



Serviço de Biblioteca e Documentação

Faculdade de Medicina

Universidade de São Paulo

Autorizo a divulgação desta Tese na
Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP

.....

São Paulo
2007

Nome completo – Tese (Doutorado) - SP - 2007

NOME COMPLETO

Efeitos do treinamento físico aeróbio sobre a inflamação pulmonar alérgica crônica em camundongos

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

Área de concentração: Patologia

Orientadora: Prof. Dra. Marisa Dolhnikoff
Co-orientador: Prof. Dr. Celso Ricardo Fernandes de
Carvalho

São Paulo
2007

Ficha Catalográfica

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Vieira, Rodolfo de Paula

Efeitos do treinamento físico aeróbio sobre a inflamação pulmonar alérgica crônica em camundongos / Rodolfo de Paula Vieira. -- São Paulo, 2007.

Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Patologia.

Área de concentração: Patologia.

Orientadora: Marisa Dolhnikoff.

Co-orientador: Celso Ricardo Fernandes de Carvalho

Descritores: 1.Asma 2.Exercício 3.Doenças respiratórias/reabilitação
4.Alergia e imunologia 5.Pulmão 6.Inflamação 7.Hiper-reatividade
brônquica 8.Colágeno 9.Camundongos

USP/FM/SBD-140/07

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha querida e amada esposa, Rosa Helena, que durante os cinco anos do nosso casamento tem me apoiado em todas as etapas de minha vida profissional.

AGRADECIMENTOS

Neste momento de minha vida, é muito importante dizer que chegar até aqui só foi possível com a ajuda de inúmeras pessoas maravilhosas, as quais eu faço questão de mencionar nestes agradecimentos:

Primeiramente agradeço à pessoa de meu Deus Elohim (Pai, Filho e Espírito Santo) por me abrir às portas para cursar o doutorado e pela forma maravilhosa como Ele sustentou minha vida, de minha esposa e filho durante esse período.

Agradeço a minha esposa por todo o carinho e cuidado especiais durante esses três anos de doutorado.

Ao meu filho Jonathan, de três anos de idade, por me alegrar todos os dias, quando chegava em casa após os árduos períodos de trabalho.

Aos meus pais, Vera (mãe), José (padrasto), Cláudio (pai), Margarida (madrasta), Neusa (sogra) e Júlio (sogro), por todo apoio espiritual, emocional e financeiro durante essa importante etapa de minha vida.

Ao Prof. Dr. José Maria Santarém, por me abrir às portas da Faculdade de Medicina da USP.

A minha orientadora, Profa. Dra. Marisa Dolhnikoff, por todo ensino e apoio intermináveis.

Ao meu co-orientador e amigo, Prof. Dr. Celso Carvalho, pelo ensino, apoio e amizade, em todos os momentos, mas principalmente nos momentos de dificuldades.

Ao Prof. Dr. Raymundo Soares de Azevedo, coordenador do Programa de Doutorado em Patologia, por acreditar em mim.

Aos Professores Doutores Milton de Arruda Martins e Paulo Hilário Nascimento Saldiva pelo suporte financeiro no desenvolvimento desse projeto.

As Professoras Doutoradas Élia Garcia Caldini, Elnara Márcia Negri e Thaís Mauad pela grande disposição em me ensinar.

A todas queridas técnicas do Laboratório de Histologia do Departamento de Patologia, pelo incansável apoio na confecção de milhares de lâminas.

A Ângela Santos, Maria Cristina e a todos do Laboratório de Imunohistoquímica do Departamento de Patologia, pelo incansável apoio na confecção de milhares de lâminas.

Às amigas, Renata Claudino, Anna Cecília, Vanessa Ferreira, Mariana Ignácio, Fernanda Crantes, Fernanda Lopes, Alessandra Choqueta, Nilza Regina, Rosana Aparecida, Cirlene Tavares, Liduvina Barros, Beatriz Saraiva e Francine Almeida pela amizade e grande apoio durante esses três anos.

Aos amados amigos, irmãos e intercessores, Marcelo Araújo e Adriana, Ruth Miacci, Bruno Frossard, Rubens Bordieri e Helena, Rodrigo Ferreira, Rodrigo Prego e Helen, Jane Cristina, Rosana Pedrosa, Jane Marques, Joel Martins e Ordalha, Eduardo Lalli e Regina, Ricardo Kenseler e Romariz, Ildelfonso Sousa e Marcia, Ricardo Augusto e Adriana, Ivo Siqueira e Cláudia, Ademir Santos, Josefa Modolo, Benedito Lemes e Cristina, Rivaldo Rodrigues e Marilda, Nilza Vieira e Vicente Lopes, Terezinha Vieira e João Luiz, por me carregarem através de suas orações durante esses anos.

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

“O temor do Senhor é o princípio (chavê) do conhecimento, mas os insensatos desprezam a sabedoria e a disciplina”.

Provérbios de Salomão 1:7.

“Meu filho, se você aceitar as minhas palavras e guardar no coração os meus mandamentos; se der ouvidos à sabedoria e inclinar o coração para o discernimento; se chamar por entendimento e por discernimento gritar bem alto; se procurar a sabedoria como se procura a prata e buscá-la como quem busca um tesouro escondido, então você entenderá o que é temer o Senhor e achará o conhecimento de Deus. Pois o Senhor é quem dá sabedoria, da sua boca procedem o conhecimento e o discernimento. Ele reserva a sensatez para o justo; como um escudo protege quem anda com integridade, pois guarda a vereda do justo e protege o caminho de seus fiéis.” *Provérbios de Salomão 2:1-8.*

“Confie no Senhor de todo o seu coração e não se apóie em seu próprio entendimento (sabedoria); reconheça o Senhor em todos os seus caminhos e Ele endireitará as suas veredas. Não seja sábio aos seus próprios olhos; tema o Senhor e aparta-te do mal”. *Provérbios de Salomão 3:5-8.*

SUMÁRIO

1 – Introdução	01
1.1 – Asma – Definição	02
1.2 – Asma – Epidemiologia	02
1.3 – Asma – Fisiopatologia	02
1.3.1 – Asma – Inflamação	03
1.3.2 – Asma – Remodelamento	07
1.3.3 – Asma – Responsividade Brônquica	09
1.4 – Atividade Física Aeróbia	11
1.4.1 – Atividade Física Aeróbia e Asma	11
1.4.2 – Atividade Física Aeróbia e Sistema Imune	12
2 – Objetivos	14
3 – Materiais e Métodos	16
3.1 – Animais	17
3.2 – Protocolo Experimental	17
3.2.1 – Grupos Experimentais	18
3.2.2 – Sensibilização dos Animais	18
3.2.3 – Treinamento e Teste Físico	19
3.3 – Avaliação da Responsividade Brônquica	20
3.4 – Coleta e Análise do Lavado Broncoalveolar	21
3.5 – Avaliação dos Títulos de IgE e IgG ₁	22
3.6 – Histoquímica e Imunohistoquímica	23
3.6.1 – Histoquímica	23
3.6.2 – Imunohistoquímica	24
3.7 – Análise Morfométrica dos Pulmões	25

3.7.1 – Inflamação Peribrônquica	26
3.7.2 – Remodelamento Brônquico	26
3.7.3 – Inflamação Perivascular e Edema Perivascular	27
3.7.4 – Remodelamento Vascular	27
3.7.5 – Inflamação do Parênquima Alveolar	28
3.7.6 – Remodelamento do Parênquima Alveolar	28
3.8 – Análise Estatística	29
4 – Resultados	30
5 – Discussão	73
6 – Conclusões	84
7 – Referências Bibliográficas	86
Anexos	
A – Aerobic Exercise Decreases Lung Inflammation and Airway Remodeling in Chronically Sensitized Mice.	
B – Aerobic Exercise Decreases Vascular and Parenchymal Inflammation and Remodeling in Chronically Sensitized Mice.	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Massa corporal dos animais	31
Figura 2 – Avaliação condicionamento físico	32
Figura 3 – Avaliação da responsividade brônquica dos animais	34
Figura 4 – Níveis de IgE específicos para OVA	35
Figura 5 – Níveis de IgG ₁ específicos para OVA	36
Figura 6 – Células totais no lavado broncoalveolar	37
Figura 7 – Eosinófilos no lavado broncoalveolar	38
Figura 8 – Neutrófilos no lavado broncoalveolar	39
Figura 9 – Células mononucleares no lavado broncoalveolar	40
Figura 10 – Densidade peribrônquica de células mononucleares	41
Figura 11 – Densidade peribrônquica de eosinófilos	42
Figura 12 – Densidade peribrônquica de células IL-4+	43
Figura 13 – Densidade peribrônquica de células IL-5+	44
Figura 14 – Densidade peribrônquica de células IL-2+	45
Figura 15 – Densidade peribrônquica de células IFN-gama+	46
Figura 16 – Conteúdo de fibras colágenas nas vias aéreas	47
Figura 17 – Conteúdo de fibras elásticas nas vias aéreas	48
Figura 18 – Índice de espessura do músculo liso das vias aéreas	49
Figura 19 – Índice de espessura da camada epitelial das vias aéreas	50
Figura 20 – Índice de broncoconstrição	51
Figura 21 – Fotomicrografias das células IL-4+ peribrônquicas	52
Figura 22 – Fotomicrografias do conteúdo de colágeno das vias aéreas	52
Figura 23 – Densidade perivascular de células mononucleares	53
Figura 24 – Densidade perivascular de eosinófilos	54

Figura 25 – Densidade perivascular de células IL-4+	55
Figura 26 – Densidade perivascular de células IL-5+	56
Figura 27 – Densidade perivascular de células IL-2+	57
Figura 28 – Densidade perivascular de células IFN-gama+	58
Figura 29 – Densidade perivascular de células MCP-1+	59
Figura 30 – Índice de edema perivascular	60
Figura 31 – Conteúdo de fibras colágenas vasculares	61
Figura 32 – Conteúdo de fibras elásticas vasculares	62
Figura 33 – Índice de espessura do músculo liso vascular	63
Figura 34 – Fotomicrografias das células MCP-1+ perivasculares	64
Figura 35 – Fotomicrografias do colágeno vascular	64
Figura 36 – Densidade parenquimal de células mononucleares	65
Figura 37 – Densidade parenquimal de eosinófilos	66
Figura 38 – Densidade parenquimal de células IL-4+	67
Figura 39 – Densidade parenquimal de células IL-5+	68
Figura 40 – Densidade parenquimal de células IL-2+	69
Figura 41 – Densidade parenquimal de células IFN-gama+	70
Figura 42 – Conteúdo de volume de fibras colágenas parenquimais	71
Figura 43 – Conteúdo de fibras elásticas parenquimais	72

RESUMO

Vieira RP. *Efeitos do treinamento físico aeróbio sobre a inflamação pulmonar alérgica crônica em camundongos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 105p.

A asma é uma doença inflamatória crônica, predominantemente das vias aéreas, mas também envolve o sistema vascular e parênquima pulmonar, na qual as células inflamatórias, a musculatura lisa e o epitélio brônquico têm um papel fundamental na fase inicial, progressão e perpetuação da doença. O treinamento físico aeróbio tem sido indicado como uma relevante forma de auxílio no tratamento de pacientes asmáticos por melhorar a qualidade de vida e reduzir sintomas e o uso de medicamentos. No entanto, não existe um consenso a respeito sobre a intensidade de treinamento ideal para esses pacientes assim como também existem pouquíssimos estudos a respeito dos possíveis mecanismos da atividade física aeróbia para esses pacientes. Por esses motivos, os objetivos do presente estudo foram avaliar os efeitos de duas intensidades de atividade física aeróbia (leve e moderada) sobre um modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica em camundongos. Os animais foram sensibilizados com ovalbumina por 51 dias. A atividade física aeróbia teve início no dia 21 e perdurou por 30 dias. Os resultados demonstraram que ambas as intensidades de atividade aeróbia inibiram o desenvolvimento da inflamação predominantemente eosinofílica no lavado broncoalveolar, nos compartimentos peribrônquico, perivascular e no parênquima pulmonar, a expressão de interleucina 4 e 5 pelas células inflamatórias nestes três compartimentos pulmonares. Ambas intensidades

de atividade física aeróbia também inibiram significativamente a deposição de fibras colágenas e elásticas (nas vias aéreas e vasos pulmonares) e também o espessamento da musculatura lisa brônquica e vascular assim como da camada epitelial brônquica. Por outro lado, ambas intensidades de atividade física aeróbia não inibiram a síntese de anticorpos anafiláticos IgE e IgG₁ e a hiperresponsividade brônquica. Portanto, concluímos que a atividade física aeróbia de intensidade leve e moderada são capazes de inibir o desenvolvimento da inflamação e do remodelamento pulmonar, mas não a hiperresponsividade num modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica em camundongos.

Descritores: asma, exercício, doenças respiratórias/reabilitação, alergia e imunologia, pulmão, inflamação, hiper-reatividade brônquica, colágeno, camundongos.

SUMMARY

Vieira RP. *Effects of aerobic physical training on lung allergic lung inflammation in mice* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2007. 105p.

Asthma is a chronic inflammatory disease, predominantly involving the airways, but also involving the pulmonary vessels and parenchyma, in which the inflammatory cells, bronchial smooth muscle and epithelium have a central role in the initial phase, progression and perpetuation of the disease. The low and moderate intensity of aerobic physical training have been indicated as a relevant mean to help in the treatment of asthmatic patients, improving life quality, decreasing symptoms and the use of medicines. However, there is not a consensus about the best intensity of training to these patients and also there are few studies about the possible mechanisms of aerobic physical training for asthmatic patients. Therefore, the aims of this study was to evaluate the effects of two intensities of aerobic physical training (low and moderate) on an experimental model of chronic allergic lung inflammation in mice. The animals were sensitized with ovalbumin during 51 days. The aerobic physical training started to 21st day and endures for 30 days. The results showed that as low as moderate intensities of aerobic physical training inhibited the eosinophilic inflammation in the bronchoalveolar lavage, peribronchial, perivascular and in the pulmonary parenchyma, as well as the expression of interleukin 4 and 5 by inflammatory cells in these three pulmonary compartments. Both intensities of aerobic physical training also inhibited the collagen and elastic fibers deposition (in

the airways and in the pulmonary vessels) and also the thickness of smooth muscle in the airways and vessels, as well as of the airway epithelial layer. On other hand, both intensities of aerobic physical training did not inhibit the synthesis of anaphylactic antibodies IgE and IgG₁ and the hyperresponsiveness. Therefore, we conclude that aerobic physical training, to both intensities, were capable of inhibit the development of pulmonary inflammation and remodeling, but not of hyperresponsiveness in an experimental model of allergic lung inflammation in mice.

Keywords: asthma, exercise, respiratory diseases/rehabilitation, allergy and immunology, lung, inflammation, bronchial hyperreactivity, collagen, mice.

INTRODUÇÃO

1.1 – Asma – Definição

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, predominantemente alérgica, na qual muitas células e elementos celulares exercem um importante papel. O quadro de inflamação crônica está associado à hiperresponsividade brônquica que leva a episódios recorrentes de dispnéia, chiado e tosse, principalmente à noite ou no início da manhã. Estes sintomas estão associados à obstrução brônquica sendo, ao menos, parcialmente reversível espontaneamente ou com tratamento (1).

1.2 – Asma – Epidemiologia

Até 1995, estimava-se que a prevalência de asma estivesse em torno de 7,2% da população mundial (aproximadamente 10 milhões de pessoas) e que pelo menos 40.000 mortes por ano eram atribuídas à doença até este período. Atualmente, estima-se que, aproximadamente, 300 milhões de pessoas tenham asma, que a sua prevalência varie entre 01 e 18%, dependendo da região, e que a mortalidade ocasione em torno de 250 mil mortes por ano (1). O aparente paradoxo de aumento da mortalidade por asma apesar dos recentes avanços no conhecimento de fisiopatologia da doença e da utilização de novas modalidades terapêuticas, é um fenômeno preocupante e até certo ponto pouco conhecido (2, 3, 4).

1.3 – Asma – Fisiopatologia

A primeira etapa para o desenvolvimento do quadro asmático é a sensibilização a algum antígeno, na qual as células dendríticas presentes na

mucosa brônquica atuam como apresentadoras de antígenos (5, 6). A interação dessas células com linfócitos T auxiliares faz com que os linfócitos B sejam estimulados produzindo imunoglobulinas E (IgE) que liberadas na circulação se ligam a receptores de alta afinidade presentes em mastócitos (6). Em consequência deste processo, nos próximos contatos com agentes desencadeantes, a grande maioria dos pacientes asmáticos desenvolve uma fase imediata e uma fase tardia. A fase imediata se instala em poucos minutos e é caracterizada fundamentalmente pela obstrução de vias aéreas. As imunoglobulinas liberadas na circulação se ligam aos receptores de alta afinidade presentes em mastócitos dando seqüência ao processo inflamatório (6). Em um outro contato com agentes desencadeantes, os pacientes asmáticos desenvolvem um quadro que se instala em poucos minutos, caracterizado fundamentalmente pela obstrução de vias aéreas. A máxima intensidade deste quadro ocorre em torno de 10 a 20 minutos, terminando em torno de 01 a 02 horas. O principal fator pela obstrução das vias aéreas nesta fase é a contração da musculatura lisa brônquica, descrita por vários autores como sendo mediada por histamina, prostaglandina D₂ e leucotrienos (6, 7, 8). A fase tardia ocorre a partir de 03 horas do contato com o alérgeno e pode durar vários dias. Nesta fase há um processo inflamatório decorrente de uma grande migração celular para as vias aéreas.

1.3.1 – Asma – Inflamação

Em pacientes asmáticos, o infiltrado inflamatório brônquico é composto predominantemente de eosinófilos, mastócitos e linfócitos

principalmente do subtipo CD4+ (9). Estes achados em pacientes com diagnóstico recente, antes do início do tratamento, subsidiaram a idéia de que o processo inflamatório desempenha um papel fundamental na fisiopatologia da asma (9). Entretanto, o recrutamento e ativação desses tipos celulares para as vias aéreas de pacientes asmáticos dependem da expressão e ativação de inúmeras classes de proteínas, como citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (10, 11).

A fase inicial do processo inflamatório envolve a adesão das células inflamatórias ao endotélio, processo mediado por inúmeras quimiocinas (10, 11). As quimiocinas, nome derivado de “citocinas quimioatrativas”, são proteínas pequenas (8-10kDa) estruturalmente relacionadas, que se ligam aos receptores do tipo “seven transmembrane G-protein coupled” (GPCR) e participam da migração leucocitária. Mais de 50 quimiocinas já foram identificadas em seres humanos e exercem sua função via 20 tipos diferentes de receptores (10). Alguns exemplos de quimiotaxinas são as eotaxinas, proteínas quimiotáticas para monócitos (MCP) e RANTES. Na resposta alérgica, a grande maioria das quimiocinas sinaliza via os receptores CCR3 e CCR4, subtipos do (GPCR) (10, 11). Esses receptores são encontrados em eosinófilos, basófilos, mastócitos e em sub-populações de linfócitos Th₂ (11). Esses achados podem subsidiar o mecanismo para o recrutamento de todos esses tipos celulares citados acima no contexto da inflamação pulmonar alérgica (10, 11).

Além de serem atraídas para o *locus* inflamatório, as células inflamatórias necessitam aderir ao vaso para que possam atravessá-lo. Este

processo ocorre através da ação das moléculas de adesão e seus ligantes. As moléculas de adesão são uma família de glicoproteínas envolvidas na interação célula-célula e célula-matriz-extracelular. Algumas dessas moléculas já foram identificadas, como por exemplo, a molécula de adesão celular neuronal (do inglês, *NCAM*), a molécula de adesão intracelular 1, também conhecida como CD54 (do inglês, *ICAM-1*), a molécula de adesão celular de plaquetas e endotélio 1, também conhecida como CD31 (do inglês, *PECAM-1*), a molécula de adesão endotelial de leucócitos (do inglês, *ELAM-1*) e a molécula de adesão celular vascular 1 (do inglês, *VCAM-1*) (12, 13). As moléculas de adesão e seus ligantes (do inglês, *e-selectin*, *p-selectin*, *I-selectin* e integrinas) agem conjuntamente com as quimiocinas com o intuito de proporcionarem o tráfico de leucócitos dos vasos para o local do tecido lesado (12, 13). Várias citocinas podem induzir a síntese e liberação das moléculas de adesão, mas especificamente no caso da resposta alérgica, a IL-4 e a IL-13 têm demonstrado efeitos diretos na liberação de ICAM-1 pelo endotélio vascular, facilitando a adesão de eosinófilos ao endotélio (12, 13).

Do ponto de vista imunológico, a asma é caracterizada por uma resposta denominada Th₂, que, quando ativados liberam citocinas típicas dessa resposta, como as interleucinas 4 (IL-4), IL-5 e IL-13 (5, 6, 14). De acordo com a hipótese da higiene, uma exposição reduzida a agentes microbianos durante os primeiros anos de vida pode proporcionar polarização de células T específicas da resposta alérgica, o que pode resultar no desenvolvimento da asma (15). Esse processo é conhecido como

desbalanço Th₁/Th₂, no qual a resposta Th₁ é uma resposta a agentes virais ou bacterianos e normalmente encontra-se diminuída em casos de doenças alérgicas, como na asma (15). Modelos experimentais de inflamação pulmonar alérgica crônica demonstram que a sensibilização com ovalbumina (OVA) induz à liberação de citocinas Th₂, particularmente IL-4 e IL-5 (16, 17). A IL-4 é capaz de perpetuar a ativação de mastócitos, os quais são responsáveis pela liberação de IgE e IgG₁, de induzir o recrutamento e a ativação de eosinófilos e também de estimular as células epiteliais a produzirem muco (16, 18). A IL-5 estimula a proliferação, diferenciação, sobrevivência e ativação de eosinófilos na medula óssea e também a liberação de eosinófilos maduros da medula para a circulação, além de ter papel quimioatrativo para os eosinófilos (16, 19). A IL-5 também é capaz de bloquear os efeitos inibitórios da IL-2 sobre a migração de eosinófilos (20, 21).

Em relação ao *locus* inflamatório tanto em pulmões de pacientes asmáticos quanto em modelos experimentais, um grande número de evidências têm demonstrado que a inflamação não se restringe às grandes vias aéreas, mas se estende às pequenas vias aéreas (22-24), ao parênquima (25-27) e vasos pulmonares (28-31). Estes achados são importantes para o melhor entendimento da fisiopatologia da doença e também proporcionar melhores condições para estudos sobre novas drogas e estratégias terapêuticas.

1.3.2 – Asma – Remodelamento

O termo remodelamento pulmonar é normalmente utilizado para expressar modificações estruturais que ocorrem nos pulmões, especialmente em situações patológicas (32). O remodelamento pulmonar é um processo associado a um desbalanço entre a síntese e degradação de proteínas da matriz extracelular (32). As fibras colágenas e elásticas, os proteoglicanos e as lamininas são as principais proteínas da matriz extracelular (33). Os principais fatores que controlam esse processo, são as metaloproteinases (MMPs), os inibidores das metaloproteinases (TIMPs) e os fatores de crescimento (33). Entretanto, alguns estudos sugerem que diversos mediadores inflamatórios tais como os eicosanóides e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio também regulam o processo de remodelamento (34-36).

O remodelamento na asma é caracterizado principalmente pelo aumento na deposição das proteínas de matriz extracelular nas vias aéreas. Entretanto, esse processo também já foi descrito no parênquima (25-27) e vasos pulmonares (28-31). As principais alterações nas vias aéreas são: fibrose subepitelial, hipertrofia e hiperplasia de músculo liso, hiperplasia de glândulas submucosas resultando num espessamento da parede brônquica e redução do calibre brônquico (37). O grau dessas alterações nas vias aéreas, também tem sido associado aos níveis de gravidade da doença e diminuição da função pulmonar (38-41). O remodelamento do parênquima pulmonar ainda é algo bastante discutido, embora alguns estudos clínicos e experimentais tenham apontado sua existência e possível correlação com o

aumento à resposta a agentes constritores (25-27). Os estudos sobre o remodelamento dos vasos pulmonares são recentes e as informações sobre as possíveis repercussões funcionais são escassas (28-31).

Até um passado recente, o epitélio brônquico era compreendido apenas como uma célula afetada na asma (42). Algumas dessas alterações incluíam hipertrofia e hiperplasia das células secretoras, espessamento da membrana basal epitelial e acúmulo de células inflamatórias tanto ao nível sub-epitelial quanto intra-epitelial (14, 42-44). Entretanto, na última década, o epitélio brônquico tem sido descrito como uma barreira primária contra toxinas e microorganismos e também como modulador dos eventos inflamatórios e do remodelamento na asma, secretando inúmeros mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas, eicosanóides e fatores de crescimento (12, 35, 45, 46).

Alterações estruturais no epitélio brônquico e na síntese de muco também têm sido descritas tanto em estudos de cultura de células epiteliais como em modelos murinos de asma alérgica (5, 14). O papel das IL-4 e IL-13 no epitélio brônquico tem sido extensivamente investigados e alguns estudos têm demonstrado que estas interleucinas estimulam a síntese de óxido nítrico, eotaxinas e fatores de crescimento pelas células epiteliais (35, 47, 48). Os níveis de óxido nítrico estão aumentados em pacientes asmáticos e modelos murinos de asma alérgica e também estão envolvidos na inflamação pulmonar, no remodelamento e na hiperresponsividade das vias aéreas (49, 50). Portanto, o epitélio brônquico representa uma barreira física, metabolicamente ativa que contribui tanto para a manutenção da

homeostase das vias aéreas, mas que também pode contribuir para o desenvolvimento da asma.

Em pacientes asmáticos e em estudos experimentais, a musculatura lisa brônquica apresenta hipertrofia e hiperplasia e vários estudos sugerem que isto se deve à liberação de diversos mediadores inflamatórios, fatores de crescimento e citocinas (51-54). Alguns estudos também sugerem que esses mediadores inflamatórios e fatores de crescimento são liberados pelas células inflamatórias, pela musculatura lisa e epitélio brônquico, e até por proteínas da matriz extracelular (55-59). Neste sentido, tem sido demonstrado que mastócitos e outras células inflamatórias infiltram na musculatura lisa brônquica, liberam seus produtos e que este fato está diretamente relacionado à hiperresponsividade brônquica (55-59). Aliado a este fator admite-se também que pacientes asmáticos apresentam aumento das “gap junction” e dos potenciais de ação, contribuindo para a hiperreatividade brônquica (60).

1.3.3 – Asma – Responsividade Brônquica

O termo responsividade brônquica é normalmente utilizado para descrever quão rápida e intensa é a resposta das vias aéreas a um agente broncoconstritor (61). Na asma, a hiperresponsividade brônquica pode ser desencadeada não só por alérgenos, mas também por outros estímulos inespecíficos, dentre eles infecções respiratórias, poluição atmosférica, refluxo gastroesofágico, irritantes inalatórios, exercícios físicos, estimulantes farmacológicos e fatores emocionais (61, 62).

Alguns fatores têm sido demonstrados diretamente relacionados com a hiperresponsividade brônquica tais como: o calibre das vias aéreas, a espessura e integridade da camada epitelial, o conteúdo e o nível de integridade das proteínas de matriz extracelular, a presença de inflamação, alterações da mecânica das vias aéreas e a regulação autonômica (63-66). Entretanto, a contribuição de cada uma destas variáveis na hiperresponsividade brônquica ainda não está completamente entendida. A inflamação das vias aéreas e a liberação de citocinas são consideradas como características chaves da fisiopatologia da hiperresponsividade brônquica (67). Podemos dizer também que a intensidade da fibrose subepitelial também está correlacionada com a hiperresponsividade das vias aéreas em pacientes com asma (68). Em relação ao papel do músculo liso brônquico na hiperresponsividade, podemos dizer que a infiltração específica de mastócitos no músculo liso está relacionada com a hiperresponsividade (57). Podemos dizer ainda que os possíveis mecanismos pelo qual a infiltração de mastócitos pode contribuir para a hiperresponsividade, incluem a liberação de citocinas, fatores quimiotáticos, e fatores de crescimento, os quais podem atuar diretamente na contração das células musculares lisas (57, 61, 67, 68). Outro fator importante, é que as células musculares lisas, quando ativadas através de infiltrado inflamatório, são capazes de produzir essas mesmas citocinas, fatores quimiotáticos e de crescimento, também levando a sua própria contração e contribuindo para um aumento no recrutamento de mais células inflamatórias (57, 61, 67, 68). Outros estudos sugerem que além dos mastócitos, os linfócitos T podem interagir com as

células musculares lisas, também levando a um processo de ativação, contração e proliferação das células musculares lisas (52, 69). Interações entre monócitos e células musculares lisas também têm sido estudadas, apontando para os mesmos efeitos descritos acima (70). Portanto, podemos sugerir que tanto a inflamação quanto o remodelamento brônquico contribuem significativamente para o desenvolvimento da hiperresponsividade brônquica.

1.4 – Atividade Física Aeróbia

Uma atividade física é considerada aeróbia quando a maior parte da demanda energética é suprida através do metabolismo aeróbio (71, 72). A atividade física aeróbia realizada de maneira sistemática e regular desencadeiam uma série de adaptações crônicas benéficas em todo o organismo, tais como: redução da pressão arterial e da frequência cardíaca de repouso em indivíduos hipertensos (73, 74), aumento do consumo máximo de oxigênio (71, 72), aumento da massa muscular e densidade óssea (71), melhora da resposta imunológica (se a atividade for predominantemente realizada em intensidade leve ou moderada) (75) e aumento da expressão e atividade de enzimas anti-oxidantes (76, 77).

1.4.1 – Atividade Física Aeróbia e Asma

A atividade física aeróbia tem sido recomendada como um meio auxiliar efetivo para o tratamento de pacientes asmáticos (78, 79). Os mais proeminentes efeitos da atividade física aeróbia em pacientes asmáticos são

melhora da capacidade física e ventilatória, diminuição de sintomas incluindo a dispnéia, diminuição do broncoespasmo induzido por exercício e também do uso diário corticóides (80-83). Diversos estudos clínicos, entretanto, ressaltam que a atividade física necessita ser realizada de maneira regular e de intensidade baixa ou moderada e que os efeitos fisiológicos para estes pacientes precisam ser melhor estudados (80-83).

1.4.2 – Atividade Física Aeróbia e Sistema Imune

Os efeitos antiinflamatórios da atividade física aeróbia têm sido extensivamente investigados (84). De maneira geral, há um consenso na literatura de que a atividade aeróbia de alta intensidade e longa duração desencadeia uma resposta pró-inflamatória enquanto as atividades de intensidade leve e moderada e média ou longa duração desencadeiam uma resposta antiinflamatória (84-87). Grande parte dos efeitos imunomodulatórios da atividade física aeróbia têm sido demonstrados em casos de aterosclerose, diabetes, câncer de cólon e de mama, e de doenças cardíacas isquêmicas (84). Esses estudos demonstram que essas respostas são reguladas por inúmeras citocinas e/ou quimiocinas dentre elas: IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, MCP-1, NAP-1, G-CSF (84-87). Aoi et al. (2004) sugerem que a inflamação aguda ocasionada pelo exercício físico de alta intensidade pode ser provocada pelo aumento do estresse oxidativo que proporciona uma intensa migração de fagócitos para a musculatura utilizada durante a atividade (88).

A atividade física aeróbia é capaz de modular tanto o sistema imune inato quanto o adaptativo (89). Os mecanismos que modulam essas respostas são basicamente dependentes dos efeitos hormonais (90), metabólicos (91) e mecânicos (92). Embora o exercício seja normalmente classificado como um estímulo estressante cabe esclarecer que normalmente ocorrem duas respostas ao exercício: a resposta aguda e a adaptação crônica (89, 93, 94). De acordo com Costa Rosa, *“A resposta aguda é reação transitória ao estresse, enquanto o estímulo crônico gera a resposta de adaptação crônica ao exercício, que habilita o organismo a tolerar de maneira mais adequada o estresse”* (89).

Portanto, uma vez que a asma é uma doença pulmonar inflamatória crônica de intensa imunoregulação, e que a atividade física aeróbia apresenta efeitos antiinflamatórios e imunoreguladores, acreditamos ser importante estudar os efeitos da atividade física aeróbia num modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica.

2. OBJETIVOS

2.1 – Objetivos Gerais

Avaliar os efeitos da atividade física aeróbia de intensidade leve e moderada sobre a inflamação, remodelamento e responsividade pulmonar num modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica.

2.2 – Objetivos Específicos

2.2.1 – Avaliar os efeitos da atividade física aeróbia de intensidade leve e moderada na inflamação peribrônquica, perivascular e parenquimal.

2.2.2 – Avaliar os efeitos da atividade física aeróbia de intensidade leve e moderada no remodelamento brônquico, vascular e parenquimal.

2.2.3 – Avaliar os efeitos da atividade física aeróbia de intensidade leve e moderada na responsividade brônquica.

2.2.4 – Avaliar os efeitos da atividade física aeróbia de intensidade leve e moderada na expressão de citocinas e quimiocinas pelas células inflamatórias nos compartimentos peribrônquico, perivascular e parenquimal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Comissão de Ética

Todos os estudos aqui apresentados foram aprovados pelo Comitê de Ética para Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq-FMUSP), Protocolo nº 503/05.

3.1 – Animais

Foram utilizados 96 camundongos machos da linhagem Balb/c, adultos jovens, com 06 semanas de idade, pesando aproximadamente 15-20g. Os animais foram obtidos do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e mantidos em condições controladas de temperatura (22-25°C) e luminosidade (ciclo 12h claro/12h escuro), e 70% de umidade relativa. A alimentação constou de água e ração (Purina Labina[®], São Paulo, Brasil) “*ad libitum*”.

3.2 – Protocolo Experimental

O protocolo experimental foi dividido em 02 etapas sendo utilizado 48 animais para cada etapa e em ambas foi utilizado o mesmo protocolo experimental com 06 grupos e 08 animais por grupo. Na 1^a etapa, foi avaliada as alterações do peso corporal, capacidade física, níveis de imunoglobulinas IgE e IgG₁ e a inflamação e o remodelamento pulmonar. Na 2^a etapa foi avaliada a responsividade brônquica.

3.2.1 – Grupos Experimentais

Cada um dos 06 grupos experimentais foi constituído por 08 animais conforme quadro abaixo:

Grupos Experimentais	Treinamento	Intensidade	Ovalbumina
Controle	-	-	-
50%	+	Leve	-
75%	+	Moderada	-
OVA	-	-	+
OVA+50%	+	Leve	+
OVA+75%	+	Moderada	+

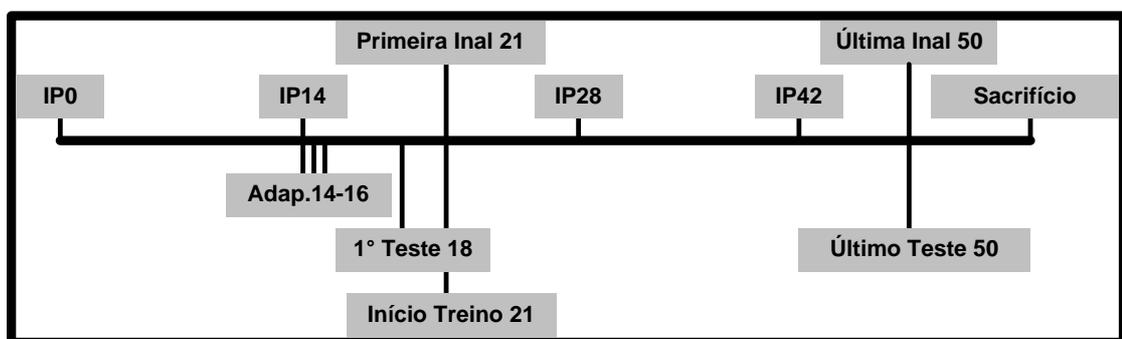
3.2.2 – Sensibilização dos Animais

Foram realizadas 04 administrações intraperitoneais (i.p) de OVA (20µg/animal) diluída em soro fisiológico (NaCl 0,9%), na proporção de 1g/10ml, correspondendo a 20µg/OVA/animal, nos dias 0, 14, 28 e 42. A partir do dia 21 do experimento, foram iniciadas as inalações de OVA 1% diluída em soro fisiológico, realizadas 03 vezes por semana, 30 minutos cada sessão, até o dia 51 do experimento. Para a realização da inalação, os camundongos foram colocados numa caixa de acrílico (30 x 15 x 20 cm) acoplada a um nebulizador ultrassônico (modelo Pulmoclear II Luxo, marca Soniclear[®], SP, Brasil) e submetidos à inalação de um aerosol de (OVA) preparada conforme descrito acima. Os animais não sensibilizados foram inalados com soro fisiológico.

3.2.3 – 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 04 semanas. Na semana anterior ao início do treinamento, os animais foram submetidos a 03 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. O teste consistiu de 05 minutos de aquecimento a uma velocidade de 0,2Km/h que era aumentada em 0,1Km/h a cada 2,5 minutos até a exaustão dos animais. Os animais foram considerados exaustos quando não conseguiam permanecer correndo mesmo após 10 estímulos mecânicos. A intensidade do treinamento (leve = 50% e moderada = 75%) era calculada a partir da velocidade máxima atingida no teste. O treinamento foi realizado 05 vezes por semana, 60 minutos por sessão, durante 04 semanas. Após este período, o teste físico foi repetido com o intuito de reavaliar o condicionamento físico dos animais.

Esquema do protocolo experimental:



IP = injeção intra-peritoneal de OVA ou salina; Inal = inalação de aerosol de OVA ou salina.

3.3 – Avaliação da Responsividade Brônquica

Setenta e duas horas após a última inalação com OVA ou salina, a responsividade brônquica para metacolina (MCh) foi avaliada em camundongos conscientes usando um sistema de pletismografia de corpo inteiro com fluxo (Buxco Europe, Winchester, Reino Unido). Os camundongos foram colocados em um pletismógrafo de corpo inteiro respirando espontaneamente para coleta dos valores de fluxo. O pletismógrafo de corpo inteiro utilizado não é totalmente vedado e apresenta dois orifícios que conectam o interior da câmara com o meio externo. O conjunto formado por esses dois orifícios é denominado, pelo fabricante, de pneumotacógrafo. O sinal de pressão dentro do pletismógrafo em relação à atmosfera foi coletado. Estes valores de pressão foram proporcionais ao fluxo entrando e saindo da câmara através do pneumotacógrafo. Para estimar o fluxo e o volume advindos do sinal de pressão da câmara, o pletismógrafo foi calibrado injetando-se 01 ml de ar antes da tomada das medidas. O tempo de expiração (TE) e relaxamento (TR; definido como o tempo de decaimento até 36% da pressão total da câmara durante a expiração), o pico inspiratório e expiratório foram extraídos do sinal de pressão da câmara. Os picos de fluxo expiratórios (PFE) e inspiratórios (PFI) foram calculados a partir das pressões desses picos (95). Os valores da “pausa aumentada” *enhanced pause* (Penh) foram calculadas de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{Penh} = \frac{\text{PFE}}{\text{PFI}} \times \left(\frac{\text{TE}}{\text{TR}} - 1 \right)$$

A literatura demonstra que o Penh tem uma relação teórica com a obstrução das vias aéreas (95-97). Portanto, a hiperresponsividade brônquica foi avaliada utilizando os valores calculados do Penh como um índice. As medidas basais foram tomadas durante três minutos após a ambientação dos animais. Uma média das medidas foi calculada para este intervalo. Em seguida os camundongos foram expostos à nebulização de solução fisiológica 0,9% por 03 minutos, seguidos pela nebulização das seguintes concentrações de metacolina (6,25, 12,5, 25,0, 50,0 mg/ml). As medidas foram obtidas por 05 minutos (sendo 03 minutos durante a nebulização e 02 minutos após). Os valores do Penh foram calculados como a média de aproximadamente 25 ciclos respiratórios, e as médias dos valores cumulativos foi expressa para cada concentração (95-97).

3.4 – Coleta e Análise do Lavado Broncoalveolar (LBA)

Após a avaliação da responsividade brônquica, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (6mg/Kg, i.p.), traqueostomizados e canulados. Os pulmões foram lavados com 1,5ml (03 x 0,5ml) de soro fisiológico estéril (NaCl 0,9%) e 1,0ml de LBA foi recuperado. Este volume foi então centrifugado (1000rpm, durante 10 minutos) a 05°C, e o sobrenadante coletado e armazenado a -70°C para análises futuras. O botão de células foi ressuspendido em 1,0ml de soro fisiológico estéril (NaCl 0,9%) e utilizado para avaliação do número de células total e diferencial. Vinte microlitros foram utilizados para contagem total num hematocitômetro (*Laser Blood Cell Counter*, modelo JXJ-402 Automático, *Shangai Sichuang Instrument*, SG,

China) e 500 µl para contagem diferencial após centrifugação (06 min, 450 rpm) (modelo Cytospin-2, *Shandon Instruments*, Sewickley, PA) e fixação em lâminas com o corante Grün-wald-Giemsa. Foram contadas 300 células por lâmina (98).

3.5 – Avaliação dos Títulos de IgE e IgG₁ Específicos para OVA

Após a coleta do lavado broncoalveolar, os animais foram tricotomizados, realizada a assepsia da área cirúrgica com iodo polvidona (Polvidini[®]) e realizada uma incisão de 3-4 cm na linha mediana do abdômen do animal. Foi então coletada uma amostra de sangue (01ml) na via veia cava inferior utilizando seringa (01ml) e agulha (12,7mm x 0,33mm). As amostras de sangue foram centrifugadas (5000 rpm, 5°C) e o soro aliquoteado e armazenado a - 70°C para análise dos títulos de imunoglobulinas 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, (99, 100). Para a determinação dos títulos de IgE específicos para OVA, uma amostra de 0,1ml do soro dos camundogos foi submetida a diferentes diluições (a partir de 1:5) e foram injetadas intradermicamente no dorso de ratos Wistar sem nenhum tratamento. Vinte e quatro horas após a sensibilização passiva, os ratos receberam uma injeção intravenosa de 01ml de soro fisiológico contendo 01 mg de OVA e 10 mg de Azul de Evans. Uma hora após esta administração, os ratos foram sacrificados, tiveram o dorso tricotomizados e o diâmetro das manchas azuis na porção subcutânea foi quantificado.

Para a determinação dos títulos de IgG₁ específicos para OVA, uma alíquota de 0,1ml do soro dos camundongos foi incubado durante 03 horas, a 56°C com o objetivo de neutralizar os anticorpos IgE. Estas amostras foram submetidas a diferentes diluições (a partir de 1:20) e injetadas intradermicamente em camundongos Balb/c sem nenhum tipo de tratamento. Após a sensibilização passiva (24 horas), os camundongos foram desafiados e a determinação do título foi realizada como acima. 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 (99, 100).

3.6 – Histoquímica e Imunohistoquímica

Imediatamente após a coleta do LBA e do sangue, os pulmões foram perfundidos com 0,3ml de formol 10%. A caixa torácica foi então aberta, a traquéia clampeada, sendo retirado 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.

3.6.1 – Histoquímica

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

- **Hematoxilina e Eosina** - coloração utilizada para avaliação do índice da espessura da camada epitelial, da musculatura lisa da via aérea, e do músculo liso vascular.

- **Luna** - coloração utilizada para avaliação da densidade de eosinófilos peribrônquicos, perivasculares, e do parênquima alveolar (27, 101, 102).

- **Resorcina Fucsina de Weigert com Oxidação** – coloração utilizada para avaliação da proporção de volume de fibras elásticas nas vias aéreas, nos vasos e no parênquima pulmonar (25, 27).

- **Picrossírius** – coloração utilizada para avaliação da proporção de volume de fibras colágenas nas vias aéreas, nos vasos e no parênquima pulmonar (25, 27).

3.6.2 – Imunohistoquímica

As lâminas previamente preparadas com (3-Aminopropil-trietoxi-silano) (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-5 (sc-7885; Santa Cruz), anti-IFN-gama (sc-8308; Santa Cruz), anti-MCP-1(sc-1784; Santa Cruz) , anti-IL-2 (sc-7896; Santa Cruz) e anti-IL-4 (sc-1260; Santa Cruz), diluídos em BSA na proporção de 1:200 (IL-

5), 1:300 (IFN-gama), 1:3500 (MCP-1), 1:400 (IL-2) e 1:500 (IL-4), 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).

3.7 – 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 µm² para aumento de

1000x; 62.500 μm^2 para aumento de 400x), adaptado à ocular do microscópio.

3.7.1 – Inflamação Peribrônquica: (células mononucleares, eosinófilos e células inflamatórias positivas para IL-4, IL-5, IL-2 e IFN-gama): Foram analisadas 05 vias aéreas de cada animal, cinco campos por via aérea, avaliados 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 positivas em cada campo, dividido pela área de tecido. A densidade de células foi expressa em células/ μm^2 e os resultados foram transformados para cells/ mm^2 , ajustando-se as unidades (26, 27).

3.7.2 – Remodelamento Brônquico e Índice de Broncoconstrição: Foram analisadas 05 vias aéreas de cada animal, cinco campos por via aérea,. A proporção de volume de fibras colágenas e de fibras elásticas foi calculada como a proporção do número de pontos que incidiram sobre fibras colágenas ou elásticas pelo número de pontos que incidiram na parede das vias aéreas (localizados entre a membrana basal epitelial até a adventícia), avaliados num aumento de 1000x. Os resultados foram expressos em porcentagem. O índice de espessura do músculo liso e da camada epitelial brônquica foi calculado como o número de pontos que incidiram sobre o músculo liso ou camada epitelial brônquica, divididos pelo número de

interceptos que cruzaram a membrana basal epitelial. O índice de broncoconstrição foi calculado como a raiz quadrada do número de interceptos que cruzaram a membrana basal dividida pelo número de pontos que incidiram sobre a luz da via aérea. Os índices de espessura do músculo liso e camada epitelial e o índice de broncoconstrição foram realizados em aumento de 400x.

3.7.3 – Inflamação Perivascular e Edema Perivascular: Para a avaliação da densidade de células mononucleares, eosinófilos e células inflamatórias positivas para IL-4, IL-5, IL-2, IFN-gama e MCP-1, foram utilizadas 05 artérias brônquicas de cada animal, avaliadas num aumento de 1000x. A área avaliada foi calculada a partir do número de pontos que incidiam na parede vascular, localizados entre a camada muscular lisa até a adventícia. A densidade de células foi determinada como o número de células positivas ao redor de todo o vaso, dividido pela área avaliada. A densidade de células foi expressa em células/ μm^2 e os resultados foram transformados para cells/ mm^2 , ajustando-se as unidades (26, 27). O índice de edema perivascular foi realizado a partir do número de pontos que incidiram sobre as áreas de edema pelo número de interceptos que cruzaram o limite externo da camada muscular lisa.

3.7.4 – Remodelamento Vascular: A proporção de volume de fibras colágenas e elásticas e o índice de espessura do músculo liso foram avaliados em 05 artérias brônquicas de cada animal, analisadas num

aumento de 1000x. A área avaliada foi calculada a partir do número de pontos que incidiam na parede vascular, localizados entre a camada muscular lisa até a adventícia. A proporção de volume de fibras colágenas e de fibras elásticas foi calculada como a relação do número de pontos que incidiram sobre fibras colágenas ou elásticas divididas pelo número de pontos que incidiram na parede dos vasos. Os resultados foram expressos em porcentagem. O índice de espessura do músculo liso vascular foi calculado como o número de pontos que incidiram sobre o músculo liso, divididos pelo número de interceptos que cruzaram o limite externo da camada muscular.

3.7.5 – Inflamação do Parênquima Alveolar: Para a avaliação da densidade de células mononucleares, eosinófilos e células inflamatórias positivas para IL-4, IL-5, IL-2 e IFN-gama, foram utilizados 25 campos do parênquima em cada animal, escolhidos de maneira aleatória, avaliados num aumento de 1000x. A área utilizada para avaliação da inflamação tecidual foi calculada a partir do número de pontos que incidiram nos septos alveolares. A densidade de células foi determinada como o número de células positivas nos septos alveolares dividido pela área mensurada. A densidade de células foi expressa em células/ μm^2 e os resultados foram transformados para cells/ mm^2 , ajustando-se as unidades (26, 27).

3.7.6 – Remodelamento do Parênquima Alveolar: A proporção de volume de fibras colágenas e elásticas foi determinada analisando-se 25

campos do parênquima em cada animal, escolhidos de maneira aleatória, avaliados num aumento de 1000x. A proporção de volume de fibras colágenas ou elásticas foi calculada como a relação entre o número de pontos que incidiram sobre fibras colágenas ou elásticas e o número de pontos que incidiram nos septos alveolares. Os resultados foram expressos como porcentagem.

3.8 – Análise Estatística

Os dados foram analisados através do software SigmaStat 3.1 (Califórnia, EUA). A distribuição da normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados com distribuição paramétrica foram submetidos ao teste One-way ANOVA seguido pelo teste 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 (Califórnia, EUA).

4. RESULTADOS

Os animais foram pesados e submetidos a um teste de esforço para avaliar a *performance* física antes e após o estudo. Somente os animais sensibilizados e submetidos ao treinamento físico de intensidade moderada (OVA+75%) ganharam peso corporal quando comparado com todos os demais grupos ($p<0,001$) (Figura 1). Além disto, todos os grupos treinados (50%, 75%, OVA+50% e OVA+75%) melhoraram o desempenho físico se comparado com os grupos não treinados ($p<0,001$) (Figura 2).

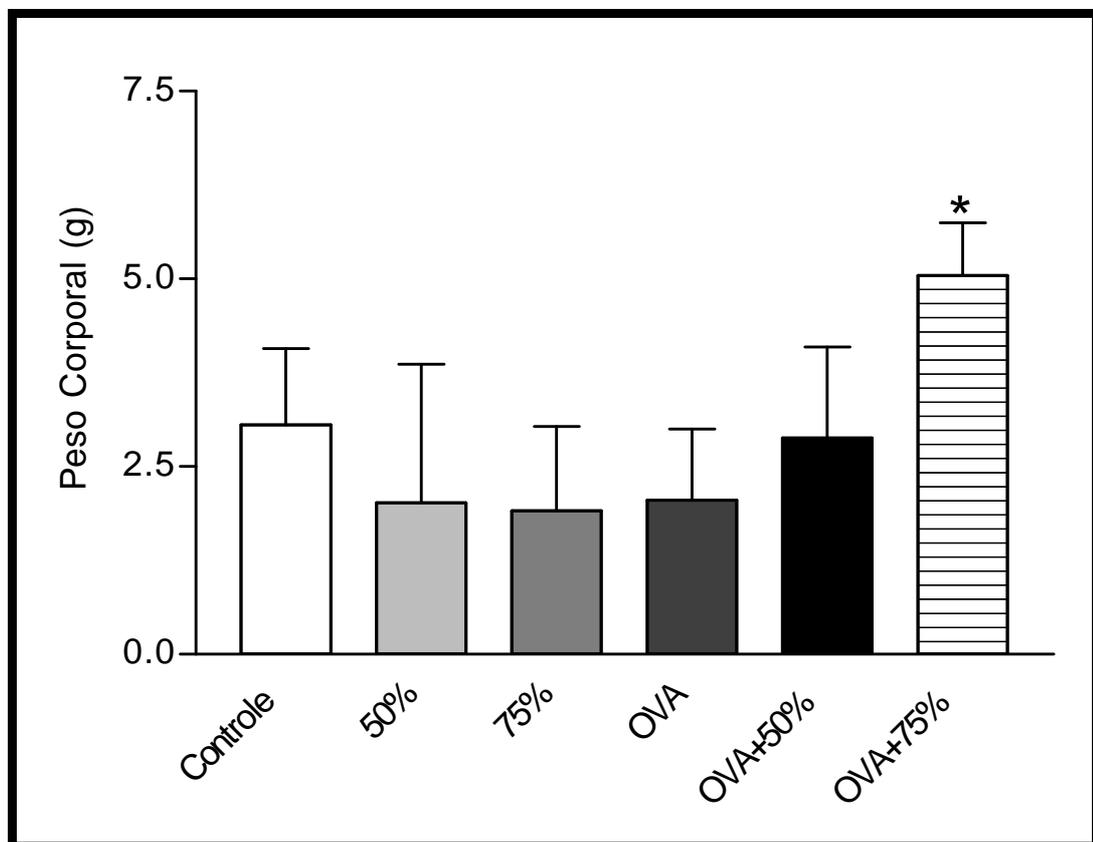


Figura 1 – Efeito do treinamento físico aeróbio de intensidade leve ou moderada no ganho de peso corporal dos animais. Valores expressos como média e desvio padrão. Controle: animais não sensibilizados e não submetidos ao condicionamento físico; 50%: animais não sensibilizados submetidos ao treinamento físico de 50% da intensidade; 75%: animais não sensibilizados submetidos a um condicionamento físico de 75% da intensidade; OVA: animais sensibilizados à ovalbumina; OVA+50%: animais sensibilizados e submetidos ao treinamento físico de 50% da intensidade; OVA+75%: animais sensibilizados e submetidos ao treinamento físico de 75% da intensidade. * $p<0,001$ quando comparado com os demais grupos.

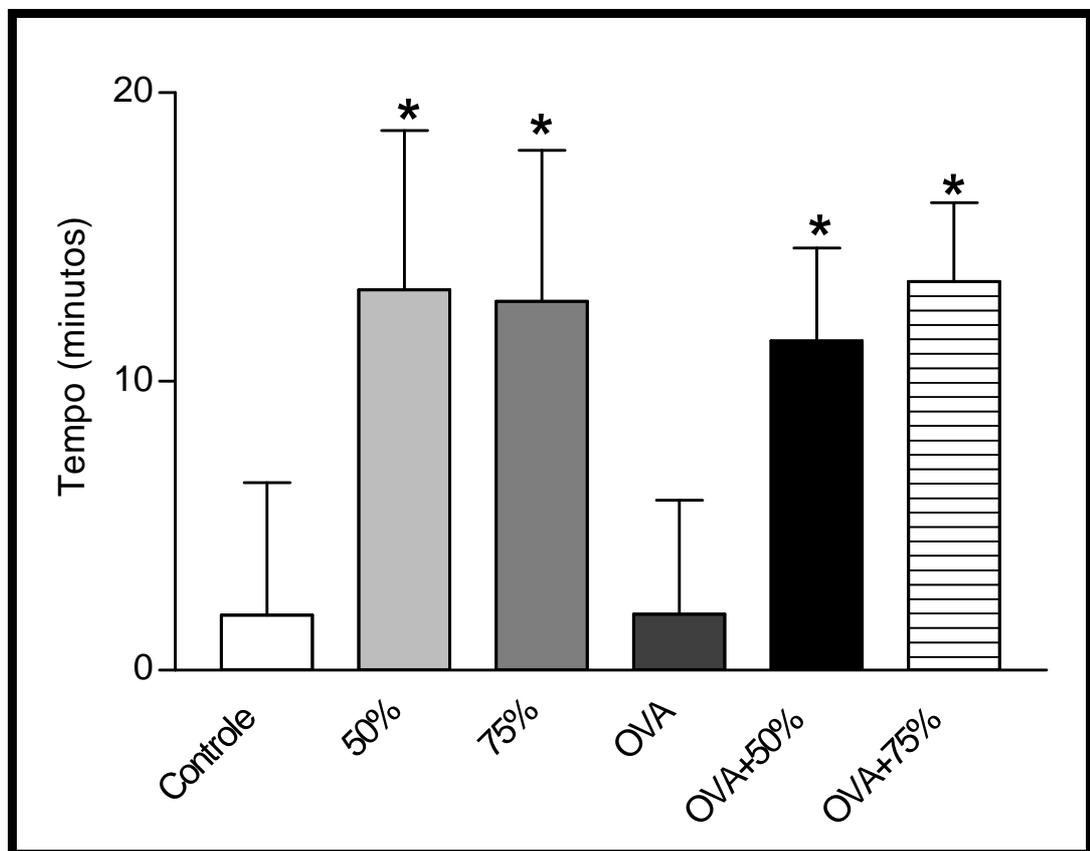


Figura 2 – Efeito do treinamento físico aeróbio de intensidade leve ou moderada na melhora da *performance* física dos animais. Valores expressos como média e desvio padrão. Os grupos estão descritos na Figura 1. * $p < 0,001$ quando comparado com os grupos não treinados.

A responsividade brônquica foi avaliada pela inalação dos animais a doses crescentes de metacolina (de 6,25 a 50 mg/ml) (Figura 3). Os animais do grupo 75% e OVA+75% apresentaram alteração do Penh na condição basal quando comparado com o grupo controle (*p<0,05). Quando submetidos à inalação de salina, os animais dos grupos 50%, OVA e OVA+75% apresentaram alteração do Penh quando comparados aos do grupo Controle (*p<0,05). Os animais dos grupos OVA+50% e OVA+75% apresentaram alteração do Penh quando submetidos à inalação de 6,25mg/ml de metacolina em relação ao grupo Controle (*p<0,05). Quando submetidos à inalação de 12,5mg/ml de metacolina os animais do grupo OVA+50% apresentou alteração do Penh quando comparado com os animais do grupo Controle (*p<0,05). Os animais do grupo OVA+50% e apresentaram alteração do Penh em relação a todos os demais grupos (*p<0,05) e os animais do grupo OVA+75% apresentaram alteração do Penh em relação ao grupo Controle (*p<0,05) quando submetidos à inalação de 25,0mg/ml de metacolina (*p<0,05). Quando submetidos à inalação de 50,0mg/ml de metacolina os animais do grupo OVA+75% apresentaram alteração do Penh em relação aos grupos Controle e 75% (*p<0,05) e o grupo 50% em relação ao grupo 75% (*p<0,05). De maneira geral e interessante, os animais sensibilizados e submetidos ao treinamento físico aeróbio de intensidade leve e moderada apresentaram aumento da hiperresponsividade à maioria das doses de metacolina quando comparado com o grupo Controle.

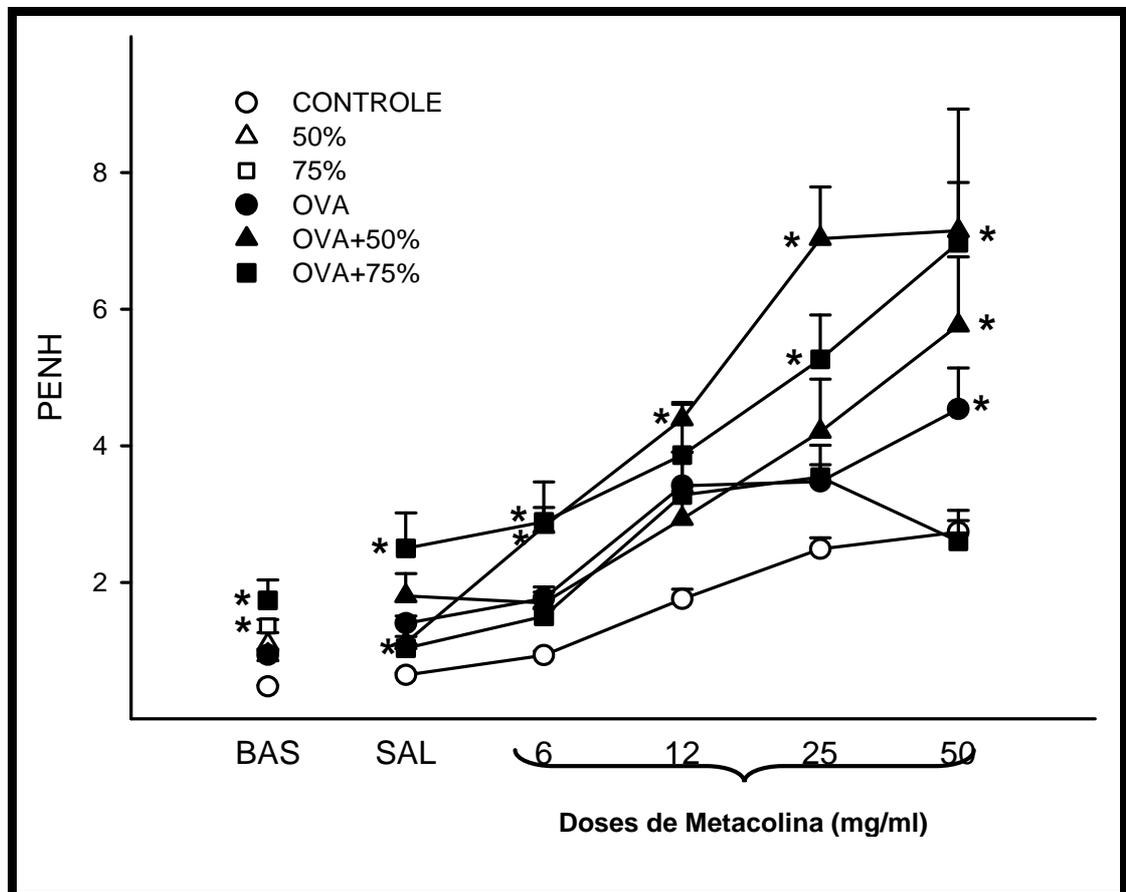


Figura 3 – Efeito do treinamento físico aeróbio de intensidade leve ou moderada na responsividade brônquica. Valores expressos como média e erro padrão. BAS: basal; SAL: salina; 6 a 50: doses crescentes de metacolina (em mg/ml). Os grupos estão descritos na Figura 1.

Os níveis plasmáticos de imunoglobulinas E (IgE) e G (IgG₁) foram quantificados ao término do estudo (respectivamente, Figuras 4 e 5). O treinamento físico em animais não sensibilizados não modificou os níveis de IgE e IgG₁ se comparado com o grupo Controle. A sensibilização à OVA aumentou os níveis de IgE e IgG₁ e o treinamento físico de intensidade leve e moderada nos animais sensibilizados não modificou estes níveis de IgE e IgG₁ induzidos pela sensibilização à OVA (Figuras 4 e 5).

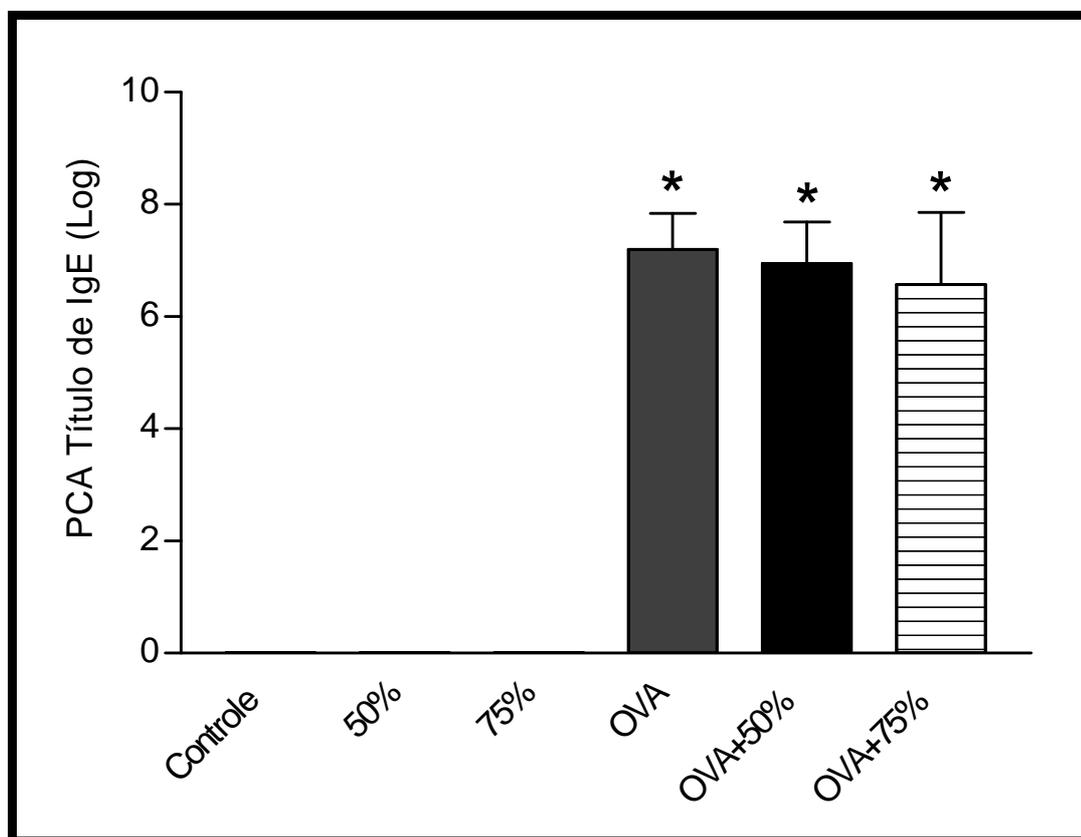


Figura 4 – Efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade leve ou moderada sobre os níveis de IgE específicos para OVA. Valores expressos como média e desvio padrão. Os grupos estão descritos na Figura 1. * $p < 0,001$ quando comparado com os grupos Controle, 50% e 75%.

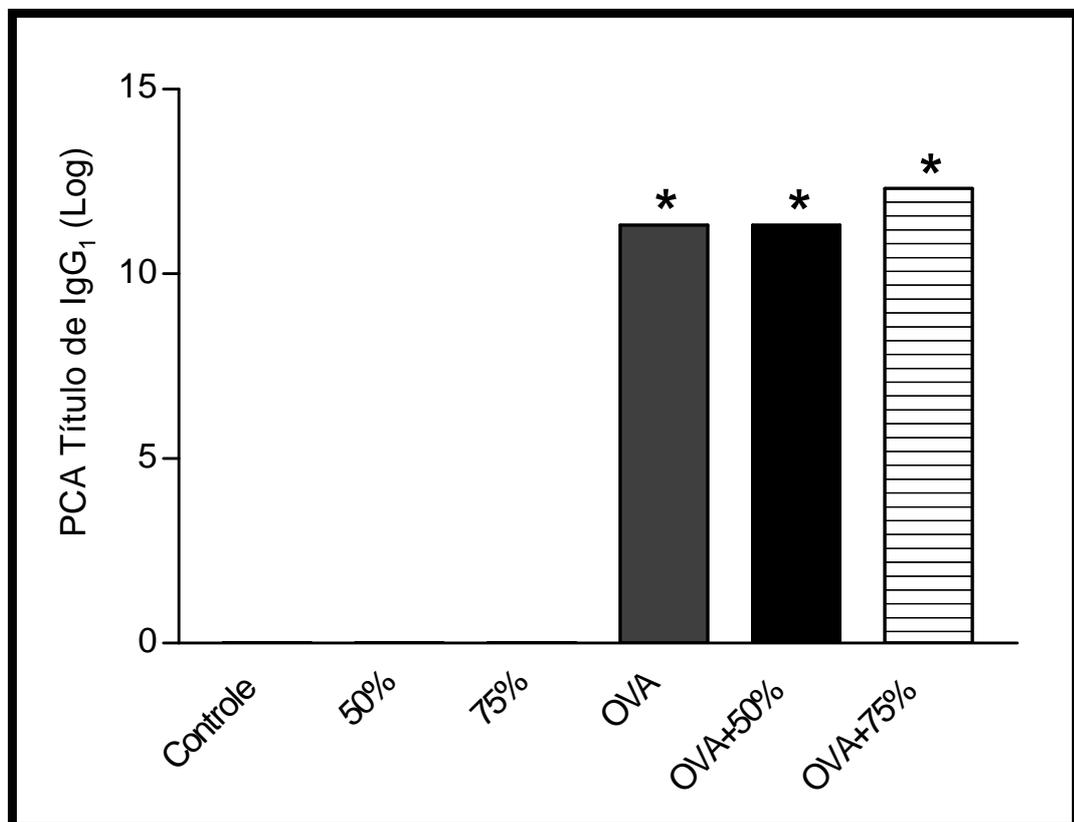


Figura 5 – Efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade leve ou moderada sobre os níveis de IgG₁ específicos para OVA. Valores expressos como média e desvio padrão. Os grupos estão descritos na Figura 1. * $p < 0,001$ quando comparado com os grupos Controle, 50% e 75%.

A inflamação pulmonar foi avaliada através da quantificação de células totais (Figura 6) e diferenciais (Figuras 7 a 9) no lavado broncoalveolar (LBA). O treinamento físico de intensidade leve ou moderada em animais não sensibilizados não modificou o número total de células no LBA. A sensibilização com OVA elevou em aproximadamente 05 vezes número total de células. O treinamento físico de intensidade leve e moderada não modificou o aumento de migração total de células induzido pela sensibilização alérgica crônica (Figura 6).

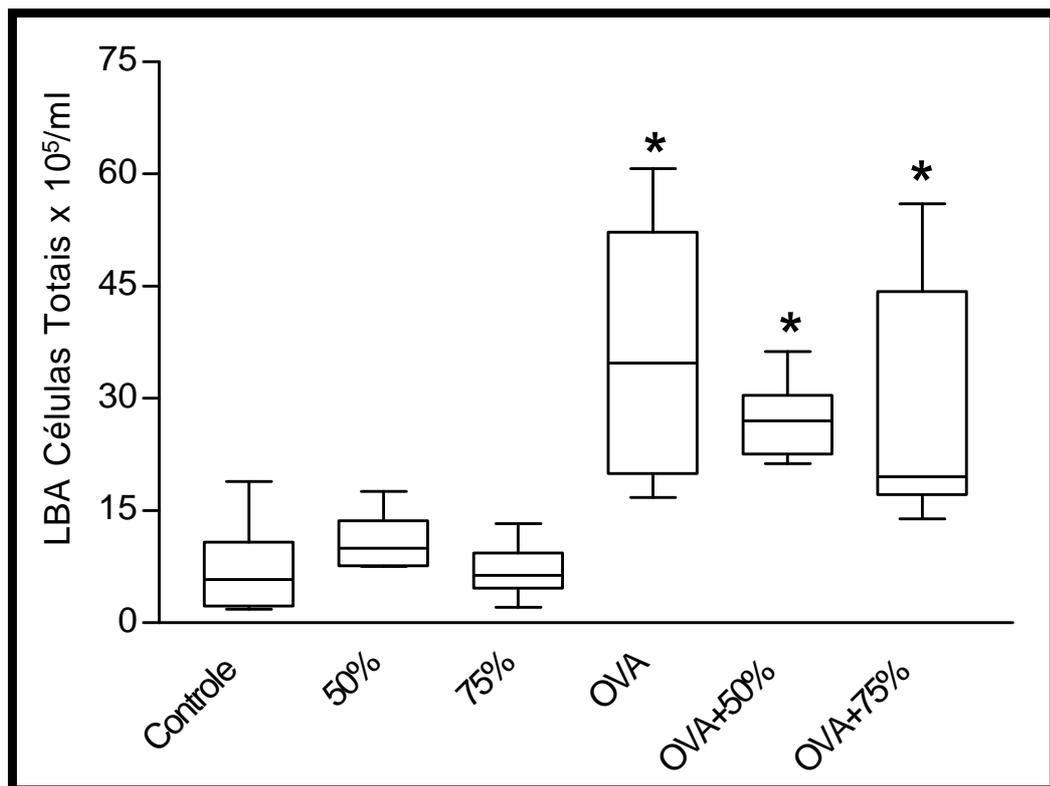


Figura 6 – Efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade leve ou moderada sobre o número de células totais no LBA. Valores expressos em *box plot* (a linha media do *box* define a mediana, as linhas terminais do *box* representam os percentis 25 e 75% e as linhas terminais da barra de erro representam os percentis 10 e 90%). Os grupos estão descritos na Figura 1. * $p < 0.001$ quando comparado com os grupos Controle, 50% e 75%.

Não foram observadas diferenças no número de eosinófilos no LBA entre os grupos não sensibilizados (Figura 7). A sensibilização à OVA aumentou em aproximadamente 03 vezes o número de eosinófilos no LBA quando comparado aos grupos não sensibilizados (* $p < 0,001$). Este aumento foi totalmente inibido quando os animais sensibilizados à OVA foram submetidos ao treinamento físico de intensidade leve ou moderada (Figura 7).

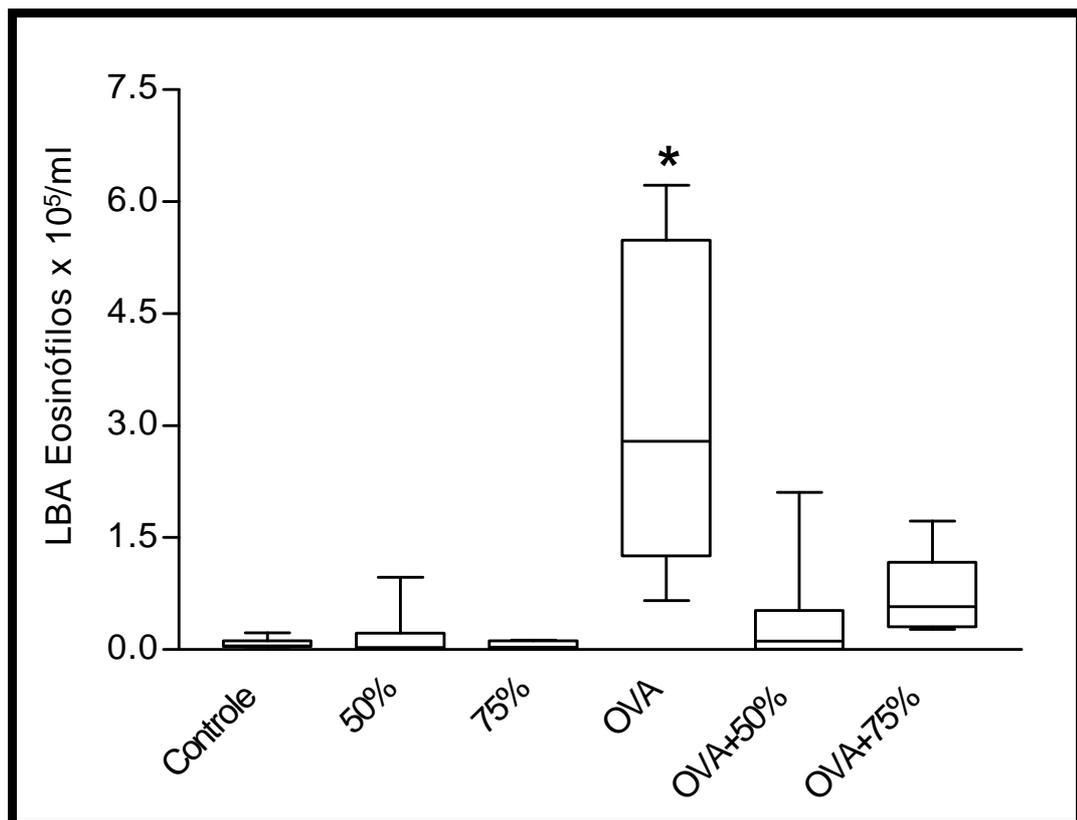


Figura 7 – Efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade leve ou moderada sobre o número de eosinófilos no LBA. Valores expressos em *box plot* (detalhes descritos na Figura 6). Os grupos estão descritos na Figura 1. * $p < 0,001$ quando comparado com todos os demais grupos.

Nem o treinamento físico aeróbio nem a sensibilização alérgica crônica desencadearam alteração no número de neutrófilos no LBA e não foi observada diferença entre todos os grupos (Figura 8) ($p>0,05$).

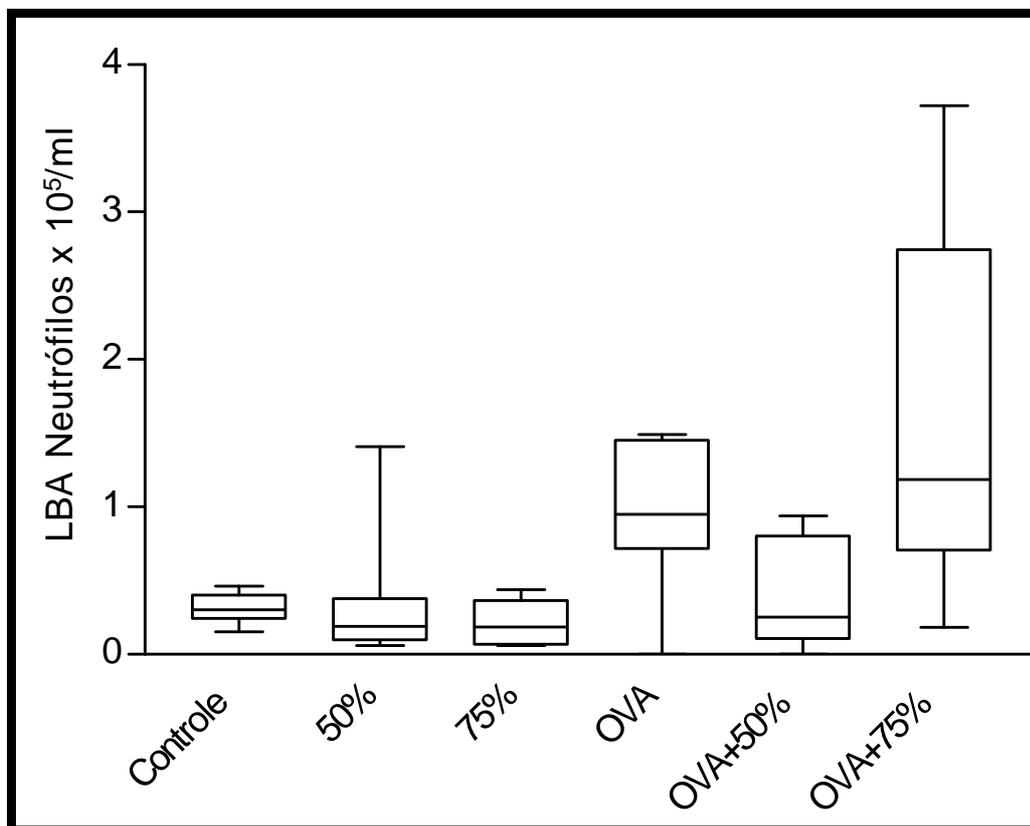


Figura 8 – Efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade leve ou moderada sobre o número de neutrófilos no LBA. Valores expressos em *box plot* (detalhes descritos na Figura 6). Os grupos estão descritos na Figura 1. Não foram encontradas diferenças no número de neutrófilos no lavado broncoalveolar quando comparados todos os grupos.

O treinamento físico de intensidade leve ou moderada em animais não sensibilizados não modificou o número total de células no LBA. (Figura 9). A sensibilização à OVA aumentou em aproximadamente 03 vezes o número de células mononucleares no LBA quando comparado aos grupos não sensibilizados (* $p < 0,001$). O treinamento físico de intensidade leve e moderada não modificou o aumento de migração de células mononucleares induzida pela sensibilização alérgica crônica (Figura 9).

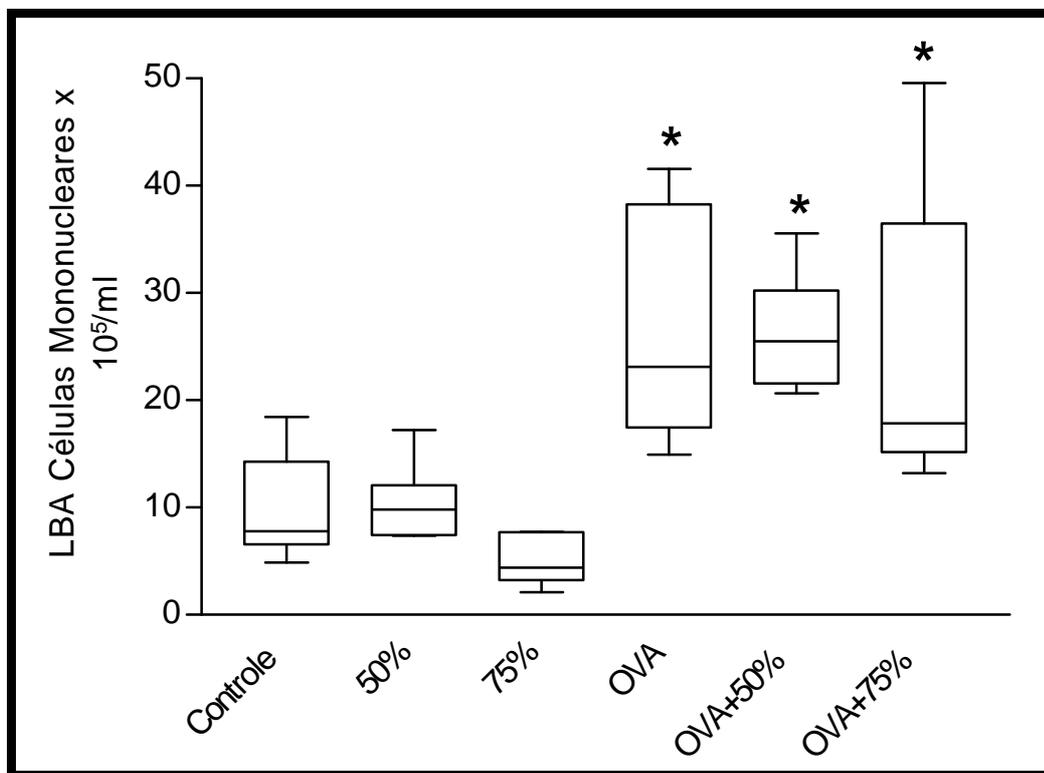


Figura 9 – Efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade leve ou moderada sobre o número de células mononucleares no LBA. Valores expressos em *box plot* (detalhes descritos na Figura 6). Os grupos estão descritos na Figura 1. * $p < 0,001$ quando comparado com os grupos Controle, 50% e 75%.

O treinamento físico de intensidade leve ou moderada em animais não sensibilizados não modificou a densidade peribrônquica de células mononucleares. (Figura 10). A sensibilização à OVA aumentou em aproximadamente 03 vezes a densidade peribrônquica de células mononucleares quando comparado aos grupos não sensibilizados (* $p < 0,001$). O treinamento físico de intensidade leve e moderada não modificou o aumento da densidade peribrônquica de células mononucleares induzida pela sensibilização alérgica crônica (Figura 10).

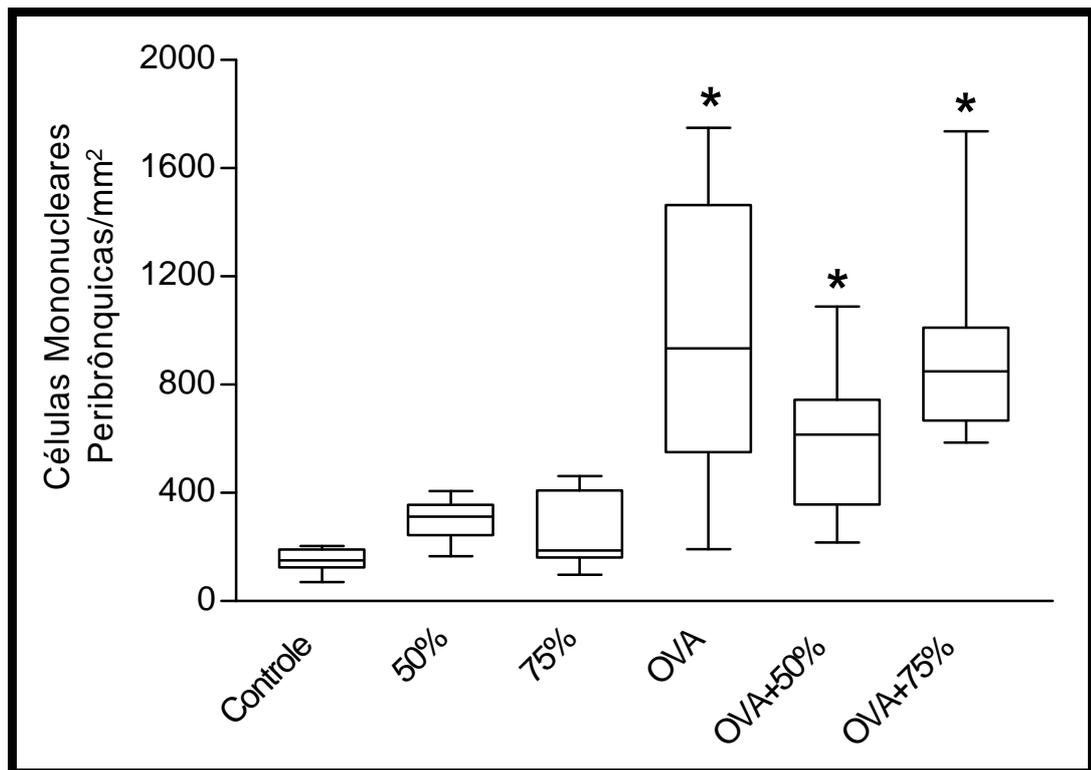


Figura 10 – Efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade leve ou moderada sobre a densidade peribrônquica de células mononucleares. Valores expressos em *box plot* (detalhes descritos na Figura 6). Os grupos estão descritos na Figura 1. * $p < 0,001$ quando comparado com os grupos Controle, 50% e 75%.

O treinamento físico de intensidade leve ou moderada em animais não sensibilizados não modificou a densidade peribrônquica de eosinófilos. (Figura 11). A sensibilização à OVA aumentou em aproximadamente 150 vezes a densidade peribrônquica de eosinófilos quando comparado aos grupos não sensibilizados ($*p<0,001$). Este aumento foi quase totalmente inibido quando os animais sensibilizados à OVA foram submetidos ao treinamento físico de intensidade leve ou moderada (Figura 11).

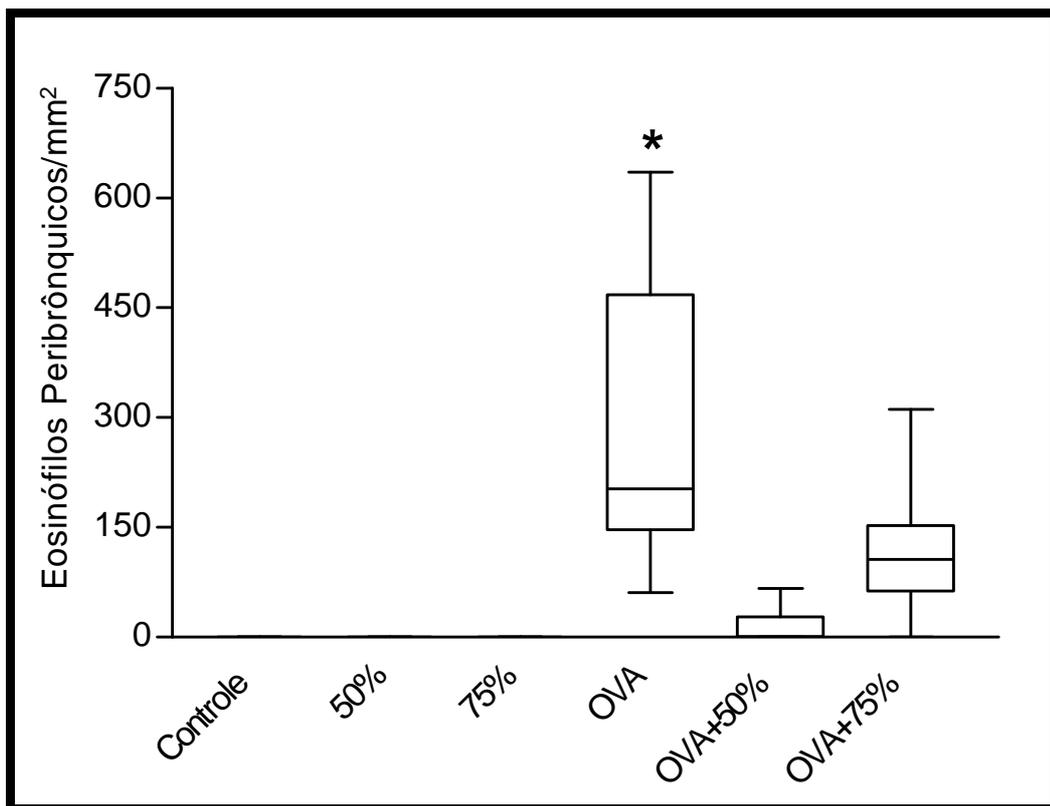


Figura 11 – Efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade leve ou moderada sobre a densidade peribrônquica de eosinófilos. Valores expressos em *box plot* (detalhes descritos na Figura 6). Os grupos estão descritos na Figura 1. $*p<0,001$ quando comparado com todos os demais grupos.

O treinamento físico de intensidade leve ou moderada em animais não sensibilizados não modificou a densidade peribrônquica de células inflamatórias positivas para IL-4 e IL-5 (respectivamente, figuras 12 e 13). A sensibilização à OVA aumentou em aproximadamente 500 vezes a densidade peribrônquica de células inflamatórias positivas para IL-4 e IL-5 quando comparado aos grupos não sensibilizados (* $p < 0,001$). Estes aumentos foram quase totalmente inibidos quando os animais sensibilizados à OVA foram submetidos ao treinamento físico de intensidade leve ou moderada (Figura 12 e 13).

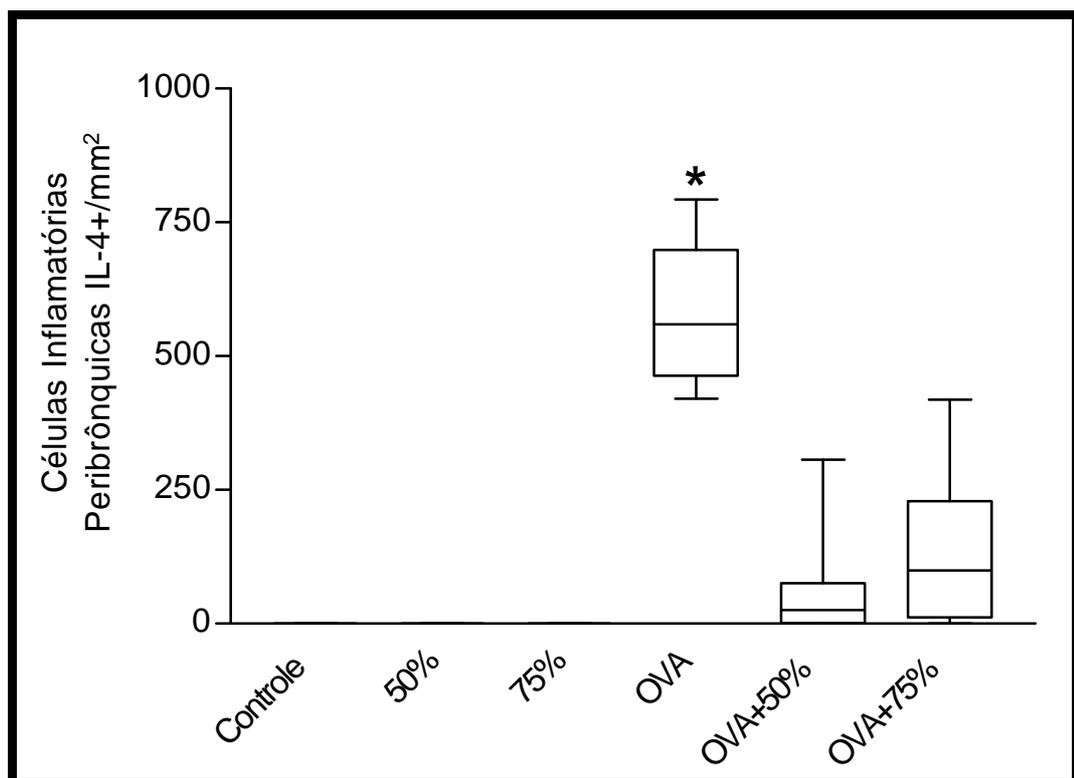


Figura 12 – Efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade leve ou moderada sobre a densidade peribrônquica de células inflamatórias positivas para IL-4. Valores expressos em *box plot* (detalhes descritos na Figura 6). Os grupos estão descritos na Figura 1. * $p < 0,001$ quando comparado com todos os demais grupos.

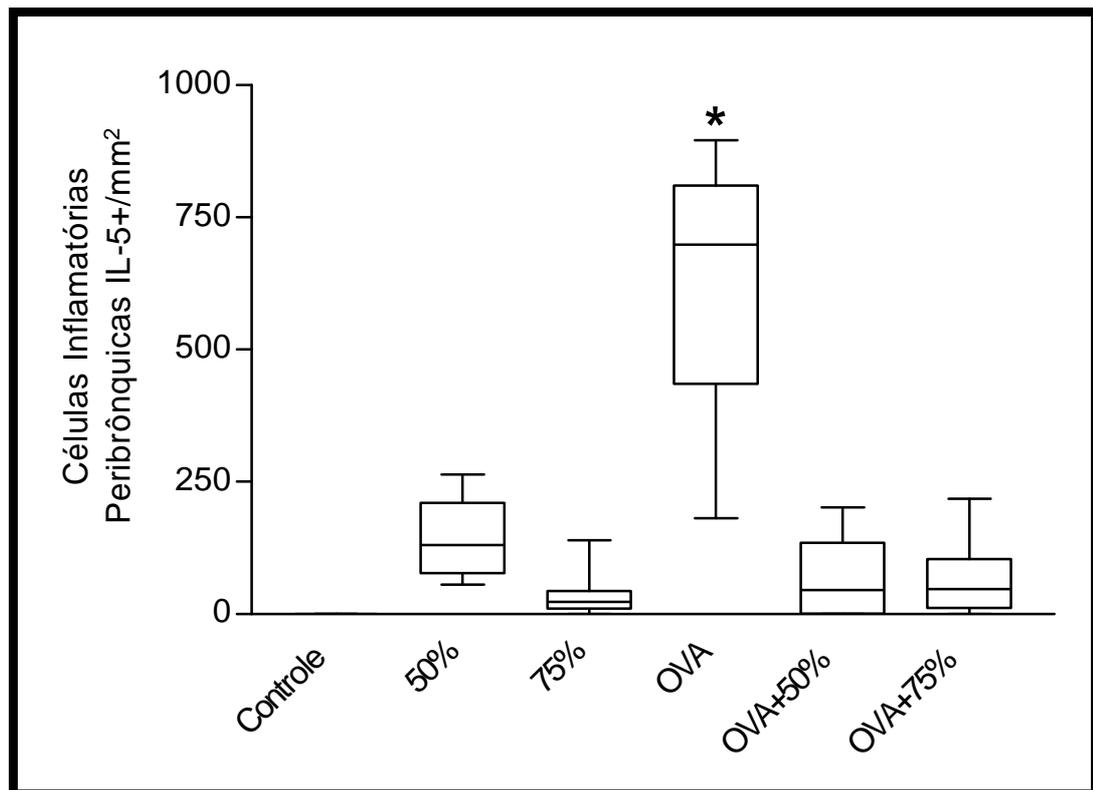


Figura 13 – Efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade leve ou moderada sobre a densidade peribrônquica de células inflamatórias positivas para IL-5. Valores expressos em *box plot* (detalhes descritos na Figura 6). Os grupos estão descritos na Figura 1. * $p < 0,001$ quando comparado com todos os demais grupos.

O treinamento físico de intensidade leve ou moderada em animais não sensibilizados não modificou a densidade peribrônquica de células inflamatórias positivas para IL-2 e IFN-gama (respectivamente, figuras 14 e 15). A sensibilização também não aumentou a densidade peribrônquica de células inflamatórias positivas para IL-2 e IFN-gama quando comparado aos grupos não sensibilizados.

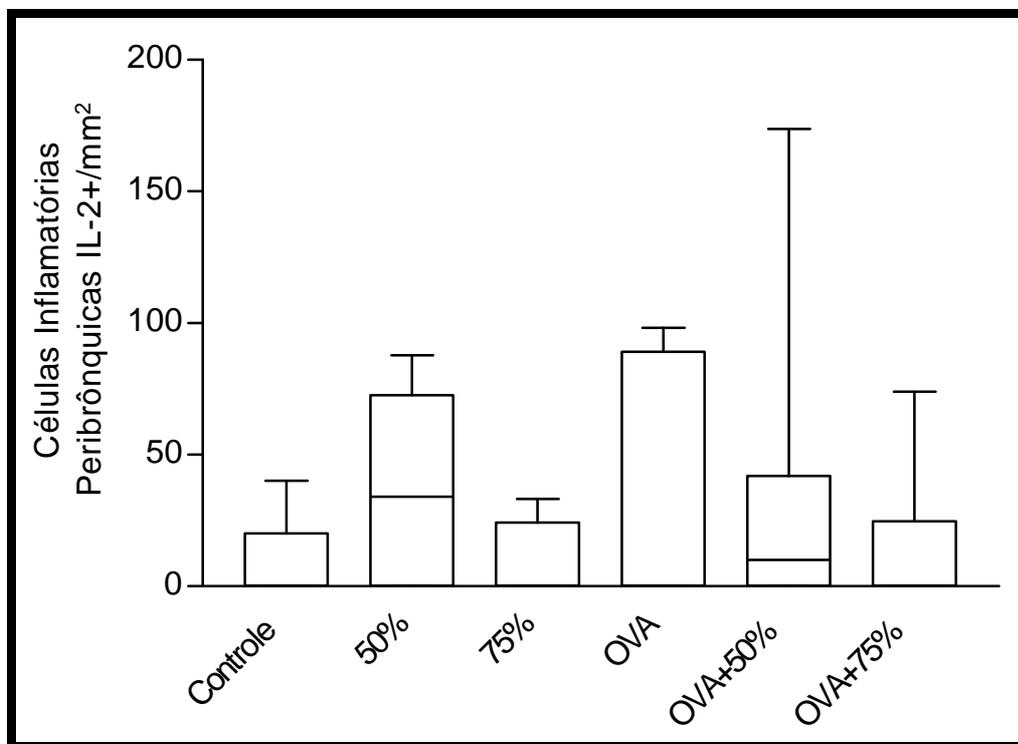


Figura 14 – Efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade leve ou moderada sobre a densidade peribrônquica de células inflamatórias positivas para IL-2. Valores expressos em *box plot* (detalhes descritos na Figura 6). Os grupos estão descritos na Figura 1. Não foram encontradas diferenças entre os grupos.

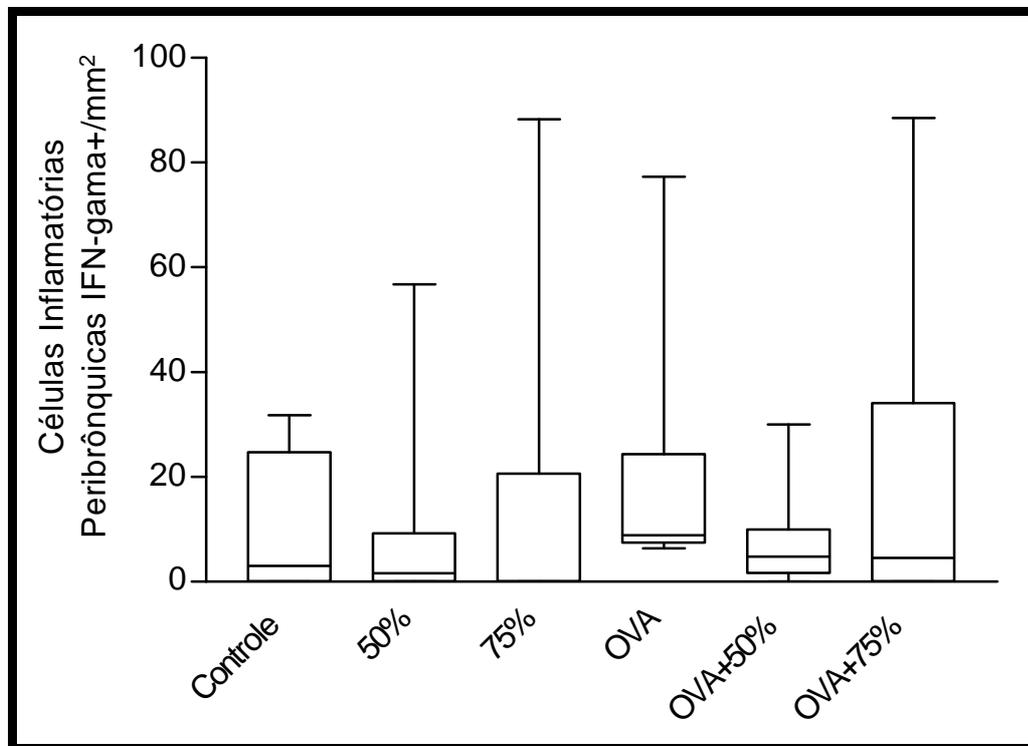


Figura 15 – Efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade leve ou moderada sobre a densidade peribrônquica de células inflamatórias positivas para IFN-gama. Valores expressos em *box plot* (detalhes descritos na Figura 6). Os grupos estão descritos na Figura 1. Não foram encontradas diferenças entre os grupos.

O treinamento físico de intensidade leve ou moderada em animais não sensibilizados não modificou a proporção de volume de fibras colágenas e elásticas nas vias aéreas (respectivamente, figuras 16 e 17). A sensibilização à OVA aumentou em aproximadamente 03 e 1,5 vezes (respectivamente) a proporção de volume de fibras colágenas e elásticas nas vias aéreas quando comparado aos grupos não sensibilizados (* $p < 0,001$). Estes aumentos foram totalmente inibidos quando os animais sensibilizados à OVA foram submetidos ao treinamento físico de intensidade leve ou moderada (Figura 16 e 17).

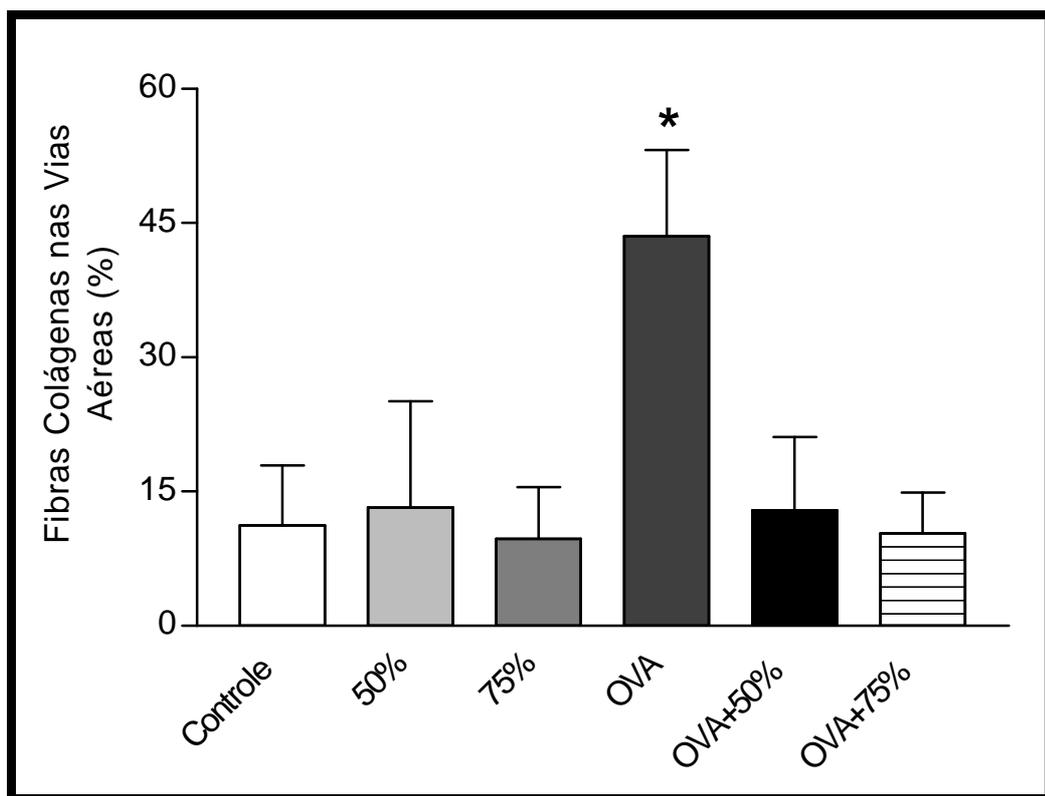


Figura 16 – Efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade leve ou moderada sobre a proporção de volume de fibras colágenas nas vias aéreas. Valores expressos como média e desvio padrão. Os grupos estão descritos na Figura 1. * $p < 0,001$ quando comparado com todos os demais grupos.

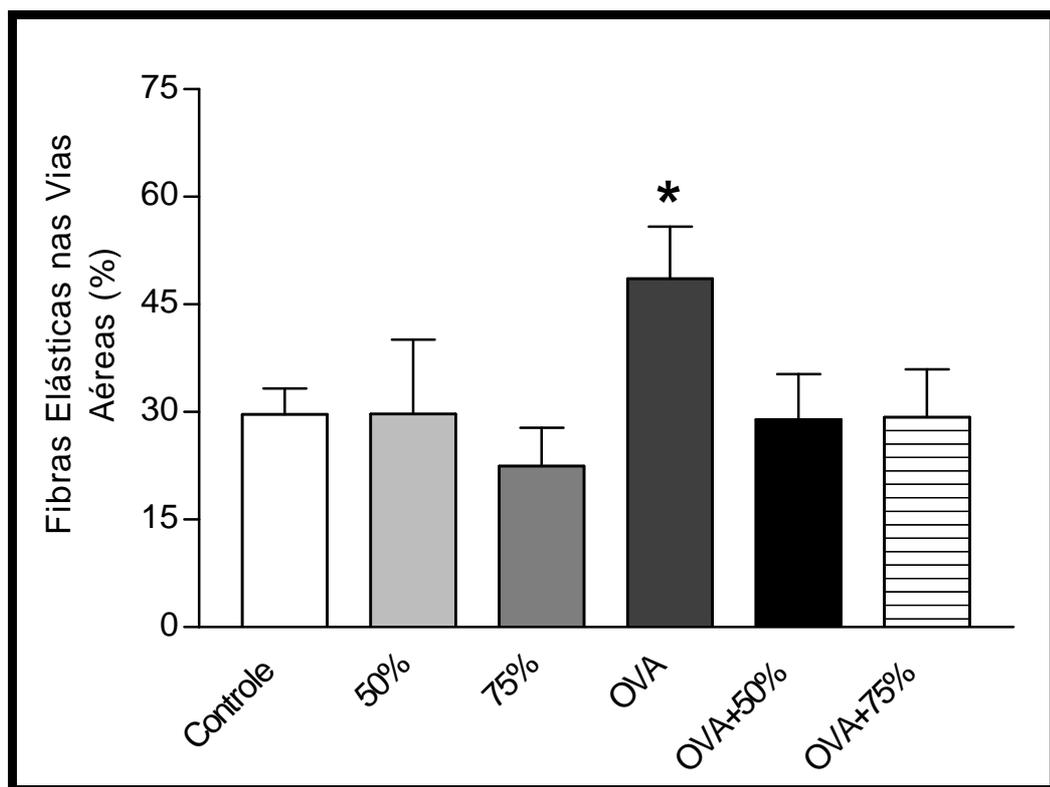


Figura 17 – Efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade leve ou moderada sobre a proporção de volume de fibras elásticas nas vias aéreas. Valores expressos como média e desvio padrão. Os grupos estão descritos na Figura 1. * $p < 0,001$ quando comparado com todos os demais grupos.

O treinamento físico de intensidade leve ou moderada em animais não sensibilizados não modificou o índice de espessura do músculo liso e da camada epitelial das vias aéreas (respectivamente, figuras 18 e 19). A sensibilização à OVA aumentou em aproximadamente 03 vezes o índice de espessura do músculo liso e da camada epitelial das vias aéreas quando comparado aos grupos não sensibilizados ($*p<0,001$). Estes aumentos foram totalmente inibidos quando os animais sensibilizados à OVA foram submetidos ao treinamento físico de intensidade leve ou moderada (Figura 18 e 19).

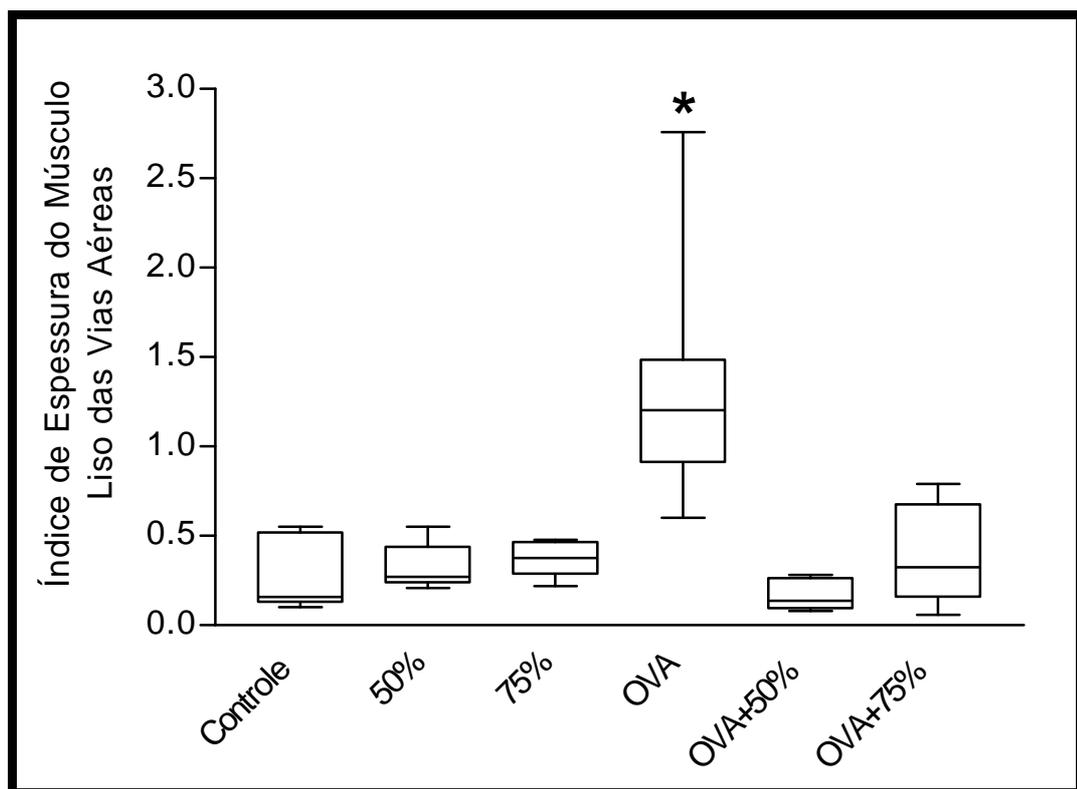


Figura 18 – Efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade leve ou moderada sobre o índice de espessura do músculo liso das vias aéreas. Valores expressos em *box plot* (detalhes descritos na Figura 6). Os grupos estão descritos na Figura 1. $*p<0,001$ quando comparado com todos os demais grupos.

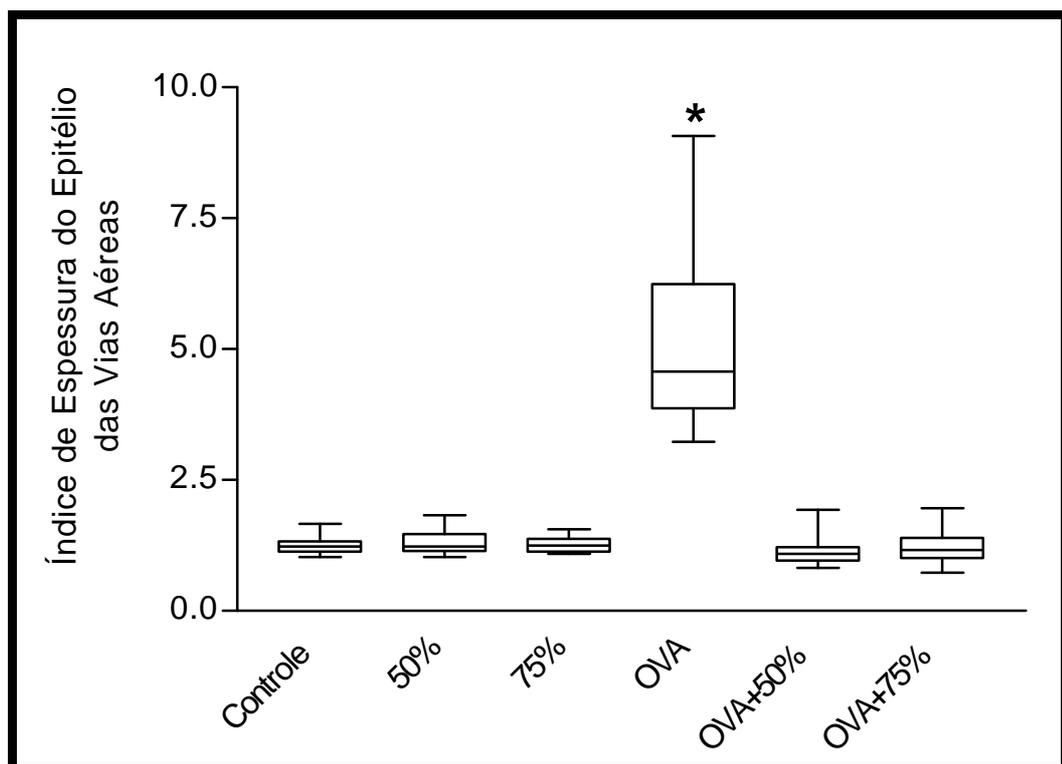


Figura 19 – Efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade leve ou moderada sobre o índice de espessura da camada epitelial das vias aéreas. Valores expressos em *box plot* (detalhes descritos na Figura 6). Os grupos estão descritos na Figura 1. * $p < 0,001$ quando comparado com todos os demais grupos.

O treinamento físico de intensidade leve ou moderada em animais não sensibilizados não modificou o índice de broncoconstrição (Figura 20). A sensibilização à OVA aumentou o índice de broncoconstrição quando comparado aos grupos não sensibilizados (* $p < 0,05$). Este aumento foi totalmente inibido quando os animais sensibilizados à OVA foram submetidos ao treinamento físico de intensidade leve ou moderada (Figura 20).

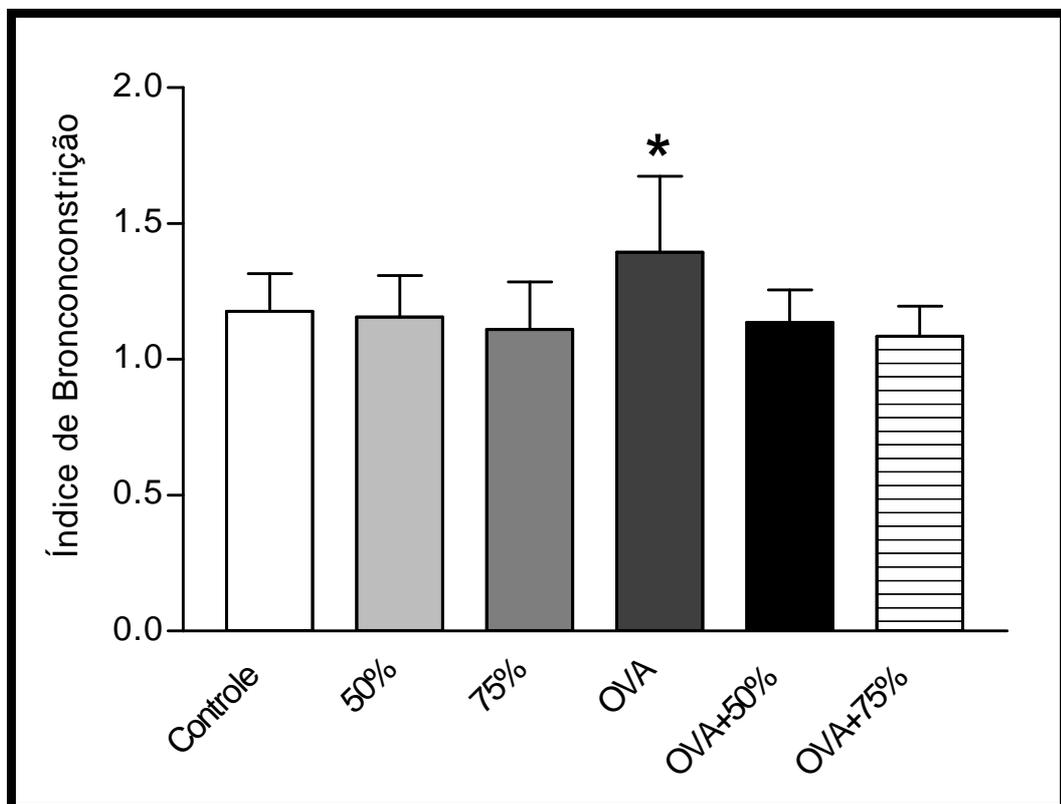


Figura 20 – Efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade leve ou moderada sobre o índice de broncoconstrição. Valores expressos como média e desvio padrão. Os grupos estão descritos na Figura 1. * $p < 0,05$ quando comparado com todos os demais grupos.

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

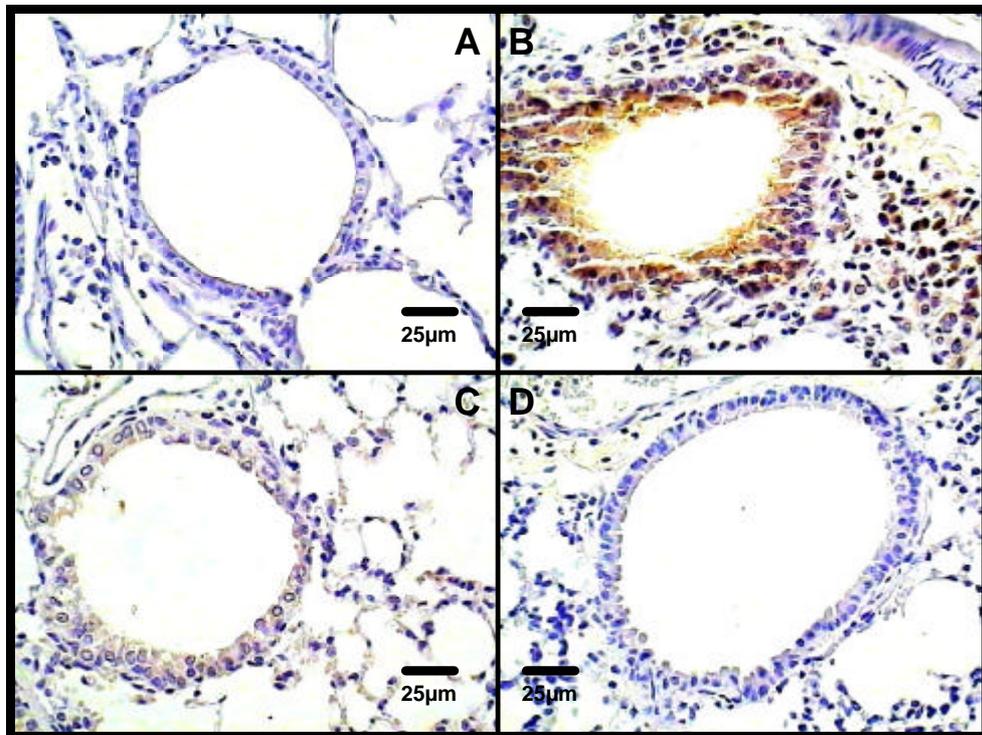


Figura 21 – A: Controle; B: OVA; C: OVA+50%; D: OVA+75%.

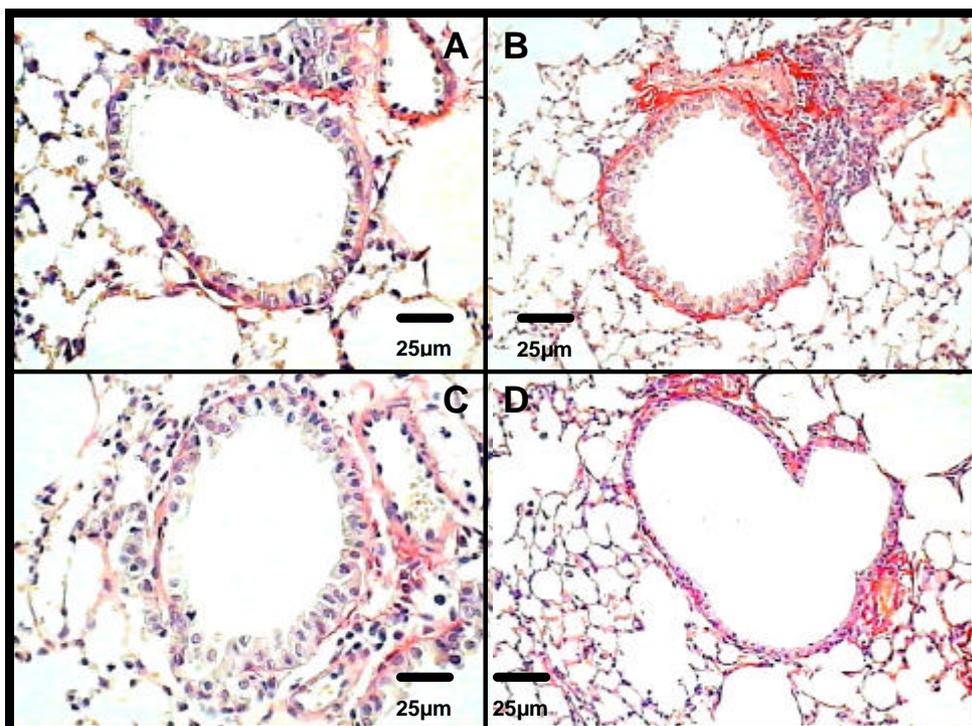


Figura 22 – A = Controle; B = OVA; C = OVA+50%; D = OVA+75%.

O treinamento físico de intensidade leve ou moderada em animais não sensibilizados não modificou a densidade perivascular de células mononucleares. (Figura 23). A sensibilização à OVA aumentou em aproximadamente 05 vezes a densidade perivascular de células mononucleares quando comparado aos grupos não sensibilizados (* $p < 0,001$). O treinamento físico de intensidade leve e moderada não modificou o aumento da densidade perivascular de células mononucleares induzida pela sensibilização alérgica crônica (Figura 23).

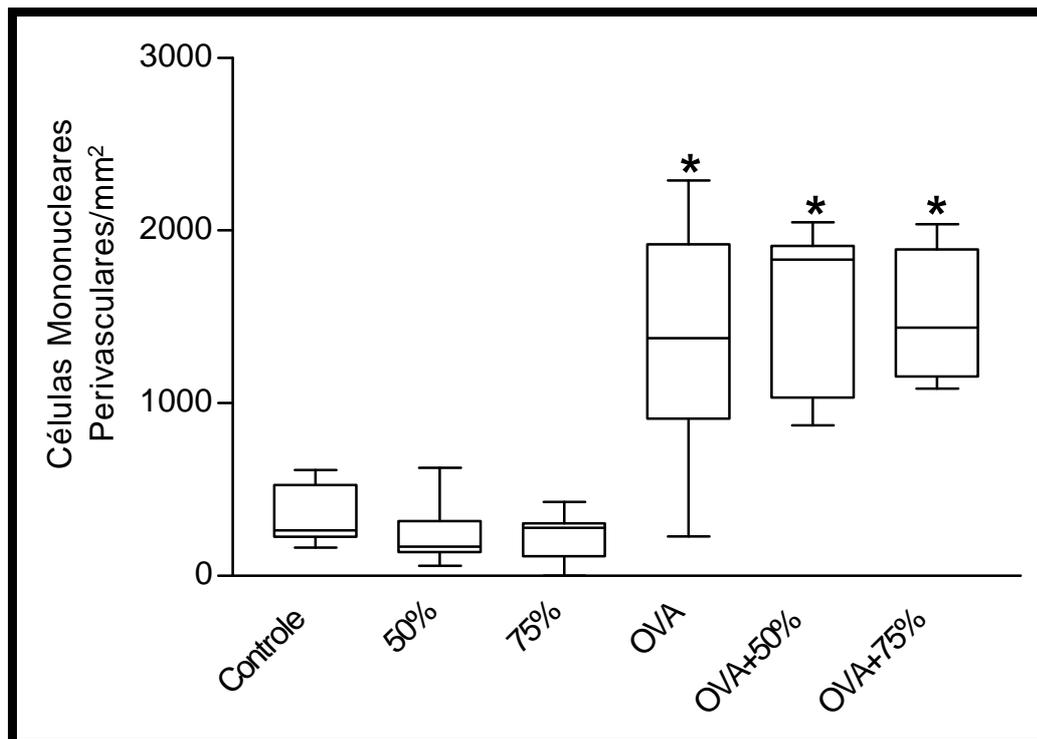


Figura 23 – Efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade leve ou moderada sobre a densidade perivascular de células mononucleares. Valores expressos em *box plot* (detalhes descritos na Figura 6). Os grupos estão descritos na Figura 1. * $p < 0,001$ quando comparado com os grupos Controle, 50% e 75%.

O treinamento físico de intensidade leve ou moderada em animais não sensibilizados não modificou a densidade perivascular de eosinófilos. (Figura 24). A sensibilização à OVA aumentou em aproximadamente 350 vezes a densidade perivascular de eosinófilos quando comparado aos grupos não sensibilizados ($*p<0,001$). Este aumento foi inibido quando os animais sensibilizados à OVA foram submetidos ao treinamento físico de intensidade leve ou moderada (Figura 24).

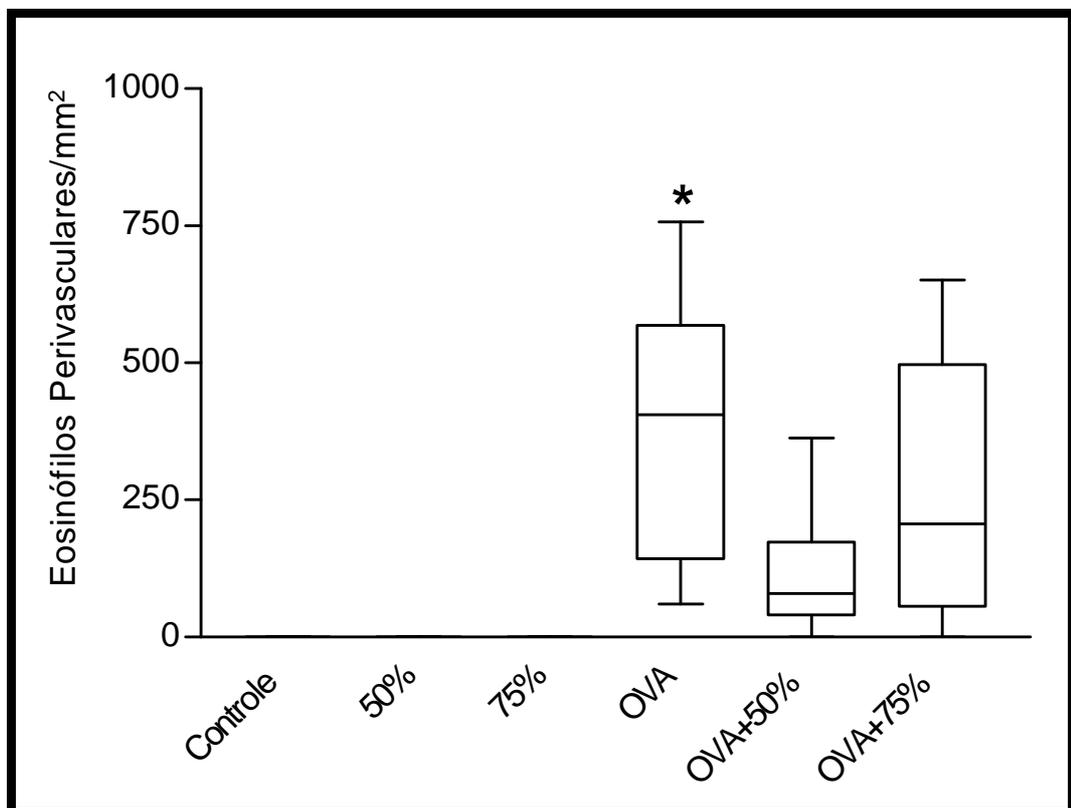


Figura 24 – Efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade leve ou moderada sobre a densidade perivascular de eosinófilos. Valores expressos em *box plot* (detalhes descritos na Figura 6). Os grupos estão descritos na Figura 1. $*p<0,001$ quando comparado com todos os demais grupos.

O treinamento físico de intensidade leve ou moderada em animais não sensibilizados não modificou a densidade perivascular de células inflamatórias positivas para IL-4 e IL-5 (respectivamente, figuras 25 e 26). A sensibilização à OVA aumentou em aproximadamente 1800 vezes a densidade perivascular de células inflamatórias positivas para IL-4 e IL-5 quando comparado aos grupos não sensibilizados (* $p < 0,001$). Estes aumentos foram totalmente inibidos quando os animais sensibilizados à OVA foram submetidos ao treinamento físico de intensidade leve ou moderada (Figura 25 e 26).

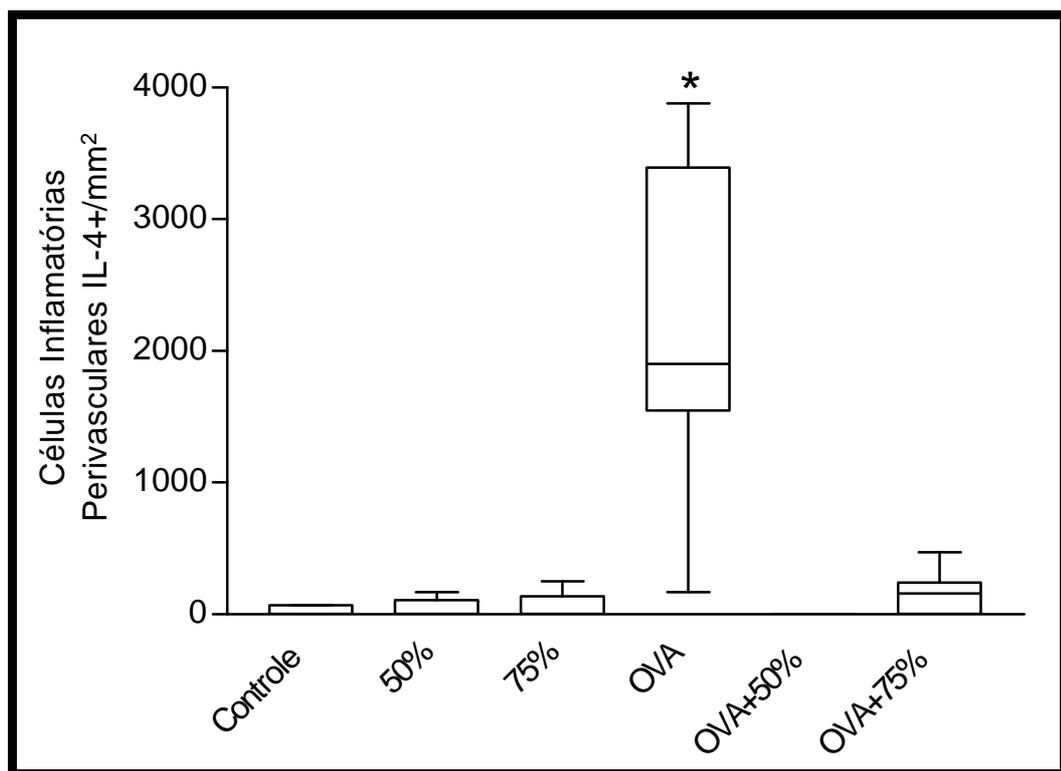


Figura 25 – Efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade leve ou moderada sobre a densidade perivascular de células inflamatórias positivas para IL-4. Valores expressos em *box plot* (detalhes descritos na Figura 6). Os grupos estão descritos na Figura 1. * $p < 0,001$ quando comparado com todos os demais grupos.

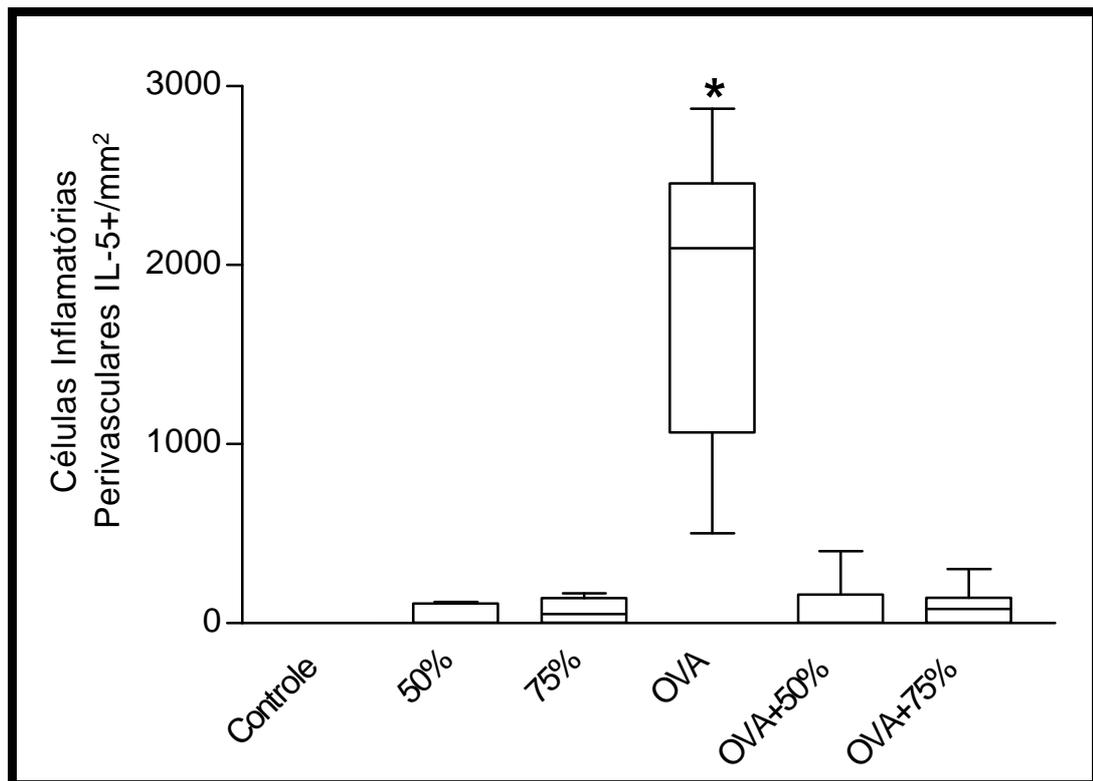


Figura 26 – Efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade leve ou moderada sobre a densidade perivascular de células inflamatórias positivas para IL-5. Valores expressos em *box plot* (detalhes descritos na Figura 6). Os grupos estão descritos na Figura 1. * $p < 0,001$ quando comparado com todos os demais grupos.

O treinamento físico de intensidade leve ou moderada em animais não sensibilizados não modificou a densidade perivascular de células inflamatórias positivas para IL-2 e IFN-gama (respectivamente, figuras 27 e 28). A sensibilização também não aumentou a densidade perivascular de células inflamatórias positivas para IL-2 e IFN-gama quando comparado aos grupos não sensibilizados.

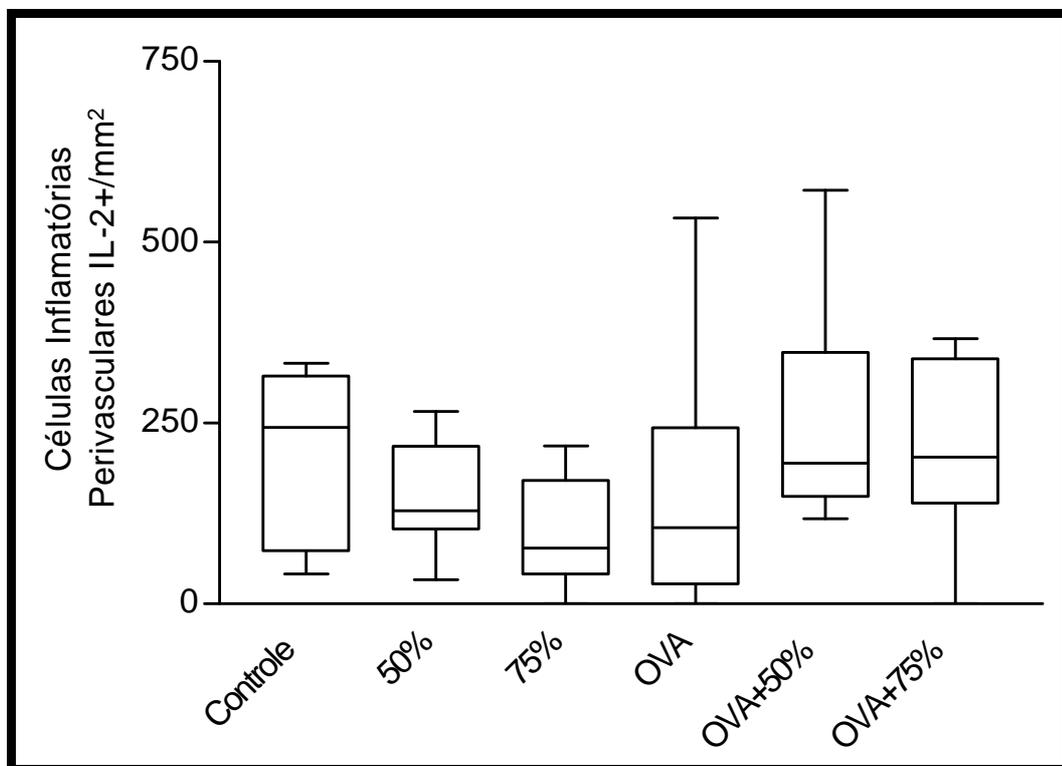


Figura 27 – Efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade leve ou moderada sobre a densidade perivascular de células inflamatórias positivas para IL-2. Valores expressos em *box plot* (detalhes descritos na Figura 6). Os grupos estão descritos na Figura 1. Não foram encontradas diferenças entre os grupos.

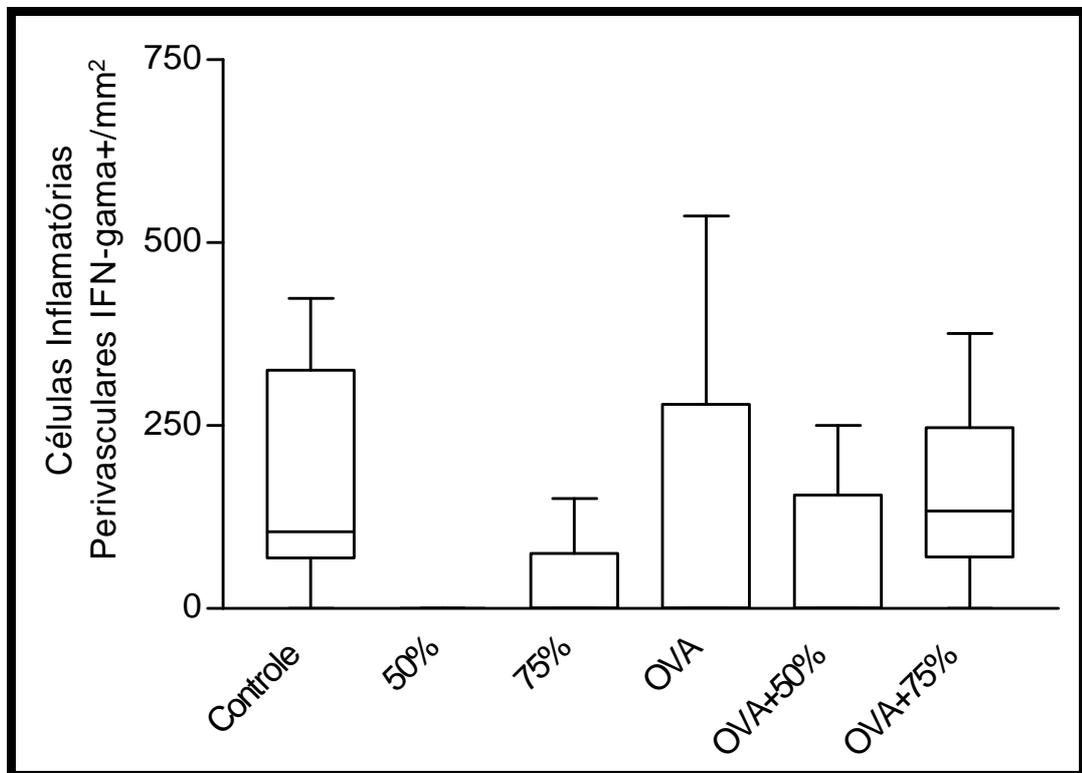


Figura 28 – Efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade leve ou moderada sobre a densidade perivascular de células inflamatórias positivas para IFN-gama. Valores expressos em *box plot* (detalhes descritos na Figura 6). Os grupos estão descritos na Figura 1. Não foram encontradas diferenças entre os grupos.

O treinamento físico de intensidade leve ou moderada em animais não sensibilizados não modificou a densidade perivascular de células inflamatórias positivas para MCP-1 (Figura 29). A sensibilização à OVA aumentou em aproximadamente 3,5 vezes a densidade perivascular de células inflamatórias positivas para MCP-1 quando comparado aos grupos não sensibilizados (* $p < 0,001$). Estes aumentos foram quase totalmente inibidos quando os animais sensibilizados à OVA foram submetidos ao treinamento físico de intensidade leve ou moderada (Figura 29).

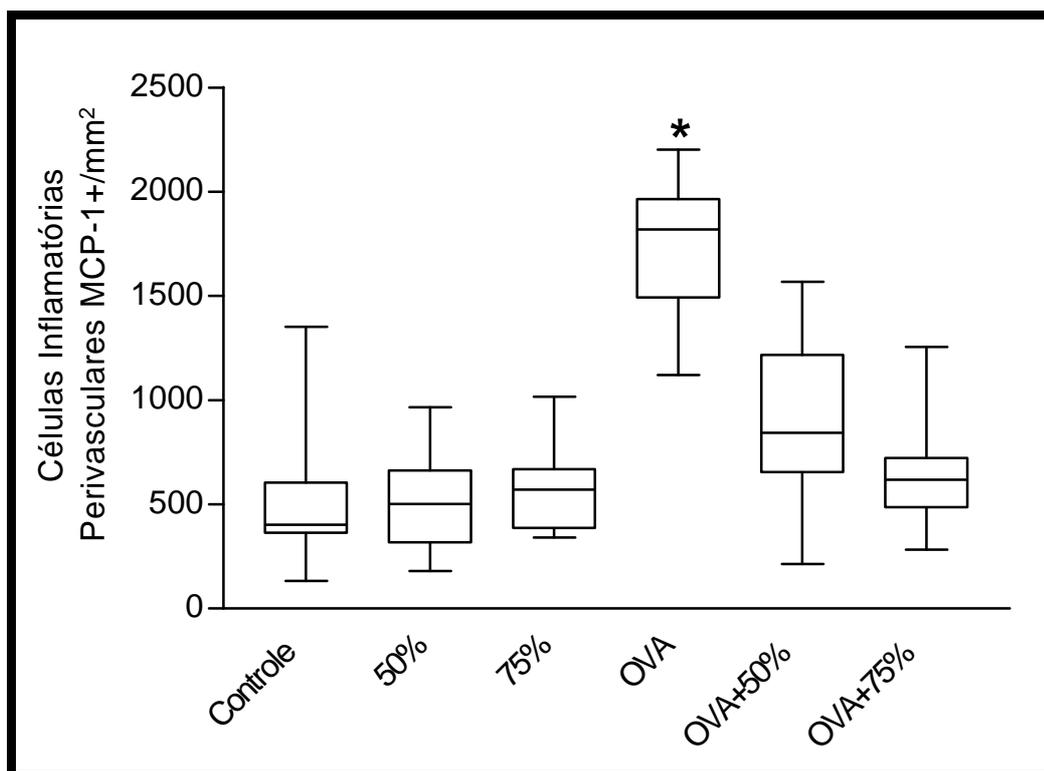


Figura 29 – Efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade leve ou moderada sobre a densidade perivascular de células inflamatórias positivas para MCP-1. Valores expressos em *box plot* (detalhes descritos na Figura 6). Os grupos estão descritos na Figura 1. * $p < 0,001$ quando comparado com todos os demais grupos.

O treinamento físico de intensidade leve ou moderada em animais não sensibilizados não modificou o índice de edema perivascular (Figura 30). A sensibilização à OVA aumentou em aproximadamente 01 vez o índice de edema perivascular quando comparado aos grupos não sensibilizados (* $p < 0,05$). Este aumento foi totalmente inibido quando os animais sensibilizados à OVA foram submetidos ao treinamento físico de intensidade leve ou moderada (Figura 30).

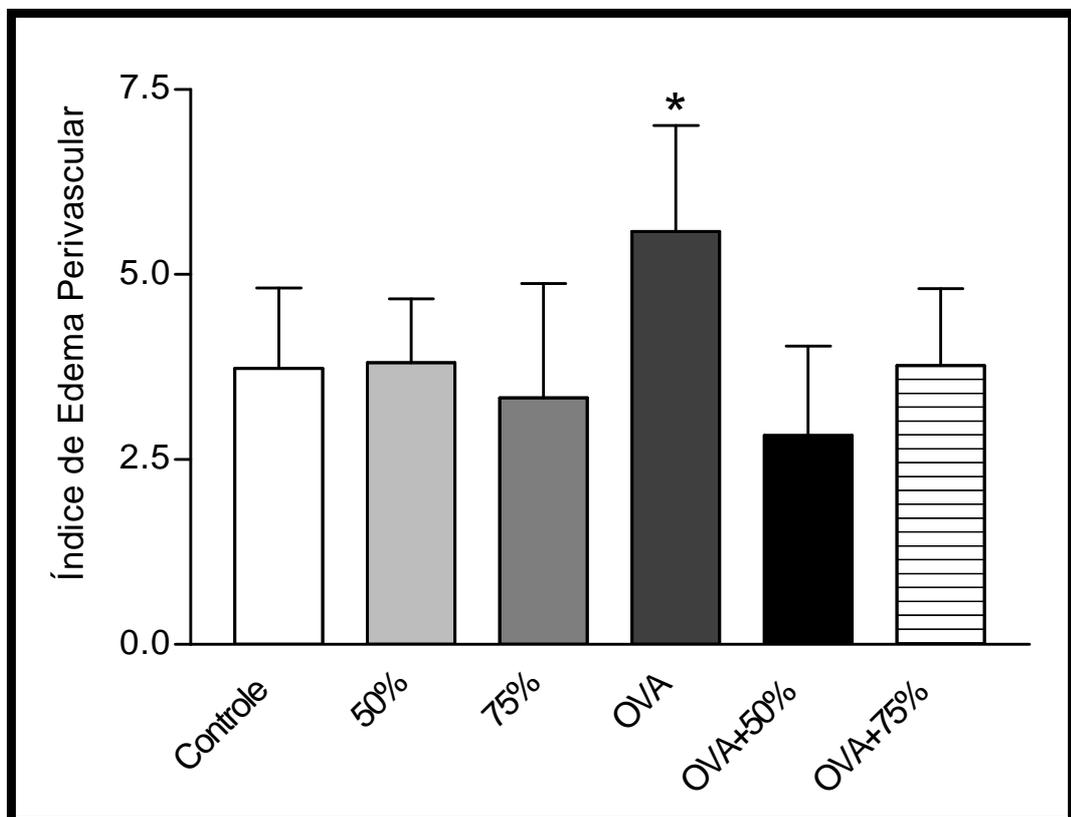


Figura 30 – Efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade leve ou moderada sobre o índice de edema perivascular. Valores expressos como média e desvio padrão. Os grupos estão descritos na Figura 1. * $p < 0,05$ quando comparado com todos os demais grupos.

O treinamento físico de intensidade leve ou moderada em animais não sensibilizados não modificou a proporção de volume de fibras colágenas e elásticas nos vasos (respectivamente, figuras 31 e 32). A sensibilização à OVA aumentou em aproximadamente 02 vezes a proporção de volume de fibras colágenas e elásticas nos vasos quando comparado aos grupos não sensibilizados (* $p < 0,001$). Estes aumentos foram totalmente inibidos quando os animais sensibilizados à OVA foram submetidos ao treinamento físico de intensidade leve ou moderada (Figura 31 e 32).

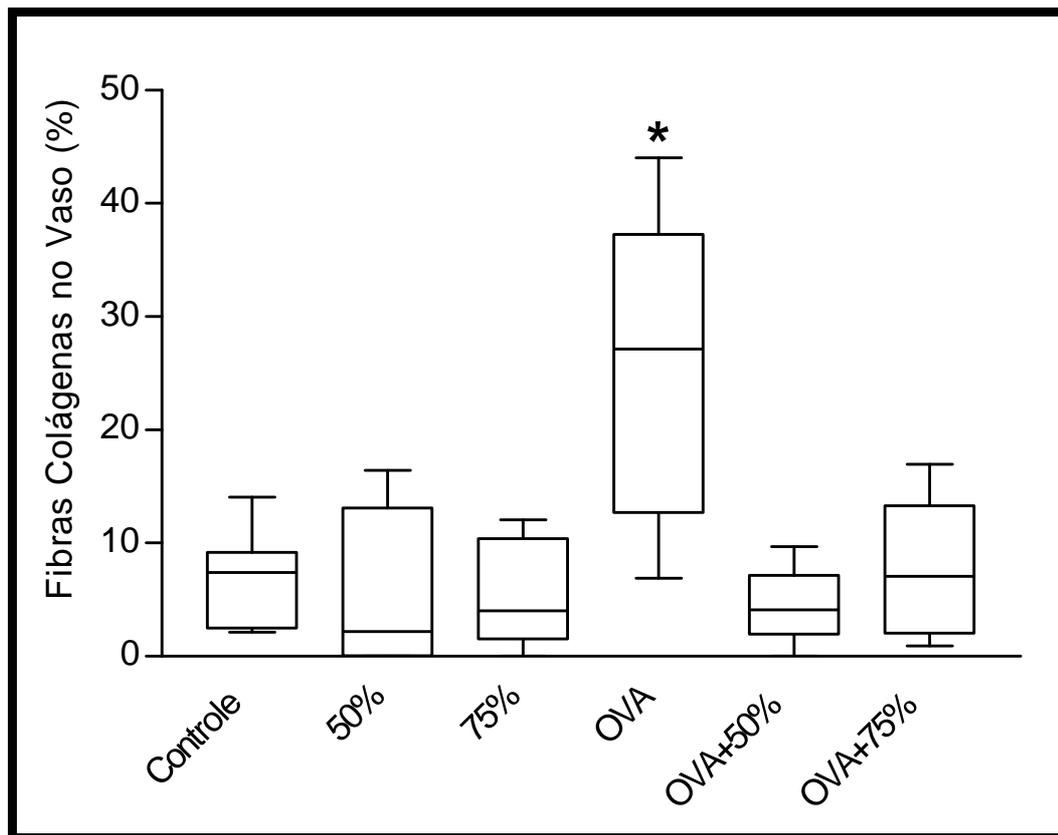


Figura 31 – Efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade leve ou moderada sobre a proporção de volume de fibras colágenas nos vasos. Valores expressos em *box plot* (detalhes descritos na Figura 6). Os grupos estão descritos na Figura 1. * $p < 0,001$ quando comparado com todos os demais grupos.

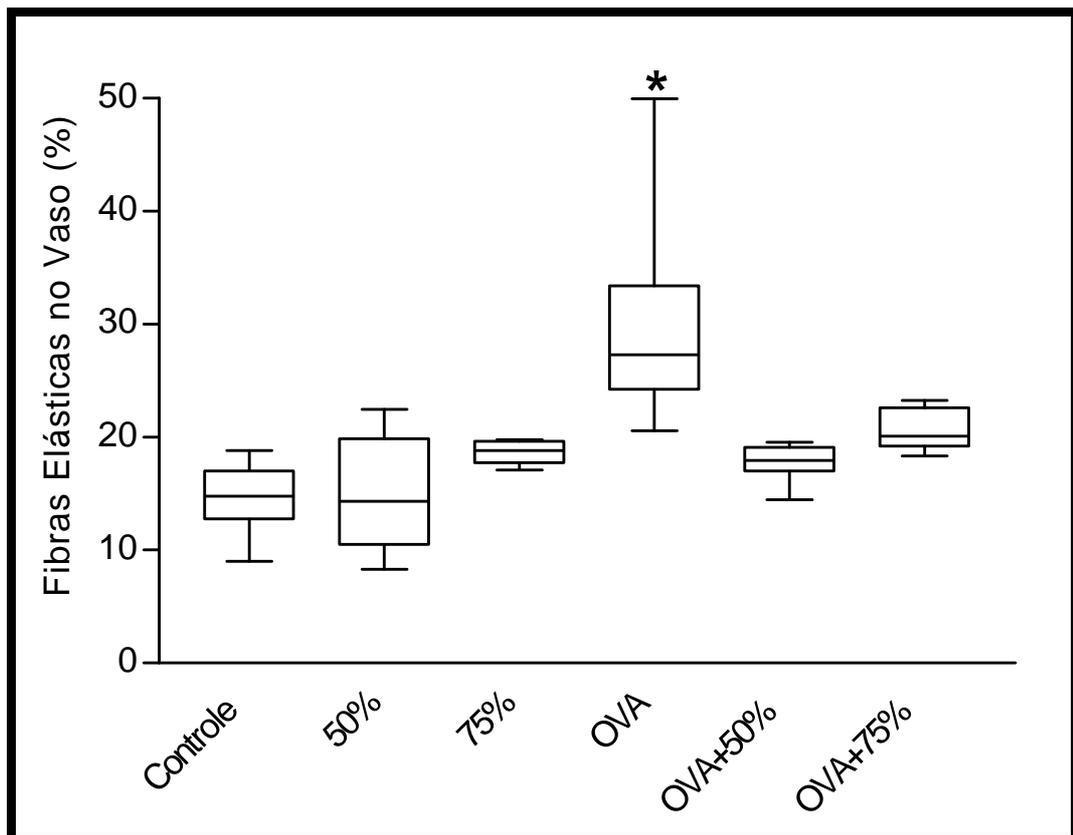


Figura 32 – Efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade leve ou moderada sobre a proporção de volume de fibras elásticas nos vasos. Valores expressos em *box plot* (detalhes descritos na Figura 6). Os grupos estão descritos na Figura 1. * $p < 0,001$ quando comparado com todos os demais grupos.

O treinamento físico de intensidade leve ou moderada em animais não sensibilizados não modificou o índice de espessura do músculo liso vascular (Figura 33). A sensibilização à OVA aumentou em aproximadamente 04 vezes o índice de espessura do músculo liso vascular quando comparado aos grupos não sensibilizados (* $p < 0,001$). Estes aumentos foram totalmente inibidos quando os animais sensibilizados à OVA foram submetidos ao treinamento físico de intensidade leve ou moderada (Figura 33).

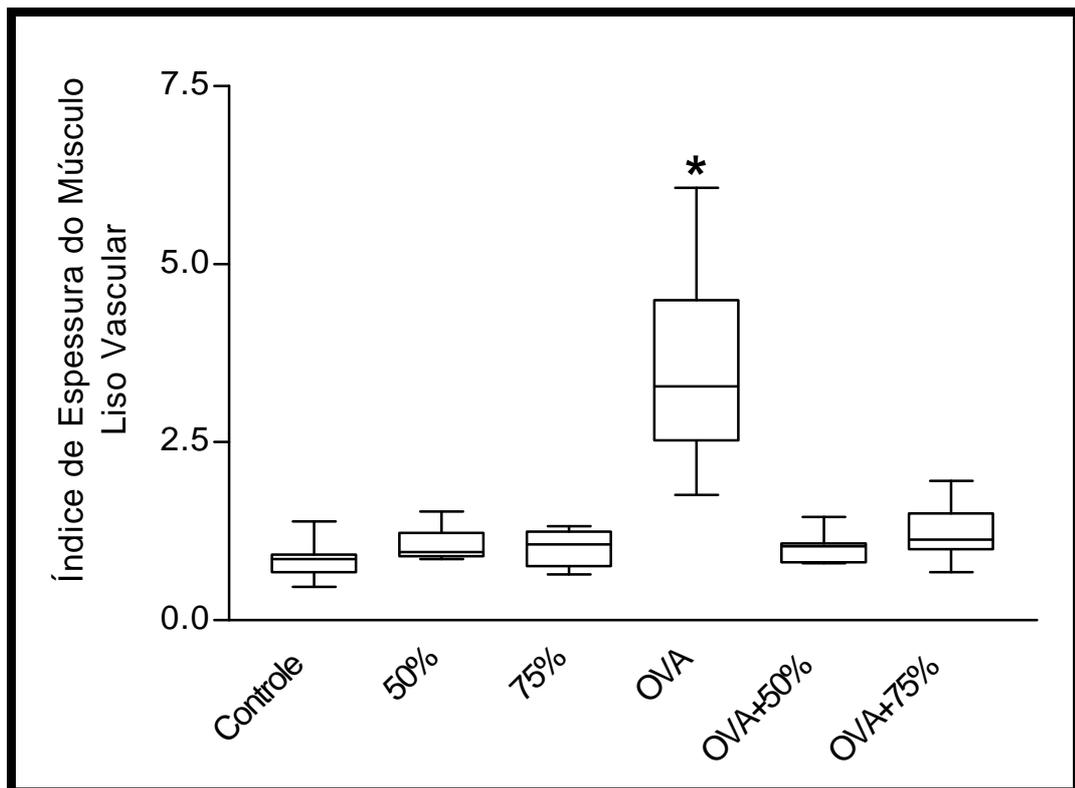


Figura 33 – Efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade leve ou moderada sobre o índice de espessura do músculo liso vascular. Valores expressos em *box plot* (detalhes descritos na Figura 6). Os grupos estão descritos na Figura 1. * $p < 0,001$ quando comparado com todos os demais grupos.

Os painéis de fotomicrografias representam, respectivamente, a expressão de células inflamatórias perivasculares positivas para MCP-1 e o conteúdo de fibras colágenas vasculares.

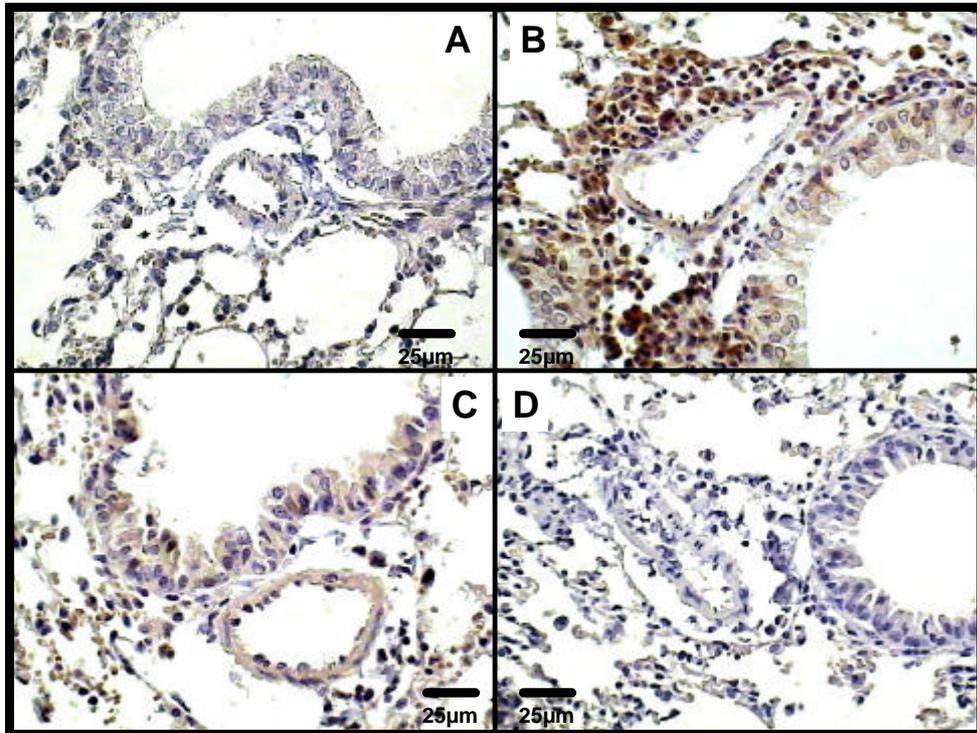


Figura 34 – A: Controle; B: OVA; C: OVA+50%; D: OVA+75%.

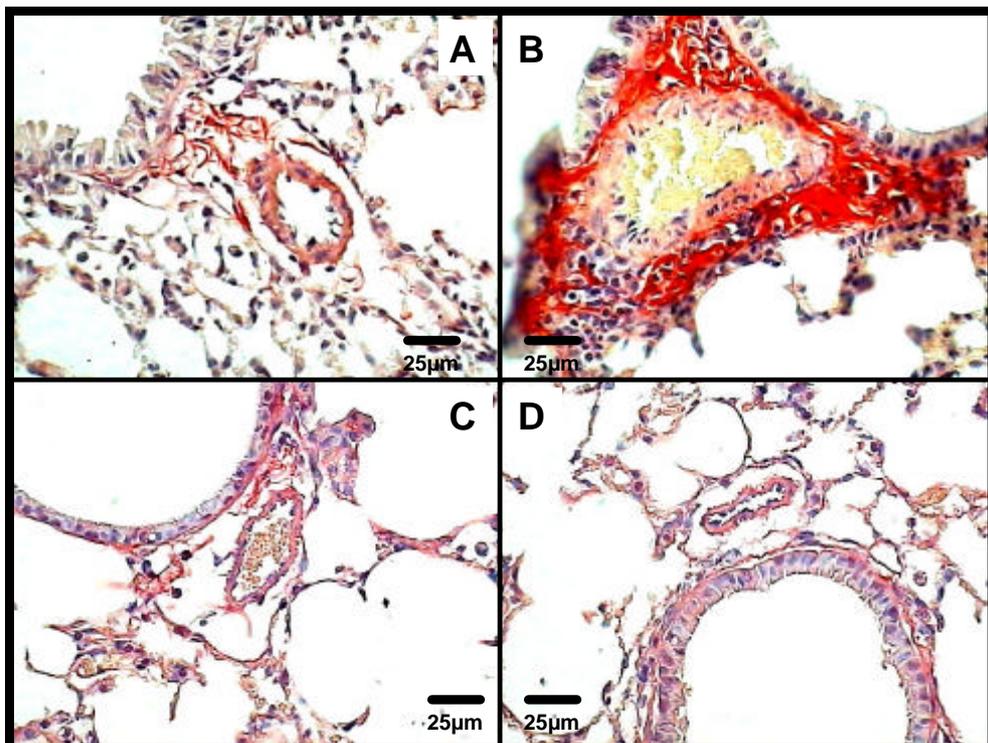


Figura 35 – A: Controle; B: OVA; C: OVA+50%; D: OVA+75%.

O treinamento físico de intensidade moderada em animais não sensibilizados não modificou a densidade parenquimal de células mononucleares. (Figura 36). Os treinamentos de intensidade leve (grupo 50%), a sensibilização à OVA (grupo OVA), e o treinamento físico aeróbio de intensidade leve e moderada em animais sensibilizados (respectivamente, grupos OVA+50% e OVA+75%) apresentaram aumentos de aproximadamente 03 vezes sobre a densidade parenquimal de células mononucleares quando comparado com os demais grupos (* $p < 0,05$).

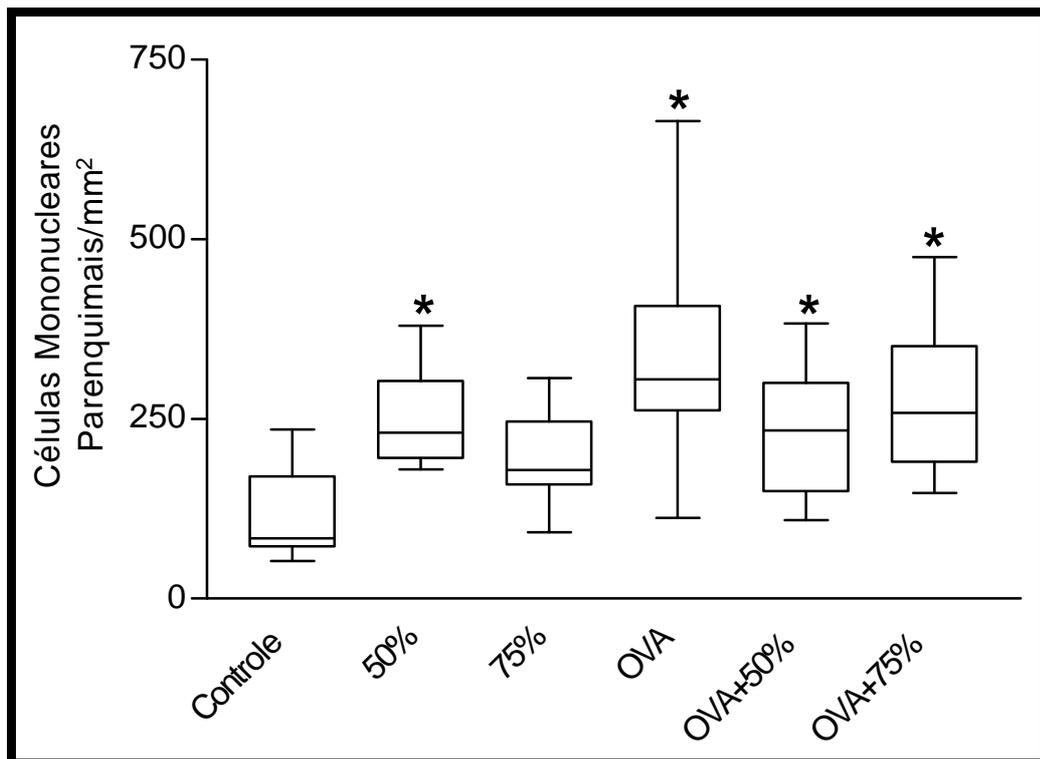


Figura 36 – Efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade leve ou moderada sobre a densidade de células mononucleares parenquimais. Valores expressos em *box plot* (detalhes descritos na Figura 6). Os grupos estão descritos na Figura 1. * $p < 0,05$ quando comparado com todos os demais grupos.

O treinamento físico de intensidade leve ou moderada em animais não sensibilizados não modificou a densidade parenquimal de eosinófilos. (Figura 37). A sensibilização à OVA aumentou em aproximadamente 10 vezes a densidade parenquimal de eosinófilos quando comparado aos grupos não sensibilizados ($*p<0,01$). Este aumento foi inibido quando os animais sensibilizados à OVA foram submetidos ao treinamento físico de intensidade leve ou moderada (Figura 37).

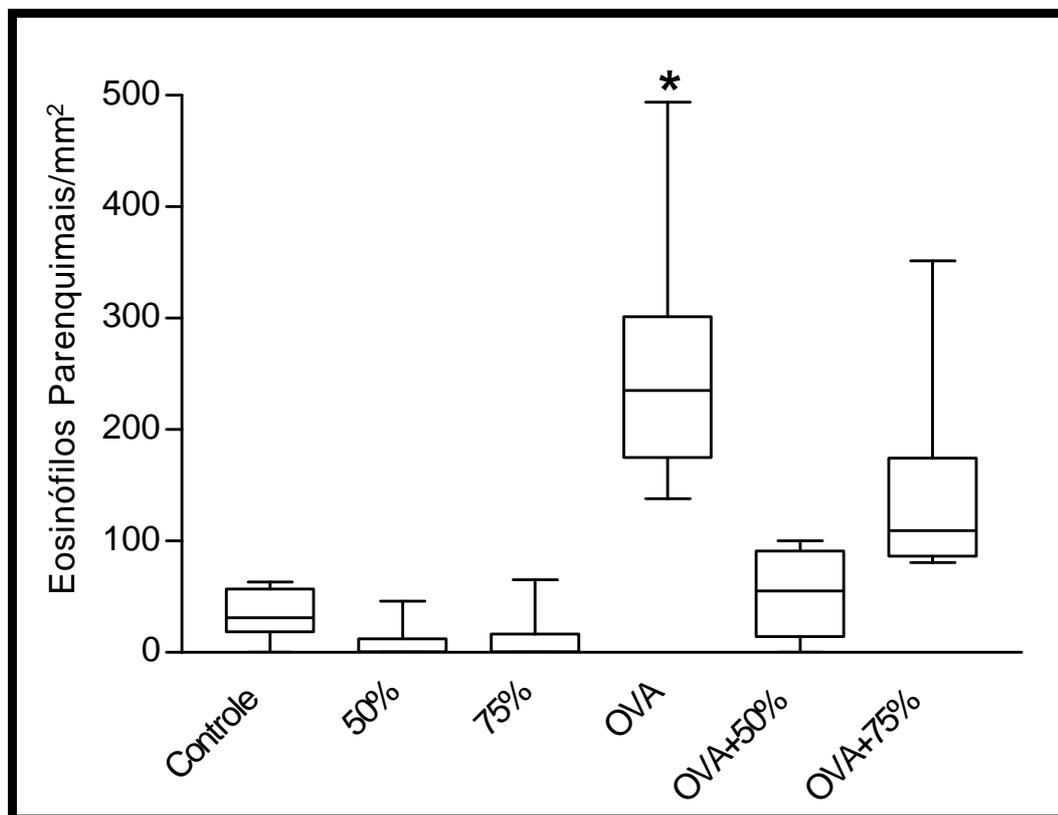


Figura 37 – Efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade leve ou moderada sobre a densidade parenquimal de eosinófilos. Valores expressos em *box plot* (detalhes descritos na Figura 6). Os grupos estão descritos na Figura 1. $*p<0,01$ quando comparado com todos os demais grupos.

O treinamento físico de intensidade leve ou moderada em animais não sensibilizados não modificou a densidade parenquimal de células inflamatórias positivas para IL-4 e IL-5 (respectivamente, figuras 38 e 39). A sensibilização à OVA aumentou em aproximadamente 250 vezes a densidade parenquimal de células inflamatórias positivas para IL-4 e IL-5 quando comparado aos grupos não sensibilizados (* $p < 0,01$). Estes aumentos foram totalmente inibidos quando os animais sensibilizados à OVA foram submetidos ao treinamento físico de intensidade leve ou moderada (Figura 38 e 39).

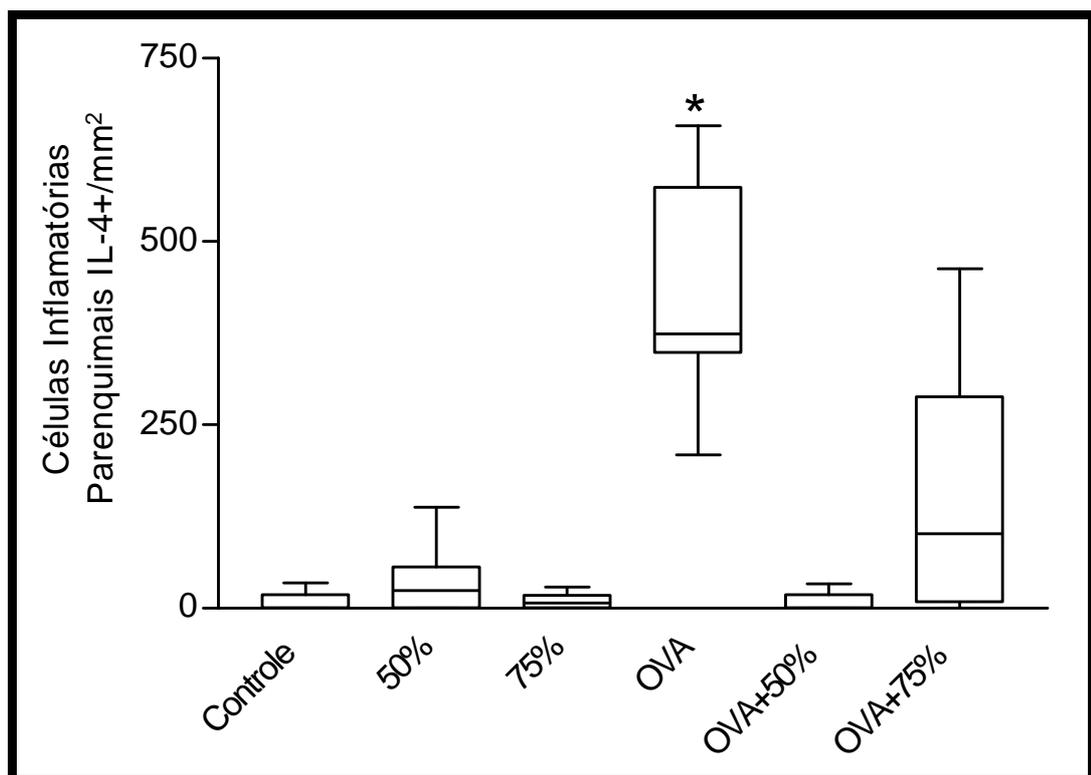


Figura 38 – Efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade leve ou moderada sobre a densidade parenquimal de células inflamatórias positivas para IL-4. Valores expressos em *box plot* (detalhes descritos na Figura 6). Os grupos estão descritos na Figura 1. * $p < 0,01$ quando comparado com todos os demais grupos.

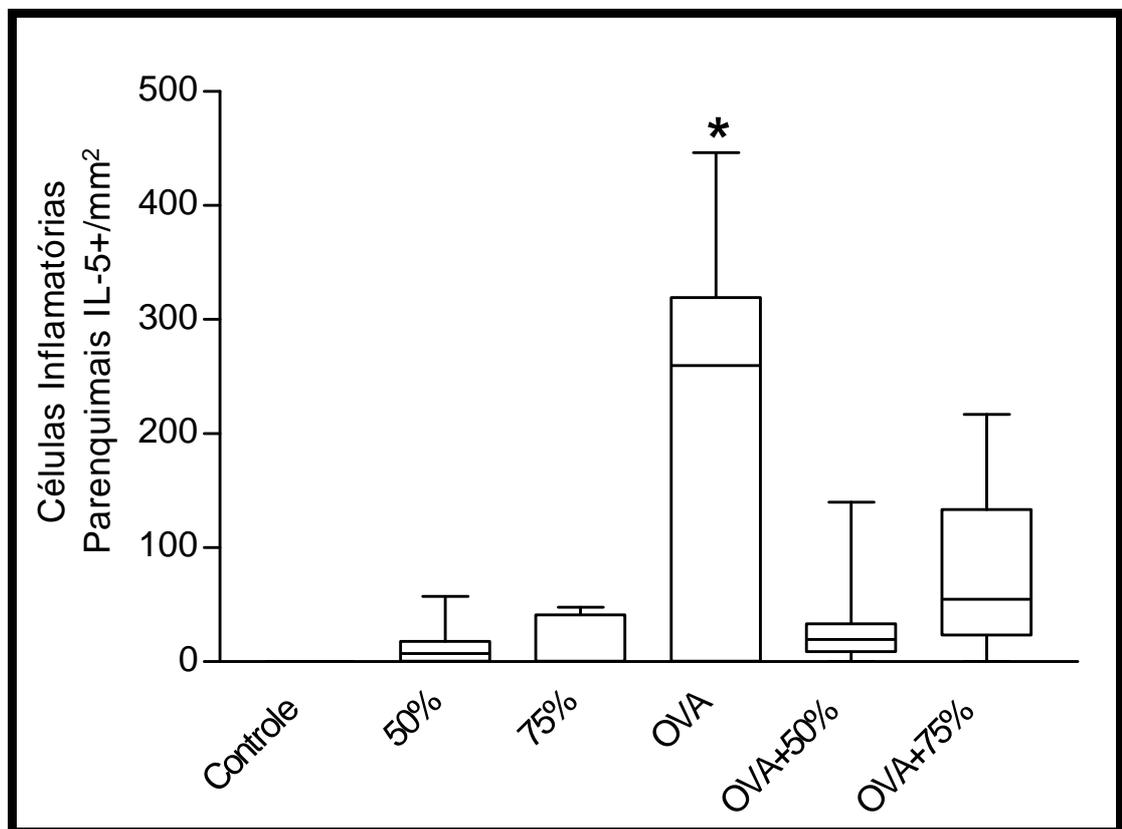


Figura 39 – Efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade leve ou moderada sobre a densidade parenquimal de células inflamatórias positivas para IL-4. Valores expressos em *box plot* (detalhes descritos na Figura 6). Os grupos estão descritos na Figura 1. * $p < 0,01$ quando comparado com todos os demais grupos.

O treinamento físico de intensidade leve ou moderada em animais não sensibilizados não modificou a densidade parenquimal de células inflamatórias positivas para IL-2 e IFN-gama (respectivamente, figuras 40 e 41). A sensibilização também não aumentou a densidade parenquimal de células inflamatórias positivas para IL-2 e IFN-gama quando comparado aos grupos não sensibilizados. Entretanto, os animais sensibilizados e submetidos ao treinamento físico aeróbio de intensidade leve e moderada (respectivamente, grupos OVA+50% e OVA+75%) apresentaram aumento da densidade parenquimal de células inflamatórias para IL-2 (* $p < 0,05$).

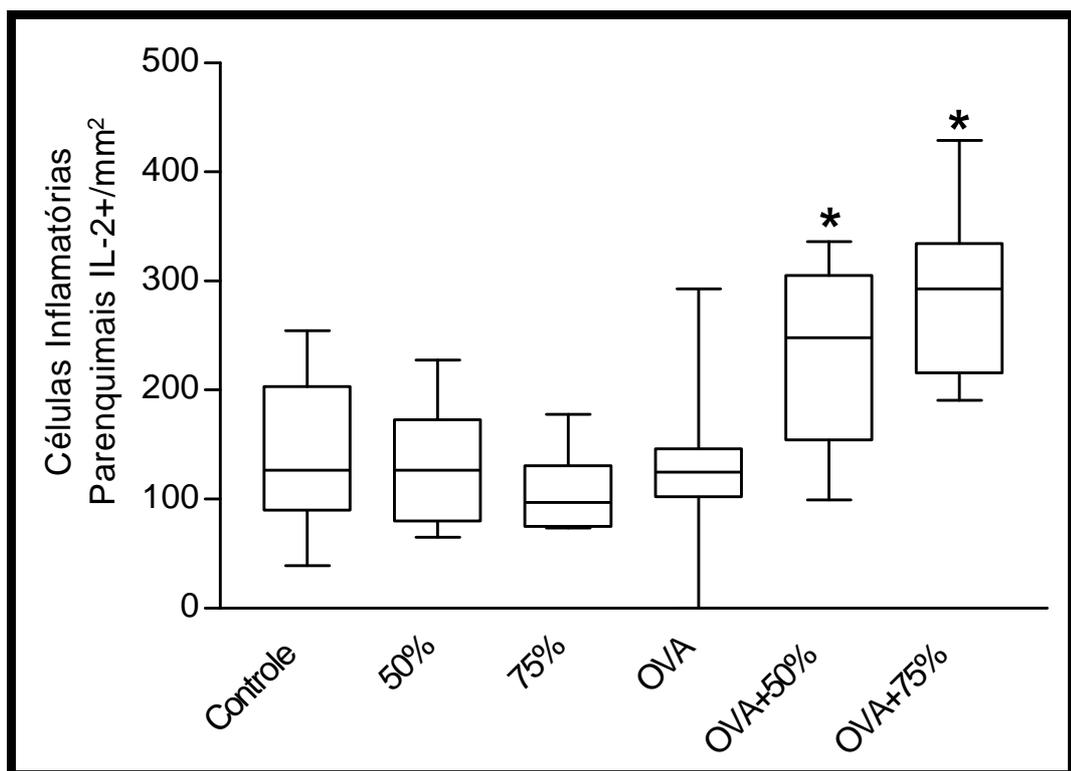


Figura 40 – Efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade leve ou moderada sobre a densidade parenquimal de células inflamatórias positivas para IL-2. Valores expressos em *box plot* (detalhes descritos na Figura 6). Os grupos estão descritos na Figura 1. * $p < 0,05$ quando comparado com todos os demais grupos.

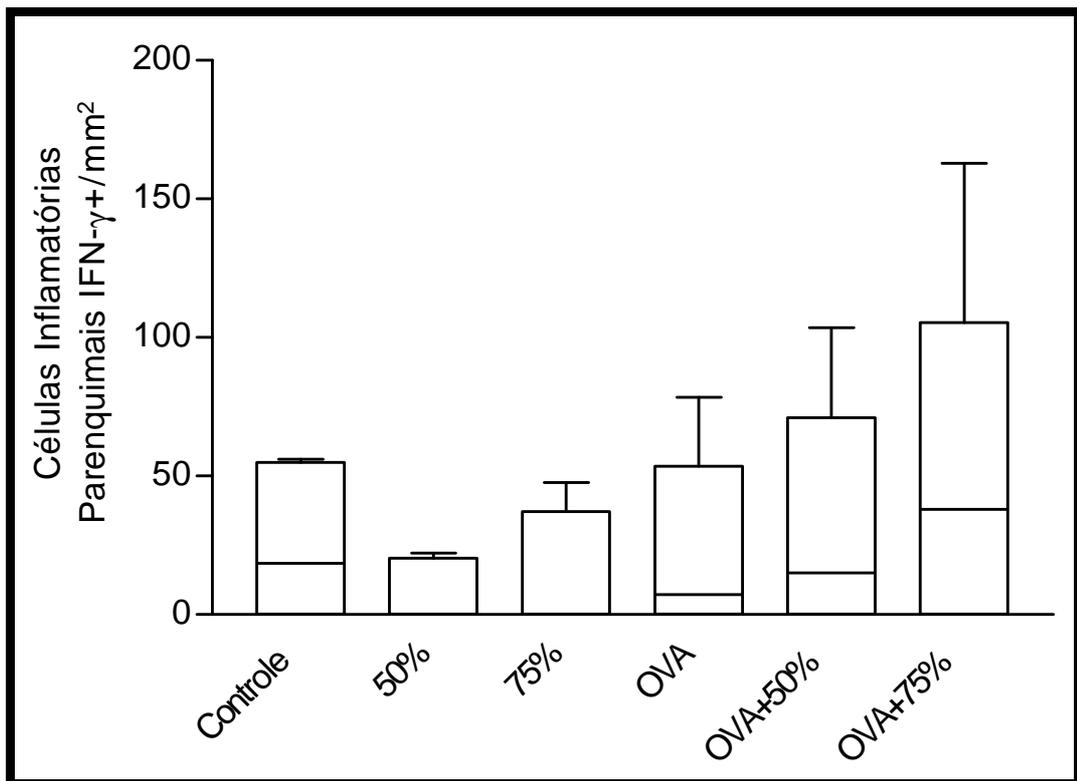


Figura 41 – Efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade leve ou moderada sobre a densidade parenquimal de células inflamatórias positivas para IFN-gama. Valores expressos em *box plot* (detalhes descritos na Figura 6). Os grupos estão descritos na Figura 1. Não foram encontradas diferenças entre os grupos.

O treinamento físico de intensidade leve ou moderada em animais não sensibilizados não modificou a proporção de volume de fibras colágenas e elástica no parênquima (respectivamente, figuras 42 e 43). A sensibilização também não aumentou a proporção de volume de fibras colágenas e elásticas no parênquima quando comparado aos grupos não sensibilizados.

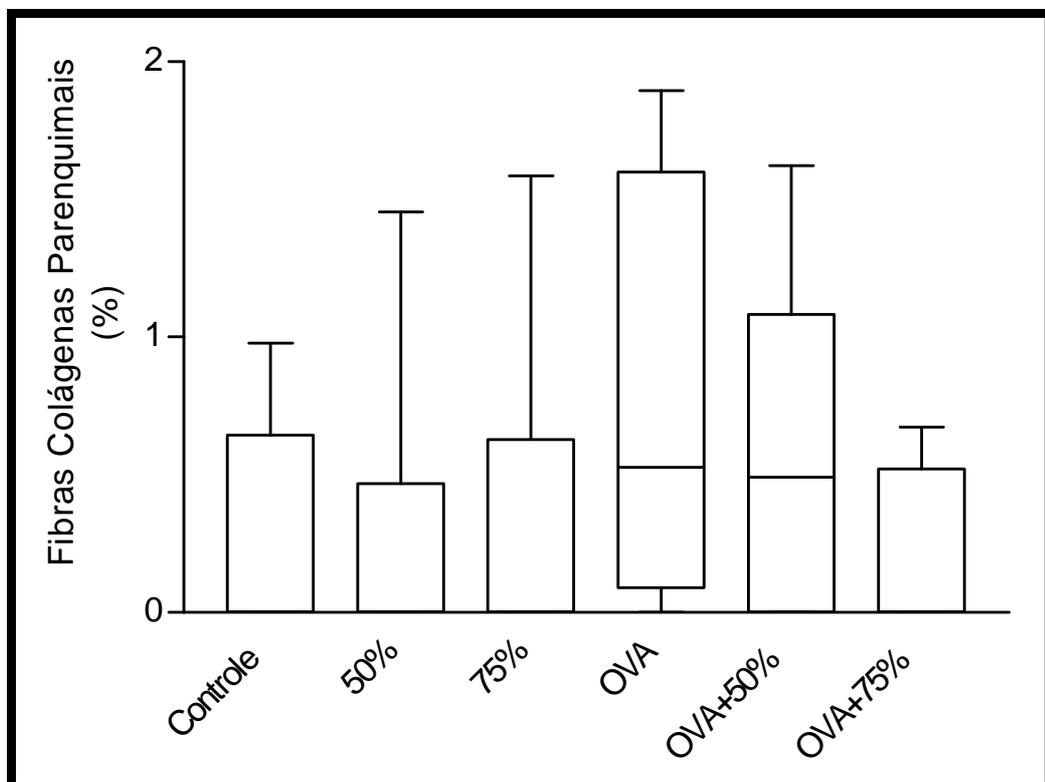


Figura 42 – Efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade leve ou moderada sobre a proporção de volume de fibras colágenas no parênquima. Valores expressos em *box plot* (detalhes descritos na Figura 6). Os grupos estão descritos na Figura 1. Não foram encontradas diferenças entre os grupos.

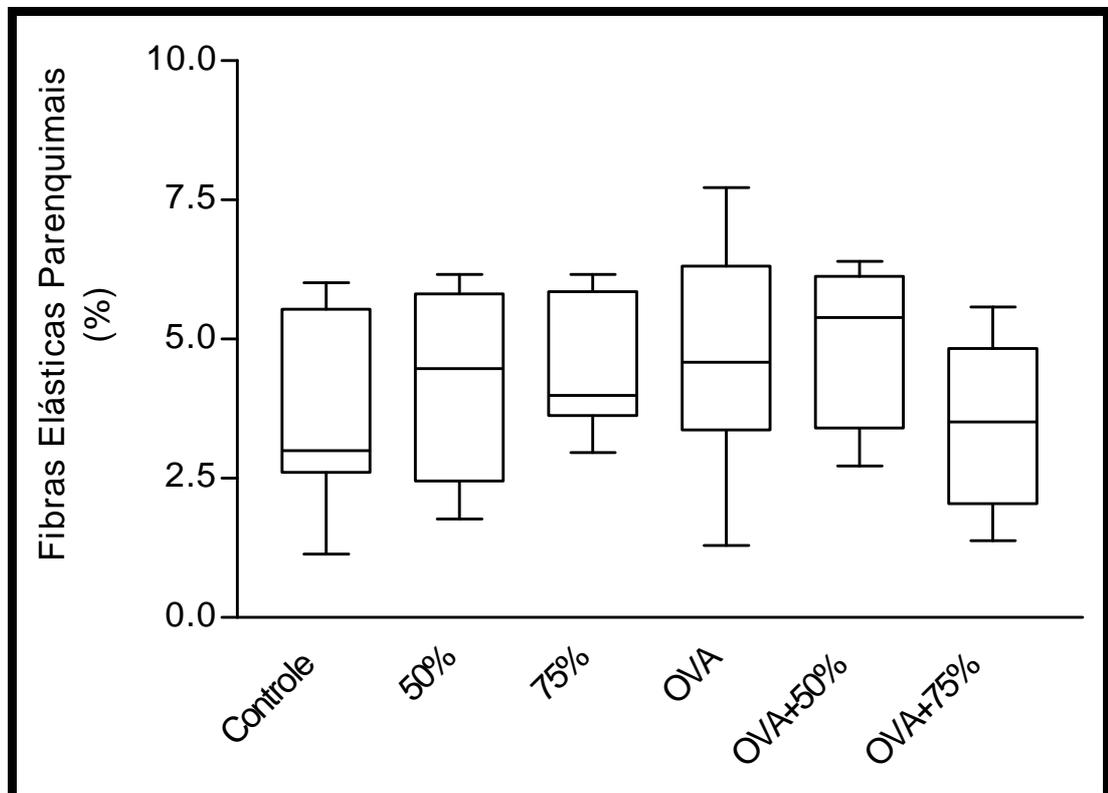


Figura 43 – Efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade leve ou moderada sobre a proporção de volume de fibras elásticas no parênquima. Valores expressos em *box plot* (detalhes descritos na Figura 6). Os grupos estão descritos na Figura 1. Não foram encontradas diferenças entre os grupos.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que o treinamento físico de intensidade leve ou moderada inibiu a eosinofilia induzida pela sensibilização pulmonar alérgica crônica com ovalbumina, assim como a expressão de IL-4, IL-5 e MCP-1 pelas células inflamatórias, nos compartimentos peribrônquico, perivascular e parenquimal. O estudo também demonstrou que ambas as intensidades de treinamento físico aeróbio foram capazes de inibir o remodelamento brônquico e vascular induzidos pela inflamação pulmonar alérgica crônica. Esses resultados sugerem que o treinamento físico aeróbio pode exercer um importante papel no tratamento da asma, devido aos seus possíveis efeitos antiinflamatórios, que parecem não estar somente restrito às vias aéreas, mas que também são extensivos aos vasos e parênquima pulmonares.

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas e diversos estudos têm demonstrado que as células inflamatórias exercem um papel central tanto no processo inflamatório na asma quanto no remodelamento e que ambos os fatores estão associados com a obstrução brônquica (103-109). Esses estudos também demonstram que a expressão de IL-4 e IL-5 por células inflamatórias estão aumentadas tanto em modelos experimentais quanto em estudos clínicos, resultados também encontrados em nosso trabalho (103-109). Outros trabalhos demonstram que a expressão aumentada de IL-4 e IL-5 age tanto direta quanto indiretamente promovendo diferenciação, proliferação, aumento do recrutamento e da sobrevivência das células inflamatórias na inflamação alérgica (106, 110, 111). Alguns autores sugerem que o processo de remodelamento das vias aéreas é secundário à

inflamação, sendo também a causa mais comum para se explicar as anormalidades funcionais na asma (112, 113).

Em nosso modelo experimental, encontramos intensa eosinofilia pulmonar, demonstrada através do aumentado conteúdo de eosinófilos no LBA, nos compartimentos peribrônquico, perivascular e no parênquima alveolar. Outra característica importante em nosso modelo animal foi o grande aumento da expressão de IL-4 e IL-5 pelas células inflamatórias nos compartimentos pulmonares peribrônquico, perivascular e no parênquima alveolar. Encontramos também aumentados níveis plasmáticos de IgE e IgG₁ específicos para OVA. Interessantemente, o modelo de sensibilização pulmonar alérgica crônica utilizado em nosso estudo apresentou características de remodelamento tanto de vias aéreas quanto dos vasos pulmonares, demonstrados pelo aumento da deposição de fibras colágenas e elásticas nas vias aéreas e vasos sangüíneos, aumento da espessura da musculatura lisa e da camada epitelial brônquica e aumento da espessura da musculatura lisa vascular, modificações já demonstrados em estudos de outros autores (14, 25, 27, 29). Cabe ressaltar que nem todos os modelos experimentais crônicos apresentam estas alterações.

Apesar da incidência populacional da asma, existem poucos estudos avaliando os efeitos do treinamento físico aeróbio em pacientes asmáticos. O treinamento físico aeróbio parece trazer benefícios importantes para o paciente asmático, entretanto os mecanismos pelo qual isto ocorre ainda parecem pouco compreendidos. A explicação mais facilmente utilizada atualmente é que o treinamento físico aeróbio melhora a capacidade física

dos pacientes reduzindo assim o seu limiar ventilatório. O treinamento físico aeróbio tem sido recomendado para pacientes asmáticos pela Sociedade Americana de Reabilitação Cardiovascular e Pulmonar e a Sociedade Britânica de Tórax (78, 79). Os principais efeitos do treinamento físico aeróbio que justificam tais recomendações são: o aumento da capacidade ventilatória e da capacidade física, diminuição da dispnéia, diminuição do broncoespasmo induzido por exercício e também da necessidade do uso de corticóides, os quais poderiam estar sugerindo um possível efeito antiinflamatório do treinamento físico aeróbio na asma (80-83).

Em nosso estudo, observamos que o treinamento físico aeróbio de intensidade leve ou moderada inibiu especificamente a migração de eosinófilos para as vias aéreas, vasos e parênquima pulmonares. Pastva *et al.* foram os primeiros a mostrar que a atividade aeróbia de intensidade moderada reduz a inflamação alérgica das vias aéreas num modelo experimental em camundongos (114). Embora estes autores tenham mostrado que o treinamento físico aeróbio de intensidade moderada reduziu o número de células polimorfonucleares e linfomononucleares no lavado broncoalveolar, o modelo de inflamação pulmonar alérgica utilizado por esses autores foi predominantemente neutrofílico. Em vista disto, os resultados do presente estudo sugerem, pela primeira vez, que o treinamento físico aeróbio pode ter papel na redução da migração eosinofílica, embora os mecanismos pelos quais isto ocorra ainda não estejam totalmente compreendidos. Pastva *et al.* (114) também mostraram que o treinamento físico reduziu os níveis de IL-4, mas não de IL-5,

sugerindo que o treinamento físico aeróbio diminui a resposta Th₂. O nosso modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica apresentou um aumento na expressão de IL-4 e IL-5 pelas células inflamatórias, aumento este que foi reduzido tanto pelo treinamento físico aeróbio de intensidade leve quanto moderada. Uma vez que a IL-4 e IL-5 também podem mediar a síntese de IgE e a eosinofilia das vias aéreas (115), nós também avaliamos os níveis de IgE e IgG₁ específicos para ovalbumina e verificamos que eles não foram diminuídos treinamento físico. Estes resultados sugerem que os efeitos antiinflamatórios do treinamento físico aeróbio num modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica não foram mediados pelos níveis de IgE e IgG₁ específicos para ovalbumina. Interessante notar que estes resultados são contraditórios aqueles apresentados por Pastva et al. (114) que observaram uma redução dos níveis de IgE específicos para OVA após a melhora do condicionamento físico. É possível que a diferença entre os nossos resultados e aqueles apresentados por Pastva et al. (114) sejam decorrentes do momento em que a atividade física foi iniciada durante o processo de sensibilização alérgica crônica. Neste sentido, estudos recentes e ainda não publicados do nosso laboratório mostram que a melhora do condicionamento físico antes do início do processo de sensibilização reduz os níveis de IgE e IgG₁.

Estudos clínicos e experimentais sugerem que o treinamento físico aeróbio modula o sistema imune (84-90, 93, 94, 114, 116-118). Esses estudos demonstram que o treinamento físico de intensidade leve ou moderada aumenta a resposta imune Th₁, enquanto que as atividades

extenuantes (de intensidade e ou duração muito altas) aumentam a resposta Th₂ e deprimem a resposta Th₁ (84-90, 93, 94, 114, 116-120). Entretanto, as possíveis alterações desencadeadas pelo treinamento físico sobre o balanço Th₁/Th₂ em inflamações alérgicas permanecem desconhecidas. A hipótese da higiene sugere que a reação alérgica pode ser modulada por um desbalanço das respostas Th₁/Th₂ que se auto-regulam por *feedback* negativo (121, 122). Baseados nos efeitos do treinamento físico aeróbio descritos anteriormente, nós hipotetizamos que os efeitos depressores do treinamento sobre a resposta Th₂ encontrados em nosso experimento poderiam estar sendo mediados por um aumento na resposta Th₁. Assim, nós também investigamos, pela primeira vez, os efeitos do treinamento físico aeróbio sobre a expressão de citocinas Th₁ (IL-2 e IFN-gama) pelas células inflamatórias. Entretanto, nós não observamos qualquer alteração na expressão de citocinas Th₁ (IL-2 e IFN-gama) pelas células inflamatórias das vias aéreas dos animais sensibilizados ou naqueles não sensibilizados. Foi observado, porém, um aumento da expressão de IL-2 pelas células inflamatórias no parênquima pulmonar nos animais sensibilizados e submetidos ao treinamento físico aeróbio de intensidade leve e moderada. Até o presente momento, somente dois estudos investigaram os efeitos antiinflamatórios da atividade física aeróbia em modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica (114, 123). No primeiro, os autores demonstraram que o treinamento físico de intensidade moderada inibiu a síntese de IL-4 e a inflamação predominantemente neutrofílica das vias aéreas (114). No segundo, demonstraram que, parte desses efeitos, poderia

ter sido mediada por um aumento nos níveis de glicocorticóides (123). Vistos conjuntamente, parece haver uma concordância de que o treinamento físico pode reduzir a resposta pulmonar alérgica crônica e que este efeito parece ocorrer predominantemente por uma modulação na resposta Th₂. Entretanto, ainda há necessidade de se compreender se este efeito ocorre diretamente sobre a resposta Th₂ ou indiretamente devido ao aumento da resposta Th₁.

O termo remodelamento é normalmente aplicado para descrever um processo dinâmico que leva a alterações estruturais dos pulmões na asma (25-29). Estas alterações estruturais são normalmente relatadas como sendo secundárias à inflamação e resultam num componente irreversível de obstrução das vias aéreas em pacientes asmáticos, especialmente na asma severa e como consequência o paciente, muitas vezes, deixa de responder aos broncodilatadores (124, 125). Entretanto, existe um número grande de evidências sugerindo que o remodelamento na asma não se limita às vias aéreas, mas estende-se aos vasos e parênquima pulmonares (25-31, 37, 40, 41). Em relação aos vasos, existem evidências de que cronicamente a asma aumenta a proliferação de vasos pulmonares, aumenta o fluxo sanguíneo e a permeabilidade vascular, alterações que estão relacionadas com a severidade da asma e com o grau de hiperresponsividade (126-130). Em nosso estudo, observamos que o modelo experimental apresentou um aumento na deposição de fibras colágenas e elásticas nas vias aéreas e vasos pulmonares, espessamento da parede das vias aéreas, possivelmente decorrente da hipertrofia e hiperplasia da musculatura lisa e células epiteliais, e um espessamento da musculatura lisa vascular. Observamos

ainda que a atividade física aeróbia de intensidade leve e moderada reduziu estes efeitos decorrentes da sensibilização alérgica crônica.

Existem evidências experimentais sugerindo que o aumento da IL-4 leva a eosinofilia nas vias aéreas e ao desenvolvimento de fibrose sub-epitelial e hiperplasia de células secretoras (125). O mesmo estudo também sugere que o aumento da IL-5 está implicado na inflamação eosinofílica, mas não têm um papel essencial no desenvolvimento da disfunção das vias aéreas ou em alguns aspectos do remodelamento das vias aéreas (125). Os efeitos das citocinas na asma e em modelos experimentais de inflamação pulmonar alérgica crônica são bastante complexos. Apesar de todos eles estarem presentes no nosso modelo experimental, não é possível explicar os mecanismos envolvidos no remodelamento das vias aéreas. Entretanto, podemos especular que os efeitos inibitórios da atividade física aeróbia de intensidade leve ou moderada sobre a expressão da IL-5 poderiam estar relacionados à redução da inflamação eosinofílica, enquanto que seus efeitos inibitórios sobre a expressão da IL-4 poderiam estar relacionados com a inibição do remodelamento encontrado em nossos estudos.

Além das citocinas Th₂, as quimiocinas também apresentam um importante papel na fisiopatologia da asma, dentre eles, a ativação da cascata inflamatória, na hiperresponsividade brônquica e no remodelamento das vias aéreas (131-135). Neste sentido, níveis aumentados de MCP-1 têm sido verificados no lavado broncoalveolar e em vias aéreas de pacientes asmáticos e em modelos experimentais (131-135). O nosso modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica também apresentou

uma expressão aumentada de MCP-1, quantificado especificamente pelas células inflamatórias do compartimento pulmonar perivascular. As doenças pulmonares alérgicas crônicas, como a asma, apresentam um grande recrutamento de células inflamatórias para o local da inflamação através de uma cascata complexa de eventos celulares e moleculares que estão inter-relacionados. Dentre estes eventos, estão a ativação das células vasculares endoteliais, o aumento da síntese e a liberação de quimiocinas, como a MCP-1, e também de moléculas de adesão (123, 131-134). É possível que haja uma intercomunicação entre as vias aéreas e os vasos pulmonares durante o processo inflamatório dos pulmões, fato que tem sido demonstrado tanto em modelos experimentais quanto em pacientes asmáticos e que poderia explicar a inflamação perivascular na fisiopatologia da doença (28-31, 136-139).

Os efeitos do treinamento físico aeróbio sobre a resposta vascular têm sido extensivamente investigados, porém não existem estudos analisando este efeito no pulmão (140-142). Parte dos efeitos antiinflamatórios do treinamento físico na resposta vascular tem sido atribuído à modulação da expressão e atividade da enzima óxido nítrico sintase endotelial amplamente expressa pelo endotélio vascular (140). Entretanto, outros estudos têm demonstrado que parte dos efeitos antiinflamatórios do treinamento físico em doenças como a síndrome metabólica e as doenças cardiovasculares ocorrem através da redução dos níveis de MCP-1 (141, 142). Os efeitos do treinamento físico aeróbio sobre a expressão de MCP-1 por células inflamatórias em modelos experimentais de

inflamação pulmonar alérgica crônica nunca foram avaliados. No presente estudo, o treinamento físico de intensidade leve ou moderada reduziu a expressão de MCP-1 pelas células inflamatórias no compartimento perivascular induzidos pela sensibilização pulmonar alérgica crônica. Estes resultados sugerem que este poderia ser um dos mecanismos envolvidos na redução da migração das células inflamatórias para as vias aéreas, vasos e parênquima pulmonar no nosso modelo experimental.

Até o momento, os efeitos de diferentes intensidades de atividade física em pacientes asmáticos ou em modelos experimentais têm sido pouco estudados, mas existem algumas evidências sugerindo que diferentes intensidades podem resultar em diferentes respostas no asmático, incluindo a avaliação da hiperresponsividade brônquica e o desencadeamento do broncoespasmo induzido pelo exercício. A redução de broncoespasmo induzido pelo exercício tem sido encontrada em estudos com pacientes que foram treinados aerobiamente em intensidade moderada (82, 143, 144), enquanto que pacientes treinados aerobiamente em intensidade leve não apresentaram alterações no broncoespasmo induzido pelo exercício (145, 146). No presente estudo, nós avaliamos a responsividade brônquica à metacolina e verificamos que o treinamento físico de intensidade leve ou moderada aumentou a responsividade mesmo em animais não sensibilizados. Nossos resultados também sugerem que houve uma potencialização da hiperresponsividade brônquica nos animais sensibilizados submetidos ao treinamento físico de intensidade leve ou moderada. Evidências recentes da literatura sugerem que o treinamento

físico aeróbio em camundongos não sensibilizados leva à descamação epitelial (147). Apesar de nós não termos uma explicação para este fenômeno, é possível especular que, no nosso estudo, a atividade física aeróbia tenha ocasionado uma descamação epitelial, o que poderia expor as terminações nervosas da musculatura lisa brônquica, desencadeando um aumento da broncoconstrição e da hiperresponsividade brônquica.

Apesar do modelo de sensibilização alérgica crônica animal ser largamente utilizado para estudar as alterações fisiopatológicas da asma, existe uma grande diferença entre estes modelos e a doença propriamente dita (148, 149). O maior deles é que se interrompermos o processo de sensibilização alérgica crônica, a inflamação pulmonar se reverte nos modelos experimentais. Além disto, devemos ter cuidado ao transpormos os nossos resultados para a prática clínica porque poderia sugerir ao paciente que o treinamento físico poderia ser substituído pelo tratamento clínico-medicamentoso reduzindo assim os cuidados do paciente com a ingesta da medicação. Assim, apesar de compreendermos que os resultados obtidos no presente estudo não podem ser transpostos para a prática clínica, é razoável sugerir que a atividade física aeróbia de intensidade leve ou moderada pode reduzir a inflamação e remodelamento pulmonar num modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica. Por outro lado, evidências recentes do nosso grupo sugerem que o treinamento físico de intensidade moderada reduz os níveis de óxido nítrico exalado e a eosinofilia pulmonar em pacientes asmáticos com controle medicamentoso e clinicamente estáveis sugerindo que a atividade física parece possuir um efeito antiinflamatório na asma.

6. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo sugerem que a atividade física aeróbia de intensidade leve ou moderada reduz a inflamação e o remodelamento pulmonar nas vias aéreas, vasos e parênquima num modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica. Estes efeitos parecem ser mediados pela redução da resposta imune Th₂ e da expressão de quimiocinas. Por outro lado, o treinamento físico de intensidade leve ou moderada parece aumentar a hiperresponsividade brônquica, embora o mecanismo para este efeito ainda não esteja elucidado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- GINA – Global Initiative for Asthma [on line]. Ed. 2006. Reino Unido. [acessado em 20 de Fevereiro de 2007]. Disponível em: <http://www.ginasthma.org>.
- 2- Keeley D, Neill P. Asthma paradox. *Lancet*. 1991; 337:1099.
- 3- Jackson R, Sears MR, Beaglehole R, Rea HH. International trends in asthma mortality: 1970-1985. *Chest*. 1988; 94:914-918.
- 4- Braman SS. The global burden of asthma. *Chest*. 2006; 130:4S-12S.
- 5- Reibman J, Hsu Y, Chen LC, Bleck B, Gordon T. Airway epithelial cells release MIP-3alpha/CCL20 in response to cytokines and ambient particulate matter. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003; 28:648-654.
- 6- Stumbles PA, Thomas JA, Pimm CL, Lee PT, Venaille TJ, Proksch S, Holt PG. Resting respiratory tract dendritic cells preferentially stimulate T helper cell type 2 (Th2) responses and require obligatory cytokine signals for induction of Th1 immunity. *J Exp Med*. 1998; 188:2019-2031.
- 7- Holgate ST, Finnerty JP. Recent advances in understanding the pathogenesis of asthma and its clinical implications. *Quart J Med New Series*. 1988; 249:5-19.
- 8- Harris RR, Carter GW, Bell RL, Moore JL, Brooks DW. Clinical activity of leukotriene inhibitors. *Int J Immunopharmacol*. 1995; 17:147-156.
- 9- Laitinen LA, Laitinen A, Haahtela T. Airflow mucosal inflammation even in patients with newly diagnosed asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1993; 147:697-704.
- 10- Conroy DM, Williams TJ. Eotaxin and the attraction of eosinophils to the asthmatic lung. *Respir Res*. 2001; 2:150-156.

- 11- 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.
- 12- 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.
- 13- Weller CL, Jose PJ, Williams TJ. Selective suppression of leukocyte recruitment in allergic inflammation. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005; 100:153-160.
- 14- Broide DH, Lawrence T, Doherty T, Cho JY, Miller M, McElwain K, McElwain S, Karin M. Allergen-induced peribronchial fibrosis and mucus production mediated by IkappaB kinase beta-dependent genes in airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102:17723-17728.
- 15- Schaub B, Lauener R, von Mutius E. The many faces of the hygiene hypothesis. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 117:969-977.
- 16- Lampinen M, Carlson M, Venge HP. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. *Allergy.* 2004; 59:793–805.
- 17- Bruijnzeel PLB. Eosinophil tissue mobilization in allergic disorders. *Ann NY Acad Sci.* 1994; 725:259–267.
- 18- Rothenberg ME, Hogan SP. The Eosinophil. *Annu Rev Immunol.* 2006; 24:5.1–5.28.

- 19- 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.
- 20- 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.
- 21- 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; 87:155–161.
- 22- Tulic MK, Hamid Q. Contribution of the distal lung to the pathologic and physiologic changes in asthma: potential therapeutic target. Roger S. Michell lecture. *Chest*. 2003; 123:348-355.
- 23- Tulic MK, Christodoulopoulos P, Hamid Q. Small airway inflammation in asthma. *Resp Res*. 2001; 2:333-339.
- 24- Balzar S, Wenzel SE, Chu HW. Transbronchial biopsy as a tool to evaluate small airways in asthma. *Eur Respir J*. 2002; 20:254–259.
- 25- 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.
- 26- 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.

- 27- Lancas T, Kasahara DI, Prado CM, Tiberio IF, Martins MA, Dolhnikoff M. Comparison of early and late responses to antigen of sensitized guinea pigs parenchymal lung strips. *J Appl Physiol*. 2006; 100:1610-1616.
- 28- Sur S, Wild JS, Choudhury BK, Sur N, Alam R, Klinman DM. Long term prevention of allergic lung inflammation in a mouse model of asthma by CpG Oligodeoxynucleotides. *J Immunol*. 1999; 162:6284-6293.
- 29- Tormanen KR, Uller L, Persson CG, Erjefalt JS. Allergen exposure of mouse airways evokes remodeling of both bronchi and large pulmonary vessels. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 171:19-25.
- 30- Leino MS, Alenius HT, Fyhrquist-Vanni N, Wolff HJ, Reijula KE, Hintikka EL, Salkinoja-Salonen MS, Haahtela T, Makela MJ. Intranasal exposure to *Stachybotrys chartarum* enhances airway inflammation in allergic mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006; 173:512–518.
- 31- Singh B, Shinagawa K, Taube C, Gelfand EW, Pabst R. Strain-specific differences in perivascular inflammation in lungs in two murine models of allergic airway inflammation. *Clin Exp Immunol*. 2005; 141:223-229.
- 32- Vignola AM, Mirabella F, Costanzo G, Giorgi R, Gjomarkaj M, Bellia V, Bonsignori G. Airway remodeling in asthma. *Chest*. 2003; 123:417S-22S.
- 33- James A. Airway remodeling in asthma. *Curr Opin Pulm Med*. 2005; 11:1-6.
- 34- Bove PF, Wesley UV, Greul AK, Hristova M, Dostmann WR, van der Vliet A. Nitric oxide promotes airway epithelial wound repair through enhanced activation of MMP-9. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006 Sep 15; doi 10.1165/rcmb.2006-0253SM.

- 35- van Wetering S, Zuyderduyn S, Ninaber DK, van Sterkenburg MA, Rabe KF, Hiemstra PS. Epithelial differentiation is a determinant in the production of eotaxin-2 and -3 by bronchial epithelial cells in response to IL-4 and IL-13. *Mol Immunol.* 2007; 44:803-811.
- 36- Lora JM, Zhang DM, Liao SM, Burwell T, King AM, Barker PA, Singh L, Keaveney M, Morgenstern J, Gutierrez-Ramos JC, Coyle AJ, Fraser CC. Tumor necrosis factor-alpha triggers mucus production in airway epithelium through an IkappaB kinase beta-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2005; 280:36510-36517.
- 37- Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma: from bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161:1720-1745.
- 38- Lange P, Parner J, Vestbo J, Schnohr P, Jensen G. A 15-year follow-up study of ventilatory function in adults with asthma. *New Engl J Med.* 1998; 339:1194-1200.
- 39- Peat JK, Woolcock AJ, Cullen K. Rate of decline of lung function in subjects with asthma. *Eur J Resp Dis.* 1987; 70:171-179.
- 40- Chiappara G, Gagliardo R, Siena A, Bonsignore Mr, Bousquet J, Bonsignore G, Vignola AM. Airway remodelling in the pathogenesis of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2001; 1:85-93.
- 41- Mauad T, Souza ASL, Saldiva PHN, Dolhnikoff M. Remodelamento brônquico na asma. *J Pneumologia.* 2000; 26:91-98.
- 42- Rennard SI, Romberger DJ, Robbins RA, Spurzem JR. Is asthma an epithelial disease? *Chest.* 2005; 107:127S-135S.

- 43- Temelkovski J, Hogan SP, Shepherd DP, Foster PS, Kumar RK. An improved murine model of asthma: selective airway inflammation, epithelial lesions and increased methacholine responsiveness following chronic exposure to aerosolised allergen. *Thorax*. 1998; 53:849-856.
- 44- Honda K, Marquillies P, Capron M, Dombrowicz D. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is expressed in airways and inhibits features of airway remodeling in a mouse asthma model. *J Allergy Clin Immunol*. 2004; 113:882-888.
- 45- Vignola AM, Campbell AM, Chanez P, Bousquet J, Paul-Lacoste P, Michel FB, Godard P. HLA-DR and ICAM-1 expression on bronchial epithelial cells in asthma and chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis*. 1993; 148:689–694.
- 46- Bentley AM, Durham SR, Robinson DS, Menz G, Storz C, Cromwell O, Kay AB, Wardlaw AJ. Expression of endothelial and leukocyte adhesion molecules intercellular adhesion molecule-1, E-selectin, and vascular cell adhesion molecule-1 in the bronchial mucosa in steady-state and allergen-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1993; 92:857–868.
- 47- Holgate ST, Davies DE, Lackie PM, Wilson SJ, Puddicombe SM, Lordan JL. Epithelial-mesenchymal interactions in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2000; 105:193-204.
- 48- Kao YJ, Piedra PA, Larsen GL, Colasurdo GN. Induction and regulation of nitric oxide synthase in airway epithelial cells by respiratory syncytial virus. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 163:532-539.

- 49- Trifilieff A, Fujitani Y, Mentz F, Dugas B, Fuentes M, Bertrand C. Inducible nitric oxide synthase inhibitors suppress airway inflammation in mice through down-regulation of chemokine expression. *J Immunol.* 2000; 165:1526-1533.
- 50- Eynott PR, Groneberg DA, Caramori G, Adcock IM, Donnelly LE, Kharitonov S, Barnes PJ, Chung KF. Role of nitric oxide in allergic inflammation and bronchial hyperresponsiveness. *Eur J Pharmacol.* 2002; 452:123-133.
- 51- Begueret H, Berger P, Vernejoux JM, Dubuisson L, Marthan R, Tunon-de-Lara JM. Inflammation of bronchial smooth muscle in allergic asthma. *Thorax.* 2007; 62:8-15.
- 52- Lazaar AL, Albelda SM, Pilewski JM, Brennan B, Pure E, and Panettieri RA Jr. T lymphocytes adhere to airway smooth muscle cells via integrins and CD44 and induce smooth muscle cell DNA synthesis. *J Exp Med.* 1994; 180:807–816.
- 53- Johnson PRA, Black JL, Cralin S, Ge Q, and Underwood PA. The production of extracellular matrix proteins by human passively sensitized airway smooth-muscle cells in culture: the effect of beclomethasone. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 162:2145–2151.
- 54- Johnson SR and Knox AR. Synthetic functions of airway smooth muscle in asthma. *Trends Pharmacol Sci.* 1997; 18:288–292.
- 55- Chan V, Burgess JK, Ratoff JC, O'connor BJ, Greenough A, Lee TH, Hirst SJ. Extracellular matrix regulates enhanced eotaxin expression in

asthmatic airway smooth muscle cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 174:379-385.

56- Munakata M. Airway remodeling and airway smooth muscle in asthma. *Allergol Int.* 2006; 55:235-243.

57- Brightling CE, Bradding P, Symon FA, Holgate ST, Wardlaw AJ, Pavord ID. Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med.* 2002; 346:1699–1705.

58- Brightling CE, Symon FA, Holgate ST, Wardlaw AJ, Pavord ID, Bradding P. Interleukin-4 and -13 expression is co-localized to mast cells within the airway smooth muscle in asthma. *Clin Exp Allergy.* 2003; 33:1711-1716.

59- Berger P, Girodet PO, Begueret H, et al. Tryptase-stimulated human airway smooth muscle cells induce cytokine synthesis and mast cell chemotaxis. *Faseb J.* 2003; 17:2139–2141.

60- Barnes PJ, Chung KF, Page CP. Inflammatory mediators and asthma. *Pharmacol Reviews.* 1988; 40:49-83.

61- Blease K, Lukacs NW, Hogaboan CM, Kunkel SL. Chemokines and their role in airway hyper-reactivity. *Respir Res.* 2000; 1:54-61.

62- Guidelines for the diagnosis and management of asthma. National Heart, Lung, and Blood Institute. National Asthma Education Program. Expert Panel Report. *J Allergy Clin Immunol.* 1991; 88:427-535.

63- Boushey HA, Holzman MJ, Sheller JR, Nadel JA. Bronchial hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis.* 1980; 121:389–413.

64- Sterk PJ. Bronchial hyperresponsiveness today. *Respir Med.* 1993; 87:27–29.

- 65- International Symposium of Airway Hyperreactivity. Airway hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis.* 1991; 143:S1–S82.
- 66- Christie PE, Jonas M, Tsai C-H, Chi EY, Henderson Jr ER. Increase in laminin expression in allergic airway remodeling and decrease by dexamethasone. *Eur Respir J.* 2004; 24:107-115.
- 67- Anrani Y, Chen H, Panettieri Jr RA. Activation of tumor necrosis factor receptor 1 in airway smooth muscle: a potential pathway that modulates bronchial hyper-responsiveness in asthma? *Respir Res.* 2000; 1:49-53.
- 68- Anrani Y, Chen H, Panettieri Jr RA. Activation of tumor necrosis factor receptor 1 in airway smooth muscle: a potential pathway that modulates bronchial hyper-responsiveness in asthma? *Respir Res.* 2000; 1:49-53.
- 69- Burgess JK, Blake AE, Boustany S, Johnson PR, Armour CL, Black JL, Hunt NH, Hughes JM. CD40 and OX40 ligand are increased on stimulated asthmatic airway smooth muscle. *J Allergy Clin Immunol.* 2005; 115:302–308.
- 70- Zhu YK, Liu X, Wang H, Kohyama T, Wen FQ, Skold CM, Rennard SI. Interactions between monocytes and smooth muscle cells can lead to extracellular matrix degradation. *J Allergy Clin Immunol.* 2001; 108:989–996.
- 71- McArdle WD, Katch FI, Katch VL. Fisiologia do Exercício, Energia, Nutrição e Desempenho Humano. 4ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan; 1998.
- 72- Denadai BS. Índices Fisiológicos de Avaliação Aeróbia: Conceitos e Aplicações. 1ed. Ribeirão Preto: Ed. Unesp; 1999.

- 73- Mueller PJ. Exercise training and sympathetic nervous system activity: evidence for physical activity dependent neural plasticity. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007; 34:377-384.
- 74- Fagard RH, Cornelissen VA. Effect of exercise on blood pressure control in hypertensive patients. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2007; 14:12-17.
- 75- Pedersen BK, Hoffman-Goetz L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev.* 2000; 80:1055-1081.
- 76- Ji LL. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1999; 222:283-292.
- 77- Banerjee AK, Mandal A, Chanda D, Chakraborti S. Oxidant, antioxidant and physical exercise. *Mol Cell Biochem.* 2003; 253:307-312.
- 78- American Association of Cardiovascular & Pulmonary Rehabilitation. Guidelines of pulmonary rehabilitation programmes, 2nd ed. Champaign, IL, EUA: Human Kinetics; 1998.
- 79- BTS Statement. Pulmonary rehabilitation. *Thorax.* 56:827-834, 2001.
- 80- Ram FS, Robinson SM, Black PN, Picot J. Physical training for asthma. *Cochrane Database Syst Rev* (4):CD001116, 2005.
- 81- Carroll N, Sly P. Exercise training as an adjunct to asthma management. *Thorax.* 1999; 54:190-191.
- 82- Svenonius E, Kautto R, Arborelius M Jr. Improvement after training of children with exercise-induced asthma. *Acta Paediatr Scand.* 1983; 72:23-30.
- 83- 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.

- 84- Petersen AM, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol*. 2005; 98:1154-1162.
- 85- Pedersen BK, Toft AD. Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. *Br J Sports Med*. 2000; 34:246-251.
- 86- Moldoveanu AI, Shepard RJ, Shek PN. The cytokine response to physical activity and training. *Sports Med*. 2001; 31:115-144.
- 87- Zieker D, Zieker J, Dietzsch J, Burnet M, Northoff H, Fehrenbach E. CDNA-microarray analysis as a research tool for expression profiling in human peripheral blood following exercise. *Exerc Immunol Rev*. 2005; 11:86-96.
- 88- Aoi W, Naito Y, Takanami Y, Kawai Y, Sakuma K, Ichikawa H, Yoshida N, Yoshikawa T. Oxidative stress and delayed-onset muscle damage after exercise. *Free Radic Biol Med*. 2004; 37:480-487.
- 89- Costa Rosa LFPB, Vaisberg MW. Influências do exercício na resposta imune. *Rev Bras Med Esporte*. 2002; 8:167-172.
- 90- Jonsdottir IH, Hoffman P, Thorèn P. Physical exercise, endogenous opioids and immune function. *Acta Physiol Scand*. 1997; 640:47-50.
- 91- Curi R, Newsholme P, Pithon-Curi TC, Pires-de-Melo M, Garcia C, Homem-de-Bittencourt Jr. PI, Guimarães ARP. Metabolic fate of glutamine in lymphocytes, macrophages and neutrophils. *Braz J Med Biol Res*. 1999; 32:15-21.
- 92- Evans WJ, Calmon JG. The metabolic effect of exercise-induced muscle damage. *Exerc Sports Sci Rev*. 1991; 19:99-125.

- 93- Cannon JG, Meydani SN, Fielding RA. Acute phase response in exercise. Part II: associations between vitamin E, cytokines, and muscle proteolysis. *Am J Physiol.* 1991; 260:R1235-1240.
- 94- Lakier Smith L. Overtraining, excessive exercise, and altered immunity: is this a T helper-1 versus T helper-2 lymphocyte response? *Sports Med* 33: 347-364, 2003.
- 95- Hamelmann E, Schwarze J, Takeda, K, Oshiba A, Larsen GL, Irvin CG, Gelfand EW. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 156:766-775.
- 96- Dohi M, Tsukamoto S, Nagahori T, Shinagawa K, Saitoh K, Tanaka Y, Kobayashi S, Tanaka R, To Y, Yamamoto K. Noninvasive system for evaluating the allergen-specific airway response in a murine model of asthma. *Lab Invest.* 1999; 79:1559-1571.
- 97- Lomask M. Further exploration of the penh parameter. *Exp Toxicol Pathol.* 2006; 57:13-20.
- 98- 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.
- 99- Ovary. Z. Passive Cutaneous Anaphylaxis. In: *Immunological Methods.*, 2nd ed. Oxford, GB: Blackwell Scientific Publications; 1964.
- 100-. Mota I, Perini A. A heat labile mercaptoethanol susceptible homocytotropic antibody in the guinea pig. *Life Sciences.* 1970; 9:923-930.

- 101- Luna, L.G.. AFIP manual of histologic staining methods. New York, EUA: *McGraw Hill*; 1986.
- 102- Watanabe T, Okano M, Hattori H, Yoshino T, Ohno N, Ohta N, Sugata Y, Orita Y, Takai T and Nishizaki K. Roles of FcγRIIB in nasal eosinophilia and IgE production in murine allergic rhinitis. *Am J Resp Crit Care Med.* 2004; 169:105-112.
- 103- Feleszko W, Jaworska J, Hamelmann E. Toll-like receptors--novel targets in allergic airway disease (probiotics, friends and relatives). *Eur J Pharmacol.* 2006; 533:308-318.
- 104- Georas SN, Guo J, De Fanis U, Casolaro V. T-helper cell type-2 regulation in allergic disease. *Eur Respir J.* 2005; 26:1119-1137.
- 105- Bryce PJ, Mathias CB, Harrison KL, Watanabe T, Geha RS, Oettgen HC. The H1 histamine receptor regulates allergic lung responses. *J Clin Invest.* 2006; 116:1624-1632.
- 106- 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.
- 107- Robinson D, Hamid Q, Bentley A, Ying S, Kay AB, Durham SR. Activation of CD4+ T cells, increased TH2-type cytokine mRNA expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1993; 92:313–324.
- 108- Postma DS, Timens W. Remodeling in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2006; 3:434-439.

- 109- Muz MH, Deveci F, Bulut Y, Ilhan N, Yekeler H, Turgut T. The effects of low dose leukotriene receptor antagonist therapy on airway remodeling and cysteinyl leukotriene expression in a mouse asthma model. *Exp Mol Med.* 2006; 38:109-118.
- 110- Brusselle GG, Kips JC, Tavernier JH, van der Heyden JG, Cuvellier CA, Pauwels RA, Bluethmann H. Attenuation of allergic airway inflammation in IL-4 deficient mice. *Clin Exp Allergy.* 1994; 24:73-80.
- 111- 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.
- 112- Alistair K Reinhardt, Stephen E Bottoms, Geoffrey J Laurent and Robin J McAnulty. Quantification of collagen and proteoglycan deposition in a murine model of airway remodeling. *Respir Res.* 2005; 6:30.
- 113- Henderson WR Jr, Chiang GK, Tien YT, Chi EY. Reversal of allergen-induced airway remodeling by CysLT1 receptor blockade. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 173:718-728.
- 114- 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.
- 115- Wills-Karp M. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness *Annu Rev Immunol.* 1999; 17:255-281.
- 116- Woods JA, Vieira VJ, Keylock KT. Exercise, inflammation, and innate immunity. *Neurol Clin.* 2006; 24:585-599.

- 117- Woods JA, Lu Q, Ceddia MA, Lowder T. Exercise and neuroendocrine modulation of macrophage function. *Immunol Cell Biol.* 2000; 78:545-553.
- 118- Ceddia MA, Voss EW, Woods JA. Intracellular mechanisms are responsible for the exhaustive exercise-induced suppression of macrophage antigen presentation. *J Appl Physiol.* 2000; 88:804-810.
- 119- Pedersen BK, Steensberg A, Fischer C, Keller C, Ostrowski K, Schjerling P. Exercise and cytokines with particular focus on muscle-derived IL-6. *Exerc Immunol Rev.* 2001; 7:18-31.
- 120- 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.
- 121- Renz H, Blumer N, Virna S, Sel S, Garn H. The immunological basis of the hygiene hypothesis. *Chem Immunol Allergy.* 2006; 91:30-48.
- 122- 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.
- 123- Pastva A, Estell K, Schoeb TR, Schwiebert LM. RU486 blocks the anti-inflammatory effects of exercise in a murine model of allergen-induced pulmonary inflammation. *Brain Behav Immun.* 2005; 19: 413-422.
- 124- Fish JE, Peters S. Airway remodeling and persistent airway obstruction in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1999; 104:509-516.
- 125- Leigh R, Ellis R, Wattie JN, Hirota JA, Matthaei KI, Foster PS, O'Byrne PM, Inman MD. Type 2 cytokines in the pathogenesis of sustained

dysfunction and airway remodeling in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004; 169:860-867.

126- Horvath G, Wanner A. Inhaled corticosteroids: effects on the airway vasculature in bronchial asthma. *Eur Respir J.* 2006; 27:172-187.

127- Salvato G. Quantitative and morphological analysis of the vascular bed in bronchial biopsy specimens from asthmatic and non-asthmatic subjects. *Thorax.* 2001; 56:902-906.

128- Li X, Wilson JW. Increased vascularity of the bronchial mucosa in mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 156:229–233.

129- Vrugt B, Wilson S, Bron A, Holgate ST, Djukanovic R, Aalbers R. Bronchial angiogenesis in severe glucocorticoid-dependent asthma. *Eur Respir J.* 2000; 15:1014–1021.

130- Chetta A, Zanini A, Foresi A, Del Donno M, Castagnaro A, D'Ippolito R, Baraldo S, Testi R, Saetta M, Olivieri D. Vascular component of airway remodeling in asthma is reduced by high dose of fluticasone. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 167:751–757.

131- Alam R, York J, Boyars M, Stafford S, Grant JA, Lee J, Forsythe P, Sim T, Ida N. Increased MCP-1, RANTES, and MIP-1alpha in bronchoalveolar lavage fluid of allergic asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 153:1398-1404.

132- Sousa AR, Lane SJ, Nakhosteen JA, Yoshimura T, Lee TH, Poston RN. Increased expression of the monocyte chemoattractant protein-1 in bronchial tissue from asthmatic subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1994; 10:142-147.

- 133- Romagnani S. Cytokines and chemoattractants in allergic inflammation. *Mol Immunol.* 2002; 38:881-885.
- 134- Ip WK, Wong CK, Lam CW. Interleukin (IL)-4 and IL-13 up-regulate monocyte chemoattractant protein-1 expression in human bronchial epithelial cells: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Janus kinase-2 but not c-Jun NH2-terminal kinase 1/2 signalling pathways. *Clin Exp Immunol.* 2006; 145:162-172.
- 135- Qiu Z, Fujimura M, Kurashima K, Nakao S, Mukaida N. Enhanced airway inflammation and decreased subepithelial fibrosis in interleukin 6-deficient mice following chronic exposure to aerosolized antigen. *Clin Exp Allergy.* 2004; 34:1321-1328.
- 136- Tigani B, Cannet C, Quintana HK, Ble FX, Zurbruegg S, Schaeublin E, Fozard JR, Beckmann N. Lung inflammation and vascular remodeling after repeated allergen challenge detected noninvasively by MRI. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 3 Nov 2006; doi. 10.1152/ajplung.00122.2006.
- 137- Green FH, Butt JC, James AL, Carroll NG. Abnormalities of the bronchial arteries in asthma. *Chest.* 2006; 130:1025-1033.
- 138- Pabst R, Tschernig T. Perivascular capillaries in the lung: an important but neglected vascular bed in immune reactions? *J Allergy Clin Immunol.* 2002; 110:209–214.
- 139- Pabst R. The periarterial space in the lung: its important role in lung edema, transplantation, and microbial or allergic inflammation. *Pathobiology.* 2004; 71:287–294.

- 140- Kojda G, Hambrecht R. Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy? *Cardiovasc Res.* 2005; 67:187-197.
- 141- Troseid M, Lappegard KT, Claudi T, Damas JK, Morkrid L, Brendberg R, Mollnes TE. Exercise reduces plasma levels of the chemokines MCP-1 and IL-8 in subjects with the metabolic syndrome. *Eur Heart J.* 2004; 25:349-355.
- 142- Adamopoulos S, Parissis J, Kroupis C, Georgiadis M, Karatzas D, Karavolias G, Koniavitou K, Coats AJ, Kremastinos DT. Physical training reduces peripheral markers of inflammation in patients with chronic heart failure. *Eur Heart J.* 2001; 22:791-797.
- 143- Henriksen JM, Toftegaard NT. Effect of physical training on exercise-induced bronchoconstriction. *Acta Paediatr.* 1983; 72:31-36.
- 144- Matsumoto IH, Araki K, Tsuda H, Odajima S, Nishima Y, Higaki H, Tanaka M, Tanaka, Shindo M. Effects of swimming training on aerobic capacity and exercise induced bronchoconstriction in children with bronchial asthma. *Thorax.* 1999; 54:196-201.
- 145- Szentagothai K, Gyene I, Szocska M, Osvath P. Physical exercise program for children with bronchial asthma. *Pediatr Pulmonol.* 1987; 3:166-172.
- 146- Nickerson BG, Bautista DB, Namey MA, et al. Distance running improves fitness in asthmatic children without pulmonary complications or changes in exercise-induced bronchospasm. *Pediatrics.* 1983; 71: 147-152.
- 147- Chimenti L, Morici G, Paterno 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; 175:442-449.

148- Wenzel S, Holgate ST. The mouse trap: It still yields few answers in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 174:1173-1176.

149- Shapiro SD. Animal models of asthma: Pro: Allergic avoidance of animal (models) is not an option. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 174:1171-1173.

ANEXOS

Anexo A

Aerobic Exercise Decrease Lung Inflammation and Airway Remodeling in Chronically Sensitized Mice. (Paper submetido ao American Journal of Respiratory Critical Care Medicine, em última revisão).

ABSTRACT

Aerobic conditioning improves exercise capacity and decreases symptoms in asthmatic patients. However, the exercise intensity required to provide benefits and its effect on allergic airway inflammation is poorly understood. We evaluated the effect of two distinct intensities of aerobic exercise on airway inflammation, cytokine expression and airway remodeling in a murine model of chronic allergic lung inflammation. Chronic ovalbumin (OVA) sensitized mice submitted to low (OVA-Low) and moderate (OVA-Mod) intensities of exercise training presented a significant decrease in eosinophil cells counting in BALF (respectively, 84% and 75%, $p < 0.05$) and airway walls (respectively, 94% and 58%, $p < 0.05$) when compared with the non-trained OVA group. OVA-Low and OVA-Mod groups also presented a significant reduction in the number of peribronchial inflammatory cells expressing interleukin 4 (IL-4) (respectively, 85% and 75%; $p < 0.05$) and IL-5 (respectively, 88% and 89%; $p < 0.05$) when compared with the non-trained OVA group. Aerobic conditioning did not change either the expression of interferon-gamma and IL-2 by peribronchial inflammatory cells or plasmatic levels of IgE or IgG₁. OVA-induced allergic airway inflammation resulted in airway remodeling characterized by an increase in collagen (288%), elastic

(56%), smooth muscle (380%) and epithelial (402%) contents ($p < 0.05$) when compared with the control group. Low and moderate aerobic conditioning reduced airway remodeling in OVA-sensitized mice when compared with the non-trained OVA group. In conclusion, our results show that low and moderate aerobic exercises decrease lung inflammation and airway remodeling in a murine model of asthma and suggest a beneficial effect on the clinical management of the disease.

Key words: asthma, aerobic exercise, lung inflammation, airway remodeling.

Anexo B

Aerobic Conditioning Decreases Vascular and Parenchymal Inflammation and Remodeling in Chronically Sensitized Mice. (Paper submetido ao Journal of Applied Physiology, em 1^a revisão).

ABSTRACT

Recent evidence suggests that asthma leads to inflammation and remodeling not only in the airways, but also in pulmonary vessels and parenchyma. The present study tested the hypothesis that aerobic conditioning decreases inflammation and remodeling in pulmonary vessels and parenchyma in a model of chronic allergic lung inflammation. Pulmonary vessel and parenchyma inflammation was evaluated by the quantitative analysis of eosinophils and mononuclear cells and remodeling by collagen and elastin content and smooth muscle thickness. Immunohistochemistry was also performed to quantify the density of IL-2, IL-4, IL-5, IFN- γ and MCP-1-positive cells. Balb/c mice were chronically sensitized with ovalbumin (OVA). Aerobic training was performed in a treadmill at low or moderate intensities. OVA-sensitization induced pulmonary vessel and parenchyma inflammation with increased density of eosinophils and mononuclear cells as well as IL-4, IL-5 and MCP-1-positive cells. OVA sensitization also induced an increase in smooth muscle thickness, elastic and collagen contents in pulmonary vessels. Low or moderate aerobic training intensities significantly decreased perivascular and parenchymal density of eosinophils and IL-4, IL-

5 and MCP-1-positive cells. In addition, low or moderate aerobic conditioning also decreased arterial smooth muscle thickness and collagen and elastin contents. These results demonstrated that low or moderate aerobic conditioning decreases pulmonary vascular and parenchymal inflammation and remodeling in chronically sensitized mice, suggesting extensive beneficial effects of aerobic conditioning for asthmatic patients.

Key words: asthma, aerobic exercise, pulmonary inflammation, pulmonary remodeling.