

Ronaldo Aparecido da Silva

Estudo dos mecanismos induzidos pelo treinamento físico aeróbico ao longo do tempo na inflamação pulmonar e no remodelamento brônquico em um modelo murino de asma

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. Celso Ricardo Fernandes de Carvalho

São Paulo
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Ronaldo Aparecido da

Estudo dos mecanismos induzidos pelo treinamento físico aeróbico ao longo do tempo na inflamação pulmonar e no remodelamento brônquico em um modelo murino de asma / Ronaldo Aparecido da Silva. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientador: Celso Ricardo Fernandes de Carvalho.

Descritores: 1.Asma/reabilitação 2.Asma/imunologia 3.Asma/fisiopatologia 4.Exercício 5.Receptores de glucocorticoides/antagonistas & inibidores 6.Interleucina-10 7.Alergia e imunologia 8.Citocinas 9.Remodelação das vias aéreas 10.Educação física e treinamento 11.Mediadores de inflamação 12.Modelos animais

USP/FM/DBD-173/13

Agradecimentos a FAPESP

A conclusão dessa tese só foi possível devido ao apoio financeiro obtido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através do processo 2009/54420-5.

Agradeço imensamente por toda ajuda, colaboração e apoio da FAPESP, do seu corpo de funcionários e professores colaboradores que apoiaram meu estudo durante esses 3 anos de doutorado.

Dedicatória

Primeiro dedico essa tese para as duas pessoas mais importantes da minha vida:

- Minha Mãe Idalina e minha Esposa Nelba, sem vocês não sou nada!

Em segundo dedico ao:

- Professor Celso Carvalho, orientador e amigo!

Agradecimentos

Essa tese só existe porque tive todo o apoio da minha Mãe Idalina e minha Esposa Nelba, elas estão presentes em todos os momentos, eu agradeço muito por tudo. Em segundo lugar e não menos importante agradeço ao Professor Celso Carvalho que não é apenas meu orientador, mas é um grande amigo, além disso, ele foi como um grande irmão e até pai, sempre acreditou no meu potencial, deu apoio, ajudou, fez todo o possível para o meu crescimento como pesquisador e ser humano e sempre pensou no meu futuro, agradeço do fundo do coração por ele ter ajudado a mudar completamente minha vida, serei eternamente grato.

Jamais poderia deixar de agradecer aos meus colegas de L9M-20 (FMUSP): Dra. Beatriz Saraiva, Clarice R. Olivo, Francine M. Almeida, Dra. Fernanda Lopes, Luiz Afonso, Davi, Ivanildo, Dr. Rodolfo P. Vieira, Felipe A. R. Mendes e Renata Nakata. Obrigado por toda a ajuda e colaboração para desenvolvimento do estudo durante os últimos sete anos de convivência.

Existem outras pessoas que ajudaram muito e colaboraram com meu projeto, nesse momento não posso esquecer-me delas, ficarei eternamente grato à ajuda, boa vontade e cooperação dos Professores Milton A. Martins, Thais Mauad e Adenir Perini. Um muito obrigado também as minhas colegas Ângela, Cristina e Bárbara que tanto ajudaram, as quais sempre mostraram boa vontade de colaborar, agradeço à todas imensamente.

SUMÁRIO

Nº da Página

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Resumo

Abstract

1. Introdução.....	1
1.1 Definição da asma.....	1
1.2 Epidemiologia.....	1
1.3 Processo fisiopatológico da asma.....	2
1.4 Fatores quimiotáticos.....	4
1.5 Remodelamento brônquico.....	5
1.6 Reabilitação pulmonar para pacientes asmáticos.....	7
1.7 Mecanismos anti-inflamatórios desencadeados pelo treinamento aeróbico na inflamação em modelos de doenças pulmonares e no modelo murino de asma.....	8
2. Objetivos.....	12
3. Métodos.....	14
3.1 Local da execução da pesquisa.....	14
3.2 Animais.....	14
3.3 Delineamento do estudo.....	14
3.4 Protocolo de indução da inflamação pulmonar alérgica crônica.....	15
3.5 Teste físico e treinamento aeróbico.....	16
3.5.1 Período de adaptação.....	16
3.5.2 Teste físico.....	16
3.5.3 Treinamento aeróbico.....	16
3.6 Anestesia e coleta de sangue.....	17
3.7 Coleta do lavado broncoalveolar.....	17
3.8 Coleta dos pulmões e dos músculos quadríceps.....	18
3.9 Imunohistoquímica.....	18
3.10 Análise morfométrica.....	19
3.11 Quantificação dos títulos específicos IgE e IgG ₁ para OVA.....	20
3.12 Quantificação do remodelamento brônquico por análise de imagem.....	20
3.13 Análise estatística.....	21

4. Resultados.....	24
4.1 Miocinas IL10, IL-1ra e IL6.....	40
5. Discussão.....	43
6. Conclusão.....	54
7. Referências.....	56

LISTA DE FIGURAS**Nº da Página**

Figura 1 - Protocolo de indução da IPAC OVA 1-3% e treinamento aeróbico.....	15
Figura 2 - IgE.....	24
Figura 3 - IgG ₁	25
Figura 4 - Contagem das células totais de lavado broncoalveolar (LBA).....	26
Figura 5 - Contagem de eosinófilos no LBA.....	26
Figura 6 - Contagem de neutrófilos no LBA.....	27
Figura 7 - Contagem de macrófagos no LBA.....	27
Figura 8 - Músculo liso.....	28
Figura 9 - Espessamento do epitélio.....	29
Figura 10 - Fibras de colágeno.....	29
Figura 11 - Fibras elásticas.....	30
Figura 12 - Muco epitelial.....	30
Figura 13 - Fotografias do músculo liso e das fibras de colágeno.....	31
Figura 14 - Fotografias das fibras elásticas e do muco.....	31
Figura 15 - IL-4.....	32
Figura 16 - IL-5.....	33
Figura 17 - Eotaxina.....	33
Figura 18 - RANTES.....	34
Figura 19 - ICAM-1.....	34
Figura 20 - VCAM-1.....	35
Figura 21 - TGF- β	36
Figura 22 - VEGF.....	36
Figura 23 - Osteopontina (OPN).....	37
Figura 24 - IL-10.....	37
Figura 25 - IL-1ra.....	38
Figura 26 - Receptor de glicocorticóide (RG) - Células peribrônquicas.....	39
Figura 27 - Receptor de glicocorticóide (RG) no ML.....	39
Figura 28 - Fotografias da marcação positiva do receptor de glicocorticóide (RG) no músculo liso das vias aéreas.....	40
Figura 29 - NF- κ B.....	41
Figura 30 - FOXP3.....	41

ABREVIATURAS E SIGLAS

Alum	Alumínio
BIE	Broncoespasmo Induzido Pelo Exercício
dp	Desvio Padrão
EF	Exercício Físico
FcεRI	do inglês, <i>FC epsilon Region of Immunoglobulin</i>
FOXP3	do inglês, <i>Forkhead Box P3</i>
GINA	do inglês, <i>Global Initiative for Asthma</i>
Hidrox	Hidróxido
ICAM-1	do inglês, <i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i>
VCAM-1	do inglês, <i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
IgE	Imunoglobulina E
IgG₁	Imunoglobulina, do Grego <i>Gama</i> , 1
IL	Interleucina
IL-1ra	Interleucina 1-receptor antagonista
i.p.	Injeção intraperitoneal
km/h	Quilômetros por hora
LBA	Lavado broncoalveolar
mg	Microgramas
mL	Mililitros
ML	Músculo Liso
NaCl	Soro Fisiológico (Salina)
NF-κB	do inglês, <i>Nuclear Factor</i> , do Grego <i>kappa</i> , B
OPN	Osteopontina
OVA	Ovoalbumina
PAS-AB	do inglês, <i>Periodic Acid-Schiff-Alcian Blue</i>
RB	Remodelamento Brônquico
RG	Receptor de Glicocorticoide
kg	Quilo
TA	Treinamento Aeróbico
TGF-β	do inglês, <i>Transforming Growth Factor</i> , do Grego, <i>Beta</i>
TF	Teste Físico

Th1	T Helper 1
Th2	T Helper 2
TNF-α	do inglês, <i>Tumor Necrosis Factors</i> , do Grego, <i>Alfa</i>
μm	Mícron
μg	Microgramas
VEGF	do inglês, <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

RESUMO

Silva RA. Estudo dos mecanismos induzidos pelo treinamento físico aeróbico ao longo do tempo na inflamação pulmonar e no remodelamento brônquico em um modelo murino de asma. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

O treinamento aeróbico (TA) traz benefícios para os asmáticos, porém os mecanismos anti-inflamatórios não são conhecidos. Estudos experimentais de asma têm mostrado que o TA reduz a inflamação pulmonar alérgica crônica (IPAC) e a resposta Th2, no entanto, nenhum estudo explicou quando os efeitos protetores são iniciados e qual é a principal via anti-inflamatória desencadeada. **Objetivo:** Avaliar o efeito do TA ao longo do tempo em um modelo murino de asma visando identificar quando são iniciados os efeitos anti-inflamatórios e a reversão do remodelamento brônquico (RB). **Métodos:** BALB/c (160 animais) foram divididos em 4 grupos: Controle (CT): não induzidos à IPAC e não treinados; Treinamento Aeróbico (TA): não induzidos à IPAC e treinados; OVA: induzidos à IPAC e não treinados; OVA+TA: induzidos à IPAC e treinados. Em seguida foram criados outros subgrupos 1, 3, 7, 15 e 30 dias de TA, ou seja, cada grupo foi repetidos 5 vezes para investigação do efeito do TA ao longo do tempo. Os grupos OVA foram sensibilizados com i.p. (OVA+HidroxA Alum), após foram induzidos à IPAC com aerosol de OVA (1-3%) iniciado no dia 21 (3 x semana; 30 min./sessão). A adaptação ao TA foi realizada entre os dias 21 a 23, no dia 25 foi realizado o teste físico, no dia 28 o TA foi iniciado (50% intensidade, frequência 5 x, por 4 semanas). Vinte quatro horas da última sessão de TA (1, 3, 7, 15 e 30 dias) os animais foram anestesiados, eutanizados e coletados o lavado broncoalveolar (LBA) (contagem celular total e diferencial), sangue para quantificação das imunoglobulinas (IgE e IgG₁) por técnica de reação de anafilaxia cutânea passiva (PCA), o tecido pulmonar para avaliação dos mediadores: IL-4, IL-5, eotaxina, RANTES, ICAM-1, VCAM-1, TGF- β , VEGF, Osteopontina (OPN), NF- κ B, FOXP3, receptor de glicocorticoide (RG) e anti-inflamatórias IL-10 e IL-1ra (imunohistoquímica e quantificação por morfometria) e foi coletado também o músculo quadríceps para avaliação da produção das miocinas (IL-10, IL-1ra e IL-6) (imunohistoquímica e quantificado por análise de imagem). O RB (músculo liso, epitélio, deposições das fibras de colágeno e elástica e produção de muco) também foi avaliado por análise de imagem. **Resultados:** Não foi observada produção das miocinas ($p > 0,05$). Os níveis de IgE, IgG₁, migração celular, produção dos mediadores inflamatórios e o RB foram aumentados nos grupos OVA ($p < 0,05$), que ainda mostraram redução da produção do RG ($p < 0,05$). O TA aumentou o RG no músculo liso das vias aéreas, as produções de IL-10 e IL-1ra aumentaram a partir do 7º dia por células peribrônquicas, ao mesmo tempo que foram reduzidos o NF- κ B, IL-4, IL-5, eotaxina, RANTES, ICAM-1, VCAM-1, VEGF, eosinófilos no LBA e foram revertidos o espessamento do músculo liso, do epitélio e as deposições de fibras de colágeno ($p < 0,05$). Curiosamente, a diminuição de TGF- β ocorreu após o 3º dia, enquanto OPN, elástica e muco ocorreram após 15 dias de TA, enquanto IgE, IgG₁ e neutrófilos apenas foram reduzidas ao final de 30 dias ($p < 0,05$). **Conclusão:** A partir do 3º dia do TA foi iniciado o mecanismo anti-inflamatório pelo aumento do RG no músculo liso das vias aéreas, seguido pelo aumento de IL-10 e IL-1ra e pela redução de NF- κ B a partir do 7º dia do TA, efeitos que revertem a inflamação alérgica crônica e o RB.

Descritores: 1.Aasma/reabilitação 2.Aasma/imunologia 3.Aasma/fisiopatologia 4.Exercício 5.Receptores de glucocorticoides/antagonistas & inibidores 6.Interleucina-10 7.Alergia e imunologia 8.Citocinas 9.Remodelação das vias aéreas 10.Educação física e treinamento 11.Mediadores de inflamação 12.Modelos animais

ABSTRACT

Silva RA. Study of the mechanisms induced by aerobic training over time in pulmonary inflammation and bronchial remodeling in an asthma murine model. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

The aerobic training (AT) promotes benefits for asthmatics, but the anti-inflammatory mechanisms are not known. Experimental studies of asthma have shown that AT reduces the pulmonary allergic chronic inflammation (PACI) and response Th2, however no study has ever explained when the protective effects are initiated and which is the main anti-inflammatory pathway triggered. **Aim:** To evaluate the effect of AT over time in a murine model of asthma to identify when the anti-inflammatory effects is started and reverse bronchial remodeling (BR). **Methods:** BALB/c (160 mice) were divided into 4 groups: Control (CT): not induced to PACI and untrained; Aerobic Training (TA): not induced to PACI and trained; OVA: induced to PACI and untrained; OVA + TA: induced to PACI and trained. After that were created others subgroups 1, 3, 7, 15 and 30 days AT, that is, each group was repeated 5 times to investigate the effect of AT over time. The OVA groups were sensitized with i.p. OVA (OVA+AlumHidro), and then the mice were induced after the PACI with aerosol of OVA (1-3%) started on the 21st day (3 x week, 30 min./Session). Adaptation to TA was held between 21-23, on the 25th day the physical test was performed, and on day 28 AT was begun (50% intensity, frequency x 5 for 4 weeks). Twenty four hours of the after last session of AT (1, 3, 7, 15 and 30 days) the mice were anesthetized, euthanized and the bronchoalveolar lavage fluid was collected (BALF) (Total and differential cell count) and blood was used to quantify immunoglobulins (IgE and IgG₁) by passive cutaneous anaphylaxis reaction (PCA) technique, the pulmonary tissue was removed and used to evaluate the mediators IL-4, IL-5, eotaxin, RANTES, ICAM-1, VCAM-1, TGF- β , VEGF, osteopontin (OPN), NF- κ B, FOXP3, glucocorticoid receptor (GR), and anti-inflammatory IL-10 and IL-1ra (immunohistochemistry and quantified by morphometry), was also the quadriceps muscle to assess the expression of myokines (IL-10, IL-1ra and IL-6) (by immunohistochemistry and image analyses). The BR (smooth muscle, epithelium, collagen and elastic fibers deposition, and mucus production) was also evaluated by image analysis. **Results:** It was not observed any production of myokines ($p > 0.05$). The levels of IgE and IgG₁, cell migration, production of inflammatory mediators, and the BR were increased in the OVA groups ($p < 0.05$); that still showed a decreased production of the GR ($p < 0.05$). The AT promoted an increase of GR in the airway smooth muscle from the 3rd day, the production of IL-10 and IL-1ra were increased from day 7 for cells peribronchial, while NF- κ B, IL-4, IL-5, eotaxin, RANTES, ICAM-1, VCAM-1, VEGF, eosinophil counting in BALF were reduced, and reversed the smooth muscle thickening, epithelium and deposition of collagen fibers too ($p < 0.05$). Interestingly, the decreasing of TGF- β occurred in the 3rd day, and OPN, elastic fibers, mucus occurred after 15 days of AT, while IgE and IgG₁, and neutrophils were reduced only after 30 days ($p < 0.05$). **Conclusion:** The anti-inflammatory mechanism by increasing the GR on the smooth muscle of the airways was initiated from the 3rd day of the AT, followed by an increase of IL-10 and IL-1ra and a reduction of NF- κ B from the 7th day of the AT, reversed the effects of chronic allergic inflammation and bronchial remodeling.

Descriptors: Asthma/rehabilitation; Asthma/immunology; Asthma/physiopathology; Exercise; Receptors, Glucocorticoid/antagonists & inhibitors; Inflammation mediators; Interleukin-10; Cytokines; Allergy and immunology; Airway remodeling; Physical education and training; Models, animal.

1- INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

1.1 Definição da asma

Asma é uma doença crônica inflamatória que afeta as vias aéreas, sua fisiopatologia envolve migração das células para os pulmões como os eosinófilos, neutrófilos, mastócitos, linfócitos T, macrófagos e células dendríticas conforme revisto por Holgate (2010). Essa inflamação crônica está associada à hiperresponsividade das vias aéreas, que leva a episódios recorrentes de sibilos, dispnéia, opressão torácica (sensação de aperto no peito) e tosse, particularmente à noite ou no início da manhã. Esses sintomas ocorrem como consequência da obstrução ao fluxo aéreo, que pode ser reversível espontaneamente ou com uso de medicação (GINA, 2011; DSBPTMA, 2012).

1.2 Epidemiologia

Em âmbito mundial, a doença afeta entre 1 a 18% da população, o que totaliza cerca de 300 milhões de pessoas e provoca 250.000 mortes/ano (GINA, 2011). No Brasil existem aproximadamente 20 milhões de asmáticos, levando a asma a ocupar o 8º lugar na escala de maiores índices de afastamentos por doença (DSBPTMA, 2012). Segundo o Ministério da Saúde (2005) estima-se que 350 mil asmáticos são internados por ano, o que corresponde a 2,3% das internações, colocando-a como o 3º maior fator de internação entre crianças e adultos jovens. Dados mais recentes mostraram que no ano de 2011 ocorreram 160 mil internações, o que corresponde a 4ª maior causa de hospitalizações no Brasil. Além disso, estima-se um gastos de 76 milhões de reais ao ano com a asma, conferindo-lhe o 3º maior gasto por doenças, correspondendo a 2,8% do total dos recursos investidos no sistema de saúde do país (DSBPTMA, 2012).

1.3 Processo fisiopatológico da asma

A fisiopatologia da asma alérgica é um processo complexo e tem início com a sensibilização alérgica quando o indivíduo entra em contato com o alérgeno ou antígeno pela primeira vez, fazendo com que as células apresentadoras de antígeno reconheçam o agente estranho, processado e em seguida apresentado às células T que ao reconhecer o alérgeno modificado passam a produzir mediadores como a citocina IL-4 que vai estimular as células B a produzirem anticorpos específicos, tais como a imunoglobulina E (IgE), como anteriormente revisado por Kuhl e Nicola (2012), essa fase é conhecida como período de desenvolvimento da resposta alérgica como previamente revisto (Holgate, 2008, Galli e Tsai, 2012; Holtzman 2012).

Em uma segunda exposição ao alérgeno que desencadeou o processo alérgico, ocorre uma ligação com o IgE específico desse antígeno, em seguida esse conjunto conecta-se aos receptores de alta afinidade *FcεRI* presentes nas membranas dos macrófagos, que vão liberar seus grânulos contendo leucotrienos, histamina, prostaglandinas, triptases entre outros mediadores (Halmelmann et al., 1999; Stone et al., 2010; Kuhl e Hanania, 2011) que provocam a broncoconstrição das vias aéreas como previamente revisado (Chhabra et al., 2007; Holgate e Polosa 2008). Esse processo é conhecido como reação ou fase imediata e pode durar de 15 a 60 minutos, após isso ocorre relaxamento brônquico de forma espontânea ou através do uso de medicação (Durham, 1991; DSBPTMA, 2012). Essa reação provoca sintomas como tosse, sibilância e desconforto no tórax (IV DBMA, 2006), esses problemas são considerados apenas indicadores das alterações das funções do sistema respiratório, que ao longo do tempo é danificado pelo aumento da inflamação, processo conhecido como fase crônica (Holgate & Polosa, 2008).

A fase crônica da asma é caracterizada pelo aumento da inflamação alérgica nas vias aéreas, processo que envolve principalmente linfócitos CD4 perfil *T Helper 2* (Th2), predominantemente aumentados em asmáticos alérgicos (Robinson et al., 1992). As células perfil do Th2 desempenham a função de manter a resposta alérgica crônica aumentada através da produção de interleucinas-4 (IL-4), IL-5 e IL-13 perfil Th2 (Mosmann et al., 1988), as quais estimulam a migração dos eosinófilos, neutrófilos, macrófagos entre outras células para as vias aéreas como revisto previamente (Holgate, 2008).

A Interleucina-4 (IL-4) é uma citocina extremamente importante para desenvolvimento da predominância da resposta imune Th2 (Barnes, 1996; Fallon et al., 2002; Holgate, 2008) e está envolvida tanto no aumento da produção de IgE (anticorpo) (Del prete et al., 1988; Vercelli et al., 1990) quanto na redução da resposta imune não alérgica Th1 (Cohn et al., 2004). Já IL-5 estimula a produção de quimiocinas nos leucócitos, e tem como principal papel promover o aumento da migração e sobrevivência de eosinófilos nas vias aéreas (Hogan et al, 1997; Foster et al, 2002), células que se apresentam em grande número nas vias aéreas de asmáticos, atuando no aumento da resposta inflamatória, danos teciduais (Menzies-Gow et al., 2007; Leckie et al., 2000) e remodelamento brônquico (Cho et al., 2004).

A longo prazo, esse processo inflamatório crônico induzido pela pelas citocinas Th2 piora o quadro clínico do asmático, altera sua função pulmonar (van Rensen et al., 2005), aumenta a hiperresponsividade brônquica (Bousquet et al., 2000) e provoca mudanças estruturais nas vias como aumento do músculo liso e fibrose entre outras alterações (Broide, 2008; Al-Muhsen et al., 2011).

1.4 Fatores quimiotáticos

As citocinas Th2 (como IL-4 e IL-5) têm sua produção aumentada no asmático induzindo ao aumento da inflamação alérgica nas vias aéreas (Robinson et al., 1992; Holgate, 2008). Também existem outros mediadores como as quimiocinas que são proteínas pequenas que se ligam aos receptores do tipo *seven transmembrane G-protein coupled* (GPCR) e atuam no estímulo da migração leucocitária para as vias aéreas (Conroy e Williams, 2001).

Em asmáticos foi verificado também aumento da produção das quimiocinas como eotaxina e RANTES, que parecerem exercer o papel de ampliação a resposta inflamatória promovendo o aumento da migração das células inflamatórias (Ying et al., 1999; Rojas-Ramos et al., 2003). Em complemento, foi verificado que esses pacientes ainda apresentam aumento dos níveis de moléculas de adesão (ICAM-1 e VCAM-1, por exemplo) (Tang et al., 2002), que estão envolvidas em vários processos imunológicos ligados à inflamação das vias aéreas (Panettieri et al., 1995; Tang et al., 2002). No caso da VCAM-1, essa molécula de adesão parece ser induzida pela citocina IL-4 e está envolvida na migração dos eosinófilos (Schleimer et al., 1992), enquanto ICAM-1 faz parte de uma grande família imunoglobulinas e está expressada em células endoteliais, fibroblastos, células T e B, macrófagos, eosinófilos e células dendríticas, também contribuindo para a migração dessas células para o sítio de inflamação (Stanciu e Djukanovic, 1992; Tang et al., 2002).

As citocinas Th2, quimiocinas e moléculas de adesão desempenham um importante papel no aumento da migração celular, sobrevida das células e na produção de mediadores inflamatórios celulares contribuindo para aumento da severidade da doença e dificultando o controle clínico (Fixman et al., 2007; James et al., 2007), tão

como pioram a função pulmonar e induzem as alterações estruturais das vias aéreas, processo que é denominado remodelamento brônquico (RB) (Broide, 2008; Mauad et al., 2007).

1.5 Remodelamento brônquico

O remodelamento brônquico (RB) dos asmáticos é decorrente do aumento e da manutenção da inflamação, principalmente eosinofílica e neutrofílica como revisto por Hamid (2012) e pela ação de vários mediadores produzidos pelos leucócitos presentes nas vias aéreas como IL-13, IL-5 (Zhu et al., 1999; Cho et al., 2004), fator de crescimento e transformação-*Beta* (TGF- β) (Roche et al., 1989; Broide, 2008) e a citocina Osteopontina (OPN) (Simoes et al., 2009), os quais induzem à alterações nas vias aéreas como espessamento do músculo liso e da parede do epitélio, aumento das deposições das fibras colágenas e elásticas, produção elevada de muco e espessamento da membrana basal (Cho et al., 2004; Mauad et al., 2007; Simoes et al., 2009; Girodet et al., 2011).

O processo inflamatório alérgico crônico induz o músculo liso das vias aéreas do asmático a sofrer alteração como espessamento (Mauad et al., 2007) por hipertrofia e hiperplasia (Ebina et al., 1993). Esses processos possivelmente são estimulados pela ação da própria divisão celular das fibras musculares ou pela migração de células mesenquimais que podem diferenciar-se em células musculares (Heard e Hussain, 1973). Essas alterações podem também ser mediadas por fatores de crescimento como o TGF- β entre outros, produzido por células inflamatórias ou por espécies reativas de oxigênio (Roth et al., 2004). Adicionalmente foi também mostrado que a OPN parece desempenhar papel na proliferação de células do músculo liso contribuindo para o seu espessamento (Chaulet et al., 2001; Ogata et al., 2007).

A fibrose das vias aéreas é caracterizada pelo aumento das deposições de matriz extracelular e parece ocorrer devido à ação de citocinas inflamatórias como IL-5 ou pelo TGF- β que estimula a produção dessas fibras por miofibroblastos ou fibroblastos (Roche et al., 1989; Cho et al., 2004; Blobe et al., 2000) ou por outros mecanismos como desequilíbrio na síntese e degradação da matriz extracelular (Araújo et al., 2008) e pela síntese e degradação da matriz metaloproteinase (MMPs), que ocorrem principalmente pela produção de inibidores fisiológicos denominados inibidores de matriz metaloproteinases (TIMPs), classificadas em TIMP-1, 2, 3 e 4 (Baker et al., 2002; Gueders et al., 2006). Em complemento foi mostrado que a citocina osteopontina (OPN) aumenta a migração e a proliferação de fibroblastos, bem como estimular a produção de colágeno por essas células (Chaulet et al., 2001; Ogata et al., 2007) e também por aumentar a produção da metaloproteinase-9 (MMP-9) (Simões et al., 2009). Outra característica no RB é o aumento da produção de muco epitelial nas vias aéreas, decorrente da hiperplasia e aumento da atividade das células de *goblet*, tão como aumento do tamanho das glândulas submucosas (Ordonez et al., 2001; James e Wenzel, 2007), que supostamente ocorre pelo estímulo da citocina IL-13 (Nath et al., 2007) e também pela osteopontina (OPN) (Kohan et al., 2009).

Outros achados têm mostrado que o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) também tem um papel crítico no RB por desencadear remodelamento vascular, edema brônquico, aumento da produção de muco e hiperresponsividade das vias aéreas (Lee et al., 2005). Quando aumentados, esses reguladores (IL-5, TGF- β , VEGF e OPN) do RB das vias aéreas prejudicam a funcionalidade das vias aéreas pelas alterações estruturais que dificultam o controle clínico da doença, por isso devem ser alvo de mais investigações.

1.6 Reabilitação pulmonar para pacientes asmáticos

O processo inflamatório alérgico crônico do asmático é atenuado clinicamente com uso de medicação a base de corticosterona (GINA, 2011). Agregado ao tratamento farmacológico tem sido recomendado a esses pacientes a participação em programas de reabilitação pulmonar (GINA, 2011; DSBPTMA, 2012) onde os asmáticos recebem cuidados clínicos, orientações sobre a doença e realizam treinamento aeróbico (TA) de forma individualizada, o que contribui para a melhora do controle clínico da doença e proporciona mais benefícios como o aumento do condicionamento cardiovascular, redução de crises entre outros como descrito em revisões sistemáticas recentes (Chandratilleke et al., 2012; Crosbie, 2012; Eijkemans et al., 2012; Pacheco et al., 2012; Wanrooij et al., 2013).

Entretanto, até pouco tempo atrás a realização de exercícios físicos regulares ou TA por asmáticos era considerada uma imprudência por ser um dos principais fatores responsáveis por desencadear dispnéia e o broncoespasmo induzido pelo exercício (BIE) nesses pacientes (Welsh et al., 2005; Disabella & Sherman, 1998).

Contudo, ao longo dos anos, os efeitos do TA nos asmáticos foram estudados de forma mais rigorosa por vários grupos no mundo, mostrando que asmáticos treinados aerobicamente aumentaram o condicionamento físico, reduziram o consumo de medicação (Neder et al., 1999; Fanelli et al., 2007) e do BIE (Emtner et al., 1996; Fanelli et al., 2007). Recentes achados ainda mostraram que o TA melhorou os escores de qualidade de vida e reduziu os níveis de ansiedade e depressão (Dogra et al., 2010; Mendes et al., 2010; Turner et al., 2010). Também foi mostrado que o TA reduziu nesses pacientes os níveis de óxido nítrico exalado (Gonçalves et al., 2008; Mendes et al., 2011) e mais recentemente diminuiu a inflamação eosinofílica (Mendes et al., 2011),

marcadores do estresse oxidativo (endothelina-1 e malondialdeído) (Onur et al., 2011; Gunay et al., 2012) e a responsividade das vias aéreas (Scichilone et al., 2012).

Os achados clínicos citados acima são muito relevantes e comprovaram que o TA ajuda a ampliar o controle clínico da asma, a tolerância ao esforço físico entre outros benefícios, porém os estudos clínicos não explicaram quais são os mecanismos protetores ou anti-inflamatórios desencadeados pelo TA. Neste sentido, estudos experimentais têm avaliado o efeito do treinamento aeróbico na inflamação e no RB em modelos experimentais de asma (Pastva et al., 2004; Pastva et al., 2005; Vieira et al., 2007; Silva et al., 2010; Olivo et al., 2012) relatando que o TA reduz a inflamação alérgica, via Th2 e o RB por diferentes mecanismos, a exemplo da melhora da resposta hormonal (Pastva et al., 2005), da redução de fatores de transcrição nuclear (Pastva et al., 2004; Lowder et al., 2010; Silva et al., 2010) e aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias (Vieira et al., 2007; Silva et al., 2010).

1.7 Mecanismos anti-inflamatórios desencadeados pelo treinamento aeróbico na inflamação em modelos de doenças pulmonares no modelo murino de asma

Nos últimos anos estudos têm avaliado os efeitos anti-inflamatórios do TA em modelos experimentais de doenças pulmonares. Nesse sentido, tem se observado que o TA pode desencadear um efeito protetor e diminuir o processo inflamatório pulmonar pela redução da migração de leucócitos e do estresse oxidativo após exposição das vias aéreas ao lipossacarídeo (LPS) (Reis Gonçalves et al., 2012). Em complemento, outro estudo verificou que o TA reduz a produção de espécies reativas de oxigênio, aumenta a produção de enzimas antioxidativas como glutathione peroxidase e aumenta a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 em um modelo murino de enfisema pulmonar (Toledo et al., 2012).

Nos modelos experimentais de asma tem sido observado que o TA desempenha efeito de redução da inflamação pulmonar alérgica crônica, da resposta Th2 (Pastva et al., 2004; Vieira et al., 2007; Lowder et al., 2010; Silva et al., 2010), de mediadores inflamatórios como eotaxina e proteína KC (Pastva et al., 2004; Vieira et al., 2012) e diminuiu o RB (Pastva et al., 2004; Vieira et al., 2007; Silva et al., 2010). Ainda nos modelos murinos de asma, os estudos apontaram diferentes mecanismos anti-inflamatórios desencadeados pelo TA. Pastva e colaboradores (2005) consideram o aumento do receptor do hormônio glicocorticóide por células peribrônquicas como o mecanismo responsável pela redução do fator de transcrição NF-κB, o que conseqüentemente reduz a transcrição das citocinas Th2, enquanto Vieira et al., (2007) e Silva et al., (2010) apontaram o aumento da produção das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-1ra pelo TA como a principal via de redução da inflamação pulmonar alérgica crônica. Adicionalmente, Lowder et al., (2010) mostraram que o TA aumenta a atividade do fator de transcrição nuclear FOXP3 e a redução da resposta Th2, a esse achado foi atribuído o mecanismo de reversão da inflamação alérgica crônica.

Além dos mecanismos propostos por Pastva et al., (2005), Vieira et al., (2007), Silva et al., (2010) e Lowder et al., (2010), ainda é possível considerar outro mecanismo anti-inflamatório, a produção de IL-10, IL-1ra e IL-6 (miocinas) pelos músculos esqueléticos durante a realização do TA, que parecem reduzir processos inflamatórios crônicos em doenças não alérgicas (Pedersen, 2007; Pedersen & Febbraio, 2008), porém esse mecanismo desencadeado pelo TA ainda não foi investigado em modelo murino de asma e nos pacientes asmáticos.

Outra importante consideração sobre os mecanismos antiinflamatórios provocados pelo TA nos modelos murinos de asma é o momento em que o treino é iniciado, que no estudo de Pastva et al., (2005) não foi relatado, ou seja, se o exercício

aeróbico regular foi iniciado antes, durante ou após a indução da inflamação pulmonar alérgica crônica (IPAC). No caso do estudo de Vieira et al., (2007) o TA foi realizado ao mesmo tempo em que os animais eram induzidos à IPAC. Dessa forma, esses estudos descritos parecem não simular nos modelos experimentais o que realmente acontece com os asmáticos, que apresentam inflamação já estabelecida e aumentada. Nesse sentido, apenas os estudos de Hewitt et al., (2010), Lowder et al., (2010) e Silva et al., (2010) avaliaram o papel do TA após o estabelecimento da inflamação, entretanto cada um mostrou reversão da inflamação alérgica crônica em tempos diferentes de treinamento aeróbico e por mecanismos também distintos.

Apesar da relevância dos estudos experimentais descritos anteriormente que apontaram alguns mecanismos anti-inflamatórios, ainda existem questões a serem melhor estudadas como quando os benefícios promovidos pelo TA são iniciados nos modelos de asma experimental, uma vez que não existe consenso sobre a quantidade mínima de dias ou semanas necessárias para desencadeamento dos efeitos anti-inflamatórios. Ainda é necessário elucidar qual é o mecanismo iniciado primeiro e se algum é predominante. Sendo assim, mais investigações são necessárias para melhor entendimento do papel do TA na redução da inflamação pulmonar alérgica crônica nos modelos experimentais de asma.

2- OBJETIVOS

2- OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo são:

A) Avaliar o efeito do treinamento aeróbico ao longo do tempo visando identificar quais os mecanismos anti-inflamatórios são desencadeados.

B) Verificar em que momento é iniciada a reversão da resposta imune Th2, a produção dos mediadores inflamatórios, o remodelamento brônquico e qual mecanismo anti-inflamatório é predominante.

3- MÉTODOS

3. MÉTODOS

3.1- Local da execução da pesquisa

O estudo foi realizado no Laboratório de Terapêutica Experimental (LIM-20) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), com aprovação da comissão de ética para análise de projetos de pesquisa da FMUSP recebendo o protocolo número 0656/08.

3.2- Animais

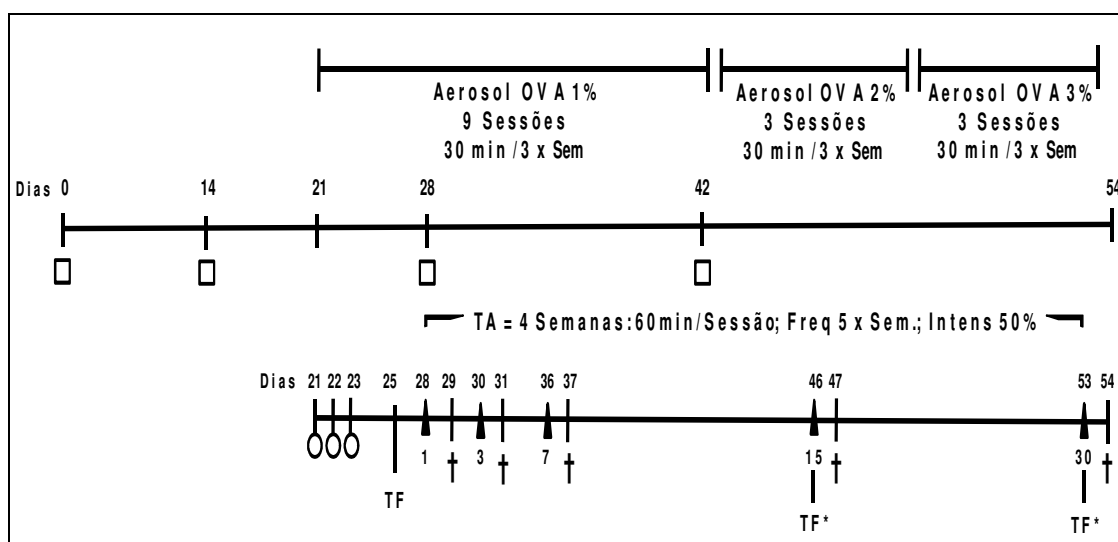
Foram utilizados 160 camundongos da linhagem BALB/c, machos, adultos jovens (entre 6 e 8 semanas de idade), peso 20 ± 3 gramas, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Terapêutica LIM-20 com a temperatura controlada ($22-25^{\circ}\text{C}$), luminosidade (ciclo 12h claro/12h escuro), 70% de umidade e alimentados com ração *ad libitum* (Purina, Brasil).

3.3- Delineamento do estudo

Os animais inicialmente foram divididos em 4 grupos ($n=8$ cada): Controle (CT), não induzidos à inflamação pulmonar alérgica crônica (IPAC) pela exposição a ovoalbumina (OVA) e não treinados); Treinamento Aeróbico (TA), não induzidos à IPAC e treinados); Ovoalbumina (OVA), induzidos à IPAC e não treinados; OVA+TA, induzidos à IPAC e treinados. Em seguida, para avaliar o efeito do TA ao longo do tempo foram formados subgrupos (CT, TA OVA e OVA+TA 1, 3, 7, 15 e 30, respectivamente), ou seja, repetidos 5 vezes para investigação do efeito do treinamento

aeróbico realizado por 1, 3, 7, 15 e 30 dias após o estabelecimento da inflamação pulmonar alérgica crônica (IPAC).

Figura 1- Protocolo de indução da IPAC OVA 1-3% e treinamento aeróbico



Legenda: Min = Minutos; Sem = Semana; Freq = Frequência; Intens = Intensidade; OVA= Ovoalbumina; TA = Treinamento Aeróbico; TF = Teste Físico; TF* = Representa o teste físico repetido após 15 e 30 dias de TA; Os símbolos □ representam as injeções intraperitoneais (i.p.s) aplicadas nos dias 0, 14, 28 e 42; Os símbolos O, ▲ e † representam a adaptação física na esteira, o período de dias de treinamento aeróbico e a eutanásia que ocorreu 24 horas após 1, 3, 7, 15 e 30 dias de TA, respectivamente.

3.4- Protocolo de indução da inflamação pulmonar alérgica crônica

Os grupos OVA inicialmente foram sensibilizados com injeções intraperitoneais (i.p.) com 0,2 mL a base de OVA+hidrox de alumínio+Salina (0,9%) (proporção de 50µg /camundongo, aplicadas nos dias 0, 14, 28 e 42). A partir do dia 21, os camundongos foram submetidos às sessões de aerossol a base de OVA+Salina com aumento gradual das concentrações de OVA para indução da IPAC com uso de um nebulizador *Soniclear* (Ultrasonic, Brasil). As exposições ao aerossol de Ovalbumina

(OVA) foram feitas com OVA a 1% entre o 21º ao 39º dia, OVA a 2% entre o 42º ao 46º dia, OVA 3% entre o 49º ao 53º dia (Figura 1). Os aumentos da concentração de OVA foram realizados para evitar tolerância ao alérgeno.

3.5- Teste físico e treinamento aeróbico

3.5.1- Período de adaptação

Na semana precedente ao início do TA, os animais foram submetidos a 3 dias de adaptação na esteira ergométrica *Inbraspost* (Inbramed, Brasil) (dias 21, 22 e 23), onde caminharam durante 15 minutos com velocidade de 0,2 Km/h e inclinação de 25% (Silva et al., 2010).

3.5.2- Teste físico

No 25º dia, todos os animais foram submetidos a um teste físico de esforço máximo, iniciando a corrida na esteira com inclinação de 25%, por um período de aquecimento físico de 2 minutos e 30 segundos com velocidade de 0,2 Km/h e aumentada em 0,1 Km/h a cada 2 minutos e 30 segundos até atingirem a exaustão, nesse momento foram registrados o tempo e a velocidade (Km/h) atingida, a intensidade de esforço do programa de TA foi determinada com 50% da velocidade máxima atingida em Km/h obtida no teste físico inicial (média dos grupos) (Silva et al., 2010). O mesmo teste físico foi repetido ao final do TA apenas para os grupos 15 e 30 dias.

3.5.3. Treinamento aeróbico

Após os grupos OVA+TA serem expostos a 3 sessões de aerosol foi iniciado no dia 28 o programa de treinamento aeróbico junto com os grupos TA (animais não induzidos à IPAC), com corrida em esteira ergométrica adaptada para camundongos,

frequência de 5 x semana, 60 minutos duração, com inclinação de 25% e intensidade de 50% (Km/h) da máxima capacidade de exercício alcançada no teste de esforço máximo (Silva et al., 2010).

3.6- Anestesia e coleta de sangue

Após 24 horas da última sessão de TA para os grupos 1, 3, 7, 15 e 30 dias, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/Kg; i.p.) (Cristalia, Brasil), traqueostomizados com uso de um tubo de polietileno, em seguida foram submetidos à assepsia e à tricotomia na região abdominal com iodo Polvidona (Polvidini, Brasil) para realização da incisão, então foram coletados 1 mL de sangue pela veia cava inferior com de uma seringa previamente preparada com 0,03 mL de heparina sódica (Hipolabor, São Paulo, Brasil). Após a coleta de sangue, ainda anestesiados, os animais foram eutanizados por ex-sanguinação. Em seguida as amostras de sangue foram centrifugadas a 5°C, durante 15 minutos, a 1000 rpm, o plasma foi coletado, colocado em tubos plásticos com 50 µl e armazenados a -80°C para futuras análises.

3.7- Coleta do lavado broncoalveolar

O lavado broncoalveolar (LBA) foi coletado para contagem celular total e diferencial. Após a traqueostomia foi injetado 1,5 mL solução salina (3 x 0,5 mL), seguido de uma leve massagem nos pulmões e recuperados 1,0 mL do volume injetado. O material foi centrifugado durante 15 minutos, 1000 rpm, 5° C. O sobrenadante foi coletado armazenado a -80°C para futuras análises de mediadores. O “pellet” de células foi ressuscitado em 30 µl de salina e a contagem do número total celular foi realizada com uso de uma câmara de *Neubauer*. As lâminas para contagem diferencial foram preparadas com o equivalente a 300 mil células por lâminas. O preparo ocorreu com uso

de uma citocentrífuga *Cytospin3Shadon* (Thermo Shandon, Pittsburgh, EUA) a uma rotação de 450 rpm durante 5 minutos. O botão celular foi fixado em álcool 70% e corado com *Diff Quick* (Medion Diagnosis, Dürdingen, Suíça). Foram contadas 300 células/ lâmina (Saraiva-Romanholo et al., 2003; Vieira et al., 2012).

3.8- Coleta dos pulmões e dos músculos quadríceps

A caixa torácica foi aberta e os pulmões retirados, em seguida o pulmão direito foi retirado e pré-fixado com 0,30 mL de formol 4% e imerso em formol 4% por 24 horas. Após esse período, o pulmão foi submetido à rotina histológica com parafina (Azar & Espinoza, 1986). Os cortes de espessura 5 µm de espessura foram corados com Hematoxilina e Eosina (H/E) para análise da espessura da músculo liso das vias aéreas e do espessamento do epitélio, Picrossirius para análise do conteúdo de fibras colágenas na parede das vias aéreas, Resorcina-Fucsina com oxidação para análise do conteúdo de fibras elásticas na parede das vias aéreas, e *Periodic Acid-Schiff-Alcian Blue* (PAS-AB) para análise da produção do muco epitelial. Com o tecido pulmonar ainda foram feitas lâminas de pulmão silanizadas em branco para futuras análises com imunohistoquímica (Azar & Espinoza, 1986). Após a coleta dos pulmões foram também retirados os músculos quadríceps, em seguida foram armazenados em formol por 24 horas, após os tecidos foram submetidos à rotina histológica e de imunohistoquímica para futuras análises da miocinas.

3.9– Imunohistoquímica

As lâminas do tecido pulmonar produzidas pelos setores técnicos de histologia e imunohistoquímica (Departamento de Patologia e LIM-20, FMUSP) receberam aplicações de silane (Sigma-Aldrich, Inc.) e foram prepararam através das técnicas

clássicas de imunohistoquímica (Azar & Espinoza, 1986) para a marcação dos mediadores com os seguintes anticorpos: interleucina (IL)-4, IL-5, IL-10, IL-1ra, osteopontina (OPN); quimiocinas: eotaxina e RANTES; moléculas de adesão: ICAM-1 e VCAM-1; fator de transcrição nuclear-*kappa* B (NF- κ B) e FOXP3; VEGF; TGF- β e Receptor de Glicocorticóide (RG). Todos os anticorpos usados foram da marca Santa Cruz (Vieira et al., 2011; Reis Gonçalves et al., 2012; Silva et al., 2012).

As produções de IL-10, IL-1ra e IL-6 no tecido muscular esquelético (quadríceps) foram marcadas também pela técnica de imunohistoquímica conforme descrito acima, as quantificações das aéreas positivas foram feitas por técnica de análise de imagem como descrito no item 3.12.

3.10- Análise morfométrica

As lâminas preparadas com a técnica de imunohistoquímica foram analisadas com o uso de técnica morfométrica através de um retículo de Weibel conectado a uma ocular do microscópio *Olympus Bx40F4* (Olympus Optical CO.LTD, Tóquio, Japão). A contagem foi feita usando um retículo ocular de Weibel com 50 linhas e 100 pontos (aumento de 1,000x com área conhecida de 10,000 μm^2) (Weibel, 1990). Cada marcador imune foi avaliado através da contagem celular, sendo determinada com o número de células positivas para cada mediador destacado, dividida pela área do tecido e as mensurações foram expressas como células/ μm^2 . Os resultados foram então transformados para células/ mm^2 por ajuste de unidade (Weibel, 1990). A quantificação do RG no músculo liso das vias aéreas foi realizada pelos pontos do retículo que coincidiram em cima das marcações positivas, valores corrigidos pelo comprimento da membrana basal.

3.11- Quantificação dos títulos específicos IgE e IgG₁ para OVA

As amostras de plasma sanguíneo foram utilizadas para avaliação dos títulos de imunoglobulina (Ig)E e IgG₁ através da técnica de anafilaxia cutânea passiva como descrito por Mota e Perini (1970). Para determinação dos títulos de IgE, o plasma sanguíneo foi diluído nas proporções de 1:10, 1:20, 1:40; 1:80, 1:160, 1:320 e 1:640 injetados no subcutâneo do dorso de ratos *Wistar* previamente depilados. Após 24 horas, os animais receberam uma injeção intravenosa contendo a base de 1 mg de OVA e 10 mg de azul de Evans homogeneizados em 1 mL de NaCL (0,9%). Após 60 minutos, os animais foram anestesiados e expostos à eutanásia, a pele do dorso foi removida e foi avaliada a reação anafilática local pela quantificação do diâmetro da reação no tecido subcutâneo.

As quantificações dos títulos de IgG₁ ocorreram de forma semelhante à de IgE, entretanto a reação cutânea foi realizada com uso de camundongos BALB/c. O plasma foi diluído nas proporções de 1:10, 1:20, 1:40; 1:80, 1:160, 1:320 e 1:640 e injetados no tecido subcutâneo do dorso dos animais. Após 24 horas de repouso para ocorrer à reação passiva, os animais receberam injeções intravenosas a base de 1 mg de OVA e 10 mg de azul de Evans homogeneizados em 1 mL de NaCL (salina) (0,9%) . Após 60 minutos da aplicação, os animais foram anestesiados e expostos a eutanásia, a pele do dorso foi tricotomizada para visualização e foi avaliada a reação ocorrida no local da injeção inicial no tecido subcutâneo.

3.12- Quantificação do remodelamento brônquico por análise de imagem

O remodelamento brônquico (RB) foi quantificado pela técnica de análise de imagem. Todas as lâminas marcadas com H/E, Picrossirus, Resorcina-fucsina e PAS-AB usados para marcação do espessamento do músculo liso e epitélio das vias aéreas,

fibras de colágeno, para elástica e para muco, respectivamente, foram focalizadas com aumento de 400x em um microscópio *Eclipse E-200* (Nikon, Japão) e então fotografadas por uma câmera digital (Photometrics, Japão) acoplada a microscópio, ambos conectados em um microcomputador *OptiPlex 390* (Dell, Brasil) onde as imagens foram captadas pelo e *software Infinity Capture* (Lumenera Corporation, ON, Canadá).

Para cada lâmina e seu respectivo marcador foram fotografadas 5 vias aéreas, após cada foto foi analisada pelo *software Image Proplus 4.5* (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA). O espessamento do músculo liso foi mensurado da parte mais interna até a parte mais externa, a área do epitélio foi quantificada através da quantificação da parede epitelial (cálculo das áreas). As deposições das fibras de colágeno e elástica foram avaliadas na área compreendida entre a membrana basal epitelial até a adventícia da via aérea de acordo com sua coloração específica captada pelo programa *Image ProPlus*, enquanto a coloração específica positiva para muco foi quantificada pela área marcada no epitélio captada pelo *software*. As áreas positivas encontradas foram mostradas em percentual da média das 5 fotos analisadas de cada marcador em relação a área total das vias aéreas (Silva et al., 2010).

3.13- Análise estatística

A estatística foi realizada com uso do programa *Sigma Stat 3.5* (Systat Software, San Jose, CA, EUA), os gráficos foram criados no *software Graphpad Prism 5.0* (GraphPad Software, Inc., CA, EUA). Os dados paramétricos foram analisados como teste *Two-way* (ANOVA) seguido pelo teste *post hoc* de *Tukey*. Os dados foram apresentados com intervalo de confiança (IC 95%), nível de significância adotado foi 5%. Com objetivo de melhor entendimento dos resultados, os grupos Controle (CT) 1, 3, 7, 15 e 30 e os grupos Treinamento Aeróbico (TA) 1, 3, 7, 15 e 30 foram agrupados

formando apenas um grupo CT e um TA apresentados por apenas 1 *Box plot* cada. As análises estatísticas do teste *Two-way* fizeram comparação entre pares: grupos CT comparado TA; OVA comparado com CT; OVA comparado com OVA+TA; OVA+TA comparado com TA. Os testes estatísticos foram realizados apenas intra grupos e não inter subgrupos.

4- RESULTADOS

4. RESULTADOS

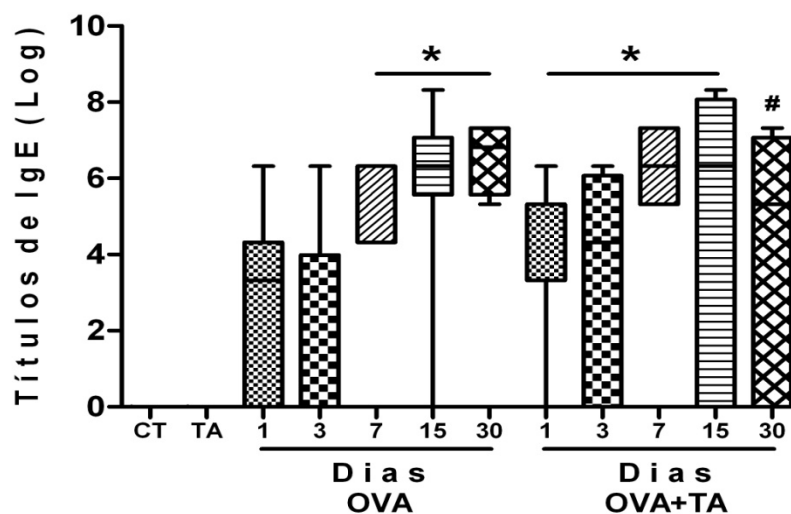


Figura 2- IgE: Títulos específicos para ovalbumina (OVA) quantificados pela técnica de anafilaxia cutânea passiva. Os valores nos gráficos estão apresentados com mediana e 95% do intervalo de confiança. Descrição dos grupos: CT = Controle, animais não induzidos à inflamação pulmonar alérgica crônica (IPAC) e não treinados aerobicamente; TA = animais não induzidos à IPAC e treinados aerobicamente; OVA = animais induzidos à IPAC e não treinados aerobicamente; OVA+TA = animais induzidos à IPAC e treinados aerobicamente. Foram feitos grupos CT e TA para cada período (1, 3, 7, 15 e 30), mas no gráfico foi apresentado somente um *boxplot* com todos os dados agrupados para cada um desses grupos. O símbolo * representa $p < 0,05$ quando comparados com os grupos CT e TA; O símbolo # representa $p < 0,05$ quando comparado com o grupo OVA 30.

Não foi identificada produção de IgE nos grupos CT e TA ($p > 0,05$). A indução à IPAC aumentou os níveis de IgE nos grupos OVA (7, 15 e 30) e OVA+TA (1 até 30) quando comparados com os grupos CT e TA ($p < 0,05$) (Figura 2). O TA apenas reduziu a produção de IgE após 30 dias ($p < 0,05$) (Figura 2).

Na Figura 3 os resultados mostraram que não foi quantificado produção de IgG₁ nos grupos CT e TA ($p > 0,05$). Todos os grupos OVA apresentaram aumento de IgG₁ quando comparados com grupos CT e TA ($p < 0,05$). Similarmente ao que ocorreu com o IgE, o TA também reduziu a produção de IgG₁ após 30 dias ($p < 0,05$).

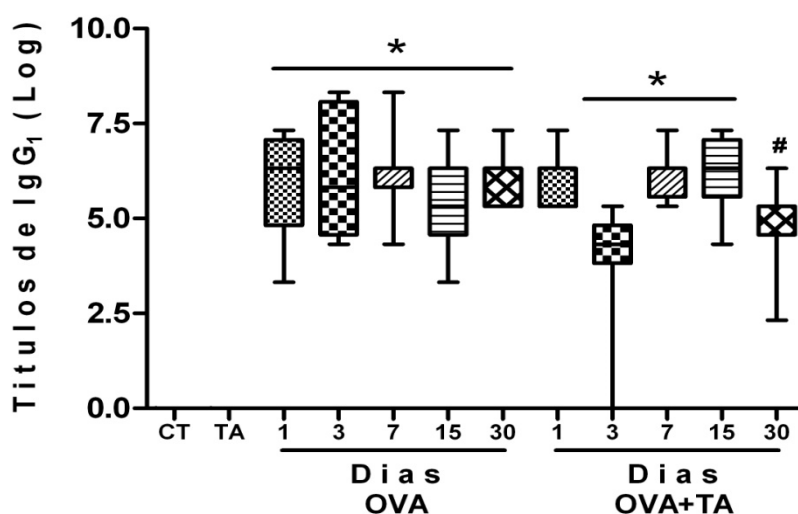


Figura 3- IgG₁. Títulos específicos para OVA quantificados por anafilaxia cutânea passiva. Descrição detalhada da apresentação dos dados e dos grupos na figura 2. * $p < 0,05$ quando comparados com os grupos CT e TA. # $p < 0,05$ quando comparado com OVA 30.

As células totais do lavado broncoalveolar (LBA) foram aumentadas nos grupos OVA e OVA+TA (7, 15 e 30 dias) quando comparados com os grupos CT e TA ($p < 0,05$). O TA apenas reduziu as células totais a partir do 7º dia, benefícios que foram mantidos nos grupos OVA+TA seguintes ($p < 0,05$) (Figura 4).

Os eosinófilos no LBA foram aumentados nos grupos OVA e OVA+TA (1, 3, 7 e 15) quando comparados com os grupos CT e TA ($p < 0,05$). Verifica-se ainda que há um pico no grupo OVA 7, porém o grupo OVA 30 apresenta aumento, mas sem diferença significativa. O TA reduziu os eosinófilos a partir do 7º dia ($p > 0,05$), redução que foi consecutivamente mantida nos grupos seguintes induzidos à IPAC e treinados aerobicamente ($p < 0,05$) (Figura 5). Os neutrófilos no LBA foram aumentados apenas nos grupos OVA e OVA+TA 15 e 30 dias quando comparados com os grupos CT e TA ($p < 0,05$). O TA reduziu a contagem de neutrófilos após 30 dias ($p < 0,05$) (Figura 6). A contagem dos macrófagos foi aumentada nos grupos OVA 7, 15 e 30 e OVA+TA 1

quando comparados com os grupos CT e TA ($p < 0,05$). O TA reduziu os macrófagos só a partir do 15º ($p < 0,05$) (Figura 7).

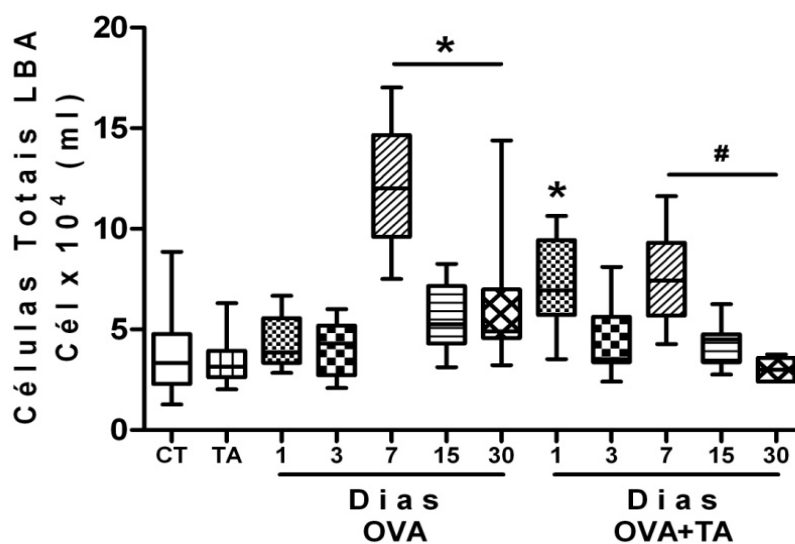


Figura 4- Contagem das células totais de lavado broncoalveolar (LBA). Descrição detalhada da apresentação dos dados e dos grupos na figura 2. * $p < 0,05$ quando comparados com os grupos CT e TA. # $p < 0,05$ quando comparados com os grupos OVA.

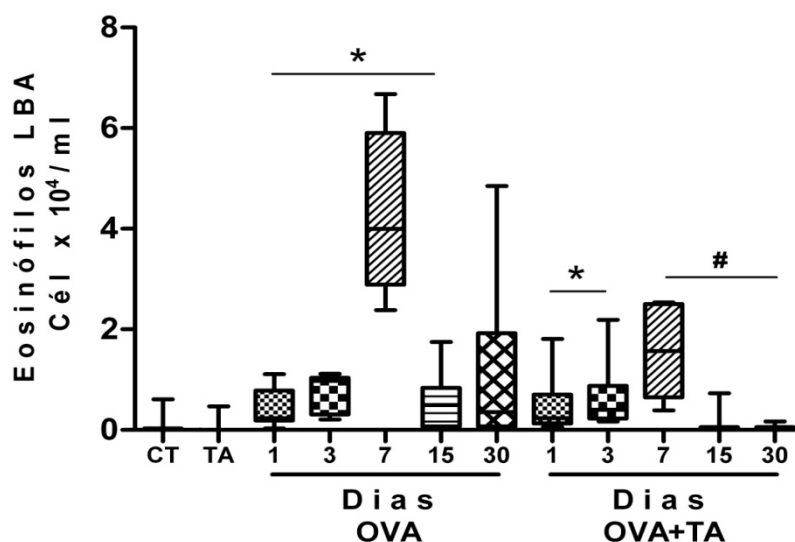


Figura 5 – Contagem de eosinófilos no LBA. * $p < 0,05$ quando comparados com os grupos CT e TA. # $p < 0,05$ quando comparados com os grupos OVA.

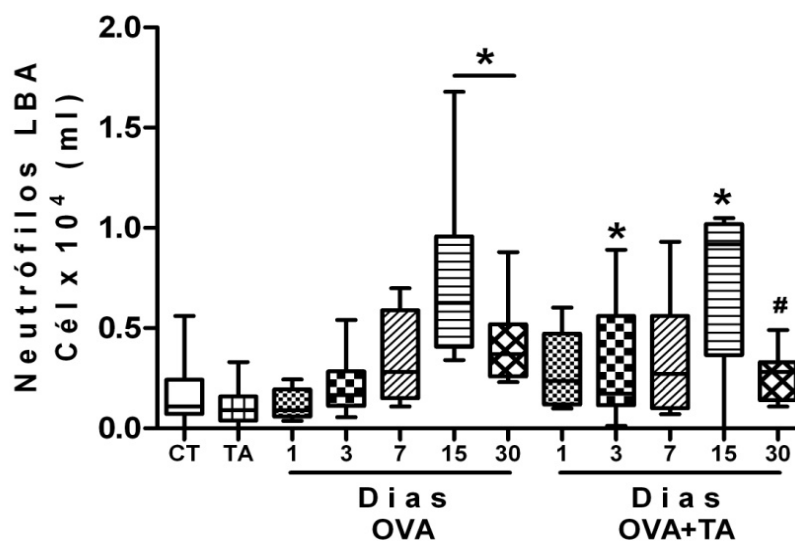


Figura 6- Contagem de neutrófilos no LBA. * $p < 0,05$ quando comparados com os grupos CT e TA. # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo OVA 30.

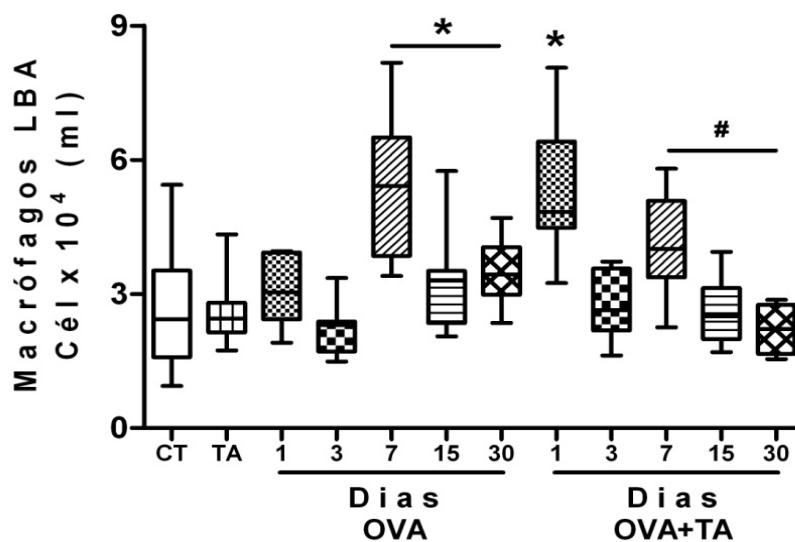


Figura 7- Contagem de macrófagos no LBA. * $p < 0,05$ quando comparados com os grupos CT e TA. # $p < 0,05$ quando comparados com os grupos OVA.

A quantificação do remodelamento brônquico mostrou que todos os grupos induzidos à IPAC tiveram espessamento do músculo liso e epitélio, aumento das produções das fibras de colágeno, elástica e produção do muco epitelial quando comparados com os grupos CT e TA ($p < 0,05$) (Figuras 8-12). O TA reverteu o espessamento do músculo liso, do epitélio e ainda diminuiu a produção de colágeno a partir do 7º dia, benefícios mantidos também nos grupos seguintes induzidos à IPAC e ao TA ($p < 0,05$). Curiosamente, a reversão das deposições das fibras elásticas e produção muco epitelial ocorreram só a partir do 15º dia de TA ($p < 0,05$) (Figuras 11 e 12).

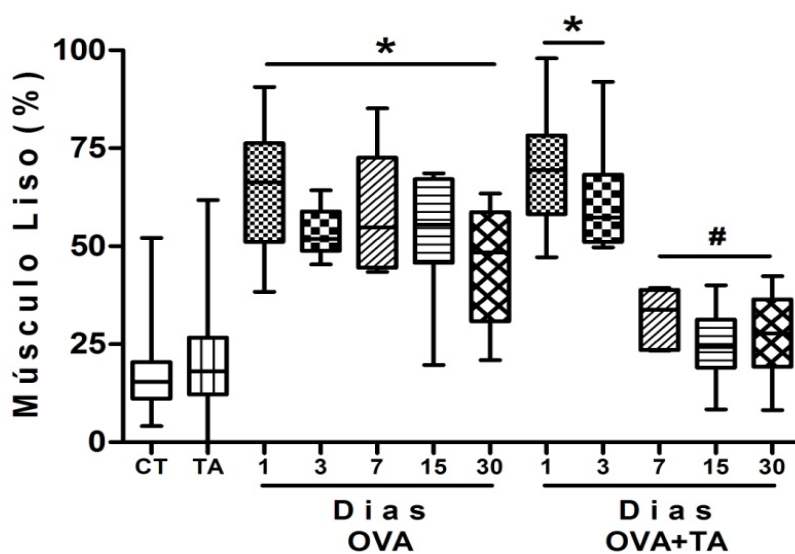


Figura 8- Músculo liso. Percentual de área positiva das vias aéreas. * $p < 0,05$ quando comparados com os grupos CT e TA. # $p < 0,05$ quando comparados com os grupos OVA.

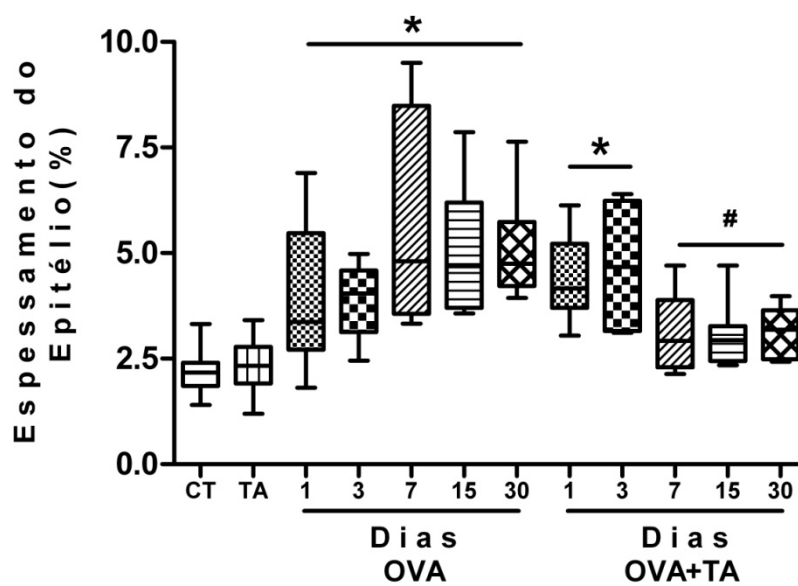


Figura 9- Espessamento do epitélio. Percentual de área total. * $p < 0,05$ quando comparados com os grupos CT e TA. # $p < 0,05$ quando comparados com os grupos OVA.

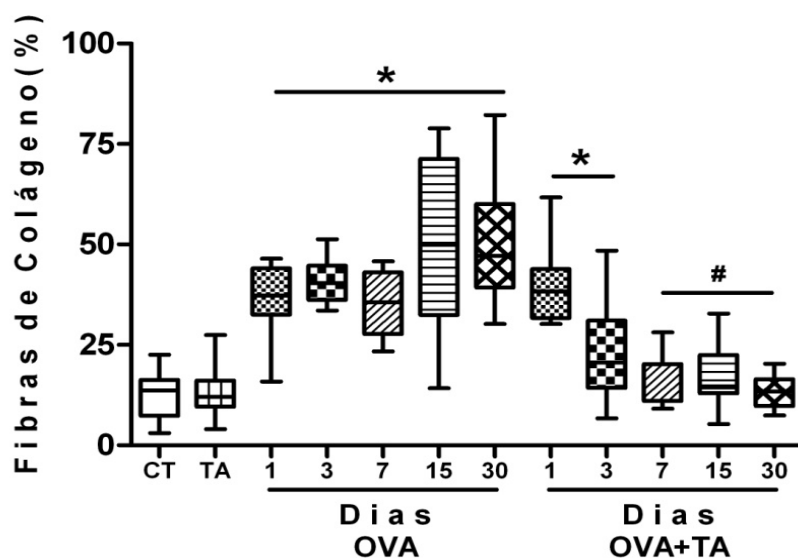


Figura 10- Fibras de colágeno. Percentual de área positiva das vias aéreas. * $p < 0,05$ quando comparados com os grupos CT e TA. # $p < 0,05$ quando comparados com os grupos OVA.

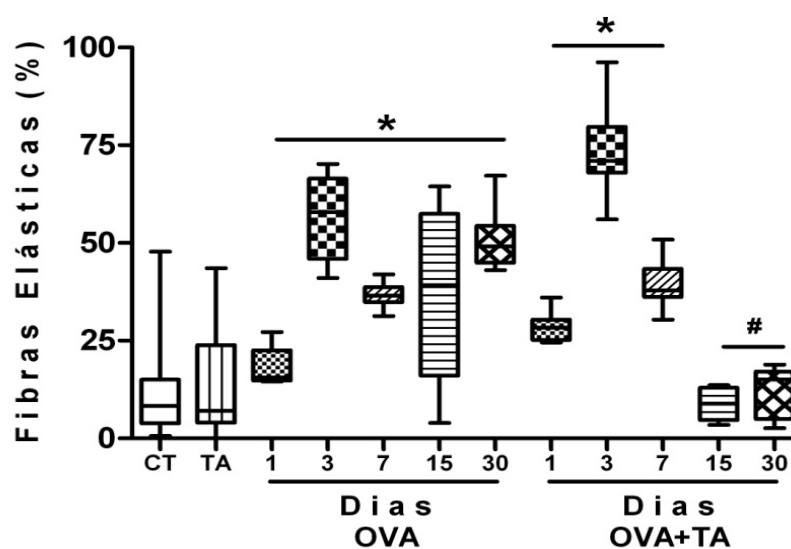


Figura 11- Fibras elásticas. Percentual de área positiva das vias aéreas. * $p < 0,05$ quando comparados com os grupos CT e TA. # $p < 0,05$ quando comparados com os grupos OVA.

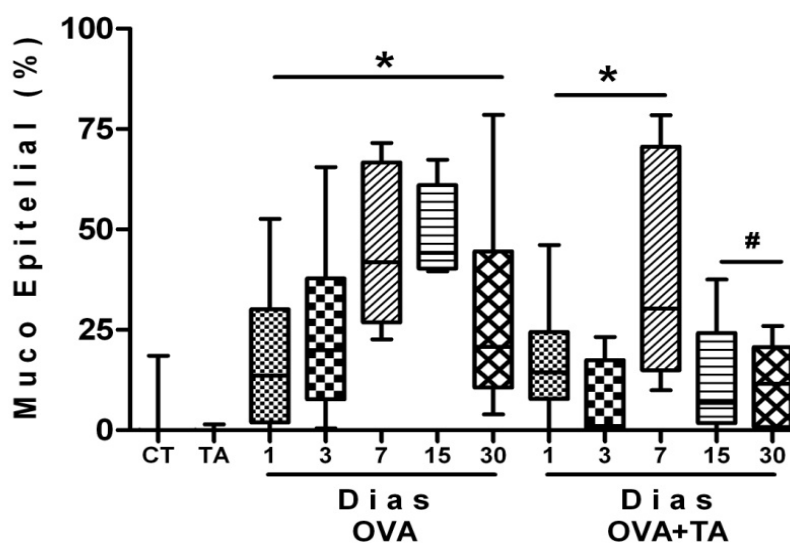


Figura 12- Muco Epitelial. Percentual de Área positiva das vias aéreas. * $p < 0,05$ quando comparados com os grupos CT e TA. # $p < 0,05$ quando comparados com os grupos OVA.

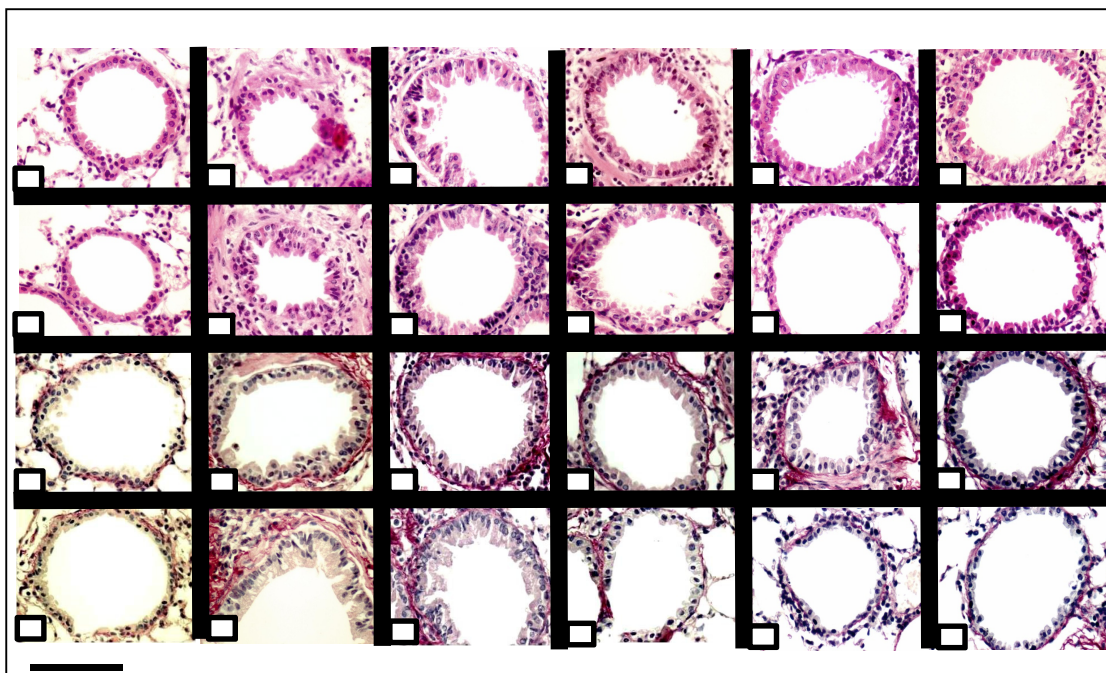


Figura 13- Fotografias do músculo liso e das fibras de colágeno. Fotos A-L representando o espessamento do músculo liso. Fotos M-W representando as deposições das fibras de colágeno das vias aéreas (400x; Escala 25 μ m). A e M = Grupo Controle; G e S = Grupo TA; B-F e N-R = Grupos OVA1-30; H-L e I-W Grupos OVA+TA 1-30, respectivamente.

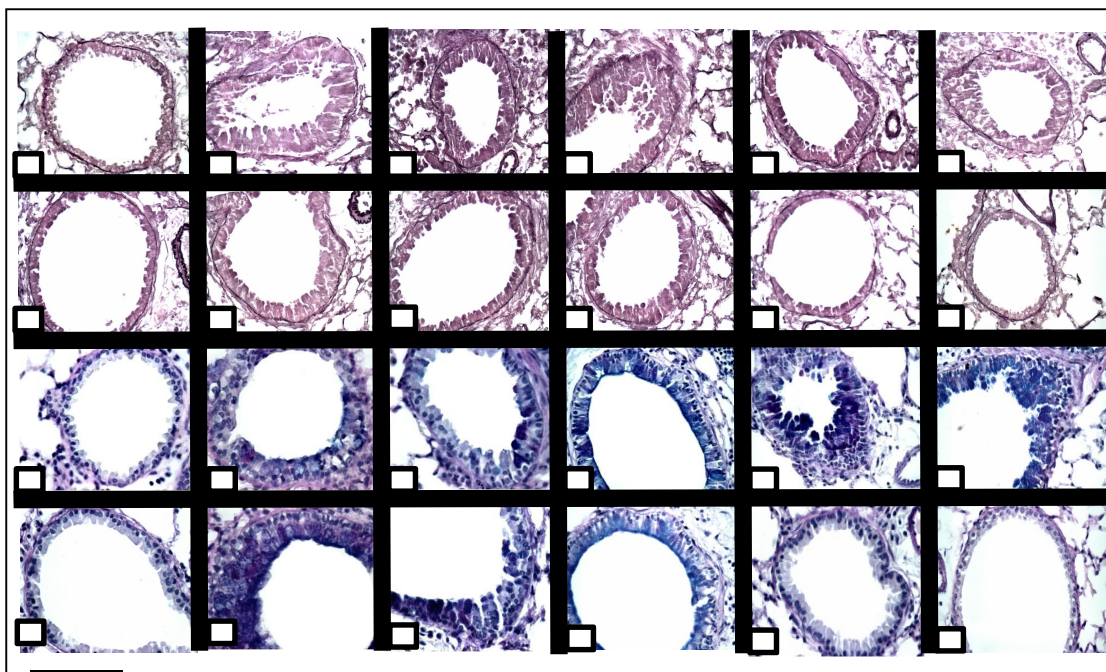


Figura 14- Fotografias das fibras elásticas e do muco. Fotos A-L representando as deposições das fibras elásticas. Fotos M-W representando produção de muco pelo epitélio das vias aéreas (400x; Escala 25 μ m). A e M = Grupo Controle; G e S = Grupo TA; B-F e N-R = Grupos OVA1-30; H-L e I-W Grupos OVA+TA 1-30, respectivamente.

As figuras 15 e 16 mostraram que todos os grupos induzidos à IPAC tiveram aumento de IL-4 e IL-5 quando comparados com os grupos CT e TA ($p < 0,05$). O TA reduziu as produções de IL-4 e de IL-5 a partir do 7º dia, diminuição mantida nos grupos seguintes induzidos à IPAC e treinados aerobicamente ($p < 0,05$).

Os resultados do presente estudos também mostraram que as quimiocinas eotaxina e RANTES (Figuras 17 e 18), bem como moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 foram aumentados em todos os grupos OVA quando comparados com os grupos CT e TA ($p < 0,05$) (Figuras 19 e 20). Interessantemente, o TA diminuiu as produções de eotaxina, RANTES, ICAM-1 e VCAM-1 a partir do 7º dia, as reduções foram mantidas também nos grupos seguintes ($p < 0,05$).

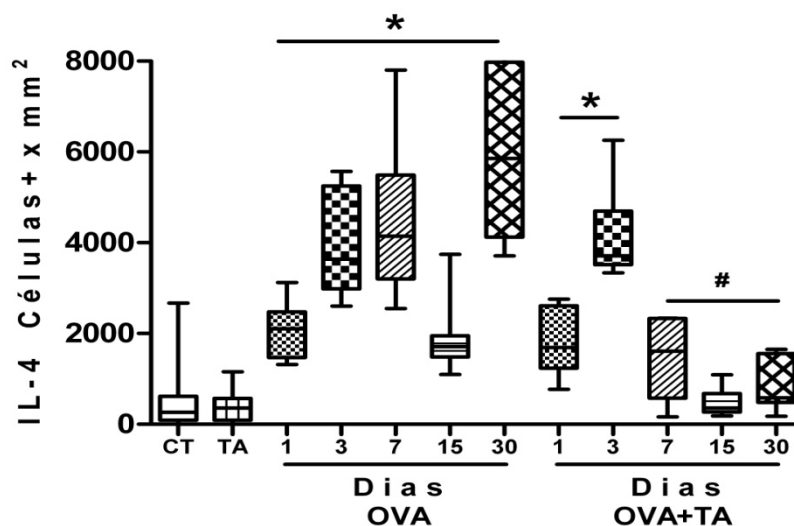


Figura 15- IL-4: Células peribrônquicas positivas avaliadas com técnica de morfometria (aumento 1000x, área de 10,000 mm²). * $p < 0,05$ quando comparados com os grupos CT e TA; # $p < 0,05$ quando comparados com os grupos OVA.

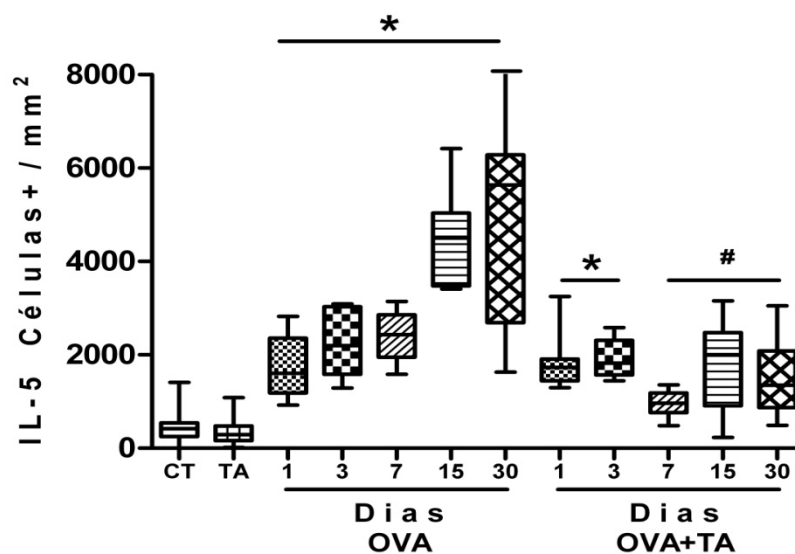


Figura 16- IL-5: Células peribrônquicas positivas avaliadas com técnica de morfometria (aumento 1000x, área de 10,000 mm²). * p<0,05 quando comparados com os grupos CT e TA; # p<0,05 quando comparados com os grupos OVA.

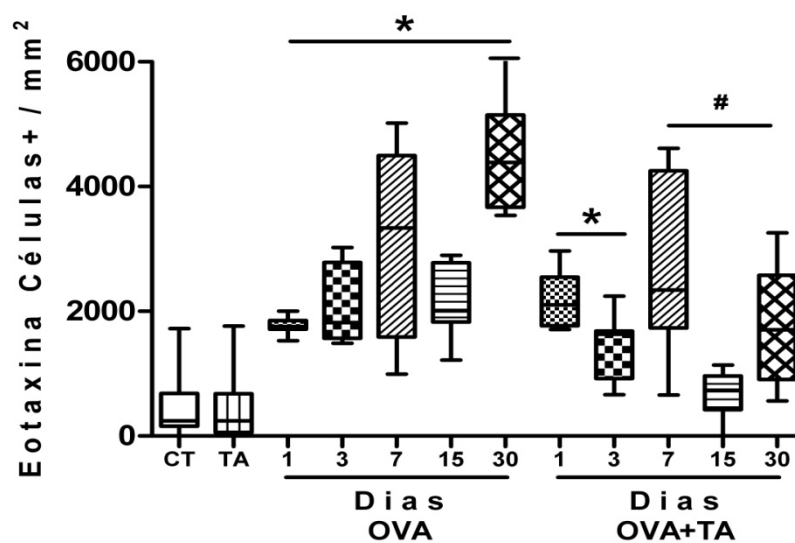


Figura 17- Eotaxina: Células peribrônquicas positivas avaliadas com técnica de morfometria (aumento 1000x, área de 10,000 mm²). * p<0,05 quando comparados com os grupos CT e TA; # p<0,05 quando comparados com os grupos OVA.

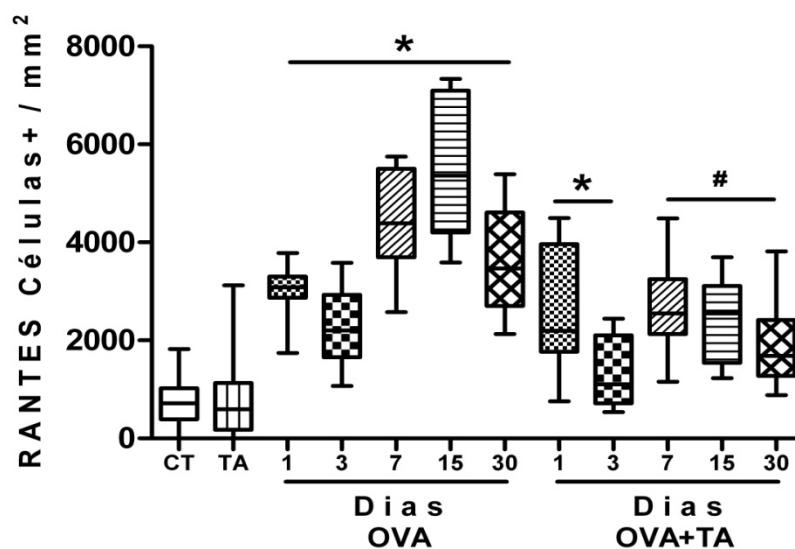


Figura 18- RANTES: Células peribrônquicas positivas avaliadas com técnica de morfometria (aumento 1000x, área de 10,000 mm²). * p<0,05 quando comparados com os grupos CT e TA; # p<0,05 quando comparados com os grupos OVA.

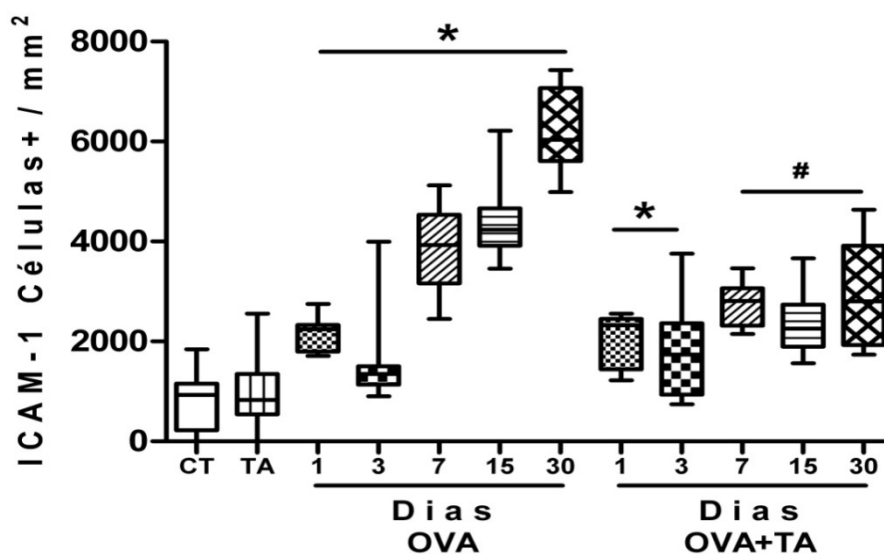


Figura 19- ICAM-1: Células peribrônquicas positivas para moléculas de adesão avaliadas com técnica de morfometria (aumento 1000x, área de 10,000 mm²). * p<0,05 quando comparados com os grupos CT e TA; # p<0,05 quando comparados com os grupos OVA.

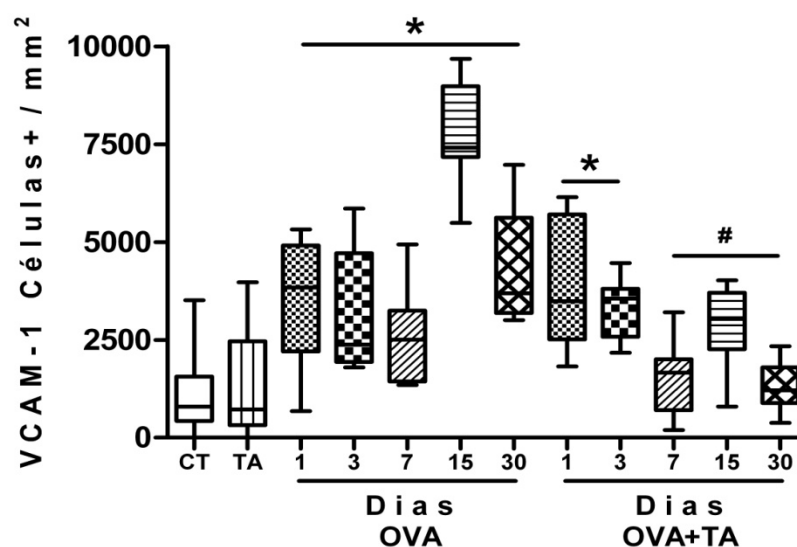


Figura 20- VCAM-1: Células peribrônquicas positivas para moléculas de adesão avaliadas com técnica de morfometria (aumento 1000x, área de 10,000 mm²). * $p < 0,05$ quando comparados com os grupos CT e TA; # $p < 0,05$ quando comparados com os grupos OVA.

A produção do TGF- β foi aumentada em todos os grupos OVA quando comparados com os grupos CT e TA ($p < 0,05$). O TA reduziu a produção do TGF- β a partir do 3º dia, redução mantida nos grupos seguintes ($p < 0,05$) (Figura 21).

A Figura 22 mostra que a produção do VEGF foi aumentada em os grupos induzidos à IPAC quando comparados com os grupos CT e TA ($p < 0,05$). O TA reduziu a produção do VEGF a partir do 7º dia ($p < 0,05$), redução mantida nos grupos seguintes.

A produção da citocina Osteopontina (OPN) foi aumentada em todos os grupos OVA quando comparados com os grupos CT e TA ($p < 0,05$). O TA apenas reduziu a produção a OPN após 15 dias ($p < 0,05$) (Figura 23).

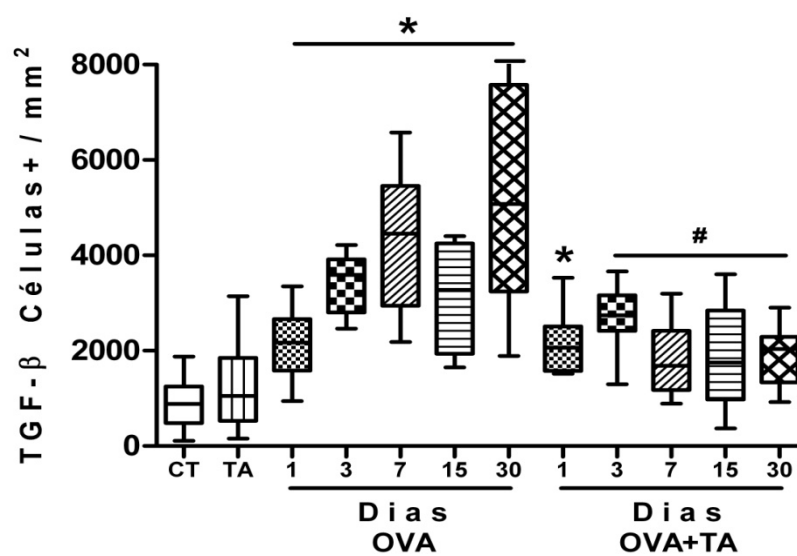


Figura 21- TGF- β : Células peribrônquicas positivas avaliadas com técnica de morfometria (aumento 1000x, área de 10,000 mm²). * p<0,05 quando comparados com os grupos CT e TA; # p<0,05 quando comparados com os grupos OVA.

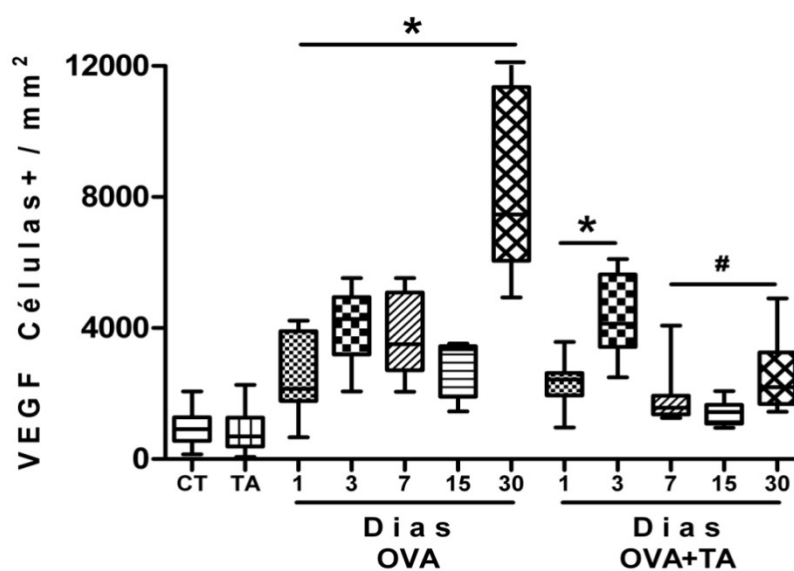


Figura 22- VEGF: Células peribrônquicas positivas avaliadas com técnica de morfometria (aumento 1000x, área de 10,000 mm²). * p<0,05 quando comparados com os grupos CT e TA; # p<0,05 quando comparados com os grupos OVA.

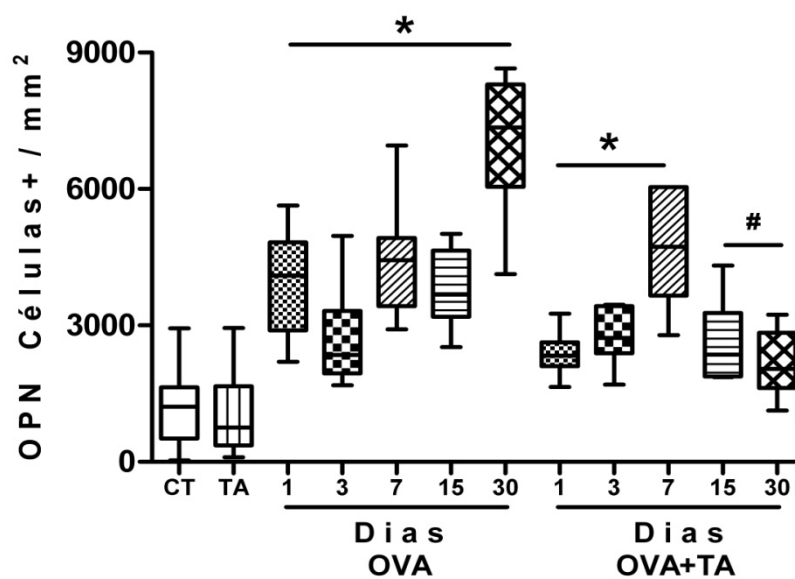


Figura 23- Osteopontina (OPN): Células peribrônquicas positivas avaliadas com técnica de morfometria (aumento 1000x, área de 10,000 mm²). * p<0,05 quando comparados com os grupos CT e TA; # p<0,05 quando comparados com os grupos OVA.

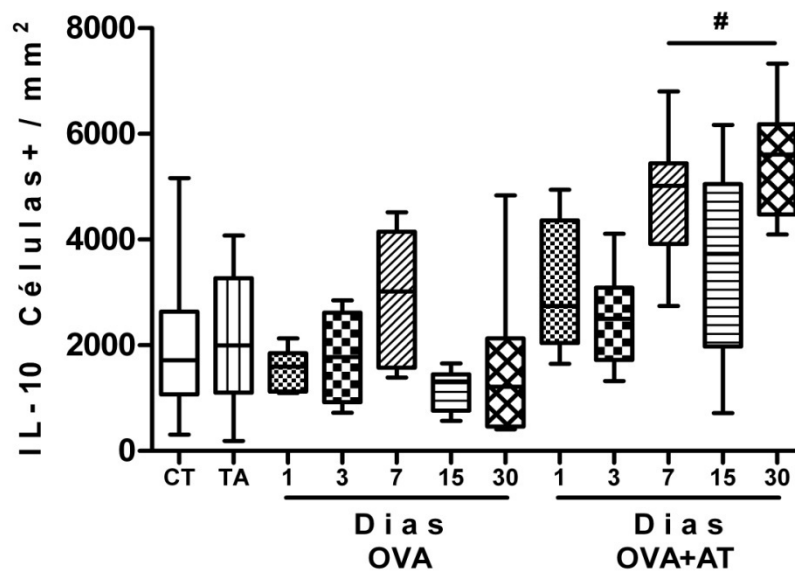


Figura 24- IL-10: Células peribrônquicas positivas avaliadas com técnica de morfometria (aumento 1000x, área de 10,000 mm²). # p<0,05 quando comparados com os grupos OVA.

Os resultados do presente estudo mostraram que os grupos CT, TA e OVA tiveram produções de IL-10 e IL-1ra não significantes. Apesar disso, o TA aumentou a produção de IL-10 e IL-1ra no grupo OVA+TA a partir do 7º dia ($p<0,05$), aumentos mantidos nos grupos OVA+TA seguintes (Figuras 24 e 25).

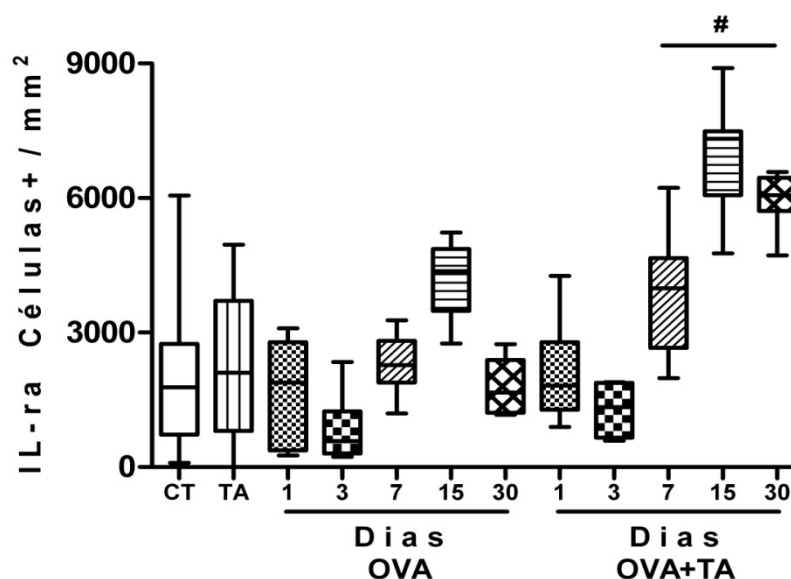


Figura 25- IL-1ra: Células peribrônquicas positivas avaliadas com técnica de morfometria (aumento 1000x, área de 10,000 mm²). # $p<0,05$ quando comparados com os grupos OVA.

Os nossos achados também mostraram que todos os grupos CT, TA e OVA tiveram menor produção do RG nas células peribrônquicas. Porém, o TA aumentou o RG desde o 1º dia, aumento mantido para os grupos OVA+TA seguintes ($p<0,05$) (Figura 26). No presente estudo foi ainda quantificado o receptor do hormônio glicocorticóide endógeno (RG) no músculo liso (ML) das vias aéreas. Os achados mostraram que os grupos OVA (não treinados aerobicamente) apresentaram redução do RG quando comparados com os grupos CT ($p<0,05$). O TA foi eficiente no aumento do RG no ML a partir do 3º dia, mudança mantida nos grupos seguintes induzidos à IPAC e treinados aerobicamente ($p<0,05$) (Figura 27).

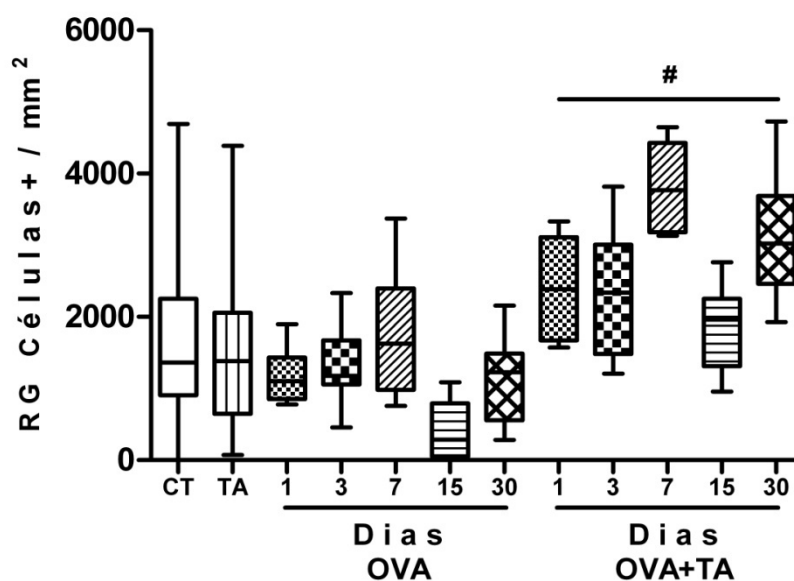


Figura 26- Receptor de glicocorticoide (RG) - Células peribrônquicas: avaliadas com técnica de morfometria (aumento 1000x, área de 10,000 mm²). * p<0,05 quando comparados com os grupos CT e TA; # p<0,05 quando comparados com os grupos OVA.

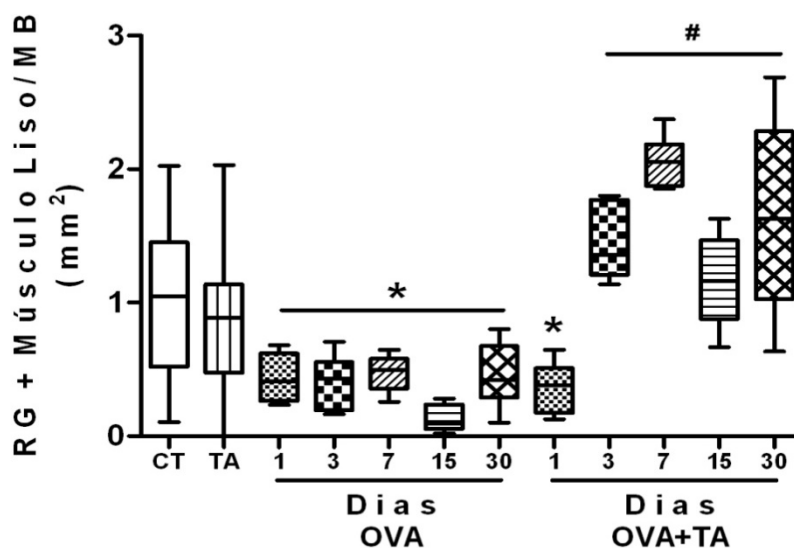


Figura 27- Receptor de glicocorticoide (RG) no músculo liso (ML): Área positiva do ML das vias aéreas para RG avaliadas com técnica de morfometria (aumento 1000x, área de 10,000 mm²), corrigida pelo comprimento da membrana basal (MB) da via aérea (área positiva de músculo/área da membrana basal). * p<0,05 quando comparados com os grupos CT e TA; # p<0,05 quando comparados com os grupos OVA.

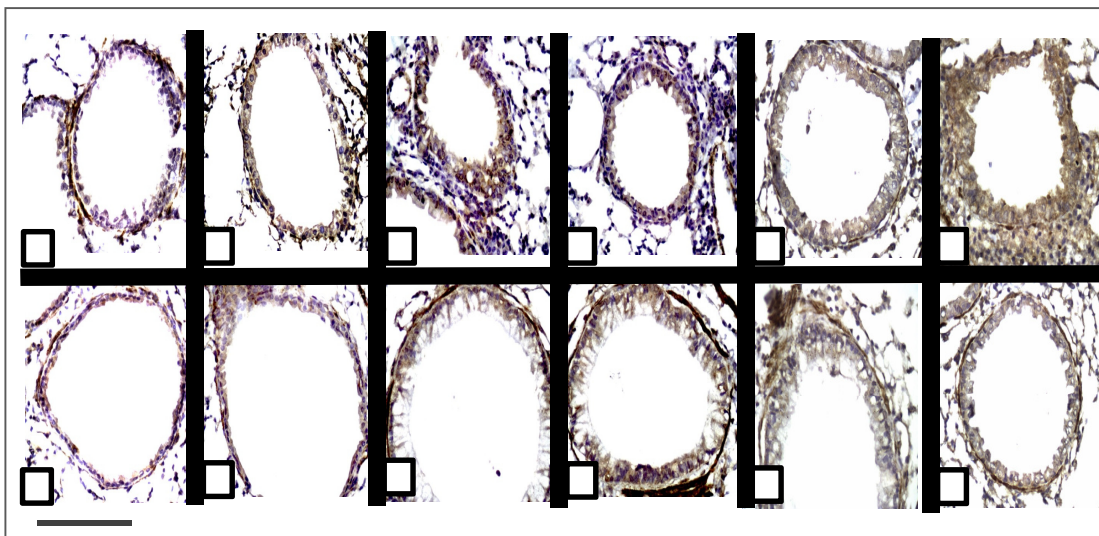


Figura 28 – Fotografias da marcação positiva do receptor de glicocorticóide (RG) no músculo liso das vias aéreas (400x; Escala 25 μ m). Fotos: A = Grupo Controle; G = Grupo TA; Fotos B-F = Grupos OVA1-30; Fotos H-L = Grupos OVA+TA 1-30, respectivamente.

A Figura 29 mostra que todos os grupos induzidos à IPAC tiveram aumento do NF- κ B quando comparados com os grupos CT e TA ($p < 0,05$). O TA reduziu o NF- κ B a partir do 7^o dias, mudança mantida nos grupos OVA+TA seguintes ($p < 0,05$). Os achados do presente estudo ainda mostraram que o FOXP3 foi aumentado nos grupos OVA 1, 3, 7 e 15 e OVA+TA 3, 7 e 15 quando comparados com os grupos CT e TA ($p < 0,05$). Interessantemente, os grupos OVA 30 e OVA+TA 30 não tiveram aumento do FOXP3 ($P > 0,05$) (Figura 30).

4.1 Miocinas IL-10, IL-1ra e IL-6

Não foi verificada produção das miocinas IL-10, IL-1ra e IL-6 no tecido muscular esquelético quadríceps ($p > 0,05$). Dados não mostrados devido a nenhuma marcação positiva.

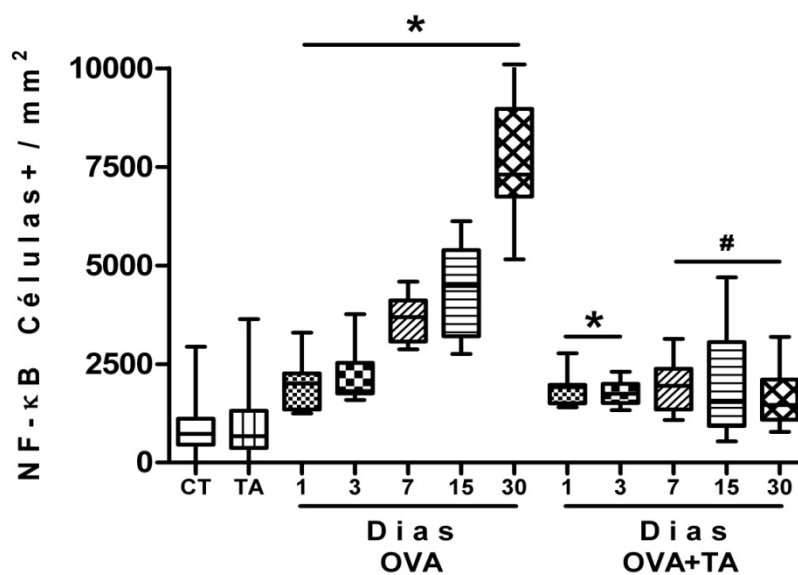


Figura 29- NF-κB: Células peribrônquicas positivas avaliadas com técnica de morfometria (aumento 1000x, área de 10,000 mm²). * p<0,05 quando comparados com os grupos CT e TA; # p<0,05 quando comparados com os grupos OVA.

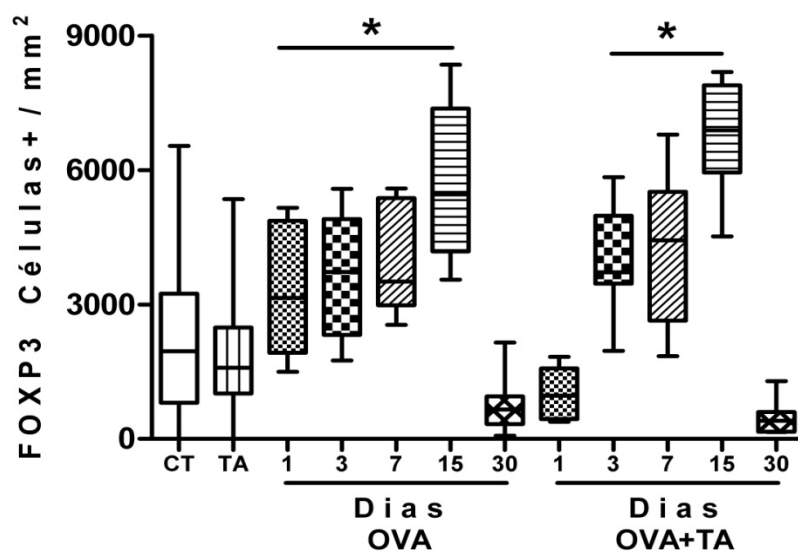


Figura 30- FOXP3: Células peribrônquicas positivas avaliadas com técnica de morfometria (aumento 1000x, área de 10,000 mm²). * p<0,05 quando comparados com os grupos CT e TA.

5- DISCUSSÃO

5- DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que o treinamento aeróbico (TA) aumentou a produção do receptor de glicocorticóide (RG) entre o 1º e 3º dia, seguido pelo aumento da produção das citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e IL-1ra), da redução do NF-κB e das citocinas Th2, seguidos pelas diminuições dos fatores quimiotáticos (eotaxina, RANTES, ICAM-1, VCAM-1) e da migração celular nas vias aéreas a partir do 7º dia de TA. A redução do remodelamento brônquico (RB) foi iniciada a partir de 7 dias, assim como o VEGF, a reversão total do RB ocorreu após 15 dias do início do TA, ao mesmo tempo em que ocorreu a diminuição da produção da osteopontina (OPN). Os níveis de IgE e IgG₁ foram reduzidos só ao final dos 30 dias do início do TA. Os resultados indicam que os benefícios do TA parecem ser iniciados a partir do 3º dia com o aumento do RG no músculo liso das vias aéreas, seguido pelo aumento de IL-10 e IL-1ra e da redução do NF-κB após o 7º dia, quando o RB também começou a ser revertido.

Até pouco tempo atrás estudos indicavam que os pacientes asmáticos treinados aerobicamente tinham apenas aumento do condicionamento aeróbico e redução de sintomas e crises (Ram et al., 2009). Porém, recentemente estudos clínicos mostraram mais benefícios proporcionados pelo TA como: a melhora a qualidade de vida (Fanelli et al., 2007; Gonçalves et al., 2008; Mendes et al., 2010; Turner et al., 2010; Dogra et al., 2011), redução do uso da medicação (Neder et al., 1999; Fanelli et al., 2007), redução dos níveis de óxido nítrico exalado (Gonçalves et al., 2008; Mendes et al., 2011; Gunay et al., 2012) e da inflamação eosinofílica (Mendes et al., 2011).

Apesar da relevância desses achados, os estudos clínicos não mostraram os mecanismos anti-inflamatórios desencadeados pelo TA e responsáveis pelos benefícios adquiridos nesses pacientes. Alguns estudos apenas consideram algumas hipóteses como: a melhora do limiar ventilatório (Clark e Cochraine, 1990); adaptação do sistema

imune provocando aumento da resposta Th1 e redução da resposta imune Th2 (Lakier, 2003); aumento da produção de miocinas pela musculatura estriada esquelética (Pedersen e Febbraio, 2008). Teorias que ainda não foram comprovadas por nenhum estudo clínico que investigou os efeitos do TA nos asmáticos.

Apesar disso, os estudos experimentais avançaram no entendimento dos mecanismos protetores provocados pelo TA em modelo murino de asma, os quais mostraram a redução da resposta imune Th2 por diferentes efeitos anti-inflamatórios como: a via hormonal (Pastva et al., 2005); aumento da produção das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-1ra (Vieira et al., 2007; Silva et al., 2010); pela regulação de fatores de transcrição como NF- κ B (Pastva et al., 2004; Pastva et al., 2005; Vieira et al., 2008; Silva et al., 2010); aumento do fator de transcrição FOXP3 (Lowder et al., 2010).

Baseado nessas evidências, o presente estudo visou investigar se essas vias anti-inflamatórias são desencadeadas pelo TA após o estabelecimento da inflamação pulmonar alérgica crônica (IPAC), pois apenas dois estudos mostraram a reversão da inflamação crônica e identificaram mecanismos anti-inflamatórios desencadeados pelo TA (Lowder et al., 2010; Silva et al., 2010). Em complemento, o presente estudo ainda objetivou identificar em qual momento ao longo do tempo o TA reduz os efeitos da IPAC (ou asma experimental) e do remodelamento brônquico (RB).

De acordo com as possíveis hipóteses sobre o impacto do TA nos pacientes asmáticos e tendo em vista as evidências mostradas nos estudos experimentais de asma murina, é possível considerar que o efeito anti-inflamatório do TA ocorra pelos seguintes mecanismos: a) receptor de glicocorticóide (RG); b) produção das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-1ra; c) produção de miocinas IL-10, IL-1ra e IL-6 (citocinas produzidas pela musculatura estriada esquelética); d) produção dos fatores de transcrição NF- κ B e FOXP3.

Inicialmente o presente estudo investigou os efeitos do TA no RG por exercer potente efeito anti-inflamatório (Barnes, 1998), e os nossos resultados mostraram que todos os grupos OVA (não treinados) tiveram redução do RG nas células, o que foi revertido pelo TA desde o 1º dia. Anteriormente, apenas Pastva et al., (2005) mostraram que o RG seria um dos possíveis mecanismos anti-inflamatórios desencadeados pelo TA, através da redução da resposta Th2 e do NF- κ B, benefícios atribuídos ao aumento da produção do RG nos leucócitos. Porém no nosso modelo, não observamos redução da migração celular e da resposta Th2 até 3 dias de TA, o que apenas ocorreu após 7 dias, sugerindo que os efeitos anti-inflamatórios ocorreram com períodos maiores de TA e por outro mecanismo distinto da produção do RG nos leucócitos.

Curiosamente, quando o RG foi quantificado no músculo liso (ML) das vias aéreas, foi demonstrado que grupos OVA tiveram também redução do RG, o que foi revertido pelo TA partir do 3º dia e mantido nos grupos seguintes que realizaram TA e mostraram redução da inflamação celular e resposta Th2 a partir do 7º dia. Similarmente, um estudo clínico verificou que asmáticos graves têm redução do RG no ML das vias aéreas, dificultando o controle clínico da doença com uso de corticosteroide (Chang et al., 2012). Baseados nos achados do presente estudo e nos de Chang et al., (2012), e uma vez que o ML é uma estrutura ativa que contribui para o processo fisiopatológico da asma pela produção de mediadores inflamatórios (Chung, 2000; Howarth, 2004), é possível considerar que o aumento do RG no ML tenha afetado o NF- κ B, alterando todo seu ciclo de ação pela interação com as enzimas que promovem a transcrição dos mediadores inflamatórios (citocinas Th2, por exemplo), e inibindo a produção de uma ampla gama de genes inflamatórios como revisto anteriormente (Ray et al., 1994; Adcock et al., 1995; Baldwin, 1996; Barnes et al., 1998; Christman et al., 2000).

Dessa forma, é possível considerar que o aumento do RG no ML tenha provocado impacto na redução da IPAC pela potencialização do glicocorticoide endógeno circulante e da medicação a base de corticosteroide, o que também poderia explicar os achados de Fanelli et al., (2007), que demonstraram o efeito do TA na melhora do condicionamento físico, na diminuição do BIE e na redução do uso de corticosterona em pacientes asmáticos, benefícios que podem ter relação com a potencialização da medicação pelo aumento do RG no ML das vias aéreas.

A hipótese de aumento da RG pelo TA tem uma importante relevância clínica, pois normalmente os asmáticos são tratados com altas doses de corticosterona, que a longo prazo provoca problemas de saúde devido aos efeitos colaterais como: perda de massa óssea (osteoporose), inibição do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e supressão do crescimento, candidíase oral, disfonia, hipertensão arterial, diabetes, catarata, supressão adrenal, obesidade, fraqueza muscular, adelgaçamento cutâneo e tosse crônica por irritação das vias aéreas superiores entre outros problemas (DSBPTMA, 2012). Isso mostra a relevância de considerar que essa população possa apresentar algum tipo de deficiência no RG, tornando mais difícil a eficiência da medicação a base de corticosterona, problema que pode ser atenuado pelo TA, o qual vai ajudar tanto na redução do consumo como na eficiência do medicamento.

Apesar dos achados e do mecanismo descrito anteriormente, não é possível desconsiderar outros mecanismos anti-inflamatórios desencadeados pelo TA. Nesse sentido, também investigamos a produção de IL-10 e IL-1ra. Nossos resultados mostraram aumento da produção dessas citocinas nas células peribrônquicas após 7 dias de TA, ao mesmo tempo em que foram observadas reduções da migração celular e da resposta Th2 (citocinas IL-4 e IL-5). Anteriormente, estudos sugeriram que o TA aumenta tanto a produção de IL-10 como de IL-1ra (Petersen e Pedersen, 2005), o que

pode reduzir processos inflamatórios. Em doenças alérgicas, a IL-10 reduz processos crônicos inflamatórios provocados pela resposta imune Th2 (Wang et al., 1995; Zuany-Amorin et al., 1995; Nakagome et al., 2005; Fu et al., 2006; Kosaka et al., 2011), pois a IL-10 inibe o NF- κ B a induzir a produção das citocinas perfil Th2 (Wang et al., 1995; Yoshidome et al., 1999), enquanto IL-1ra atua como um inibidor natural de IL-1, uma citocina com uma longa família de variações como IL-1A, IL-1B e IL-1RN, por exemplo, que parecem atuar na sinalização inicial da inflamação (Arend e Guthridge, 2000; Nicklin et al., 2002).

Anteriormente, Vieira et al., (2007) mostraram redução da resposta Th2 e apontaram o aumento de IL-10 como o principal efeito anti-inflamatório, entretanto esse efeito foi obtido ao mesmo tempo em que os animais foram induzidos à IPAC e realizavam o TA. Adicionalmente, Silva et al., (2010) mostraram tanto aumento de IL-10 como IL-1ra quando o TA foi iniciado após o período de indução da IPAC, e ambos mostraram aumento dessas citocinas anti-inflamatórias apenas após o 30º dia de TA, sem identificar o momento em que a redução da resposta Th2 foi iniciada. Reforçando essa hipótese, nós também demonstramos um aumento de IL-10 e IL-1ra por células peribrônquicas, que parecem exercer a função de redução da resposta Th2 após o 7º dia do TA, demonstrando ainda que a produção das citocinas anti-inflamatórias não ocorreu pela musculatura esquelética (miocinas IL-10, IL-1ra ou IL-6), diferentemente ao que ocorre em humanos como sugerido por Petersen e Pedersen (2005).

Além do aumento do RG e das citocinas IL-10 e IL-1ra como demonstrado pelo presente estudo, é possível também considerar outro mecanismo anti-inflamatório desencadeado pelo TA. Nesse sentido foi também investigado a produção dos fatores de transcrição NF- κ B como sugerido por Pastva et al., (2005), Silva et al., (2010) e FOXP3 por Lowder et al., (2010). Segundo nossos resultados, o NF- κ B foi reduzido a

partir do 7º dia do TA. Enquanto o FOXP3 foi aumentado tanto nos grupos OVA e OVA+TA até 15 dias, tendo uma redução da produção após 30 dias, sugerindo que no modelo experimental do presente estudo o FOXP3 parece não exercer efeito anti-inflamatório. O papel do FOXP3 na redução da inflamação pulmonar alérgica ainda é controverso, enquanto Lowder et al., (2010) apontou esse mecanismo na redução da resposta Th2, Silva et al., (2010) não mostraram alteração dessa via, sugerindo mais investigações por futuros estudos.

Em contrapartida, o efeito do TA no NF-κB parece ser mais compreendido. Esse fator de transcrição (NF-κB) é responsável pela produção gênica das citocinas IL-4 e IL-5 (Baldwin, 1996; Christman, 2000; Desmet et al., 2004), que atuam no aumento e manutenção da resposta Th2 e da migração de leucócitos como eosinófilos e neutrófilos para as vias aéreas dos asmáticos (Robinson et al., 1992; Holgate, 2008). Nesse sentido, Pastva et al., (2004) foram os primeiros a mostrar que o TA reduz o NF-κB e a resposta Th2, porém seu modelo experimental parece não representar o que ocorre nos asmáticos, pois não se sabe quando o TA foi iniciado, já nossos achados mostraram que após o estabelecimento da IPAC o TA diminuiu o NF-κB, possivelmente resultando na redução das citocinas Th2, conseqüentemente também diminuindo a migração celular após o 7º dia do início do TA.

Independente do mecanismo anti-inflamatório estudado, o presente estudo demonstrou o impacto do TA na migração dos leucócitos. A migração celular para as vias aéreas como ocorre nos asmáticos é também simulada nos estudos experimentais de asma que descrevem aumento de células totais, eosinófilos (Kenyon et al., 2003; Nath et al., 2007) e neutrófilos (Pastva et al., 2004; Herbert et al., 2010) no LBA. Nesse sentido, os resultados do presente estudo mostraram que o número de células totais, também dos macrófagos, eosinófilos (grupos OVA 1 a 15) e neutrófilos (grupos OVA

15 e 30) no LBA foram aumentados nos grupos induzidos à IPAC. Entretanto, o TA diminuiu a migração celular após 7 dias. O efeito do TA na redução da migração dos leucócitos foi descrito anteriormente (Pastva et al., 2004; Vieira et al., 2007; Lowder et al., 2010; Silva et al., 2010; Vieira et al., 2011; Olivo et al., 2012), porém nenhum desses estudos relatou ou especificaram o momento em que as reduções foram iniciadas, apenas relataram que ocorreram ao final de 3 a 8 semanas de TA, enquanto o presente estudo mostrou redução a partir do 7º dia.

Até o presente momento, apenas um estudo clínico demonstrou o efeito do TA na redução da migração dos eosinófilos (Mendes et al., 2011), mas sem explicar qual o mecanismo anti-inflamatório responsável. Nos estudos experimentais o TA reduziu a migração celular, provavelmente em resposta a diminuição produção das citocinas IL-4 e IL-5 (Pastva et al., 2004; Pastva et al., 2005; Vieira et al., 2007; Lowder et al., 2010; Silva et al., 2010; Olivo et al., 2012) e pela redução de eotaxina, RANTES e VCAM-1 (Pastva et al., 2004), todos sem explicar o momento em que as mudanças foram iniciadas e de acordo com seus respectivos modelos de IPAC.

Diferentemente, o presente estudo demonstrou que a migração celular, principalmente os eosinófilos foram reduzidos a partir do 7º dia de TA, no mesmo momento em que foram observadas as reduções das citocinas IL-4 e IL-5, das quimiocinas eotaxina e RANTES, das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1, que tem função de estimular a migração celular (Teran, 2000) e facilitar o transporte das células para o sítio de inflamação nas vias aéreas (Wegner et al., 1990; Nakajima et al., 1994). Curiosamente os neutrófilos foram reduzidos apenas a partir de 30 dias do TA, o que parece ter relação com a severidade da inflamação induzida nas vias aéreas no presente modelo experimental. As reduções desses mediadores (IL-4, IL-5, eotaxina, RANTES, ICAM-1 e VCAM-1) possivelmente contribuíram para diminuir a migração

celular para as vias aéreas, o que aconteceu mais precocemente (7º dia), se comparado com os achados dos estudos anteriores.

Junto com a redução da inflamação alérgica crônica conforme descrito anteriormente, nós também verificamos a reversão do remodelamento brônquico (RB) pela redução do espessamento do músculo liso, do epitélio, pelas reduções das deposições de fibras colágenas e elásticas e pela diminuição da produção de muco. Porém, esse efeito aconteceu de forma gradativa, conforme o TA foi sendo realizado ao longo do tempo. De acordo com nossos resultados, períodos inferiores há 3 dias não reverteram o RB, o que só ocorreu a partir do 7º dia com redução do espessamento do músculo liso, epitélio e colágeno, enquanto a reversão total aconteceu apenas após 15 dias de TA pela redução das fibras elásticas e do muco.

Em contraste, o treinamento aeróbico parece não reverter o RB (Olivo et al., 2012), embora tenham sido observadas reduções do espessamento do músculo liso, epitélio (Pastva et al., 2004; Vieira et al., 2007; Silva et al., 2010), deposições das fibras de colágeno e elástica (Vieira et al., 2007; Silva et al., 2010) e produção de muco (Pastva et al., 2004; Silva et al., 2010), porém sem explicar qual o mecanismo regulatório do RB é alterado e quando essa reversão é iniciada. Apenas um estudo investigou os mecanismos de regulação do RB (Vieira et al., 2011), porém com limitações, pois avaliou a produção dos mediadores IL-5, TGF- β e VEGF pelo epitélio e no mesmo momento em que os animais eram induzidos à IPAC e treinados aerobicamente.

Dessa forma, numa tentativa de elucidar os mecanismos envolvido na reversão do RB, o presente estudo considerou inicialmente a diminuição do processo inflamatório celular, fundamentalmente eosinófilos, como uma provável explicação, uma vez crônica a inflamação eosinofílica contribui para o desbalanço entre a síntese e a degradação de matriz extracelular resultando em fibrose (Araújo et al., 2008) e aumento do

espessamento do músculo liso e produção de muco (Mauad et al., 2007; Broide, 2008; Girodet et al., 2011).

Além disso, o presente estudo avaliou outros possíveis efeitos do TA ao longo do tempo em mecanismos do RB, como a produção de IL-5 e TGF- β , que contribuem para aumento da inflamação eosinofílica e estimulam a atividade dos fibroblastos (Cho et al., 2004; McMillan et al., 2005; Broide, 2008), do VEGF, que desempenha o papel na proliferação das células epiteliais e na formação de novos vasos sanguíneos (Lee et al., 2004). Foi ainda investigado pelo presente estudo a produção da citocina Osteopontina (OPN), que parece promover a migração e proliferação de fibroblastos, estimular a produção de colágeno e espessamento das células do músculo liso das vias aéreas (Chaulet et al., 2001; Ogata et al., 2007; Simoes et al., 2009) e ainda parece ter relação com o aumento da migração de eosinófilos para as vias aéreas (Takahashi et al., 2009; Puxeddu et al., 2010).

Em relação aos mecanismos do RB, o TA reduziu primeiro o TGF- β após 3 dias, seguido pelas diminuições de IL-5 e VEGF a partir do 7º dia, mesmo momento em que foi iniciada a reversão do RB pela diminuição do músculo liso, epitélio, colágeno e produção de muco. A reversão total ocorreu somente após 15 dias de TA, mesmo tempo em que foi reduzida a OPN, como essa citocina parece exercer função de regulação e estímulo das glândulas mucosas (Kohan et al., 2009) e também fibrótico por aumentar a atividade dos fibroblastos (Simoes et al., 2009), é possível considerar no presente modelo experimental, que a redução da OPN tenha relação apenas com a redução do muco e das fibras elásticas. Baseados em nossos achados e fundamentados pelos estudos anteriores, podemos sugerir que a reversão do RB foi iniciada após o 7º dia do TA, pela redução do TGF- β , IL-5, VEGF e da migração celular, complementados pela diminuição da OPN.

Por fim, foi também investigado o papel do treinamento aeróbico ao longo do tempo na produção dos anticorpos anafiláticos (IgE e IgG₁). Os nossos achados mostraram que a produção das imunoglobulinas anafiláticas não foram alteradas entre 1 e 15 dias, porém a redução ocorreu após 30 dias de TA. Poucos estudos avaliaram o efeito do TA na redução das imunoglobulinas específicas (IgE e IgG₁). Pastva et al., (2004) foram os primeiros a sugerir que o TA poderia reduzir a síntese desses anticorpos e demonstraram redução dos níveis de IgE total e específico. Moreira et al., (2008) foram os únicos a mostrar que o TA reduz os níveis de imunoglobulinas totais em pacientes asmáticos, no entanto, sem identificar redução da inflamação nas vias aéreas.

Mais recentemente, Silva et al., (2012) comprovaram que a melhora do condicionamento físico foi efetiva na redução dos níveis de IgE e IgG₁ específicas, antes do período de indução da IPAC, sugerindo que o TA prévio pode amenizar a resposta alérgica. Porém, Vieira et al., (2007), Silva et al., (2010) e Olivo et al., (2012) não observaram mudanças nos anticorpos anafiláticos em camundongos induzidos à IPAC e treinados aerobicamente. Entretanto, no presente estudo o TA foi capaz de diminuir a produção das imunoglobulinas IgE e IgG₁ ao final de 30 dias, por algum mecanismo desencadeado a longo prazo que ainda precisa ser melhor investigado por futuros estudos. Apesar da relevância desses achados, parece que esse efeito do TA não é relevante para redução da inflamação alérgica crônica, uma vez que o efeito anti-inflamatório foi iniciado muito antes da redução das imunoglobulinas.

6- CONCLUSÃO

6- CONCLUSÃO

O treinamento aeróbico reduz a inflamação alérgica pulmonar crônica, esse benefício parece ser iniciado a partir do 3º dia pelo aumento do receptor de glicocorticóide no músculo liso, seguido pelo aumento da produção das citocinas IL-10 e IL-1ra e da redução do fator de transcrição NF-κB a partir do 7º dia do TA, mesmo tempo que foi iniciada a reversão do remodelamento brônquico pela redução da inflamação, de IL-5 e VEGF.

7. REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

1. Holgate ST. A brief history of asthma and its mechanisms to modern concepts of disease pathogenesis. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2010 Jul;2(3):165-71.
2. Global Initiative for Asthma (GINA). Global Strategy for asthma management and prevention. 2011. Acesso em 05/03/2012. Disponível em < http://www.ginasthma.org/uploads/users/files/GINA_Report_2011.pdf >.
3. DSBPTMA (Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o Manejo da Asma). *Jornal Brasileiro de Pneumologia.* 2012, 38:S1-58.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Ações Básicas. Estatísticas de saúde e mortalidade. Brasília: Ministério da Saúde; 2005.
5. Kuhl K, Hanania NA. Targeting IgE in asthma. *Curr Opin Pulm Med.* 2012 Jan;18(1):1-5.
6. Holgate ST, Polosa R. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat Rev Immunol.* 2008 Mar;8(3):218-30.
7. Galli SJ, Tsai M. IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med.* 2012 May 4;18(5):693-704. doi: 10.1038/nm.2755.
8. Holtzman MJ. Asthma as a chronic disease of the innate and adaptive immune systems responding to viruses and allergens. *J Clin Invest.* 2012 Aug 1;122(8):2741-8.
9. Halmelmann E, Takeda K, Oshiba A, Gelfand EW. Role of IgE in the development of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness-in a murine model. *Allergy* 1999;54:297-305.
10. Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S73-80.

11. Chhabra J, Li YZ, Alkhouri H, Blake AE, Ge Q, Armour CL, Hughes JM. Histamine and tryptase modulate asthmatic airway smooth muscle GM-CSF and RANTES release. *Eur Respir J* 29:861-870, 2007.
12. Durham SR. The significance of late responses in asthma. *Clinical and Experimental Allergy*, 1991 (21)3-7.
13. IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma (DBMA). *J. Bras. Pneumol.* vol. 32suppl.7 São Paulo Nov. 2006.
14. Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, Corrigan C, Durham SR, Kay AB. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med.* 1992 Jan 30;326(5):298-304.
15. Mosmann VR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RI. Two types of murine helper t cell clone: I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *The Journal of Immunology* 1986;7(136):2348-2356.
16. Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clinical and Experimental Allergy* 2008;38:872- 897.
17. Barnes PJ. Pathophysiology of asthma. *Br J Clin Pharmacol* 1996;42:3-10.
18. Fallon PG, Jolin HE, Smith P, Emson CL, Townsend MJ, Fallon R, Smith P, McKenzie ANJ. IL-4 Induces characteristic th2 responses even in the combined absence of IL-5, IL-9, and IL-13. *Immunity* 2002;7(17):7-17.
19. Del Prete G, Maggi E, Parronchi P, Chrétien I, Tiri A, Macchia D, Ricci M, Banchereau J, De Vries J, Romagnani S. IL-4 is an essential factor for the IgE synthesis induced in vitro by human T cell clones and their supernatants. / *Immunol* 1988; 140: 4193-8.

20. Vercelli, D., H. H. Jabara, R. P. Lauener, and R. S. Geha. 1990. IL-4 inhibits the synthesis of IFN-g and induces the synthesis of IgE in human mixed lymphocyte cultures. *J. Immunol.* 144:570.
21. Cohn L, Elias JA, Chupp GL. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol*, 2004; 22: 789-815.
22. Hogan SP, Koskinen A, Foster PS. Interleukin-5 and eosinophils induce airway damage and bronchial hyperreactivity during allergic airway inflammation in BALB/c mice. *Immunology and Cell Biology* (1997) 75, 284-288
23. Foster PS, Hogan SP, Yang M, Mattes J, Young IG, Matthaei KI, Kumar RK, Mahalingam S, Webb DC. Interleukin-5 and eosinophils as therapeutic targets for asthma. *Trends Mol Med* 2002;8:162-7.
24. Menzies-Gow AN, Flood-Page PT, Robinson DS, Kay AB. Effect of inhaled interleukin-5 on eosinophil progenitors in the bronchi and bone marrow of asthmatic and non-asthmatic volunteers. *Clinical and Experimental Allergy*, 37, 1023–1032, 2007.
25. Leckie MJ, ten Brinke A, Khan J, Diamant Z, O'Connor BJ, Walls CM, Mathur AK, Cowley HC, Chung KF, Djukanovic R, Hansel TT, Holgate ST, Sterk PJ, Barnes PJ. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet* 2000; 356: 2144–2148.
26. Cho JY, Miller M, Baek KJ, Han JW, Nayar J, Lee SY, McElwain K, McElwain S, Friedman S, Broide DH. Inhibition of airway remodeling in IL-5-deficient mice. *J Clin Invest.* 2004;113:551-60.
27. van Rensen EL, Sont JK, Evertse CE, Willems LN, Mauad T, Hiemstra PS, Sterk

- PJ; AMPUL Study Group. Bronchial CD8 cell infiltrate and lung function decline in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Oct 1;172(7):837-41.
28. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1720–45.
29. Broide DH. Immunologic and inflammatory mechanisms that drive asthma progression to remodeling. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:560-70.
30. Al-Muhsen S, Johnson JR, Hamid Q. Remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2011;128:451-62.
31. Conroy DM, Williams TJ. Eotaxin and the attraction of eosinophils to the asthmatic lung. *Respir Res* 2: 150-156, 2001.
32. Ying S, Meng Q, Zeibecoglou K, Robinson DS, Macfarlane A, Humbert M, Barry Kay A. Eosinophil chemotactic chemokines (eotaxin, eotaxin-2, RANTES, monocyte chemoattractant protein-3 (MCP-3), MCP-4, and C-C chemokine receptor 3 expression in bronchial biopsies from atopic and non-atopic (intrinsic asthmatics)). *J Immunol* 1999; 163: 6321–6329.
33. Rojas-Ramos E, Avalos AF, Pérez-Fernandez L, Cuevas-Schacht F, Valencia-Maqueda E, Terán LM. Role of the chemokines RANTES, monocyte chemotactic proteins-3 and -4, and eotaxins-1 and -2 in childhood asthma. *Eur Respir J*. 2003 Aug;22(2):310-6.
34. Tang RB, Chen SJ, Soong WJ, Chung RL. Circulating adhesion molecules in sera of asthmatic children. *Pediatr Pulmonol*. 2002 Apr;33(4):249-54.
35. Panettieri RA Jr, Lazaar AL, Puré E, Albelda SM. Activation of cAMP-dependent pathways in human airway smooth muscle cells inhibits TNF-alpha-induced ICAM-

- 1 and VCAM-1 expression and T lymphocyte adhesion. *J Immunol.* 1995 Mar 1;154(5):2358-65.
36. Schleimer RP, Sterbinsky SA, Kaiser J, Bickel CA, Klunk DA, Tomioka K, Newman W, Luscinskas FW, Gimbrone MA Jr, McIntyre BW. IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium. Association with expression of VCAM-1. *J Immunol.* 1992 Feb 15;148(4):1086-92.
37. Stanciu LA, Djukanovic R. The role of ICAM-1 on T-cells in the pathogenesis of asthma. *Eur Respir J.* 1998 Apr;11(4):949-57.
38. Fixman ED, Stewart A, Martin JG. Basic mechanisms of development of airway structural changes in asthma. *Eur Respir J* 29:379-389, 2007.
39. James AL, Wenzel S. Clinical relevance of airway remodelling in airway diseases. *Eur Respir J* 2007;30:134-155.
40. Mauad T, Bel EH, Sterk PJ. Asthma therapy and airway remodeling. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Nov;120(5):997-1009; quiz 1010-1.
41. Hamid Q. Pathogenesis of small airways in asthma. *Respiration.* 2012;84(1):4-11.
42. Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, Chen Q, Geba GP, Wang J, Zhang Y, Elias JA. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest* 1999; 103:779-88.
43. Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet.* 1989;1:520-524.
44. Simoes DC, Xanthou G, Petrochilou K, Panoutsakopoulou V, Roussos C, Gratziau C. Osteopontin deficiency protects against airway remodeling and hyperresponsiveness in chronic asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009 May 15;179(10):894-902.

45. Girodet PO, Ozier A, Bara I, Tunon de Lara JM, Marthan R, Berger P. Airway remodeling in asthma: new mechanisms and potential for pharmacological intervention. *Pharmacol Ther.* 2011 Jun;130(3):325-37.
46. Ebina M, Takahashi T, Chiba T, Motomiya M. Cellular hypertrophy and hyperplasia of airway smooth muscles underlying bronchial asthma. A 3-D morphometric study. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 720-726.
47. Heard BE, Hossain S. Hyperplasia of bronchial smooth muscle in asthma. *J. Pathol.* 1973;110:319-332.
48. Roth M, Johnson PR, Borger P, Bihl MP, Rüdiger JJ, King GG, Ge Q, Hostettler K, Burgess JK, Black JL, Tamm M. Dysfunctional interaction of C/EBP alpha and the glucocorticoid receptor in asthmatic bronchial smooth-muscle cells. *N. Engl. J. Med.* 2004;351:560-574.
49. Chaulet H, Desgranges C, Renault M-A, Dupuch F, Ezan G, Peiretti F, Loirand G, Pacaud P, and Gadeau A-P. Extracellular Nucleotides Induce Arterial Smooth Muscle Cell Migration Via Osteopontin. *Circ Res* 2001; 89:772-778.
50. Ogata T, Ueyama T, Nomura T, Asada S, Tagawa M, Nakamura T, Takahashi T, Matsubara H, and Oh H. Osteopontin is amyosphere-derived secretory molecule that promotes angiogenic progenitor cell proliferation through the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 359:341-347.
51. Blobel G.C., Schiemann, W.P., and Lodish, H.F. 2000. Role of transforming growth factor beta in human disease. *New. Engl. J. Med.* 342:1350–1358.
52. Araujo BB, Dolhnikoff M, Silva LF, Elliot J, Lindeman JH, Ferreira DS, Mulder A, Gomes HA, Fernezlian SM, James A, Mauad T. Extracellular matrix components and regulators within the airway smooth muscle in asthma. *Eur Respir J* 2008;32:61-9.

53. Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 115: 3719–3727, 2002.
54. Gueders MM, Foidart JM, Noel A, Cataldo DD. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in the respiratory tract: potential implications in asthma and other lung diseases. *Eur J Pharmacol* 533:133-144, 2006.
55. Ordoñez CL, Khashayar R, Wong HH, Ferrando R, Wu R, Hyde DM, Hotchkiss JA, Zhang Y, Novikov A, Dolganov G, Fahy JV. Mild and moderate asthma is associated with airway goblet cell hyperplasia and abnormalities in mucin gene expression. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 517-523.
56. Nath P, Leung SY, Williams AS, Noble A, Xie S, McKenzie AN, Chung KF. Complete inhibition of allergic airway inflammation and remodelling in quadruple IL-4/5/9/13^{-/-} mice. *Clin Exp Allergy* 2007;37:1427-35.
57. Kohan M, Bader R, Puxeddu I, Levi-Schaffer F, Breuer R, and Berkman N. Enhanced osteopontin expression in a murine model of allergen-induced airway remodelling. *Clin Exp Allergy* 2007; 37:1444-1454.
58. Lee CG, Link H, Baluk P, Homer RJ, Chapoval S, Bhandari V, Kang MJ, Cohn L, Kim YK, McDonald DM, Elias JA. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces remodeling and enhances TH2-mediated sensitization and inflammation in the lung. *Nat Med* 2004;10:1095-103.
59. Chandratilleke MG, Carson KV, Picot J, Brinn MP, Esterman AJ, Smith BJ. Physical training for asthma. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012 May 16;5
60. Crosbie A. The effect of physical training in children with asthma on pulmonary function, aerobic capacity and health-related quality of life: a systematic review of randomized control trials. *Pediatr Exerc Sci*. 2012 Aug;24(3):472-89.

61. Eijkemans M, Mommers M, Draaisma JM, Thijs C, Prins MH. Physical activity and asthma: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2012;7(12):e50775.
62. Pacheco DR, Silva MJ, Alexandrino AM, Torres RM. Exercise-related quality of life in subjects with asthma: a systematic review. *J Asthma*. 2012 Jun;49(5):487-95.
63. Wanrooij VH, Willeboordse M, Dompeling E, van de Kant KD. Exercise training in children with asthma: a systematic review. *Br J Sports Med*. 2013. Apr 4. [Epub ahead of print].
64. Welsh L, Kemp JG, Roberts RGD. Effects of physical conditioning on children and adolescents with asthma. *Sports Med* 2005; 35 (2): 127-141.
65. Disabella V, Sherman C. Exercise for asthma patients. *Phys Sports Med* 1998;26:75-85.
66. Neder JA, Nery LE, Silva AC, Cabral AL, Fernandes AL. Short-term effects of aerobic training in the clinical management of moderate to severe asthma in children. *Thorax*. 1999; 54:202-206.
67. Fanelli A, Cabral ALB, Neder JA, Martins MA, Carvalho CRF. Exercise training on disease control and quality of life in asthmatic children. *Med Sci Sports Exerc* 39:1474-80, 2007.
68. Emtner M, Herala M, Stalenheim G. High-intensity physical training in adults with asthma. *Chest*, v. 109, p. 323-30, 1996.
69. Dogra S, Kuk JL, Baker J, Jamnik V. Exercise is associated with improved asthma control in adults. *Eur Respir J*. 2011 Feb;37(2):318-23.
70. Mendes FA, Gonçalves RC, Nunes MP, Saraiva-Romanholo BM, Cukier A, Stelmach R, Jacob-Filho W, Martins MA, Carvalho CR. Effects of aerobic training on psychosocial morbidity and symptoms in patients with asthma: a randomized clinical trial. *Chest*. 2010 Aug;138(2):331-7.

71. Turner S, Eastwood P, Cook A, Jenkins S. Improvements in symptoms and quality of life following exercise training in older adults with moderate/severe persistent asthma. *Respiration*. 2011;81(4):302-10.
72. Gonçalves RC, Nunes MPT, Cukier A, Stelmach R, Martins MA, Carvalho CRF. Efeito de um programa de condicionamento físico aeróbico nos aspectos psicossociais, na qualidade de vida, nos sintomas e no óxido nítrico exalado de portadores de asma persistente moderada ou grave. *Rev Bras Fisioter, São Carlos*, v. 12, n. 2, p. 127-35, mar./abr. 2008.
73. Mendes FAR, Mendes FA, Almeida FM, Cukier A, Stelmach R, Jacob-Filho W, Martins MA, Carvalho CR. Effects of aerobic training on airway inflammation in asthmatic patients. *Med Sci Sports Exerc*. 2011 Feb;43(2):197-203.
74. Onur E, Kabaroğlu C, Günay O, Var A, Yilmaz O, Dündar P, Tikiz C, Güvenç Y, Yüksel H. The beneficial effects of physical exercise on antioxidant status in asthmatic children. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2011 Jan 15.
75. Gunay O, Onur E, Yilmaz O, Dundar PE, Tikiz C, Var A, Yuksel H. Effects of physical exercise on lung injury and oxidant stress in children with asthma *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2012 Jan-Feb;40(1):20-4.
76. Scichilone N, Morici G, Zangla D, Arrigo R, Cardillo I, Bellia V, Bonsignore MR. Effects of exercise training on airway closure in asthmatics. *J Appl Physiol*. 2012 Sep 1;113(5):714-8.
77. Pastva A, Estell K, Shoeb TR, Atkinson TP, Schwiebert LM. Aerobic exercise attenuates airway inflammation in a mouse model of atopic asthma. *J immunol* 172:4520-4526, 2004.

78. Pastva A, Estell K, Shoeb TR, Schwiebert LM. RU486 blocs the anti-inflammatory effects of exercise in a murine model of allergen-induced pulmonary inflammation. *Brain, Behavior, and Immunity* 2005;19:413-422.
79. Vieira RP, Claudino RC, Duarte AC, Santos AB, Perini A, Faria Neto HC, Mauad T, Martins MA, Dolhnikoff M, Carvalho CR. Aerobic exercise decreases chronic allergic lung inflammation and airway remodeling in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 176:871-877, 2007.
80. Silva RA, Vieira RP, Duarte AC, Lopes FDTQS, Perini A, Mauad T, Martins MA, Carvalho CR. Aerobic training decrease inflammation and remodeling in a murine model. *Eur Respir J.* 2010 May;35(5):994-1002.
81. Olivo CR, Vieira RP, Arantes-Costa FM, Perini A, Martins MA, Carvalho CR. Effects of aerobic exercise on chronic allergic airway inflammation and remodeling in guinea pigs. *Respir Physiol Neurobiol* 2012;1:182:81-7.
82. Lowder T, Dugger K, Deshane J, Estell K, Schwiebert LM. Repeated bouts of aerobic exercise enhance regulatory T cell responses in a murine asthma model. *Brain Behav Immun.* 2010 Jan;24(1):153-9.
83. Reis Gonçalves CT, Reis Gonçalves CG, de Almeida FM, Dos Santos Lopes FD, Dos Santos Durão AC, Dos Santos FA, da Silva LF, Marcourakis T, Castro-Faria-Neto HC, Vieira RD, Dolhnikoff M. Protective effects of aerobic exercise on acute lung injury induced by LPS in mice. *Crit Care.* 2012 Oct 18;16(5):R199.
84. Toledo AC, Magalhaes RM, Hizume DC, Vieira RP, Biselli PJ, Moriya HT, Mauad T, Lopes FD, Martins MA. Aerobic exercise attenuates pulmonary injury induced by exposure to cigarette smoke. *Eur Respir J.* 2012 Feb;39(2):254-64.
85. Vieira RP, Toledo AC, Silva LB, Almeida FM, Damaceno-Rodrigues NR, Caldini EG, Santos AB, Rivero DH, Hizume DC, Lopes FD, Olivo CR, Castro-Faria-Neto

- HC, Martins MA, Saldiva PH, Dolhnikoff M. Anti-inflammatory effects of aerobic exercise in mice exposed to air pollution. *Med Sci Sports Exerc.* 2012 Jul;44(7):1227-34.
86. Pedersen BK. IL-6 signalling in exercise and disease. *Biochem Soc Trans.* 2007 Nov;35(Pt 5):1295-7.
87. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev.* 2008 Oct;88(4):1379-406.
88. Hewitt M, Estell K, Davis IC, Schwiebert LM. Repeated bouts of moderate-intensity aerobic exercise reduce airway reactivity in a murine asthma model. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010 Feb;42(2):243-9.
89. Saraiva-Romanholo BM, Barnabé V, Carvalho AL, Martins MA, Saldiva PH, Nunes MP. Comparison of three methods for differential cell count in induced sputum. *Chest* 2003 Sep;124(3):1060-6.
90. Azar HA and Espinoza CG. Diagnostic immunohistochemistry and electron microscopy of “Undifferentiated” malignant tumors. In: *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, 3th ed., edited by Noel R. Rose, Herman Friedman and John L. Fahey. Washington, D.C., 1986, p.926-930.
91. Vieira RP, Toledo AC, Ferreira SC, Santos AB, Medeiros MC, Hage M, Mauad T, Martins Mde A, Dolhnikoff M, Carvalho CR. Airway epithelium mediates the anti-inflammatory effects of exercise on asthma. *Respir Physiol Neurobiol.* 2011 Mar 15;175(3):383-9.
92. Silva ACD, Vieira RP, Nisiyama M, Santos ABG, Perini A, Mauad T, Dolhnikoff M, Martins MA, Carvalho CRF. Exercise inhibits allergic lung inflammation. *Int J Sports Med*, 2012 May;33(5):402-9.

93. Weibel ER. Morphometry: stereological theory and practical methods. In: J. Gil, Editor, *Models of Lung Disease - Microscopy and Structural Methods*, Marcel Dekker, New York; 1990:199-247.
94. Mota I, Perini A. A heat labile mercaptoethanol susceptible homocytotropic antibody in the guinea pig. *Life Sciences* 1970; 9 (Part II):923-930.
95. Ram FSF, Robinson S, Black PN, Picot J. Physical training for asthma. *Cochrane Database of Systematic Reviews The Cochrane Library*, Issue 1, 2009.
96. Cochrane LM, Clark CJ. Benefits and problems of a physical training programme for asthmatic patients. *Thorax* 1990;45:345-351.
97. Lakier SL. Overtraining, excessive exercise, and altered immunity: is this a T helper-1 versus T helper-2 lymphocyte response? *Sports Med* 2003; 33: 347–364.
98. Vieira RP, de Andrade VF, Duarte AC, Dos Santos AB, Mauad T, Martins MA, Dolhnikoff M, Carvalho CR. Aerobic conditioning and allergic pulmonary inflammation in mice. II. Effects on lung vascular and parenchymal inflammation and remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008 Oct;295(4):L670-9.
99. Barnes P. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular Mechanisms. *Clinical Science* (1998) 94, 557-572.
100. Chang PJ, Bhavsar PK, Michaeloudes C, Khorasani N, Chung KF. Corticosteroid insensitivity of chemokine expression in airway smooth muscle of patients with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130:877-85.
101. Chung KF. Airway smooth muscle cells: contributing to and regulating airway mucosal inflammation? *Eur Respir J*. 2000 May;15(5):961-8.
102. Howarth PH, Knox AJ, Amrani Y, Tliba O, Panettieri RA, Johnson MJ. Synthetic responses in airway smooth muscle. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:S32-50.

103. Ray A, Prefontaine KE. (1994) Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF- κ B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 752-6.
104. Adcock IM, Brown CR, Gelder CM, Shirasaki H, Peters MJ, Barnes PJ. (1995) The effects of glucocorticoids on transcription factor activation in human peripheral blood mononuclear cells. *Am J Physiol* 37: C331-8.
105. Baldwin AS Jr. 1996. The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* 14:649.
106. Christman JW, Sadikot RT, Blackwell TR. 2000. The role of nuclear factor- κ B in pulmonary diseases. *Chest* 117:1482.
107. Petersen AMW, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol* 98: 1154–1162, 2005.
108. Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. 1995. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappaB (NF κ B) activation in human monocytes: IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J. Biol. Chem.* 270:9558–9563.
109. Zuany-Amorin C, Haile S, Leduc D, Dumarey C, Huerre M, Vargaftig BB, and Pretolani M. Interleukin-10 inhibits antigen- induced cellular recruitment into the airways of sensitized mice. *J Clin Invest* 95: 2644–2651, 1995.
110. Nakagome K, Dohi M, Okunishi K, Komagata Y, Nagatani K, Tanaka R, Miyazaki J, Yamamoto K. In vivo IL-10 gene delivery suppresses airway eosinophilia and hyperreactivity by down-regulating APC functions and migration without impairing the antigen-specific systemic immune response in a mouse model of allergic airway inflammation. *J Immunol* 2005;174:6955–6966.

111. Fu CL, Chuand YH, Chau LY, Chiang BL. Effects of adenovirus expressing IL-10 in alleviating airway inflammation in asthma. *J Gene Med* 2006;8:1393–1399.
112. Kosaka S, Tamauchi H, Terashima M, Maruyama H, Habu S, Kitasato H. IL-10 controls Th2-type cytokine production and eosinophil infiltration in a mouse model of allergic airway inflammation. *Immunobiology*. 2011 Jul;216(7):811-20.
113. Yoshidome H, Kato A, Edwards MJ, Lentsch AB. Interleukin-10 inhibits pulmonary NF-kappaB activation and lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion. *Am J Physiol*. 1999 Nov;277(5 Pt 1):L919-23.
114. Arend WP, Guthridge CJ (2000) Biological role of interleukin 1 receptor antagonist isoforms. *Ann Rheum Dis* 59 (Suppl 1):i60–i64.
115. Nicklin MJ, Barton JL, Nguyen M, FitzGerald MG, Duff GW, Kornman K. (2002) A sequence-based map of the nine genes of the human interleukin-1 cluster. *Genomics* 79(5):718-725.
116. Desmet C, Gosset P, Pajak B, Cataldo D, Bentires-Alj M, Lekeux P, Bureau F. Selective blockade of NF-kappa B activity in airway immune cells inhibits the effector phase of experimental asthma. *J Immunol*. 2004 Nov 1;173(9):5766-75.
117. Kenyon NJ, Ward RW, Last JA. Airway fibrosis in a mouse model of airway inflammation. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2003 Jan 15;186(2):90-100.
118. Herbert C, Scott MM, Scruton KH, Keogh RP, Yuan KC, Hsu K, Siegle JS, Tedla N, Foster PS, Kumar RK. Alveolar macrophages stimulate enhanced cytokine production by pulmonary CD4+ T-lymphocytes in an exacerbation of murine chronic asthma. *Am J Pathol*. 2010 Oct; 177(4):1657-64.
119. Teran LM. CCL chemokines and asthma. *Immunol Today* 2000; 21: 235–242.

120. Wegner, C. D., R. H. Gundel, P. Reilly, N. Haynes, L. G. Letts, and R. Rothlein. 1990. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the pathogenesis of asthma. *Science* 247:456.
121. Nakajima H, Sano H, Nishimura T, Yoshida S, Iwamoto I. 1994. Role of vascular cell adhesion molecule I/very late activation antigen 4 and intercellular adhesion molecule I/lymphocyte function-associated antigen 1 interactions in antigen-induced eosinophil and T cell recruitment into the tissue. *J. Exp. Med.* 179:1145.
122. McMillan SJ, Xanthou G, Lloyd CM. Manipulation of allergen-induced airway remodeling by treatment with anti-TGF-beta antibody: effect of the Smad signaling pathway. *J Immunol* 2005;174:5774-80.
123. Takahashi A, Kurokawa M, Konno S, Ito K, Kon S, Ashino S, Nishimura T, Uede T, Hizawa N, Huang SK, Nishimura M. Osteopontin is involved in migration of eosinophils in asthma. *Clin Exp Allergy.* 2009;39(8):1152-9.
124. Puxeddu I, Berkman N, Ribatti D, Bader R, Haitchi HM, Davies DE, Howarth PH, Levi-Schaffer F. Osteopontin is expressed and functional in human eosinophils. *Allergy.* 2010 Feb;65(2):168-74.
125. Moreira A, Delgado L, Haahtela T, Fonseca J, Moreira P, Lopes C, Mota J, Santos P, Ryttilä P, Castel-Branco MG. Physical training does not increase allergic inflammation in asthmatic children. *Eur Respir J.* 2008 Dec;32(6):1570-5.