CLARICE ROSA OLIVO

Efeito do condicionamento físico aeróbio de moderada intensidade na inflamação pulmonar alérgica crônica e na hiperresponsividade brônquica à metacolina em cobaias sensibilizadas

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

Área de Concentração: Movimento, Postura e Ação Humana
Orientador(a): Prof (ª) Dr. Celso Ricardo Fernandes de Carvalho

São Paulo
2009

CLARICE ROSA OLIVO

Efeito do condicionamento físico aeróbio de moderada intensidade na inflamação pulmonar alérgica crônica e na hiperresponsividade brônquica à metacolina em cobaias sensibilizadas

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

Área de Concentração: Movimento, Postura e Ação Humana
Orientador(a): Prof (ª) Dr. Celso Ricardo Fernandes de Carvalho

São Paulo
2009

DEDICATÓRIA

À Wilma, Claudio e ao André.

AGRADECIMENTOS

Não existem palavras ou expressões suficientes para que possa expor o meu agradecimento as pessoas foram (e são) essenciais na conclusão de mais essa etapa:

Ao André, por ser companheiro, generoso, por me tornar (ou pelo menos tentar) uma pessoa mais paciente, calma e boa.....por acreditar em mim.....por me fazer mais completa e por me amar....todos os dias da minha vida até a eternidade.

Aos meus pais, por acreditarem em mim, por me confortar, por estar sempre ao meu lado, por me mostrar os caminhos da vida, por tornarem todos os meus dias e sonhos possíveis e reais.....por sempre me fazerem feliz. Às minhas irmãs por se fazerem presentes aonde não estou. À Marilyn e ao Frederico pela generosidade do amor sincero.

Ao meu orientador, Celso, pela grande oportunidade e por apostar em mim. Ao Rodolfo, por ser parte fundamental deste trabalho. Ao Prof Milton pela generosidade. À Deborah por ter me mostrado, pela primeira vez, os caminhos da ciência.

Às minhas sempre madrinhas, Anna Cecília, Fê Arante e Fê Lopes, pela amizade, carinho, companherismo.....por me emprestarem o ombro para todas as angústias da vida.... e me fazer rir em todos os momentos adversos.

Às todas as minhas amigas de "laboratório" que me emprestam sabedoria e que me fazem compreender por quê é tão bom ter amigos: Adenir, Tati, Alessandra, Rosana, Edna, Francine, Bia, Fabi, Carla, Petra, Vanessinha, Paolo, Henrique. Ao quinteto fantástico e às minhas amigas fisioterapeutas por sempre se orgulharem de mim me apoiando.

Aos companheiros do grupo "Asma e Exercício". Aos anjos Ângela e Cris, por serem parte deste trabalho e pela serem sempre tão doces.

À USP e FAPESP pela oportunidade.

OBRIGADA!!!

Este trabalho recebeu apoio financeiro da FAPESP.
Projeto:06/58259-6

EPÍGRAFE

"A vida é para quem topa qualquer parada. Não para quem pára em qualquer topada."

Bob Marley

SUMÁRIO

Lista de Figuras e Tabelas

Lista de Abreviaturas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO 1

1.1Imunologia da Asma 2

1.2O Óxido Nítrico e a Asma 5

1.3O Remodelamento Brônquico na Asma 6

1.4A Importância da Atividade Física na Asma 7

2 OBJETIVOS 12

3 MÉTODOS 13

3.1 Animais 13

3.2 Delineamento Experimental 13

3.3 Protocolo de Sensibilização Pulmonar Alérgica Crônica 14

3.4 Determinação da Velocidade de Treinamento 15

3.5 Protocolo de Treinamento Físico 16

3.6 Coleta e Mensuração do NO exalado 17

3.7 Coleta de Sangue 17

3.8 Estudo Morfométrico 18

3.9 Imunohistoquímica 20

3.10 Avaliação dos Títulos de IgE e IgG1 específicos para OVA 22

3.11 Avaliação da Hiperresponsividade Brônquica a Metacolina 23

3.12 Análise dos Resultados 24

4 RESULTADOS..... 25

5 DISCUSSÃO..... 41

6 CONCLUSÃO..... 48

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 49

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 - Protocolo de sensibilização e treinamento físico..... 16

Tabela 1 - Teste físico aeróbio e Imunoglobulinas..... 26

Figura 2 - Níveis de Óxido nítrico exalado (NOex) 27

Figura 3 - Resistência das vias aéreas (Raw) 28

Figura 4 - Resistência do tecido pulmonar (Gtis) 28

Figura 5 - Elastância do tecido pulmonar (Htis) 29

Figura 6 - Eosinófilos peribrônquicos..... 30

Figura 7 - Linfócitos peribrônquicos..... 31

Figura 8 - Índice de edema peribrônquico..... 32

Figura 9 - IL-4+ peribrônquico/mm^2..... 33

Figura 10 - IL-13+peribrônquico/mm^2..... 34

Figura 11 - IL-5+ peribrônquico/mm^2..... 34

Figura 12 - IL-2+ peribrônquico/mm^2..... 35

Figura 13 - IFN-γ+ peribrônquico/mm^2..... 35

Figura 14 - IL-1ra+ peribrônquico/mm^2..... 36

Figura 15 - IL-10+ peribrônquico/mm^2..... 36

Figura 16 - Índice de broncoconstrição das vias aéreas..... 37

Figura 17 - Índice de espessura do músculo liso..... 38

Figura 18 - Proporção de volume de fibras colágenas nas vias aéreas... 39

Figura 19 - Proporção de volume de fibras elásticas nas vias .aéreas.... 39

Figura 20 - Espessura do epitélio respiratório..... 40

LISTA DE ABREVIATURAS

TF – Treinamento Físico

OVA – Ovalbumina

NO – Òxido Nítrico

NOex – Óxido Nítrico Exalado

Mch – Metacolina

IL – interleucina

IFN-γ – interferon – γ

Th1 – Linfócitos T tipo 1

Th2 – Linfócitos T tipo 2

IgE – Imunoglobulina E

IgG1 – Imunoglobulina gamma-1

PCA – Anafilaxia Cutânea Passiva

Raw – Resistência das vias aéreas

Gtis – Resistência dos tecidos

Htis – Elastância do tecido

RESUMO

Olivo, CR. Efeito do condicionamento físico aeróbio de moderada intensidade na inflamação pulmonar alérgica crônica e na hiperresponsividade brônquica à metacolina em cobaias sensibilizadas [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 55p.

O treinamento físico (TF) melhora a resposta imune de indivíduos saudáveis e traz benefícios para o paciente asmático, mas seu papel na resposta alérgica é desconhecido. **Objetivo**: Avaliar o papel do TF de moderada intensidade na inflamação pulmonar alérgica crônica. **Métodos**: 54 cobaias, divididas em 4 grupos: grupo controle (C) (não sensibilizados e não treinados), grupo OVA (sensibilizados à ovalbumina (OVA) e não treinados), grupo treinamento físico (TF) (não sensibilizados e submetidos a um TF), e grupo OVA+TF (sensibilizados à OVA e submetidos a um TF). A sensibilização à OVA teve duração de 8 semanas e o programa de TF de 6 semanas iniciando 15 dias após o início da sensibilização. Cada grupo foi dividido em 2 subgrupos. No primeiro foi avaliada a inflamação pulmonar e os níveis de óxido nítrico exalado (NOex) e no segundo, a hiperresponsividade brônquica à metacolina (Mch). **Resultados**: A sensibilização à OVA induziu a um aumento da densidade de eosinófilos e linfócitos, expressão de IL(interleucina)-4 e IL-13 e na espessura do músculo liso na via aerea assim como espessura do epitélio comparado aos animais não-sensibilizados ($p<0,05$). Os animais do grupo OVA+TF apresentaram uma redução da densidade de eosinófilos, linfócitos, IL-4 e IL-13 comparado com o grupo OVA ($p<0,05$). Nem a sensibilização crônica a OVA ou TF influenciaram a expressão das citocinas Th1 (IL-2 e IFN-γ) ou a expressão das citocinas regulatórias (IL-10 e IL-1-ra) e nos níveis de NOex. Os grupos que realizaram TF tiveram aumento na espessura do epitélio quando comparados com grupos não-treinados embora não há diferença entre os grupos na avaliação da hiperresponsividade brônquica. **Conclusão**: Nossos resultados sugerem que o TF reduz a inflamação alérgica sem modificar a hiperresponsividade brônquica e o remodelamento das vias aéreas.

Descritores: Asma, Condicionamento físico animal, cobaias, ovalbumina, hiperreatividade brônquica, metacolina.

SUMMARY

Olivo, CR. Effects of aerobic physical training with moderate intensity on chronic airway inflammation and bronchial hyperresponsivity to a methacoline in sensitized guinea pig. [disertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 55p.

Background*:* Aerobic training (TF) has a positive effects on health subjects and bring benefits on the immune system of asthmatic patients. However, its role on allergic immune response remains poorly understood. **Objective**: To evaluate the effects of TF in chronic allergic inflammation. **Methods**: Fifty-four animals, divided in 4 groups: non-trained and non-sensitized (C), non-sensitized and aerobic exercise (TF), ovalbumin sensitized and non-trained (OVA), and sensitized and aerobic exercise (OVA+TF). OVA or saline sensitization was performed during 8 weeks. TF was performed in a treadmill during 6 weeks beginning in the 3rd week of sensitization. Each group were divided in two groups. In the first one, it was evaluated airway inflammation and levels of exhaleted oxide nitric (NOex), on the second, airway hyperresponsiveness to a methacholine (Mch). **Results**: OVA sensitization induced an increase in the eosinophils and lymphocytes counting, expression of IL-4 and IL-13 and the amount of airway smooth muscle and epithelium thickness compared to non-sensitized animals ($p<0.05$). Sensitized animals submitted to TF presented a reduction in the eosinophil and lymphocyte counting, expression of IL-4 and IL-13 compared with OVA group ($p<0.05$) but not OVA-induced changes in airway remodeling ($p>0.05$). Neither OVA nor TF induced any difference in the expression of Th1 (IL-2 and IFN-γ) and regulatory cytokine (IL-10 and IL1-ra) and the levels of NOex. Trained groups presented an increase in epithelium thickness as compared to the non-trained groups however we did not find difference between groups on hyperresponsiveness avaliation. **Conclusion**: Our results suggest that TF reduces allergic airway inflammation without changes in bronchial hyperresponsiveness and airway remodeling.

Descriptors: Asthma, Physical conditioning animal, Guinea Pig, Ovalbumin, Bronchial hyperreactivity, Methacholine.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A asma é uma doença inflamatória alérgica crônica das vias aéreas na qual participam células e mediadores celulares (GINA, 2006). É caracterizada pela hiperresponsividade das vias aéreas e limitação variável ao fluxo aéreo, reversível espontaneamente ou com tratamento (IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma, 2006). A asma pode se desenvolver durante a infância ou vida adulta. (Fireman, 2003)

O excessivo estreitamento da via aérea, edema da parede brônquica, descamação das células epiteliais, infiltrado de celulas inflamatórias (principalmente eosinófilos) e tampão mucoso estão presentes na crise de asma (Lucas, 2005). Clinicamente, os sinais e sintomas mais usuais são: falta de ar, chiado, tosse, aperto no peito e produção aumentada de muco (Fireman, 2003). Os fatores gatilhos mais comuns da asma são: infecção viral, alergia, exercício, irritantes como cigarro, odores fortes, poeira, entre outros.

A prevalência, severidade e hospitalizações em decorrência da asma tem aumentado muito nas últimas 4 décadas (Lucas, 2005). Estima-se que 150 milhões de pessoas sejam afetadas pela doença em todo o mundo (GINA, 2006). No Brasil, ocorrem, anualmente, cerca de 350.000 internações pela doença que constitui a quarta causa de internação pelo Sistema Único de Saúde (2,3% do total) e a terceira entre crianças e adultos jovens (IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma, 2006). Esse aumento na prevalência e consequente alto custo da asma tem sido descrito por alguns

autores como reflexos do estilo de vida ocidental, ou seja, a melhora nas condições de higiene e no controle das infecções teriam reduzido a exposição à "carga" microbial durante a infância liderando uma polarização de células Th2. Teoria esta que suporta a hipótese da higiene (Strachan, 1989).

Além disso, o custo direto (utilização dos serviços de saúde) e indireto (diminuição da produtividade e prejuízo da qualidade de vida) da asma é bastante elevado. Em 1996, foram gastos, aproximadamente, 76 milhões de reais com internações por asma, o que correspondeu a 2,8% do gasto total anual e o terceiro maior valor com uma doença (IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma, 2006). Assim, apesar do grande avanço no entendimento da fisiopatologia da asma e no desenvolvimento de medicamentos específicos para seu tratamento, a morbidade e a mortalidade da doença ainda se encontram em níveis elevados.

1.1 Imunologia da Asma

A asma é uma doença de caráter predominantemente alérgico. Para o seu desenvolvimento ocorre, inicialmente, o que chamamos de sensibilização. Nesse processo, as células dendríticas presentes no trato respiratório são apresentadoras de antígeno e os apresentam para os linfócitos T (Bharadwaj et al 2007) que após passarem por diversas alterações funcionais adquirem um padrão fenotípico do tipo 2 (Th2) (Calich

e Vaz, 2001). A diferenciação dessas células Th2 ocorre em resposta à exposição a alérgenos sob a influência da interleucina (IL)-4 que tem sido reconhecida como chave fundamental na patogênese da asma e na inflamação dos pulmões. Os linfócitos Th2 ativados produzem as IL-4, IL-5 e IL-13. A IL-5 é especialmente responsável pela ativação da cascata eosinofílica, IL-4 e IL-13 pela produção de IgE através das células B. Já os linfócitos Th1 são diferenciados sob a influência da IL-12 e secretam primariamente IL-2 e interferon-gamma (IFN-γ) que tem um papel importante na destruição intracelular de micróbios fagocitados (Renauld, 2001; Packard & Khan, 2003; Ngoc et al, 2005).

Além disso, a interação das células dendríticas, já citadas, com os linfócitos T auxiliadores faz com que os linfócitos B sejam estimulados produzindo imunoglobulinas E (IgE) que, quando liberadas na circulação, se ligam a receptores de alta afinidade presentes na superfície dos mastócitos resultando na síntese e liberação de uma variedade de mediadores inflamatórios (Hamelmann et al, 1999). O processo de sensibilização ainda inclui a formação de uma memória celular que pode se localizar em órgãos linfáticos periféricos ou em tecidos inflamados (Sallusto et al, 1999) e que respondem rapidamente a um segundo estímulo de antígenos e desencadeiam a resposta imune.

Após o indivíduo estar sensibilizado, uma nova exposição ao antígeno desencadeará uma resposta inflamatória em 2 fases (Ferreira, 2004). Na primeira, o contato com o antígeno ativa os mastócitos e leva à liberação de mediadores inflamatórios tais como histamina, leucotrienos e prostaglandina.

Simultaneamente a esse processo, haverá o início da segunda fase com ativação das células centrais de memória Th2 e células B, que migram para o pulmão e aumentam o recrutamento e a atividade leucocitária. Os linfócitos Th2 também estimulam a produção de eosinófilos na medula óssea que ocorre pela sinalização de IL-5, responsável pela proliferação, diferenciação, sobrevivência e ativação de eosinófilos na medula óssea e também pela liberação de eosinófilos maduros para a circulação bem como possui um papel quimioatrativo para estas células (Carlson et al 1993; Lampinen et al, 2004). A IL-5 também é capaz de bloquear os efeitos inibitórios da IL-2 sobre a migração de eosinófilos (Bossé et al, 1996; Levi-Schaffer et al, 1996).

A IL-4 é outra citocina Th2 que está envolvida na inflamação pulmonar alérgica. A IL-4 é capaz de perpetuar a ativação de mastócitos, responsáveis pela liberação de IgE e Imunoglobulina gamma-1 (IgG1), induzir o recrutamento e a ativação de eosinófilos e também estimular as células epiteliais a produzirem muco (Lampinen et al, 2004; Rothenberg & Hogan, 2006). Todo esse processo já foi verificado em modelos experimentais de inflamação alérgica crônica utilizando ovalbumina (OVA) como antígeno (Bruijnzeel, 1994; Lampinen et al, 2004).

Muitos estudos sugerem que a fisiopatologia da asma está vinculada a um possível desbalanço Th1/Th2 e existem evidências de que a resposta alérgica ocorreria devido a um efeito de *feedback* negativo. Ou seja, o aumento da ativação das células Th1 leva a uma inibição das células Th2 e vice-versa. No caso do aumento da resposta Th1, ocorreria um aumento da expressão de IFN-γ que inibe a infiltração eosinofílica, a produção de muco e

a hiperresponsividade brônquica causadas pela ação de Th2 (Iwamoto et al., 1993; Cohn et al., 1999; Huang et al., 2001). Entretanto, outros estudos sugerem que as células Th1 podem influenciar positivamente no processo alérgico, inclusive potencializando os efeitos Th2 nos estágios primários da inflamação (Randolph, 1999; Hansen et al., 1999). Neste caso, acredita-se que a potencialização possa estar relacionada a uma cooperação entre os linfócitos Th1 e os Th2 para os pulmões (Randolph et al., 1999; Stephens et al., 2002). Com isso, nota-se que os mecanismos que envolvem a asma são muito complexos e não podem ser exclusivamente explicados somente pelo desbalanço Th1/Th2 (Ngoc et al 2005).

1.2 O Óxido Nítrico e a Asma

O óxido nítrico é um mediador inflamatório sintetizado continuamente pelas células a partir do aminoácido L-arginina, através das enzimas NO sintase. Apresenta um efeito relaxante na musculatura lisa das vias aéreas em humanos *in vitro* (Gaston et al., 1993) embora não tenha efeito sobre a função pulmonar de indivíduos normais (Hogman et al., 1993; Kacmarek et al., 1996).

O NO é produzido em grande quantidade pelas células epiteliais de indivíduos asmáticos (Hamid et al., 1993), seus níveis exalados (NOex) estão aumentados nestes pacientes (Alving et al., 1993; Kharitonov et al., 1994) podendo estar reduzidos após corticoideterapia (Yates et al., 1995),

sugerindo que o Noex pode ser um potencial marcador para controle do grau de inflamação nesses indivíduos, além de ter a vantagem de a sua mensuração ser simples e não invasiva.

Por outro lado, existem evidências sugerindo que o NOex não tem relação direta com a gravidade da asma (Dupont et al., 1998) tão quanto com o broncoespasmo causado pelo alérgeno na ausência de inflamação (Ashutosh, 2000), mostrando-se apenas aumentado durante a exacerbação da asma e diminuído com a recuperação da mesma (Dupont et al., 1998). Neste caso, o NO poderia servir para diferenciar entre a inflamação e o broncoespasmo bem como servir de guia para a terapia medicamentosa com esteróides e outros medicamentos antiinflamatórios. Níveis aumentados de NOex também já foram observados em doenças como rinite alérgica, síndrome da doença respiratória aguda (ARDS). Entretanto, nestas patologias, ao contrário do que ocorre na asma, os níveis de NOex não diminuem com o tratamento (Ashutosh, 2000).

1.3 O Remodelamento Brônquico na Asma

Nos últimos anos, a relação entre a estrutura e função da árvore brônquica na asma tem sido objeto de estudos. Este interesse é decorrente da queda da função pulmonar de caráter irreversível ao longo do tempo em alguns pacientes asmáticos. Além disso, alguns estudos ainda mostram uma alteração persistente da função pulmonar, embora esses pacientes possam

não apresentar as manifestações clínicas da doença. Acredita-se que as alterações estruturais, muitas delas definitivas, contribuem ou provocam as alterações funcionais de caráter irreversível a observadas. Teoricamente, a presença da inflamação crônica, com liberação de inúmeras substâncias mediadoras, pode agir em cada um dos compartimentos da via aérea levando a alterações anatômicas (Mauad, 2000).

Além disso, há evidências que pulmões de pacientes que faleceram decorrente da asma apresentam uma acentuada hiperplasia da musculatura lisa dos brônquios e bronquíolos, espessamento da membrana submucosa basal, aumento da deposição de colágeno e elástica, hipertrofia das glândulas mucosas e edema de mucosa (Fireman, 2003), caracterizando o remodelamento brônquico.

O remodelamento brônquico é, se não mais, a consequência anatômica da ação da inflamação crônica na via aérea e espelha a falta de reparo à injúria crônica (Irvin & Wenzel, 1995).

1.4 A Importância da Atividade Física na Asma

Devido ao desconforto respiratório vivenciado durante a realização das atividades de vida diária ou durante atividades que requeiram algum esforço, a maioria dos pacientes asmáticos modifica seu estilo de vida reduzindo os níveis de atividade física para não vivenciar a falta de ar (Ludwick et al., 1985; Cochrane & Clark, 1990). Estes níveis reduzidos levam

a uma redução na capacidade aeróbia e consequentemente ao descondicionamento físico aumentando a probabilidade destes pacientes apresentarem uma redução do limiar ventilatório (Cochrane & Clark, 1990). O descondicionamento físico pode estar presente até mesmo em pacientes sob tratamento clínico-medicamentoso.

A possibilidade do exercício vir a ser usado como parte do tratamento de pacientes asmáticos surgiu em 1882, por Henry Hide Salter (Salter, 1882 *apud* Lucas, 2005). Hoje, sabe-se que asmáticos que praticam atividade física de modo regular evidenciam uma redução do número de sintomas durante a prática esportiva, fato também evidenciado pelo número de atletas de elite asmáticos que participaram dos jogos olímpicos (Wilber et al, 2000; Welsh, 2004).

Um programa de treinamento físico elaborado para pacientes asmáticos deve ter como objetivos: aumentar a capacidade física, a coordenação neuromuscular e a confiança. Um possível mecanismo para se explicar os benefícios da atividade física é de que a melhora da capacidade aeróbia que irá aumentar o limiar ventilatório, diminuindo o volume minuto durante o exercício moderado. Além disso, existem evidências de que o condicionamento físico reduz a percepção da broncoconstrição e aumenta a força da musculatura respiratória (Ram, 2009).

O número de estudos clínicos avaliando o papel do condicionamento físico na melhora clínica de pacientes asmáticos vem aumentando significativamente. Weinstein e colaboradores (1996) mostraram que crianças asmáticas submetidas a um programa de condicionamento físico

apresentam uma redução no número de internações, visitas a pronto-socorros, uso de corticoesteróides e consultas médicas ambulatoriais e que este efeito permaneceu durante 4 anos subseqüentes ao programa. Além disto, os autores mostraram uma redução dos custos com o tratamento da doença, mesmo quando considerado o custo da internação hospitalar das crianças durante o período de reabilitação. Infelizmente, muitos estudos sobre atividade física em pacientes asmáticos são estudos não controlados e seus resultados perderam muito da sua importância (Satta, 2000).

Não existe um critério estabelecido para determinar o tipo de treinamento físico para o paciente asmático e existem evidências de que tanto o treinamento aeróbio de intensidade moderada ou intensa podem ser benéficos para este paciente (Varray et al., 1991; Emtner et al., 1996). Ram et al (2009), numa meta-análise recente, mostraram que a capacidade aeróbia nos asmáticos aumenta em níveis semelhantes aqueles observados em pessoas saudáveis. No entanto, a intensidade e a modalidade dos exercícios ideais para estes pacientes ainda não está estabelecida.

Counil et al (2003) analisaram o efeito do treinamento aeróbio e anaeróbio em crianças com asma moderada à grave e verificaram que ambos são bem tolerados pelos pacientes sugerindo que o treinamento anaeróbio pode ser considerado dentro de um programa de reabilitação. Neder e colaboradores (1999) estudaram o impacto do treinamento aeróbio no tratamento clínico de crianças com asma persistente moderada e grave e seus resultados mostram uma relação linear inversa entre a capacidade aeróbia basal e o incremento aeróbico bem como uma redução do uso de

corticóides inalatórios. Além disso, estudos clínicos do nosso grupo demonstraram que pacientes asmáticos submetidos a um programa de treinamento físico diminui o uso de corticóide sugerindo que a atividade física pode ter um efeito anti-inflamatório nesses pacientes (Fanelli et al, 2007).

Outros estudos também têm mostrado que o treinamento traz benefícios para os asmáticos tais como: melhora da capacidade física, da tolerância à crise asmática e maior independência social e psicológica bem como redução da incidência e freqüência de crises asmáticas, de sintomas de asma e do absenteísmo escolar (Morton et al., 1981; Huang et al., 1989; Strunk et al., 1991; Varray et al., 1991).

Do ponto de vista imunológico, sabe-se que a atividade física pode modificar a resposta de indivíduos asmáticos. Tal hipótese encontra base num estudo que mostra que o condicionamento físico pode alterar o balaço Th1/Th2 (Moyna et al., 1996). Embora muitos estudos sejam feitos com o intuito de avaliar efeitos agudos do exercício no sistema imunológico, ainda se sabe pouco sobre os efeitos crônicos neste sistema e não se chegou a um consenso sobre a atividade proliferativa de linfócitos (Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000). Dados relativos à relação Th1/Th2 também são escassos na literatura.

Pastva et al. (2004) verificaram que camundongos submetidos ao treinamento físico de intensidade moderada atenua a expressão de IL-4, a infiltração de células inflamatórias, a produção de muco e a hipertrofia epitelial. Além disso, Vieira et al (2007) mostraram que o treinamento físico

em camundongos pode ter um efeito anti-inflamatório observada pela redução da expressão de IL-4 e IL-5, do número de eosinófilos infiltrados sem, entretanto, modificar a expressão de citocinas Th1. Vistos conjuntamente, estes resultados sugerem que o treinamento físico modula a resposta resposta imune através das citocinas $Th_{2.}$

Devido às evidências de que o treinamento físico, em modelos animais, tenha um efeito modular na resposta inflamatória associado ao fato da melhora clínica em pacientes asmáticos, justifica-se a necessidade de entendermos melhor os mecanismos pelos quais isto é obtido.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Em vista do previamente exposto, fica evidente que o condicionamento físico tem sido utilizado de maneira auxiliar no tratamento do paciente asmático, porém ainda se desconhece os benefícios deste tipo de tratamento na inflamação pulmonar.

Nossa hipótese de trabalho é de que o condicionamento físico modifica a resposta imune possivelmente aumentando a resposta Th1 e reduzindo a resposta Th2. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o papel do condicionamento físico de moderada intensidade na inflamação pulmonar alérgica crônica.

MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizadas 54 cobaias Hartley machos pesando entre 250 e 280 gramas, adquiridas do Laboratório Medlab, alimentadas *ad libitum* e mantidas em ciclo claro-escuro de 12 horas em temperatura ambiente de $20\pm2^{o}C$ no Biotério do LIM-20 (Laboratório de Terapêutica Experimental) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da FMUSP (protocolo 100/04).

3.2 *Delineamento Experimental*

As cobaias foram divididas em 4 grupos: não sensibilizados e não treinados (grupo Controle (C); n=13); não-sensibilizados e treinados (grupo Treinamento Físico (TF); n=14); sensibilizados à ovalbumina e não-treinados (grupo Ovalbumina (OVA); n=13;); e não sensibilizados e submetidos a um treinamento físico (grupo OVA+TF; n=14;). Cada grupo foi divido em 2 subgrupos e submetido a 2 protocolos experimentais diferentes. No primeiro,

foi avaliada a inflamação pulmonar e os níveis de óxido nítrico exalado e no segundo, a hiperresponsividade brônquica à metacolina (Mch).

3.3 Protocolo de Sensibilização Pulmonar Alérgica Crônica

Os animais foram cronicamente sensibilizados como previamente descrito por Tibério et al. (1997). Resumidamente, os animais foram submetidos a 7 sessões de ovalbumina aerossolizada (OVA grau V, Sigma; EUA) com a duração máxima de 15 minutos cada. Para isto, os animais foram colocados em caixas de acrílico (30x15x20cm) acopladas a um nebulizador ultra-sônico que gerou um aerossol de OVA. As inalações ocorreram em dias intercalados, dias comerciais da semana (2as, 4as e 6as-feiras), num período total de 15 dias. Nas primeiras 4 inalações, as cobaias foram expostas a concentrações de 1 mg/mL de OVA; na 5ª e 6ª inalações, a concentrações foram de 2,5 de mg/mL de OVA; na última inalação, os animais foram desafiados pela exposição de OVA numa concentração de 5 mg/mL. A partir da 4^{a} inalação, alguns animais apresentaram desconforto respiratório (tosse ou tiragem intercostal) e o tempo de inalação dos animais foi determinado pelo aparecimento destes sintomas decorrentes da inalação. Para evitar possível variabilidade na interpretação do desconforto respiratório entre-observadores, a avaliação destas alterações foi realizada sempre por um único observador. Ao término do processo de sensibilização, os animais foram submetidos a um protocolo de inalação crônica, sendo

expostos a 3 inalações semanais com doses crescentes OVA durante 6 semanas (5mg/mL nas duas primeiras semanas, 10mg/mL nas duas semanas intermediárias e 20mg/mL nas duas últimas semanas) e cada sessão teve a duração máxima de 15 minutos.

Os animais pertencentes aos grupos não-sensibilizados (C e TF) foram submetidos aos mesmos procedimentos de inalação, embora tenham recebido salina aerossolizada (NaCl – 0.9%) ao invés de OVA.

3.4 Determinação da Velocidade de Treinamento

Antes do início do estudo, os animais foram submetidos a um protocolo de adaptação na esteira ergométrica com a finalidade de aprendizado dos animais. Neste protocolo, os animais permaneciam na esteira com uma inclinação de 8 graus a uma velocidade de 0,03 km/h, durante 5 minutos nos 4 dias que antecederam o teste de esforço inicial.

Antes do período de treinamento, cada cobaia foi submetida a um teste de esforço máximo inicial, adaptado de Gava et al. (1995), que consiste no aumento gradual da velocidade (0,3 Km/h) da esteira ergométrica a cada 3 minutos, numa inclinação de 8 graus. A velocidade máxima alcançada por cada animal foi aquela na qual ele conseguia se manter em movimento mesmo após receber 10 estímulos mecânicos. Este teste foi também repetido ao final do protocolo para verificar a melhora da capacidade de exercício dos animais.

3.5 Protocolo de Treinamento Físico

Os animais foram treinados em esteira ergométrica diariamente por 60 minutos, 5 dias por semana, durante 6 semanas (período da inalação crônica). Para os grupos de treinamento, a velocidade de treinamento foi de 50% da média aritmética da velocidade máxima alcançada pelo grupo no teste de esforço. O treinamento aeróbio consistiu de 10 minutos de aquecimento e 10 minutos de resfriamento, com velocidades variando entre 10 a 30% da carga máxima, e 40 minutos na velocidade de treinamento estipulada.

Os animais não-treinados mantiveram o protocolo de adaptação na esteira ergométrica até o final do período de treinamento dos grupos que realizaram atividade física.

Legenda: Protocolo de sensibilização à OVA associado ao protocolo de treinamento físico

3.6 Coleta e Mensuração do NO exalado (Noex)

Quarenta e oito horas após a última sessão de treinamento físico os animais foram anestesiados com tiopental (170 mg/kg i.p.), traqueostomizados com um tubo de polietileno e conectados a um ventilador mecânico para roedores (Harvard, Rodent Ventilator Model 683) com volume corrente de 6 mL/kg e freqüência respiratória de 66 respirações por minuto (Ray et al., 1988). A partir de então, foi coletado o ar exalado para mensuração dos níveis de Noex basal.

Para a coleta do Noex, utilizou-se sacos de Mylan e foi colhido o ar expirado na válvula expiratória do ventilador mecânico sendo que, durante a coleta, os animais respiraram ar ambiente (fiO_2=0,21).Todas as amostras foram analisadas no período de 24 horas após sua coleta, como previamente descrito por Mehta et al., 1997. As amostras de gás exalado foram misturadas por 5 a 10 segundos antes da determinação da concentração do NO por quimioluminescência (Sievers 280). O equipamento de análise do NO é calibrado diariamente utilizando-se uma amostra de gás com concentração de NO conhecida.

3.7 Coleta de Sangue

Após a coleta do NOex, realizou-se uma incisão de 3 a 4 cm na linha mediana do abdômen do animal, e então coletada uma amostra de sangue

da veia cava inferior. As amostras de sangue foram centrifugadas (5000 rpm x 10 min, 5°C) e o soro aliquotado e armazenado a –70°C para análise dos títulos de imunoglobulinas IgE e IgG1 específicos para OVA.

3.8 Estudo Morfométrico

Após a coleta de sangue, os animais foram sacrificados por exanguinação da aorta abdominal e foi introduzido 5 mL de paraformaldeido (4%) na cânula traqueal, foi removida a caixa torácica anterior e o pulmão clampeado e retirado em bloco para imersão imediata em paraformaldeido (4%) por 24 horas para fixação do tecido. Após este período, o material foi submetido às técnicas histológicas habituais com parafina, para obtenção de cortes de 5 μm de espessura e corados com hematoxilina e eosina para quantificação do índice de edema peribrônquico, indice de broncoconstrição, quantificação de musculatura lisa da via aérea e espessura do epitélio. As colorações de luna, picro sirius e resorsina-fucsina foram utilizadas, respectivamente para quantificação de eosinófilos e fibras colágenas e elásticas.

O estudo morfométrico foi realizado com o auxílio de um microscópio óptico comum (CH30) Olympus e utilizada a técnica de contagem de pontos com o auxílio de um retículo de 50 retas e 100 pontos sobrepostos ao tecido (10^4 μm^2 de área total). Para cada índice realizado, foram escolhidas 5 vias aéreas por lâmina, de forma aleatória. Para a quantificação de índice de

edema peribrônquico, índice de contração da via aérea, quantificação da espessura do epitélio e espessura da musculatura lisa presente na região peribrônquica, as vias aéreas foram focalizadas no aumento de 1000x. Para a quantificação das variáveis, foi contado o número de pontos do retículo que coincidiram com as áreas estudadas. Cada valor foi então dividido pelo número de interceptos que cruzavam a membrana basal correspondente. Este método tem sido amplamente utilizado e descrito (Garcia et al., 1994; Sakae et al., 1995; Warth et al., 1995).

A densidade dos eosinófilos e linfócitos na parede da via área foi quantificada utilizando o retículo previamente descrito com aumento de 400x e foi avaliado o número de pontos que caíram fora da parede da via aérea (entre a musculatura lisa da via aérea e a adventícia) e o número de células que se encontravam nesta área. A densidade de células foi dada pela divisão do número de células pela área, expressada em células/mm^2.

A quantificação das fibras colágenas e elásticas na região peribrônquica foi quantificada pelo número de pontos que coincidiram com os locais corados positivamente para cada coloração utilizada (picro sirius e resorsina-fucsina, respectivamente) dividindo-se pelo número de pontos que caíram na área avaliada. A leitura foi realizada num aumento de 400x, e o número expresso em porcentagem como previamente descrito (Lanças et al, 2006).

3.9 Imunohistoquímica

As lâminas foram previamente preparadas com (3-Aminopropil-trietoxisilano) (Silane - Sigma) contendo os cortes histológicos dos pulmões. Essas lâminas foram previamente desparafinadas e hidratas 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 realizou-se com água oxigenada (H_2O_2) 10V 3% (3 x 10 minutos), seguidos de incubação com os anticorpos primários: anti-IL-5 (sc-7885; Santa Cruz), anti-IFN-gama (sc-8308; SantaCruz), anti-IL-2 (sc-7896; Santa Cruz) e anti-IL-4 (sc-1260; Santa Cruz), anti-IL-10 (sc-1783; Santa Cruz), anti-IL-13(sc-1776; Santa Cruz), anti-IL-1ra (sc-8482; Santa Cruz) diluídos em BSA na proporção de 1:150 (IL-5) 1:150 (IFN-gama), 1:150 (IL-2) e 1:300 (IL-4),1:50 (IL-10), 1:150 (IL-13), 1:120 (IL-1ra) os quais foram aplicados sobre os cortes de tecidos relativos ao grupo intervenção e ao controle (positivo e negativo, respectivamente), 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,

seguirá o bloqueio da peroxidade endógena com $H_2O_2$10V 3% + metanol (1:1) (2 x 10 minutos) e posteriormente incubação com o complexo.

Etapa 4 – Revelação: Seguiu-se 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, lavadas em água corrente, desidratadas, diafanizadas e montadas com resina para microscopia Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha).

A análise consistiu de medidas de densidade de células positivas para IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-1ra e IFN-γ. Para a contagem da densidade de células, foi utilizado o mesmo retículo acima citado para avaliação morfométrica. Em aumento de 1000x, foram contados os pontos que sobrepõem na área da parede da via aérea (excluindo a camada epitelial), localizada entre o limite externo da camada de músculo liso e a adventícia. Assim, a área estudada em cada campo foi calculada de acordo com o número de pontos incidentes na parede, em proporção a área total do retículo.

Uma vez conhecida a área, foram contados o número de células positivas a IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-1ra e IFN-γ na parede da via aérea. As medidas foram expressas em células/μm^2 e os resultados em células/mm^2 através do ajuste de unidades. A contagem também foi

realizada em 5 vias aéreas escolhidas aleatoriamente por lâmina como previamente descrito (Simões et al., 2005; Lancas et al., 2006).

3.10 Avaliação dos Títulos de IgE e IgG1 *Específicos para OVA*

A técnica de anafilaxia cutânea passiva (PCA) foi utilizada conforme previamente descrito para determinação dos títulos de IgE e IgG1. Para a determinação dos títulos de IgE específicos para OVA, uma amostra de 0,1mL do soro das cobaias foi submetida a diferentes diluições (a partir de 1:5) e injetadas intradermicamente no dorso das cobaias sem qualquer tratamento. Setenta e duas horas após a sensibilização passiva, os animais receberam uma injeção intravenosa de 1mL de soro fisiológico contendo 2 mg de OVA e 5 mg de Azul de Evans. Uma hora após esta administração, esses animais foram anestesiados (Tiopental – 170 mg/Kg) e sacrificados. Após o sacrifício, o dorso dos animais foi tricotomizado e o diâmetro das manchas azuis na porção subcutânea quantificado.

Para a determinação dos títulos de IgG1 específicos para OVA, uma amostra de 0,1mL do soro das cobaias foi diluída com soro fisiológico na proporção de 1:5, e logo após, essa diluição permaneceu durante uma hora a temperatura de 56°C com a finalidade de neutralizar os anticorpos IgE. Em seguida, essas amostras foram submetidas a novas diluições (a partir de 1:10) e injetadas intradermicamente em cobaias sem nenhum tipo de tratamento. Vinte e quatro horas após a sensibilização passiva, os animais

foram desafiados com a solução de azul de evans e OVA (2,5%) e uma hora após o desafio eles foram sacrificados, tricotomizados e as porções coradas com azul de evans quantificadas.

Os títulos de IgE e IgG1 específicos para OVA foram definidos como a maior diluição que apresentou uma mancha azul de no mínimo 10mm de diâmetro como previamente descrito (Mota & Perini, 1970; Ovary, 1974).

3.11 Avaliação da Hiperresponsividade Brônquica à Mch.

Os animais foram anestesiados (Tiopental, 170 mg/Kg; i.p.), traqueostomizados, paralisados (*Pancuronium*, 0,03 mg/Kg; i.p) e ventilados mecanicamente (6mL/Kg; 66 rpm) utilizando-se um ventilador Flexivent (Scireq, Quebec, Canadá). A impedância do sistema respiratório (Z_f) foi calculada utilizando perturbações por 16 segundos e volume corrente de 1,5mL/Kg. As medidas de mecânica pulmonar foram coletadas após 30 segundos e 1, 2 e 3 minutos da infusão de doses crescentes de Mch (1-300 ug/mL; i.v.). O intervalo entre cada dose foi de 5 minutos.

Foram coletados o volume de ar deslocado pelo pistão do ventilador (V_{cyl}) e a pressão interna do cilindro (P_{cyl}) durante os 16 segundos de perturbação. A perturbação foi composta por uma soma de senóides com freqüências primas de 0,25 a 19,625 Hz evitando assim distorções harmônicas (Hantos et al., 1992). As amplitudes das senóides decrescem hiperbolicamente com a freqüência. Para o cálculo dos dados, foram feitas

correções considerando as perdas devido à compressibilidade dos gases (Bates et al., 2000). O V_{cyl} foi corrigido para se obter o volume que efetivamente chegava ao animal (V) e a P_{cyl} corrigida, resultando no valor de P_{ao} (pressão de abertura das vias aéreas). Através da derivação no tempo de V, foi obtido o fluxo (V'). Para análise das impedâncias obtidas, utilizou-se o modelo de fase constante, descrito por Hantos et al. (1992):

$$Z(f) = R_{aw} + i \cdot 2 \cdot \pi \cdot f \cdot I_{aw} + \frac{G - i \cdot H}{(2 \cdot \pi \cdot f)^{\alpha}}$$

Onde R_{aw} = resistência de vias aéreas, I_{aw} = inertância, G = a dissipação de energia nos tecidos pulmonares, H = energia acumulada nos tecidos do pulmão, *i* = unidade imaginária e *f* = freqüência e $\alpha = 2/\pi.\arctan(H/G)$.

3.12 Análise dos resultados

Os resultados obtidos para cada parâmetro avaliado foram comparados entre-grupos utilizando-se o teste de análise de variância através do pacote estatístico Sigma Stat 2.0 e foram considerados como estatisticamente significantes quando $p<0,05$.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

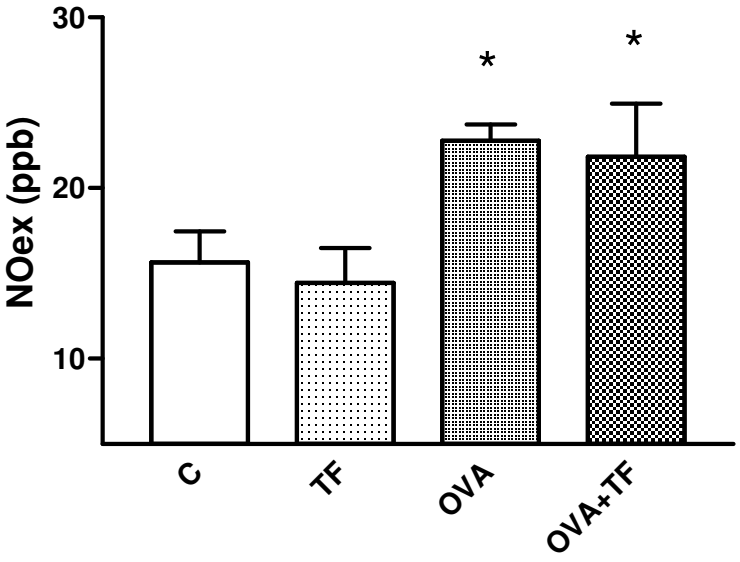
Os animais não sensibilizados à ovalbumina (OVA) e não treinados (grupo C) e os animais sensibilizados à OVA e não treinados (grupo OVA) não apresentaram aumento da capacidade de exercício ao final do período de protocolo (Tabela 1). Por outro lado, os animais submetidos ao treinamento físico (grupos TF e OVA+TF), apresentaram um aumento da capacidade de tempo de exercício quando comparado com os grupos não treinados (grupos C e OVA) (Figura 1; $p<0,01$), porém não houve diferença do tempo de exercício entre os grupos treinados.

Com relação à sensibilização à OVA, verificou-se que os animais sensibilizados apresentaram um aumentou dos níveis de imunoglobulinas específicas E e G1 para OVA (respectivamente, IgE e IgG1) quando comparado com os grupos não sensibilizados (Tabela 1; $*p<0,001$). Além disto, este aumento não foi alterado pelo treinamento físico aeróbio.

	Teste Físico Aeróbio (minutos)		Immunoglobulinas (Log)	
GRUPOS	**Teste Inicial**	**Teste Final**	**IgE**	**IgG1**
C	18,1 ± 1,3	23,3 ±1,7	0	0
TF	22,0 ± 2,1	38,5 ± 5,0*	0	0
OVA	14,7 ± 3,4	21,2 ± 3,2	2,9 ± 1,7**	5,7 ± 2,9**
OVA+TF	20,4 ± 2,0	40,5 ± 3,8*	2,7 ± 2,2**	4,8 ± 3,7**

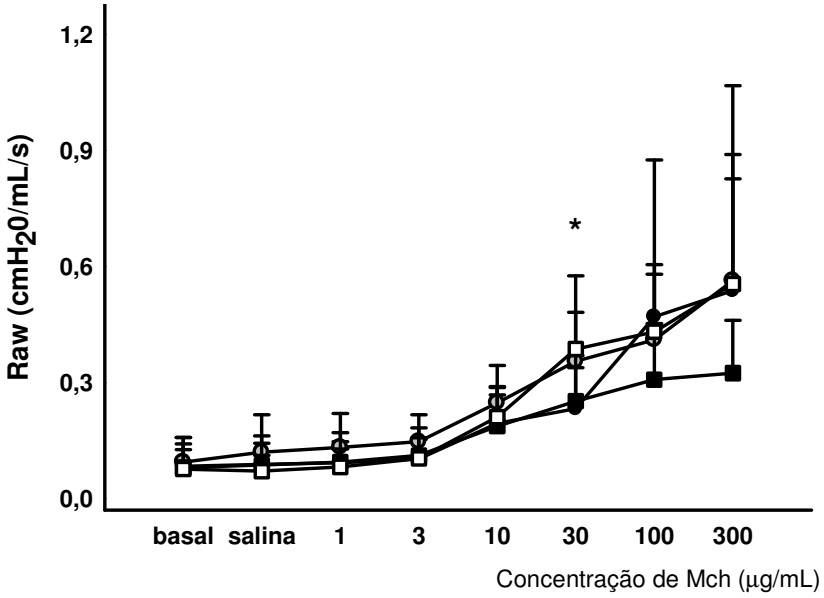
Legenda: Avaliação da capacidade física e níveis de Imunoglobulinas. Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão (DP). O tempo do teste físico foi avaliado em minutos e a titulação de Imunoglobulinas no logaritmo da sua quantificação. C= animais não sensibilizados e não treinados; TF = animais não sensibilizados e treinados; OVA = animais sensibilizados e não-treinados; OVA+TF = animais sensibilizados e treinados; IgE e IgG1=respectivamente, imunoglobulinas E e G1; *p<0,01 quando comparado com os animais não treinados e com os valores iniciais; **p<0,001 comparado os animais não sensibilizados.

Os grupos OVA e OVA+TF apresentaram um aumento dos níveis de óxido nítrico exalado (NOex) quando comparado com os animais dos grupos C e TF (Figura 2; p<0,001). Por outro lado, o treinamento físico aeróbio não modificou os níveis de NOex tanto nos animais sensibilizados quanto nos não sensibilizados

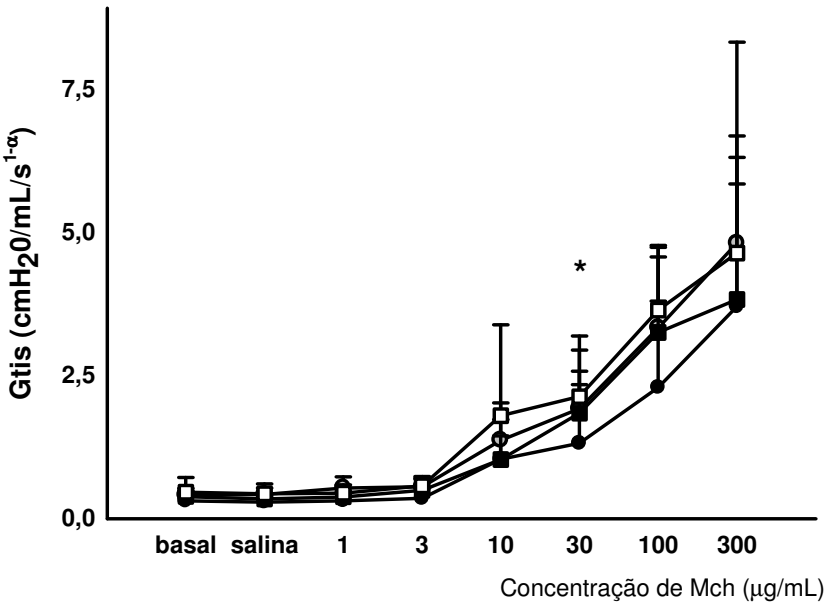


Legenda: Níveis de NOex. Os dados estão expressos em média ± DP. Os grupos estão descritos na Tabela 1; *p<0,001 quando comparado com os grupos não sensibilizados; ppb=partes por bilhão.

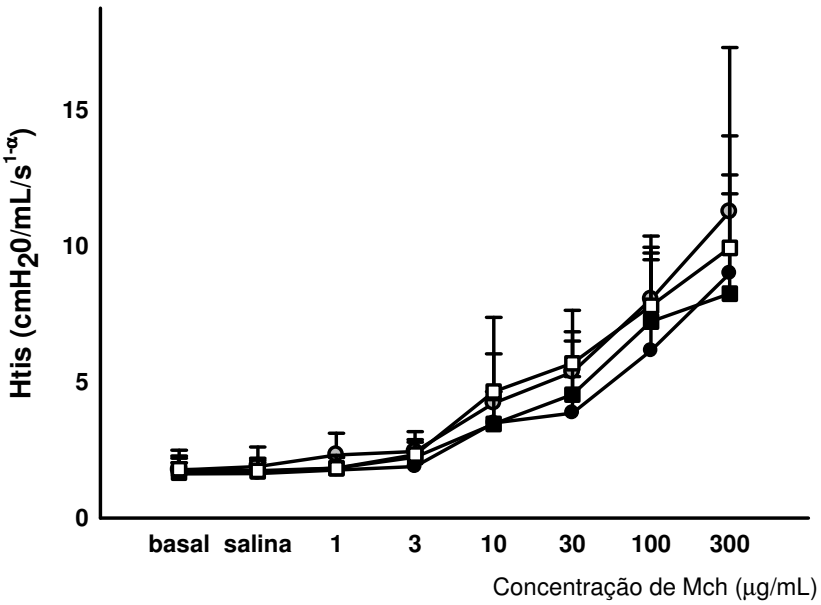
A hiperresponsividade brônquica foi avaliada através da curva dose-resposta à metacolina (Mch) e verificou-se que houve uma pequena diferença somente na resistência das vias aéreas (Raw) e do tecido (Gtis) na dose de 30 µg/mL (p<0,05; Figura 3 e 4, respectivamente). Por outro lado, não foi verificada diferença entre os grupos na avaliação da elastância do tecido (Htis) (Figura 5).



Legenda: Avaliação da hiperresponsividade das vias aéreas a doses crescentes de Mch em cobaias. Os dados estão expressos em média ± DP. Os grupos estão descritos na Tabela 1; (-●-) grupo C; (-○-) grupo TF; (-■-) grupo OVA; (-□-) grupo OVA+TF. Raw=resistência das vias aéreas.

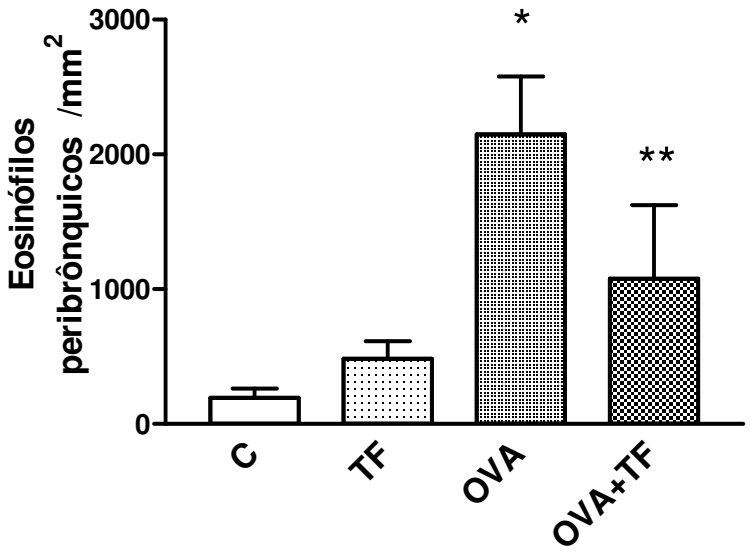


Legenda: Avaliação da hiperresponsividade do tecido pulmonar em cobaias. Os dados estão expressos em média ± DP. Os grupos estão descritos na Tabela 1; (-●-) C; (-○-) TF; (-■-)OVA; (-□-)OVA+TF. Gtis=resistência do tecido. *p<0,05 quando comparado com o grupo C



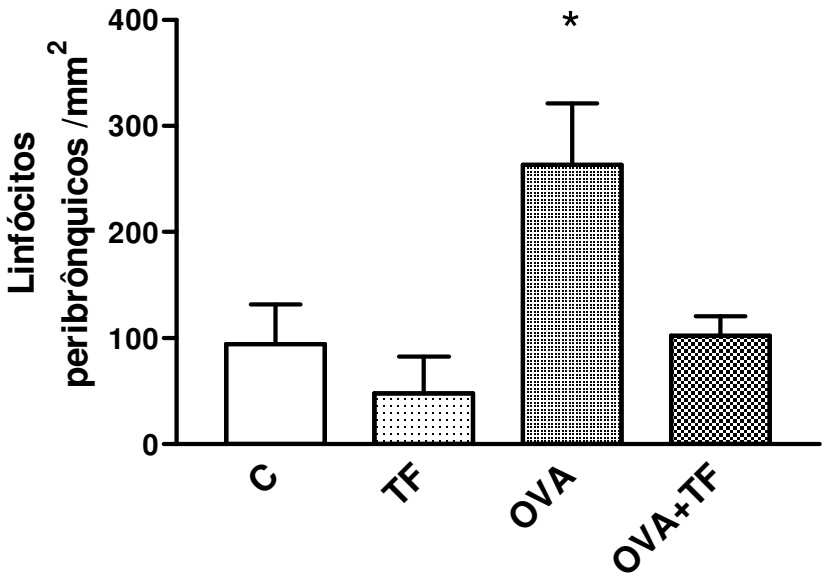
Legenda: Avaliação da hiperresponsividade da elastância pulmonar em cobaias. Os dados estão expressos em média ± DP. Os grupos estão descritos na Tabela 1; (⊣●⊢) C; (⊣○⊢) TF; (⊣■⊢)OVA; (⊣□⊢)OVA+TF. Htis= elastância do tecido.

A sensibilização à OVA aumentou o número de eosinófilos na região peribrônquica do grupo OVA quando comparados com os grupos que não foram sensibilizados (C e TF) (Figura 6; p<0,001). Por outro lado, o treinamento físico nos animais sensibilizados (grupo OVA+TF) reduziu o número de eosinófilos para a região peribrônquica quando comparado com o grupo OVA (p<0,01).



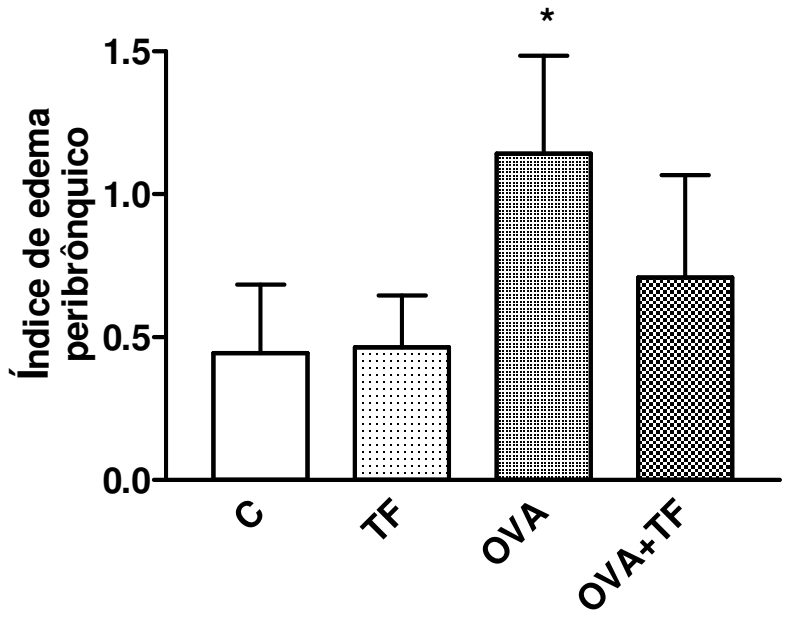
Legenda: Número de eosinófilos na região peribrônquica. Os dados estão expressos em média ± DP. Os grupos estão descritos na Tabela 1. *p<0,001 quando comparado com os grupos demais grupos; **p<0,01 quando comparado com os grupos OVA.

De maneira similar, a sensibilização aumentou o número de linfócitos na região peribrônquica dos animais do grupo OVA quando comparado com os grupos não sensibilizados (Figura 7; p<0,001) e o treinamento físico nos animais sensibilizados (grupo OVA+TF) inibiu a migração dessas células. Não houve diferença quando comparados com os grupos C; TF e OVA+TF (Figura 7) (p>0,05).



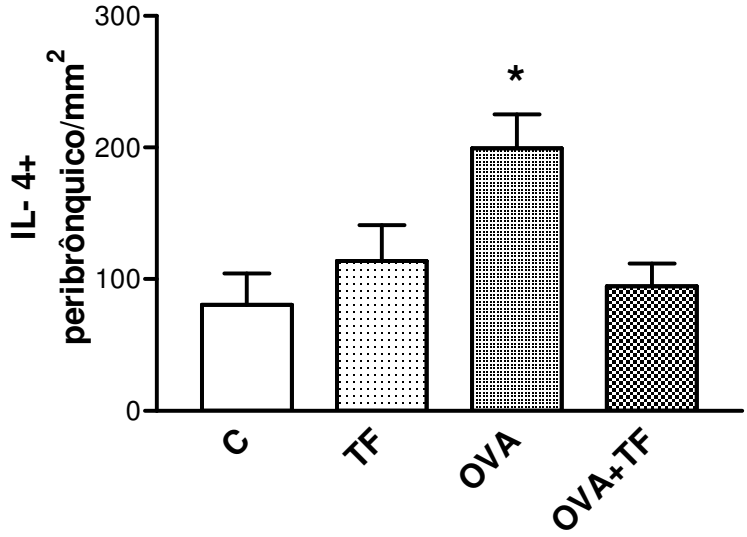
Legenda: Número de linfócitos na região peribrônquica. Os dados estão expressos em média ± DP. Os grupos estão descritos na Tabela 1; *p<0,001 quando comparado com os demais grupos.

A sensibilização à OVA ocasionou um edema na região peribrônquica quando comparado com os grupos C e TF (Figura 8; $p<0,05$). Por outro lado, o treinamento físico aeróbio nos animais sensibilizados reduziu o edema induzido pela sensibilização e os valores obtidos foram similares aos dos grupos não sensibilizados.

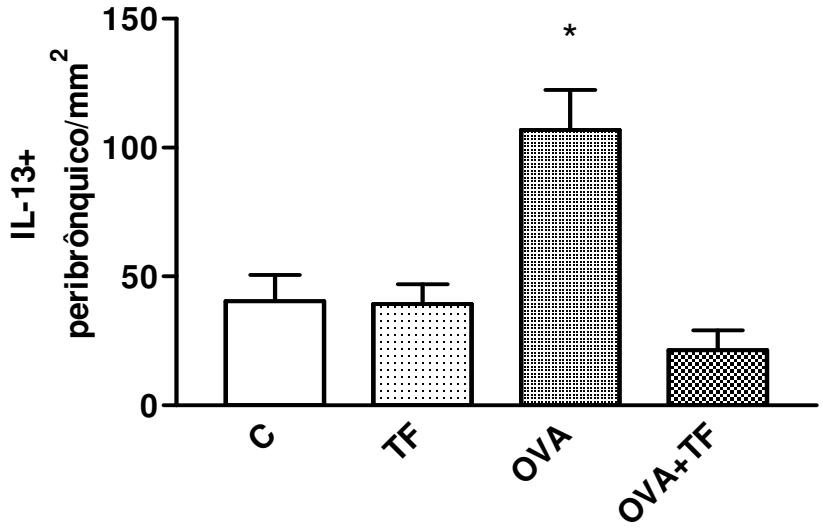


Legenda: Avaliação do índice de edema na região peribrônquica. Os dados estão expressos em média ± DP. Os grupos estão descritos na Tabela 1. *p<0,01 quando comparado com os demais grupos.

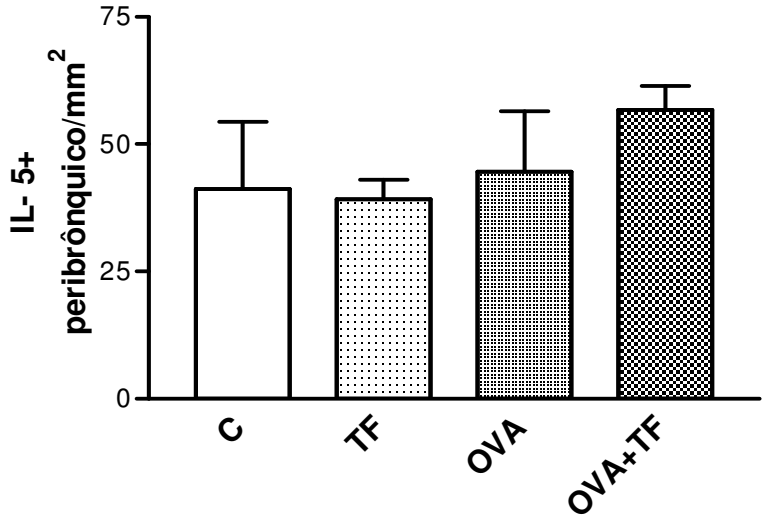
A expressão das interleucina-4 e -13, respectivamente IL-4 e IL-13, foi maior na região peribrônquica do grupo OVA quando comparado com os grupos não sensibilizados (C e TF) (Figuras 9 e 10; p<0,001). Por outro lado, os animais sensibilizados à OVA e submetidos ao treinamento físico apresentaram uma redução da expressão de IL-4 e IL-13. Porém, a expressão de IL-5 (Figura 11) não foi modificada nem com a sensibilização à OVA nem com o treinamento físico (p>0,05).



Legenda: Densidade de células positivas IL-4 na região peribrônquica. Os dados estão expressos em média ± DP. Os grupos estão descritos na Tabela 1.*p<0,001 quando comparado com os demais grupos.

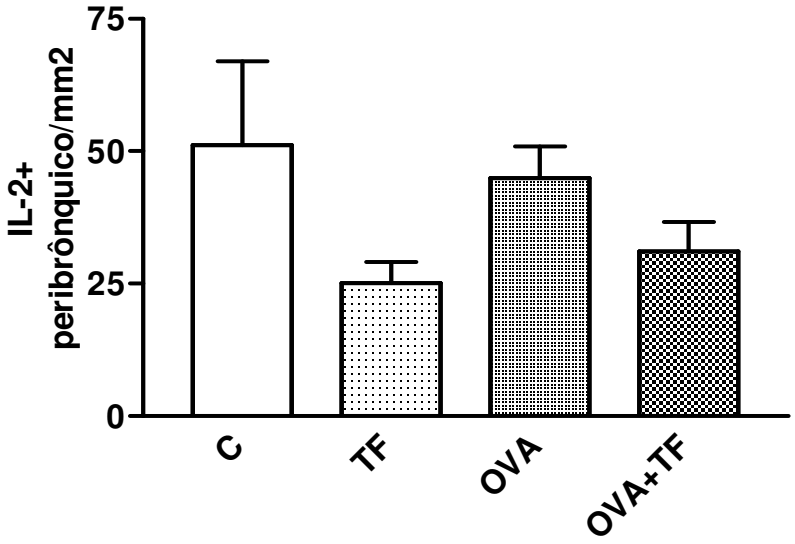


Legenda: Densidade de células positivas IL-13 na região peribrônquica. Os dados estão expressos em média ± DP. Os grupos estão descritos na Tabela 1.*p<0,001 quando comparado com os demais grupos.

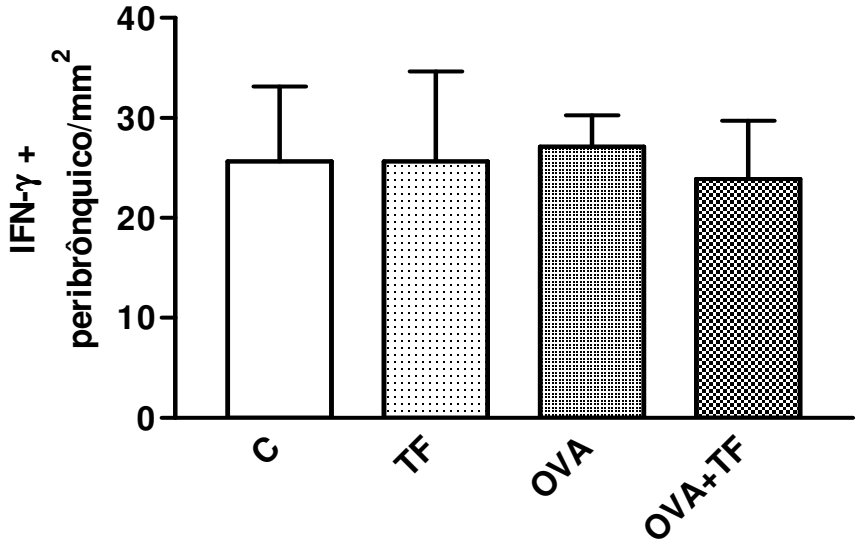


Legenda: Densidade de células positivas IL-5 na região peribrônquica. Os dados estão expressos em média ± DP. Os grupos estão descritos na Tabela 1.

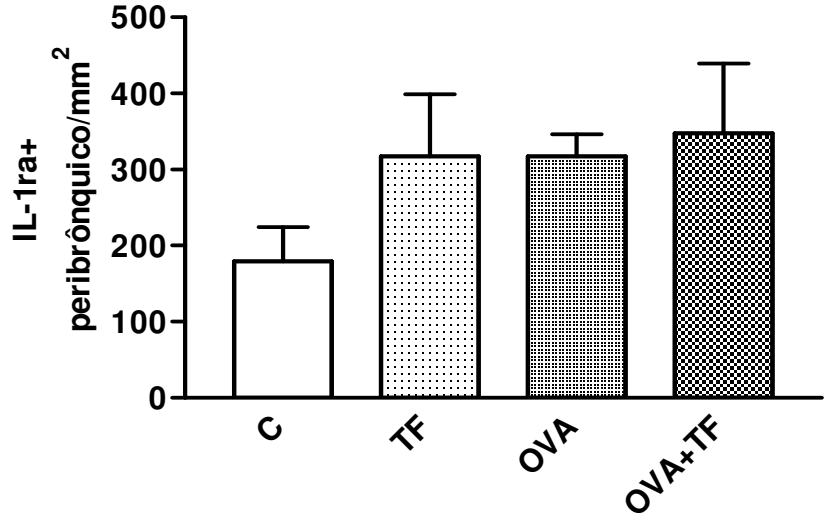
A sensibilização à OVA e o treinamento físico não modificaram a expressão das citocinas Th1 (IL-2 e interferon-gamma (IFN-γ)) e regulatórias (IL-1ra e IL-10) na região peribrônquica (respectivamente, Figuras 12 a 15).



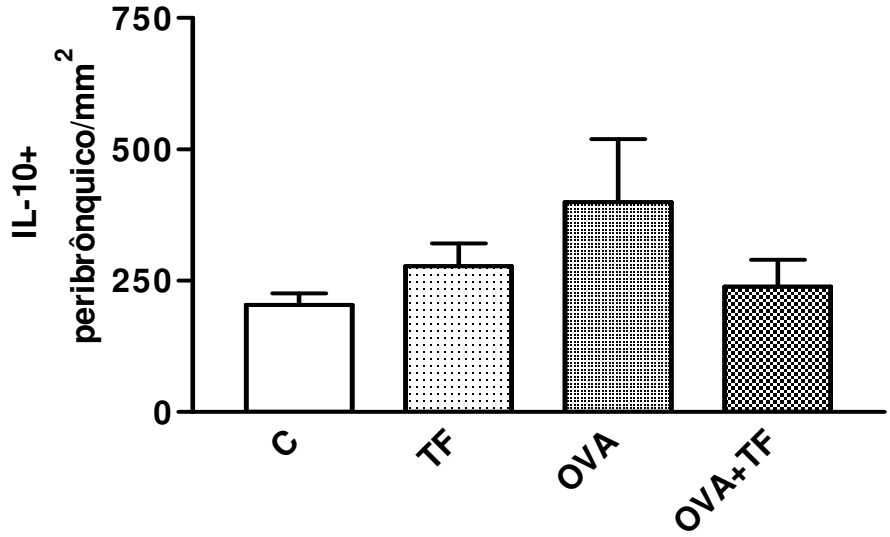
Legenda: Densidade de células positivas IL-2 na região peribrônquica. Os dados estão expressos em média ± DP. Os grupos estão descritos na Tabela 1.



Legenda: Densidade de células positivas IFN-γ na região peribrônquica. Os dados estão expressos em média ± DP. Os grupos estão descritos na Tabela 1.

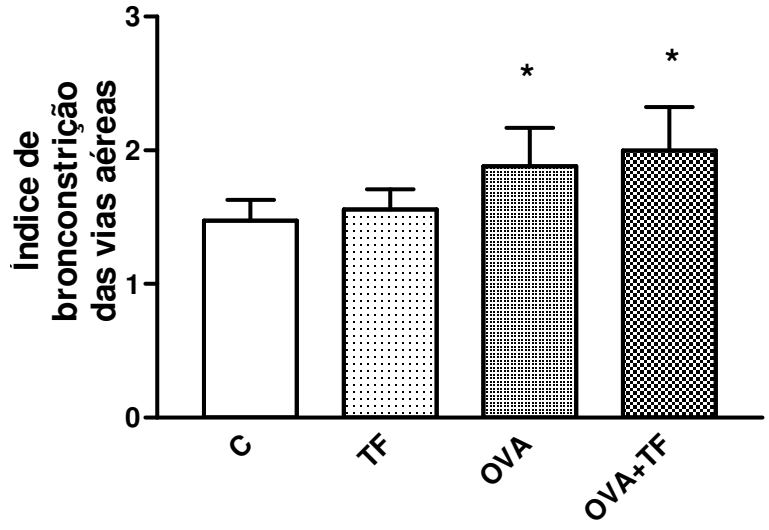


Legenda: Densidade de células positivas IL-1-ra na região peribrônquica. Os dados estão expressos em média ± DP. Os grupos estão descritos na Tabela 1.



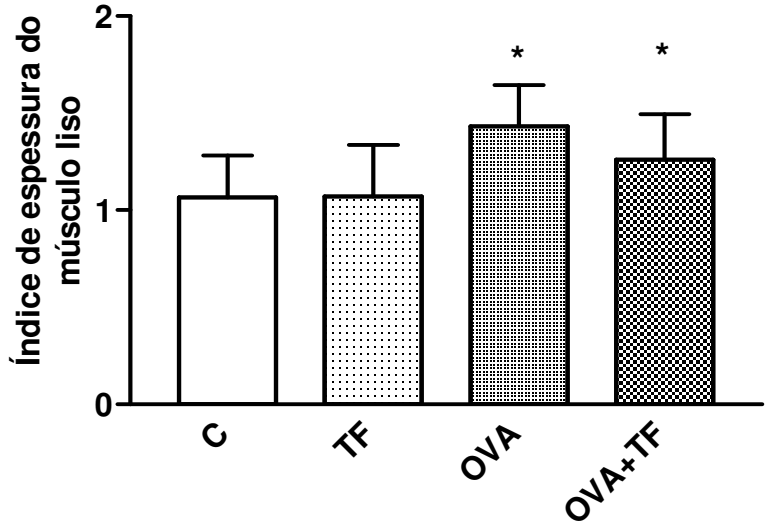
Legenda: Densidade de células positivas IL-10 na região peribrônquica. Os dados estão expressos em média ± DP. Os grupos estão descritos na Tabela 1.

Os animais sensibilizados (grupo OVA e OVA+TF) apresentaram um aumento no índice de broncoconstrição das vias aéreas quando comparado com os animais dos grupos C e TF (Figura 16; *p<0,05). O treinamento físico não modificou a broncoconstrição induzida pela sensibilização.



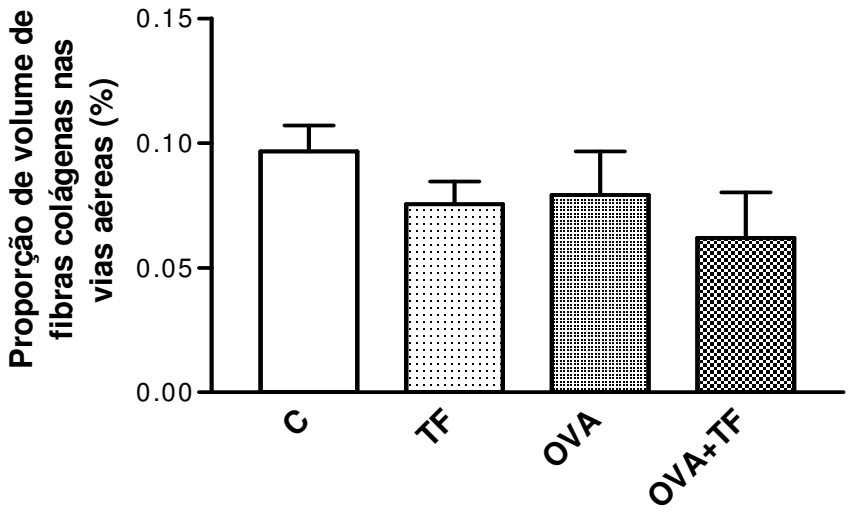
Legenda: Avaliação do índice de broncoconstrição das vias aéreas. Os dados estão expressos em média ± DP. Os grupos estão descritos na Tabela 1; *p<0,05 quando comparado com os grupos C e TF.

De maneira similar, a exposição à OVA ocasionou um aumento na espessura do músculo liso nos grupos sensibilizados (OVA e OVA+TF) quando comparado com os animais dos grupos não sensibilizados (C e TF) (Figura 17; $p<0,05$). Porém, o treinamento físico não modificou as alterações do músculo liso induzidas pela sensibilização à OVA.

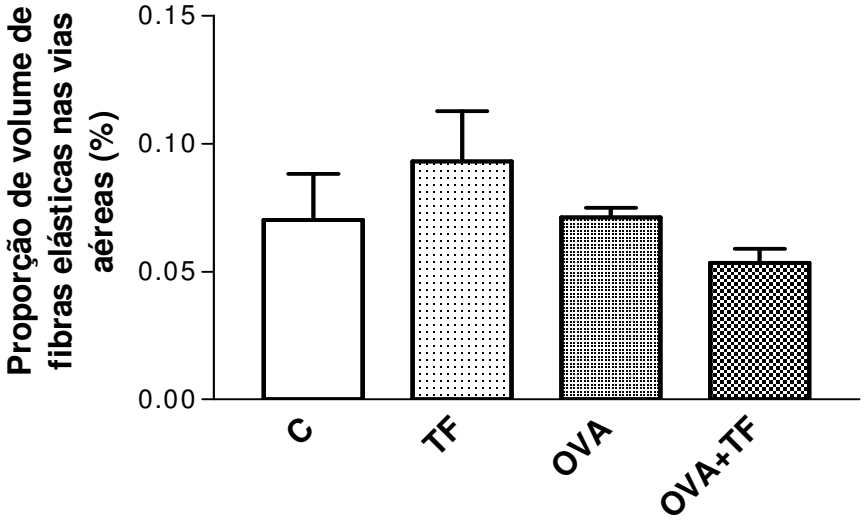


Legenda: Índice de espessura do músculo liso das vias aéreas. Os dados estão expressos em média ± DP. Os grupos estão descritos na Tabela 1. *p<0,05 quando comparados aos grupos C e TF.

O remodelamento das vias aéreas também foi avaliado pela proporção de volume de fibras colágenas e elásticas na região peribrônquica. Tanto a sensibilização à OVA como o treinamento físico não alteraram os níveis de fibras colágenas e elásticas (respectivamente, Figuras 18 e 19).

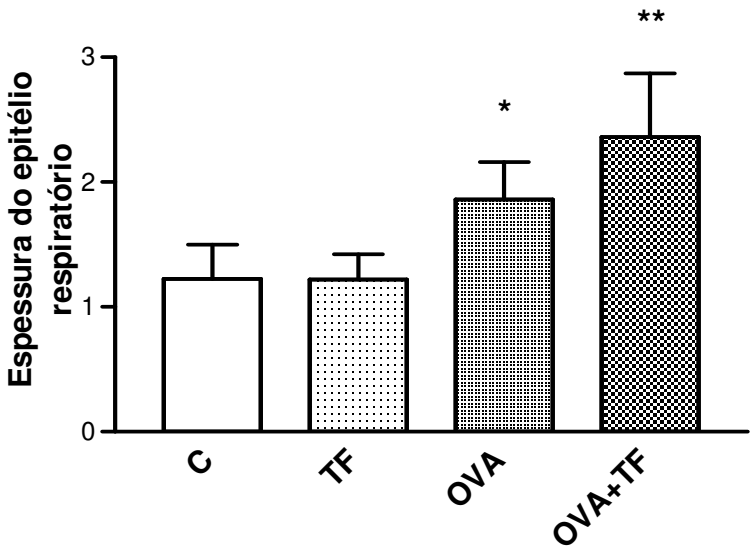


Legenda: Volume de proporção de fibras colágenas nas vias aéreas. Os dados estão expressos em média ± DP. Os grupos estão descritos na Tabela 1.



Legenda: Volume de proporção de fibras elásticas nas vias aéreas. Os dados estão expressos em média ± DP. Os grupos estão descritos na Tabela 1.

Os animais sensibilizados à OVA (grupos OVA e OVA+TF) apresentaram um aumento da espessura do epitélio respiratório quando comparado com os grupos não sensibilizados (grupo C e TF) (Figura 20; p<0,01). Além disto, verificou-se que os animais do grupo OVA+TF tiveram um aumento ainda maior na espessura do epitélio quando comparado com o grupo OVA (p<0,05).



Legenda: Quantificação da espessura do epitélio respiratório. Os grupos estão descritos na Tabela 1. Os dados estão expressos em média ± DP. *p<0,01 quando comparado com os grupos C e TF; **p<0,01 quando comparado ao grupo OVA.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostram que o treinamento físico aeróbio foi eficaz em inibir a infiltração de eosinófilos e linfócitos, a expressão de citocinas Th2 (IL-4 e IL-13), além de aumentor a espessura do epitélio brônquico induzidos pela sensibilização à ovalbumina (OVA). No entanto, essa redução na migração de células não refletiu em alterações do remodelamento brônquico, na expressão de citocinas Th1 (IL-2 e IFNγ) e na hiperresponsividade brônquica.

Os benefícios do exercício físico têm sido demonstrados através de vários estudos clínicos (Lavier & Milani 2000; Carvalho et al 2005; Edwards et al 2007; Fanelli et al., 2007), mas ainda se desconhece os mecanismos pelos quais ele ocasiona a melhora clínica de pacientes asmáticos. Existem evidências de que o paciente asmático submetido ao exercício físico apresenta uma melhora da capacidade ventilatória e redução dos sintomas relacionados com a asma (Ram et al, 2009; Welsh et al, 2004). Neste sentido, uma revisão sistemática da literatura sugere que o treinamento físico melhora a capacidade aeróbia e diminui a demanda ventilatória do exercício em pacientes com asma moderada além de aumentar a capacidade aeróbia máxima e submáxima (Ram et al, 2009). Neder et al (1999) mostraram que crianças asmáticas submetidas ao treinamento físico

apresentam uma redução no consumo de broncodilatadores de longa duração sugerindo que a melhora da capacidade aeróbia pode ocasionar uma melhora clínica dos pacientes. Além disto, Fanelli et al., (2007) mostraram que crianças asmáticas submetidas ao treinamento físico reduzem o uso de corticóide mesmo quando prescrito de maneira "cega" pelos médicos (Fanelli et al, 2007). Outro trabalho recente sugere que adultos com asma moderada-grave submetidos a 12 semanas de treinamento físico aeróbio de intensidade moderada apresentaram menores níveis de óxido nítrico exalado e redução dos dias livres de sintomas de asma (Gonçalves et al, 2008). Vistos conjuntamente, estes estudos sugerem que o treinamento aeróbio pode ter um efeito anti-inflamatório nos pacientes asmáticos embora a fisiopatologia para tais benefícios continue pouco compreendida.

Os eosinófilos são considerados marcadores para a inflamação alérgica das vias aéreas e a sua quantificação tem sido usada como guia no tratamento de pacientes asmáticos (Bacci et al, 2002; Covar et al, 2004). No presente estudo, mostramos que o treinamento físico aeróbio reduziu o número de eosinófilos na região peribrônquica de animais sensibilizados. Estes resultados são similares aqueles previamente mostrados por Pastva et al., (2004) e Vieira et al., (2007) que estudaram o efeito do treinamento físico em camundongos sensibilizados. Tais resultados, somados aos nossos, reforçam a idéia de que o exercício pode reduzir a inflamação pulmonar alérgica crônica independente da espécie animal. Além disto, o nosso estudo

deu um passo a mais ao verificar também uma redução no número de linfócitos infiltrados nas vias aéreas.

O efeito do treinamento físico na migração de linfócitos é pouco estudado (Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000). Existem evidências sugerindo que o exercício físico realizado agudamente pode diminuir a migração de linfócitos em sujeitos saudáveis (Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000). Lancaster et al., (2004) mostraram que o exercício físico realizado agudamente pode modificar a expressão de citocinas pelos linfócitos, mais explicitamente aumentando a expressão do perfil Th1 enquanto que as citocinas do perfil Th2 permanecem inalteradas. Jankord & Jemiolo (2004) sugeriram que o treinamento físico aeróbio de intensidades moderada ou alta podem modular o processo inflamatório de produção das citocinas pelos linfócitos.

As citocinas Th2 estão presentes nas vias aéreas de pacientes asmáticos assim como de animais de sensibilizados (Larché et al, 2003) e parecem ter um papel fundamental no desenvolvimento da asma. Por exemplo, (i) a eliminação das células Th2 suprime a imunidade alérgica (Gavett et al, 1994); e, (ii) a transferência de células Th2 induz a uma asma alérgica "passiva" em animais *naive* (Epstein, 2006). Existem evidências sugerindo que as respostas Th1 e Th2 são moduladas através de um efeito de *feedback* negativo (Strachan, 1989). Baseado nisto, a nossa hipótese era de que o exercício aeróbio poderia reduzir a inflamação alérgica crônica melhorando a resposta Th1. No entanto, em nosso modelo experimental a expressão das citocinas Th1 (IL-2 e IFN-γ) se manteve inalterada tanto ao

estímulo da OVA quanto ao exercício aeróbio, sugerindo que, neste modelo experimental, os efeitos anti-inflamatórios do exercício não são decorrentes de alterações na resposta Th1.

As citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) são produzidas em situações muito específicas (Ngoc et al, 2005) e existem evidências de que a produção destas citocinas ocorre de maneira seletiva. Por exemplo, pacientes com asma atópica ou com bronquite eosinofílica tem um aumento específico na expressão de IL-5 (Doi et al, 1994) sugerindo seu papel na regulação da migração de eosinófilos (Ray et al, 1999). A IL-4, por sua vez, induz e sustenta a diferenciação das células *naive* Th0 em Th2 e regula positivamente a adesão de células endoteliais essenciais para a infiltração eosinofílica nos tecidos (Swain et al 1990; Schleimer et al,1992) além de aumentar a expressão de IgE e IgG1 (Bergstedt-Lindqvist et al, 1988). Por último, a expressão de IL-13 induz a inflamação alérgica de vias aéreas, hipersecreção de muco, fibrose subepitelial, eosinofilia e produção de eotaxina (Zhu et al, 1999). Em nosso estudo, a sensibilização a OVA induziu a um aumento em IL-4 e IL-13, mas não alterou a expressão de IL-5. Existem apenas 2 estudos na literatura que avaliaram o efeito do treinamento físico na inflamação alérgica das vias aéreas e ambos mostraram que o exercício físico reduz IL-4 e IL-5 (Pastva et al, 2004; Vieira et al, 2007), porém nenhum deles avaliou a expressão de IL-13. Nossos resultados referentes à IL-4 estão de acordo com aqueles previamente encontrados e reforça a idéia de que o exercício físico aeróbio pode ter um efeito anti-inflamatório na resposta Th2, independente da espécie animal.

Embora, neste momento não tenhamos subsídios para explicar o porque IL-5 não está reduzido em nosso estudo, uma possível justificativa é que a diferença no controle da migração celular, principalmente de eosinófilos, pode ser específica para esta espécie. Entretanto, independente disto, os nossos resultados reforçam a hipótese de que o treinamento físico reduz a inflamação pulmonar alérgica possivelmente por um efeito direto na resposta Th2.

Adicionalmente à resposta imune, outros mediadores inflamatórios têm sido envolvidos na inflamação pulmonar alérgica tais como os leucotrienos e prostaglandinas (Robinson & Holgate, 1990), neuropeptídeos (Choi & Kwon, 1998), e o óxido nítrico (NO) (Hamid et al., 1993). O NO é liberado nos terminais nervosos, epitélio brônquico e células inflamatórias e tem um efeito broncodilatador em sujeitos com asma persistente leve assim como em cobaias submetidas à hiperpnéia (Suman & Beck, 2002; Pennachioni et al., 2009). Além disso, os níveis de NOex estão aumentados em pacientes asmáticos quando comparados com não asmáticos sugerindo que este mediador pode ter um papel marcador na inflamação das vias aéreas de asmáticos (Prieto et al, 2002), porém seu efeito é pouco compreendido. Gouw et al., (2001) e Suman & Beck (2002) sugeriram que a síntese endógena de NO não afeta a resposta das vias aéreas ao exercício em sujeitos saudáveis mas a sua inibição pode atenuar ligeiramente a broncoconstrição induzida pelo exercício (Gouw et al., 2001; Suman et al., 2002). Recentemente, Gonçalves et al., (2008) mostraram que pacientes asmáticos submetidos a um protocolo de exercício aeróbio apresentaram

uma redução nos níveis de óxido nítrico exalado (NOex). No entanto, em nosso estudo, verificamos que nem a sensibilização à OVA nem o treinamento físico alteraram os níveis de NOex, sugerindo que tal mecanismo não está envolvido no processo de inflamação de via aérea neste modelo animal.

A inflamação alérgica crônica das vias aéreas pode resultar num processo de destruição e reparo inadequado levando a um desequilíbrio e resultando no processo que chamamos de remodelamento das vias aéreas (Irvin & Wenzel, 1995). Este remodelamento leva à descamação do epitélio, deposição de fibras colágenas e elásticas na membrana basal subepitelial, aumento na vascularização, hipertrofia e hiperplasia da musculatura lisa peribrônquica (Larché et al, 2003). Nossos resultados mostram que a exposição à OVA induz a um aumento na musculatura lisa das vias aéreas e que o treinamento físico não modifica estas alterações. Interessante notar que, apesar da sensibilização à OVA aumentar a musculatura lisa no nosso modelo experimental, ela não alterou a responsividade brônquica. Estes resultados sugerem que, embora o treinamento físico possa reduzir a inflamação na via aérea isto, possivelmente, não está diretamente relacionado com o remodelamento e hiperresponsividade brônquica.

Os nossos resultados mostram ainda que o epitélio brônquico apresentou alterações (aumento de espessura) após a inflamação pulmonar alérgica crônica. Este efeito foi potencializado em animais sensibilizados submetidos ao treinamento físico. O epitélio pulmonar parece ter um efeito protetor para as vias aéreas. Por outro lado, estudos recentes sugerem que

o treinamento físico aumenta a descamação e a síntese de células epitelias sugerindo um possível remodelamento destas células em situações de treinamento (Chimenti et al, 2007). Assim, embora aparentemente inesperado, os nossos resultados são subsidiados por estudos sugerindo que o treinamento físico pode modificar o processo de *turnover* das células epiteliais.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo sugerem que o condicionamento físico de moderada intensidade diminui a migração de eosinófilos e linfócitos e a expressão de citocinas IL-4 e IL-13 sem, entretanto modificar o remodelamento aéreo e a hiperresponsividade brônquica.

Estes resultados reforçam a importância do condicionamento físico em pacientes asmáticos e sugerem um possível papel anti-inflamatório na asma. Porém, a transposição dos resultados obtidos neste modelo experimental para indivíduos com asma tem que ser visto com cautela e sugere-se a necessidade de mais estudos avaliando o efeito anti-inflamatório do treinamento físico em pacientes asmáticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alving, K.; Weitzberg, E.; Lundberg, J.M. Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. *Eur Respir J* 1993; 6: 1368-70.

Ashutosh, K. Nitric oxide and asthma: a review. *Curr Opin Pulm Med* 2000;6: 21-5.

Bacci E, Cianchetti S, Carnevali S, et al. Induced sputum is a reproducible method to assess airway inflammation in asthma. *Mediators Inflamm* 2002; 11:293–8.

Bates, J.T.; Gomes, R.F.M.; Shen, X.; Ramchandani, R.; Tepper; R.S. Comparative respiratory system mechanics in rodents. *J Appl Physiol* 2000; 89:809-916.

Bergstedt-Lindqvist S, Moon HB, Persson U, Heusser C, Severinson E. interleukin-4 instructs uncommitted B Lymphocytes to switch to IgG1 and IgE. *Eur J Immunol* 1988;18:1073-7.

Bharadwaj A.S., Bewtra, A.K., Agrawal, D.K. Dendritic cells in allergy airway inflamation. *Can J Physiol Pharmacol* 2007; 85: 686-99.

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; 87:149–54.

Bruijnzeel PLB. Eosinophil tissue mobilization in allergic disorders. *Ann NY Acad Sci* 1994; 725:259–67.

Calish V, Vaz CAC. Imunologia. São Paulo: Revinter, 2001.

Carlson M, Peterson C, Venge P. The influence of IL-3, IL-5 and GMCSF on normal human eosinophil and neutrophil C3b-induced degranulation. *Allergy* 1993; 48:437–42.

Carvalho MR, Sato EI, Tebexreni AS, Heidecher RT, Schenkman S, Neto TL. *Arthritis Rheum* 2005; 53:838-44.

Chimenti L, Morici G, Paternò A, Bonanno A, Siena L, Licciardi A, Veca M, Guccione W, Macaluso F, Bonsignore G, Bonsignore MR. Endurance training damages small airway epithelium in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 442-9.

Choi DC, Kwon OJ. Neuropeptides and asthma. *Curr Opin Pulm Med* 1998; 4:16-24.
Cochrane LM, Clark CJ. Benefits and problems of a physical training programme for asthmatic patients. *Thorax* 1990; 45:345-51.

Cohn L, Homer RJ, Niu N, Bottomly K. T helper 1 cells and interferon-gamma regulate allergic airway inflammation and mucus production. *J Exp Med* 1999; 190:1309-18.

Council, F.P.; Varray, A.; Matecki, S.; Beurey, A.; Marchal, P.; Voisin, M.; Prefaut, C. Training of aerobic and anaerobic fitness in children with asthma. *J Pediatr* 2003; 142:179-84.

Covar RA, Spahn JD, Martin RI, Silkoff PE, Sundstrom DA, Murphy J, Szefler SI. Safety and application of induced sputum analysis in childhos asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:575-82.

Doi SV, Gemou-Engesaeth AB, Kay AB, Corrigan CJ. Polymerase chain reaction quantification of cytokines messenger RNA expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with acute exacerbation of asthma: effects of glicocorticoid therapy. Clin Exp Allergy 1994;24:854-67.

Dupont, L.J.; Rochette, F.; Demedts, M.G.; Verlenden, G.M. Exhaled nitric oxide correlates with airway hyperresponsiveness in steroid-naïve patients with mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:894-8.

Edwards KM, Ziegler MG, Mills PJ. The potencial ainti-inflamatory benefits of improving physical fitness in hypertension. *J* hypertens 2007; 25:1533-42.

Emtner M.; Herala M.; Stalenheim G. High-intensity physical training in adults with asthma. *Chest* 1996; 109:323-30.

Epstein MM. Targeting memory Th2 cells for the treatment of allergic asthma. *Phar Therap* 2006;109:107-36.

Fanelli A, Cabral ALB, Neder JA, Martins MA, Carvalho CRF. Exercise training on disease control and quality of life in asthmatics children. *Med Sci Sports Exerc* 2007; 39:1481-6.

Ferreira MAR. Inflammation in allergic asthma: initiating events, immunological response and risk factors. *Respirology* 2004; 9:16-24.

Fireman, P. Symposium: Understanding asthma pathophysiology. *Allergy and Asthma Proc* 2003; 24: 79-83.

Garcia, MLB; Paiva, PSO; Dolhnikoff, M; Jancar, S; Saldiva, PHN; Martins, MA. Airway and pulmonary tissue responses to Platelet-Actrivating Factor in rats. *Exp Lung Res* 1994; 20: 169-84.

Gaston, B.; Reilly, J.; Drazen, J.M.; Fackler, J. Ramdev, P.; Arnelle, D.; Mullins, M.E.; Sugarbaker, D.J.; Chee, C.; Singel, D.J.; et al. Endogenous nitrogen oxides and bronchodilatodor s-nitrosothiols in human airway. *Proc natl Acad Sci* 1993; 90: 10957-61.

Gava, N. S.; A. S. Véra-Silva; C. E. Negrão; E. M. Krieger. Low-intensity exercise training attenuates cardiac beta-adrenergic tone during exercise in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1995; 26:1129 – 33.

Gavett, S. H., O'Hearn, D. J., Li, X., Huang, S. K., Finkelman, F. D., & Wills-Karp, M. Interleukin 12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness, inflammation, and Th2 cytokine expression in mice. *J Exp Med* 1995; 182: 1527– 36.
GINA – Global Initiative for Asthma [on line]. Ed. 2006. Reino Unido. Disponível em:http://www.ginasthma.org.

Gonçalves RC, Nunes MPT, Cukier A, Stelmach R, Martins MA, Carvalho CRF. Effects of an aerobic physical training program on psychosocial characteristics quality-of-life, symptoms and exhaled nitric oxide in individuals with moderate or severe persistent asthma. *Rev Bras Fisioter* 2008; 12:127-35.

Gouw, H.W.F.M.; Marshall-Partridge, S.J.; Van der Veen, H.; Van den Aardweg, G.J.; Hiemstra, P.S.; Sterk, P.J. Role of nitric oxide in the airwaiy response to exercise in healthy and asthmatic subjects. *J Appl Physiol* 2001; 90: 586-92.

Hamelmann E., Tadeda K., Oshiba A., Gelfand E.W. Role of IgE in the development of allerguc airway inflammation and airway hyperresponsiveness – a murine model. *Allergy* 1999; 54: 297-305.

Hamid, Q.; Springal, D.R. Riveros-Moreno, V.;Chavez, P.; Howzrth, P.; Redington, A.; Bousquet, J.; Godard, P.; Holgate, S.; Polak, J.M.; induction of nitric oxide synthase in asthma. *Lancet* 1993; 342:1510-3.

Hansen G, Berry G, DeKruyff RH, Umetsu DT. Allergen-specific Th1 fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *J Clin Invest* 1999; 103:175-83.

Hantos, Z.; Daròczy, B.; Suzi, B.; nagy, S.; Fredberg, J.J. Input impedance and peripheral inhomogenety of dog lungs. *J Appl Physiol* 1992; 72:168-78.

Hogman, M.; Frostell, C.G.; Hedenstrom, H.; Hedenstierna, G. Inhalation of nitric oxide modulates adult human bronchial tone. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 1474-8.

Huang, S.W.; Veiga, R.; Sila, U et al., The effect of swimmming in asthmatic children-participants in a swimming program in the City of Baltimore. *J Asthma* 1989; 26:117-21.

Huang TJ, MacAry PA, Eynott P, Moussavi A, Daniel KC, et al. Allergen-specific Th1 cells counteract efferent Th2 cell-dependent bronchial hyperresponsiveness and eosinophilic inflammation partly via IFN-gamma. *J Immunol* 2001; 166:204-17.

IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma. *J Bras Pneumol* 2006; 32 (Supl 7): S447-74.

Irvin CG, Wenzel S. Asthma: structure and function.*Chest* 1995; 107:S85–S86.

Iwamoto I, Nakajima H, Endo H, Yoshida S. Interferon-gamma regulates antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways by inhibiting the infiltration of CD4+ T cells. *J Exp Med* 1993; 177:573-76.

Jankord R, Jemiolo B. Influence of physical activity on serum IL-6 and IL-10 levels in healthy older men. *Med Sci Sports Exerc* 2004; 36:960-4.

Kharitonov, S.A.; Yates, D.; Robbins, R.A.; Logan-Sinclair, R.; Shinebourne, E.A.; Barnes, P.J. Increased nitric oxide in exhaled air in asthmatics patients. *Lancet* 1994; 343:133-5.

Lampinen M, Carlson M, Venge HP. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. *Allergy*. 2004; 59:793–805.

Lanças, T.; Kasahara, D.I.; Prado, C.M.; Tibério, I.F.L.C.; Martins, M.A.; Dolhnikoff, M. Comparison of early and late responses to antigen of sensitized guinea pigs parenchymal lung strips. *J Appl Physiol* 2006; 100:1610-6.

Lancaster GI, Halson SI, 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.

Larché M, Robinson DS, Kay AB. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:450-63.

Lavier CJ, Milani RV. Disparete effects of improving aerobic exercise capacity and quality of life after cardiac rehabilitation in young and elderly coronary patients. *J Cardiopulm Rehabil* 2000; 20: 235-40.

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. *Immunol* 1996; 87:155–61.

Lucas, S.R.; Platts-Mills, T.A.E. Physical activity and exercise in asthma: Relevance to etiology and treatment. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 928-34.

Ludwick S.; Jones T.; et al. Normalization of cardiorespiratory endurance in severely asthmatic children with asthma. *J Pediatr* 1985; 106:556-80.

Mauad, T.; Souza, A.S.L.; Saldiva, P.H.N.; Dolhnikoff, M. Remodelamento brônquico na asma. *J Pneumol* 2000; 26:91-8.

Mehta, S.; Boudreau,J.; Lilly,C.M.; Drazen,J.M. Endogenous pulmonary nitric oxide in the regulation of airway macrovascular leak. *Am J Physiol* 1998; 275:L961-8.

Morton, A.; Fitch, K.; Hahn, A. Physical activity and the asthmatic. *Phys Sports Med* 1981; 9:51-64.

Mota I, Perini A. A heat labile mercaptoethanol susceptible homocytotropic antibody in the guinea pig. *Life Sciences* 1970; 9:923-30.

Moyna, N. M.; Acker, G. R.; Fulton, J. R.; Weber, K.; Goss, F. L.; Robertson, R. J.; Tollerud, D. J.; Rabin, B. S. Lymphocyte function and cytokine production during incremental exercise in active and sedentary males and females. *Int J Sports Med* 1996;17: 585-91.

Neder J.A., Nery L.E., Silva A.C., et al. - Short term effects of aerobic training in the clinical manegement of moderate to severe asthma in children. *Thorax* 1999; 54: 202-6.

Ngoc L.P., Gold, DR, Tzianabos A.O., Weiss S.T., Céledón J.C. Cytokines, allergy and asthma. *Cur Opin in Allergy and Clin Immunol* 2005; 5: 161-6.
Packard K.A., Khan M.M. Effects oh histamine on Th1/Th2 cytokine balance. *Inter Immunopharm* 2003; 3: 909-20.

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

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; 172:4520-6.

Pedersen BK, Hoffman-Goetz L. Exercise and the immune system: regulation, integration and adaptation. *Physiol Rev* 2000; 80:1055-81.

Pennachioni P, Vieira RP, Arantes-Costa F, Lopes FDTQ, Martins MA, Carvalho CRF. Role of nitric oxide in hyperpnea-induced bronchoconstriction and airway microvascular permeability in guinea pigs. *Exp Lung Res* (Aceito para publicação), 2009.

Prieto L, Gutiérrez V, Uixera S. Exhaled Nitric Oxide and Bronchial Responsiveness to Adenosine 5'-Monophosphate in subjects with allergic rhinitis. *Chest* 2002; 121:1853-9.

Ram FSF, Robinson SM, Black PN, et al J. Physical training for asthma (Cochrane Review). *The Cochrane Library* 2009; Issue 1.

Randolph DA, Carruthers CJL, Szabo SJ, Murphy KM, Chaplin DD. Modulation of airway inflammation by passive transfer of allergen-specific Th1 and Th2 cells in a mouse model of asthma. *J Immunol* 1999; 162:2375-83.

Ray, D.W.; Hernandez, C.; Munoz, N.; Leff, A.R.; Solway, J.; Bronchoconstriction elicityed by isocapnic hyperpnea in guinea-pigs. *J Appl Physiol* 1988; 65: 934.

Ray A, Cohn L. Th2 cells and GATA-3 in asthma: new insights into the regulation of airway inflammation. *J Clin Invest* 1999; 104:985.

Reunald JC. New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol* 2001; 54: 577-89.

Robinson C, Holgate ST. The role of leukotrienes and prostaglandins in asthma: evidence from clinical investigations. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 1990; 20:209-16.

Rothenberg ME, Hogan SP. The Eosinophil. *Annu Rev Immunol*. 2006; 24:5.1–28.

Sakae, R. S.; Leme, A. S.; Dolhnikoff, M.; Pereira, P. M.; Warth, M. P. T. N.; Zin, W. A.; Saldiva, P. H. N.; Martins, M. A. Neonatal capsaicin treatment

decreases airway and pulmonary tissue resopnsiveness to methacoline in Wistar rats. Am J Physiol, 268: L23-L29, 1995.

Salter HH. On asthma: itá pathology and treatment. 1st ed. New York: William Woos & Company; 1882.

Satta, A. Exercise training in asthma. *J Sports Med Phys Fitness 2000*; 40: 277-83.

Schleimer RP, Sterbinsky SA, Kaiser J, Bickel CA, Klunk DA, Tomioka K, Newman W, Luscinskas FW, Gimbrone MA Jr, McIntyre BW, et al. IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium. Association with expression of VCAM-1. *J Immunol* 1992; 148:1086-92.

Simoes SM, dos Santos MA, da Silva Oliveira M, FontesES, 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; 35:602-11.

Stephens R, Randolph DA, Huang G, Holtzman MJ, Chaplin DD. Antigen-nonspecific recruitment of Th2 cells to the lung as a mechanism of viral infection-induced allergic asthma. *J Immunol* 2002; 169:5458-67.

Strachan, DPBMJ, Hayfever, hygiene, and household size. *Brit Med J* 1989; 299:1259-60.

Strunk, R.C.; Mascia, A.V.; Lipkowita, M.A.; et al. - Rehabilitation of a patient with asthma in the outpatient setting. *J Allergy Clin Immunol* 1991, 87: 601-11.

Suman OE, Beck KC. Role of airway endogenous nitric oxide on lung function during and after exercise in mild asthma. *J Appl Physiol* 2002; 93:1932-8.

Swain Sl, Weinberg AD, English M, Huston G. IL-4 directs the development of Th2-like helper/effectors. *J Immunol* 1990; 145:3796-806.

Tibério, I.F.L.C.; Turco, G.M.G.; Leick-Maldonado, E.A.; Sakae, R.S.; Paiva, P.S.O.; Warth, M.P.T.N.; Lapa e Silva J.R., Saldiva, P.H.N.; Martins, M.A. Effects of neurokinin depletion on airway inflamation induced by chronic antigen exposure. *Am J Resp Crit Care Med* 1997; 155:1739-47.

Varray, A.; Mercier, J.; Terral, C.; et al. Individualized aerobic and high intensity training for asthmatic children in na exercise read-adaptation program. *Chest* 199; 99: 579-86.

Vieira RP, Claudino RC, Duarte ACS, Santos ABG, Perini A, Faria-Neto HCC, Mauad T, Martins MA, Dolhnikoff M, Carvalho CRF. Aerobic exercise decrease chronic allergic lung inflammation and airway remodeling in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176:871-7.

Warth, MPTN; Maldonado, EAL; Fernezlian, SM; Leme, AS; Perini, A; Saldiva, PHN; Martins, MA. Neurokinin depletion attenuates pulmonary changes induced by antigen challenge in sensitized guinea pigs. *Am J Physiol* 1995; 268:L781-8.

Weinstein, A.G.; McKee, L.; Stapleford, J; et al. - An economic evaluation of short-term inpatient rehabilitation for children with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98: 264-73.

Welsh, L.; Roberts, R.G.D.; Kemp, J. G. Fitness and physical activity in children with asthma. *Sports Med* 2004;34(13): 861-70.

Wilber RL; Rundel KW; Szmedra L. Incidence of exercise-induced bronchospasm in Olympic winter sport athletes. *Med Sci Sports Exerc* 2000; 32:732-7.

Yates, D.H.; Kharitonov, S.A.; Robbions, F.A.; Thomas, P.S.; Barnes, P.J. Effects of a nitric oxide synthase inhibitor and glicocorticosteroid on exhaled nitric oxide. *Am J Resp Crit Care Med* 1995; 152: 892-6.

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.