo através da

ligação ao seu receptor presente na membrana plasmática celular, o que desencadeia principalmente aumento nos níveis intracelulares de AMPc (15). Entretanto, para nossa surpresa, a traqueia pré-incubada com o antagonista do GCGR (des-His¹-[Glu⁹] glucagon amida), mas que não foi tratado com glucagon *in vitro*, apresentou uma inibição da resposta contrátil da musculatura lisa ao carbacol *in vitro* quando comparada ao grupo salina. Essa inibição ocorreu sobre a potência do carbacol, mas não sobre o efeito máximo desse agente colinérgico. Ainda não encontramos uma explicação satisfatória para esse fato, já que é relatado que dentre o grupo de antagonistas sintéticos do GCGR, o (des-His¹-[Glu⁹] glucagon amida) apresenta boa afinidade de ligação pelo GCGR e não ativa o sistema da AC (132-134).

Na etapa seguinte deste trabalho, avaliamos se o efeito anti-espasmódico apresentado pelo glucagon sobre a traqueia isolada seria dependente de fatores liberados pelas células epiteliais, uma vez que a literatura aponta a ativação do epitélio, com conseqüente secreção de mediadores químicos, como um dos principais mecanismos que desencadeiam o relaxamento do músculo liso das vias respiratórias (81, 135). Nesse contexto, algumas traqueias tiveram seu epitélio removido mecanicamente pela fricção da superfície interna traqueal com uma fina pinça de prata. Esse método de desepitelização das traqueias é bastante eficiente, como comprovado em estudos prévios do nosso laboratório, onde se observou através da histologia a ausência total de epitélio nas traqueias que foram submetidas a esse processo (136). Nossos experimentos mostraram que o pré-tratamento com glucagon apresentou efeito anti-espasmódico sobre a contração da musculatura lisa induzida por carbacol *in vitro* somente em preparações de traqueia que permaneceram com o epitélio intacto. Esses dados sugerem que o glucagon apresenta um efeito anti-espasmódico indireto, dependente de fatores liberados pelo epitélio. Essa nossa proposta é reforçada pela literatura que só aceita o envolvimento de fatores relaxantes derivados do epitélio numa ação broncodilatadora quando não se observa nenhum efeito relaxante na ausência da camada epitelial (137).

Adicionalmente, realizamos experimentos utilizando o propranolol que é um antagonista não-seletivo dos receptores β -adrenérgicos, e foi observado que o glucagon na presença do propranolol foi capaz de inibir a contração da musculatura lisa das traqueias produzida por adições crescentes de carbacol *in vitro*, o que confirmou que a ação do glucagon não é exercida diretamente no músculo liso mas

sim através do epitélio, uma vez que é conhecido que a célula muscular lisa expressa os receptores adrenérgicos $\beta 1$ e $\beta 2$, com destaque para o subtipo $\beta 2$, cuja ativação constitui um dos principais mecanismos que promovem o relaxamento do músculo liso das vias aéreas mediado pela elevação nas concentrações intracelulares de AMPc, e por isso seus agonistas adrenérgicos $\beta 2$ são um dos broncodilatadores mais importantes para o tratamento da asma (83, 85). Também descartamos a possibilidade do glucagon apresentar atividade anti-espasmódica de forma direta no músculo liso das vias aéreas através da inibição dos receptores M_3 , pois, como já foi mencionado, nos ensaios com traqueia isolada o antagonista do GCGR inibiu o efeito do glucagon *in vitro*, o que mostrou que o glucagon não atua sobre receptores M_3 , mas depende da ligação ao GCGR para exercer sua ação anti-espasmódica.

Com o intuito de compreender melhor esse efeito indireto do glucagon, a expressão do GCGR foi analisada por *Western blot*, no pulmão, na traqueia que não sofreu alteração no epitélio e na traqueia desepitelizada. Observamos a presença do GCGR no pulmão, que foi o nosso controle positivo, pois o GCGR já tinha sido encontrado no tecido pulmonar por outros autores (16), e na traqueia com epitélio intacto. Entretanto, na traqueia em que o epitélio estava ausente não foi detectada expressão do GCGR. Com base nesse resultado, sugerimos que, nas vias aéreas de grande calibre, o GCGR está presente apenas no epitélio e não na célula muscular lisa, e é através da ativação desse GCGR epitelial que o glucagon exerce seu efeito anti-espasmódico.

Dando continuidade as nossas análises, tentamos elucidar quais fatores liberados pelo epitélio seriam responsáveis pela ação anti-espasmódica do glucagon *in vitro* e *in vivo*. Quando pré-incubamos a traqueia com o inibidor não-seletivo de NOS conhecido como L-NAME, observamos que o efeito anti-espasmódico do glucagon foi inibido, o que mostra que o NO participa dessa ação anti-espasmódica do glucagon *in vitro*. Além disso, o pré-tratamento i.p. de camundongos A/J com L-NAME também inibiu o efeito protetor do glucagon sobre o aumento de RL e redução da Cdyn provocados por metacolina *in vivo*, o que confirma a participação do NO na ação do glucagon. Estudos utilizando células endoteliais vasculares tem relatado que aumento nos níveis intracelulares de AMPc ativa a enzima NOS-3, que é expressa de forma constitutiva no epitélio, através de dois possíveis mecanismos, o que culmina na liberação de NO por essa enzima. Um dos mecanismos descreve que o AMPc pode estimular a PKA que, em sequencia, fosforila a NOS-3, o que leva

a ativação desse subtipo de NOS. No outro mecanismo, em alguns fenótipos celulares como o endotélio vascular, a elevação nos níveis de AMPc mediada pela isoforma III da enzima AC está associada ao aumento de Ca^{+2} citosólico, e esse íon Ca^{+2} é capaz de estimular a NOS-3 (138). A partir dessas informações, apesar de não ser o mesmo tipo celular, sugerimos que no nosso modelo, o glucagon ativa seus receptores presente no epitélio, o que aumenta os níveis de AMPc intracelulares (18). Essa elevação de AMPc estimula a enzima NOS-3, que é expressa nas células epiteliais, a produzir e liberar NO. Em seguida, o NO se difunde até a célula muscular lisa das vias aéreas onde, como já é conhecido, ativa a enzima GCs, o que resulta na elevação da concentração intracelular de GMPc e assim promove o relaxamento dessa célula muscular lisa (98).

Resultados similares aos ensaios com L-NAME *in vitro* e *in vivo* foram obtidos quando traqueia isolada foi incubada com um inibidor não-seletivo da enzima COX, denominado indometacina, previamente ao tratamento com glucagon *in vitro* e quando esse inibidor da COX foi administrado i.p. em alguns camundongos 30 min antes da instilação com glucagon. Esses dados mostraram que, além do NO, alguns produtos da ativação de COX liberados pelo epitélio também parecem participar do efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração da musculatura lisa das vias aéreas induzida por estímulos colinérgicos *in vitro* e *in vivo*. Dentre o conjunto de mediadores produzidos pela COX que apresentam atividade relaxante na célula muscular lisa das vias aéreas, destacam-se a PGE_2 e a PGI_2 . Ambas as prostaglandinas atuam diretamente sobre seus receptores expressos no músculo liso das vias aéreas, sendo descritos os receptores EP2 e EP4 para a PGE_2 e o receptor IP para a PGI_2 , cuja ativação resulta no aumento dos níveis intracelulares de AMPc e consequente relaxamento dessa célula (83, 95). Com isso, acreditamos que o efeito anti-espasmódico do glucagon na musculatura lisa das vias aéreas provavelmente depende da liberação de PGE_2 e/ou PGI_2 pelo epitélio. Ainda não é bem definido na literatura como a elevação de AMPc pode influenciar na produção de prostaglandinas pela COX. Um trabalho publicado em 1999 mostrou, em células endoteliais de aorta bovina, que agentes que aumentam os níveis de AMPc citosólico, como o *forskolin*, inibem a atividade da COX-1 sem alterar a expressão da mesma, porém induzem a expressão da COX-2 (139). Em contrapartida, pesquisas mais recentes mostraram que a elevação de AMPc em adipócitos e hepatócitos produzida pelo aumento da taxa plasmática de glucagon em relação a insulina promove aumento na expressão de COX-1 e COX-2, bem como na

produção de PGE₂ por essas enzimas (140, 141). Apesar dessa divergência, sugerimos que o glucagon através da ligação ao seu receptor presente no epitélio, gera um aumento de AMPc intracelular, o que poderia ativar e elevar a expressão da enzima COX-1, e/ou induzir a expressão de COX-2, o que culminaria na liberação de PGE₂ e/ou PGI₂ pelas células epiteliais e poderia explicar porque o efeito anti-espasmódico do glucagon *in vivo* é melhor após 3 h de tratamento.

Quando avaliamos a possível participação do CO nesse efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração da musculatura lisa traqueal induzida por carbacol *in vitro*, verificamos que o glucagon foi capaz de exercer sua ação anti-espasmódica na musculatura lisa das traqueias pré-incubadas com ZnPP IX, um inibidor da enzima HO, o que descarta o envolvimento do CO no efeito anti-espasmódico do glucagon *in vitro*. Esse dado diferencia o mecanismo de ação do glucagon na musculatura lisa das vias aéreas dos mecanismos de ação do VIP e PACAP nesse mesmo tipo celular, já que estudos mostram que a ação anti-espasmódica tanto do VIP quanto do PACAP é dependente de CO *in vitro* (112, 142, 143), sugerindo que esses peptídeos não causam relaxamento das vias aéreas através da ligação ao GCGR.

A partir dessas observações, sugerimos que o efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração da musculatura lisa das vias aéreas promovida por agentes colinérgicos *in vitro* e *in vivo* ocorre de forma indireta, através da ativação do GCGR presente no epitélio, que culmina com a liberação de fatores que relaxam a musculatura lisa das vias aéreas, como NO e derivados da ação de COX, incluindo PGE₂ e/ou PGI₂. Nós sugerimos ainda que esses fatores do epitélio possam estar atuando através de 2 mecanismos. Um dos mecanismos seria um sinergismo entre NO e produtos da ativação de COX, pois a administração tanto de L-NAME quanto de indometacina inibiu por completo a ação anti-espasmódica do glucagon *in vitro* e *in vivo*, o que nos leva a inferir que o epitélio das vias aéreas, após ser estimulado com glucagon, produz NO e PGI₂ e/ou PGE₂, em uma concentração que isoladamente nenhum deles seja capaz de relaxar as células musculares lisas das vias aéreas, porém, quando esses mediadores estão presentes simultaneamente, atuam de forma sinérgica, o que culmina no relaxamento da musculatura lisa das vias aéreas.

O outro mecanismo que propomos é que ou o NO estimularia a produção de PGE₂ e/ou PGI₂ que então atuariam relaxando o músculo liso, ou essas prostaglandinas induziram a liberação de NO que então promoveria o relaxamento

da célula muscular lisa das vias aéreas. Esse mecanismo foi sugerido com base na literatura onde alguns trabalhos descrevem que o NO ativa a enzima COX, de forma ainda não bem esclarecida, o que leva a produção de prostaglandinas, especialmente a PGE₂ (144-146), enquanto alguns autores já relataram que as prostaglandinas, principalmente a PGE₂, são capazes de estimular a enzima NOS a liberarem NO (147, 148).

Mediante a caracterização desse novo efeito extra-hepático do glucagon, e sabendo da relevância em regular a contração da musculatura lisa das vias aéreas em diversas doenças, como a asma, resolvemos avaliar se o tratamento i.n. com glucagon teria ação sobre a hiper-reatividade das vias aéreas em resposta à metacolina utilizando um modelo de asma aguda de 2 dias de desafio i.n. com OVA em camundongos A/J. Escolhemos trabalhar com essa linhagem de camundongos, pois ela é considerada uma boa produtora de IgE, desenvolve alterações estruturais no pulmão semelhantes às observadas nos indivíduos asmáticos (149) e os modelos de asma em camundongos A/J já estão bem estabelecidos no nosso laboratório. Como desde o início deste trabalho já tínhamos a intenção de avaliar o efeito do tratamento com glucagon em modelos murinos de asma, utilizamos essa cepa de camundongos ao longo de todo o nosso estudo.

No nosso modelo, a metacolina induziu aumento de RL e redução de C_{dyn} de forma concentração-dependente 24 h após o último desafio com OVA, sendo que essas alterações foram proeminentes nos animais apenas desafiados com OVA em comparação com os que somente receberam salina, e por isso uma resposta de hiper-reatividade das vias aéreas foi constituída nesse grupo submetido aos desafios com OVA. Esse resultado já era esperado, pois uma das principais características da asma é a ocorrência da hiper-reatividade das vias aéreas, que é uma constricção exagerada das vias aéreas desencadeada por diversos estímulos químicos, físicos ou farmacológicos (49). Em ambos os parâmetros de função pulmonar avaliados, RL e C_{dyn}, o tratamento i.n. com glucagon 1 h antes ou depois do desafio antigênico com OVA inibiu parcialmente a hiper-reatividade das vias aéreas em resposta a aerossóis de metacolina, porém no tempo de 6 h após o tratamento, esse hormônio não teve efeito algum sobre o fenômeno de hiper-reatividade. O efeito anti-espasmódico do glucagon na musculatura lisa das vias aéreas que foi descrito nos resultados anteriores pode contribuir para essa inibição da hiper-reatividade das vias aéreas à metacolina observada nos grupos tratados com esse hormônio uma vez

que o músculo liso das vias aéreas é considerado a principal célula efetora da contração e hiper-reatividade das vias aéreas na asma (51).

Além da célula muscular lisa das vias aéreas, é relatado que a inflamação e as alterações estruturais do tecido pulmonar características da asma tem papel importante no desenvolvimento da hiper-reatividade das vias aéreas (53). No nosso modelo de asma aguda de 2 dias consecutivos de provocações com OVA em camundongos A/J, apesar de ser um período curto, já é possível identificar uma resposta inflamatória das vias aéreas constituída pelo acúmulo de eosinófilos e linfócitos, e também detectar alguns aspectos do remodelamento das vias aéreas como hipersecreção de muco e fibrose peribrônquica (150). Esse conjunto de informações nos levou a tratar os animais com o glucagon em diferentes tempos com relação à instilação com OVA a fim de avaliar qual seria o efeito dele em diferentes pontos da cascata inflamatória que culmina na resposta exagerada das vias aéreas à metacolina.

O fato do tratamento com glucagon 1 h antes da provocação com OVA ter sido capaz de prevenir a ocorrência da hiper-reatividade das vias aéreas sugere que ele também possa estar atuando sobre os mastócitos, pois a ativação deles é importante para o início da fase efetora da asma (33). Dados recentemente publicados por nós corroboram com essa hipótese, pois demonstramos que em tecido subcutâneo de ratos sensibilizados com OVA, o tratamento com glucagon 1 h antes da incubação desses tecidos com OVA inibe a liberação de histamina pelos mastócitos. Também descrevemos que a administração i.p. diária de glucagon (10 ou 100 µg/Kg) durante 7 dias, uma vez ao dia, em camundongos *Swiss-Webster*, reduz o número de mastócitos no peritônio e mesentério (151). Como já foi mencionado, o GCGR expresso no epitélio das vias aéreas ao ser ativado pelo glucagon promove a liberação de PGI₂ e/ou PGE₂. Esse mecanismo, além de ser responsável pelo efeito anti-espasmódico do glucagon, também pode estar envolvido no efeito preventivo desse hormônio sobre a hiper-reatividade brônquica. Pois já foi mostrado na literatura que a administração de PGI₂ realizada previamente a desafios antigênicos em modelos animais de asma altera as funções das células DC, o que reduz o recrutamento de eosinófilos e a secreção de citocinas pelos linfócitos Th₂ (152, 153). Além disso, em estudos com animais, já foi observado que a administração de PGE₂ antes da provocação com antígenos é capaz de atenuar a eosinofilia nas vias aéreas e diminuir a presença de leucotrienos cisteínicos no lavado broncoalveolar (154).

A inibição da hiper-reatividade das vias aéreas frente ao estímulo da metacolina pelo tratamento i.n. com glucagon 1 h depois da instilação com OVA pode ser explicada pela ação relaxante de fatores liberados pelo epitélio, que incluem NO e/ou PGE₂ e/ou PGI₂, no músculo liso e também por alguns efeitos desses fatores em outras células que participam da fisiopatologia da asma. Ainda é debatido o papel do NO na resposta inflamatória na asma, pois apesar de pacientes asmáticos apresentarem elevados níveis de NO no ar exalado por eles, o que é associado aos sintomas dessa doença, e a inibição da enzima NOS-2 atenuar a deposição de fibras elásticas e colágenas nos pulmões de cobaias submetidas a protocolo de asma alérgica (96), em algumas pesquisas o NO também exibe propriedades anti-inflamatórias, como induzir apoptose de eosinófilos *in vitro* e inibir o recrutamento de eosinófilos em ratos sensibilizados e desafiados com OVA (155, 156). Divergências também existem com relação a PGE₂ e PGI₂ na asma. Enquanto alguns autores tem descrito que ocorre uma produção intensa dessas prostaglandinas nos pulmões dos asmáticos (157), e que a inalação delas está associada à tosse nesses indivíduos (158, 159), outros mostraram que camundongos sensibilizados e desafiados com alérgenos, porém deficientes no gene do receptor da PGI₂ apresentam resposta inflamatória pulmonar exagerada e hiper-reatividade das vias aéreas em comparação a camundongos do tipo selvagem (160). Além disso, também já foi relatado que a PGE₂ inibe a proliferação, produção de colágeno e diferenciação em miofibroblastos dos fibroblastos pulmonares (161) e que a sua administração i.n. em pacientes com asma atenua o processo inflamatório induzido por alérgenos, através da inibição da ativação de mastócitos e do recrutamento de eosinófilos (95).

O tratamento i.n. com glucagon realizado 6 h após o desafio com OVA não teve ação sobre a hiper-reatividade das vias aéreas frente ao estímulo com metacolina provavelmente porque a resposta inflamatória no tecido pulmonar nesse tempo de 6 h está mais intensa e consolidada do que no tempo de 1 h após a administração i.n. com OVA, o que torna mais difícil perceber algum efeito inibitório do tratamento. Em um modelo murino de asma foi mostrado que após 3 h de uma única provocação com OVA em animais que produzem elevada quantidade de IgE, os eosinófilos já margeiam a superfície endotelial e após 6 h começam a se infiltrar nos tecidos peribrônquios e perivascularares enquanto os linfócitos T já estão infiltrados nesses tecidos nesse mesmo tempo. Também começa a ser observada produção de muco pelas células Clara a partir do tempo de 6 h após um único

desafio com OVA (162). No entanto, não podemos inferir ainda que o glucagon não atua acelerando a resolução da resposta inflamatória, uma vez que este não é o melhor modelo de estudo para se observar este fenômeno. Outros estudos serão realizados para melhor elucidar este fenômeno.

Diante disso tudo, o glucagon além de apresentar efeito anti-espasmódico sobre a contração da musculatura lisa das vias aéreas induzida por estímulos colinérgicos *in vitro* e *in vivo*, e de parcialmente impedir a hiper-reatividade das vias aéreas em resposta à metacolina, também mostra tendência em possuir uma ação anti-inflamatória na asma, porém, essa ação será mais bem investigada em outros trabalhos.

6. Conclusão

Em conjunto, nossos resultados descrevem uma nova ação extra-hepática do glucagon que é o efeito anti-espasmódico sobre a contração da musculatura lisa das vias aéreas induzida por agentes colinérgicos. Esse novo efeito do glucagon é mediado pela ativação do seu receptor expresso no epitélio das vias aéreas, o que culmina na liberação de NO e produtos da ativação de COX, que através de um sinergismo ou um estimulando a secreção do outro, atuam sobre o músculo liso das vias aéreas inibindo a sua contração (Figura 6.1).

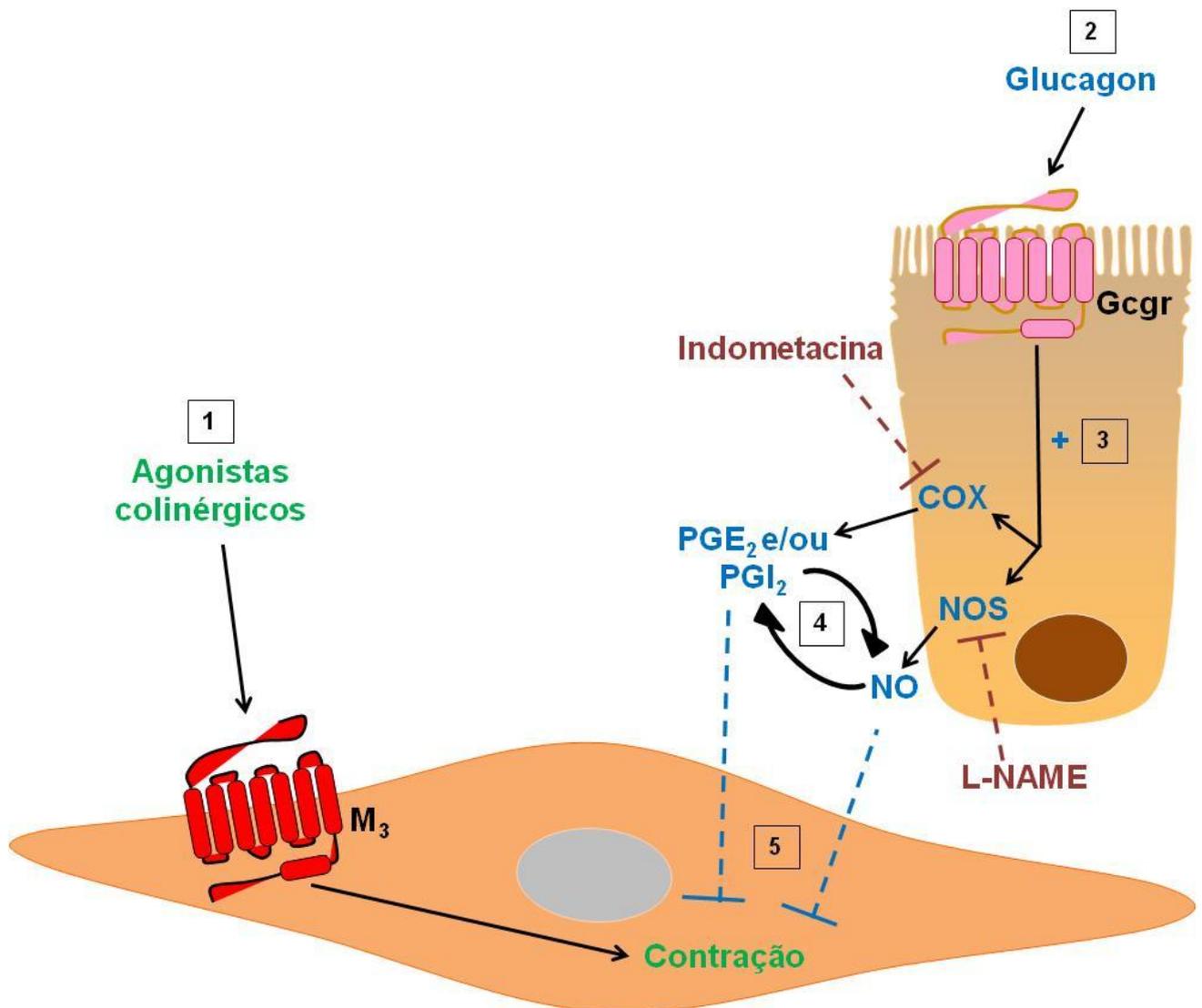


Figura 6.1: Representação esquemática do possível mecanismo molecular envolvido no efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração da musculatura lisa das vias aéreas de camundongos A/J. Agonistas colinérgicos, como carbacol e metacolina, ativam receptores muscarínicos M_3 expressos no músculo liso das vias aéreas e dessa forma promovem a contração dessa célula (1). No nosso estudo, sugerimos que o glucagon se ligue ao seu receptor (GCGR) presente nas células epiteliais (2), o que culmina na ativação de COX e NOS, visto que a indometacina e o L-NAME foram capazes de inibir o efeito anti-espasmódico do glucagon (3). A ativação de COX leva a síntese e secreção de PGI_2 e/ou PGE_2 , e a ativação de NOS culmina na produção e liberação NO pela célula epitelial. Esses fatores atuam sobre a célula muscular lisa e inibem a sua contração através de dois prováveis mecanismos: um induzindo a produção e secreção do outro (4) ou eles atuam de forma sinérgica (5), uma vez que a inibição tanto da COX como da NOS leva a uma total reversão do efeito do glucagon.

7. Referências Bibliográficas

1. Jackson MA, Caputo N, Castle JR, David LL, Roberts CT, Jr., Ward WK. Stable liquid glucagon formulations for rescue treatment and bi-hormonal closed-loop pancreas. *Current Diabetes Reports*. 2012;12(6):705-10.
2. Demong DE, Miller MW. Glucagon Rceptor Antagonists in Development. In: Jones RM. *New Therapeutic Strategies for Type 2 Diabetes: Small Molecule Approaches*. Royal Society of Chemistry. Rahway, USA; 2012. 429-63.
3. Unson CG. Expression of glucagon receptors in tetracycline-inducible HEK293S GnT1- stable cell lines: an approach toward purification of receptor protein for structural studies. *Biopolymers*. 2008;90(3):287-96.
4. Nam BH, Kim YO, Kong HJ, Kim WJ, Lee SJ, Choi TJ. Identification and characterization of the prepro-vasoactive intestinal peptide gene from the teleost *Paralichthys olivaceus*. *Veterinary Immunology And Immunopathology*. 2009;127(3-4):249-58.
5. Nussdorfer GG, Bahcelioglu M, Neri G, Malendowicz LK. Secretin, glucagon, gastric inhibitory polypeptide, parathyroid hormone, and related peptides in the regulation of the hypothalamus- pituitary-adrenal axis. *Peptides*. 2000;21(2):309-24.
6. Onoue S, Misaka S, Yamada S. Structure-activity relationship of vasoactive intestinal peptide (VIP): potent agonists and potential clinical applications. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives Of Pharmacology*. 2008;377(4-6):579-90.
7. Kieffer TJ, Habener JF. The glucagon-like peptides. *Endocrine Reviews*. 1999;20(6):876-913.
8. Katz LS, Gosmain Y, Marthinet E, Philippe J. Pax6 regulates the proglucagon processing enzyme PC2 and its chaperone 7B2. *Molecular And Cellular Biology*. 2009;29(8):2322-34.

9. Pocai A. Unraveling oxyntomodulin, GLP1's enigmatic brother. *Journal Of Endocrinology*. 2012;215(3):335-46.
10. Quesada I, Tuduri E, Ripoll C, Nadal A. Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *Journal Of Endocrinology*. 2008;199(1):5-19.
11. Le Marchand SJ, Piston DW. Glucose suppression of glucagon secretion: metabolic and calcium responses from alpha-cells in intact mouse pancreatic islets. *Journal Of Biological Chemistry*. 2010;285(19):14389-98.
12. Holst JJ, Christensen M, Lund A, de Heer J, Svendsen B, Kielgast U, et al. Regulation of glucagon secretion by incretins. *Diabetes, Obesity & Metabolism*. 2011;13
13. Bansal P, Wang Q. Insulin as a physiological modulator of glucagon secretion. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*. 2008;295(4):E751-61.
14. Vuguin PM, Charron MJ. Novel insight into glucagon receptor action: lessons from knockout and transgenic mouse models. *Diabetes, Obesity & Metabolism*. 2011;13 Suppl 1:144-50.
15. Habegger KM, Heppner KM, Geary N, Bartness TJ, DiMarchi R, Tschop MH. The metabolic actions of glucagon revisited. *Nature Reviews Endocrinology*. 2010;6(12):689-97.
16. Authier F, Desbuquois B. Glucagon receptors. *Cellular And Molecular Life Sciences*. 2008;65(12):1880-99.
17. Neumann JM, Couvineau A, Murail S, Lacapere JJ, Jamin N, Laburthe M. Class-B GPCR activation: is ligand helix-capping the key? *Trends In Biochemical Sciences*. 2008;33(7):314-9.

18. Cho YM, Merchant CE, Kieffer TJ. Targeting the glucagon receptor family for diabetes and obesity therapy. *Pharmacology & Therapeutics*. 2012;135(3):247-78.
19. Longuet C, Sinclair EM, Maida A, Baggio LL, Maziarz M, Charron MJ, et al. The glucagon receptor is required for the adaptive metabolic response to fasting. *Cell Metabolism*. 2008;8(5):359-71.
20. Krilov L, Nguyen A, Miyazaki T, Unson CG, Williams R, Lee NH, et al. Dual mode of glucagon receptor internalization: role of PKC α , GRKs and beta-arrestins. *Experimental Cell Research*. 2011;317(20):2981-94.
21. Jeon KW. *International Review of Cell and Molecular Biology*: Academic Press. Burlington, USA : Elsevier Science ; 2012.
22. Krilov L, Nguyen A, Miyazaki T, Unson CG, Bouscarel B. Glucagon receptor recycling: role of carboxyl terminus, beta-arrestins, and cytoskeleton. *American Journal Of Physiology Cell Physiology*. 2008;295(5):C1230-7.
23. Moran GW, O'Neill C, Padfield P, McLaughlin JT. Dipeptidyl peptidase-4 expression is reduced in Crohn's disease. *Regulatory Peptides*. 2012;177(1-3):40-5.
24. Fontes G, Lajoix AD, Bergeron F, Cadel S, Prat A, Foulon T, et al. Miniglucagon (MG)-generating endopeptidase, which processes glucagon into MG, is composed of N-arginine dibasic convertase and aminopeptidase B. *Endocrinology*. 2005;146(2):702-12.
25. Joslin EP, Kahn CR. *Diabetes Mellitus*. 14^a ed. Filadélfia, USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
26. Aswar M, Aswar U, Subhedar N. Glucagon Secreting Cells Responds to Insulin Secretion In vitro Using Immunocytochemistry. *Journal Of Young Pharmacists*. 2010;2(2):144-7.
27. Sherman MS, Lazar EJ, Eichacker P. A bronchodilator action of glucagon. *The Journal Of Allergy And Clinical Immunology*. 1988;81(5 Pt 1):908-11.

28. Melanson SW, Bonfante G, Heller MB. Nebulized glucagon in the treatment of bronchospasm in asthmatic patients. *The American Journal Of Emergency Medicine*. 1998;16(3):272-5.
29. Imbruce R, Goldfedder A, Maguire W, Briscoe W, Nair S. The effect of glucagon on airway resistance. *Journal Of Clinical Pharmacology*. 1975;15(10):680-4.
30. Wilber ST, Wilson JE, Blanda M, Gerson LW, Meerbaum SO, Janas G. The bronchodilator effect of intravenous glucagon in asthma exacerbation: a randomized, controlled trial. *Annals Of Emergency Medicine*. 2000;36(5):427-31.
31. Yu M, Eckart MR, Morgan AA, Mukai K, Butte AJ, Tsai M, et al. Identification of an IFN-gamma/mast cell axis in a mouse model of chronic asthma. *The Journal Of Clinical Investigation*. 2011;121(8):3133-43.
32. Kondo N, Matsui E, Nishimura A, Kaneko H. Pharmacogenetics of asthma in children. *Allergy, Asthma & Immunology Research*. 2010;2(1):14-9.
33. Madore AM, Laprise C. Immunological and genetic aspects of asthma and allergy. *Journal Of Asthma And Allergy*. 2010;3:107-21.
34. Mannam P, Siegel MD. Analytic review: management of life-threatening asthma in adults. *Journal Of Intensive Care Medicine*. 2010;25(1):3-15.
35. Adcock IM, Caramori G, Chung KF. New targets for drug development in asthma. *Lancet*. 2008;372(9643):1073-87.
36. Pawankar R, Canonica GW, Holgate ST, Lockey RF. Allergic diseases and asthma: a major global health concern. *Current Opinion In Allergy And Clinical Immunology*. 2012;12(1):39-41.
37. de Farias MR, Rosa AM, Hacon Sde S, de Castro HA, Ignotti E. Prevalence of asthma in schoolchildren in Alta Floresta- a municipality in the southeast of the Brazilian Amazon. *Revista Brasileira De Epidemiologia*. 2010;13(1):49-57.

38. Fiori NS, Goncalves H, Dumith SC, Cesar MA, Menezes AM, Macedo SE. Ten-year trends in prevalence of asthma in adults in southern Brazil: comparison of two population-based studies. *Cadernos de saude publica / Ministerio da Saude, Fundacao Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saude Publica*. 2012;28(1):135-44.
39. Bahadori K, Doyle-Waters MM, Marra C, Lynd L, Alasaly K, Swiston J, et al. Economic burden of asthma: a systematic review. *BMC Pulmonary Medicine*. 2009;9:24.
40. Murdoch JR, Lloyd CM. Chronic inflammation and asthma. *Mutation Research*. 2010;690(1-2):24-39.
41. Stumm CL, Wettlaufer SH, Jancar S, Peters-Golden M. Airway remodeling in murine asthma correlates with a defect in PGE2 synthesis by lung fibroblasts. *American Journal Of Physiology Lung Cellular And Molecular Physiology*. 2011;301(5):L636-44.
42. Taher YA, Henricks PA, van Oosterhout AJ. Allergen-specific subcutaneous immunotherapy in allergic asthma: immunologic mechanisms and improvement. *The Libyan Journal Of Medicine*. 2010;5:1-11.
43. Poon AH, Eidelman DH, Martin JG, Laprise C, Hamid Q. Pathogenesis of severe asthma. *Clinical And Experimental Allergy : Journal Of The British Society For Allergy And Clinical Immunology*. 2012;42(5):625-37.
44. Wegmann M. Targeting eosinophil biology in asthma therapy. *American Journal Of Respiratory Cell And Molecular Biology*. 2011;45(4):667-74.
45. Holgate ST. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nature Medicine*. 2012;18(5):673-83.
46. Lloyd CM, Hessel EM. Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nature Reviews Immunology*. 2010;10(12):838-48.

47. Barnes PJ. Pathophysiology of allergic inflammation. *Immunological Reviews*. 2011;242(1):31-50.
48. Brannan JD, Loughheed MD. Airway hyperresponsiveness in asthma: mechanisms, clinical significance, and treatment. *Frontiers In Physiology*. 2012;3:460.
49. Dekkers BG, Maarsingh H, Meurs H, Gosens R. Airway structural components drive airway smooth muscle remodeling in asthma. *Proceedings Of The American Thoracic Society*. 2009;6(8):683-92.
50. Siddiqui S, Redhu NS, Ojo OO, Liu B, Irechukwu N, Billington C, et al. Emerging airway smooth muscle targets to treat asthma. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 2013;26(1):132-44.
51. Black JL, Panettieri RA, Jr., Banerjee A, Berger P. Airway smooth muscle in asthma: just a target for bronchodilation? *Clinics In Chest Medicine*. 2012;33(3):543-58.
52. West AR, Syong HT, Siddiqui S, Pascoe CD, Murphy TM, Maarsingh H, et al. Airway contractility and remodeling: Links to asthma symptoms. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 2013;26(1):3-12.
53. Busse WW. The relationship of airway hyperresponsiveness and airway inflammation: Airway hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance. *Chest*. 2010;138(2 Suppl):4S-10S.
54. Hirota JA, Nguyen TT, Schaafsma D, Sharma P, Tran T. Airway smooth muscle in asthma: phenotype plasticity and function. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 2009;22(5):370-8.
55. Halwani R, Al-Muhsen S, Hamid Q. Airway remodeling in asthma. *Current Opinion In Pharmacology*. 2010;10(3):236-45.

56. Rydell-Tormanen K, Risse PA, Kanabar V, Bagchi R, Czubryt MP, Johnson JR. Smooth muscle in tissue remodeling and hyper-reactivity: Airways and arteries. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 2013;26(1):13-23.
57. Gazdar AF. Should we continue to use the term non-small-cell lung cancer? *Annals Of Oncology : Official Journal Of The European Society For Medical Oncology / ESMO*. 2010;21 Suppl 7:vii225-9.
58. Williamson JP, Phillips MJ, Hillman DR, Eastwood PR. Managing obstruction of the central airways. *Internal Medicine Journal*. 2010;40(6):399-410.
59. Hyde DM, Hamid Q, Irvin CG. Anatomy, pathology, and physiology of the tracheobronchial tree: emphasis on the distal airways. *The Journal Of Allergy And Clinical Immunology*. 2009;124(6 Suppl):S72-7.
60. Jindal SK. *Textbook of Pulmonary and Critical Care Medicine (2 Vol)*. Nova Dehli, India: Jaypee Brothers Medical Publishers; 2011.
61. Hill J, Olson E. *Muscle 2-Volume Set: Fundamental Biology and Mechanisms of Disease*. Califórnia, Usa: Elsevier Science; 2012.
62. Dixon RE, Santana LF. A Ca²⁺- and PKC-driven regulatory network in airway smooth muscle. *The Journal Of General Physiology*. 2013;141(2):161-4.
63. Glaab T, Taube C, Braun A, Mitzner W. Invasive and noninvasive methods for studying pulmonary function in mice. *Respiratory Research*. 2007;8:63.
64. Zin WA. Métodos e técnicas para a monitorização das propriedades elásticas e resistivas dos pulmões e da parede torácica na insuficiência respiratória aguda. *Jornal de Pneumologia*. 1990;16(2):91-6.
65. Johnson JR, Hamid Q. Appraising the small airways in asthma. *Current Opinion In Pulmonary Medicine*. 2012;18(1):23-8.

66. Donn SM, Sinha SK. Manual of Neonatal Respiratory Care. Nova York, USA: Springer; 2012.
67. Kelly VJ, Brown NJ, King GG, Thompson BR. A method to determine in vivo, specific airway compliance, in humans. *Medical & biological engineering & computing*. 2010;48(5):489-96. Epub 2010/03/11.
68. Chitano P. Models to understand contractile function in the airways. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 2011;24(5):444-51.
69. Doeing DC, Solway J. Airway Smooth Muscle in the Pathophysiology and Treatment of Asthma. *J Appl Physiol*. 2013.
70. Kistemaker LE, Oenema TA, Meurs H, Gosens R. Regulation of airway inflammation and remodeling by muscarinic receptors: perspectives on anticholinergic therapy in asthma and COPD. *Life Sciences*. 2012;91(21-22):1126-33.
71. Kolahian S, Gosens R. Cholinergic regulation of airway inflammation and remodelling. *Journal Of Allergy*. 2012;2012:681258.
72. Meurs H, Dekkers BG, Maarsingh H, Halayko AJ, Zaagsma J, Gosens R. Muscarinic receptors on airway mesenchymal cells: Novel findings for an ancient target. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 2013;26(1):145-55.
73. Wessler I, Kirkpatrick CJ. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *British Journal Of Pharmacology*. 2008;154(8):1558-71.
74. Avellar MC, Siu ER, Yasuhara F, Marostica E, Porto CS. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in the male reproductive tract: expression and function in rat efferent ductules and epididymis. *Journal Of Molecular Neuroscience*. 2010;40(1-2):127-34.

75. Jakubik J, Michal P, Machova E, Dolezal V. Importance and prospects for design of selective muscarinic agonists. *Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. 2008;57 Suppl 3:S39-47.
76. Wu J, Lukas RJ. Naturally-expressed nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Biochemical Pharmacology*. 2011;82(8):800-7.
77. Shah N, Khurana S, Cheng K, Raufman JP. Muscarinic receptors and ligands in cancer. *American Journal Of Physiology Cell Physiology*. 2009;296(2):C221-32.
78. Moulton BC, Fryer AD. Muscarinic receptor antagonists, from folklore to pharmacology; finding drugs that actually work in asthma and COPD. *British Journal Of Pharmacology*. 2011;163(1):44-52..
79. Sanderson MJ, Delmotte P, Bai Y, Perez-Zogbi JF. Regulation of airway smooth muscle cell contractility by Ca²⁺ signaling and sensitivity. *Proceedings Of The American Thoracic Society*. 2008;5(1):23-31.
80. Barnes PJ. Pharmacology of airway smooth muscle. *American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine*. 1998;158(5 Pt 3):S123-32.
81. de Sousa AA, Soares PM, de Almeida AN, Maia AR, de Souza EP, Assreuy AM. Antispasmodic effect of *Mentha piperita* essential oil on tracheal smooth muscle of rats. *Journal Of Ethnopharmacology*. 2010;130(2):433-6.
82. Hoetzel A, Dolinay T, Vallbracht S, Zhang Y, Kim HP, Ifedigbo E, et al. Carbon monoxide protects against ventilator-induced lung injury via PPAR-gamma and inhibition of Egr-1. *American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine*. 2008;177(11):1223-32.
83. Billington CK, Ojo OO, Penn RB, Ito S. cAMP regulation of airway smooth muscle function. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 2013;26(1):112-20.

84. Michel MC, Parra S. Similarities and differences in the autonomic control of airway and urinary bladder smooth muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives Of Pharmacology*. 2008;378(2):217-24.
85. Barisione G, Baroffio M, Crimi E, Brusasco V. Beta-Adrenergic Agonists. *Pharmaceuticals*. 2010;3(4):1016-44.
86. Michel MC, Ochodnický P, Summers RJ. Tissue functions mediated by beta(3)-adrenoceptors-findings and challenges. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives Of Pharmacology*. 2010;382(2):103-8.
87. Tanaka Y, Yamashita Y, Michikawa H, Horinouchi T, Koike K. Pharmacological characterization of the beta-adrenoceptor that mediates the relaxant response to noradrenaline in guinea-pig tracheal smooth muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives Of Pharmacology*. 2007;375(1):51-64.
88. Ruan YC, Zhou W, Chan HC. Regulation of smooth muscle contraction by the epithelium: role of prostaglandins. *Physiology (Bethesda)*. 2011;26(3):156-70.
89. Mitchell JA, Ali F, Bailey L, Moreno L, Harrington LS. Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. *Experimental Physiology*. 2008;93(1):141-7.
90. Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, And Vascular Biology*. 2011;31(5):986-1000.
91. Botting R, Botting J. C14 Non-steroidal anti-inflammatory drugs. In: Nijkamp FP, Parnham MJ, editors. *Principles of Immunopharmacology*: Birkhäuser Basel; 2011. p. 573-84.
92. Kam P, So A. COX-3: Uncertainties and controversies. *Current Anaesthesia & Critical Care*. 2009;20(1):50-3.

93. Liao MH, Shih CC, Tsao CM, Chen SJ, Wu CC. RhoA/Rho-Kinase and Nitric Oxide in Vascular Reactivity in Rats with Endotoxaemia. *Plos One*. 2013;8(2):e56331.
94. Aso H, Ito S, Mori A, Suganuma N, Morioka M, Takahara N, et al. Differential regulation of airway smooth muscle cell migration by e-prostanoid receptor subtypes. *American Journal Of Respiratory Cell And Molecular Biology*. 2013;48(3):322-9.
95. Nagai H. Prostaglandin as a target molecule for pharmacotherapy of allergic inflammatory diseases. *Allergology International : Official Journal Of The Japanese Society Of Allergology*. 2008;57(3):187-96.
96. Ghosh S, Erzurum SC. Nitric oxide metabolism in asthma pathophysiology. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 2011;1810(11):1008-16.
97. Strapkova A, Antosova M. Competition of NO synthases and arginase in the airways hyperreactivity. *General Physiology And Biophysics*. 2011;30(1):75-83.
98. Perez-Zoghbi JF, Bai Y, Sanderson MJ. Nitric oxide induces airway smooth muscle cell relaxation by decreasing the frequency of agonist-induced Ca²⁺ oscillations. *The Journal Of General Physiology*. 2010;135(3):247-59.
99. Wilkinson WJ, Kemp PJ. Carbon monoxide: an emerging regulator of ion channels. *The Journal Of Physiology*. 2011;589(Pt 13):3055-62.
100. Vijayan V, Mueller S, Baumgart-Vogt E, Immenschuh S. Heme oxygenase-1 as a therapeutic target in inflammatory disorders of the gastrointestinal tract. *World Journal Of Gastroenterology*. 2010;16(25):3112-9.
101. Almolki A, Taille C, Martin GF, Jose PJ, Zedda C, Conti M, et al. Heme oxygenase attenuates allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity in guinea pigs. *American Journal Of Physiology Lung Cellular And Molecular Physiology*. 2004;287(1):L26-34.

102. Almolki A, Guenegou A, Golda S, Boyer L, Benallaoua M, Amara N, et al. Heme oxygenase-1 prevents airway mucus hypersecretion induced by cigarette smoke in rodents and humans. *The American Journal Of Pathology*. 2008;173(4):981-92.
103. Zieba BJ, Artamonov MV, Jin L, Momotani K, Ho R, Franke AS, et al. The cAMP-responsive Rap1 guanine nucleotide exchange factor, Epac, induces smooth muscle relaxation by down-regulation of RhoA activity. *The Journal Of Biological Chemistry*. 2011;286(19):16681-92.
104. Roscioni SS, Maarsingh H, Elzinga CR, Schuur J, Menzen M, Halayko AJ, et al. Epac as a novel effector of airway smooth muscle relaxation. *Journal Of Cellular And Molecular Medicine*. 2011;15(7):1551-63.
105. Bazan-Perkins B. cGMP reduces the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ loading in airway smooth muscle cells: a putative mechanism in the regulation of Ca²⁺ by cGMP. *Journal Of Muscle Research And Cell Motility*. 2012;32(6):375-82.
106. Wu BN, Lin RJ, Lo YC, Shen KP, Wang CC, Lin YT, et al. KMUP-1, a xanthine derivative, induces relaxation of guinea-pig isolated trachea: the role of the epithelium, cyclic nucleotides and K⁺ channels. *British Journal Of Pharmacology*. 2004;142(7):1105-14.
107. Hamelmann E, Schwarze J, Takeda K, Oshiba A, Larsen GL, Irvin CG, et al. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine*. 1997;156(3 Pt 1):766-75.
108. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*. 1985;150(1):76-85.
109. Rosenberry TL, Sonoda LK, Dekat SE, Cusack B, Johnson JL. Monitoring the reaction of carbachol with acetylcholinesterase by thioflavin T fluorescence and acetylthiocholine hydrolysis. *Chemico-Biological Interactions*. 2008;175(1-3):235-41.

110. Blumenthal MN, Brody TM. Studies on the mechanism of drug-induced bronchiolar relaxation in the guinea pig. *The Journal Of Allergy*. 1969;44(2):63-9.
111. Mentlein R. Mechanisms underlying the rapid degradation and elimination of the incretin hormones GLP-1 and GIP. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2009;23(4):443-52.
112. Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Burel D, Wurtz O, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacological Reviews*. 2009;61(3):283-357.
113. Tannu SA, Renzetti LM, Tare N, Ventre JD, Lavelle D, Lin TA, et al. Dual bronchodilatory and pulmonary anti-inflammatory activity of RO5024118, a novel agonist at vasoactive intestinal peptide VPAC2 receptors. *British Journal Of Pharmacology*. 2010;161(6):1329-42.
114. Perret J, Van Craenenbroeck M, Langer I, Vertongen P, Gregoire F, Robberecht P, et al. Mutational analysis of the glucagon receptor: similarities with the vasoactive intestinal peptide (VIP)/pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP)/secretin receptors for recognition of the ligand's third residue. *The Biochemical Journal*. 2002;362(Pt 2):389-94.
115. Kenakin TP. Biased signalling and allosteric machines: new vistas and challenges for drug discovery. *British Journal Of Pharmacology*. 2012;165(6):1659-69.
116. Tsurikisawa N, Oshikata C, Tsuburai T, Saito H, Sekiya K, Tanimoto H, et al. Bronchial hyperresponsiveness to histamine correlates with airway remodelling in adults with asthma. *Respiratory Medicine*. 2010;104(9):1271-7.
117. Bazan-Perkins B, Vargas MH, Sanchez-Guerrero E, Chavez J, Montano LM. Spontaneous changes in guinea-pig respiratory pattern during barometric plethysmography: role of catecholamines and nitric oxide. *Experimental Physiology*. 2004;89(5):623-8.

118. Borges Mde C, Ferraz E, Vianna EO. Bronchial provocation tests in clinical practice. *Revista Paulista De Medicina*. 2011;129(4):243-9.
119. Gurevich VV, Gurevich EV. Rich tapestry of G protein-coupled receptor signaling and regulatory mechanisms. *Molecular Pharmacology*. 2008;74(2):312-6.
120. Berndt A, Leme AS, Williams LK, Von Smith R, Savage HS, Stearns TM, et al. Comparison of unrestrained plethysmography and forced oscillation for identifying genetic variability of airway responsiveness in inbred mice. *Physiological Genomics*. 2011;43(1):1-11.
121. Wesley UV, Tiwari S, Houghton AN. Role for dipeptidyl peptidase IV in tumor suppression of human non small cell lung carcinoma cells. *International Journal Of Cancer*. 2004;109(6):855-66..
122. Santos AM, Jung J, Aziz N, Kissil JL, Pure E. Targeting fibroblast activation protein inhibits tumor stromagenesis and growth in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(12):3613-25.
123. Kedia N. Treatment of severe diabetic hypoglycemia with glucagon: an underutilized therapeutic approach. *Diabetes, Metabolic Syndrome And Obesity : Targets And Therapy*. 2011;4:337-46.
124. Hoymann HG. Lung function measurements in rodents in safety pharmacology studies. *Frontiers In Pharmacology*. 2012;3:156.
125. Gainetdinov RR, Premont RT, Bohn LM, Lefkowitz RJ, Caron MG. Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annual Review Of Neuroscience*. 2004;27:107-44.
126. Kelly E, Bailey CP, Henderson G. Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *British Journal Of Pharmacology*. 2008;153 Suppl 1:S379-88.

127. Irvin CG, Bates JH. Measuring the lung function in the mouse: the challenge of size. *Respiratory Research*. 2003;4:4.
128. Hartney JM, Coggins KG, Tilley SL, Jania LA, Lovgren AK, Audoly LP, et al. Prostaglandin E2 protects lower airways against bronchoconstriction. *American Journal Of Physiology Lung Cellular And Molecular Physiology*. 2006;290(1):L105-13.
129. Pearson T. Glucagon as a treatment of severe hypoglycemia: safe and efficacious but underutilized. *The Diabetes Educator*. 2008;34(1):128-34.
130. Aaos, Caroline NL, Elling B, Smith M. Nancy Caroline's Emergency Care in the Streets. Londres, UK: Jones & Bartlett Learning, LLC; 2011.
131. L. L. Glucagon for injection (rDNA origin): indicated for treatment of severe hypoglycemia in diabetes patients and as a diagnostic aid in radiological examinations. The Free Library. 1999.
132. Abdelmelek H, Fechtali T, Rouanet JL, Montaron A, Lachuer J, Pequignot JM, et al. Effects of intracerebroventricular injections of des-His1 (Glu9) glucagon amide on the regulatory thermogenesis in muscovy ducklings. *Comptes Rendus De l'Academie Des Sciences Serie III, Sciences De La Vie*. 2000;323(3):267-71.
133. Dunning BE, Gerich JE. The role of alpha-cell dysregulation in fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes and therapeutic implications. *Endocrine Reviews*. 2007;28(3):253-83.
134. Li XC, Liao TD, Zhuo JL. Long-term hyperglucagonaemia induces early metabolic and renal phenotypes of Type 2 diabetes in mice. *Clin Sci (Lond)*. 2008;114(9):591-601.
135. Folkerts G, Nijkamp FP. Airway epithelium: more than just a barrier! *Trends In Pharmacological Sciences*. 1998;19(8):334-41.

136. Coelho LP, Serra MF, Pires AL, Cordeiro RS, Rodrigues e Silva PM, dos Santos MH, et al. 7-Epiclusianone, a tetraprenylated benzophenone, relaxes airway smooth muscle through activation of the nitric oxide-cGMP pathway. *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*. 2008;327(1):206-14.
137. Vanhoutte PM. Airway epithelium-derived relaxing factor: myth, reality, or naivety? *American Journal Of Physiology Cell Physiology*. 2013;304(9):C813-20.
138. Neto M, Lunardi C, Rodrigues G, Bendhack L. Vasodilatation induced by forskolin involves cyclic GMP production. *Journal of Biophysical Chemistry*. 2011;2:373-9.
139. Rocca B, Spain LM, Ciabattoni G, Patrono C, FitzGerald GA. Differential expression and regulation of cyclooxygenase isozymes in thymic stromal cells. *J Immunol*. 1999;162(8):4589-97.
140. Madsen L, Pedersen LM, Liaset B, Ma T, Petersen RK, van den Berg S, et al. cAMP-dependent signaling regulates the adipogenic effect of n-6 polyunsaturated fatty acids. *The Journal Of Biological Chemistry*. 2008;283(11):7196-205.
141. Madsen L, Pedersen LM, Lillefosse HH, Fjaere E, Bronstad I, Hao Q, et al. UCP1 induction during recruitment of brown adipocytes in white adipose tissue is dependent on cyclooxygenase activity. *Plos One*. 2010;5(6):e11391.
142. Udem BJ, Ellis JL, Meeker S, Fischer A, Canning BJ. Inhibition by zinc protoporphyrin-IX of vasoactive intestinal peptide-induced relaxations of guinea pig isolated trachea. *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*. 1996;278(2):964-70.
143. Kastin A. *Handbook of Biologically Active Peptides*. 2^a ed. São Diego, USA: Elsevier Science; 2013.
144. Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(15):7240-4.

145. Mollace V, Muscoli C, Masini E, Cuzzocrea S, Salvemini D. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacological Reviews*. 2005;57(2):217-52.
146. Chen LG, Yang LL, Wang CC. Anti-inflammatory activity of mangostins from *Garcinia mangostana*. *Food And Chemical Toxicology : An International Journal Published For The British Industrial Biological Research Association*. 2008;46(2):688-93.
147. Mhanna MJ, Dreshaj IA, Haxhiu MA, Martin RJ. Mechanism for substance P-induced relaxation of precontracted airway smooth muscle during development. *The American Journal Of Physiology*. 1999;276(1 Pt 1):L51-6.
148. Namkoong S, Lee SJ, Kim CK, Kim YM, Chung HT, Lee H, et al. Prostaglandin E2 stimulates angiogenesis by activating the nitric oxide/cGMP pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Experimental & Molecular Medicine*. 2005;37(6):588-600.
149. Keane-Myers A, Wysocka M, Trinchieri G, Wills-Karp M. Resistance to antigen-induced airway hyperresponsiveness requires endogenous production of IL-12. *J Immunol*. 1998;161(2):919-26.
150. Serra MF, Anjos-Valotta EA, Olsen PC, Couto GC, Jurgilas PB, Cotias AC, et al. Nebulized lidocaine prevents airway inflammation, peribronchial fibrosis, and mucus production in a murine model of asthma. *Anesthesiology*. 2012;117(3):580-91.
151. Insuela DBR, Silva PMR, Martins MA, Carvalho VF. The Yin Yang of hormones that control glucose homeostasis in asthma. *Journal Of Allergy & Therapy*. 2013;S11:01-8.
152. Idzko M, Hammad H, van Nimwegen M, Kool M, Vos N, Hoogsteden HC, et al. Inhaled iloprost suppresses the cardinal features of asthma via inhibition of airway dendritic cell function. *The Journal Of Clinical Investigation*. 2007;117(2):464-72.

153. Hayashi M, Koya T, Kawakami H, Sakagami T, Hasegawa T, Kagamu H, et al. A prostacyclin agonist with thromboxane inhibitory activity for airway allergic inflammation in mice. *Clinical And Experimental Allergy : Journal Of The British Society For Allergy And Clinical Immunology*. 2010;40(2):317-26.
154. Martin JG, Suzuki M, Maghni K, Pantano R, Ramos-Barbon D, Ihaku D, et al. The immunomodulatory actions of prostaglandin E2 on allergic airway responses in the rat. *J Immunol*. 2002;169(7):3963-9.
155. Ilmarinen-Salo P, Moilanen E, Kinnula VL, Kankaanranta H. Nitric oxide-induced eosinophil apoptosis is dependent on mitochondrial permeability transition (mPT), JNK and oxidative stress: apoptosis is preceded but not mediated by early mPT-dependent JNK activation. *Respiratory Research*. 2012;13:73.
156. Oliveira MS, de OBE, Zamuner S, Pires AL, Ferreira TP, Cordeiro RS, et al. Suppressive effects of nitric oxide-releasing prednisolone NCX-1015 on the allergic pleural eosinophil recruitment in rats. *Clinical And Experimental Allergy : Journal Of The British Society For Allergy And Clinical Immunology*. 2008;38(11):1830-7.
157. Herrerias A, Torres R, Serra M, Marco A, Pujols L, Picado C, et al. Activity of the cyclooxygenase 2-prostaglandin-E prostanoid receptor pathway in mice exposed to house dust mite aeroallergens, and impact of exogenous prostaglandin E2. *J Inflamm (Lond)*. 2009;6:30.
158. Ishiura Y, Fujimura M, Nobata K, Oribe Y, Abo M, Myou S. Prostaglandin I2 enhances cough reflex sensitivity to capsaicin in the asthmatic airway. *Cough*. 2007;3:2.
159. Safholm J, Dahlen SE, Delin I, Maxey K, Stark K, Cardell LO, et al. PGE2 maintains the tone of the guinea pig trachea through a balance between activation of contractile EP1 receptors and relaxant EP2 receptors. *British Journal Of Pharmacology*. 2013;168(4):794-806.

160. Wilson SM, Shen P, Rider CF, Traves SL, Proud D, Newton R, et al. Selective prostacyclin receptor agonism augments glucocorticoid-induced gene expression in human bronchial epithelial cells. *J Immunol.* 2009;183(10):6788-99.
161. Huang SK, Scruggs AM, Donaghy J, McEachin RC, Fisher AS, Richardson BC, et al. Prostaglandin E(2) increases fibroblast gene-specific and global DNA methylation via increased DNA methyltransferase expression. *FASEB Journal : Official Publication Of The Federation Of American Societies For Experimental Biology.* 2012;26(9):3703-14.
162. Haile S, Lefort J, Joseph D, Gounon P, Huerre M, Vargaftig BB. Mucous-cell metaplasia and inflammatory-cell recruitment are dissociated in allergic mice after antibody- and drug-dependent cell depletion in a murine model of asthma. *American Journal Of Respiratory Cell And Molecular Biology.* 1999;20(5):891-902.

8. Anexos

8.1. Artigo publicado durante o período do mestrado

Review Article

The Yin Yang of hormones that control glucose homeostasis in asthma

Daniella BR Insuela, Patrícia MR Silva, Marco A Martins and Vinicius F. Carvalho*.
Laboratório de Inflamação, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz; Av.
Brasil, nº 4365, Manguinhos, CEP 21045-900, Rio de Janeiro, Brazil.

*Author for correspondence:

Dr. Vinicius F. Carvalho

Laboratório de Inflamação

Fundação Oswaldo Cruz

Av. Brasil, nº 4365, Manguinhos,

Rio de Janeiro, Brazil.

E.mail: vfrias@ioc.fiocruz.br

Tel. 55.21. 2562-1334; fax 55.21. 2562-135

The Yin Yang of Hormones that Control Glucose Homeostasis in Asthma

Daniella BR Insuela, Patrícia MR Silva, Marco A Martins and Vinicius F Carvalho*

Laboratório de Inflamação, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Brazil

Abstract

Asthma is a chronic inflammatory disease whose prevalence has increased in the last 50 years. Several hormones can determine the course of asthma pathogenesis. Furthermore, some endocrine disorders, including diabetes and obesity, have been identified as important factors that influence the prevalence of asthma. These endocrine disorders are characterized by presenting an imbalance in blood hormones levels that regulate glucose metabolism, including hyperglycemic and hypoglycemic hormones. This review gives an update of the state-of-the-art concerning the effect of hormones that control glucose homeostasis on asthma pathogenesis and development. Here, we proposed that while hypoglycemic hormones, including insulin and leptin aggravate asthma, the hyperglycemic hormones, as glucagon, glucocorticoids and epinephrine, have a protective effect on asthma.

Keywords: Asthma; Glucagon; Glucocorticoid; Glucose metabolism; Hormones; Insulin

Introduction

Asthma is one of the main chronic diseases of contemporary man, affecting people in countries at all stages of economic and social development and is a major public health burden worldwide. The global prevalence of asthma has markedly increased over the last 50 years. Around 300 million people have asthma worldwide, and each year 250 thousand people die due to this disease [1,2]. Asthma is a chronic inflammatory disease of the lungs characterized by variable airway obstruction in association with airway hyperresponsiveness (AHR) that leads to symptoms including recurrent episodes of wheezing, chest tightness and coughing [3,4].

The inflammatory response observed in airways of asthmatic patients is characterized by accumulation of mast cells, eosinophils and type 2 CD4⁺ T cells (Th2 cells). Th2 cells are central to the pathogenesis of asthma, since Th2-type cytokines orchestrate the allergic inflammatory response in asthma, including IgE synthesis, Th2 cells, eosinophils and mast cells survival, eosinophil and mast cell maturation and basophil recruitment [3,5]. Moreover, the infiltration of type 17 CD4⁺ T cells (Th17 cells) in the airway walls of some asthmatic patients and the severity of AHR is correlated with the presence of these cells. This evidence suggests the role of Th17 cells in driving airway inflammation and pathological changes in some cases of asthma. In fact, activation of Th17 cells is closely associated with asthma severity, neutrophil recruitment and development of steroid-resistance in asthmatic subjects [6,7]. Moreover, asthmatics show structural changes in the airway wall called airway remodeling. These changes including epithelial shedding increased airway smooth muscle mass and mucus-producing goblet cells in the epithelium or submucosal glands and sub-epithelial fibrosis [4].

In type 1 diabetes, glucagon and insulin secretion from pancreatic α - and β -cells, respectively, become dysregulated with hypersecretion of glucagon and hyposecretion of insulin resulting in hyperglycemia [8]. Uncontrolled type 1 diabetic patients present a lower prevalence of allergic diseases, including asthma [9,10]. One hypothesis to explain this negative correlation between type 1 diabetes and asthma is that autoimmune diseases, including diabetes, involve a Th1 response while allergic diseases are associated with the Th2 phenotype [11,12]. We showed that alloxan-diabetic rats presented decrease in the allergen-induced acute protein leakage and eosinophil infiltration in skin, intestine and pleural space. This suppression of allergic responses in

diabetic rats was correlated with reduction in IgE synthesis and number of local mast cells [13-16].

Hypoglycemic Hormones and Asthma

The maintenance of glucose homeostasis requires a tight regulation of glucose utilization by liver, muscle and fat, besides the glucose production and release in the blood by liver. This homeostatic process is controlled by two classes of hormones: i) hypoglycemics that induce uptake of glucose to peripheral tissues; ii) hyperglycemics that stimulate hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis [17]. Among the hypoglycemic hormones, stands insulin that is produced by pancreatic β cells and acts by inhibiting hepatic gluconeogenesis and glycogenolysis and stimulating glucose storage by liver, muscle and fat as promoting glucose uptake and utilization by muscle and adipose tissues [18].

In diabetic patients, treatment with inhaled insulin induces decrease in forced expiratory volume in 1 second (FEV-1) [19]. Moreover, uncontrolled insulin-dependent diabetic patients present a less incidence of asthma [9,10]. In inflammatory and structural cells involved in asthma pathogenesis, insulin is able to modulate T cell differentiation promoting a shift towards a Th2-type response, which is central to the pathogenesis of asthma, with an increase in the number of Th2 cells and Th2-cytokine profile [20]. Furthermore, insulin promotes mast cell survival and a more robust antigen-triggered mast cell degranulation [21,22], and enhances contractility and proliferation of airway smooth muscle [23], through a mechanism dependent on PI3K pathway activation [21,24]. In keeping with this, hyporesponsiveness to antigen observed in the airways and pleural space of diabetic rats was reversed by treatment of the animals with insulin [25,26]. In association, these evidences indicate that insulin seems to aggravate asthma symptoms.

***Corresponding author:** Vinicius F Carvalho, Laboratório de Inflamação, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, nº 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil, Tel: 55-21-2562-1334; Fax: 55-21-2562-1357; E-mail: vfrias@ioc.fiocruz.br

Received December 15, 2012; **Accepted** January 10, 2013; **Published** January 15, 2013

Citation: Insuela DBR, Silva PMR, Martins MA, Carvalho VF (2013) The Yin Yang of Hormones that Control Glucose Homeostasis in Asthma. J Allergy Ther S11: 001. doi:10.4172/2155-6121.S11-001

Copyright: © 2013 Insuela DBR, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Although insulin is the major hypoglycemic hormone, it is known that other hormones can reduce the circulating levels of glucose. These hormones are produced by adipose tissue, including adiponectin and leptin, and gastrointestinal tract, as glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP) and glucagon-like peptide-1 (GLP-1) [27,28]. Animal models of untreated type 1 and type 2 diabetes present leptin deficiency accompanied by insulin resistance [29,30], and central or peripheral leptin administration was able to restore normoglycemia in animal models of type 1 and type 2 diabetes [31-35]. This hypoglycemic effect of leptin in diabetes is associated with lowers circulating glucagon levels, decreases gluconeogenic gene expression and improves insulin sensitivity and release [35]. Furthermore, leptin is able to suppress glucose production in non-diabetic animals by a mechanism associated with decrease of hepatic glycogenolysis without affecting glucose uptake [36].

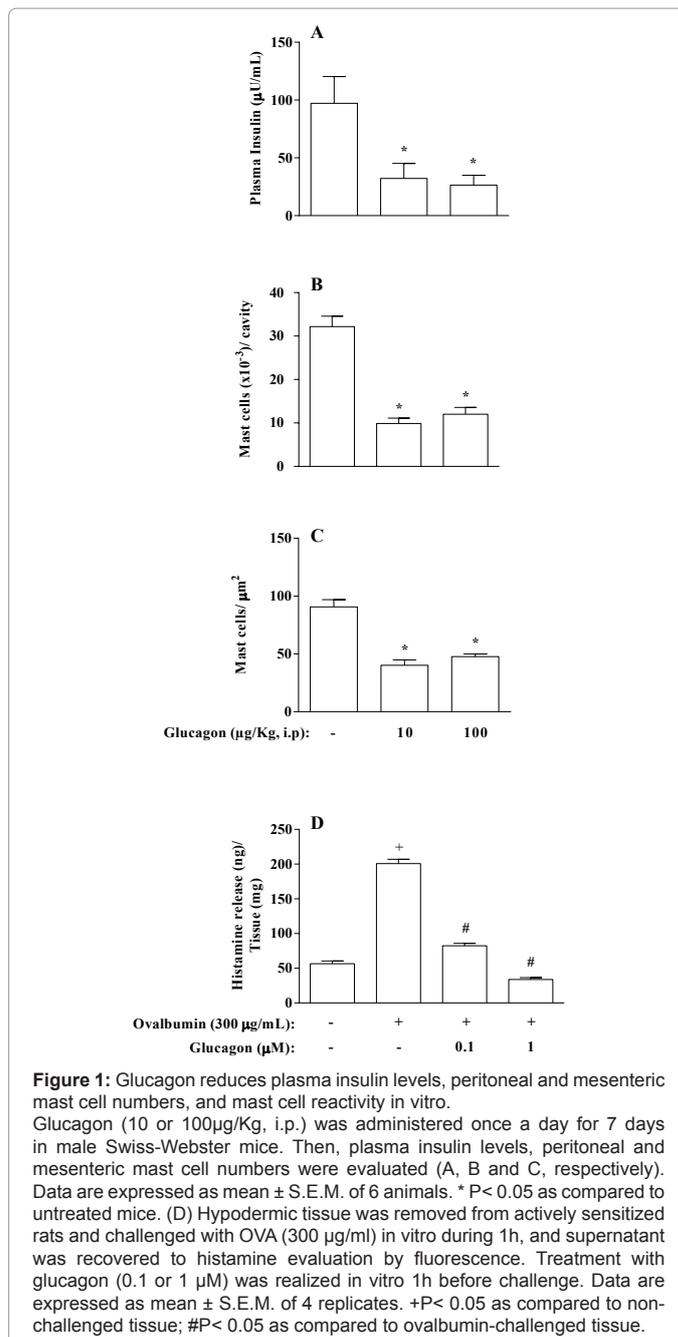
Receptors for both leptin and adiponectin are expressed in lungs [37], however only some experimental evidences supported that leptin and adiponectin could have a role in the pathogenesis of asthma. Leptin has a pro-inflammatory profile in cells that have an important role in asthma, including mast cell activation, CD4⁺ T cells proliferation and induction of cytokine release and migration of eosinophils [38-41]. Furthermore, leptin increases inflammatory cells mobilization to bronchoalveolar fluid and airway hyperreactivity following allergen challenge [42].

In addition to leptin, another important hormone produced by adipose tissue that influences glucose homeostasis is adiponectin. Adiponectin induces decrease of systemic glucose levels by increasing glucose uptake, reducing hepatic glucose production and improving insulin sensitivity [43-45]. Unlike leptin, adiponectin seems to present an anti-asthmatic profile since adiponectin knockout mice presented an increase of allergic airway inflammation [46], and adiponectin administration was able to reduce allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation in mice [47]. However, adiponectin may have an important pro-inflammatory action in severe asthma and, especially, in steroid-resistance in asthmatic subjects since this hormone is highly expressed in synovium of patients with rheumatoid arthritis [48,49], activates synovial fibroblast inducing cytokine release and matrix degrading effects [50,51], and induces maturation and activation of dendritic cells polarizing naïve CD4⁺ T cells into Th17 phenotype [52].

GIP and GLP-1 modulate glucose homeostasis through of an “incretin” effect, which is a potentiation of glucose stimulated insulin secretion in an additive manner [53,54]. However, until now there is no information about the role of these incretins on allergic diseases, including asthma, and on inflammatory cells which are central in development of asthma.

Hyperglycemic Hormones and Asthma

The hyperglycemic hormones are secreted during fasting to maintaining blood glucose levels and preventing hypoglycaemia. Glucagon is secreted by pancreatic α -cells, and considered as the body's primary defence against low blood glucose levels [55]. Glucagon induces hyperglycemia through stimulation of synthesis and mobilization of hepatic glucose, by activating glycogenolysis and gluconeogenesis and inhibition of glycolysis and glycogenesis [56,57]. Here, we showed that mice treated i.p. with glucagon for 7 consecutive days presented a reduction in the plasma insulin levels (Figure 1), which could be partly explained by the hyperglycemic effect of this hormone too. Moreover, although fasting plasma glucagon levels are not elevated in patients



with type 1 and type 2 diabetes [58,59], significant elevations were shown with serial sampling in both type of diabetes [60,61].

In asthmatic patients, glucagon presents a relaxant action on the airway smooth muscle inducing an improvement in the lung function [62,63], however this effect of glucagon needs to be further elucidated since some studies did not show any significant bronchodilator effect of glucagon on these patients [64,65]. Despite this controversy about the bronchodilator effect of glucagon in asthmatics, the lungs of rats express glucagon receptor (GcgR), and glucagon relaxes guinea pig bronchiolar smooth muscle *in vitro* independently of β -adrenergic receptor stimulation [66,67]. We showed that glucagon inhibited the allergen-evoked histamine release from rat subcutaneous tissue fragments *in vitro* (Figure 1), indicating a putative mast cell-stabilizing properties by

this hormone. Moreover, i.p. daily treatment with glucagon for 7 days induced a decrease in peritoneal and mesenteric mast cell numbers in a clear association with reduction of plasma insulin levels (Figure 1). Other important inflammatory cells for development of asthma that may have its activity negatively modulated by glucagon are lymphocytes, since these cells express GcgR. However, although lymphocytes express GcgR, this hormone was not able to change the proliferation of these cells induced by anti-CD3 or LPS [68]. Nevertheless, glucagon can act reducing Th2 cytokine production by lymphocytes since the activation of GcgR induces an increase in the intracellular cAMP levels [67], and forskolin, an adenylate cyclase activator that elevates cAMP, induces apoptosis of T cells *in vitro* [69].

Beyond glucagon, others hormones including epinephrine and glucocorticoids increasing blood glucose levels in response to hypoglycemia and stress situation [17]. Epinephrine is mainly produced in the adrenal medulla by a methylation reaction from norepinephrine catalyzed by the enzyme phenylethanolamine N-methyltransferase. Epinephrine induces hyperglycemia through activation of glycogenolysis and hepatic gluconeogenesis, stimulation of glucagon and inhibition of insulin release, and induction of insulin resistance. As glucagon, epinephrine induces glycogenolysis and gluconeogenesis by increasing the intracellular levels of cAMP through the activation of β -adrenergic receptors [70,71]. Although, epinephrine is less potent in inducing hyperglycemia than glucagon, epinephrine becomes essential in the control of glucose homeostasis when glucagon actions are impaired, [72].

Airway smooth muscle expresses all subtypes of epinephrine receptors, with predominance of the β_2 receptors. The activation of these receptors in airway smooth muscle promotes opposite effects; while α receptors induces contraction, the β receptors relax the muscle. An imbalance in the expression of these receptors on airway smooth muscle could be involved in the etiology of bronchial asthma [73]. Moreover, it was observed that asthmatic patients present a decrease in levels of endogenous epinephrine and this fact could explain the high effectiveness associated to the administration of exogenous epinephrine on asthma [74]. Furthermore, epinephrine was used as a standard treatment for severe asthma before the development of β_2 receptors selective agonists. Nowadays, epinephrine is used when asthmatic patients do not respond to the conventional treatment [75,76] and the inhaled β_2 agonists associated with inhaled corticosteroids became the standard therapy for asthma [77]. In addition, activation of β_2 receptors inhibits the function of various inflammatory cells involved in asthma pathogenesis, including IgE-evoked release of histamine, PGD₂ e cysteinyl-leukotrienes by mast cells [78]; ovalbumin-induced airway eosinophil infiltration and adhesion of eosinophils to lung fibroblast [79,80]; IL-4 and IL-13 production by human T cells [81,82]; pro-inflammatory and pro-fibrotic mediators release and matrix production by lung fibroblasts [83,84].

Glucocorticoids are produced in the adrenal cortex under the control of hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis [85]. Moreover, the 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β -HSD) enzymes can modulate the biological effects of glucocorticoids in target tissues since 11 β -HSD type 1 amplifies local glucocorticoids action by conversion of cortisone to cortisol [86]. Glucocorticoids increase blood glucose by increasing hepatic glucose production, decreasing insulin-dependent glucose uptake into peripheral tissues, and inhibiting insulin release from pancreatic β -cells [87]. Furthermore, disruption of glucocorticoid receptor (GR) in hepatocytes leads to hypoglycemia during prolonged starvation, and inactivation of GR in hepatocytes reduces blood glucose

levels in streptozotocin-induced diabetes [88].

Currently, glucocorticoids are recommended as first-line therapy for all patients with persistent asthma [89]. Glucocorticoids have its anti-inflammatory effect on several structural and inflammatory cells involved in asthma pathogenesis [90]. In inflammatory cells, glucocorticoids inhibit activation and proliferation of T cells and induce apoptosis of T cells, B cells, eosinophils and mast cells [91]. Moreover, glucocorticoids suppress the activity of the transcription factor GATA-3, that regulates the expression of genes encoding cytokines involved in asthma pathophysiology including IL-4, IL-5 and IL-13, in Th2 cells which results in decreased production of these cytokines by these cells [92]. However, the action of glucocorticoids in Th17 cells is not well established yet. Although glucocorticoids are able to reduce the production of IL-17 in asthmatics [93], this hormone does not inhibit cytokine production by Th17 cells *in vitro*, and the treatment with dexamethasone *in vivo* did not minimize inflammation and hyperreactivity of the airways of mice that received Th17 cells and were challenged with ovalbumin [94]. Furthermore, glucocorticoids inhibit the release of Th2-cytokines, including IL-4 and IL-5, and lipid mediators by eosinophils and mast cells [91]. We previously described that alloxan-induced diabetic rats presented an increase in the circulating corticosterone levels [14,95]. Besides, the decrease in the mast cell numbers and reactivity and antigen-induced IgE production as well as reduction of local and systemic antigenic response noted in alloxan-induced diabetes were reversed by surgical removal of adrenal glands and by treatment with the glucocorticoid receptor blocker RU486 [13,96].

In structural cells, glucocorticoids inhibit airway smooth muscle proliferation *in vitro* [97]. It also has been demonstrated that treatment with budesonide, an inhaled glucocorticosteroid, prevents airway smooth muscle thickening, contractile protein expression and tracheal hypercontractility in guinea pigs sensitized and challenged with ovalbumin [98]. Glucocorticoids are also able to inhibit airway smooth muscle contraction promoted by histamine, bradykinin or acetylcholine *in vitro* in a mechanism that involves increase in the intracellular levels of cAMP in airway smooth muscle cells [99]. Moreover, it was demonstrated that glucocorticoids increase the expression of β_2 receptor in human lungs *in vitro* and in nasal mucosa *in vivo*, which could prevent the down-regulation of these receptors after prolonged administration with β_2 agonists and thus enhance the effects of these agonists [77]. Besides, glucocorticoids inhibit cytokine generation by airway smooth muscle cells and epithelial cells [100,101]; however it is not defined if this hormone has a damaging or protective effect on epithelial cells, because some studies demonstrated that glucocorticoids increase apoptosis and epithelial shedding while others observed that the therapy with inhaled glucocorticoids restored epithelium integrity [101]. The anti-asthmatic action of glucocorticoids on pulmonary fibroblasts remains undefined. This is because, although glucocorticoids inhibit the production of fibronectin by stimulated lung fibroblast, it partially reduced the airway wall thickening and matrix deposition in a rat model of airway remodeling induced by allergen [102], decreased proliferation and liberation of inflammatory mediators by pulmonary fibroblasts, and reduced basement membrane thickness in airway biopsies from asthmatic patients [103], this hormone presents an anti-apoptotic effect on fibroblasts [103] and does not alter the ECM deposition in the reticular basement membrane in the airways [104].

Finally, an adrenal suppression has been reported in untreated allergic and asthmatic patients [104]. This phenomenon could be associated with the modulation of HPA axis activity by inflammatory

response noted in these patients, since corticotropin-releasing factor (CRF) knockout mice showed a decrease in endogenous glucocorticoid production in close-relationship with increase in airway inflammation with mechanical dysfunction of the lungs and increased levels of IL-4, IL-5 and IL-13 [105]. Together, these evidences demonstrated that patients with severe asthma exhibit a relative adrenal insufficiency that may be associated with worsening of disease.

As described previously, adipose tissue produces hormones that regulate blood glucose levels called adipokines. Even as adipose tissue releases adipokines that reducing blood glucose levels, as leptin and adiponectin, adipocytes produce hyperglycemic hormones too, including resistin [106]. The production of resistin is increased in feeding and obesity [107], and its hormone plays a significant role in obesity-induced insulin resistance [108]. The hyperglycemic effect of resistin is associated with decrease of glucose uptake in skeletal muscle cells [109] and severe hepatic insulin resistance [110]. Moreover, reduction in resistin levels by deleting the resistin gene, infusing resistin antibodies or resistin antisense oligodeoxynucleotides protect against obesity-induced hyperglycemia by restoring hepatic insulin responsiveness [108,111,112].

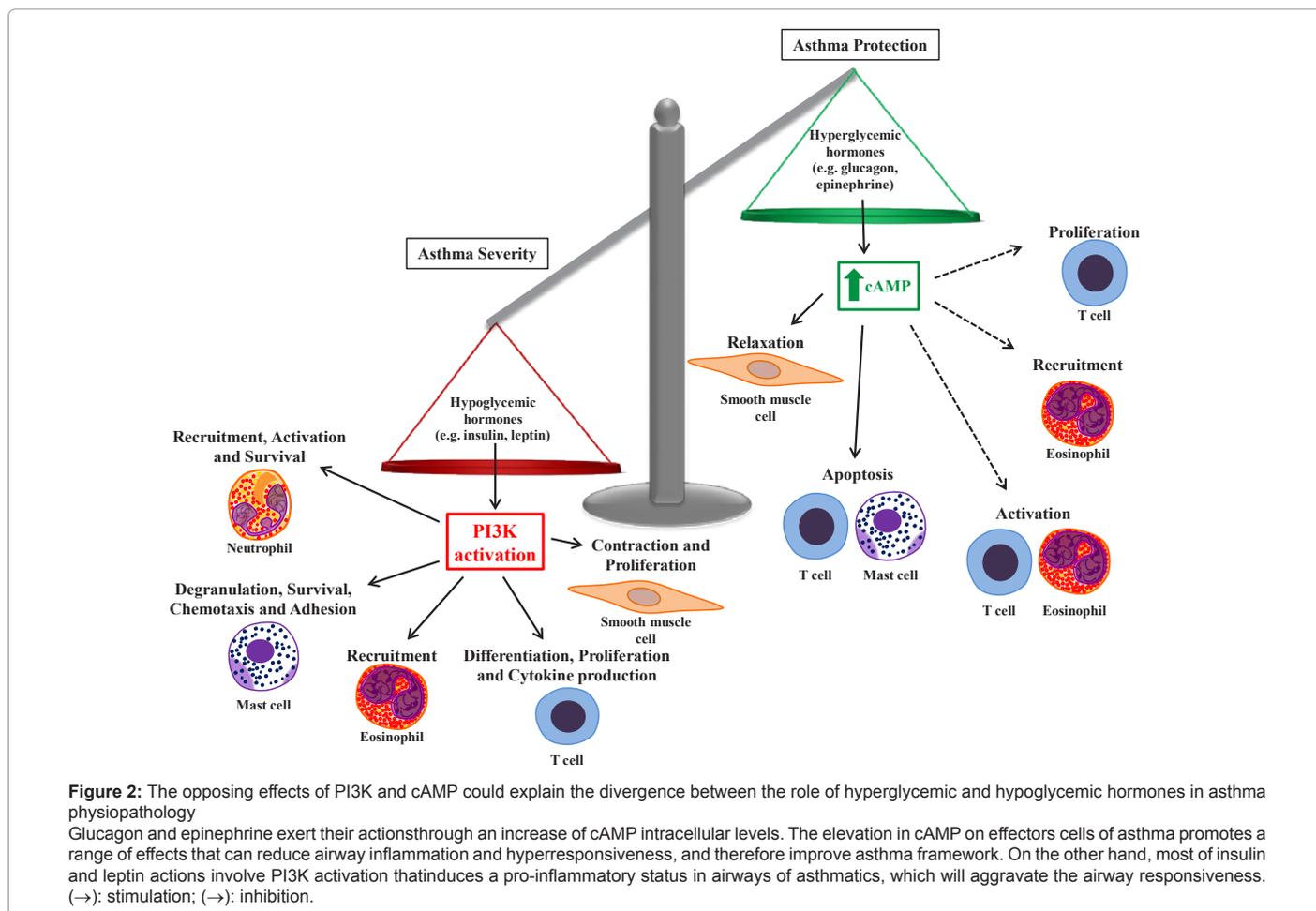
Steppan et al. [113] showed that asthmatic patients present elevated plasma resistin levels and they propose that resistin is associated with increase of asthma severity. However, atopic asthmatics had lower resistin levels compared to non-atopic asthmatic patients and control group, and resistin was negatively associated with eosinophil numbers

and serum IgE levels [114]. Hence, the effect of resistin on asthma is unclear yet and need further studies.

PI3K x cAMP on Airway Responsiveness and Inflammation in Asthma

Hormones that control glucose homeostasis act by distinct signaling pathways. While some hypoglycemic hormones, including insulin and leptin, activate PI3K, the major hyperglycemic hormones, as glucagon and epinephrine, induce increase in the intracellular levels of cAMP [70,71,115]. The activation of PI3K plays an important role in the pathogenesis of asthma by stimulating recruitment of mast cells, neutrophils and eosinophils; increasing survival of mast cells and neutrophils; activating mast cells, neutrophils and T cells; inducing proliferation of T cells and airway smooth muscle cells and differentiation of Th0 cells in Th2 and Th17 cells; promoting airway smooth muscle cell contraction [21,24,116-120] (Figure 2). Moreover, PI3K-knockout mice showed reduction in allergen-induced AHR, airway inflammation and remodeling [121,122], and aerolization of PI3K inhibitor decreased pulmonary eosinophil accumulation and AHR in murine asthma model [123].

Modulation of cAMP levels is a key therapeutic target in asthma, since the increase in cAMP induces relaxation of airway smooth muscle cells. Furthermore, cAMP stimulates apoptosis of mast cells and T cells; inhibits proliferation and activation of T cells and recruitment and activation of eosinophils [69,124-126] (Figure 2). This difference



in signaling pathways between hypoglycemic and hyperglycemic hormones could be associated with the opposite effect of these hormones in asthma [127-131].

Conclusion

The focus of this review has been on hormones that control glucose homeostasis on asthma pathogenesis and development. The fact that some diseases which are characterized by hyperglycemia have an imbalance between hypoglycemic and hyperglycemic hormones and the dichotomy between the effect of these hormones on asthma could explain, at least partly, why diseases like type 1 and type 2 diabetes present opposite incidence of asthma. In addition, a greater knowledge about the role of these hormones in asthma pathophysiology may be important for the development of new therapeutic strategies for asthma.

Acknowledgments

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) Brazil.

References

- Hams E, Fallon PG (2012) Innate type 2 cells and asthma. *Curr Opin Pharmacol* 12: 503-509.
- Wenzel SE (2012) Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med* 18: 716-725.
- Lowder TW, Kunz HE (2011) Regulatory T cells in asthma and airway hyperresponsiveness. *J Allergy Ther* S1: 1-8.
- Hayashi T (2012) Molecular mechanisms of metaplasia, differentiation and hyperplasia of goblet cell in allergic asthma. *J Allergy Ther* 3: 1-10.
- Bartemes KR, Kita H (2012) Dynamic role of epithelium-derived cytokines in asthma. *Clin Immunol* 143: 222-235.
- Chang Y, Al-Alwan L, Risse PA, Halayko AJ, Martin JG, et al. (2012) Th17-associated cytokines promote human airway smooth muscle cell proliferation. *FASEB J* 26: 5152-5160.
- Poon AH, Eidelman DH, Martin JG, Laprise C, Hamid Q (2012) Pathogenesis of severe asthma. *Clin Exp Allergy* 42: 625-637.
- Aronoff SL, Berkowitz K, Shreiner B, Want L (2004) Glucose metabolism and regulation: beyond insulin and glucagon. *Diabetes Spectr* 17: 183-190.
- Caffarelli C, Cavagni G, Pierdomenico R, Chiari G, Spattini A, et al. (2004) Coexistence of IgE-mediated allergy and type 1 diabetes in childhood. *Int Arch Allergy Immunol* 134: 288-294.
- Karlstad Ø, Nafstad P, Tverdal A, Skurtveit S, Furu K (2012) Comorbidities in an asthma population 8-29 years old: a study from the Norwegian Prescription Database. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 21: 1045-1052.
- Shi HN, Walker WA (2002) T helper cell subclasses and clinical disease states. *Curr Opin Gastroenterol* 18: 711-716.
- Rabin RL, Levinson AI (2008) The nexus between atopic disease and autoimmunity: a review of the epidemiological and mechanistic literature. *Clin Exp Immunol* 153: 19-30.
- Carvalho VF, Barreto EO, Diaz BL, Serra MF, Azevedo V, et al. (2003) Systemic anaphylaxis is prevented in alloxan-diabetic rats by a mechanism dependent on glucocorticoids. *Eur J Pharmacol* 472: 221-227.
- Carvalho VF, Barreto EO, Serra MF, Cordeiro RS, Martins MA, et al. (2006) Aldose reductase inhibitor zopolrestat restores allergic hyporesponsiveness in alloxan-diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 549: 173-178.
- de F Carvalho V, Campos LV, Farias-Filho FA, Florim LT, Barreto EO, et al. (2008) Suppression of allergic inflammatory response in the skin of alloxan-diabetic rats: relationship with reduced local mast cell numbers. *Int Arch Allergy Immunol* 147: 246-254.
- Carvalho Vde F, Barreto Ede O, Farias-Filho FA, Gomes LH, Mendonça Lde L, et al. (2009) Reduced expression of IL-3 mediates intestinal mast cell depletion in diabetic rats: role of insulin and glucocorticoid hormones. *Int J Exp Pathol* 90: 148-155.
- Brealey D, Singer M (2009) Hyperglycemia in critical illness: a review. *J Diabetes Sci Technol* 3: 1250-1260.
- Saltiel AR, Kahn CR (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414: 799-806.
- McMahon GT, Arky RA (2007) Inhaled insulin for diabetes mellitus. *N Engl J Med* 356: 497-502.
- Viardot A, Grey ST, Mackay F, Chisholm D (2007) Potential antiinflammatory role of insulin via the preferential polarization of effector T cells toward a T helper 2 phenotype. *Endocrinology* 148: 346-353.
- Lessmann E, Grochow G, Weingarten L, Giesemann T, Aktories K, et al. (2006) Insulin and insulin-like growth factor-1 promote mast cell survival via activation of the phosphatidylinositol-3-kinase pathway. *Exp Hematol* 34: 1532-1541.
- Kettner A, Di Matteo M, Santoni A (2010) Insulin potentiates FcεR1-mediated signaling in mouse bone marrow-derived mast cells. *Mol Immunol* 47: 1039-1046.
- Gosens R, Nelemans SA, Hiemstra M, Grootte Bromhaar MM, Meurs H, et al. (2003) Insulin induces a hypercontractile airway smooth muscle phenotype. *Eur J Pharmacol* 481: 125-131.
- Dekkers BG, Schaafsma D, Tran T, Zaagsma J, Meurs H (2009) Insulin-induced laminin expression promotes a hypercontractile airway smooth muscle phenotype. *Am J Respir Cell Mol Biol* 41: 494-504.
- Vianna EO, Garcia-Leme J (1995) Allergen-induced airway inflammation in rats. Role of insulin. *Am J Respir Crit Care Med* 151: 809-814.
- Diaz BL, Serra MF, Alves AC, Pires AL, Corrêa FM, et al. (1996) Alloxan diabetes reduces pleural mast cell numbers and the subsequent eosinophil influx induced by allergen in sensitized rats. *Int Arch Allergy Immunol* 111: 36-43.
- Bose M, Teixeira J, Olivan B, Bawa B, Arias S, et al. (2010) Weight loss and incretin responsiveness improve glucose control independently after gastric bypass surgery. *J Diabetes* 2: 47-55.
- Hage MP, Safadi B, Salti I, Nasrallah M (2012) Role of Gut-Related Peptides and Other Hormones in the Amelioration of Type 2 Diabetes after Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery. *ISRN Endocrinol* 2012: 504756.
- Havel PJ, Uriu-Hare JY, Liu T, Stanhope KL, Stern JS, et al. (1998) Marked and rapid decreases of circulating leptin in streptozotocin diabetic rats: reversal by insulin. *Am J Physiol* 274: R1482-R1491.
- Cummings BP, Digitale EK, Stanhope KL, Graham JL, Baskin DG, et al. (2008) Development and characterization of a novel rat model of type 2 diabetes mellitus: the UC Davis type 2 diabetes mellitus UCD-T2DM rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295: R1782-R1793.
- Fujikawa T, Chuang JC, Sakata I, Ramadori G, Coppari R (2010) Leptin therapy improves insulin-deficient type 1 diabetes by CNS-dependent mechanisms in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 17391-17396.
- Park S, Ahn IS, Kim da S (2010) Central infusion of leptin improves insulin resistance and suppresses beta-cell function, but not beta-cell mass, primarily through the sympathetic nervous system in a type 2 diabetic rat model. *Life Sci* 86: 854-862.
- Wang MY, Chen L, Clark GO, Lee Y, Stevens RD, et al. (2010) Leptin therapy in insulin-deficient type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 4813-4819.
- Denroche HC, Levi J, Wideman RD, Sequeira RM, Huynh FK, et al. (2011) Leptin therapy reverses hyperglycemia in mice with streptozotocin-induced diabetes, independent of hepatic leptin signaling. *Diabetes* 60: 1414-1423.
- Cummings BP, Bettaieb A, Graham JL, Stanhope KL, Dill R, et al. (2011) Subcutaneous administration of leptin normalizes fasting plasma glucose in obese type 2 diabetic UCD-T2DM rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 14670-14675.
- Morton GJ, Schwartz MW (2011) Leptin and the central nervous system control of glucose metabolism. *Physiol Rev* 91: 389-411.
- Tesse R, Schieck M, Kabesch M (2011) Asthma and endocrine disorders: shared mechanisms and genetic pleiotropy. *Mol Cell Endocrinol* 333: 103-111.
- Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, et al. (1998) Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 394: 897-901.

39. Wong CK, Cheung PF, Lam CW (2007) Leptin-mediated cytokine release and migration of eosinophils: implications for immunopathophysiology of allergic inflammation. *Eur J Immunol* 37: 2337-2348.
40. Jartti T, Saarikoski L, Jartti L, Lisinen I, Jula A, et al. (2009) Obesity, adipokines and asthma. *Allergy* 64: 770-777.
41. Kato H, Ueki S, Kamada R, Kihara J, Yamauchi Y, et al. (2011) Leptin has a priming effect on eotaxin-induced human eosinophil chemotaxis. *Int Arch Allergy Immunol* 155: 335-344.
42. Shore SA, Schwartzman IN, Mellema MS, Flynt L, Imrich A, et al. (2005) Effect of leptin on allergic airway responses in mice. *J Allergy Clin Immunol* 115: 103-109.
43. Giannessi D, Maltinti M, Del Ry S (2007) Adiponectin circulating levels: a new emerging biomarker of cardiovascular risk. *Pharmacol Res* 56: 459-467.
44. Rabe K, Lehrke M, Parhofer KG, Broedl UC (2008) Adipokines and insulin resistance. *Mol Med* 14: 741-751.
45. Miller RA, Chu Q, Le Lay J, Scherer PE, Ahima RS, et al. (2011) Adiponectin suppresses gluconeogenic gene expression in mouse hepatocytes independent of LKB1-AMPK signaling. *J Clin Invest* 121: 2518-2528.
46. Medoff BD, Okamoto Y, Leyton P, Weng M, Sandall BP, et al. (2009) Adiponectin deficiency increases allergic airway inflammation and pulmonary vascular remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 41: 397-406.
47. Shore SA, Terry RD, Flynt L, Xu A, Hug C (2006) Adiponectin attenuates allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness in mice. *J Allergy Clin Immunol* 118: 389-395.
48. Ehling A, Schäffler A, Herfarth H, Turner IH, Anders S, et al. (2006) The potential of adiponectin in driving arthritis. *J Immunol* 176: 4468-4478.
49. Kang EH, Lee YJ, Kim TK, Chang CB, Chung JH, et al. (2010) Adiponectin is a potential catabolic mediator in osteoarthritis cartilage. *Arthritis Res Ther* 12: R231.
50. Tang CH, Chiu YC, Tan TW, Yang RS, Fu WM (2007) Adiponectin enhances IL-6 production in human synovial fibroblast via an AdipoR1 receptor, AMPK, p38, and NF-kappa B pathway. *J Immunol* 179: 5483-5492.
51. Choi HM, Lee YA, Lee SH, Hong SJ, Hahm DH, et al. (2009) Adiponectin may contribute to synovitis and joint destruction in rheumatoid arthritis by stimulating vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase-1, and matrix metalloproteinase-13 expression in fibroblast-like synoviocytes more than proinflammatory mediators. *Arthritis Res Ther* 11: R161.
52. Jung MY, Kim HS, Hong HJ, Youn BS, Kim TS (2012) Adiponectin induces dendritic cell activation via PLCγ/JNK/NF-κB pathways, leading to Th1 and Th17 polarization. *J Immunol* 188: 2592-2601.
53. Holst JJ (2007) The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev* 87: 1409-1439.
54. Todd JF, Bloom SR (2007) Incretins and other peptides in the treatment of diabetes. *Diabet Med* 24: 223-232.
55. Ramnanan CJ, Edgerton DS, Kraft G, Cherrington AD (2011) Physiologic action of glucagon on liver glucose metabolism. *Diabetes Obes Metab* 13: 118-125.
56. Bansal P, Wang Q (2008) Insulin as a physiological modulator of glucagon secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: E751-E761.
57. Vuguin PM, Charron MJ (2011) Novel insight into glucagon receptor action: lessons from knockout and transgenic mouse models. *Diabetes Obes Metab* 13: 144-150.
58. Dunning BE, Gerich JE (2007) The role of alpha-cell dysregulation in fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes and therapeutic implications. *Endocr Rev* 28: 253-283.
59. Cooperberg BA, Cryer PE (2009) Beta-cell-mediated signaling predominates over direct alpha-cell signaling in the regulation of glucagon secretion in humans. *Diabetes Care* 32: 2275-2280.
60. Raskin P, Unger RH (1978) Effect of insulin therapy on the profiles of plasma immunoreactive glucagon in juvenile-type and adult-type diabetics. *Diabetes* 27: 411-419.
61. Reaven GM, Chen YD, Golay A, Swislocki AL, Jaspan JB (1987) Documentation of hyperglucagonemia throughout the day in nonobese and obese patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 64: 106-110.
62. Sherman MS, Lazar EJ, Eichacker P (1988) A bronchodilator action of glucagon. *J Allergy Clin Immunol* 81: 908-911.
63. Melanson SW, Bonfante G, Heller MB (1998) Nebulized glucagon in the treatment of bronchospasm in asthmatic patients. *Am J Emerg Med* 16: 272-275.
64. Imbruce R, Goldfeder A, Maguire W, Briscoe W, Nair S (1975) The effect of glucagon on airway resistance. *J Clin Pharmacol* 15: 680-684.
65. Wilber ST, Wilson JE, Blanda M, Gerson LW, Meerbaum SO, et al. (2000) The bronchodilator effect of intravenous glucagon in asthma exacerbation: a randomized, controlled trial. *Ann Emerg Med* 36: 427-431.
66. Blumenthal MN, Brody TM (1969) Studies on the mechanism of drug-induced bronchiolar relaxation in the guinea pig. *J Allergy* 44: 63-69.
67. Authier F, Desbuquois B (2008) Glucagon receptors. *Cell Mol Life Sci* 65: 1880-1899.
68. Koh WS, Lee M, Yang KH, Kaminski NE (1996) Expression of functional glucagon receptors on lymphoid cells. *Life Sci* 58: 741-751.
69. Olsen PC, Coelho LP, da Costa JC, Cordeiro RS, Silva PM, et al. (2012) Two for one: cyclic AMP mediates the anti-inflammatory and anti-spasmodic properties of the non-anesthetic lidocaine analog JMF2-1. *Eur J Pharmacol* 680: 102-107.
70. Dünser MW, Hasibeder WR (2009) Sympathetic overstimulation during critical illness: adverse effects of adrenergic stress. *J Intensive Care Med* 24: 293-316.
71. Sharara-Chami RI, Zhou Y, Ebert S, Pacak K, Ozcan U, et al. (2012) Epinephrine deficiency results in intact glucose counter-regulation, severe hepatic steatosis and possible defective autophagy in fasting mice. *Int J Biochem Cell Biol* 44: 905-913.
72. König M, Bulik S, Holzhütter HG (2012) Quantifying the contribution of the liver to glucose homeostasis: a detailed kinetic model of human hepatic glucose metabolism. *PLoS Comput Biol* 8: e1002577.
73. Fitzgerald PJ (2009) Is elevated noradrenaline an aetiological factor in a number of diseases? *Auton Autacoid Pharmacol* 29: 143-156.
74. Hu CP, Zou YQ, Feng JT, Li XZ (2012) The effect of unilateral adrenalectomy on transformation of adrenal medullary chromaffin cells in vivo: a potential mechanism of asthma pathogenesis. *PLoS One* 7: e44586.
75. Rodrigo GJ, Nannini LJ (2006) Comparison between nebulized adrenaline and beta2 agonists for the treatment of acute asthma. A meta-analysis of randomized trials. *Am J Emerg Med* 24: 217-222.
76. Erdinç M (2011) Beta-2 agonist discussions in asthma and a review of current data. *Tuber Toraks* 59: 205-212.
77. Barnes PJ (2011) Biochemical basis of asthma therapy. *J Biol Chem* 286: 32899-32905.
78. Scola AM, Loxham M, Charlton SJ, Peachell PT (2009) The long-acting beta-adrenoceptor agonist, indacaterol, inhibits IgE-dependent responses of human lung mast cells. *Br J Pharmacol* 158: 267-276.
79. Sartori C, Fang X, McGraw DW, Koch P, Snider ME, et al. (2002) Selected contribution: long-term effects of beta(2)-adrenergic receptor stimulation on alveolar fluid clearance in mice. *J Appl Physiol* 93: 1875-1880.
80. Yoshida N, Muraguchi M, Kamata M, Ikezono K, Mori T (2009) Procaterol potentiates the anti-inflammatory activity of budesonide on eosinophil adhesion to lung fibroblasts. *Int Arch Allergy Immunol* 150: 352-358.
81. Heijink IH, Vellenga E, Borger P, Postma DS, Monchy JG, et al. (2003) Polarized Th1 and Th2 cells are less responsive to negative feedback by receptors coupled to the AC/cAMP system compared to freshly isolated T cells. *Br J Pharmacol* 138: 1441-1450.
82. Goleva E, Dunlap A, Leung DY (2004) Differential control of TH1 versus TH2 cell responses by the combination of low-dose steroids with beta2-adrenergic agonists. *J Allergy Clin Immunol* 114: 183-191.
83. Todorova L, Bjermer L, Westergren-Thorsson G, Miller-Larsson A (2011) TGFβ-induced matrix production by bronchial fibroblasts in asthma: budesonide and formoterol effects. *Respir Med* 105: 1296-1307.
84. Tannheimer SL, Wright CD, Salmon M (2012) Combination of roflumilast with a beta-2 adrenergic receptor agonist inhibits proinflammatory and profibrotic mediator release from human lung fibroblasts. *Respir Res* 13: 28.

85. Funder JW (1997) Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors: biology and clinical relevance. *Annu Rev Med* 48: 231-240.
86. Seckl JR (2004) 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases: changing glucocorticoid action. *Curr Opin Pharmacol* 4: 597-602.
87. Giordano R, Guaraldi F, Berardelli R, Karamouzis I, D'Angelo V, et al. (2012) Glucose metabolism in patients with subclinical Cushing's syndrome. *Endocrine* 41: 415-423.
88. Opherck C, Tronche F, Kellendonk C, Kohlmüller D, Schulze A, et al. (2004) Inactivation of the glucocorticoid receptor in hepatocytes leads to fasting hypoglycemia and ameliorates hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Mol Endocrinol* 18: 1346-1353.
89. Barnes PJ (2006) Corticosteroids: the drugs to beat. *Eur J Pharmacol* 533: 2-14.
90. Chung KF, Caramori G, Adcock IM (2009) Inhaled corticosteroids as combination therapy with beta-adrenergic agonists in airways disease: present and future. *Eur J Clin Pharmacol* 65: 853-871.
91. Torres RC, Insuela DBR, Carvalho VF (2012) Mecanismos celulares e moleculares da ação antiinflamatória dos glicocorticoides. *Corpus et Scientia*: 36-51.
92. Maneechotesuwan K, Yao X, Ito K, Jazrawi E, Usmani OS, et al. (2009) Suppression of GATA-3 nuclear import and phosphorylation: a novel mechanism of corticosteroid action in allergic disease. *PLoS Med* 6: e1000076.
93. Ziolkowska M, Koc A, Luszczkiewicz G, Ksiezopolska-Pietrzak K, Klimczak E, et al. (2000) High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. *J Immunol* 164: 2832-2838.
94. McKinley L, Alcorn JF, Peterson A, Dupont RB, Kapadia S, et al. (2008) TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. *J Immunol* 181: 4089-4097.
95. Torres RC, Batista MM, Pons AH, Silva AR, Cordeiro RS, et al. (2012) Activation of PPAR γ by restores mast cell numbers and reactivity in alloxan-diabetic rats by reducing the systemic glucocorticoid levels. *Eur J Pharmacol* 691: 261-267.
96. Diaz B, Barreto E, Cordeiro R, Perretti M, Martins M, et al. (2001) Enhanced serum glucocorticoid levels mediate the reduction of serosal mast cell numbers in diabetic rats. *Life Sci* 68: 2925-2932.
97. Dekkers BG, Pehlic A, Mariani R, Bos IS, Meurs H, et al. (2012) Glucocorticosteroids and β 2-adrenoceptor agonists synergize to inhibit airway smooth muscle remodeling. *J Pharmacol Exp Ther* 342: 780-787.
98. Bos IS, Gosens R, Zuidhof AB, Schaafsma D, Halayko AJ, et al. (2007) Inhibition of allergen-induced airway remodeling by tiotropium and budesonide: a comparison. *Eur Respir J* 30: 653-661.
99. Ammit AJ, Burgess JK, Hirst SJ, Hughes JM, Kaur M, et al. (2009) The effect of asthma therapeutics on signalling and transcriptional regulation of airway smooth muscle function. *Pulm Pharmacol Ther* 22: 446-454.
100. Barnes PJ (1998) Efficacy of inhaled corticosteroids in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 102: 531-538.
101. Panettieri RA Jr (2004) Effects of corticosteroids on structural cells in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 1: 231-234.
102. Barnes PJ (2012) Corticosteroid Therapy for Asthma. *Pulmão RJ* 21: 53-59.
103. Andersson K, Shebani EB, Makeeva N, Roomans GM, Servetnyk Z (2010) Corticosteroids and montelukast: effects on airway epithelial and human umbilical vein endothelial cells. *Lung* 188: 209-216.
104. Tomic R, Lassiter CC, Ritzenthaler JD, Rivera HN, Roman J (2005) Anti-tissue remodeling effects of corticosteroids: fluticasone propionate inhibits fibronectin expression in fibroblasts. *Chest* 127: 257-265.
105. Al-Muhsen S, Johnson JR, Hamid Q (2011) Remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 128: 451-462.
106. Solís Herruzo JA, Pérez Peña F (1973) Erythropoietic protoporphyria (I. Clinical aspects and diagnosis). *Rev Clin Esp* 128: 451-462.
107. Keenan CR, Salem S, Fietz ER, Gualano RC, Stewart AG (2012) Glucocorticoid-resistant asthma and novel anti-inflammatory drugs. *Drug Discov Today* 17: 1031-1038.
108. Johnson PR, Burgess JK (2004) Airway smooth muscle and fibroblasts in the pathogenesis of asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 4: 102-108.
109. Priftis KN, Papadimitriou A, Nicolaidou P, Chrousos GP (2008) The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in asthmatic children. *Trends Endocrinol Metab* 19: 32-38.
110. Silverman ES, Breault DT, Vallone J, Subramanian S, Yilmaz AD, et al. (2004) Corticotropin-releasing hormone deficiency increases allergen-induced airway inflammation in a mouse model of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 114: 747-754.
111. Rosen ED, Spiegelman BM (2006) Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 444: 847-853.
112. Rajala MW, Qi Y, Patel HR, Takahashi N, Banerjee R, et al. (2004) Regulation of resistin expression and circulating levels in obesity, diabetes, and fasting. *Diabetes* 53: 1671-1679.
113. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, et al. (2001) The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409: 307-312.
114. Moon B, Kwan JJ, Duddy N, Sweeney G, Begum N (2003) Resistin inhibits glucose uptake in L6 cells independently of changes in insulin signaling and GLUT4 translocation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285: E106-E115.
115. Rajala MW, Obici S, Scherer PE, Rossetti L (2003) Adipose-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule-beta selectively impair insulin action on glucose production. *J Clin Invest* 111: 225-230.
116. Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS, Rich AS, Rhoades B, et al. (2004) Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science* 303: 1195-1198.
117. Muse ED, Obici S, Bhanot S, Monia BP, McKay RA, et al. (2004) Role of resistin in diet-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest* 114: 232-239.
118. Larochelle J, Freiler J, Dice J, Hagan L (2007) Plasma resistin levels in asthmatics as a marker of disease state. *J Asthma* 44: 509-513.
119. Kim KW, Shin YH, Lee KE, Kim ES, Sohn MH, et al. (2008) Relationship between adipokines and manifestations of childhood asthma. *Pediatr Allergy Immunol* 19: 535-540.
120. Frühbeck G (2006) Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J* 393: 7-20.
121. Condliffe AM, Cadwallader KA, Walker TR, Rintoul RC, Cowburn AS, et al. (2000) Phosphoinositide 3-kinase: a critical signalling event in pulmonary cells. *Respir Res* 1: 24-29.
122. Ammit AJ, Panettieri RA Jr (2001) Invited review: the circle of life: cell cycle regulation in airway smooth muscle. *J Appl Physiol* 91: 1431-1437.
123. Kim MS, Rädinger M, Giffillan AM (2008) The multiple roles of phosphoinositide 3-kinase in mast cell biology. *Trends Immunol* 29: 493-501.
124. Ghigo A, Damilano F, Braccini L, Hirsch E (2010) PI3K inhibition in inflammation: Toward tailored therapies for specific diseases. *Bioessays* 32: 185-196.
125. Jiang H, Xie Y, Abel PW, Toews ML, Townley RG, et al. (2012) Targeting phosphoinositide 3-kinase γ in airway smooth muscle cells to suppress interleukin-13-induced mouse airway hyperresponsiveness. *J Pharmacol Exp Ther* 342: 305-311.
126. Lim DH, Cho JY, Song DJ, Lee SY, Miller M, et al. (2009) PI3K gamma-deficient mice have reduced levels of allergen-induced eosinophilic inflammation and airway remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296: L210-L219.
127. Takeda M, Ito W, Tanabe M, Ueki S, Kato H, et al. (2009) Allergic airway hyperresponsiveness, inflammation, and remodeling do not develop in phosphoinositide 3-kinase gamma-deficient mice. *J Allergy Clin Immunol* 123: 805-812.
128. Doukas J, Eide L, Stebbins K, Racanelli-Layton A, Dellamary L, et al. (2009) Aerosolized phosphoinositide 3-kinase gamma/delta inhibitor TG100-115 [3-[2,4-diamino-6-(3-hydroxyphenyl)pteridin-7-yl]phenol] as a therapeutic candidate for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Pharmacol Exp Ther* 328: 758-765.
129. Sarkar A, Sreenivasan Y, Manna SK (2003) alpha-Melanocyte-stimulating hormone induces cell death in mast cells: involvement of NF-kappaB. *FEBS Lett* 549: 87-93.

130. Jin SL, Goya S, Nakae S, Wang D, Bruss M, et al. (2010) Phosphodiesterase 4B is essential for T(H)2-cell function and development of airway hyperresponsiveness in allergic asthma. J Allergy Clin Immunol 126: 1252-1259.
131. Billington CK, Hall IP (2012) Novel cAMP signalling paradigms: therapeutic implications for airway disease. Br J Pharmacol 166: 401-410.

Citation: Insuela DBR, Silva PMR, Martins MA, Carvalho VF (2013) The Yin Yang of Hormones that Control Glucose Homeostasis in Asthma. J Aller Ther S11: 001. doi:[10.4172/2155-6121.S11-001](https://doi.org/10.4172/2155-6121.S11-001)

This article was originally published in a special issue, **Asthma** handled by Editor(s). Dr. Manar Yehia Foda, Department of Endodontics, Cairo University Egypt

Submit your next manuscript and get advantages of OMICS Group submissions

Unique features:

- User friendly/feasible website-translation of your paper to 50 world's leading languages
- Audio Version of published paper
- Digital articles to share and explore

Special features:

- 250 Open Access Journals
- 20,000 editorial team
- 21 days rapid review process
- Quality and quick editorial, review and publication processing
- Indexing at PubMed (partial), Scopus, DOAJ, EBSCO, Index Copernicus and Google Scholar etc
- Sharing Option: Social Networking Enabled
- Authors, Reviewers and Editors rewarded with online Scientific Credits
- Better discount for your subsequent articles

Submit your manuscript at: <http://www.editorialmanager.com/acrgroup/>

