

Anna Cecília Duarte da Silva

**A melhora do condicionamento físico
aeróbio na sensibilização e na inflamação
e remodelamento das vias aéreas de
camundongos**

**Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção do título de
Mestre em Ciências**

**Área de concentração: Fisiopatologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. Celso Ricardo Fernandes Carvalho**

São Paulo

2009

Anna Cecília Duarte da Silva

**A melhora do condicionamento físico
aeróbio na sensibilização e na inflamação
e remodelamento das vias aéreas de
camundongos**

**Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção do título de
Mestre em Ciências**

**Área de concentração: Fisiopatologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. Celso Ricardo Fernandes Carvalho**

São Paulo

2009

FICHA CATALOGRÁFICA NO VERSO DA PG DE ROSTO

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado aos meus pais Simão e Conceição, pelo incentivo e apoio por todos estes anos, a minha irmã Anna Cristina pela amizade e a meu amado Fábio, por estar sempre ao meu lado...

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a pessoas muito especiais que tornaram este trabalho possível:

Aos meus familiares e ao meu namorado, por estarem sempre presentes, incentivando, confortando e rezando por mim.

Ao Prof. Dr. Celso Carvalho, pela oportunidade, orientação, ensino e disposição em todos estes anos.

Ao Prof. Dr. Milton de Arruda Martins, que disponibilizou não só o espaço em seu laboratório, como me mostrou a importância de se fazer àquilo que acreditamos ser o melhor.

Ao grande amigo e professor Dr. Rodolfo de Paula Vieira, que tanto me apoiou em todos os momentos, ensinando e participando de todas as etapas deste trabalho.

As Professoras Doutoras Claudia Fló e Naomi Kondo Nakagawa, por serem as responsáveis pelo meu amor, persistência e dedicação à pesquisa científica.

A Professora Doutora Adenir Perini por multiplicar seu conhecimento, pela generosidade e amizade.

Ao Prof Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto pela colaboração e atenção.

À Ângela Santos, Maria Cristina e a todos do Laboratório de Imunohistoquímica do Departamento de Patologia, pela dedicação na confecção de inúmeras lâminas.

Às amigas e amigos queridos: Clarice, Vanessa, Tatiana, Fernanda Arantes, Fernanda Lopes, Francine, Rosana, Edna, Carla, Débora, Beatriz, Ronaldo e Maurício, pela amizade, cumplicidade, por serem pessoas tão especiais, que possamos compartilhar de momentos importantes como este em nossas vidas.

À Fernanda Arantes pela paciência, persistência e ajuda nos momentos decisivos.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento inicial deste trabalho.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiopatologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e financiado pela (FAPESP) Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo processo 06/53965-0.

EPÍGRAFE

“Procure os seus caminhos,
mas não magoe ninguém nessa procura.
Arrependa-se, volte atrás, peça perdão!
Não se acostume com o que não o faz feliz,
revolte-se quando julgar necessário.
Alague seu coração de esperanças,
mas não deixe que ele se afogue nelas.
Se achar que precisa voltar, volte!
Se perceber que precisa seguir, siga!
Se estiver tudo errado, comece novamente
Se estiver tudo certo, continue...”

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

SUMMARY

1-INTRODUÇÃO.....	1
2-OBJETIVOS.....	12
3-MÉTODOS.....	13
3.1-Animais	13
3.2-Protocolo Experimental e Grupos Experimentais	13
3.2.1-Treinamento Aeróbio e Teste Físico	14
3.2.2-Sensibilização e Inflamação pulmonar alérgica crônica.....	15
3.3-Coleta e Análise de Lavado Broncoalveolar	15
3.4-Avaliação dos Títulos de IgE e IgG1-específicos para OVA.....	16
3.5-Histoquímica e Imunohistoquímica	17
3.5.1-Histoquímica	17
3.5.2-Imunohistoquímica	18
3.6- Análise morfométrica dos pulmões.....	19
3.6.1- Inflamação peribrônquica e expressão das citocinas Th1, Th2 e regulatória.....	20
3.6.2- Remodelamento brônquico de fibras colágenas e elásticas, expressão de eotaxina, RANTES, ICAM-1, VCAM-1, TGF- β e VEGF.....	20
3.6.3- Dosagem dos níveis de PGE ₂ por ELISA.....	21
3.7-Análise Estatística	21

4-RESULTADOS	23
5-DISCUSSÃO.....	41
6-CONCLUSÕES.....	50
7-REFERÊNCIAS	51

LISTA DE FIGURAS

Efeito da melhora do condicionamento aeróbio no (a):

Figura 1 - Número de células totais no lavado broncoalveolar.....	25
Figura 2 - Número de eosinófilos no lavado broncoalveolar.....	26
Figura 3 - Número de linfócitos no lavado broncoalveolar.....	27
Figura 4 - Migração de macrófagos no lavado broncoalveolar.....	27
Figura 5 - Migração de neutrófilos no lavado broncoalveolar.....	28
Figura 6 - Número de eosinófilos peribrônquicos.....	29
Figura 7 - Células mononucleares peribrônquicas.....	29
Figura 8 - Densidade peribrônquica de células IL4+.....	30
Figura 9 - Fotomicrografias das células IL-4+ peribrônquicas.....	31
Figura 10 - Densidade peribrônquica de células IL-5+.....	32
Figura 11 - Densidade peribrônquica de células IL-13+.....	32
Figura 12 - Expressão da quimiocina RANTES.....	33
Figura 13 - Expressão da quimiocina eotaxina.....	34
Figura 14 - Expressão de ICAM-1.....	35

Figura 15 - Expressão de VCAM-1.....	35
Figura 16 - Proporção de volume das fibras colágenas.....	36
Figura 17 - Proporção de volume das fibras elásticas.....	37
Figura 18 - Expressão do fator de crescimento TGF- β	37
Figura 19 - Expressão de VEGF.....	38
Figura 20 - Expressão de IL-2.....	39
Figura 21 - Expressão de INF- γ	39
Figura 22 - Expressão de IL-10.....	40
Figura 23 - Expressão de PGE ₂	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Teste físico inicial, pré-sensibilização e pós-sensibilização..... 23

Tabela 2-Títulos dos níveis de IgE e IgG-específicos para ovalbumina..... 24

LISTA DE ABREVIATURAS

AC - condicionamento aeróbio

ICAM-1 - molécula de adesão intercelular 1

IgE - imunoglobulina E

IgG1 - imunoglobulina 1

IL - interleucina

INF- γ - interferon gama

IP - intraperitoneal

OVA - ovalbumina

TGF- β - fator de crescimento transformador-beta

VCAM-1- molécula de adesão celular vascular 1

VEGF - fator de crescimento endotelial vascular

RESUMO

Silva ACD. A melhora do condicionamento físico aeróbio na sensibilização e na inflamação e remodelamento das vias aéreas de camundongos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.

A prevalência de doenças respiratórias alérgicas tem aumentado, embora de origem multifatorial, a atividade física parece representar um importante contribuinte. Objetivo: Nós hipotetizamos que o condicionamento aeróbio (AC) prévio à sensibilização com OVA, poderia reduzir a inflamação das vias aéreas, através de um desbalanço via Th1/Th2 ou da citocina regulatória (IL-10). Métodos: camundongos BALB/c foram divididos em 4 grupos (n=8): não treinados e não-sensibilizados (controle), treinados e não-sensibilizados (AC), não treinados e sensibilizados-OVA (OVA) e o grupo treinado e sensibilizado (OV+AC). O condicionamento aeróbio foi realizado em esteira ergométrica adaptada para camundongos por 8 semanas, seguidos de sensibilização por OVA ou soro fisiológico. Foram avaliadas a inflamação celular das vias aéreas e peribrônquica, títulos IgE e IgG₁, expressão de Th1 (IL-2 e IFN- γ), Th2 (IL-4, IL-5, IL-13), citocina regulatória (IL -10), PGE2 e remodelamento das vias aéreas. No peribrônquico a expressão de eotaxina, RANTES, ICAM-1, VCAM-1, TGF- β e VEGF. Resultados: Os grupos controle e AC tiveram resultados semelhantes nas avaliações ($p > 0,05$). O grupo OVA apresentou células inflamatórias nas vias aéreas e região peribrônquica, remodelamento e um aumento da IgG1 e títulos IgE ($p < 0,05$). Apresentou um aumento na expressão de citocinas Th2, mas não Th1, assim como, aumento na expressão de IL-10, ICAM-1, VCAM-1, RANTES,

TGF- β e VEGF também foram observadas. O grupo OVA+AC apresentou uma menor migração de eosinófilos e linfócitos para as vias aéreas inferiores e titulação de IgG1 e IgE ($p < 0,05$) e menor expressão de citocinas Th2, porém, os níveis Th1 não foram alterados. A inibição da expressão de IL-10, ICAM-1, VCAM-1, RANTES, TGF- β e VEGF, assim como, o remodelamento das vias aéreas, também foi observado no grupo OVA+AC ($p < 0,05$). Conclusão: Nossos resultados sugerem que a melhora do condicionamento aeróbio inibi a sensibilização e a inflamação alérgica.

Descritores: Hipersensibilidade, inflamação, exercício, citocinas/imunologia, colágeno, quimiocinas, camundongos.

SUMMARY

Silva, ACD. Aerobic conditioning inhibits ovalbumin allergic sensitization and airway inflammation in mice [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.

Prevalence of allergic respiratory diseases has increased and although its origin likely multifactorial, reduced physical activity seems to represent an important contributor. **Objective:** We hypothesize that an improvement in aerobic conditioning (AC) previous to OVA sensitization would reduce airway inflammation via either an imbalance Th1/Th2 pathway or regulatory cytokine (IL-10). **Methods:** BALB/c mice were divided in 4 groups (n=8): non-trained and non-sensitized (Control), AC and non-sensitized (AC), non-trained and OVA-sensitized (OVA), and AC and OVA (OVA+AC). AC was performed in a treadmill (8 weeks) followed by either OVA or saline sensitization. It was evaluated airway and peribronchial cell inflammation, specific OVA-IgE and -IgG₁ titers, expression of Th1 (IL-2 and IFN- γ), Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) or regulatory (IL-10) cytokines, PGE₂ and airway remodeling. Peribronchial expression of eotaxin, RANTES, ICAM-1, VCAM-1, TGF- β and VEGF was also evaluated. **Results:** AC and control groups had similar results in all evaluated outcome ($p>0,05$) OVA sensitization induced airway and peribronchial cell inflammation and remodeling and an increase in the IgG₁ and IgE titers ($p<0,05$). An increase in the expression of Th2 but not Th1 cytokines was well as an increase in the expression of IL-10, ICAM-1, VCAM-1, RANTES, TGF- β and VEGF was also observed. OVA+AC group presented a lower migration of eosinophils and lymphocytes to the airways

and lower titer of IgG₁ and IgE ($p < 0,05$). OVA+AC group also presented lower expression of Th2 cytokines however Th1 levels were unchanged. A lower expression of IL-10, ICAM-1, VCAM-1, RANTES, TGF- β and VEGF as well as airway remodeling was also observed in OVA+AC group ($p < 0,05$).

Conclusion: Our results suggest that improvement in aerobic conditioning inhibit allergic sensitization and inflammation.

Keywords: Hipersensibility, inflammation, exercise, cytokines/immunology, collagen, chemokines, mice.

INTRODUÇÃO

1-INTRODUÇÃO

A resposta alérgica é classicamente definida como reação de hipersensibilidade do tipo I que ocorre na presença de imunoglobulina E (IgE) que é determinada geneticamente e modulada por fatores ambientais e que, portanto, está relacionada com o estilo de vida e “aspectos ambientais” que pode favorecer a ocorrência de diversas doenças como a asma, a rinite alérgica, a conjuntivite e a dermatite atópica (1,2). Esta resposta está inserida no contexto de inflamação onde células do sistema imune interagem com células do próprio sítio inflamatório culminando no dano tecidual. O que torna a reação alérgica peculiar é o envolvimento de células que produzem um perfil característico de interleucinas e aumento de IgE (3).

Nos últimos 30 anos, a prevalência das doenças alérgicas aumentou substancialmente. As doenças alérgicas mais prevalentes são a rinite alérgica e a asma e estima-se que 400 milhões de pessoas em todo o mundo tenham rinite alérgica e 300 milhões de pessoas tenham asma (4). Interessantemente, o custo econômico com o tratamento destes quadros alérgicos é maior do que o da tuberculose e o do HIV/AIDS juntos. Um dos resultados mais alarmantes é que enquanto a incidência da alergia e doenças afins tem aumentado substancialmente, o número de profissionais de saúde treinados no diagnóstico e tratamento de alergias diminuiu, deixando muitos pacientes sem diagnóstico e sem tratamento. A alergia está se tornando mais prevalente devido a diversos fatores como a mudança climática mundial, ao aumento da poluição ambiental intra e extradomiciliar,

à industrialização das nações em desenvolvimento e a maior exposição a alérgenos intradomiciliares. Isto tem feito os quadros alérgicos mais complexos e severos com pacientes sofrendo de várias desordens alérgicas causadas por uma ampla gama de substâncias naturais e sintéticas, ao contrário de 20 anos atrás quando estes quadros eram mais limitados às estações climáticas ou localizações específicas. Conseqüentemente, as mudanças ambientais têm afetado a qualidade da vida e a produtividade do trabalho dos pacientes alérgicos e aumentado a procura pelos cuidados médicos.

As doenças alérgicas têm uma fase inicial mediada por IgE e uma fase tardia de que está relacionado a uma migração de polimorfonucleares para o sítio inflamatório. A sensibilização alérgica é um processo imune que precede o desenvolvimento do quadro alérgico e para que ela ocorra, os alérgenos, que são agentes externos desconhecidos ao organismo, entram em contato com a mucosa e são capturados por células dendríticas presentes no epitélio. As células dendríticas reconhecem e processam o antígeno e apresenta seus fragmentos peptídicos ligados à molécula de histocompatibilidade classe II (MCH II) aos linfócitos T auxiliares, que vão produzir citocinas. A interação com as células dendríticas faz com que os com linfócitos T estimulem a produção de imunoglobulinas E (IgE) pelos linfócitos B. As IgEs se então ligam aos receptores dos mastócitos presentes no epitélio brônquico, sensibilizando-os. Nesta fase da sensibilização há

formação de uma memória celular, responsável por uma resposta rápida a um segundo estímulo de antígenos e desencadeamento a resposta imune.

Após a sensibilização, quando o organismo é novamente exposto ao antígeno será iniciada uma resposta inflamatória desencadeada por este contato. Os antígenos se conectarão com as IgEs presentes nos mastócitos e levarão à liberação de mediadores inflamatórios, dentre eles a histamina, os leucotrienos e a prostaglandina (5). No caso do sistema respiratório, os mediadores liberados pelos mastócitos presentes no pulmão causarão uma contração do músculo liso, denominado broncoconstrição. Esta fase é também conhecida como fase imediata e dura cerca de 2 horas. Ao longo desta fase, ocorre também a liberação de diversas citocinas que iniciarão um processo de atração química de células inflamatórias para o sistema respiratório. Além disto, inicia-se a ativação das células centrais de memória Th2 e B que migram para o pulmão amplificando o recrutamento e a atividade leucocitária. As células Th2 também estimulam a produção de eosinófilos na medula óssea (6). Esta fase é denominada de tardia e se inicia aproximadamente após 6 horas e pode perdurar até 72 horas após a exposição antigênica.

A associação desta migração celular com os mediadores inflamatórios produzidos tanto pelas células presentes no pulmão quanto por estas novas células que acabaram de migrar para o sistema respiratório, ocasionarão uma lesão de descamação do epitélio pulmonar, tornando as vias aéreas mais expostas aos alérgenos ambientais. A descamação do epitélio

respiratório decorrente da inflamação levará à exposição das terminações nervosas e a uma reação exacerbada a diversos estímulos, sejam eles, físicos ou químicos, específico ou não, denominado hiperresponsividade brônquica.

As citocinas são proteínas solúveis que têm papel imprescindível na imunorregulação das respostas linfocitárias e tem uma ampla função na regulação do crescimento, diferenciação e a regulação da função de uma grande variedade de células. Adicionalmente, as citocinas mediam respostas imunes fisiológicas e patológicas podendo ter atividade efetora e reguladora, assim como, regular e ser expressa por muitas sub-populações celulares (7). A inflamação alérgica crônica parece ser orquestrada por duas populações principais de linfócitos T helper: os Th1 e os Th2. Os linfócitos Th1 são responsáveis pela secreção de citocinas como a interleucina-2 (IL-2) e interferon gama (INF- γ) que favorecem a indução da imunidade mediada por células inflamatórias e promovem a produção das IgM, IgG2a e IgG2b. O INF- γ é a citocina mais característica produzida pelas células Th1 e tem função de promover a ativação de macrófagos e inibir a produção da IgE pelos linfócitos B.

O grande aumento dos casos de alergia nas últimas décadas tem sido relacionado ao favorecimento do padrão Th2 na população. De acordo com a “hipótese da higiene” existe um mecanismo de *feedback* negativo entre a estimulação dos linfócitos Th1 e Th2 (8). De acordo com esta hipótese, na medida em que os indivíduos passaram a ficar menos expostos a patógenos

ou fatores ambientais que estimulam as células Th1 isto aumentaria sua predisposição ao quadro alérgico (resposta Th2) (9, 10).

Os linfócitos tipo Th2 são responsáveis por praticamente todas as manifestações fisiopatológicas de doenças alérgicas como a asma e secretam, preferencialmente, as citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 tanto em modelos animais experimentais (11,12), quanto em pacientes com quadros alérgicos quanto com asma brônquica (13).

De maneira geral, estas citocinas favorecem a indução da imunidade humoral, estimulam a síntese de IgE e IgG1 e o aumento local e/ou sistêmico de eosinófilos (14). Mais especificamente, a IL-4 perpetua a ativação de mastócitos, que são responsáveis pela liberação de IgE e IgG1, induz o recrutamento e a ativação de eosinófilos e também de estimula as células epiteliais a produzirem muco (15). A IL-5 estimula a proliferação, diferenciação, sobrevivência e ativação de eosinófilos na medula óssea, estimulam também a liberação de eosinófilos maduros da medula para a circulação e tem um papel quimioatrativo para os eosinófilos (14, 16). A IL-5 também é capaz de bloquear os efeitos inibitórios da IL-2 sobre a migração de eosinófilos (17, 18) na hora que falar sobre equilíbrio Th1/Th2. A citocina IL-13 atua de maneira similar a IL-4 na síntese de IgE e no aumento da sobrevivência dos mastócitos nos tecidos. Neste sentido, Webb *et al.* (2000) mostraram que a IL-13 determina o recrutamento seletivo de eosinófilos independente de IL-4 e participa como fator pró-inflamatório durante a exposição alérgica nas vias aéreas (19).

O recrutamento e ativação das células inflamatórias dependem da manifestação de outras classes de proteínas como as quimiocinas Th2 (eotaxina e RANTES), moléculas de adesão e mediadores inflamatórios. O termo quimiocinas se deve ao fato destas proteínas terem um papel quimioatrativo. Estas moléculas são pequenas proteínas e estão estruturalmente relacionadas, pois se ligam a receptores protéicos do tipo GPCR (do inglês, seven transmembrane G-protein coupled) e participam da migração leucocitária (20).

Na resposta alérgica, a grande maioria das quimiocinas sinaliza via os receptores CCR3 e CCR4, sub-tipos do (GPCR). Esses receptores são encontrados em eosinófilos, basófilos, mastócitos e em sub-populações de linfócitos Th2. Mais de 50 quimiocinas já foram identificadas em seres humanos e exercem sua função via 20 tipos diferentes de receptores. Alguns exemplos de quimiocinas mais presentes na resposta alérgica são as eotaxinas, RANTES e proteínas quimiotáticas para monócitos (MCP). Estas citocinas subsidiam o recrutamento de diversas células envolvidas na inflamação pulmonar alérgica (21). A eotaxina, em particular, é uma das quimiocinas que tem um forte papel quimioatrativo para os eosinófilos e é responsável por induzir a migração destas células da medula óssea para o sangue e, posteriormente, para os tecidos (22). Apesar de a eotaxina ter sido o primeiro agente quimioatrativo para eosinófilos, outros também já foram descritos, como o RANTES que também tem sido considerado uma importante quimiocina a desempenhar papel nas doenças alérgicas.

Entretanto, parece haver outras citocinas envolvidas na migração eosinofílica. Neste sentido, existem evidências de que animais deficientes de RANTES continuam apresentando inflamação eosinofílica pulmonar após o desafio antigênico nas vias aéreas, sugerindo que outros mediadores podem estar envolvidos na migração de eosinófilos durante a resposta inflamatória pulmonar (23).

Ao migrar para os tecidos, as células inflamatórias presentes no sangue precisam aderir aos vasos para que possam posteriormente atravessá-lo e isto ocorre devido às moléculas de adesão que são uma família de glicoproteínas envolvidas na interação célula-célula e célula-matriz-extracelular. Diversas moléculas de adesão já foram identificadas tais como a molécula de adesão intracelular 1 (do inglês, ICAM-1) também conhecida como CD54 e a molécula de adesão celular vascular 1 (do inglês, VCAM-1). As moléculas de adesão e seus ligantes agem conjuntamente com as quimiocinas com o intuito de proporcionarem o trajeto de leucócitos dos vasos para o local do tecido lesado. Várias citocinas podem induzir a síntese e liberação das moléculas de adesão, mas, especificamente no caso da resposta alérgica, as IL-4 e IL-13 têm efeitos diretos na liberação de ICAM-1 pelo endotélio vascular, facilitando a adesão de eosinófilos ao endotélio (24, 25).

Cronicamente, a inflamação alérgica das vias respiratórias leva a um processo de remodelamento das vias aéreas que é caracterizado por um desequilíbrio entre a síntese e degradação de proteínas da matriz

extracelular, fibras elásticas e colágenas (26, 27). O grau dessas alterações nas vias aéreas também tem sido associado aos níveis de gravidade da doença e diminuição da função pulmonar (28, 29). É provável, que vários tipos de células imunes e mediadores inflamatórios estejam envolvidos no remodelamento das vias aéreas. Além disso, suas diferentes características são provavelmente mediadas por diferentes vias inflamatórias. O processo de remodelamento é mediado por fatores de crescimento (do inglês, growth factors). Já foram identificados importantes mediadores do remodelamento tais como: o TGF- β (do inglês, transforming growth factor), que desempenha papel em diversos processos biológicos, incluindo o remodelamento e reparação tecidual em uma série de doenças pulmonares crônicas; e o VEGF (do inglês, vascular endothelial growth factor) que é um mediador da inflamação das vias aéreas e no remodelamento das vias aéreas doença alérgica (30).

O exercício físico e as doenças alérgicas

O exercício físico é um ato natural do ser humano e, evolutivamente, teve papel fundamental na sua evolução para os comportamentos de caça, defesa e busca pelo alimento, entre outros. Porém, no mundo ocidentalizado, o homem está se tornando cada vez mais sedentário. Coincidentemente ou não, ocorreu simultaneamente um aumento importante das doenças alérgicas.

Existem diversos tipos de exercício tais como o aeróbio e o resistido. No primeiro, o gasto energético é dado pelo aumento da demanda oxidativa (31) enquanto o segundo é dado pelo aumento da demanda glicolítica. A indicação do exercício físico aeróbio para a melhora da saúde, de modo geral, é sugerida objetivando-se uma série de adaptações benéficas em todo o organismo, tais como: aumento do consumo máximo de oxigênio (31, 32), redução da pressão arterial e da frequência cardíaca de repouso, aumento da massa muscular e da densidade óssea, aumento do fluxo sanguíneo muscular, melhora da resposta imunológica (33) e aumento da expressão e atividade de enzimas antioxidantes (34). Além disto, existem evidências de que o exercício físico pode proporcionar diferentes respostas no sistema imunológico (35), entretanto, parece que este efeito é intensidade-dependente. Assim, o exercício físico de intensidades leve ou moderada desencadeia uma resposta antiinflamatória enquanto que a atividade aeróbia de alta intensidade e longa duração desencadeiam uma resposta pró-inflamatória (36-38). A citocina IL-10 tem sido sugerida como uma citocina que tem um papel importante neste mecanismo imunoregulatório (39). Embora o mecanismo pelo qual o exercício físico atue sobre o sistema imunológico seja pobremente compreendido, Hockenbury *et al.* (2003) sugerem que o exercício físico de intensidade leve ajuda a diminuir a ação estressante após o exercício e, dessa forma, não sobrecarrega o sistema imunológico do organismo humano (40).

De maneira geral, o exercício físico tem sido mais amplamente utilizado para o tratamento de indivíduos com doenças alérgicas respiratórias, como a asma, objetivando melhorar sua aptidão física e reduzir a presença de broncoespasmo induzido pelo exercício. Apesar do mecanismo para esta melhora não ser amplamente conhecido, existem evidências de que a melhora do condicionamento físico para estes pacientes reduz a ventilação durante o exercício leve ou moderado, diminuindo assim a probabilidade do exercício físico induzir a asma (41). Entretanto, evidências mais recentes sugerem que o exercício físico em pacientes asmáticos pode reduzir o número de sintomas e o uso de medicamentos sugerindo um possível papel antiinflamatório (42, 43).

Os primeiros estudos que avaliaram o efeito do exercício físico como imunoregulador em doenças alérgicas foram descritos por Pastva *et al.* (44, 45) utilizando modelos experimentais de asma. Estes autores mostraram que o exercício físico reduziu a migração de leucócitos para as vias aéreas bem como reduziram a expressão de IL-4 e IL-5, os níveis de IgE e a expressão de fatores de transcrição como o NF κ - β . Além disto, Vieira e colaboradores mostraram que a melhora do condicionamento físico em animais previamente sensibilizados aumentava a expressão de IL-10 por células inflamatórias, representando um possível mecanismo de diminuição na inflamação alérgica.

Apesar das evidências sugerindo que o exercício físico modula a resposta inflamatória a agentes bacterianos em indivíduos saudáveis e de

uma possível modulação da resposta imune em indivíduos alérgicos desconhecemos, até o presente momento, estudos que avaliem o efeito da melhora do condicionamento físico prévio à resposta alérgica.

OBJETIVOS

2-OBJETIVOS

Objetivo geral:

Avaliar o efeito da melhora do condicionamento físico aeróbio na sensibilização e na inflamação e remodelamento de vias aéreas

Objetivo específico:

Avaliar o efeito da melhora do condicionamento físico aeróbio:

1. Nos níveis de IgE e IgG1-específicos para ovalbulmina;
 2. Na celularidade do lavado broncoalveolar e na região peribrônquica;
 3. Na expressão de citocinas Th1, Th2 e regulatórias por células inflamatórias pulmonares;
 4. Na expressão de fibras colágenas e elásticas peribrônquicas.
-

MÉTODOS

3-MÉTODOS

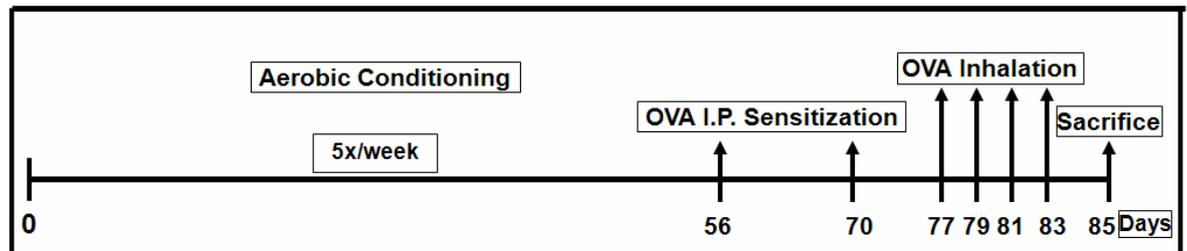
3.1-Animais

Foram utilizados 42 camundongos, BALB/c, machos, adultos jovens, com idade de 06 semanas, pesando entre 20 e 30 gramas, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura e umidade controladas e com alimentação ad-libitum em ciclo claro-escuro de 12 horas.

3.2-Protocolo Experimental e Grupos Experimentais

Os animais foram inicialmente submetidos a um programa de condicionamento físico durante 8 semanas e, a seguir, foram submetidos simultaneamente ao programa de treinamento e a um protocolo de sensibilização e inalações com ovalbumina (OVA) durante 4 semanas (Figura 1). Os animais foram divididos em 04 grupos (8 animais cada): Controle (não treinados e não sensibilizados), AC (submetido a um programa de treinamento aeróbio e não sensibilizados), OVA (não treinados e sensibilizados) e OVA+AC (treinados e sensibilizados). Quarenta e oito horas após a última sensibilização e treinamento físico, os animais foram anestesiados, traqueostomizados, canulados e exsanguinados. A seguir, os pulmões foram lavados e o sistema cardiopulmonar foi retirado para posterior análise imunohistoquímica e morfométrica.

Figura 1 - Protocolo Experimental



3.2.1-Treinamento Aeróbio e Teste Físico

O treinamento físico aeróbio foi realizado em esteira ergométrica adaptada para camundongos (modelo KT 400, marca Imbramed[®], RS, Brasil) por um período de 12 semanas. Na semana anterior ao início do treinamento, os animais foram submetidos a 3 dias de adaptação na esteira ergométrica que constava de 10 minutos de atividade a uma velocidade de 0,2Km/h. Quarenta e oito horas após o terceiro dia de adaptação, os animais foram submetidos a um teste de esforço máximo.

Teste ergométrico: O teste consistiu de 5 minutos de aquecimento a uma velocidade de 0,2Km/h que era aumentada em 0,1Km/h a cada 2 minutos e 30 segundos até a exaustão dos animais. Os animais foram considerados exaustos quando não conseguiam permanecer correndo mesmo após 10 estímulos mecânicos. A intensidade do treinamento foi estabelecida em 50% da velocidade máxima atingida no teste ergométrico e

foi calculada a partir da velocidade máxima obtida. O treinamento foi realizado 5 dias por semana, 60 minutos por sessão, durante 12 semanas. Após este período, o teste físico foi repetido com o intuito de reavaliar o condicionamento físico dos animais.

3.2.2-Sensibilização e inflamação pulmonar alérgica crônica

O período de sensibilização e inflamação pulmonar alérgica crônica foi de 4 semanas e teve início na 9ª semana de treinamento. No primeiro dia, os animais receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) de OVA diluída em hidróxido de alumínio (Aldrox). Após 14 dias os animais receberam uma dose “booster” de OVA + Aldrox intraperitoneal. No 77º dia do protocolo (21 dias após a primeira sensibilização), foi iniciada a exposição de OVA por via inalatória. Foram realizadas 4 sessões, durante 30 minutos, em dias alternados, numa concentração de 10 mg/mL de OVA diluída em soro fisiológico. Os animais não sensibilizados foram submetidos ao mesmo protocolo, porém receberam inalação somente com soro fisiológico.

3.3-Coleta e Análise do Lavado Broncoalveolar (LBA)

Quarenta e oito horas após a última inalação e sessão de treinamento físico, os animais foram anestesiados com ketamina (50mg/Kg, i.m.) e xilazina (40mg/kg i.p.), traqueostomizados, canulados e exsanguinados. Os pulmões foram lavados com 1,5ml (03 x 0,5ml) de soro fisiológico estéril (NaCl 0,9%) e, em média, 1,0ml do LBA foi recuperado. O LBA foi então

centrifugado (1000 rpm, durante 10 minutos) a 5°C, o sobrenadante coletado e armazenado a -70°C e o “pellet” celular ressuspendido em 1,0ml de soro fisiológico estéril (NaCl 0,9%) e foi avaliado o número total e diferencial de células. A celularidade total foi obtida pela análise de 20µl para contagem num hematocitômetro (Laser Blood Cell Counter, modelo JXJ-402 Automático, Shangai Sichuang Instrument, SG, China) e 500 µl foram centrifugados (6 min a 450 rpm; Cytospin-2, Shandon Instruments, Sewickley, PA, EUA) e fixados em lâminas com o corante Grün-wald-Giemsa. Foram contadas 300 células por lâmina (46).

3.4-Avaliação dos Títulos de IgE e IgG1 Específicos para OVA

Após a coleta do LBA, os animais foram tricotomizados, realizada a assepsia da área cirúrgica com iodo polvidona (Polvidini®) e realizada uma incisão de 3 a 4 cm na linha mediana do abdômen do animal. Foi então coletada uma amostra de sangue (1ml) na via veia cava inferior utilizando seringa (1ml) e agulha (12,7mm x 0,33mm). As amostras de sangue foram centrifugadas (5000 rpm a 5°C) e o soro aliquoteado e armazenado a -70°C para análise dos títulos de imunoglobulinas IgE e IgG₁ específicos para OVA.

Os anticorpos anafiláticos foram dosados pela técnica de anafilaxia cutânea passiva (PCA) que consiste em injetar por via intradérmica no dorso depilado de ratos normais, diluições sucessivas dos soros dos animais imunizados para dosagem dos anticorpos da classe IgE e IgG₁. Os soros dos animais não imunizados foram injetados num único ponto na menor

diluição (1/5) e foram negativos. Após período de latência de 24h para os anticorpos IgE e 2h para os anticorpos IgG1, foi injetado antígeno ovalbumina (1mg/ml) diluída em uma solução de azul de Evans à 0,25% por via endovenosa. A reação foi observada até 30 minutos após a injeção do antígeno; tempo em que se observa o máximo de reação. O título dos anticorpos foi expresso como a maior diluição do soro através de uma mancha azul de 5mm (47, 48).

3.5-Histoquímica e Imunohistoquímica

Imediatamente após a coleta do LBA e do sangue, os pulmões foram perfundidos com 3ml de formol 10%. A caixa torácica foi então aberta, a traquéia clampeada, foi removido todo o sistema cardiopulmonar em bloco e colocado em formol 10% durante 24 horas. Após esse período, os pulmões foram cortados no seu maior eixo e foram submetidos a processamento histológico de rotina.

3.5.1-Histoquímica

As lâminas contendo cortes histológicos de 05µm foram submetidas aos seguintes procedimentos:

- **Luna** - coloração utilizada para avaliação da densidade de eosinófilos peribrônquicos (49).

- **Resorcina Fucsina de Weigert com Oxidação** – coloração utilizada para avaliação da proporção de volume de fibras elásticas nas vias aéreas (50).

- **Picrossírius** – coloração utilizada para avaliação da proporção de volume de fibras colágenas nas vias aéreas (50).

3.5.2 -Imunohistoquímica

As lâminas previamente preparadas com (3-Aminopropil-trietoxisilano) (Silane-Sigma) contendo os cortes histológicos dos pulmões foram inicialmente desparafinadas e hidratadas e submetidas aos seguintes procedimentos:

Etapa 1 – Recuperação antigênica: através de Proteinase K por 20 minutos (37°C) seguidos de descanso de 20 minutos em temperatura ambiente. Após este período, as lâminas foram lavadas em PBS.

Etapa 2 – Bloqueio e Incubação com Anticorpo Primário: O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com água oxigenada (H₂O₂) 10V 3% (3 x 10 minutos), seguidos de incubação com os anticorpos primários: anti-IL-4 (sc-1260; Santa Cruz), anti-IL-5 (sc-8433; Santa Cruz), anti-IL-13 (sc-57262; Santa Cruz), anti-IL-10 (sc-52560; Santa Cruz), anti-IFN- γ (sc-59992; Santa Cruz), anti-IL-2 (sc-7896; Santa Cruz), anti-eotaxina (sc-28878; Santa Cruz), anti-RANTES (sc-20731; Santa Cruz), anti-VCAM-1 (sc-8304; Santa Cruz), anti-ICAM-1 (sc-18853; Santa Cruz), anti-TGF- β (sc-5103; Santa Cruz), anti-VEGF (sc-507; Santa Cruz), e, diluídos em BSA na proporção de 1:500 (IL-4), 1:200 (IL-5), 1:150 (IL-13), 1:250 (IL-10), 1:300 (IFN- γ), 1:400

(IL-2), 1:100 (eotaxina), 1:400 (RANTES), 1:200 (VCAM-1), 1:180 (ICAM-1), 1:800 (TGF- β) e 1:500 (VEGF) e, os quais foram aplicados sobre os cortes relativos ao experimento e também aos controles (positivo e negativo) de tecido, e as lâminas incubadas “overnight”.

Etapa 3 – Incubação com Anticorpo Secundário e Complexo: As lâminas foram lavadas em PBS e incubadas pelo ABCKit Vectastain (Vector Elite–PK-6105 (anti-goat) / PK-6101 (anti-rabbit). Apenas para os anticorpos primários anti-IL-2 e anti-IL-4, após a incubação do anticorpo secundário, seguiu-se o bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 10V 3% + metanol (1:1) (2 x 10 minutos) e posteriormente incubação com o complexo.

Etapa 4 – Revelação: Seguiu-se com a lavagem das lâminas em PBS e revelação pelo cromógeno 3,3 Diaminobenzidine (DAB) (Sigma Chemical Co, Saint Louis, Missouri, EUA).

Etapa 5 – Contra-Coloração e Montagem das Lâminas: As lâminas foram lavadas abundantemente em água corrente e contra-coradas com Hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha). Em seguida, as mesmas foram lavadas em água corrente, desidratadas, diafanizadas e montadas com resina para microscopia Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha).

3.6 -Análise Morfométrica dos Pulmões

Todos os parâmetros histológicos apresentados a seguir foram avaliados através da técnica de morfometria, utilizando um retículo de 50

retas e 100 pontos, com área conhecida (10.000 μm^2 para aumento de 1000x; 62.500 μm^2 para aumento de 400x), adaptado à ocular do microscópio.

3.6.1-Inflamação Peribrônquica e Expressão de citocinas Th1, Th2, e regulatória: Foi avaliado o número de células inflamatórias (eosinófilos e linfócitos) na inflamação peribrônquica e expressão das citocinas IL-2, INF- γ , IL-4, IL-5, IL-13, IL-10 na região peribrônquica. Foram analisadas 5 vias aéreas de cada animal, 5 campos por via aérea, avaliadas num aumento de 1000x. A área utilizada para a avaliação da densidade de células inflamatórias foi calculada a partir do número de pontos que incidiam na parede das vias aéreas localizados entre o músculo e a adventícia. A densidade de células foi determinada como o número de células em cada campo, dividido pela área de tecido. A densidade de células foi expressa em células/ μm^2 e os resultados foram transformados para células/ mm^2 ajustando-se as unidades (51).

3.6.2-Remodelamento Brônquico de fibras colágenas e elásticas e expressão de eotaxina, RANTES, ICAM-1, VCAM-1, TGF- β e VEGF: Usando um microscópio Eclipse E-200 (Nikon[®], Tóquio, Japão) e uma câmera digital Cool Snap (Photometrics[®], Tóquio, Japão). A análise das fibras colágenas e elásticas foram realizadas no analisador de imagem do software Image Pro Plus 4,5 (CA, EUA) enquanto as demais foram quantificadas utilizando-se um microscópio, como descrito acima. Foram avaliadas 5 vias aéreas para cada animal em um aumento de 400x de uma

área compreendida entre a membrana basal epitelial até a adventícia (45). A área positiva de fibras colágenas e elásticas foi expressa pela porcentagem de área total na via aérea (52). A análise da expressão das quiiocinas, moléculas de adesão e fatores de crescimento foram realizadas de maneira similar.

3.6.3-Dosagem dos níveis de PGE₂ por ELISA: PGE₂ foi mensurado no lavado broncoalveolar utilizando kit de ELISA de competição (Cayman Chemical, EUA) de acordo com Junqueira et al. 2007 (53). Foram adicionados em placas de 96 poços (Costar) previamente sensibilizadas com anticorpos monoclonais anti-PGE₂, 50 µl das amostras e das curvas padrões com os mediadores conjugados com acetilcolinestarease. Em seguida, foram adicionados 50 µl do segundo anticorpo anti IgG. As placas foram incubadas por 18h a 4°C. Após ciclo lavagens com tampão de lavagem fosfato salia 0,05% Tween (PBST) foram adicionados 200µl o reagente de cor para revelação. As placas foram mantidas sobre agitação por 90 minutos no escuro a temperatura ambiente. A leitura da reação foi realizada a 450nm em espectrofotômetro. As concentrações das amostras foram calculadas a partir das curvas-padrão obtidas com os mediadores inflamatórios recombinantes. O limite de detecção para PGE₂ foi de 3,9pg/ml.

3.7-Análise Estatística

Os dados foram analisados através do software SigmaStat 3.1 (San Jose, CA, EUA). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de

Kolmogorov-Smirnov. Os dados com distribuição paramétrica foram avaliados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo teste pos hoc de Newman-Keuls para comparação entre os grupos. Os dados com distribuição não paramétrica foram submetidos ao teste One-way ANOVA on Ranks seguido pelo teste de Dunn's para a comparação entre os grupos. Os níveis de significância foram ajustados para 5% ($p < 0.05$). Os gráficos foram elaborados utilizando-se o software GraphPad Prism 3.1 (San Diego, CA, EUA).

RESULTADOS

5-RESULTADOS

Os nossos resultados mostram que, como esperado, não houve diferença no teste físico dos animais antes do treinamento, mas que todos os grupos apresentaram um aumento após o período de treinamento ($p < 0,001$) (Tabela 1).

Tabela 1- Teste físico inicial, pré-sensibilização e pós-sensibilização

Teste Físico (minutos)			
Grupos	Inicial	Pré-Sensibilização	Pos-Sensibilização
Controle	38,8 ± 3,6	39,2 ± 2,0	40,1 ± 1,8
AC	39,9 ± 2,8	48,0 ± 4,1	50,2 ± 4,6*
OVA	39,9 ± 2,8	40,9 ± 2,8	39,7 ± 3,1
OVA+AC	38,9 ± 3,2	48,5 ± 5,8	49,5 ± 4,0*

Os dados apresentados no teste físico dos animais representam a média \pm DP; * $p < 0,05$ comparado intra-grupos no teste pré-sensibilização. Descrição dos grupos: controle (não treinado e não sensibilizado), AC (treinados e não sensibilizados), OVA (sensibilizados e não treinados) e OVA+AC (treinados e sensibilizados).

O resultado do teste ergométrico inicial mostrou que não houve diferença entre os grupos em relação ao desempenho no teste inicial ($p > 0,05$). Demonstrando que todos os animais começaram o protocolo de treinamento nas mesmas condições físicas. Como esperado, os grupos Controle e OVA não apresentaram diferença no tempo de teste realizado antes e após o período de treinamento. Por outro lado, os grupos AC, e OVA+AC apresentaram melhoras significativas de desempenho entre os testes inicial e final ($p < 0,001$ e $p < 0,001$, respectivamente).

Tabela 2- Títulos dos níveis de IgE e IgG1- específicos para ovalbumina

Imunoglobulinas (Log)		
Grupos	IgE	IgG 1
Controle	1,32 ± 0	1,32 ± 0
AC	1,32 ± 0	1,32 ± 0
OVA	5,32 ± 2,6	5,76 ± 2,1
OVA+AC	2,82 ± 1,2	3,48 ± 1,4

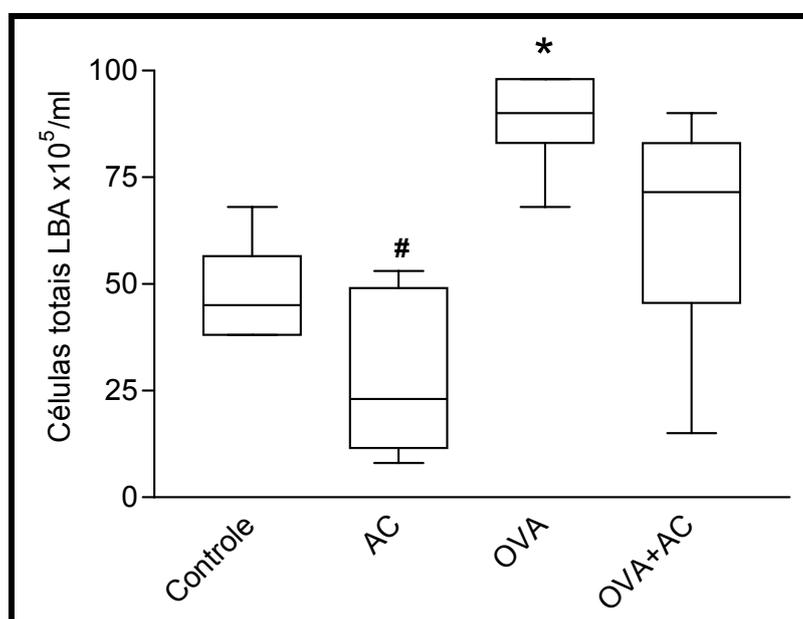
Os dados dos níveis de IgE e IgG1 representam média \pm DP; * $p < 0,05$ quando comparado intra-grupos.

O treinamento físico em animais não sensibilizados não modificou os níveis de IgE e IgG1, quando comparado entre todos os grupos. O grupo OVA aumento os níveis de IgE e IgG1, quando comparado a todos os

grupos ($p < 0,01$). Surpreendentemente o grupo AC inibiu os níveis de IgE e IgG1 nos animais sensibilizados ($p < 0,01$).

A inflamação pulmonar foi avaliada através da quantificação de células totais (Figura 1) e diferenciais (Figuras 2) no lavado broncoalveolar (LBA). O treinamento aeróbio em animais não sensibilizados (grupo AC) reduziu o número total de células quando comparado com o grupo controle ($p < 0,05$). A sensibilização com OVA (grupo OVA) aumentou o número total de células quando comparado com os demais grupos ($p < 0,05$). A melhora do treinamento aeróbio prévio à sensibilização reduziu o número total de células no LBA ($p < 0,05$) (grupo OVA+AC).

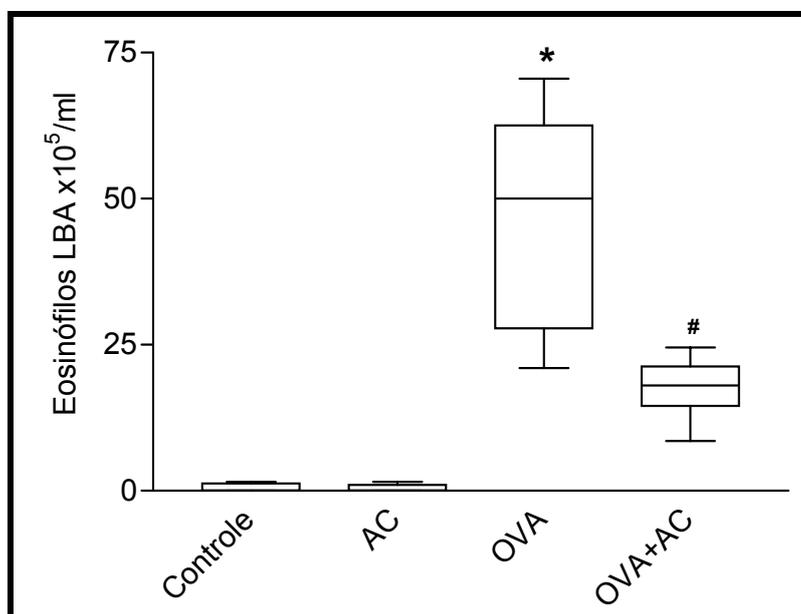
Figura 1: Efeito da melhora do condicionamento aeróbio no número de células totais no lavado broncoalveolar



Os valores estão expressos em *box plot* a linha média do *box plot* define a mediana e as linhas terminais representam os percentis 25 e 75%. As linhas terminais das barras interquartis representam os percentis 5 e 95%. Descrição dos grupos (Tabela 1); * $p < 0,01$ quando comparado com os grupos Controle, AC e OVA+AC; # $p < 0,05$ quando comparado com os grupos Controle e OVA+AC.

Não foram observadas diferenças no número de eosinófilos no LBA entre os grupos não sensibilizados (Figura 2). A sensibilização à OVA aumentou o número de eosinófilos quando comparado aos grupos não sensibilizados ($p < 0,01$) e foi inibido quando os animais foram previamente submetidos ao condicionamento físico aeróbio ($p < 0,01$) (Figura 2).

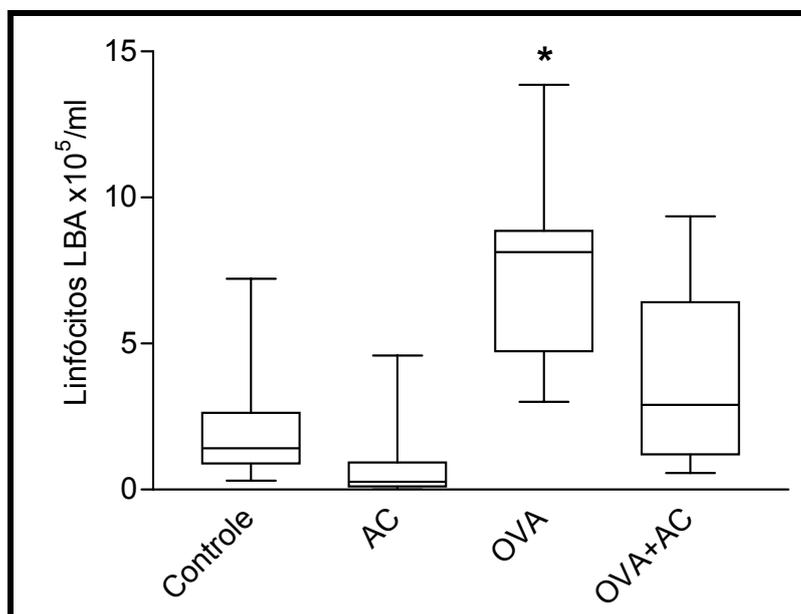
Figura 2: Efeito da melhora do condicionamento aeróbio no número de eosinófilos no lavado broncoalveolar



Os valores estão expressos em *box plot*. O detalhamento do *box plot* e dos grupos estão descritos, respectivamente, na Figura 1 e Tabela 1. * $p < 0,01$ quando comparado com os grupos Controle e AC e OVA+AC; # $p < 0,05$ quando comparado com os grupos Controle e OVA+AC.

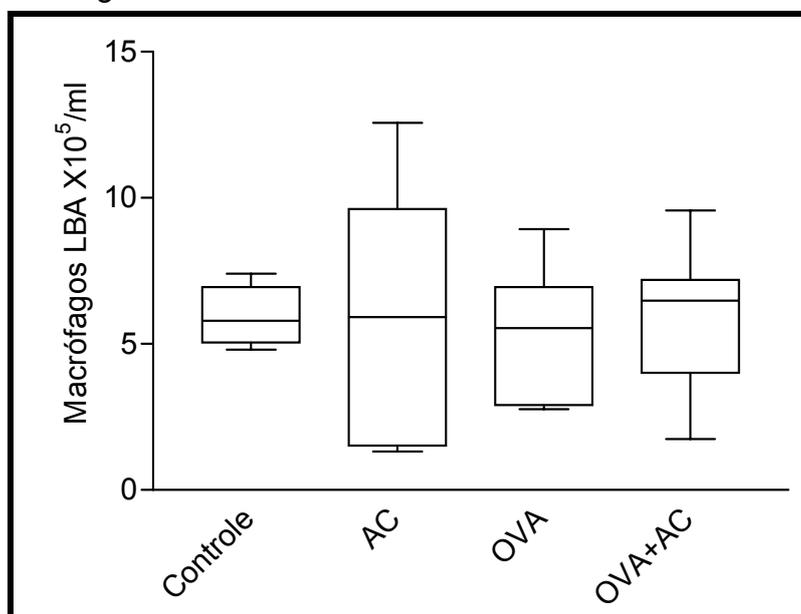
Não foram observadas diferenças no número de linfócitos no LBA entre os grupos não sensibilizados (Figura 3). A sensibilização à OVA aumentou o número de linfócitos no LBA quando comparado aos grupos não sensibilizados (* $p < 0,01$) e foi inibido quando os animais foram previamente submetidos ao condicionamento aeróbio (Figura 3) e não modificou o número de macrófagos no LBA ($p > 0,05$) (Figura 4).

Figura 3: Efeito da melhora do condicionamento aeróbio no número de linfócitos no lavado broncoalveolar



Os valores estão expressos em *box plot*. O detalhamento do *box plot* e dos grupos estão descritos, respectivamente, na Figura 1 e Tabela 1. * $p < 0,01$ quando comparado com os demais grupos.

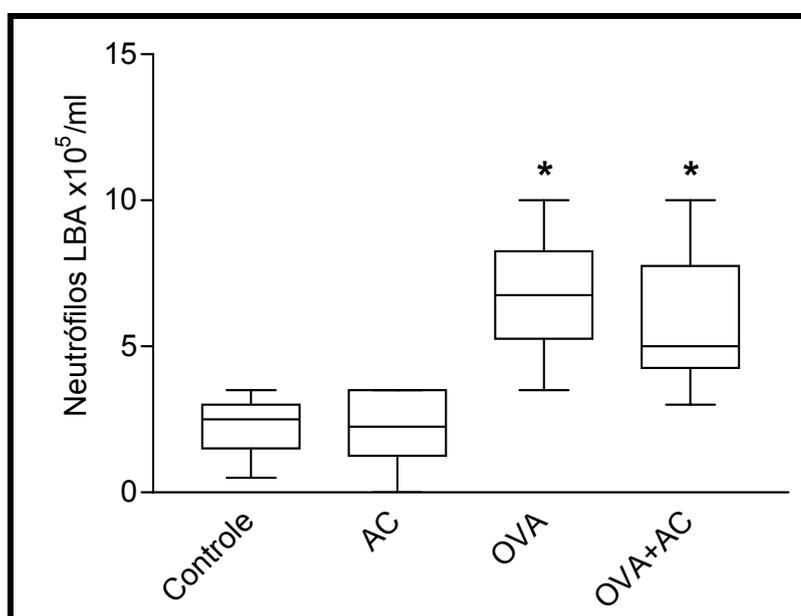
Figura 4: Efeito da melhora do condicionamento aeróbio na migração de macrófagos no lavado broncoalveolar



Os valores estão expressos em *box plot*. O detalhamento do *box plot* e dos grupos estão descritos, respectivamente, na Figura 1 e Tabela 1. Não foram encontradas diferenças entre os grupos.

Não houve diferença no número de neutrófilos no LBA entre os grupos não sensibilizados ($p>0,05$). A sensibilização com OVA aumentou o número de neutrófilos ($*p<0,05$). A melhora do condicionamento aeróbio não reduziu o número de neutrófilos no LBA causado pela sensibilização com OVA ($p>0,05$) (Figura 5).

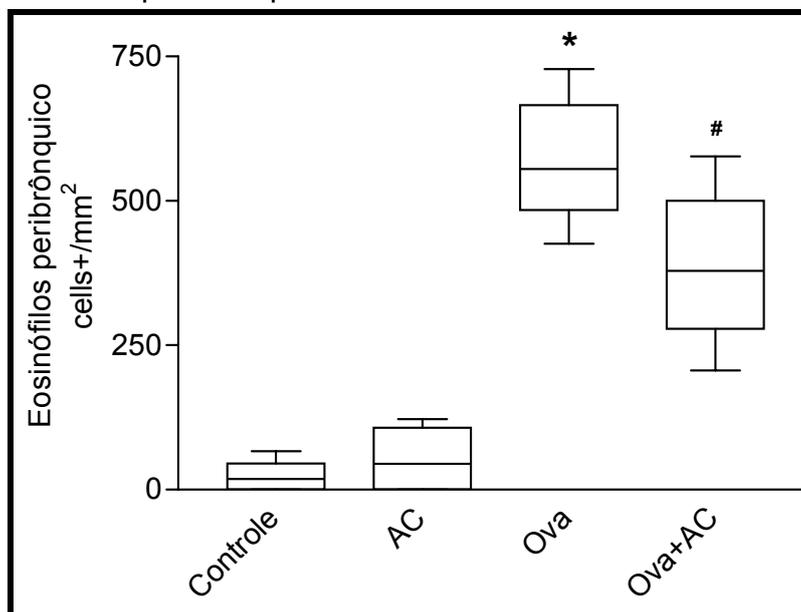
Figura 5: Efeito da melhora do condicionamento aeróbio na migração de neutrófilos no lavado broncoalveolar



Os valores estão expressos em *box plot*. O detalhamento do *box plot* e dos grupos estão descritos, respectivamente, na Figura 1 e Tabela 1. $*p<0,01$ quando comparado aos grupos não sensibilizados.

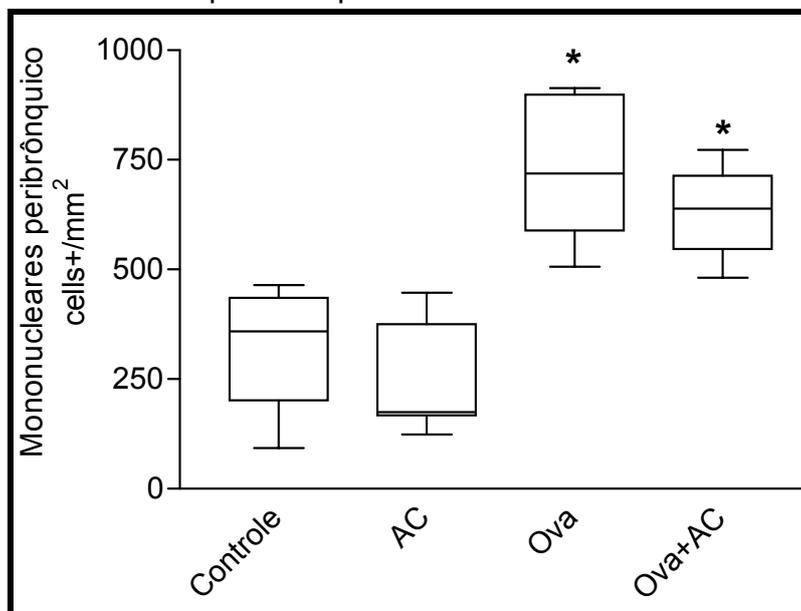
O número de eosinófilos e células mononucleares também foram analisados no compartimento peribrônquico. O condicionamento aeróbio não modificou o número de eosinófilos e células mononucleares nos grupos não sensibilizados. A sensibilização à OVA aumentou em aproximadamente 02 vezes a densidade peribrônquica de células mononucleares quando comparado aos grupos não sensibilizados ($*p<0,01$) (Figura 6).

Figura 6: Efeito da melhora do condicionamento aeróbio no número de eosinófilos peribrônquicos



Os valores estão expressos em *box plot*. O detalhamento do *box plot* e dos grupos estão descritos, respectivamente, na Figura 1 e Tabela 1. * $p < 0,01$ quando comparado aos demais grupos e # $p < 0,01$ quando comparado com os grupos Controle e AC.

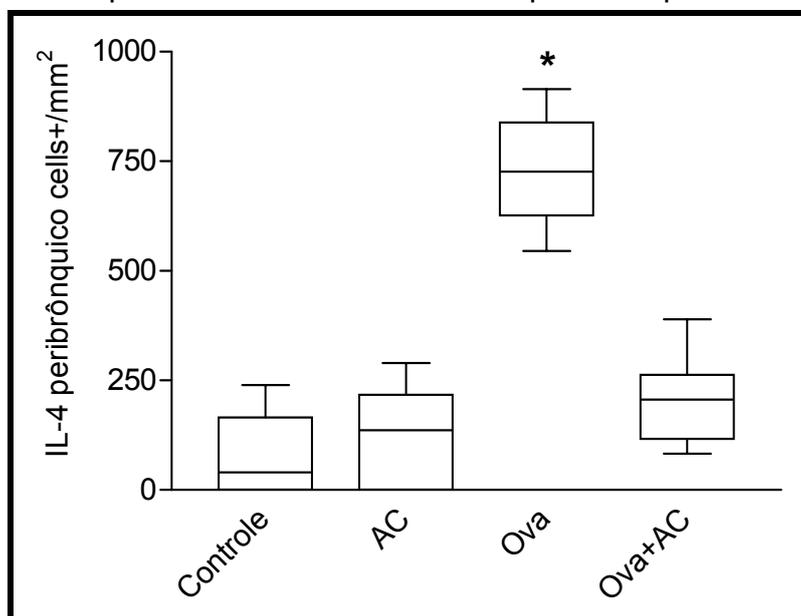
Figura 7: Efeito da melhora do condicionamento aeróbio nas células mononucleares peribrônquicas



Os valores estão expressos em *box plot*. O detalhamento do *box plot* e dos grupos estão descritos, respectivamente, na Figura 1 e Tabela 1. * $p < 0,01$ quando comparado com os grupos não sensibilizados.

As expressões de células inflamatórias de IL-4, IL-5 e IL-13 foram analisadas no compartimento peribrônquico. O condicionamento aeróbio em animais não sensibilizados não modificou a densidade peribrônquica de células inflamatórias positivas para IL-4, IL-5 e IL-13 (respectivamente, figuras 8, 10 e 11). A sensibilização à OVA aumentou em aproximadamente 250 vezes a densidade paribrônquica de células inflamatórias positivas para IL-4, IL-5 e IL-13 quando comparado aos grupos não sensibilizados (* $p < 0,01$). Estes aumentos foram totalmente inibidos quando os animais sensibilizados à OVA foram submetidos ao condicionamento aeróbio (Figuras 8, 10 e 11).

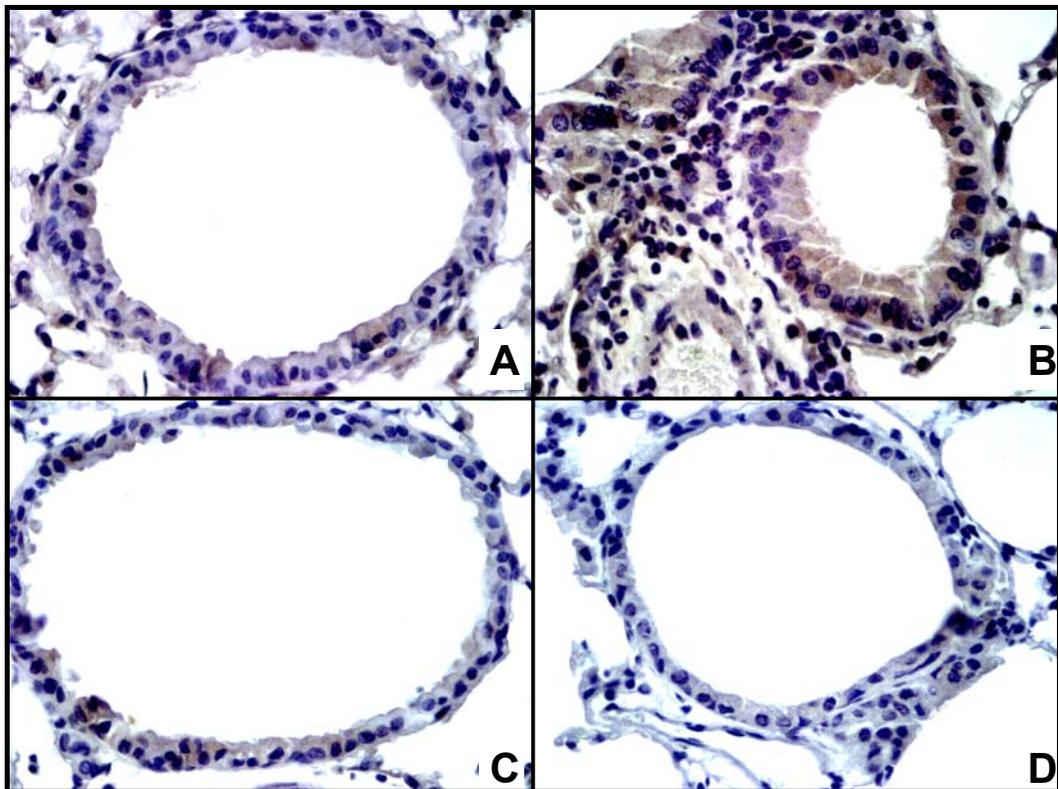
Figura 8: Efeito da melhora do condicionamento aeróbio na densidade peribrônquica de células inflamatórias positivas para IL-4



Os valores estão expressos em *box plot*. O detalhamento do *box plot* e dos grupos estão descritos, respectivamente, na Figura 1 e Tabela 1. * $p < 0,01$ quando comparado com todos os demais grupos.

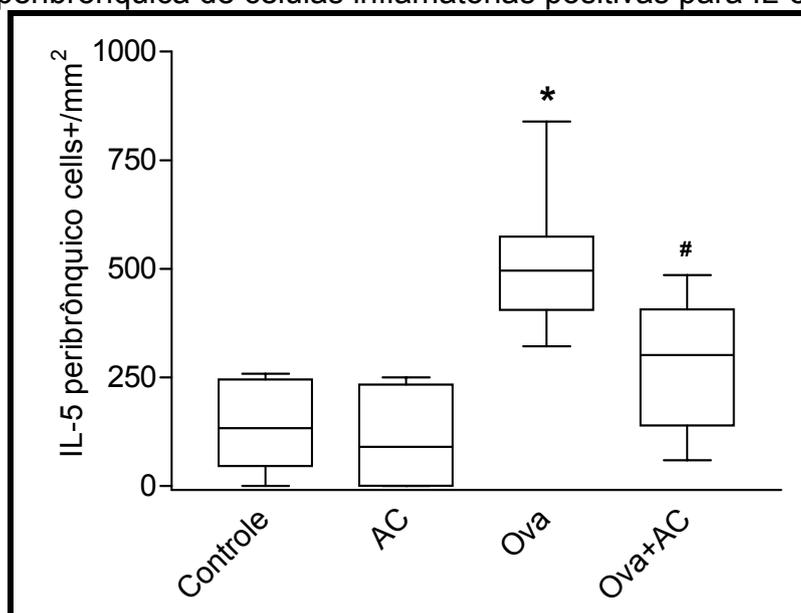
Os painéis de fotomicrografias representam, respectivamente, a expressão de células inflamatórias peribrônquicas positivas para IL-4 nas vias aéreas.

Figura 9:



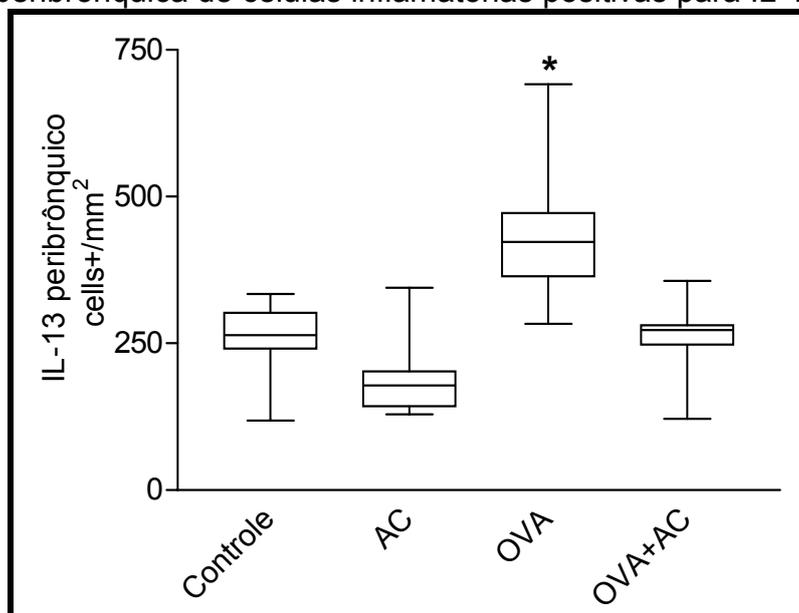
A: Controle; B: OVA; C: AC; D: AC+OVA

Figura 10: Efeito da melhora do condicionamento aeróbio na densidade peribrônquica de células inflamatórias positivas para IL-5



Os valores estão expressos em *box plot*. O detalhamento do *box plot* e dos grupos estão descritos, respectivamente, na Figura 1 e Tabela 1. * $p < 0,01$ quando comparado com todos os demais grupos e # $p < 0,01$ quando comparado com os grupos Controle e AC.

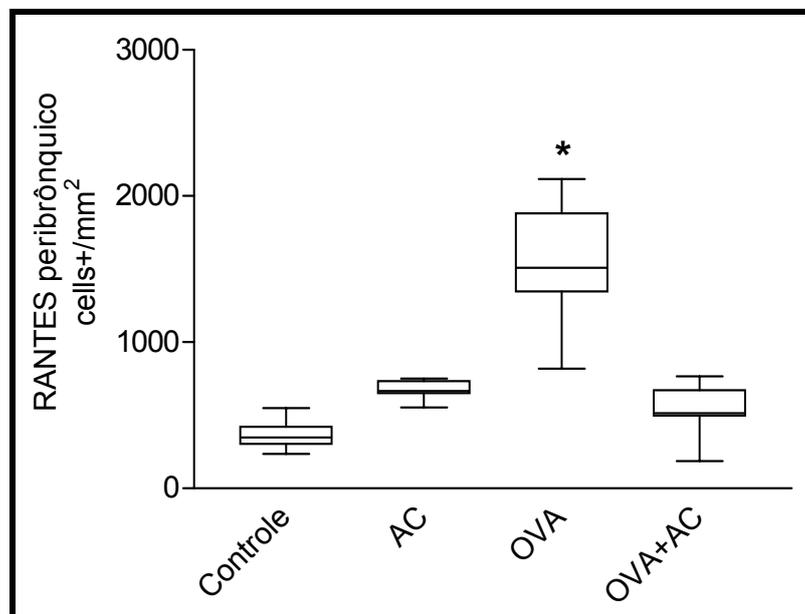
Figura 11: Efeito da melhora do condicionamento aeróbio na densidade peribrônquica de células inflamatórias positivas para IL-13



Os valores estão expressos em *box plot*. O detalhamento do *box plot* e dos grupos estão descritos, respectivamente, na Figura 1 e Tabela 1. * $p < 0,01$ quando comparado com todos os demais grupos.

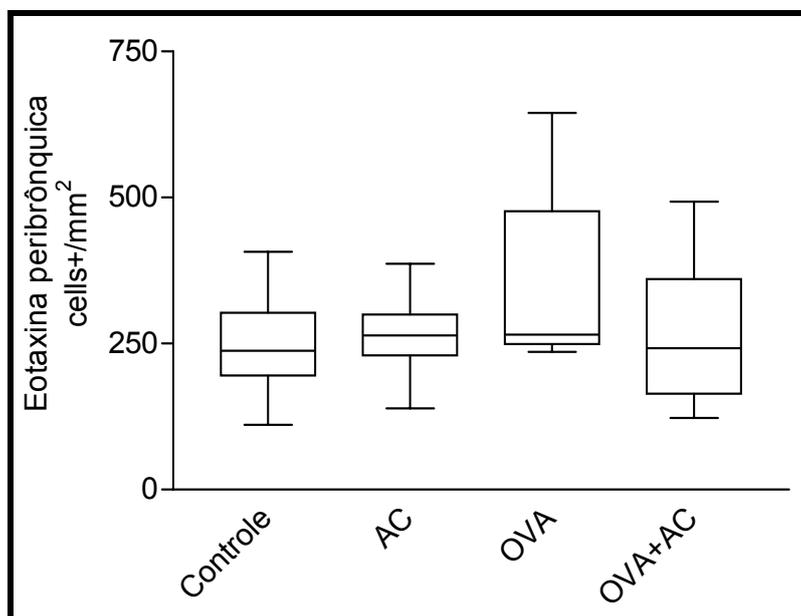
Foram avaliadas as expressões das quimiocinas RANTES e eotaxina no compartimento peribrônquico. Somente a expressão de RANTES no grupo sensibilizado OVA apresentou um aumento das células inflamatórias quando comparado aos outros grupos.

Figura 12: Efeito da melhora do condicionamento aeróbio na expressão de RANTES



Os valores estão expressos em *box plot*. O detalhamento do *box plot* e dos grupos estão descritos, respectivamente, na Figura 1 e Tabela 1. * $p < 0,01$ quando comparado com todos os demais grupos.

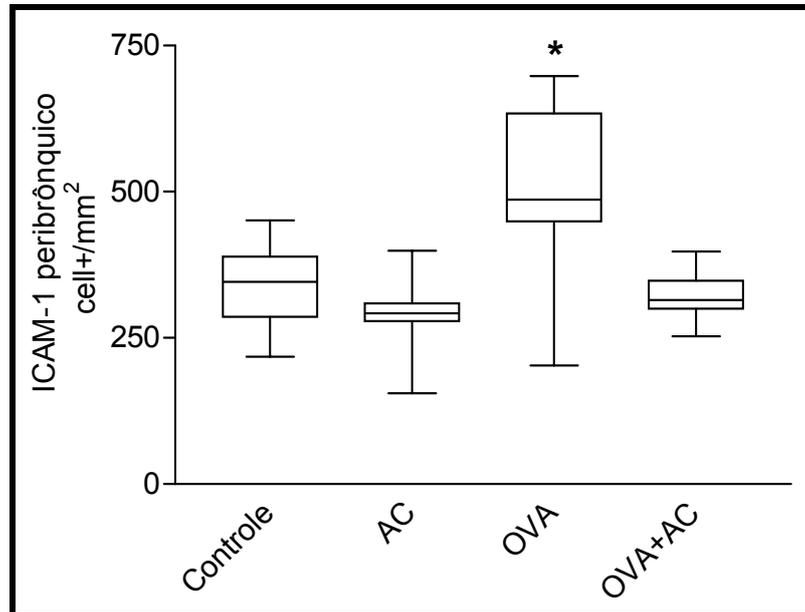
Figura 13: Efeito da melhora do condicionamento aeróbio na expressão da eotaxina



Os valores estão expressos em *box plot*. O detalhamento do *box plot* e dos grupos estão descritos, respectivamente, na Figura 1 e Tabela 1. Não foram encontradas diferenças entre os grupos.

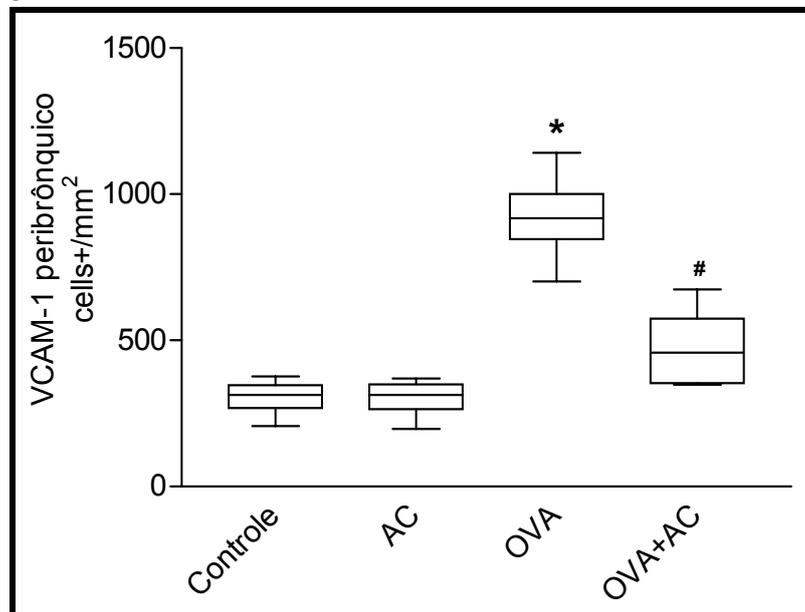
Foram avaliadas as expressões das moléculas de adesão ICAM-1 e VAM-1 no compartimento peribrônquico. As expressões de ICAM-1 e VCAM-1 não foram modificadas pelo condicionamento nos animais não sensibilizados. O grupo OVA aumentou em 50% a expressão de VCAM-1 e ICAM-1 quando comparado com os grupos não sensibilizados * $p < 0,05$.

Figura 14: Efeito da melhora do condicionamento aeróbio na expressão de ICAM-1



Os valores estão expressos em *box plot*. O detalhamento do *box plot* e dos grupos estão descritos, respectivamente, na Figura 1 e Tabela 1. * $p < 0,01$ quando comparado com todos os demais grupos.

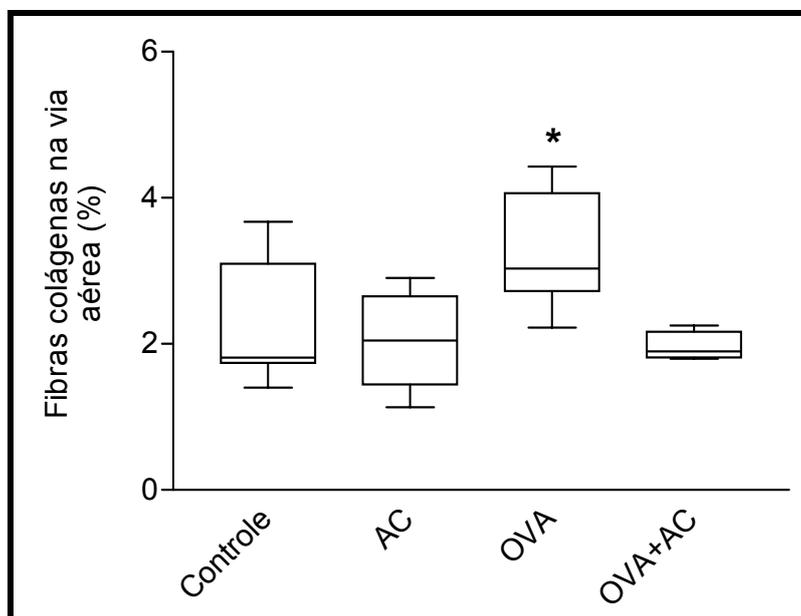
Figura 15: Efeito da melhora do condicionamento aeróbio na expressão de VCAM-1



Os valores estão expressos em *box plot*. O detalhamento do *box plot* e dos grupos estão descritos, respectivamente, na Figura 1 e Tabela 1. * $p < 0,01$ quando comparado com todos os demais grupos e # $p < 0,01$ quando comparado com os grupos Controle e AC.

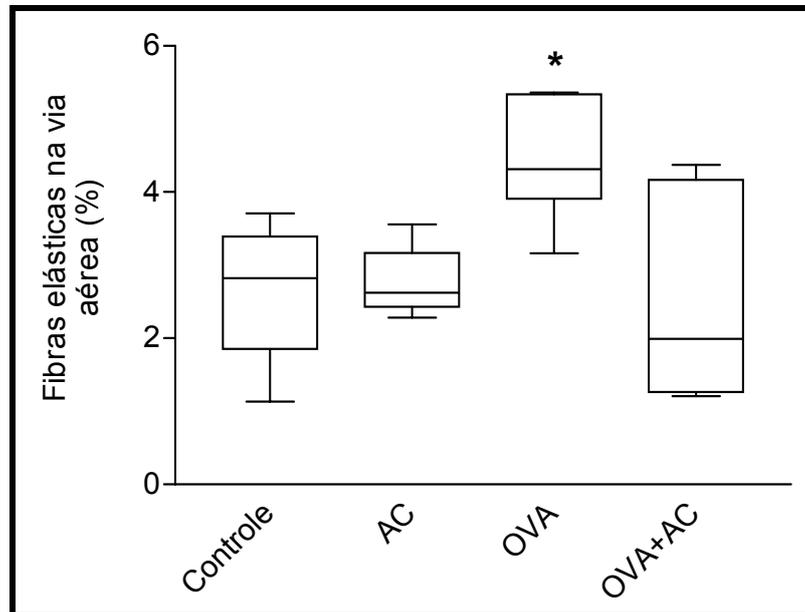
O condicionamento aeróbio em animais não sensibilizados não modificou a proporção de volume de fibras colágenas, elásticas, a expressão de TGF- β e VEGF nas vias aéreas (respectivamente, figuras 16, 17, 18 e 19). O grupo sensibilizado (OVA) aumentou a proporção de fibras colágenas e elásticas nas vias aéreas, sugestivo de remodelamento nas vias aéreas, inibindo a deposição das fibras colágenas e elásticas, quando comparado ao grupo OVA. (Figura 15, 16) ($p < 0,01$, $p < 0,05$, respectivamente). As expressões de TGF- β e VEGF também aumentaram no grupo OVA ($p < 0,01$) e este aumento foi inibido no grupo OVA+AC (Figuras 18 e 19, respectivamente).

Figura 16: Efeito da melhora do condicionamento aeróbio na proporção de volume das fibras colágenas



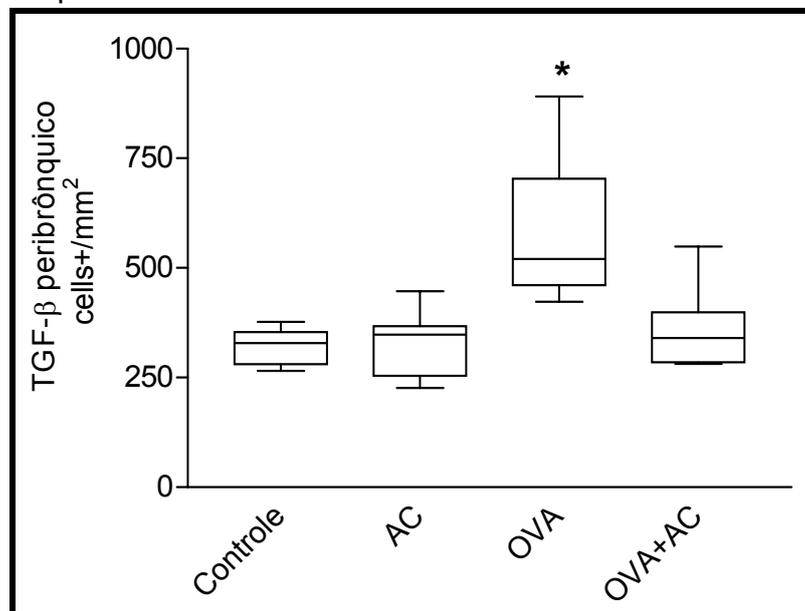
Os valores estão expressos em *box plot*. O detalhamento do *box plot* e dos grupos estão descritos, respectivamente, na Figura 1 e Tabela 1. * $p < 0,01$ quando comparado com todos os demais grupos.

Figura 17: Efeito da melhora do condicionamento aeróbio na proporção de volume das fibras elásticas



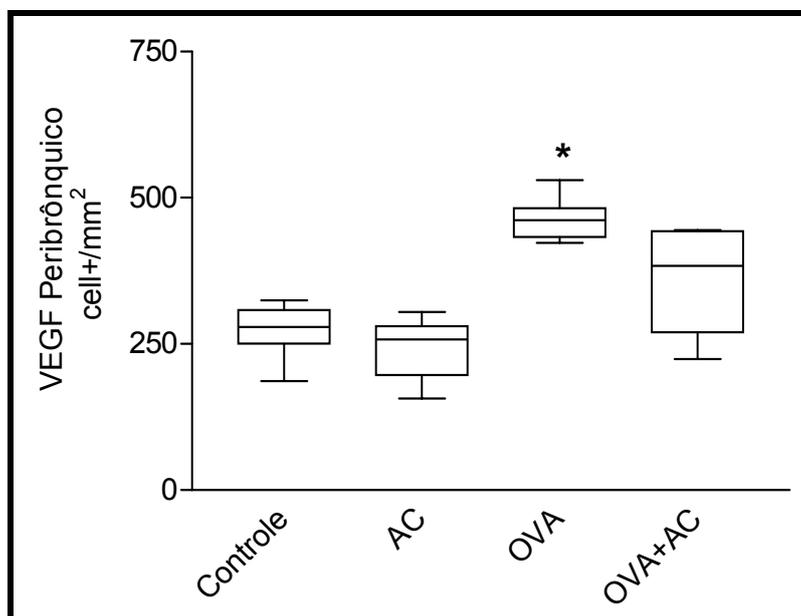
Os valores estão expressos em *box plot*. O detalhamento do *box plot* e dos grupos estão descritos, respectivamente, na Figura 1 e Tabela 1. * $p < 0,05$ quando comparado com todos os demais grupos.

Figura 18: Efeito da melhora do condicionamento aeróbio na expressão de TGF- β



Os valores estão expressos em *box plot*. O detalhamento do *box plot* e dos grupos estão descritos, respectivamente, na Figura 1 e Tabela 1. * $p < 0,01$ quando comparado com todos os demais grupos.

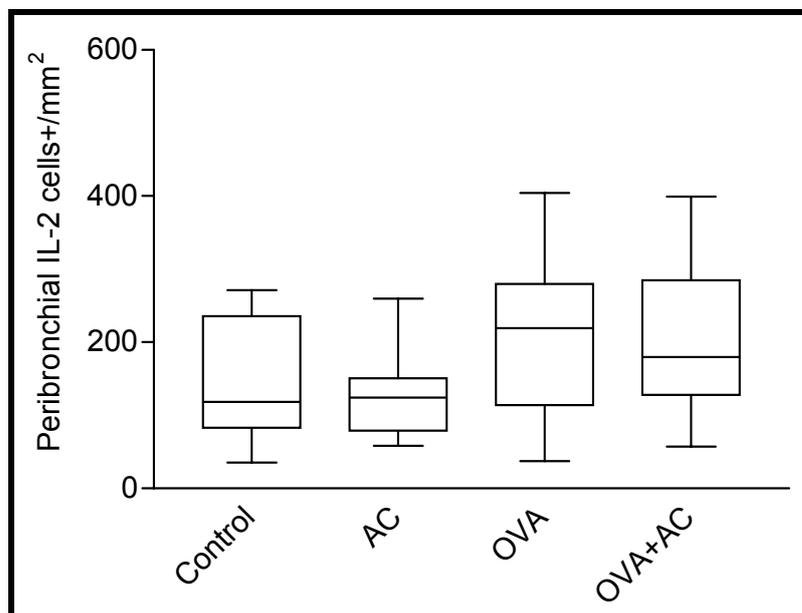
Figura 19: Efeito da melhora do condicionamento aeróbio na expressão de VEGF



Os valores estão expressos em *box plot*. O detalhamento do *box plot* e dos grupos estão descritos, respectivamente, na Figura 1 e Tabela 1. * $p < 0,01$ quando comparado com todos os demais grupos.

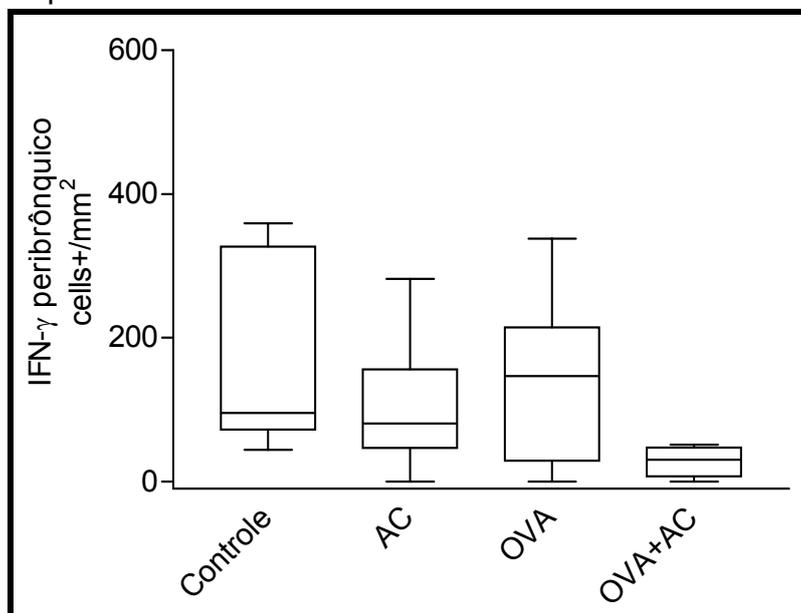
As expressões de células inflamatórias de IL-2, INF- γ e citocina regulatória IL-10 foram analisadas no compartimento peribrônquico. O condicionamento aeróbio em animais sensibilizados não modificou a densidade peribrônquica de células inflamatórias positivas para IL-2, INF- γ e IL-10 (respectivamente, Figuras 20, 21 e 22).

Figura 20: Efeito da melhora do condicionamento aeróbio na expressão de IL-2



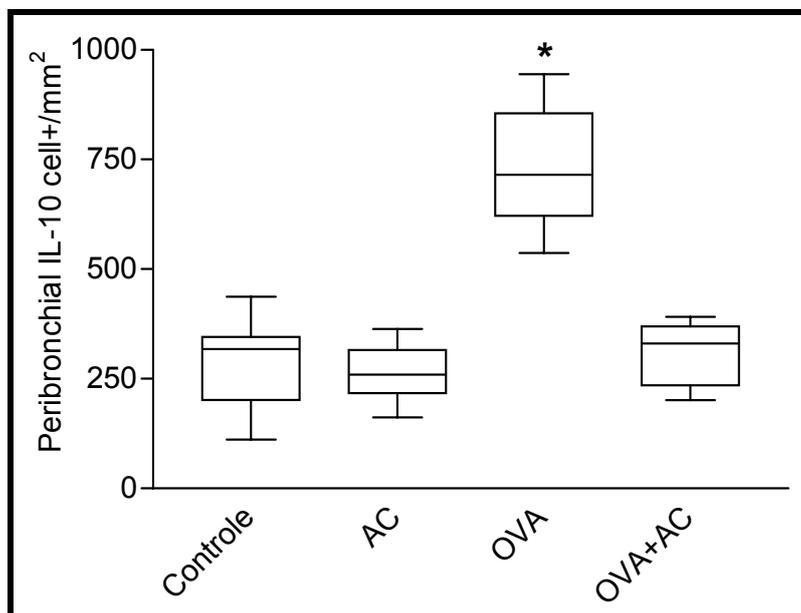
Os valores estão expressos em *box plot*. O detalhamento do *box plot* e dos grupos estão descritos, respectivamente, na Figura 1 e Tabela 1. Não foram encontradas diferenças entre os grupos.

Figura 21: Efeito da melhora do condicionamento aeróbio na expressão de INF- γ



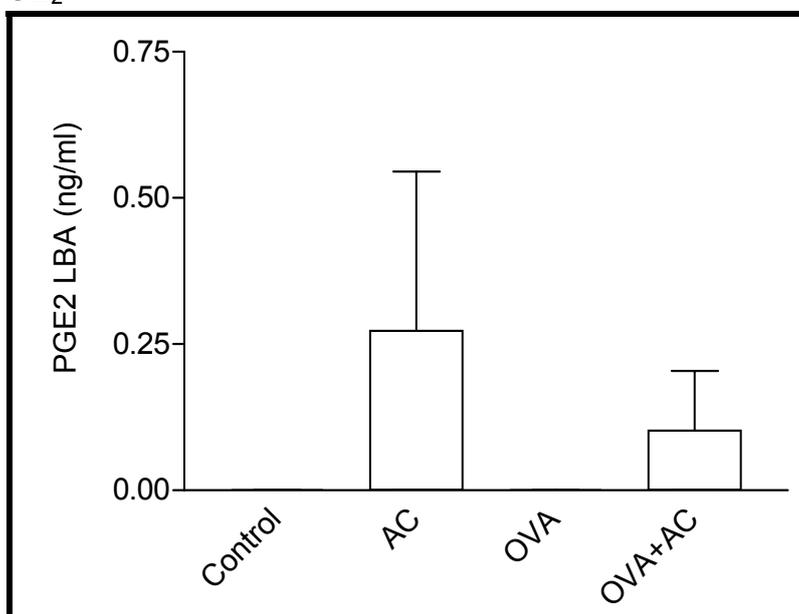
Os valores estão expressos em *box plot*. O detalhamento do *box plot* e dos grupos estão descritos, respectivamente, na Figura 1 e Tabela 1. Não foram encontradas diferenças entre os grupos.

Figura 22: Efeito da melhora do condicionamento aeróbio na expressão de IL-10



Os valores estão expressos em *box plot*. O detalhamento do *box plot* e dos grupos estão descritos, respectivamente, na Figura 1 e Tabela 1. * $p < 0,01$ quando comparado com todos os demais grupos.

Figura 23: Efeito da melhora do condicionamento aeróbio na expressão de PGE₂



Os valores estão expressos em *box plot*. O detalhamento do *box plot* e dos grupos estão descritos, respectivamente, na Figura 1 e Tabela 1. Não foram encontradas diferenças entre os grupos.

DISCUSSÃO

5-DISCUSSÃO

Os dados do presente estudo demonstram que o condicionamento físico aeróbio prévio inibiu os seguintes parâmetros: 1) a produção de imunoglobulinas específicas; 2) a migração de eosinófilos e linfócitos para as vias aéreas; 3) a expressão de citocinas Th2 pelas células inflamatórias; 4) a expressão de moléculas de adesão; 5) a expressão de quimiocinas; e, 6) o remodelamento das vias aéreas. Conjuntamente, estes resultados sugerem fortemente que a melhora no condicionamento físico aeróbio modula a sensibilização alérgica e, conseqüentemente, a inflamação pulmonar alérgica crônica e o remodelamento das vias aéreas.

A imunoglobulina E (IgE) é fundamental para o desenvolvimento da resposta alérgica e tem um papel não somente na resposta imediata como também na resposta tardia. O envolvimento da mediação de IgE na resposta alérgica das vias aéreas pode ser verificado em estudos onde o tratamento de pacientes asmáticos alérgicos com anticorpos monoclonais anti-IgE reduziu a migração de eosinófilos para as vias aéreas (54). Em nosso modelo experimental, a melhora do condicionamento físico aeróbio antes da sensibilização, surpreendentemente, inibiu a produção de IgE e IgG1 específicos para a ovalbumina (OVA). Existem poucos estudos avaliando o efeito do condicionamento físico na resposta alérgica, mais especificamente, na produção de imunoglobulinas. Vieira e colaboradores (2007) avaliaram o efeito do condicionamento físico aeróbio em camundongos sensibilizados e não encontraram alterações nos níveis de IgG1 e IgE específicas para OVA

(45). Por outro lado, Pastva *et al.* (2004) avaliaram o efeito do condicionamento físico aeróbio sobre os níveis de IgE e mostraram uma redução parcial da IgE específica para OVA, porém sem alterações nos níveis de IgE total (44). A diferença observada entre estes 2 estudos pode ser, pelo menos parcialmente, explicado pelo protocolo experimental utilizado. Neste sentido, Vieira iniciou o treinamento físico dos animais após os 14 dias do protocolo de sensibilização enquanto no estudo de Pastva o condicionamento físico foi iniciado simultaneamente à sensibilização. Visto conjuntamente, estes resultados sugerem que a melhora do condicionamento aeróbio antes ou simultaneamente com o início das sensibilizações alérgicas pode inibir a produção de imunoglobulinas alérgicas específicas.

A regulação da resposta imune no processo alérgico parece estar envolvida com o balanço Th1/Th2 (55,56). Esta regulação é denominada a hipótese da higiene e sugere que a reação alérgica pode ser modulada por um desbalanço entre a regulação dos linfócitos Th1/Th2 que se auto-regulam por feedback negativo durante o processo imune (55). No presente estudo, observamos que a melhora do condicionamento físico aeróbio levou a uma inibição na expressão das citocinas Th2, sem, entretanto, alterar a expressão das citocinas Th1. Estes resultados não sugerem a nossa hipótese inicial e reforçam que os mecanismos imunológicos envolvidos nas doenças alérgicas podem ser mais complexos do que os definidos por uma simples dicotomia da hipótese da higiene. Estudos transversais e longitudinais têm demonstrado uma forte associação entre o nível das

citocinas Th2 e a severidade das doenças atópicas, porém o papel das citocinas Th1 nas doenças atópicas permanece controverso (57). Entretanto, os nossos resultados devem ser vistos de maneira cautelosa porque, apesar de não termos observado alterações na expressão de IFN- γ e IL-2 ao final do protocolo de sensibilização, não podemos excluir possíveis alterações na expressão destas citocinas durante o protocolo de treinamento físico e/ou sensibilização. Estudos investigando o papel das citocinas Th1 em modelos experimentais na resposta alérgica mostram que transferência de linfócitos Th1, em animais naive, aumenta sua migração para o pulmão, sem, entretanto, inibir a ação de linfócitos Th2 e o desenvolvimento do processo inflamatório alérgico crônico (58). No entanto, são necessários mais estudos para melhor compreender a interação entre estas células na resposta alérgica.

Existe hoje um conjunto de evidências sugerindo que o treinamento físico aeróbio traz benefícios importantes para o paciente alérgico como o asmático, entretanto os mecanismos pelo qual isto ocorre ainda são pouco compreendidos. A hipótese mais aceita é de que o treinamento físico aeróbio aumenta da capacidade ventilatória trazendo assim outros benefícios como a melhora da capacidade física, diminuição da dispnéia e do broncoespasmo induzido por exercício. Entretanto, resultados recentes mostram que o treinamento físico também pode reduzir a necessidade do uso de corticóides e broncodilatadores de longa duração sugerindo que ele poderia ter um possível efeito antiinflamatório aeróbio na asma (59-61). Neste sentido, Pastva et al. (2004) foram os primeiros a mostrar que a atividade aeróbia de

intensidade moderada reduz a inflamação alérgica das vias aéreas num modelo experimental em camundongos (45). Apesar de estes autores terem mostrado que o treinamento físico aeróbio de intensidade moderada reduz o número de células inflamatórias nas vias aéreas num modelo experimental de asma que era predominantemente neutrofílico o que reduziu a sua relevância clínica. Por outro lado, Vieira *et al.* (2007) mostrou que o treinamento físico num modelo eosinofílico de asma reduziu a migração destas células para as vias aéreas reforçando a hipótese de que o treinamento físico possa ter um papel antiinflamatório nas reações alérgicas (45).

Apesar do papel do treinamento físico nas reações alérgicas permanecer pouco compreendido, estudo clínico e experimental sugerem que o treinamento físico aeróbio modula o sistema imune (33, 36, 38, 62). Em indivíduos saudáveis, uma única sessão de exercício de alta intensidade aumenta o número de linfócitos, porém ao término da atividade, há uma queda destas células para valores abaixo daqueles avaliados antes do exercício (33). Interessantemente, esta queda parece estar mais relacionada com a diminuição do número de linfócitos Th1 sem modificação do número de linfócitos Th2 visto que há um aumento da expressão de IFN- γ sem alteração dos níveis de IL-4 (63, 64). Por outro lado, não há um consenso sobre o efeito crônico do exercício físico na resposta imune. Existem evidências de que a melhora do condicionamento físico diminuir a atividade proliferativa de linfócitos, efeito este que pode aumentar ou permanecer inalterado em função da intensidade do treinamento físico (33). Shinkai *et al.*

(1995) demonstraram que indivíduos idosos ativos apresentam níveis maiores de IL-2, IL-4 e IFN- γ (65). Adicionalmente, Kohut *et al.* (2001) observaram que o treinamento aeróbio de intensidade moderada realizado durante 8 semanas em camundongos idosos aumentou a produção de citocinas Th1 em resposta a um agente infeccioso sugerindo uma melhora da resposta imune adaptativa (66). Porém, como dito anteriormente, o papel do exercício físico na resposta alérgica permanece pouco compreendido.

Em nosso modelo animal alérgico crônico induzido pela OVA, foi observado um grande aumento na expressão das citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) pelas células inflamatórias que foi inibido pelo treinamento físico aeróbio. Existem evidências de que as citocinas Th2, principalmente a IL-4 e a IL-5, atuam diretamente e/ou indiretamente promovendo a diferenciação e a proliferação bem como aumentam o recrutamento e a sobrevivência das células inflamatórias no processo alérgico (33). Estes dados sugerem que a redução do nível destas interleucinas pode ter inibido a inflamação pulmonar. Por outro lado, a IL-4 também está envolvida na produção de imunoglobulinas o que poderia também explicar a redução na produção destes anticorpos observada pelo condicionamento físico no nosso modelo experimental.

Os efeitos das citocinas nas doenças alérgicas e em modelos experimentais de inflamação pulmonar alérgica crônica são bastante complexos e envolvem a participação de outras citocinas Th2. A IL-5 parece também estar envolvida na produção, ativação de eosinófilos e perpetuação da eosinofilia. Neste sentido, animais deficientes de IL-5 não apresentam

uma resposta eosinofílica pulmonar após o desafio antigênico específico (67, 68). A IL-5 tem um papel importante na estimulação da produção de eosinófilos e de receptores de IL-5 pela medula óssea (69). Deste modo, a exposição à alérgenos e dos níveis de IL-5 aumentam a produção de células progenitoras de eosinófilos e basófilos responsivos a IL-5 levando a um aumento de recrutamento das células nas vias aéreas (70). Vistos conjuntamente, podemos especular que os efeitos inibitórios do condicionamento físico aeróbio na expressão da IL-5 podem também estar relacionado à redução na produção de eosinófilos enquanto a inibição na expressão da IL-4 pode estar relacionada com a inibição da produção de imunoglobulinas e a migração de eosinófilos para a via aérea.

No presente estudo, verificamos também que a exposição alérgica aumentou de maneira significativa a expressão de IL-13 que foi inibida pela melhora do condicionamento físico aeróbio. A IL-13 junto com a IL-4 promove o recrutamento de eosinófilos para o sítio inflamatório através de diversas maneiras como, por exemplo, através da expressão VCAM-1 no endotélio vascular. A infiltração eosinofílica é muito relevante nas doenças alérgicas porque acarreta em lesão epitelial, secreção de muco, hiperresponsividade das vias aéreas e estimulam o remodelamento das vias aéreas (71, 72).

O nosso modelo de inflamação alérgica apresentou características de remodelamento tanto de vias aéreas demonstrados pelo aumento da deposição de fibras colágenas e elásticas nas vias aéreas, componentes da matriz extracelular que determinam em grande parte o comportamento

mecânico do tecido pulmonar. Visto que o remodelamento das vias aéreas tem sido considerado uma conseqüência do processo inflamatório eosinofílico cuja perpetuação é orquestrada pelos linfócitos Th2, os nossos resultados sugerem fortemente que o condicionamento físico pode também reduzir a cronicidade da doença pulmonar alérgica crônica. Recentemente, foi verificado que indivíduos que são mais fisicamente ativos apresentam uma menor hiperresponsividade brônquica o que pode sugerir uma implicação entre os nossos achados e estudos clínicos (73).

As quimiocinas RANTES e eotaxina também apresentam um importante na inflamação alérgica e no remodelamento das vias aéreas visto que elas têm um forte efeito quimioatrativo para as células inflamatórias (74). Entretanto, para que a célula migre para o sítio inflamatório, também é necessária a modulação pelas moléculas de adesão, no caso, a ICAM-1 e a VCAM-1 que contribuem para a inflamação eosinofílica das vias aéreas (75, 76). Interessantemente, o nosso modelo experimental de inflamação alérgica apresentou uma expressão aumentada de RANTES e de ICAM-1 e VCAM-1 pelas células inflamatórias que foram inibidos pelo condicionamento físico aeróbio prévio. Deste modo, podemos sugerir que a melhora do condicionamento pode ter modulado a migração eosinofílica pela modulação da expressão de interleucinas Th2 e/ou pela expressão de fatores quimioatrativos e moléculas de adesão.

Os fatores de crescimento como a TGF- β e VEGF têm um papel importante no remodelamento das vias aéreas. O TGF- β promove o remodelamento das vias aéreas (77, 78) enquanto o VEGF pode também

mediar a inflamação das vias aéreas e o remodelamento das vias aéreas nas doenças alérgicas. Nossos resultados mostram que a inflamação pulmonar alérgica crônica apresentava um aumento da expressão de TGF- β e VEGF que foram reduzidos pela melhora do condicionamento físico aeróbio. Vistos em conjunto com os resultados previamente demonstrados, nossos resultados sugerem que a melhora no condicionamento aeróbio o remodelamento das vias aéreas, provavelmente decorrentes da redução da migração eosinofílica.

Para melhor compreendermos os mecanismos pelo qual o exercício reduziu a inflamação alérgica observada em nosso estudo, avaliamos a expressão de citocinas Th1 que parecem ter papel imunorregulador desencadeado pelo exercício físico (79). Entretanto, nossos resultados mostram que o condicionamento aeróbio não modificou a expressão de IL-2 e IFN- γ . Outra possível modulação da resposta imune desencadeada pela melhora do condicionamento físico observada em nosso estudo poderia ser desencadeada através de um aumento da expressão de IL-10, citocina regulatória que tem sido mostrada exercer um papel antiinflamatório nos sistemas cardiovascular e metabólico desencadeado pelo condicionamento físico aeróbio (36, 38). Nossos resultados mostram que a inflamação pulmonar alérgica aumentou a expressão de IL-10 e que, ao contrário do que esperávamos, o condicionamento físico reduziu estes níveis descartando assim o envolvimento desta citocina como imunorregulador neste modelo experimental. Por último, avaliamos os níveis da prostaglandina E₂ (PGE₂) no lavado broncoalveolar visto que este

eicosanóide parece ter um efeito antiinflamatório inibir tanto a fase inicial quanto a fase tardia do processo alérgico, atenuando a inflamação eosinofílica (80). Entretanto, o exercício físico não alterou os níveis da PGE₂ sugerindo a sua não participação no nosso modelo experimental.

Relevância clínica: As reações alérgicas podem ocorrer com maior intensidade nos dois extremos da vida humana, na infância e em idosos, quando o sistema imune está mais propenso à resposta Th2 (42, 81). Interessantemente, é também nestas duas fases da vida humana, onde os indivíduos estão mais suscetíveis ao descondiçãoamento físico (82). Assim, os nossos dados sugerem, pela primeira vez, que a melhora do condicionamento físico aeróbio tem um papel inibitório no desenvolvimento da inflamação alérgica, alterações estas que parecem ser decorrentes da inibição da resposta Th2 (expressão das citocinas e a inflamação eosinofílica). Apesar de compreendermos que os resultados obtidos no presente estudo não podem ser transpostos de imediato para a prática clínica, podemos sugerir que o condicionamento físico aeróbio pode inibir a maior incidência da resposta alérgica nos indivíduos.

CONCLUSÕES

5-CONCLUSÕES

Concluimos que a melhora no condicionamento físico aeróbio parece ter um papel preventivo no desenvolvimento da sensibilização alérgica e da inflamação e remodelamento das vias aéreas observado pelas nas seguintes variáveis:

- inibição da expressão de imunoglobulinas específicas;
- inibição da expressão de citocinas Th2;
- e, pela redução da produção de fibras colágenas e elásticas.

Entretanto, o mecanismo pelo qual o exercício físico desencadeia estes efeitos ainda não está totalmente compreendidos e parece que isto não ocorre pela modulação dos níveis de citocinas Th1 e IL-10 bem como pela modulação de PGE₂.

REFERÊNCIAS

6-REFERÊNCIAS

- 1- El Biaze M, Boniface S, Koscher V, Mamessier E, Dupuy P, Milhe F et al. T cell activation, from atopy to asthma: more a paradox than a paradigm. *Allergy* 2003; 58:844-53.
 - 2-Ishizaka K, Ishizaka T. Mechanisms of reaginic hypersensitivity: a review. *Clin Allergy* 1971; 1:9-24.
 - 3-Grumach AS. *Alergia e Imunologia na infância e adolescência*. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Ed. Atheneu; 2001.
 - 4-World Allergy Organization [on line], 2008. [acessado em 20 de Novembro de 2008]. Disponível em: <http://www.worldallergy.org>
 - 5-Ferreira MAR. Inflammation in allergic asthma: initiating events, immunological response and risk factors. *Respirology* 2004; 9:16-24.
 - 6-Bousquet J, Chanez P, Vignola AM, Lacoste JY, Michel FB. Eosinophil inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150:33-38.
 - 7-Kroemer G, Moreno de Alboran I, Gonzalo JA, Martinez C. Immunoregulation by cytokines. *Crit Rev Immunol* 1993;13:163-91.
 - 8-Strachan, DPBMJ. 1989, Hayfever, hygiene, and household size. *Brit Med J*, 299:1259-1260.
 - 9-Mucida DS, Keller AC, Fernvik EC, Russo M. Current Drug Targets Inflammation and Allergy 2003, 2, 187-195.
 - 10-Yazdanbakhsh M., Kremsner PG, van Ree R. *Science* 2002, 296:490-494.
-

- 11-Stam WB, Van Oosterhout AJ, Nijkamp FP. Pharmacologic modulation of Th1- and Th2-associated lymphokine production. *Life Sci* 1993; 53:1921-34.
- 12-Mauser PJ, Pitman AM, Fernandez X, Foran SK, Adams GR, Kreuter W et al. Effects of an antibody to interleukin-5 in a monkey model of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:467-72.
- 13-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; 326:298–304.
- 14-Lampinen M, Carlson M, Venge HP. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. *Allergy* 2004; 59:793–805.
- 15-Rothenberg ME, Hogan SP. The Eosinophil. *Annu Rev Immunol*. 2006; 24:147-74.
- 16-Carlson M, Peterson C, Venge P. The influence of IL-3, IL-5 and GM-CSF on normal human eosinophil and neutrophil C3b-induced degranulation. *Allergy* 1993; 48:437-442.
- 17-Bossé M, Audette M, Ferland C, Pelletier G, Chu HW, Dakhama A, Lavigne S, Boulet LP, Laviolette M. Gene expression of interleukin-2 in purified human peripheral blood eosinophils. *Immunology* 1996; 87:149-154.
- 18-Levi-Schaffer F, Barkans J, Newman TM, Ying S, Wakelin M, Hohenstein R, Barak V, Lacy P, Kay AB, Moqbel R. Identification of interleukin-2 in human peripheral blood eosinophils. *Immunology* 1996; 87:155–161.
- 19-Webb DC, McKenzie AN, Koskinen AM, Yang M, Mattes J, Foster PS. Integrated signals between IL-13, IL-4, and IL-5 regulate airways hyperreactivity. *J Immunol*. 2000; 165:108-113.
-

20-Conroy DM, Williams TJ. Eotaxin and the attraction of eosinophils to the asthmatic lung. *Respir Res.* 2001; 2:150-156.

21-Bisset LR, Schmid-Grendelmeier P. Chemokines and their receptors in the pathogenesis of allergic asthma: progress and perspective. *Curr Opin Pulm Med.* 2005;11:35-42.

22-Mould AW, Matthaei KI, Young IG, Foster PS. Relationship between interleukin-5 and eotaxin in regulating blood and tissue eosinophilia in mice. *J Clin Invest* 1997, 99:1064-1071.

23-Foster PS, Hogan PS, Ramsay JA, Matthaei IK, Young GI. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airway hyperreactivity and lung damage in a mouse asthma model. *J Exp Med* 1996; 183:195.

24-Wong CK, Wang CB, Li ML, Ip WK, Tian YP, Lam CW. Induction of adhesion molecules upon the interaction between eosinophils and bronchial epithelial cells: involvement of p38 MAPK and NF-kappaB. *Int Immunopharmacol.* 2006; 6:1859-1871.

25-Weller CL, Jose PJ, Williams TJ. Selective suppression of leukocyte recruitment in allergic inflammation. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005; 100:153-160.

26-Vignola AM, Mirabella F, Costanzo G, Giorgi R, Gjomarkaj M, Bellia V, Bonsignori G. Airway remodeling in asthma. *Chest* 2003; 123:417-22.

27-James A. Airway remodeling in asthma. *Curr Opin Pulm Med.* 2005; 11:1-6.

28-Peat JK, Woolcock AJ, Cullen K. Rate of decline of lung function in subjects with asthma. *Eur J Resp Dis.* 1987; 70:171-179.

- 29-Mauad T, Souza ASL, Saldiva PHN, Dolhnikoff M. Remodelamento brônquico na asma. *J Pneumologia* 2000; 26:91-98.
- 30-Lee KS, Park SJ, Kim SR, Min KH, Lee KY, Choe YH et al. Inhibition of VEGF blocks TGF-beta1 production through a PI3K/Akt signalling pathway. *Eur Respir J* 2008; 31:523-31.
- 31-McArdle WD, Katch FI, Katch VL. *Fisiologia do Exercício, Energia, Nutrição e Desempenho Humano*. 4ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan; 1998.
- 32-Denadai BS. *Índices Fisiológicos de Avaliação Aeróbia: Conceitos e Aplicações*. 1ed. Ribeirão Preto: Ed. Unesp; 1999.
- 33-Pedersen BK, Hoffman-Goetz L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev*. 2000; 80:1055-1081.
- 34-Ji LL. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1999; 222:283-292.
- 35-Leandro C, Nascimento E, Manhães-de-Castro R, Duarte JA, de Castro CM.M.B. Exercício físico e sistema imunológico: mecanismos de integrações. *Rev. Portuguesa de Ciência do Desporto* 2002; 2:80-90.
- 36-Moldoveanu AI, Shepard RJ, Shek PN. The cytokine response to physical activity and training. *Sports Med* 2001; 31:115-144.
- 37-Costa Rosa LFPB, Vaisberg MW. Influências do exercício na resposta imune. *Rev Bras Med Esporte* 2002; 8:167-172.
- 38-Petersen AMW, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol* 2005; 98:1154-1162.
-

39-Tilz, G.P. et al., Increased immune activation during and after physical exercise. *Immunobiology* 1993;188:194-202.

40-Hocknury, DH; Hocknury, SE. *Descobrimos a Psicologia*. 2ed. São Paulo: Manole, 2003.

41-Clark CJ, Cochrane LM Physical activity and asthma. *Curr Opin Pulm Med*. 1999, 5:68-75.

42-Fanelli A, Cabral AL, Neder JA, Martins MA, Carvalho CR. Exercise training on disease control and quality of life in asthmatic children. *Med Sci Sports Exerc* 2007; 39:1474-80.

43-Gonçalves RC, Nunes MPT, Cukier A, Stelmach R, Martins MA, Carvalho CRF. Efeito de um programa de condicionamento físico aeróbio 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*. 2008, 12:127-135.

44-Pastva A, Estell K, Schoeb TR, Atkinson TP, Schwiebert LM. Aerobic exercise attenuates airway inflammatory responses in a mouse model of atopic asthma. *J Immunol* 2004; 172:4520-4526.

45-Vieira RP, Claudino RC, Duarte ACS, Santos ABG, Perini A, Faria Neto HCC et al. Aerobic exercise decreases chronic allergic lung inflammation and airway remodeling in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176:871-7.

46-Jungsuwadee P, Dekan G, Stingl G, Epstein MM. Inhaled dexamethasone differentially attenuates disease relapse and established allergic asthma in mice. *Clinical Immunology* 2004; 110:13-21.

47-Ovary. Z. Passive Cutaneous Anaphylaxis. In: Immunological Methods, 2 ed. Oxford, GB: Blackwell Scientific Publications; 1964.

48-Mota I, Perini A. A heat labile mercaptoethanol susceptible homocytotropic antibody in the guinea pig. Life Sciences 1970; 9:923-930.

49-Luna, LG. AFIP manual of histologic staining methods. New York, EUA: McGraw Hill; 1986.

50-Xisto DG, Farias LL, Ferreira HC, Picanço MR, Amitrano D, Lapa e Silva JR, Negri EM, Mauad T, Carnielli D, Silva LFF, Capelozzi VL, Faffe DS, Zin WA, Rocco PRM. Lung parenchyma remodeling in a murine model of chronic allergic inflammation. Am J Respir Crit Care Med. 2005; 171:829-837.

51-de Magalhaes Simoes S, dos Santos MA, da Silva Oliveira M, Fontes ES, Fernezlian S, Garippo AL, Castro I, Castro FF, de Arruda Martins M, Saldiva PH, Mauad T, Dolhnikoff M. Inflammatory cell mapping of the respiratory tract in fatal asthma. Clin Exp Allergy 2005; 35:602-611.

52-Araujo BB, Dolhnikoff M, Silva LFF, Elliot J, Lindeman JHN, Ferreira, A. Extracellular matrix components and regulators within the airway smooth muscle in asthma. Eur Respir J 2008; 32:61-9.

53-Junqueira ME, Grund LZ, Orii MN, Saraiva TC, de Magalhães Lopes CA, Lima C, Lopes-Ferreira M. Analysis of the inflammatory reaction induced by the catfish (*Cathorops spixii*) venoms. Toxicon 2007, 49:909-19.

54-van Rensen ELJ, Evertse CE, van Schadewijk WAAM, van Wijngaarden S, Ayre G, Mauad T, Hiemstra PS, Sterk PJ, Rabe KF. Eosinophils in bronchial mucosa of asthmatics after allergen challenge: effect of anti-IgE treatment. Allergy 2008, 64:72-80.

55-Renz H, Blumer N, Virna S, Sel S, Garn H. The immunological basis of the hygiene hypothesis. *Chem Immunol Allergy* 2006; 91:30-48.

56-Racila DM, Kline JN. Perspectives in asthma: molecular use of microbial products in asthma prevention and treatment. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116:1202-1205.

57-Ngoc PL, Gold DR, Tzianabos AO, Weiss ST, Celedon JC. Cytokines, allergy, and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2005; 5:161-6.

58-Trujillo-Vargas CM, Mayer KD, Bickert T, Palmetshofer A, Grunewald S, Ramirez-Pineda, Polte T, Hansen G, Wohlleben G, Erb KJ. Vaccinations with T-helper type1 directing adjuvants have different suppressive effects on the development of allergen-induced T-helper type2 responses. *Clin Exp Allergy* 2005, 35:1003-13.

59-Svenonius E, Kautto R, Arborelius M Jr. Improvement after training of children with exercise-induced asthma. *Acta Paediatr Scand*. 1983; 72:23-30.

60-Caroll N, Sly P. Exercise training as an adjunct to asthma management. *Thorax*. 1999; 54:190-191.

61-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.

62-Ostrowski K, Rohde T, Asp S, Schjerling P, Pedersen BK. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *J Physiol*. 1999; 515:287-291.

- 63-Ibefelt T, Petersen EW, Bruunsgaard MS, Pedersen BK. Exercise-induced change in the type 1 cytokine-producing CD8+ T cells is related to a decrease in memory T cells. *J Appl Physiol* 2002; 93:645-48.
- 64-Lancaster GI, Halson SL, Khan Q, Drysdale P, Wallace F, Jeukendrup AE, Drayson MT, Gleeson M. Effects of acute exhaustive exercise and chronic exercise training on type 1 and type 2 T lymphocytes. *Exerc Immunol Rev.* 2004;10:91-106.
- 65-Shinkai S, Kohno H, Kimura K, Komura T, Asai H, Inai R, Oka K, Korokawa Y, Shephard R. Physical activity and immune senescence in men. *Med Sci Sports Exerc.* 1995; 27:1516-26.
- 66-Kohut ML, Boehm GW, Moynihan JA. Moderate exercise is associated with enhanced antigen-specific cytokine, but not IgM antibody production in aged mice. *Mech Ageing Dev* 2001; 122:1135-50.
- 67- Kopf M, Brombacher F, Hodgkin DP, Ramsay JA, Milbourne AE, Dai JW et al. IL-5 deficient mice have a development defect in CD5+B1 cells and lack eosinophilia but have normal antibody and cytotoxic T cell responses. *Immunity* 1996; 4:15.
- 68- Sanderson CL. IL-5, eosinophils and disease. *Blood* 1992; 79:3101.
- 69-Sehmi R; Wood LJ, Watson R, Foley R; Hamid Q, O'Byrne PM; Denburg JA. Allergen-induced increases in IL-5 receptor alpha-subunit expression on bone marrow-derived CD34+ cells from asthmatic subjects. A novel marker of progenitor cell commitment towards eosinophilic differentiation. *J Clin Invest.* 1997;100:2466-75.
-

- 70-Wood LJ, Inman MD, Watson RM, Foley R, Denburg JA, O'Byrne PM. Changes in bone marrow inflammatory cell progenitors after inhaled allergen in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998, 1:99-105.
- 71-Cohn L, Elias JA, Chupp GL. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol.* 2004; 22:789-815.
- 72-Larche M, Robinson DS, Kay AB. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111:450-63.
- 73-Shaaban R, Leynaert B, Soussan D, Anto JM, Chinn S, de Marco R, Garcia-Aymerich J, Heinrich J, Janson C, Jarvis D, Sunyer J, Svanes C, Wjst M, Burney PG, Neukirch F, Zureik M. Physical activity and bronchial hyperresponsiveness: European Community Respiratory Health Survey II. *Thorax* 2007, 62:403-10.
- 74-Rothenberg ME, Zimmermann N, Mishra A, Brandt E, Birkenberger LA, Hogan SP and Foster PS. Chemokines and Chemokine Receptors: Their role in allergic airway disease. *J Clin Immunol.* 1999, 19:250-65.
- 75-Wang S, Fan Y, Han X, Yang J, Bilenki L, Yang Xi. IL-12-dependent vascular cell adhesion molecule-1 expression contributes to airway eosinophilic inflammation in a mouse model of asthma-like reaction. *J Immunol.* 2001; 166:2741-2749.
- 76-Wolyniec WW, Sanctis GT, Nabozny G, Torcellini C, Haynes N, Joetham A et al. Reduction of antigen-induced airway hyperreactivity and eosinophilia in ICAM-1-deficient mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 18:777-785.
-

- 77-Ohkawara Y, Tamura G, Iwasaki T, Tanaka A, Kikuchi T, Shirato K. Activation and transforming growth factor beta production in eosinophils by hyaluronan. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000; 23:444-451.
- 78-Elovic AE, Ohyama H, Sauty A, McBride J, Tsuji T, Nagai M et al. IL-4-dependent regulation of TGF-alpha and TGF-beta 1 expression in human eosinophils. *J Immunol.* 1998; 160:6121-6127.
- 79-Suzuki K, Nakaji S, Yamada M, Totsuka M, Sato K, Sugawara K. Systemic inflammatory response to exhaustive exercise. *Exerc Immunol Ver.* 2002; 8:6-48.
- 80-Wu CY, Wang K, McDyer JF, Seder RA. Prostaglandin E2 and dexamethasone inhibit IL-12 receptor expression and IL-12 responsiveness. *J. Immunol.* 1998; 161:2723-2730.
- 81-Shearer GM, Chougnat C, Shearer MS. Atopic disease and immunologic response. *Science* 1997; 276:17-8.
- 82-Marcus BH, Williams DM, Dubbert PM, Sallis JF, King AC, Yancey AK et al. Physical activity intervention studies: what we know and what we need to know: a scientific statement from the American Heart Association Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation* 2006; 114: 2739-52.
-