RONALDO APARECIDO DA SILVA

Efeitos do treinamento físico aeróbico de baixa intensidade na inflamação alérgica crônica e na resposta imune de camundongos sensibilizados

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

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

São Paulo
2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

DEDICATÓRIA

Dedico essa Dissertação aos meus Pais Idalina e Raimundo, por tudo que fizeram na minha vida, à minha noiva Nelba pelo carinho, dedicação, amor ao longo dos últimos 9 anos, aos colegas de laboratório que tanto ajudaram na realização desse trabalho, a uma verdadeira amiga e "segunda mãe" Sra. Silvia O. Espósito, aos meus amigos Gilberto Cortes e Marli de Albuquerque. Que a vida seja maravilhosa à todos vocês como ela está sendo pra mim. Muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo quero agradecer ao meu orientador, Professor Doutor Celso Ricardo Fernandes de Carvalho, pela confiança depositada, apoio, ajuda, oportunidade mesmo na época sem me conhecer, por acreditar na minha seriedade e palavra, pela paciência e amizade, que cresceram ao longo desses anos de trabalho. Grande Professor e Pesquisador de sucesso, o qual pretendo seguir o exemplo de perseverança, esforço, seriedade, competência e dedicação.

Agradeço aos meus pais Idalina e Raimundo por ajudarem em todos os momentos da minha vida, sem sua atenção, apoio e carinho eu não seria absolutamente nada na vida. Obrigado Mãe e Pai.

Agradeço à minha amada noiva Nelba pela presença em todos os momentos bons e maus, felizes e tristes, pela ajuda, apoio moral, atenção, carinho e todo amor. Amo você doce Nel.

Agradeço aos meus colegas de laboratório Beatriz M. Saraiva, Rodolfo de Paula Vieira, Anna Cecília Duarte Silva, Clarice Rosa Olivo, Vanessa Andrade, Felipe A. R. Mendes, Francine M. Almeida, Fernanda

M. Arantes, Fernanda Degobi Lopes, obrigado por toda ajuda e atenção despendida.

Aos Professores Doutores Milton de Arruda Martins, Adenir Perini e Thais Mauad, agradeço por todo respaldo, orientação e ajuda na realização desse projeto.

Aos meus amigos Marcel Augusto Ramires, és eterno meu grande amigo e "irmão", até o dia do reencontro do outro lado da vida. A André Lopes, grande amigo, incentivador e orientador na vida. Aos amigos Gilberto Cortez, Marli de Albuquerque e a Silvia Oliveira Espósito, minha "Segunda Mãe" e grande amiga.

E agradeço ao apoio da CAPES para minha sobrevivência financeira ao longo dos últimos dois anos.

EPÍGRAFE

Um dia ouvi alguém dizer que o ser humano nascia com uma maldição: “o único ser vivo que sabe que um dia vai morrer”. Apesar disso, ele também nasceu com um dom especial, que é o poder de mudar seu destino, o mundo e tudo que está a sua volta. Cabe a cada um ser o agente da sua própria mudança e do mundo ao seu redor, tão como fazer o bem ou o mal a aqueles que o cercam e a si mesmo. Quando criança, o meio que eu convivi parecia que, no máximo, me levaria a um óbito precoce e violento. Cheguei longe demais, porém ainda não venci o desafio final, que é a própria superação a cada dia.

Ronaldo A. Silva

SUMÁRIO

1 - Introdução.....02

1.1 - Epidemiologia da Asma.....02

1.2 - Fisiopatologia da Asma Alérgica.....03

1.2.1 - Resposta Tardia.....04

1.2.2 - Remodelamento das Vias Aéreas.....07

1.3 - Programa de Reabilitação para Asmáticos.....10

1.3.1 - Treinamento Físico para Asmáticos.....11

2 - Objetivos.....16

3 - Métodos.....18

3.1 - Aprovação do Estudo Pela Comissão de Ética.....18

3.2 - Uso de Animais.....18

3.3 - Grupos experimentais.....18

3.4 - Sensibilização à Ovoalbumina (OVA).....19

3.5 - Teste de Esforço na Esteira Ergométrica.....21

3.6 - Protocolo de Treinamento Aeróbico de Baixa Intensidade.....21

3.7 - Avaliação da Mecânica Respiratória.....23

3.8 - Coleta de Sangue e Eutanásia dos Animais.....23

3.9 - Retirada e Coleta dos Pulmões.....24

3.10 - Avaliação dos Títulos Específicos IgE e IgG_1 para OVA.....24

3.11 - Imunohistoquímica do Tecido Pulmonar.....25

3.12 - Preparo dos Pulmões para Imunohistoquímica.....26

3.13 - Análise Morfométrica.....27

3.14 - Análise do Remodelamento por Método de Análise de Imagem.....28

3.15 - Análise Estatística.....29

4 - Resultados.....31

5 - Discussão.....50

6 - Conclusão.....60

7 - Referências.....62

TABELA

Tabela I - Descrição dos Grupos de Animais.....19

FIGURAS

Figura 1 - Descrição do Protocolo Experimental de 8 semanas.....20

Figura 2 - Descrição do Protocolo de Treinamento Físico Aeróbico.....22

Figura 3 - Ganho de peso corporal nos grupos estudados.....31

Figura 4 - Melhora na capacidade física.....32

Figura 5 - Níveis plasmáticos de IgE específicos para OVA mensurados por PCA.....33

Figura 6 - Níveis plasmáticos de IgE específicos para OVA mensurados por PCA.....34

Figura 7 - Avaliação da resistência tecidual (Gtis).....35

Figura 8 - Avaliação da resistência tecidual (Htis).....35

Figura 9 - Infiltração eosinofílica peribrônquica.....36

Figura 10 - Infiltração de linfócitos CD3+ T avaliados com técnica de morfometria, quantificação em células/mm^2.....37

Figura 11 - Infiltração de linfócitos T CD4+ avaliados com técnica de morfometria, quantificação em células/mm^2.....38

Figura 12 - Células peribrônquicas positivas para IL-4 avaliadas com técnica de morfometria.....39

Figura 13 - Células peribrônquicas positivas para IL-5 avaliadas com técnica de morfometria.....39

Figura 14 - Células peribrônquicas positivas para IL-13 avaliadas com técnica de morfometria.....40

Figura 15 - Perímetro da membrana basal das vias aéreas.....41

Figura 16 - Quantificação das fibras de colágeno nas vias aéreas.....42

Figura 17 - Quantificação das fibras elásticas nas vias aéreas.....42

Figura 18 - Quantificação do músculo liso das vias aéreas.....43

Figura 19 - Expressão de muco epitelial.....43

Figura 20 - Fotomicrografia representativa do remodelamento das vias aéreas.....44

Figura 21 - Células peribrônquicas positivas para IL-2.....45

Figura 22 - Células peribrônquicas positivas para IFN-γ.....45

Figura 23 - Células peribrônquicas positivas para IL-10.....46

Figura 24 - Células peribrônquicas positivas para IL-1ra.....47

Figura 25 - Células peribrônquicas positivas para NF-κB.....48

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Alum	Hidróxido de Alumínio
BIE	Broncoespasmo Induzido Pelo Exercício
dp	Desvio Padrão
EF	Exercício Físico
GINA	*Global Iniciative for Asthma*
Gtis	Resistência Pulmonar
Htis	Elastância Pulmonar
HRB	Hiperresponsividade da Brônquica
IFN-γ	*Interferon Gamma*
IgE	Imunoglobulina E
IgG_1	Imunoglobulina Gamma 1
IL	Interleucina
IL-1ra	Interleucina 1 receptor antagonista
i.p.	Injeção Intraperitonial
km/h	Quilômetros por hora
mg	Microgramas
mL	Mililitros
NaCl	Soro Fisiológico
NF-κB	Fator de Transcrição Nuclear κ Beta
NK	Células *Natural Killer*
OVA	Ovoalbumina
PAS-AB	do inglês, Ácido Periódico de Schiff e Azul Alciano
PCA	Anafilaxia Cutânea Passiva
kg	Quilo
TA	Treinamento Físico Aeróbico
TF	Treinamento Físico
Th1	Células Perfil T Helper 1
Th2	Células Perfil T Helper 2
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
μm	Mícron

RESUMO

Efeitos do treinamento físico aeróbico de baixa intensidade na inflamação alérgica crônica e na resposta imune de camundongos sensibilizados. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Fisioterapia, Fonoaudiologia e Terapia Ocupacional, Universidade de São Paulo; 2009. 89p.

O treinamento físico (TF) é parte da reabilitação pulmonar de pacientes asmáticos e parece reduzir o número de crises, o uso de medicamento, o broncoespasmo induzido pelo exercício e aumenta a tolerância ao esforço e a qualidade de vida. Apesar de todos estes benefícios, poucos estudos têm investigado possíveis efeitos anti-inflamatórios desencadeados pelo TF na doença pulmonar alérgica. Em vista disto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do treinamento físico aeróbico (TA) em camundongos com doença inflamatória pulmonar alérgica crônica. Os animais foram divididos em 4 grupos: controle (não sensibilizados e não treinados), ovoalbumina (OVA; sensibilizados e não treinados), TA (não sensibilizados e treinados) e OVA+TA (sensibilizados e treinados). Os animais foram submetidos à sensibilização (aplicação de injeção intraperitonial de OVA+Hidrox Alum+NaCl nos dias 0, 14, 28 e 42 + exposição de aerosol de OVA a 1%, 3xsemana com início no 21º e fim no 54º dia do protocolo). Em seguida, os animais foram submetidos ao TA durante 4 semanas, iniciado no 28º dia (5xsemana, 60 minutos). Foram avaliados: os títulos de IgE e IgG_1 específicos para OVA, a infiltração peribrônquica de eosinófilos, linfócitos CD3+ e CD4+, a expressão de citocinas Th1 (IL-2 e IFN-γ) e Th2 (IL-4, IL-5 e

IL-13), a expressão de NF-κB e de citocinas regulatórias (IL-10 e IL-1ra). O remodelamento das vias aéreas também foi avaliado através das deposições de fibras de colágeno e elástica, espessamento do músculo liso e expressão de muco epitelial. Nossos resultados mostram que o TA em animais sensibilizados (grupo OVA+TA) reduziu a infiltração peribrônquica de eosinófilos, linfócitos CD3+ e CD4+ e a expressão das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 induzidos pela inflamação alérgica crônica. O TA também reduziu a expressão do NF-κB, o remodelamento brônquico e a resistência e elastância pulmonar induzidos pela inflamação alérgica. Por outro lado, o TA não reduziu a expressão de IgE e IgG1 e nem a expressão de IL-2 e IFN-γ. O TA em animais sensibilizados promoveu aumento da expressão de IL-10 e IL-1ra. Estes resultados sugerem que o treinamento físico tem um efeito anti-inflamatório na inflamação pulmonar alérgica sugerindo um possível mecanismo para os benefícios da reabilitação em pacientes asmáticos. Entretanto, a transposição destes resultados para pacientes asmáticos deve ser visto com cautela.

Descritores: Asma/Reabilitação, Sistema Imune, Inflamação, Interleucinas, Exercício.

SUMMARY

Effects of the aerobic physical training of decrease intensity in the chronic allergic inflammation and in the immune response of mice sensitized. [dissertation]. “São Paulo: Faculdade de Fisioterapia, Fonoaudiologia e Terapia Ocupacional, Universidade de São Paulo”; 2009. 89p.

The physical training (PT) is part of the pulmonary rehabilitation of asthmatic patients and seems to reduce the number of crises, the use of medicine, the broncoespasm prompted by the exercise and increase the tolerance to the effort and the quality of life. Despite of these benefits, a few studies have investigated possible anti-inflammatory effects triggered by the PT in asthma. Based on that, the objective of the present study was evaluating the effect of the physical aerobic training (AT) in mice with chronic allergic pulmonary disease. The animals were divided in 4 groups: Control (non-sensitized and non-trained), Ovalbumin (OVA, sensitized and non-trained), AT (non-sensitized and trained), and OVA+AT (sensitized and trained). The mice were submitted to the sensitization (intraperitonial injection of OVA+Hidrox Alum+NaCl in the days 0, 14, 28, and 42 + exposition to the OVA aerosol to 1%, 3xweek, beginning in the 21st from to 54th day of protocol. Then, the mice were submitted to AT during 4 weeks, being initiated in the 28th day (5xweek, 60 minutes). It was evaluated: IgE and IgG1 titles specifics to OVA, peribronquial eosinophils infiltration, and CD3+ and CD4+ lymphocites T, the expression of cytokines Th1 (IL-2 and IFN-γ) and Th2 (IL-4, IL-5, and IL-13), the expression of NF-κB and regulatory cytokines (IL-10 e IL-1ra). The

airways remodeling was also evaluate through of the collagen and elastic fiber depositions, by increase of smooth muscle of airways and the expression of epithelial mucus. Our results showed that the AT in sensitized mice (OVA+AT group) decreased the peribronquial infiltration of eosinophils, and CD3+ and CD4+ lymphocites, the expression of cytokines IL-4, IL-5 e IL-13 induced by allergic chronic inflammation. The AT also decreased the NF-κB expression, the bronquial remodeling and the resistance and elastance pulmonary induced by allergic inflammation. On the other hand, the AT did not decrease the expression of IgE and IgG1 and the expression of IL-2 e IFN-γ either. The AT in sensitized mice promoted an increase in the expression of IL-10 and IL-1ra. These results show that physical training has an effect anti-inflammatory in the allergic chronic inflammation in mice, and suggests a possible mechanism for the rehabilitation in asthmatic patients. However, the transposition of these results for asthmatic patients should be seen with caution.

Wordkeys: Asthma/Rehabilitation, Immune System, Inflammation, Interleukins, Exercise.

1 – INTRODUÇÃO

A asma é uma síndrome inflamatória crônica que acomete as vias aéreas e envolve vários tipos de células. A inflamação crônica parece estar associada com hiperresponsividade brônquica (HRB), inflamação brônquica, falta de ar (dispnéia), tosse e sibilância, problemas que ocorrem, principalmente, no início da noite e começo da manhã. Atualmente, esses problemas crônicos podem ser totais ou parcialmente revertidos e tratados com medicamentos (GINA, 2006).

A asma é uma das doenças mais prevalentes nos países industrializados (GINA, 2006) e, apesar do desenvolvimento de novas terapias anti-asma, existem muitas evidências sugerindo que a prevalência e a morbidade estão aumentando (Barnes, 1996).

1.1 - Epidemiologia da Asma

A doença afeta no mundo, aproximadamente, 300 milhões de pessoas, podendo atingir de 1 a 18% das populações em cada país (GINA, 2006). Entre 56 países estudados pelo "*The International Study of Asthma and Allergy in Childhood*" (ISAAC,1998), o Brasil ocupou a 8ª posição no *ranking* de pessoas afetadas por asma. Segundo o Sistema Único de Saúde (SUS), a asma é a 4ª causa por internação (cerca de 350.000 casos/ano) e a 3ª entre adultos e crianças, a patologia ainda proporcionou um gasto de R$ 76 milhões apenas no ano de 1996, o que representa 2,6% do orçamento total desse ano (Ministério da Saúde, 2000). Já em 2005, foram registradas

367.000 internações pela doença, gerando um gasto de R$ 123.2 milhões ao SUS (Ministério da Saúde, 2005).

1.2 – Fisiopatologia da Asma Alérgica

Os problemas se agravam com a severidade da doença levando ao aumento da migração e sobrevida dos linfócitos e eosinófilos nas vias aéreas (Muro et al., 2000; Holgate, 2004; Kay, 2005), manutenção da inflamação e remodelamento das vias aéreas (James & Wenzel, 2007; Broide, 2008). Estudos recentes mostram que a asma também provoca remodelamento dos vasos sangüíneos na região peribrônquica (Siddiqui et al., 2007; Rydell-Törmänen et al., 2008) e remodelamento do parênquima (Xisto et al., 2005).

A fisiopatologia da asma alérgica é um processo muito complexo que envolve uma série de mecanismos modulatórios. Inicialmente, existe um período de sensibilização caracterizado pelo primeiro contato com o alérgeno ou antígeno que desencadeia a produção de anticorpos específicos, tais como a imunoglobulina E (IgE) (Hamelmann et al., 1999; Muro et al., 2000). Após uma segunda exposição, os anticorpos liberados ligam-se ao antígeno e estimulam os macrófagos a liberarem leucotrienos, histamina, prostaglandinas, triptases entre outros mediadores que promovem constrição das vias aéreas e podendo iniciar a fase imediata que dura cerca de 2 horas (Barnes, 1996; Muro et al., 2000; Holgate, 2004). Posteriormente, pode ocorrer à resposta tardia que se inicia através do

recrutamento de células inflamatórias para as vias aéreas, podendo levar a manutenção da inflamação e remodelamento das vias aéreas (Barnes, 1996; Holgate, 2008).

1.2.1 - Resposta Tardia

O indivíduo asmático alérgico apresenta resposta tardia após 4 a 6 horas da exposição ao antígeno e da reação ou fase imediata que pode durar até 72 horas após o contato com o alérgeno (Ferreira, 2004). A asma alérgica é uma doença mediada pelo sistema imune e dirigida em parte pelos linfócitos T helper que atuam contra alérgenos e viroses (Busse & Lemanske, 2001).

Em 1986, Mosmann & colaboradores (1986) descreveram proteínas ou linfocinas (citocinas) expressas pelos subtipos de linfócitos T helper 1 (Th1) e T helper 2 (Th2) presentes na resposta imune de camundongos. Cada subtipo ou resposta celular foi descrito como responsável por expressar diferentes citocinas. As células do perfil Th1 expressam *interferon gamma* (IFN-γ) e interleucina-2 (IL-2) e o perfil Th2 que expressam IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. Estas citocinas exercem efeito inibitório e bloqueador no outro perfil ou resposta.

Os mesmos pesquisadores sugeriram posteriormente que a predominância da resposta perfil Th2 é responsável pela ocorrência de doenças alérgicas inflamatórias como a asma, conseqüentemente com redução da resposta imune perfil Th1 (Mosmann & Coffman, 1989). Esta

teoria conhecida como hipótese da higiene é bem debatida até os dias de hoje (Romagnani, 1992; Robinson, 2000).

A partir dos achados de Mosmann & colaboradores sobre e as funções desempenhadas pelas citocinas Th1 e Th2, muitos estudos avaliaram essas respostas e os efeitos imunomodulatórios das citocinas e mediadores expressos por cada uma e a relação com a fisiopatologia de doenças alérgicas como a asma (Gajewski et al., 1988; Romagnani, 1992).

Conseqüentemente, verificou-se que indivíduos asmáticos têm ação aumentada e predominante de linfócitos CD4+ T helper que expressam IL-4, IL-5 (Ying et al, 1997) e IL-13 (Li et al., 1999; Cohn et al, 2004). As citocinas Th2 atuam no aumento da migração e sobrevida de eosinófilos, degranulação de mastócitos, espessamento do epitélio, aumento da deposição de colágeno, hipertrofia do músculo liso das vias aéreas (Barnes, 1996; Brightling et al, 2002; Ma et al, 2007; Menzies-Gow et al, 2007; Nath et al, 2007; Broide, 2008).

Em suma, as ações dessas citocinas Th2 estão diretamente associadas com doenças alérgicas, defesa contra agentes invasores ou parasitas e na manutenção da resposta imune Th2 (Foster et al, 2002; Komai et al, 2003; Nath et al, 2007) e redução da resposta imune Th1 (Romagnani, 2004).

A Interleucina-4 (IL-4) é extremamente importante para o aumento e desenvolvimento da resposta imune Th2 (Barnes, 1996; Fallon et al., 2002; Holgate, 2004) e está envolvida no aumento da expressão de IgE (anticorpo)

(Del prete et al., 1988; Vercelli et al., 1990) e na redução da expressão de IFN-γ e da resposta imune Th1 (Cohn et al., 2001).

A IL-5 estimula a produção de quimiocinas e está envolvida na responsividade das vias aéreas (Tan et al., 2007), mas seu principal papel parece ser promover o aumento da migração e sobrevida de eosinófilos nas vias aéreas (Foster et al., 1996; Hogan et al, 1997; Foster et al, 2002), células que se apresentam em grande número nas vias aéreas de asmáticos, atuando no aumento da resposta inflamatória, danos teciduais (Menzies-Gow et al., 2007; Leckie et al., 2000) e remodelamento nas vias aéreas (Cho et al., 2004).

Já a IL-13 desempenha função semelhante a IL-4 e IL-5 (Li et al., 1999), promovendo manutenção da resposta Th2 (Webb et al, 2007) e aumento da inflamação (Li et al, 1999). Além disto, estudos sugerem que seu papel na fisiopatologia da asma também é estimular hiperresponsividade das vias aéreas, hiperplasia do músculo liso e expressão de IgE (Nath et al., 2007).

As expressões elevadas das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 atuam na manutenção da resposta imune Th2 e diminuição da resposta Th1 imune (Castro et al, 2000; Romagnani, 2004) e ainda promovem aumento da expressão de outras quimiocinas e moléculas de adesão, que, auxiliam no aumento e na manutenção do processo inflamatório, decorrente disso ocorre o remodelamento das vias aéreas, processo que é considerado secundário derivado da inflamação crônica nas vias aéreas.

1.2.2 - Remodelamento das Vias Aéreas

O remodelamento das vias aéreas é definido como uma série de mudanças nas composições estruturais das vias aéreas (Davies et al., 2003), resultando no espessamento do epitélio, hiperplasia das células de *goglet*, aumento da expressão de muco epitelial, espessamento do músculo liso das vias aéreas, angiogênese, fibrose subepitelial, desequilíbrio nos componentes da matriz extracelular e aumento da HRB (Bousquet et al., 2000; Hogaboam et al., 2000; Jeffery, 2001; Lloyd & Robinson, 2007; Mauad et al., 2007; Broide, 2008).

Comumente, verifica-se nas vias aéreas de asmáticos um grande aumento da expressão de muco (James & Wenzel, 2007; Mauad et al., 2007) que contribuiu para piora do fluxo das vias aéreas, esse aumento é atribuído principalmente pela ação da citocina IL-13 (Zhu et al., 1999; Kuperman et al., 2002). O aumento da expressão de muco epitelial também é decorrente da hiperplasia e aumento da atividade das células de *goblet*, tão como aumento do tamanho das glândulas submucosas (Ordonez et al., 2001; James & Wenzel, 2007). Apesar de ser apenas detectável através de microscopia eletrônica é verificado em asmáticos o espessamento da membrana basal (Mauad et al., 2007).

As vias áreas também são prejudicadas com edema, porém essa alteração não é decorrente apenas pelas modificações no epitélio e pelo aumento do músculo liso, mas também por aumento da fibrose na região subepitelial, aumento da microvascularização na região peribrônquica, pelo

espessamento dos vasos sangüíneos e pelo extravasamento de plasma (Mauad et al., 2007; Broide, 2008). Na região peribrônquica ocorre aumento de fibrose subepitelial (Mauad et al., 2007), resultado de um desequilíbrio na síntese e degradação de fibras e/ou proteínas da matriz extracelular (Gueders et al., 2006). O problema é bem evidenciado com ao aumento da deposição de fibras de colágeno tipo I e III, fibras de proteína elástica, fibronectina e proteoglicanas (Reinhardt et al., 2005). Essa ampliação da deposição de matriz extracelular parece ocorrer devido à ação de citocinas como IL-11 e fatores de crescimento como (fator de crescimento e transformação-β (TGF-β) que estimulam a produção dessas fibras por miofibroblastos (Roche et al., 1989) e por outros mecanismos como desequilíbrio na síntese e degradação da matriz extracelular (Araújo et al., 2008) e pela síntese e degradação da matriz metaloproteinase (MMPs), que ocorrem principalmente pela expressão de inibidores fisiológicos denominados inibidores de matriz metaloproteinases (TIMPs), classificadas em TIMP-1, 2, 3 e 4 (Baker et al., 2002; Gueders et al., 2006)

A HRB em indivíduos asmáticos é outro problema decorrente do processo inflamatório e do remodelamento das vias aéreas (Broide, 2008). Existem evidências sugerindo que a HRB pode ocorrer devido aumento da contração, atividade e aumento do volume do músculo liso das vias aéreas (Bumbacea et al., 2004). Outro fator seria descamação epitelial que ocorre por conseqüência da inflamação ou pela capacidade das células epiteliais de produzirem mediadores pro-inflamatórios (Bucchieri et al., 2002; Panettieri, 2002).

O músculo liso das vias aéreas do asmático sofre aumento de tamanho (Mauad et al., 2007) por hipertrofia e hiperplasia (Ebina et al., 1993). Esses processos possivelmente são estimulados pela ação da própria divisão celular das fibras musculares ou pela migração de células mesenquimais que podem diferenciar-se em células musculares (Heard & Hussain, 1973). Essas alterações podem ser também mediadas por fatores de crescimento (como, por exemplo, o TGF-β entre outros) e por espécies reativas de oxigênio (Roth et al., 2004).

O músculo liso das vias aéreas do indivíduo asmático tem aumento da sua função contrátil (Bentley et al., 2008) e isso pode ocorrer devido a ação do fator de necrose tumoral (TNF-α) (Nakae et al., 2007). Essa reação parece acontecer devido ao aumento da expressão dos receptores do TNF-α no músculo liso (Shore & Johnston, 2006).

Além disto, o músculo liso também é considerado uma estrutura imunomodulatória devido a sua capacidade de expressar vários mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas e fatores de crescimentos que têm importante função na manutenção da inflamação, remodelamento e hiperrresponsividade (Chung, 2000).

Até pouco tempo, acreditava-se que o aumento da resposta Th2 no momento de crise era responsável por todo processo de remodelamento das vias aéreas, entretanto estudos mais recentes demonstram que o remodelamento pode também ser observado nos momentos sem crise (Sumi & Hamid, 2007).

1.3 - Programa de Reabilitação para Asmáticos

Os programas de reabilitação para asmáticos têm obtido bons resultados como adjuvante para o tratamento da doença. Esses programas são compostos por um conjunto de ações, como educação do paciente que incluem: informações sobre a fisiotapatologia, o uso correto da medicação e orientar o paciente a reconhecer a gravidade da crise. Além disto, o programa de reabilitação inclui a melhora da capacidade física aeróbia e inclui o acompanhamento psicológico e nutricional (Cambach et al., 1997; BTS, 2001; Lemaigre et al., 2005; ATS/ERS, 2006; Ries et al., 2007). O programa de reabilitação deve ser de origem multiprofissional e contar com profissionais das diversas áreas da saúde tais como nutricionista, médico, educador físico, fisioterapeuta, psicólogo e assistente social que conjuntamente proporcionarão ao doente melhores condições de controle e ajuda no tratamento da asma (ATS/ERS, 2006).

Alguns estudos sugerem que pacientes asmáticos submetidos a programas de reabilitação apresentam redução do número de crises, internações, uso de medicação, sintomas diários de asma e melhora da qualidade de vida, do *status* de saúde e do condicionamento aeróbico (Emtner et al., 1996; Cambach et al., 1997; Basaran et al., 2006; Fanelli et al., 2007; Weisgerber et al., 2008). As somatórias de todas as ações contidas no programa de reabilitação são mais eficientes quando comparadas apenas com simples acompanhamento clínico, além de aumentar a aderência do paciente ao seu tratamento, também promovem

modificações quanto aos hábitos diários de vida e transferem ao paciente parte da responsabilidade para que ele cuide do problema, melhorando o controle da doença e sua gravidade bem como a qualidade de vida (Basaram et al., 2006; BTS, 2001).

1.3.1 - Treinamento Físico para Asmáticos

O exercício físico é um dos principais fatores responsáveis por desencadear dispnéia e broncoespasmo induzido pelo exercício (BIE), principalmente em crianças asmáticas (Welsh et al., 2005). Por causa disto, até pouco tempo atrás, a recomendação da prática de exercícios físicos para asmáticos ainda era visto como imprudente ou até mesmo irresponsável devido ao BIE que poderia ser desencadeado durante o esforço físico (Disabella & Sherman, 1998). Contudo, ao longo dos anos, o assunto foi estudado por vários grupos de pesquisa apesar das descrenças sobre os efeitos positivos dos exercícios físicos para asmáticos.

Nesse sentido, Clark & Cochrane (1999) revisaram estudos sobre treinamento físico (TF) em asmáticos e mostraram que ele é eficaz na melhora da tolerância ao exercício, redução do BIE, no aumento do VO_2máx (consumo máximo de oxigênio) e pode ser utilizado em programas de reabilitação para asmáticos. Entretanto, existem controvérsias sobre as modalidades de atividades para estes pacientes.

Numa revisão sistemática recente, Ram & colaboradores (2009), concluem que o TF melhora o VO_2máx, porém não altera a função pulmonar

e a freqüência cardíaca. Apesar disto, os autores concluem sobre a necessidade de estudos avaliando a qualidade de vida e os sintomas dos asmáticos que praticaram exercício físico regular. Um fato relevante verificado nesses estudos diz respeito à falta de informações sobre os possíveis mecanismos desencadeados pelo TF e qual sua relação com o sistema imune nos asmáticos.

Ao longo destes anos, os estudos referentes aos possíveis benefícios proporcionados pelo TF para asmáticos foram aprofundados e alguns estudos sugerem que os benefícios proporcionados pelo TF não estão restritos apenas a diminuição do BIE e ao aumento do condicionamento físico, também promoveram aumento da tolerância ao exercício (Sly et al., 1972; Fitch et al., 1976; Fanelli et al., 2007), melhoraram a qualidade de vida (Cambach et al., 1997; Basaran et al., 2006; Fanelli et al., 2007; Weisgerber et al., 2008), reduziu o uso da medicação (Fitch et al., 1976; Neder et al., 1999; Fanelli et al., 2007), o número de sintomas (Emtner et al., 1996; Fanelli et al., 2007; Weisgerber et al., 2008), a freqüência de crises, o número de visitas a serviços de emergência médica, o absenteísmo escolar e laboral (Tinkelman, 1987; Fanelli et al., 2007; Weisgerber et al., 2008).

Existem evidências mostrado que o exercício físico em indivíduos saudáveis pode desencadear alguns efeitos anti-inflamatórios (Petersen & Pedersen, 2005; Cooper et al., 2007) que parecem depender da intensidade e duração (Nieman et al., 1990; Welsh et al., 2005; Cooper et al., 2007). Porém, parece que o exercício físico, quando realizado com intensidade baixa e/ou moderada desencadeiam uma resposta anti-inflamatória

(Petersen & Pedersen, 2005; Smith, 2003). Estes efeitos do TF parecem modular as respostas Th1 e Th2, porém isso ainda permanece pobremente entendido (Smith, 2003; Shephard, 2001). Estudos recentes sugerem que o TF parece atuar como fator estimulador da expressão citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e IL-1ra (receptor antagonista de IL-1) que teria importante na redução na incidência de problemas inflamatórios (Petersen & Pedersen, 2005; Pedersen & Fisher, 2007; Pedersen et al., 2007). Apesar desses achados, existem poucos estudos que investigaram o efeito do TF na resposta imune Th1, Th2 e na expressão citocinas anti-inflamatórias em asmáticos.

Estudos recentes com modelos experimentais de inflamação pulmonar alérgica em camundongos (*"asma experimental"*) investigaram o efeito do TF na expressão de IgE, na resposta imune Th2, migração de leucócitos, no NF-κB (Pastva et al., 2004), na expressão de mediadores hormonais (Pastva et al., 2005), na resposta Th1, no remodelamento das vias aéreas e expressão da citocina anti-inflamatória (Vieira et al., 2007).

Pastva et al., (2004) mostraram que camundongos sensibilizados com inflamação pulmonar alérgica expostos ao protocolo de TF aeróbico apresentaram redução da migração de leucócitos, dos títulos de IgE, na expressão da citocina IL-4 e IL-5 (Th2), de VCAM-1 (molécula de adesão celular vascular-1) e proteína KC e NF-κB. Em estudo subseqüente, os mesmos pesquisadores atribuíram ao glucocorticoide endógeno o efeito protetor desencadeado pelo TF (Pastva et al., 2005).

Vieira et al., (2007) verificaram que camundongos sensibilizados expostos ao TF aeróbico de intensidade baixa e moderada não tiveram redução da expressão das imunoglobulinas específicas IgE e IgG_1, apesar disso o TF foi eficaz na diminuição da migração de leucócitos, da expressão de IL-4 e IL-5, infiltração de eosinófilos nas vias aéreas e remodelamento. Porém não houve aumento da resposta Th1. Contudo, foi verificado aumento da expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 e atribuída a esse mediador o efeito protetor desencadeado pelo TF, que parece ter efeito anti-inflamatório por outros mecanismos diferentes dos hormonais.

Apesar das evidências apresentadas acima serem de grande contribuição e avanço para o entendimento dos possíveis mecanismos anti-inflamatórios desencadeados pelo TF nos modelos experimentais de asma, ainda faltam respostas sobre outros possíveis mecanismos protetores, como por exemplo a expressão de IL-1ra, que é relatada como uma citocina anti-inflamatória aumentada após realização de exercícios físicos (Petersen & Pedersen, 2005),

Ainda entendemos que a relevância do presente se dá pelo fato do TF ter sido iniciado após o estabelecimento da inflamação e do remodelamento nas vias aéreas, usando um modelo de inflamação pulmonar alérgica mais longa e crônica. Diferentemente de Pastva e Vieira, nós ainda avaliamos a mecânica respiratória *in vivo*, os linfócitos CD3+ e CD4+ peribrônquicos, na expressão de IL-13, de muco epitelial e de IL-1ra nos animias sensibilizados e treinados, o que foi pobremente investigado pelos estudos citados anteriormente.

2 - OBJETIVOS

Devido ao descrito acima, o presente estudo teve como objetivos:

- Investigar os efeitos do treinamento físico aeróbico na inflamação pulmonar alérgica em animais sensibilizados;

- Avaliar o efeito do treinamento físico na resposta imune Th1 e Th2;

- Avaliar os efeitos do treinamento físico no remodelamento das vias aéreas e na mecânica respiratória;

- Avaliar o possível mecanismo anti-inflamatório do treinamento físico através da mensuração de citocinas regulatórias e anti-inflamatórias;

3 - MÉTODOS

3.1 - Aprovação do Estudo Pela Comissão de Ética

Todos os procedimentos experimentais propostos neste estudo foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética e Pesquisa (CAPPesq) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), recebendo o protocolo número 0797/97.

3.2 – Uso de Animais

O estudo utilizou 28 camundongos da linhagem BALB/c machos, adultos jovens com idade aproximada de 6 a 8 semanas, peso médio 25 gramas, provindos e mantidos no Biotério central da FMUSP com controle da umidade e temperatura (24°C ± 1), umidade relativa 40-60%, ciclo claro-escuro de 12 horas e alimentados com ração (Purina, Brasil) e hidratados com água *ad libitum* (à vontade).

3.3 - Grupos experimentais

Os animais foram divididos em 04 grupos (n=7): não sensibilizados e não treinados **(Controle)**; não sensibilizados e treinados **(TA)**; sensibilizados à Ovoalbumina e não treinados **(OVA)**; sensibilizados e treinados **(OVA+TA)**. As intervenções propostas estão detalhadas na tabela I.

Tabela I - Descrição dos Grupos:

GRUPOS	Sensibilização à OVA	Treinamento de baixa intensidade (50%)
Controle	-	-
TA	-	+
OVA	+	-
OVA+TA	+	+

Legenda:

(-) = não; (+) = sim
TA = Treinamento Físico Aeróbico
OVA = Sensibilização à OVA
Os animais não sensibilizados receberam salina

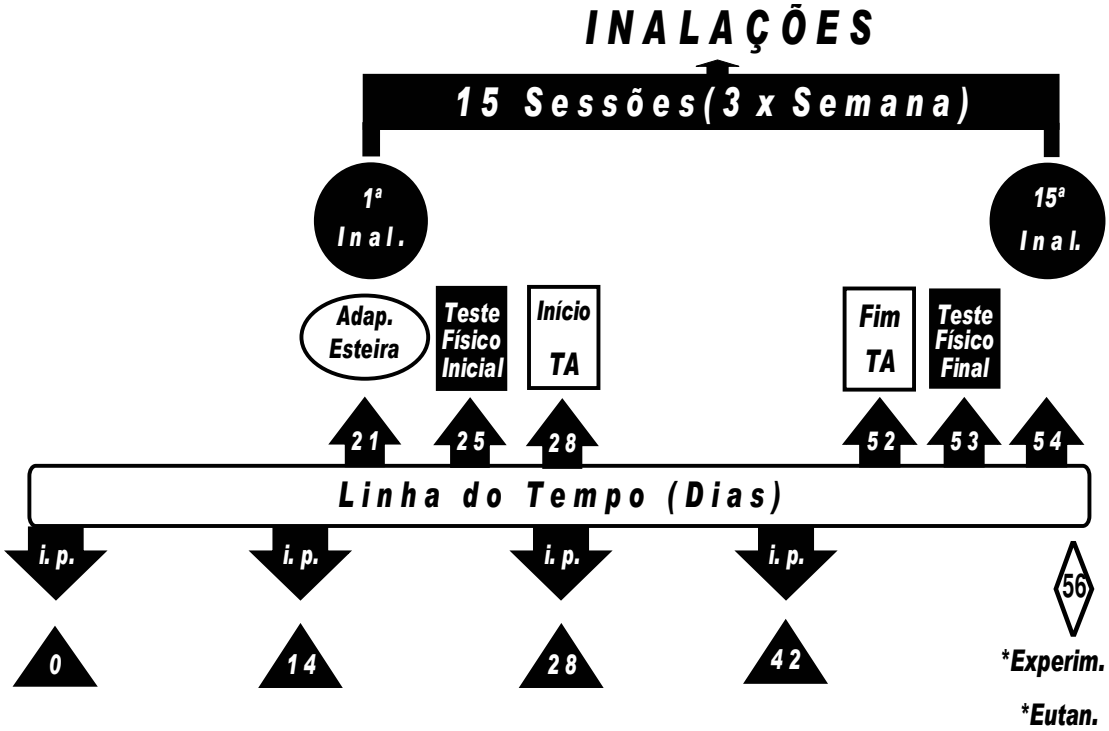
3.4 - Sensibilização à Ovoalbumina (OVA)

Os grupos OVA e OVA+TA foram submetidos à sensibilização com Ovoalbumina. Para isto, nos dias 0, 14, 28 e 42, os animais dos grupos citados acima receberam aplicações de injeções intraperitoniais (i.p.) com 10 microgramas de OVA, 1,9 mL de NaCl (soro fisiológico 0,9%) e 1 mL de hidróxido de alumínio (Laboratório Sanofi-Syntlelado, Brasil).

No 21° dia de experimento, os grupos OVA e OVA+TA foram expostos a sessões de exposição ao aerosol com OVA a 1% homogeneizada em NaCl (0,9%). O aerosol foi gerado com uso de um *Nebulizador Ultrasonic* (Pulmoclear II Luxo, Soniclear, São Paulo, Brasil), os animais foram colocados em caixas de acrílico (dimensões 30x15x20 cm) e

submetidos à inalação por um período de 30 minutos, 3 vezes por semana, em dias alternados até o 54º dia. Quarenta e oito horas após a última inalação, os animais foram submetidos a eutanásia. Os grupos Controle e TA receberam injeções i.p. e inalações com NaCl (0,9%) nos mesmos dias e horários dos grupos sensibilizados.

Figura. 1 – Descrição do Protocolo Experimental



Legenda:

▲= Injeção Intraperitonial

● = Período de Inalação à OVA

○ = Dias 21, 22 e 23 Adaptação na Esteira Ergométrica

■ = Realização dos Testes Físicos Inicial e Final

□ = Início e Fim do Treinamento Físico Aeróbico

◊ = Experimentos e Eutanásia dos Animais

3.5 - Teste Físico de Esforço na Esteira Ergométrica

Todos animais foram submetidos à teste físico no início e ao final do programa de treinamento para determinar a capacidade física máxima de todos os animais, como previamente descrito (Vieira et al., 2007). Antes do teste inicial, os animais foram submetidos à adaptação na esteira ergométrica (Imbramed, RT 400, Santa Catarina, Brasil) durante 3 dias consecutivos, por 15 minutos, velocidade 0,2 km/h e inclinação de 25%.

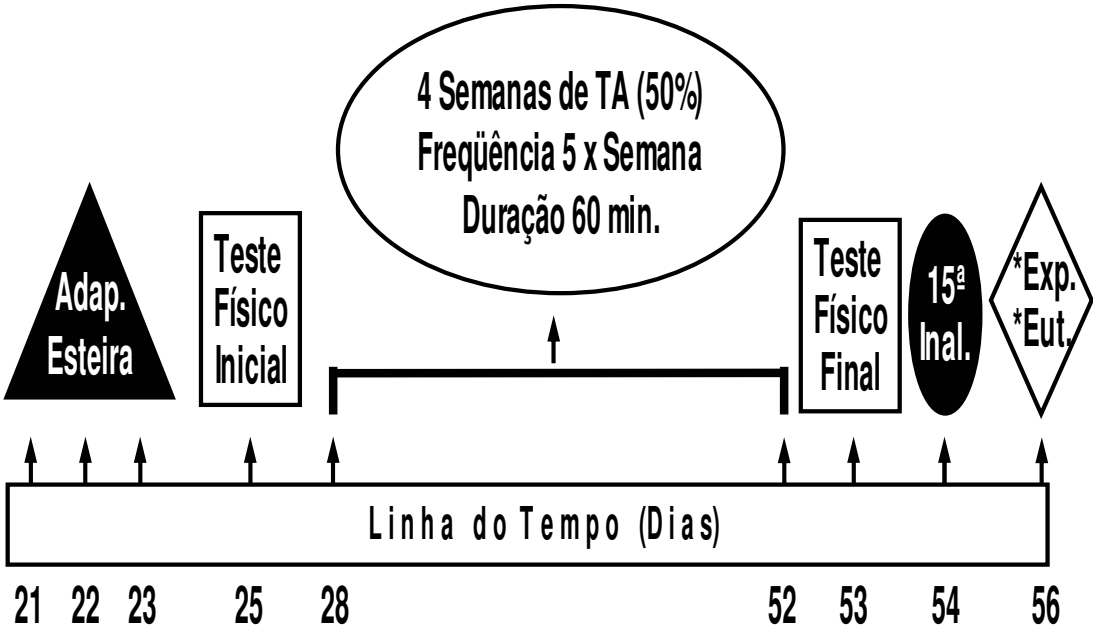
O teste físico de esforço foi realizado no 25º dia com inclinação de 25%, velocidade inicial 0,2 km/h nos primeiros 5 minutos e, após este período, a velocidade foi aumentada em 0,1 km/h a cada 2 minutos e 30 segundos. Quando os animais não conseguiram mais manter a velocidade após 10 estímulos físicos, eles eram retirados e anotados o tempo (em minutos) e a velocidade (em Km/h). A intensidade de treinamento adotada foi 50 % da média da velocidade obtida pelos animais. O mesmo teste físico foi repetido no 53º dia.

3.6 - Protocolo de Treinamento Aeróbico de Baixa Intensidade

Os grupos TA e OVA+TA foram submetidos ao protocolo de treinamento físico aeróbico de baixa intensidade (50% da média em Km/h obtida no primeiro teste físico de esforço), iniciando no 28° dia do experimento, após os animais já terem recebido duas aplicações de i.p. (dia 0 e 14) e expostos a 3 sessões de aerosol de OVA. O protocolo de

treinamento físico aeróbico foi realizado durante 4 semanas consecutivas terminando no 52º dia. O treinamento foi realizado com a esteira ergométrica com freqüência de 5 vezes por semana, duração de 60 minutos, inclinação de 25%, sendo 05 minutos para aquecimento, 50 minutos de atividade principal com e 5 minutos para volta à calma.

Figura 2 – Descrição do Protocolo de Treinamento Físico Aeróbico



Legenda:

▲ = Período de Adaptação na Esteira Ergométrica
□ = Realização dos Testes Físicos Inicial e Final
○ = Período de Treinamento Físico Aeróbico
● = Última Sessão de Inalação
◊ = Experimentos e Eutanásia dos Animais

3.7 - Avaliação da Mecânica Respiratória

No 56° dia, 48 horas após da ultima sessão de aerosol, os animais foram anestesiados com Thiopental Sódico (50 mg/Kg; i.p.) (Laboratório Cristalia, Brasil), traqueotomizados com um tubo de polietileno, sedados e conectados a um ventilador mecânico *Flexivent* (SCIREQ, Montreal, Canadá) e ventilado com um volume corrente de 10 mL/Kg and 2 Hz, respectivamente. A oscilação da mecânica pulmonar foi registrada através da aplicação ondas de oscilações nas vias aéreas através de diferentes freqüências entre 0.25 and 19.625 Hz por 16 segundos (Fust et al., 2005). Foram obtidas a resistência e a elastância tecidual (respectivamente, Gtis e Htis) como previamente descrito (Hantos et al., 2003).

3.8 - Coleta de Sangue e Eutanásia dos Animais

Após anestesia, os animais foram submetidos à assepsia e tricotomizados na região abdominal com iodo polvidona para realização da incisão, foi coletado 1 mL de sangue pela veia cava inferior com uso de uma seringa de 1mL, previamente preparada com 0,1 mL de Heparina Sódica (Laboratório Hipolabor, Brasil) e, em seguida, os animais foram eutanizados por ex-sangüinidade (Vieira, 2007).

As amostras de sangue coletadas foram centrifugadas no equipamento *Beckman CS-CR Centrifugue* (Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, USA) por 15 minutos, 1000 rpm à 5° C. Em seguida, o plasma foi

retirado com uma Micropipeta (Gilson, França) e congelado à -70°C no Freezer *Forma Scientific* 3775 (Cambridge Scientific Products, Cambridge, MA) para futuras análises das imunoglobulinas específicas para OVA.

3.9 - Retirada e Coleta dos Pulmões

Os pulmões foram retirados em bloco para processamento com técnicas de histologia e futuras análises da inflamação celular, expressão de citocinas e remodelamento brônquico. O processo de retirada dos órgãos foi iniciado com aplicação de 0,3 mL de formol 10% para pré-fixação celular, a traquéia foi amarrada com fio cirúrgico e os pulmões foram retirados. Em seguida, os pulmões foram mantidos em 200 mL de formol (10%) por um período de máximo de 12 horas, em seguida foram submetidos à rotina histológica (Behmer et al., 1976; Vieira, 2007).

3.10 – Avaliação dos Títulos Específicos IgE e IgG_1 para OVA

As amostras de plasma do sangue processadas e armazenadas à –70ºC foram utilizadas para avaliação dos títulos de imunoglobulinas G_1 e E (respectivamente, IgG_1 e IgE) através da técnica de anafilaxia cutânea passiva (PCA) como descrito por Mota e Perini (1970). Para determinação dos títulos de IgE, o plasma sanguíneo foi aliquotado de 1:20 a 1:160 e injetado no subcutâneo do dorso de ratos *Wistar* previamente depilados. Após 24 horas, os animais receberam uma injeção intravenosa contendo a

base de 1 mg de OVA e 10 mg de azul de Evans homogeneizados em 1 mL de NaCL (0,9%). Após 60 minutos, os animais foram anestesiados e eutanizados, a pele do dorso foi removida e foi avaliada a reação anafilática local pela quantificação do diâmetro da reação no tecido subcutâneo.

A avaliação dos títulos de IgG_1 ocorreu de forma semelhante à de IgE, entretanto a reação foi avaliada em camundongos BALB/c. O plasma foi aliquotado de 1:5 a 1:1200 e então injetado no tecido subcutâneo do dorso dos animais. Após 24 horas de repouso para ocorrer à reação passiva, os animais receberam as injeções intravenosas a base de 1 mg de OVA e 10 mg de azul de Evans homogeneizados em 1 mL de NaCL (0,9%). Após 60 minutos da aplicação, os animais foram anestesiados e eutanizados, a pele do dorso foi tricotomizada para visualização e foi avaliada a reação ocorrida no local da injeção inicial no tecido subcutâneo.

3.11 - Imunohistoquímica do Tecido Pulmonar

Após 12 horas que os pulmões ficaram submersos em formol, eles foram retirados e submetidos às técnicas convencionais de histologia com parafina e imunohistoquímica (Behmer et al., 1976) através de cortes dos blocos dos tecidos de *5*µm de espessura. As lâminas de tecido pulmonar receberam aplicação da coloração Luna para quantificação de eosinófilos na região peribrônquica (Luna, 1986), coloração de Hematoxilina & Eosina (H&E) para quantificação da área do músculo liso das vias aéreas (Carrol et et al., 2002), Ácido Periódico de Schiff e Azul Alciano (PAS-AB) para

quantificação da expressão de muco pelo epitélio (Broide et al., 2005), Picrossinious para quantificação da área de fibras colágenas e Resorcina-Fucsina com oxidação para analisar a área de fibras elásticas nas vias aéreas (Dolhnikoff et al., 1999).

3.12 – Preparo dos Pulmões para Imunohistoquímica

As lâminas de tecido pulmonar receberam aplicação de silane (Sigma-Aldrich, Inc.) e foram preparadas através da das técnicas clássicas de imunohistoquímica (Azar & Espinoza, 1986) para marcação dos seguintes anticorpos imunohistoquímicos: linfócitos CD3+ e CD4+, interleucinas-2 (IL-2), IL-4, IL-5, IL-13, IL-10, IL-1ra e *interferon gamma* (IFN-γ) e fator de transcrição nuclear-κB (NF-κB). As lâminas previamente preparadas com (3-Aminopropil-trietoxi-silano) (Silane-Sigma, USA) contendo os cortes histológicos dos pulmões foram inicialmente desparafinizadas e hidratas e submetidas aos seguintes procedimentos:

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

Etapa 2 – Bloqueio e Incubação com Anticorpo Primário: O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com água oxigenada (H_2O_2) 10V 3% (3 x 10 minutos), seguidos de incubação com os anticorpos primários: anti-CD3+ (sc-8308; Santa Cruz), anti-CD4+ (sc-1784; Santa Cruz), anti-IL-2, anti-IFN-γ, anti-IL-4, anti-IL-5, anti-IL-13, anti-IL-10,

anti-IL-1ra, anti-NF-κB, 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 peroxidade endógena com $H_2O_2$10V 3% + metanol (1:1) (2x 10 minutos), posteriormente a incubação com 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, Alemanha).

3.13. – Análise Morfométrica

As análises das células peribrônquicas positivas foram realizadas com o uso de técnica morfométrica através de um retículo de Weibel conectado a uma ocular 100x do microscópio *Olympus Bx40F4* (Olympys Optical CO.LTD, Tókio, Japão). A contagem peribronquial de células inflamatórias

positivas para IL-4, IL-5, IL-13, IL-2, IFN-γ, IL-1ra, IL-10, NF-κB, os linfócitos CD3+ e CD4+ e eosinófilos foram analisadas através da técnica de morfometria usando um reticulo ocular de Weibel com 50 linhas e 100 pontos (aumento de 1.000x com área conhecida de 10.000 μm^2) (Weibel, 1990). Para cada tipo celular, a contagem celular foi determinada com o número de células positivas para cada marcação, dividida pela área do tecido e as mensurações foram expressas como células/μm^2. Os resultados foram então transformados para células/mm^2 por ajuste de unidade (Weibel, 1990).

3.14 - Análise do Remodelamento por Método de Análise de Imagem

O remodelamento das vias aéreas foi avaliado nas lâminas coradas com Hematoxilina & Eosina (H&E) para análise área do músculo das vias aéreas; Picrossírius foi usado para quantificação das fibras bronquiais de colágeno; Resorcina-Fucsina de Weigert com Oxidação foi usada para detecção das fibras de elástica. Para avaliar o remodelamento, foi utilizado o método de análise de imagem (Cho et al., 2004; Broide et al., 2005) com um microscópio Eclipse E-200 (Nikon, Japan), uma câmera digital Cool Snap (Photometrics, Japan) e um *software* de captura e análise de imagem *Image Proplus* 4.5 (CA, USA). Foram avaliados: o espessamento do músculo liso das vias aéreas, a deposição de fibras de colágeno e elástica nas vias aéreas e a produção de muco epitelial. Foi utilizando um aumento de 400x, foram avaliadas 5 vias aéreas de cada animal para cada marcador.

O espessamento da camada do músculo liso das vias aéreas (o diâmetro transverso) foi mensurado da parte mais interna até a parte mais externa. As deposições das fibras de colágeno e elástica nas vias aéreas foram avaliadas na área compreendida entre a membrana basal epitelial até a adventícia da via aérea. As áreas positivas de fibras de colágeno e elástica foram expressas como percentual da área total das paredes das vias aéreas. A produção de muco foi avaliada contando a área epitelial positiva para PAS-AB, os resultados foram expressos como percentual de células positiva para PAS-AB por área total epitelial.

3.15 - Análise Estatística

Os dados foram analisados com uso de um pacote estatístico Sigma Plot Software 9.1 (Systat Software Inc., Chicago, USA). Os gráfico foram criados com o software Prisma 3.0 (GraphPad Software, CA, USA). Os dados paramétricos foram analisados com o teste *One-way Anova* seguido pelo *Student-Newman-Keuls post-hoc test* e os dados não-paramétricos pelo teste *Anova-On Ranks* seguido do *Dunn's post-hoc test*. Os dados paramétricos foram mostrados como média e desvio padrão. Valores não-paramétricos foram expressos em *box plot* e mediana (variância). A significância adotada foi 5% ($P<0,05$). Os dados paramétricos estão apresentados em gráficos com barras. Os dados não-paramétricos estão apresentados em gráficos *box plot* .

4 - RESULTADOS

Os animais de todos os grupos tiveram o peso corporal mensurado nos dias 0 (inicial) e 56 (final) do protocolo. Verifica-se que os animais apresentaram um aumento de peso, mas não houve diferença entre os grupos estudados (p>0,05) (Figura 4).

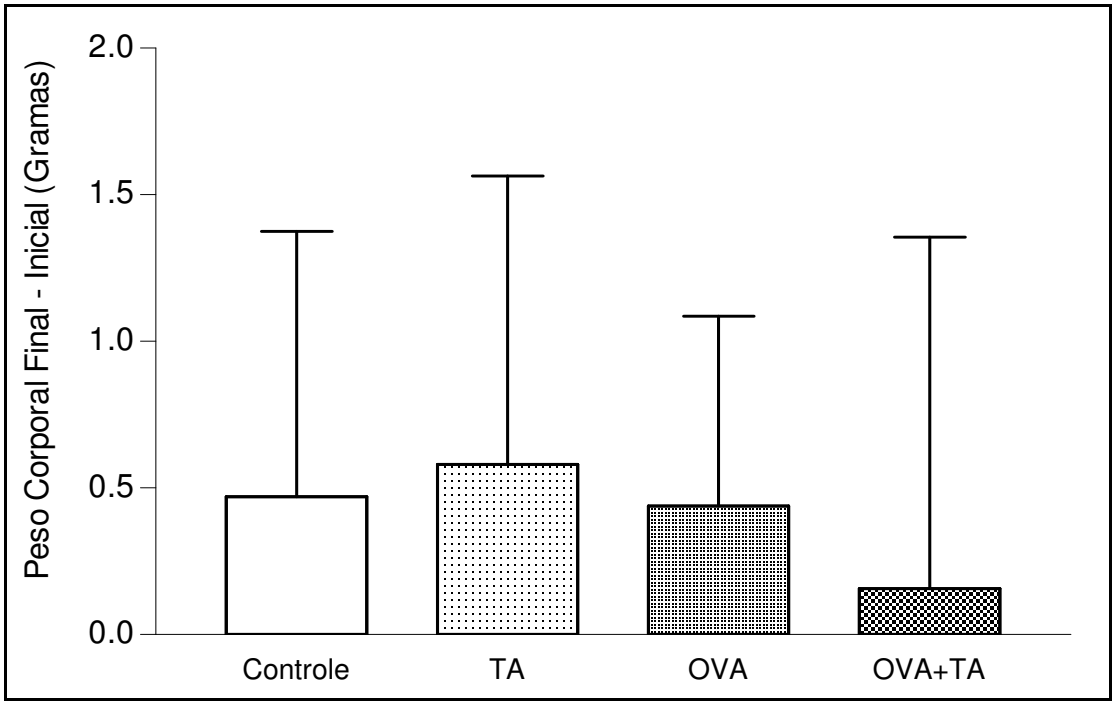


Figura 3 – Ganho de peso corporal nos grupos estudados. O ganho de peso foi analisado pela diferença entre o peso final - peso inicial. Os valores estão expressos com média ± desvio padrão (dp). Descrição dos Grupos: ***Controle***: animais não sensibilizados e não treinados (ver Materiais e Métodos); ***TA***: animais não sensibilizados e treinados aerobicamente; ***OVA***: animais sensibilizados e não treinados; ***OVA+TA***: animais sensibilizados e treinados aerobicamente. Não houve diferença estatística entre os grupos (p>0,05).

Os animais foram submetidos a testes de esforço físico antes (dia 25) e após o treinamento físico (dia 53). Os resultados mostram que os grupos

não submetidos ao treinamento físico (Controle e OVA) não apresentaram melhora na tolerância ao esforço físico após o protocolo experimental (p>0,05). Entretanto, os grupos submetidos ao treinamento físico aeróbio de baixa intensidade (50%) durante 4 semanas (TA e OVA+TA) apresentaram melhora na tolerância ao esforço físico quando comparados com os grupos não treinados (p<0,01) (Figura 4).

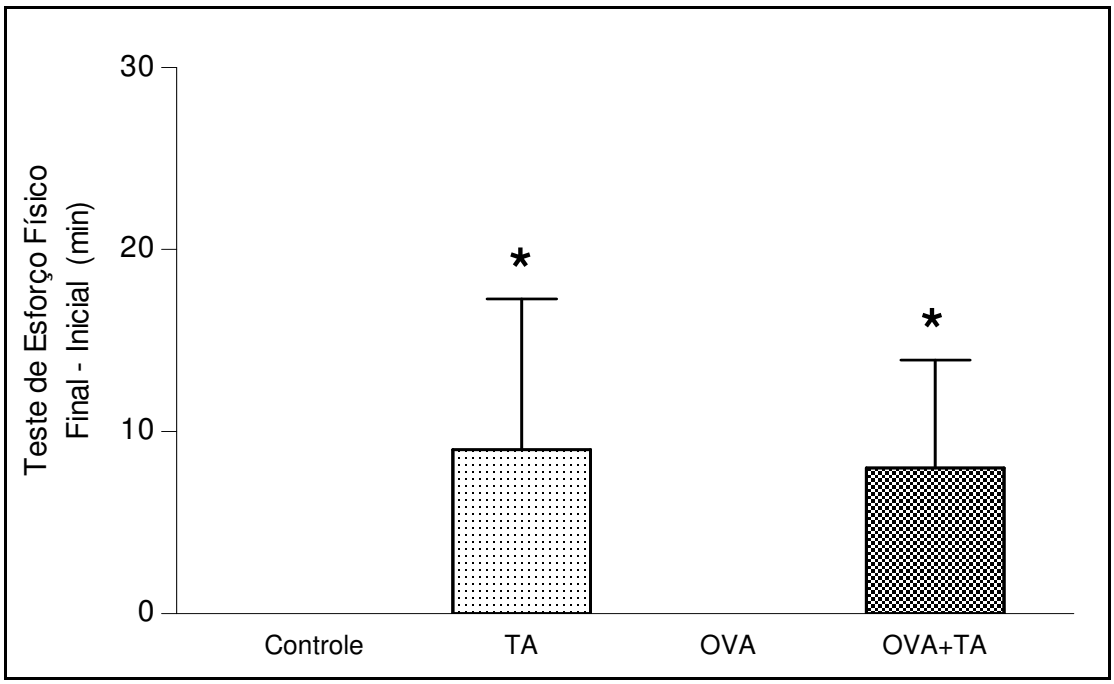


Figura 4 – Melhora na capacidade física. Os valores estão expressos em minutos e representa o tempo de melhora na performance entre o teste físico final – o inicial. Os valores estão expressos como média e dp. Os grupos estão descritos na Figura 3. *p<0,01 quando comparado com os grupos não treinados.

Os níveis plasmáticos de IgE específicos à OVA estão apresentados na Figura 5. Os resultados mostram que a sensibilização aumentou a expressão de IgE (grupos OVA e OVA+TA) se comparados com os grupos

não sensibilizados (Controle e TA) (p<0,001). Porém, o treinamento físico não modificou estes níveis nos animais sensibilizados (Figura 5).

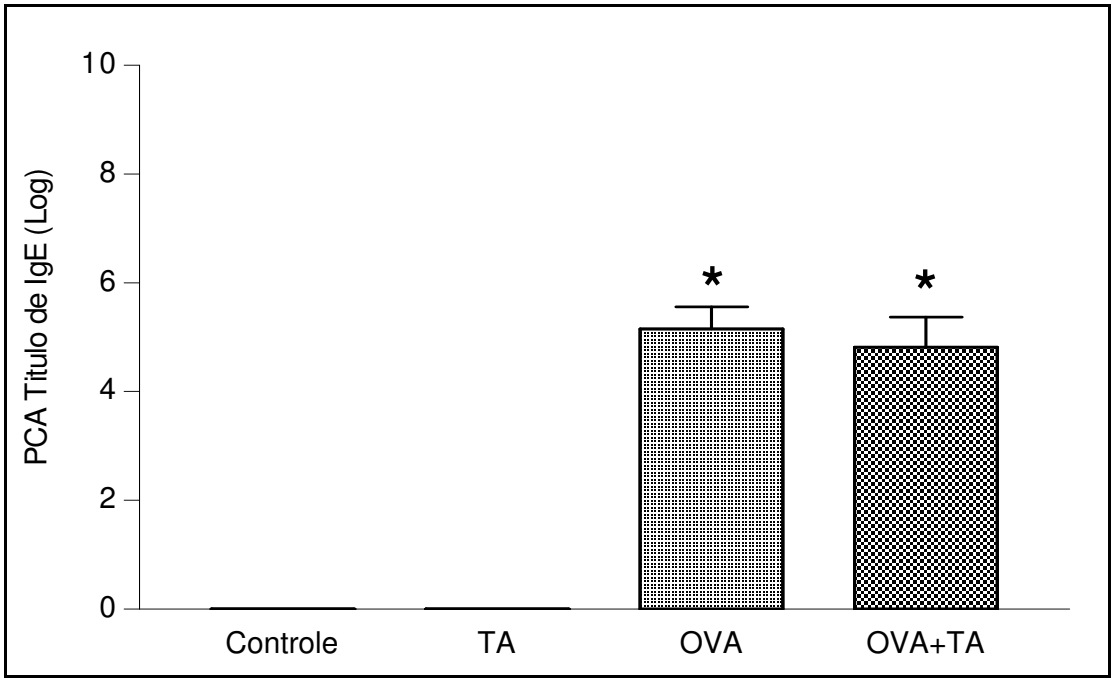


Figura 5 – Níveis plasmáticos de IgE específicos para OVA mensurados por PCA. Os valores estão expressos como média ± dp do log do título de IgE. O protocolo de sensibilização está descrito na seção Material e Métodos. *p<0,001 quando comparados com os grupos Controle e TA.

Os níveis plasmáticos de IgG_1 foram aumentados nos grupos OVA e OVA+TA quando comparados com os grupos Controle e TA (p<0,001) e o treinamento físico não modificou os níveis dessas imunoglobulinas.

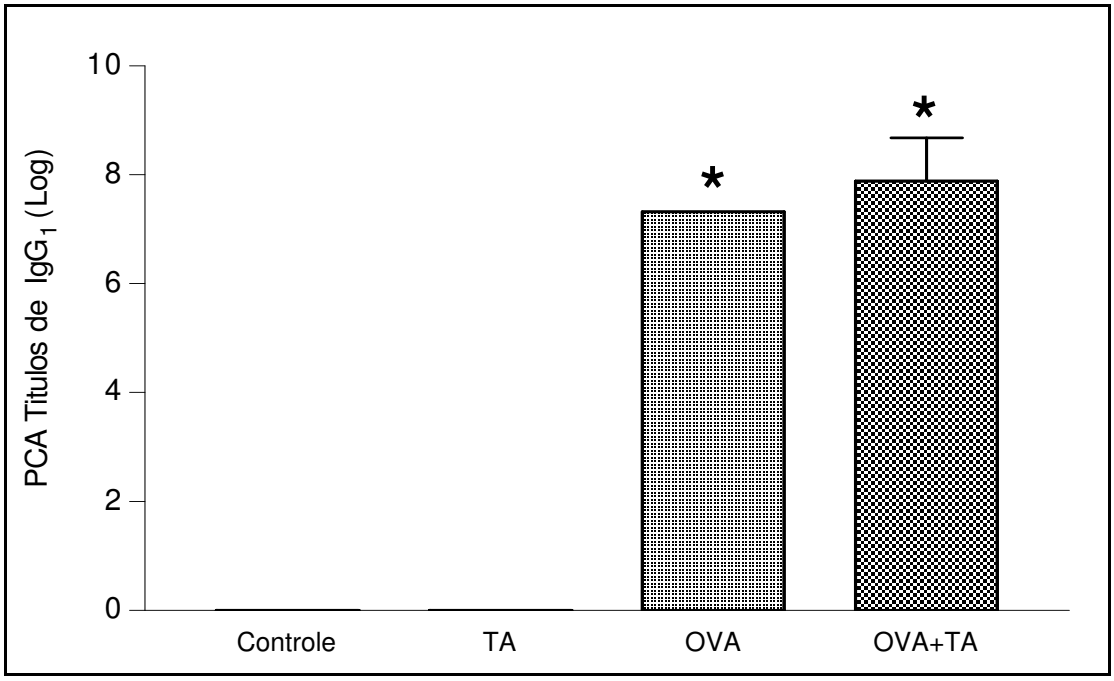


Figura 6 - Níveis plasmáticos de anticorpos IgG_1 específicos para OVA mensurados por PCA. Os valores estão expressos como média ± dp. Os grupos sensibilizados OVA e OVA+TA apresentaram aumento nos níveis plasmáticos de IgG_1 quando comparado com grupos Controle e TA (*p<0,001).

A mecânica respiratória foi avaliada no último dia do protocolo (dia 56) e foram avaliados os parâmetros Gtis e Htis (respectivamente, resistência e elastância pulmonar). Verificou-se que o Grupo OVA apresentou maior resistência e elastância tecidual quando comparado com os demais grupos (p<0,05) (respectivamente, Figuras 7 e 8).

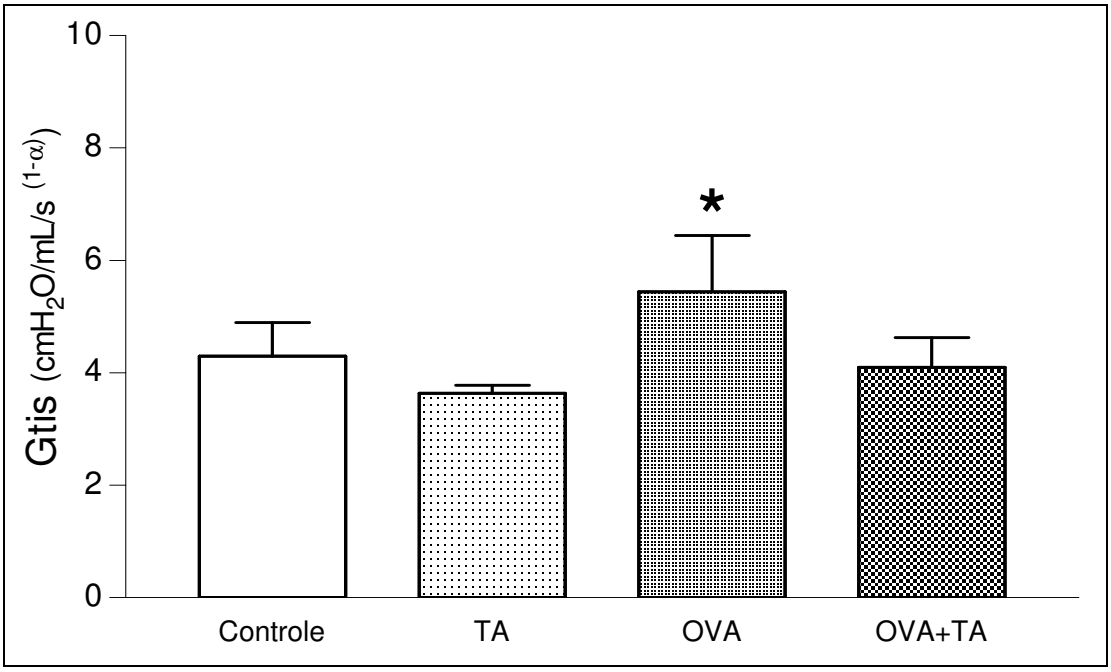


Figura 7 – Avaliação da resistência tecidual (Gtis). Os valores estão expressos como média ± dp. Gtis foi avaliado *in vivo* no 56º dia do protocolo no ventilador mecânico *Flexivent*. *p<0,001 quando comparado com os demais grupos.

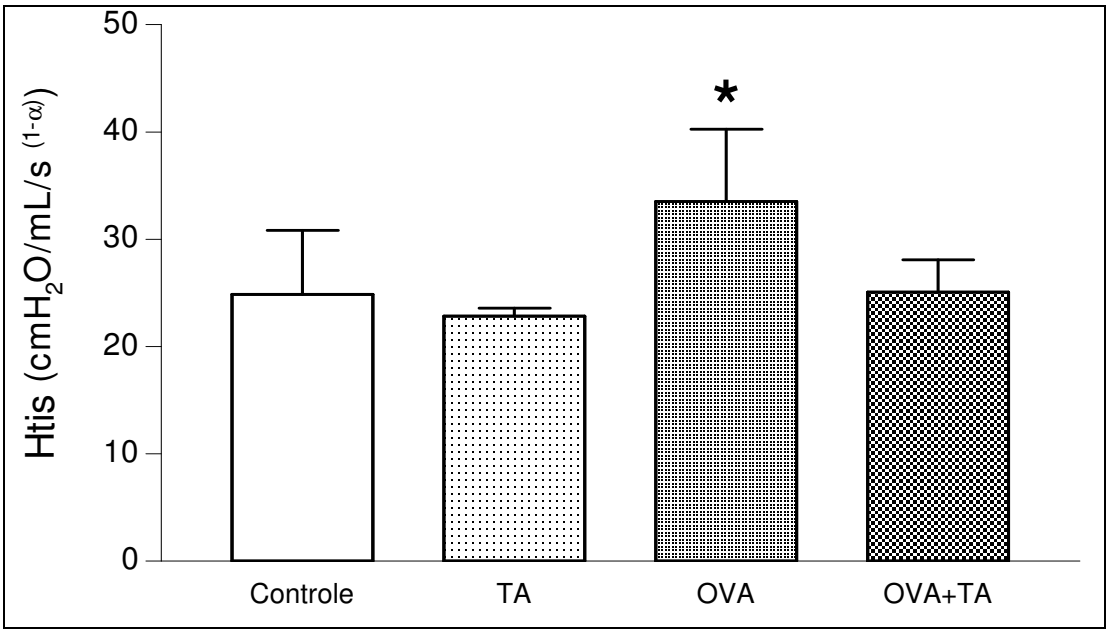


Figura 8 – Avaliação da elastância tecidual (Htis). Os valores estão expressos como média ± dp. Htis foi avaliado *in vivo* no 56º dia do protocolo no ventilador mecânico *Flexivent*. *p<0,001 quando comparado com os demais grupos.

A inflamação pulmonar alérgica crônica foi quantificada pela infiltração de eosinófilos na região peribrônquica (Figura 9). A partir da análise da destas células, verifica-se que o grupo OVA apresenta aumento da infiltração eosinofílica na região peribrônquica quando comparado com os demais grupos (p<0,01) (Figura 9). Além disto, verifica-se que o treinamento físico reduziu o número de eosinófilos na região peribrônquica em animais sensibilizados (p<0,01) (Figura 9).

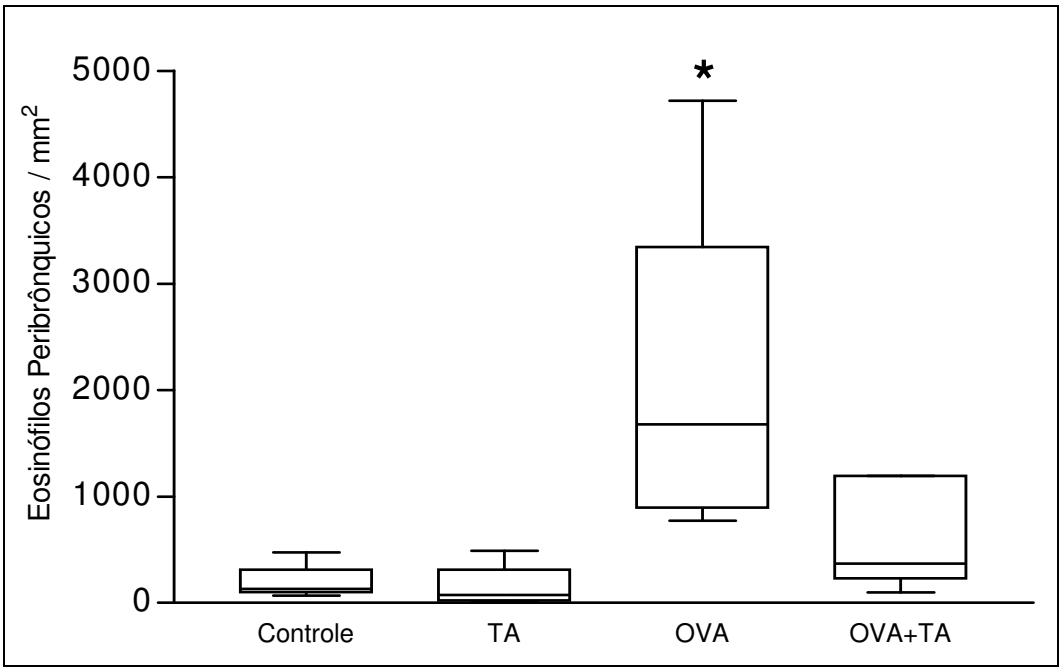


Figura 9 - Infiltração eosinofílica peribrônquica. No *box plot,* os valores expressos em mediana e intervalo de confiança 95% do número de células/mm^2. A linha média do quadrado representa a mediana e as barras superiores e inferiores representam os quartis 25% e 75%, respectivamente. As linhas superiores e inferiores ao quadrado representam os quartis 5% e 95%, respectivamente. *p<0,01 quando comparado com os demais grupos.

Foi avaliado também o número de linfócitos T CD3+ e CD4+ (respectivamente, Figuras 10 e 11). Verificou-se que a sensibilização à OVA

induziu aumento do número de linfócitos CD3+ (3 vezes) e CD 4+ (2 vezes) quando comparado com os grupos não sensibilizados (p<0,001). O aumento dos linfócitos T CD3+ foi totalmente inibido nos animais sensibilizados submetidos ao treinamento físico aeróbio (p<0,001; grupo OVA+TA). Foi observada também uma inibição no aumento de linfócitos induzidos pela sensibilização no grupo OVA+TA (p<0,001). Os níveis de CD4+ também foram reduzidos, porém seus níveis permaneceram superiores aos dos grupos não sensibilizados.

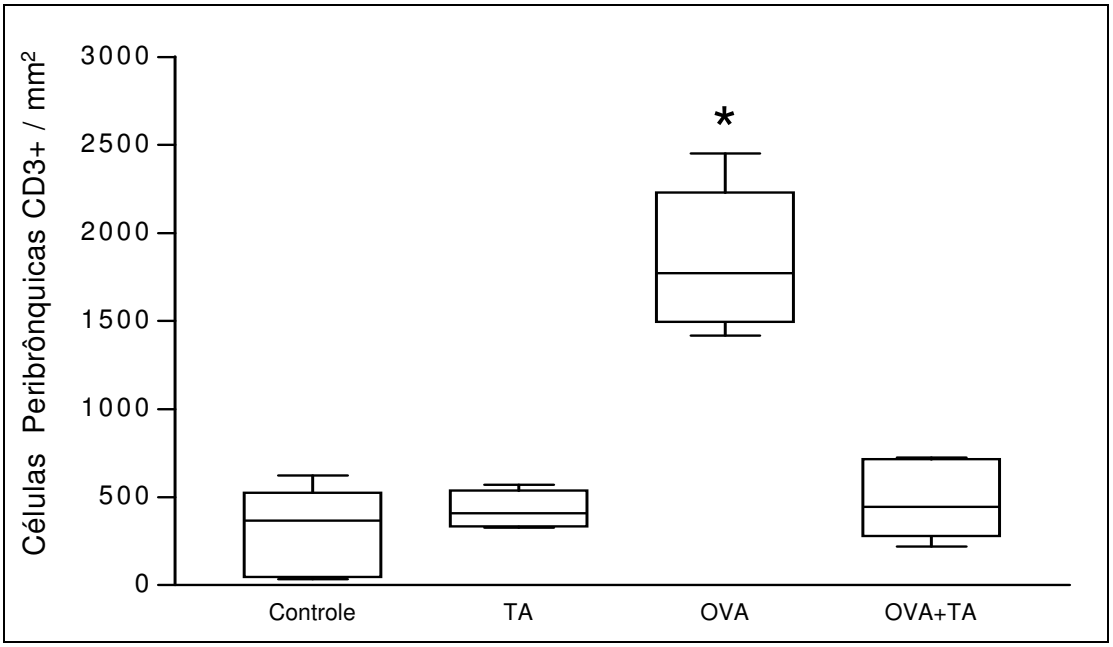


Figura 10 – Infiltração de linfócitos T CD3+ avaliados com técnica de morfometria, quantificação em células/mm^2. Valores expressos em mediana no *box plot*. *p<0,001 representa aumento linfocitário CD3+ no Grupo OVA em relação aos outros os grupos Controle, TA e OVA+TA.

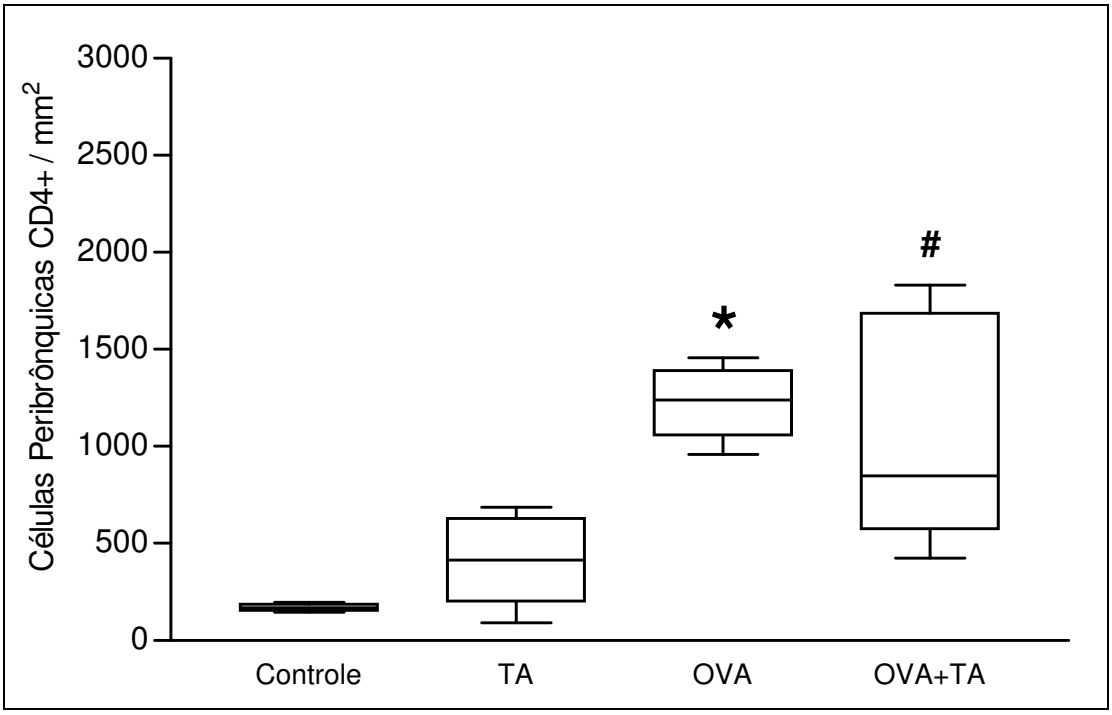


Figura 11 - Infiltração de linfócitos T CD4+ avaliados com técnica de morfometria, quantificação em células/mm^2. Valores expressos em mediana no *box plot*. *p<0,001 quando comparado com os grupos Controle, TA e OVA+TA; #p<0,001 quando comparado com os grupos Controle e TA.

Foi avaliada a resposta Th_2 através da expressão de IL-4, IL-5 e IL-13 pelas células peribrônquicas. A expressão de IL-4, IL-5 e IL-13 foram maiores nos animas sensibilizados e não treinados (grupo OVA) quando comparados com os demais grupos (p<0,05; Figuras 12, 13 e 14). Em contrapartida, os animais sensibilizados e treinados aerobicamente apresentaram menor expressão de IL-4, IL-5 e IL-13 quando comparado com o grupo OVA (p<0,05).

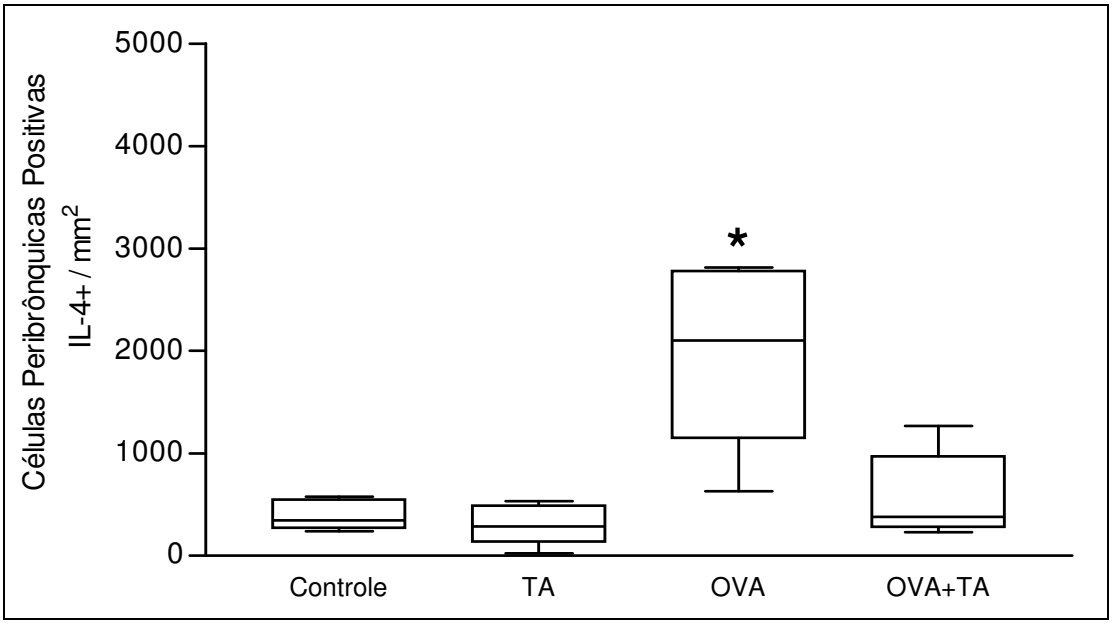


Figura 12 - Células peribrônquicas positivas para IL-4 avaliadas com técnica de morfometria. Os valores estão expressos em mediana (células/mm^2) em *box plot*; *p<0,001 quando comparado com os demais grupos.

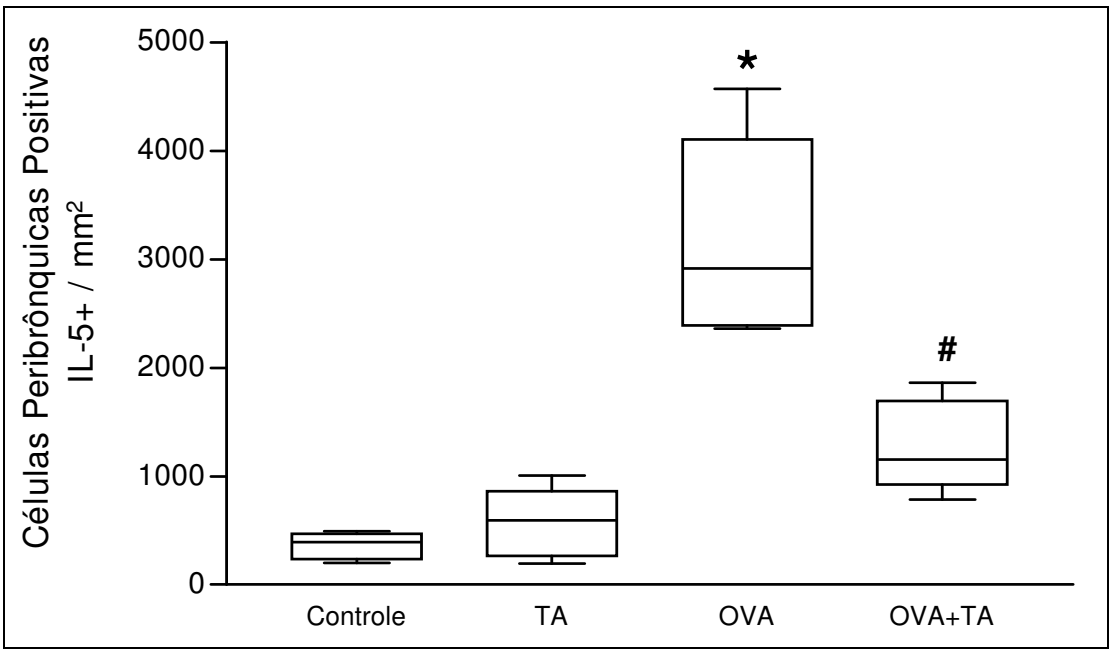


Figura 13 - Células peribrônquicas positivas para IL-5 avaliadas com técnica de morfometria. Os valores estão expressos em mediana (células/mm^2) em *box plot*; *p<0,001 quando comparado com os demais grupos; #p<0,001 quando comparado com os grupos Controle e TA.

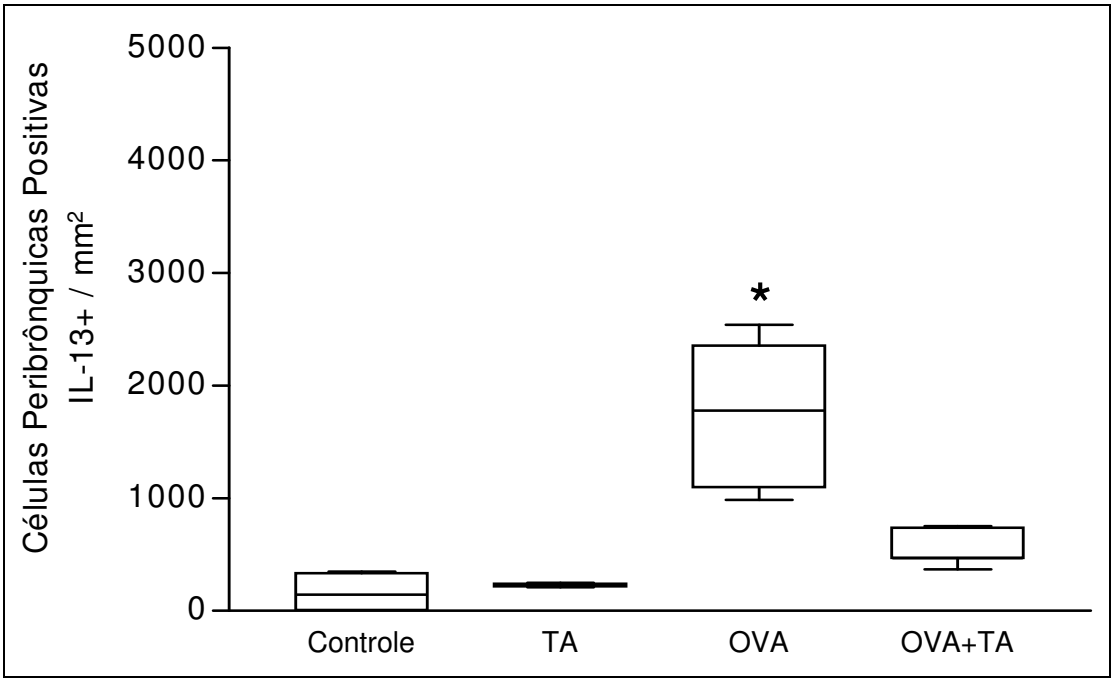


Figura 14 - Células peribrônquicas positivas para IL-13 avaliadas com técnica de morfometria. Os valores estão expressos em mediana (células/mm^2) em *box plot*; *p<0,001 quando comparado com os demais grupos.

Foi também avaliado o efeito do treinamento físico no remodelamento das vias aéreas através da quantificação de fibras de colágeno e elástica, espessamento do músculo liso das vias aéreas e síntese de muco pelo epitélio. Porém, antes desta quantificação, foi verificado se o perímetro da membrana basal das vias aéreas estudadas tinha variação de tamanho entre os grupos utilizando-se o programa *Image Proplus* versão 4.5 (Figura 15). Os resultados mostram que não existe diferença do perímetro das vias aéreas entre os grupos (p>0,05).

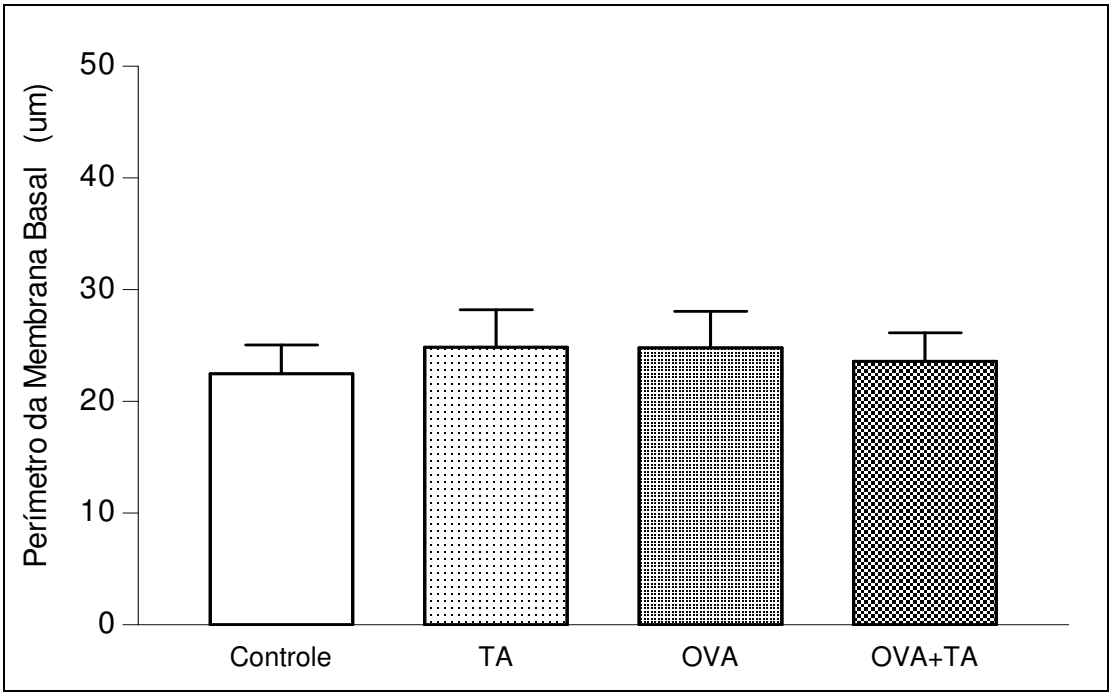


Figura 15 – Perímetro da membrana basal das vias aéreas.

Os resultados mostram que a sensibilização com OVA aumentou a deposição de fibras de colágeno e elástica, espessamento do músculo liso e expressão de muco epitelial quando comparado com os grupos para Controle e TA ($p<0,05$) (respectivamente, Figuras 16 a 19). Entretanto, foi observado que o grupo OVA+TA apresentou uma redução da deposição das fibras de colágeno e elástica, espessamento do músculo liso e expressão de muco epitelial quando comparado com o grupo OVA (respectivamente, Figuras 16 a 19).

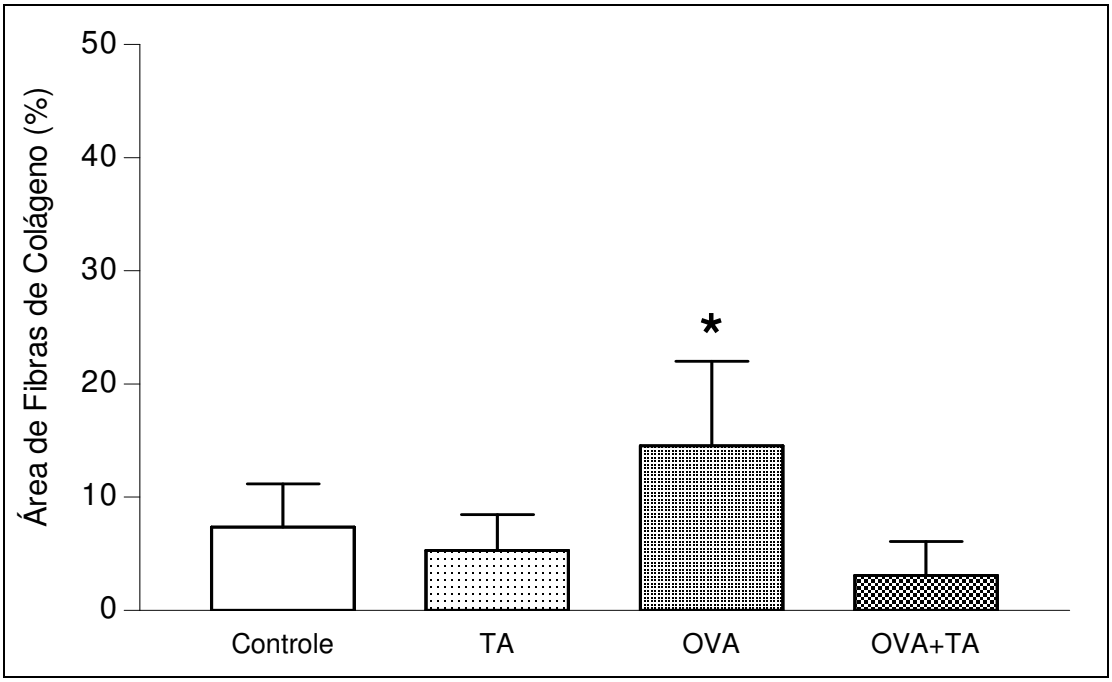


Figura 16 – Quantificação das fibras de colágeno nas vias aéreas. Os valores estão expressos como média ± dp do percentual de fibras colágenas da via aérea; *p<0,05 quando comparado com os demais grupos.

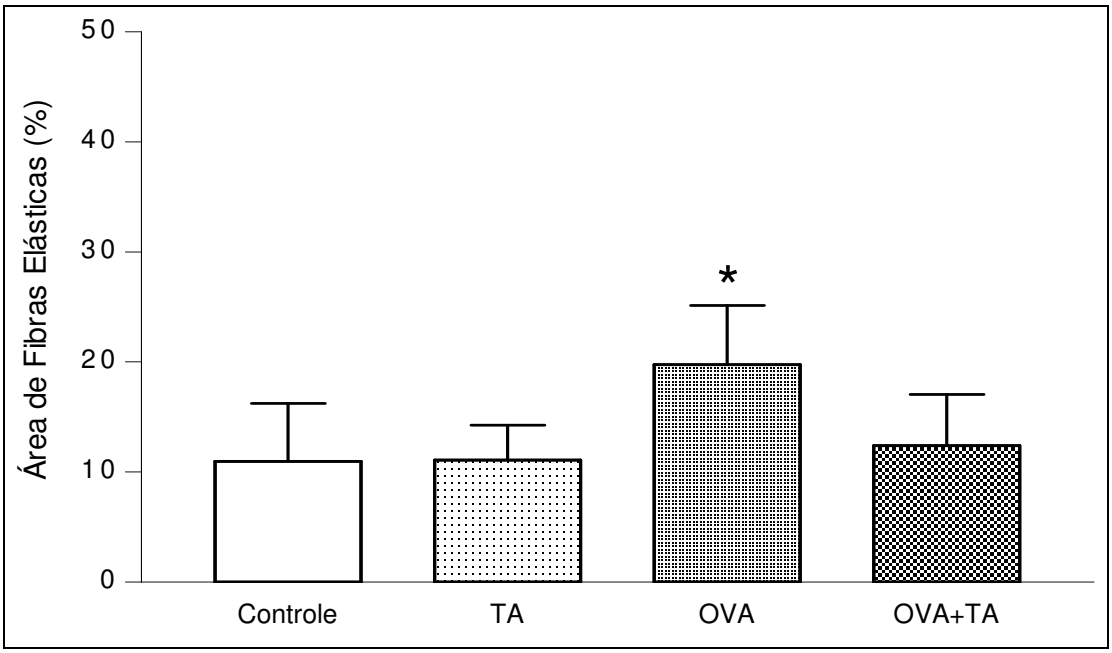


Figura 17 - Quantificação das fibras elásticas nas vias aéreas. Os valores estão expressos como média ± dp do percentual de fibras elásticas da via aérea; *p<0,05 quando comparado com os demais grupos.

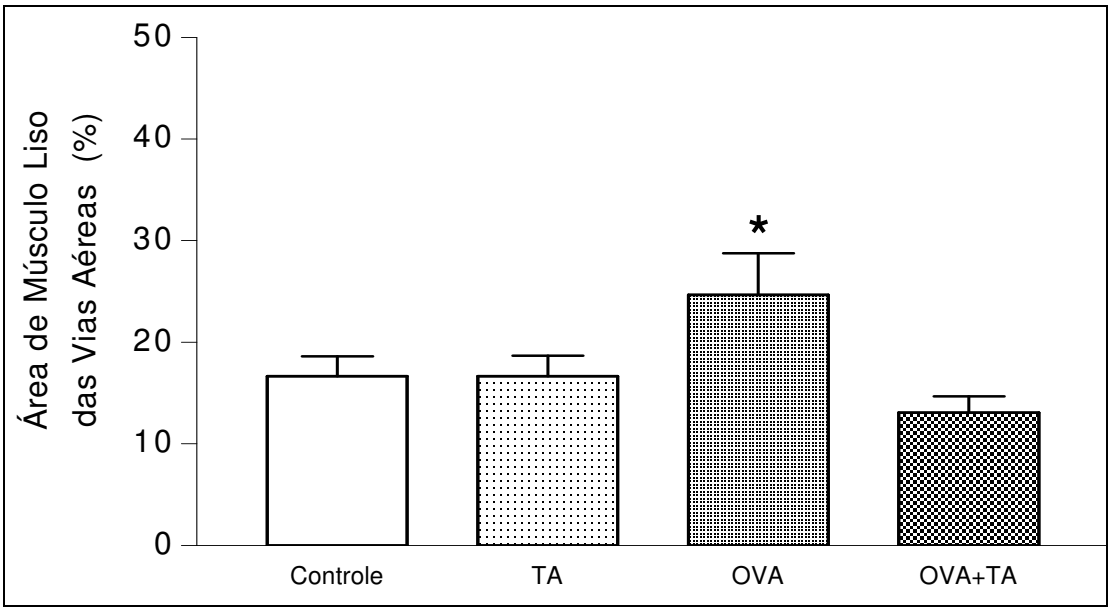


Figura 18 – Quantificação do músculo liso das vias aéreas. Os valores estão expressos como média ± dp do percentual de músculo liso da via aérea; *p<0,05 quando comparado com os demais grupos

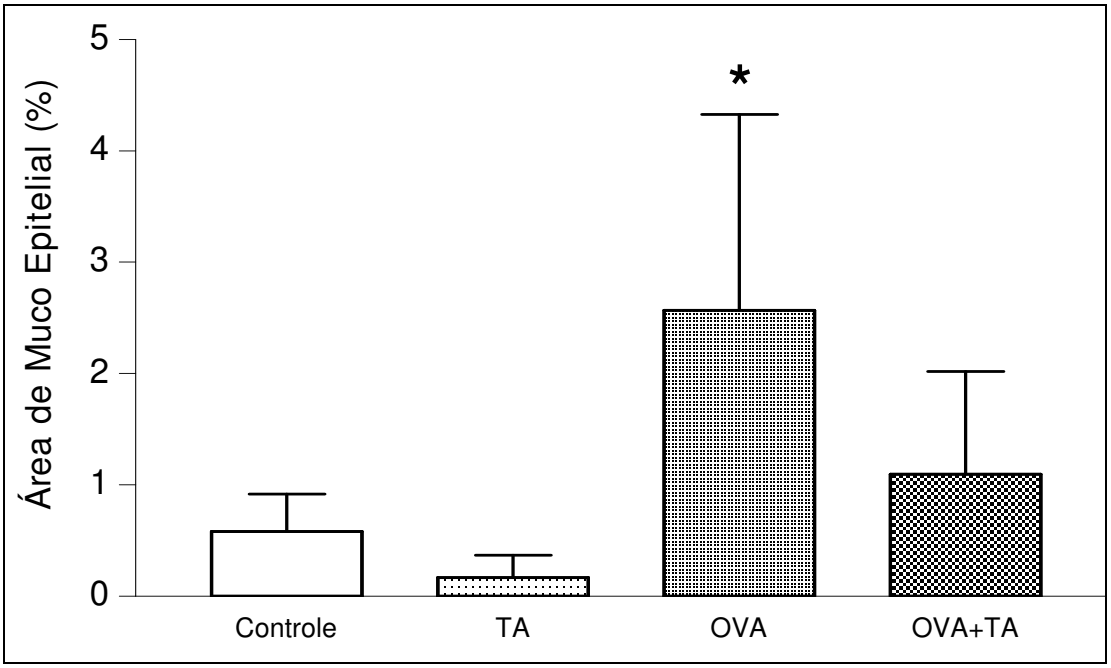


Figura 19 – Expressão de muco epitelial. Os valores estão expressos como média ± dp do percentual de área de muco; *p<0,05 quando comparado com os demais grupos.

A fotomicrografia abaixo ilustra o remodelamento das vias aéreas.

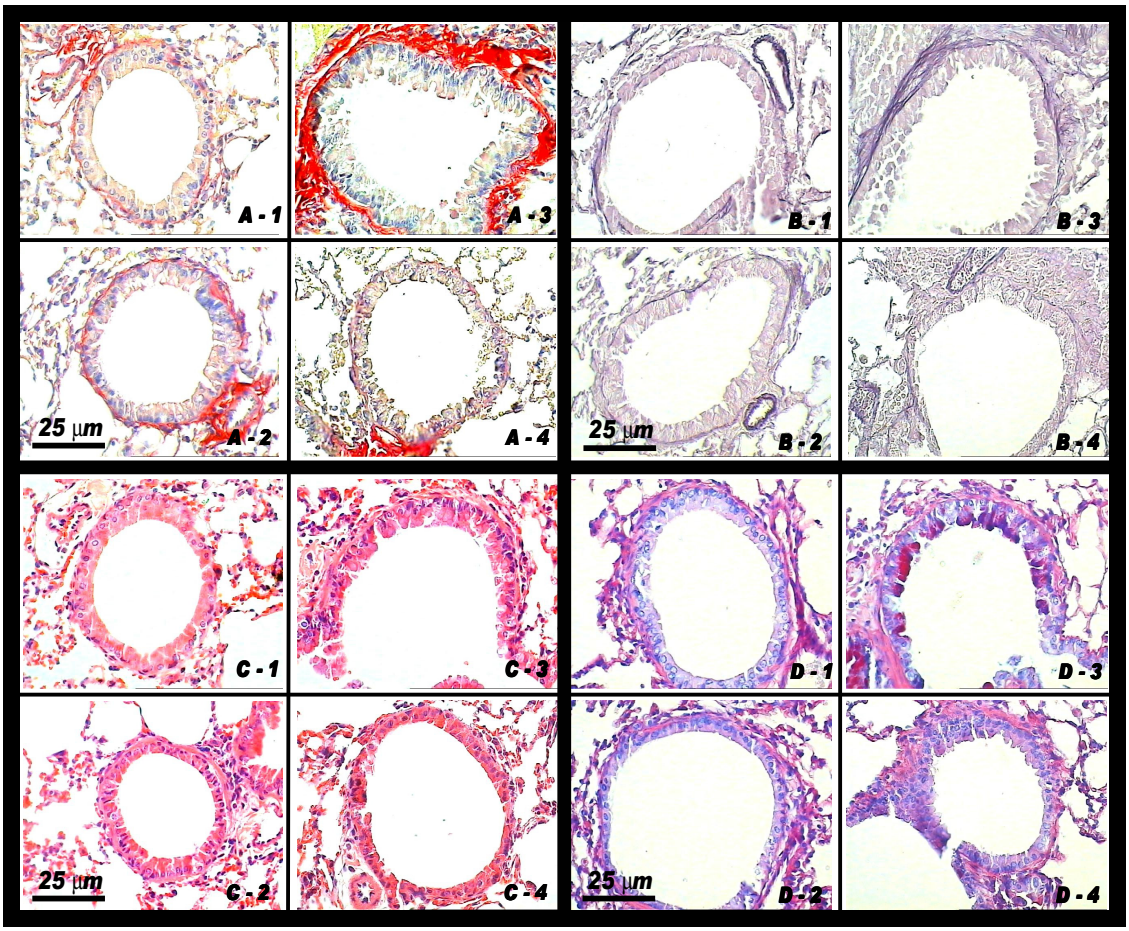


Figura 20 – Fotomicrografia representativa do remodelamento das vias aéreas. Fotos **A1-A4** = fibras colágenas; **B1-B4** = fibras elásticas; **C1-C4** = músculo liso e **D1-D4** = muco epitelial. A barra representa uma escala de 25 µm. Os grupos **1, 2, 3 e 4** representam, respectivamente, os grupos Controle, TA, OVA e OVA+TA.

O desbalanço Th1/Th2 é considerado um indicador do tipo de predominância da resposta da imune alérgica, então essas respostas foram analisadas pela expressão das suas citocinas pelas células inflamatórias na região peribrônquica. Verifica-se que a expressão das citocinas Th1 (IL-2 e IFN-γ) não foi modificada nem pela sensibilização e nem pelo treinamento físico aeróbio ($p>0,05$) (Figuras 21 e 22).

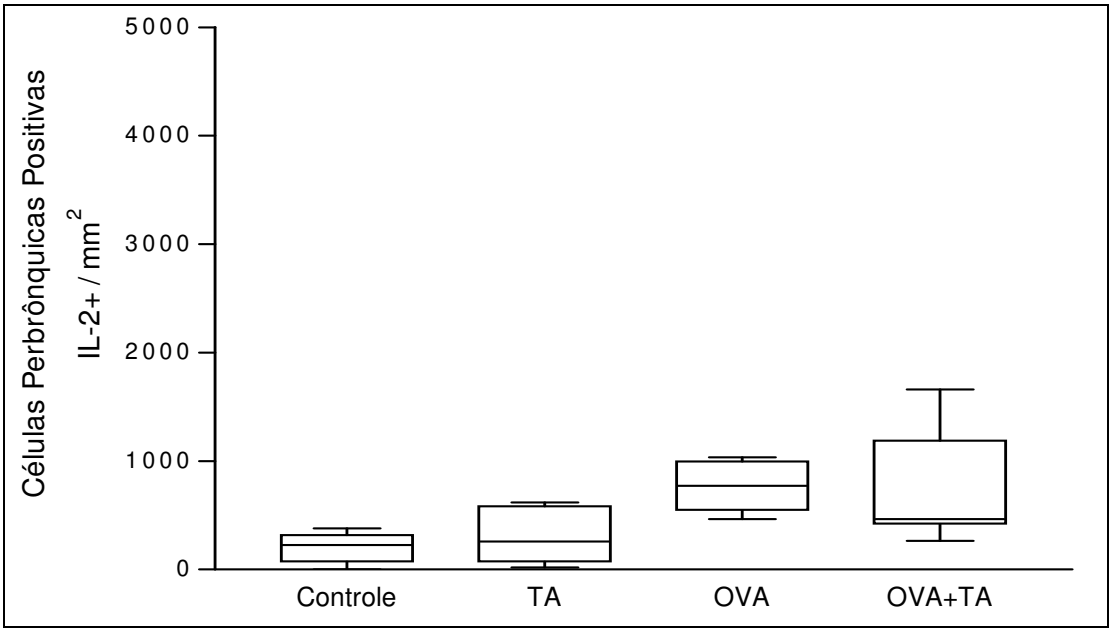


Figura 21 - Células peribrônquicas positivas para IL-2. Os valores estão expressos em mediana (células/mm^2) em *box plot*.

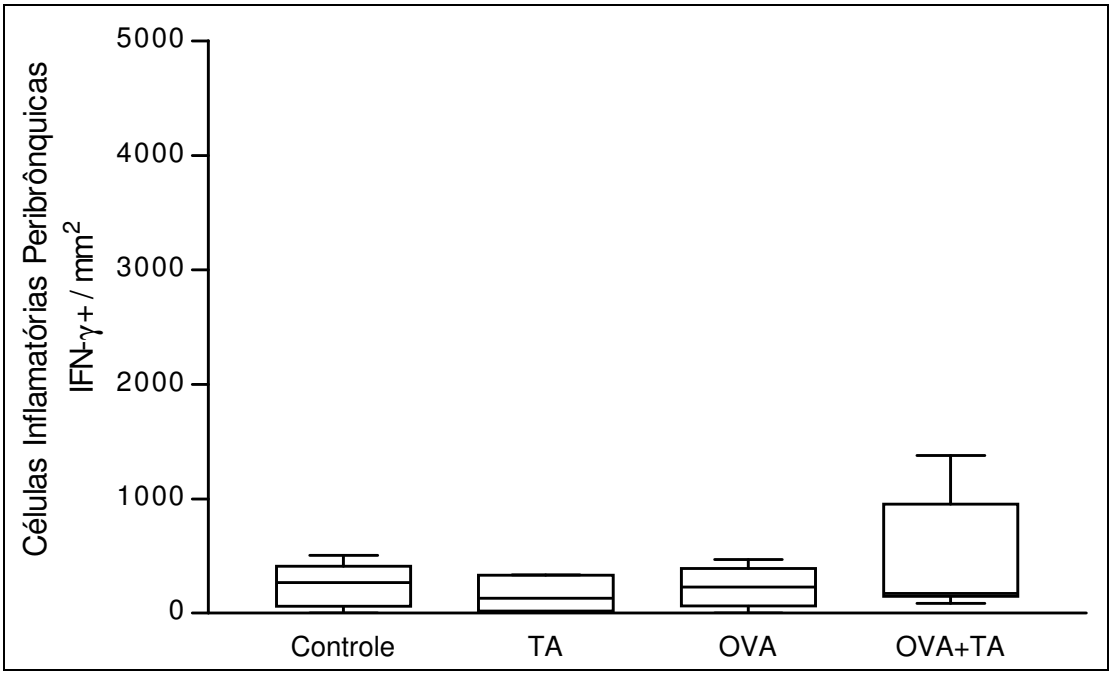


Figura 22 - Células peribrônquicas positivas para IFN-γ. Os valores estão expressos em mediana (células/mm^2) em *box plot*;

Os mecanismos regulatórios da inflamação pulmonar alérgica foi estudado pela quantificação da expressão de citocinas anti-inflamatórias, IL-10 e IL-1ra. Os resultados mostram que a sensibilização não modificou a expressão de IL-10 e IL-1ra quando comparado com os grupos Controle e TA (p>0,05; respectivamente, Figuras 23 e 24). Por outro lado, os animais sensibilizados e treinados aerobicamente apresentaram aumento da expressão destas citocinas quando comparado com os demais grupos (p<0,001).

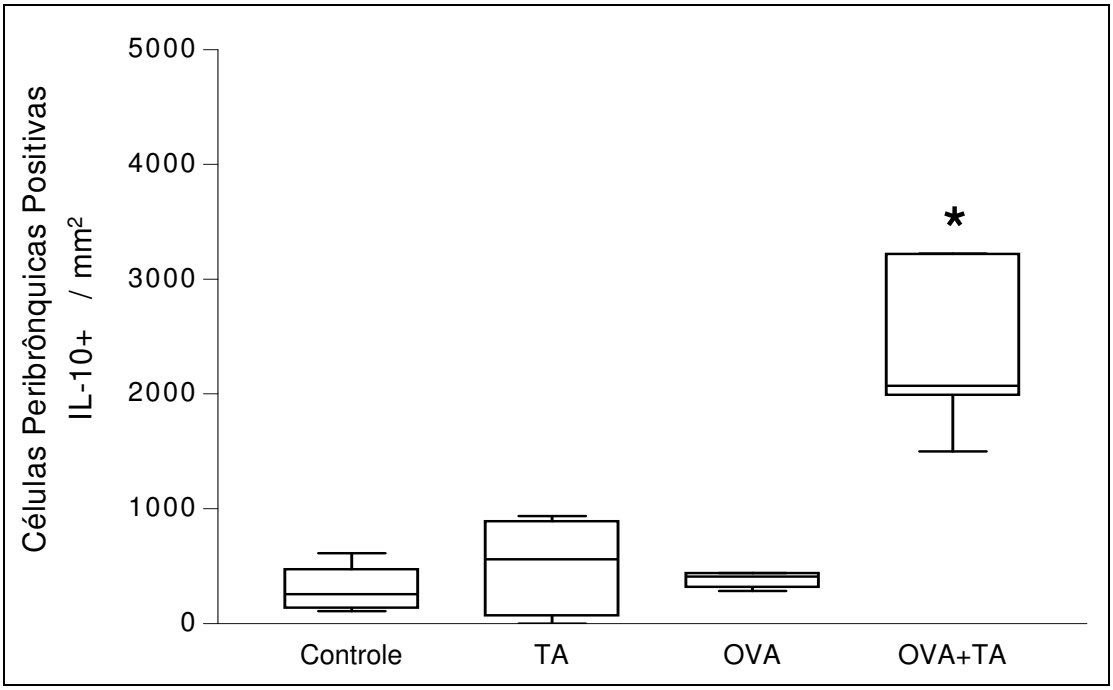


Figura 23 - Células peribrônquicas positivas para IL-10 . Os valores estão expressos em mediana (células/mm^2) em *box plot*; *p<0,01 quando comparado com os demais grupos.

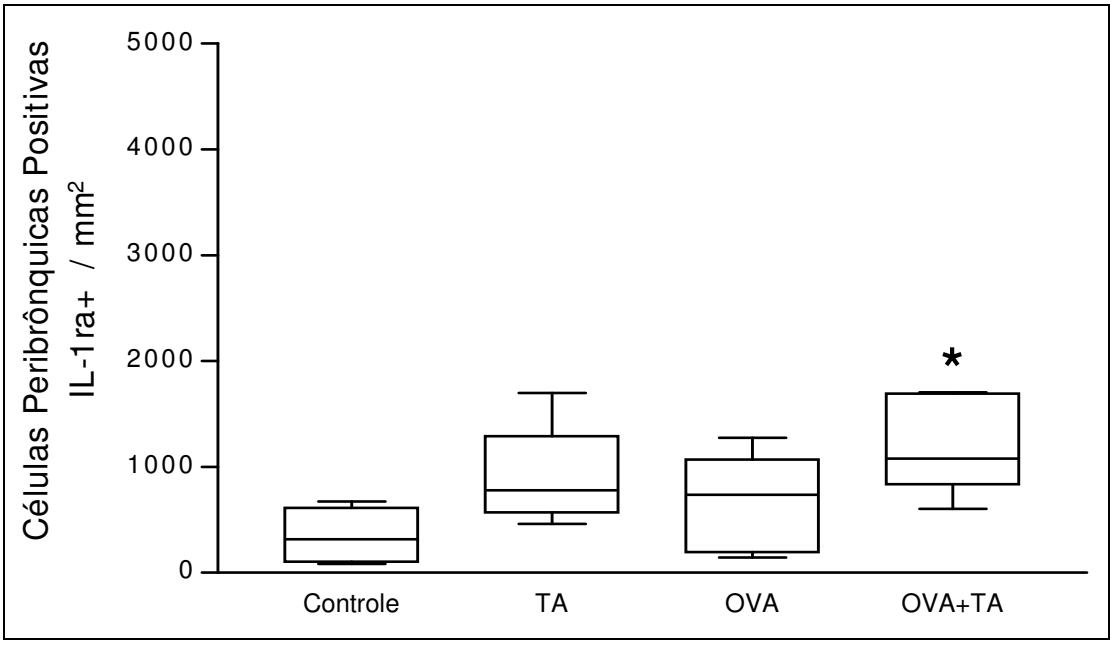


Figura 24 - Células peribrônquicas positivas para IL-1ra . Os valores estão expressos em mediana (células/mm^2) em *box plot*; *p<0,01 quando comparado com os demais grupos.

Foi avaliada também a expressão do NF-κB pelas células inflamatórias peribrônquicas. Verificamos que a sensibilização aumentou a expressão de NF-κB quando comprados com os grupos Controle e TA (p<0,01; Figura 25). Este aumento de NF-κB induzido pela sensibilização foi inibido no grupo OVA+TA quando comparado com o Grupo OVA (p<0,001). Entretanto, a expressão de NF-κB no grupo OVA+TA permaneceu superior se comparado com os grupos Controle e TA (p<0,05).

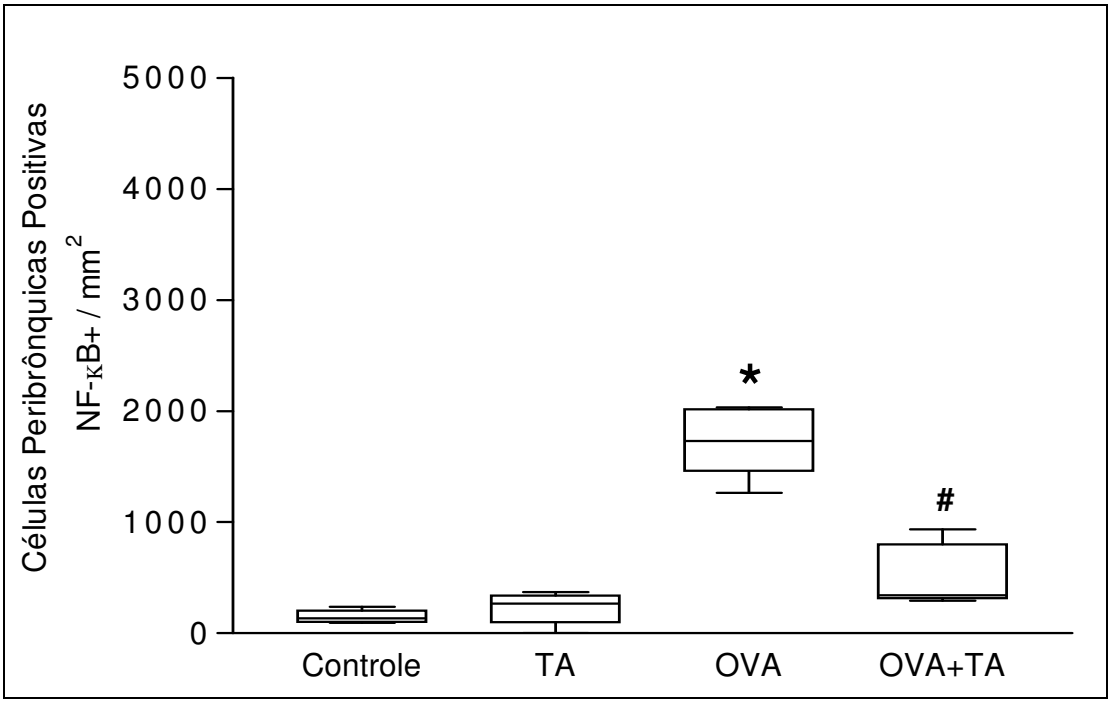


Figura 25 - Células peribrônquicas positivas para NF-κB. Os valores estão expressos em mediana (células/mm^2) em *box plot*; *p<0,01 quando comparado com os demais grupos. #p<0,05 quando comparado com os grupos Controle e TA.

5 - DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que o treinamento físico aeróbio (TF) em camundongos sensibilizados à ovoalbumina (OVA) reduziu a migração de eosinófilos e linfócitos, a produção de citocinas Th2 e o remodelamento das vias aéreas e aumentou a expressão de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e IL-1ra). Porém, o TF não modificou a produção de imunoglobulinas específicas induzidas pela inflamação pulmonar alérgica crônica e não modificou a resposta Th1.

Indivíduos com asma apresentam menor capacidade aeróbia por serem menos ativos que seus pares (Clark & Cochrane, 1998; Fink et al., 1992). Os guias de manejo da asma recomendam que indivíduos com asma devem praticar atividade física de maneira adequada e com regularidade porque auxilia na melhora da capacidade física, no aumento da capacidade de realização das atividades da vida diária e na redução da dispnéia (ATS/ERS, 2006; Ries et al., 2007). Por outro lado, estudos mais recentes sugerem também que o treinamento físico regular pode auxiliar no controle da doença, nos aspectos psicológicos e redução do número de crises, de sintomas da doença e do uso de corticóide inalatório (Fanelli et al., 2007; Gonçalves, 2007; Garcia-Aymerich et al., 2009). Entretanto, os mecanismos para esta melhora ainda são pouco conhecidos e é possível que ele seja decorrente de modificação da resposta imune que tem sido pouco estudada.

O uso de protocolos de inflamação pulmonar alérgica em camundongos são normalmente utilizados para estudar aspectos da fisiopatologia da asma, já que produzem características similares às da doença (Kips et al., 2003), tais como aumento da expressão de

imunoglobulinas, da resposta imune Th2, da migração de leucócitos e remodelamento das vias aéreas (Wills-Karp, 2000; Nakae et al., 2007; Wegmann, 2008).

Estudos experimentais utilizando modelos de inflamação alérgica pulmonar têm demonstrado que o TF reduz a inflamação, os níveis de IgE (Pastva et al., 2004), a migração de eosinófilos no lavado broncoalveolar e na área peribrônquica (Pastva et al., 2004; Vieira et al., 2007), a expressão de IL-4 e IL-5 (Pastva et al., 2004; Vieira et al., 2007), no remodelamento brônquico (Vieira et al., 2007; Vieira et al., 2008) e a expressão do NF-κB (Pastva et al., 2004; Vieira et al., 2008). Apesar do ineditismo destes estudos, eles apresentam críticas como: investigação do TA realizado antes ou durante o estabelecimento da inflamação e remodelamento, podendo não representar o que ocorre com pacientes asmáticos com inflamação e remodelamento já estabelecidos.

Em vista disto, o avanço deste estudo se dá, inicialmente, pelo fato de estudar o efeito do TF em um modelo onde à inflamação pulmonar alérgica crônica já está estabelecida, portanto sendo mais similar ao que ocorre em pacientes asmáticos.

A prevalência da asma tem sido relacionada ao aumento de sobrepeso na população (Shore & Johnston, 2006; McLachlan et al., 2007). Neste sentido, alguns estudos sugerem que obesos estariam sujeitos a problemas respiratórios como a asma por possuírem níveis plasmáticos aumentados de TNF-α, IL-6 (Litonjua et al., 1999) e leptina (Johnston et at., 2007). Esses mediadores inflamatórios seriam expressos pelo tecido adiposo

e responsáveis na ampliação dos processos inflamatórios no trato respiratório, aumento dos níveis plasmáticos de IgE e IgG_1, da HRB e da resposta Th2 (expressão de IL-4, 5 e 13), resultando no aumento da migração e infiltração celular de eosinófilos, neutrófilos, macrófagos e linfócitos nas vias aéreas e no aumento da expressão de eotaxina (Johnston et at., 2007; Rausch et al., 2007; Lord et al., 1998) resultando na inflamação e remodelamento brônquico (Johnston et at., 2007). Esses indivíduos ainda apresentam menor expressão das citocinas anti-inflamatórias como adiponectina, IL-10 e IL-1ra (Shore & Johnston, 2006; Johnston et at., 2007).

No presente estudo, observamos que os animais treinados apresentaram um aumento da capacidade aeróbica sem alteração do peso corpóreo quando comparados com os animais não treinados, sugerindo que o efeito do TF em nosso estudo não está associado a alterações do sobrepeso. Por outro lado, não podemos descartar a hipótese dos animais treinados terem apresentado alteração da quantidade de gordura corpórea e que esta tenha influenciado na inflamação pulmonar. Porém, isto não era alvo primário do nosso trabalho e deve ser considerado em estudos futuros.

Muitos estudos têm investigado os efeitos do TF na modulação da resposta imune. Nesse sentido, verificou-se que o exercício físico (EF) agudo realizado com intensidade baixa e/ou moderada pronuncia aumento dos níveis de catecolaminas e na atividade citotóxica das células *natural killer* (NK) após a realização (Shephard, 2001). Por outro lado, o EF quando realizado em alta intensidade (>2 horas) reduz o número e a atividade das células NK. O *overtraining*, causado pelo excesso de TF, também poderá

provocar um efeito imunossupressor e tornar o indivíduo suscetível a infecções virais e piora da função dos linfócitos B (Shore et al., 1999), diminuição da expressão de imunoglobulinas (Mackinnon et al., 1989; Mackinnon, 1996). Esse declínio na função imune tem sido bem investigado e descrito em atletas durante períodos intensos de TF (Shephard, 2000) e após competições intensas de longa duração com aumento de problemas no trato respiratório de maratonistas (Nieman et al., 1990).

Em vista destes efeitos do TF na resposta imune, alguns estudos têm pesquisado o seu efeito na resposta imune alérgica utilizando modelos animais com inflamação pulmonar que mimetizam a asma (Pastva et al., 2004; Vieira et al., 2007). Pastva & colaboradores (2004) foram os primeiros a avaliar este efeito, e mostraram que o TF é eficaz na redução da inflamação pulmonar alérgica, na produção de IgE e na expressão de IL-4 e IL-5. Vieira & colaboradores (2007) confirmaram que o TF reduz a migração de eosinófilos para o peribrônquico e a redução da expressão de citocinas Th2, ainda verificaram uma redução do remodelamento das vias aéreas e da expressão do NF-κB.

Diferentemente dos estudos citados acima, o nosso protocolo de TF foi realizado após a sensibilização e os nossos resultados mostram similarmente ao previamente mostrado por Pastva e Vieira, que o TF reduziu a inflamação celular alérgica pulmonar (eosinófilos e linfócitos) e a expressão de IL-4 e IL-5. Adicionalmente, mostramos que o TF reduziu o número de linfócitos T CD3+ e CD4+, a expressão de IL-13, a síntese de muco pelo epitélio e a resistência e elastância pulmonar. Por outro lado,

verificamos que o TF não modificou a produção de imunoglobulinas como previamente mostrado por Pastva e colaboradores. Existem algumas diferenças entre os nossos achados e os de Pastva et al., (2004), por exemplo, não verificamos alteração na produção de IgE específicas. É possível que esta diferença entre os nossos achados e os de Pastva esteja relacionada ao momento em que foi iniciado o TF. Esta hipótese é fundamentada por estudos prévios de Silva-Duarte et al., (2009) que verificou que quando o TF é realizado antes da sensibilização há uma redução na produção de IgE e IgG_1.

Deste modo, embora puramente especulativo, podemos sugerir que a redução da inflamação verificada por Pastva et al., (2004) possa estar relacionada à redução da expressão de anticorpos IgE específicos para OVA e, possivelmente, de toda a cascata inflamatória e na resposta das vias aéreas, como previamente sugerido por outros pesquisadores (Oshiba et a., 1996; Hamelmann et al., 1999; Renz et al., 1994). Por outro lado, os efeitos da inflamação verificados em nosso estudo parecem não estar relacionado ao processo inicial de sensibilização alérgica. Estudo recente de Moreira & colaboradores (2008) mostrou que crianças asmáticas submetidas a programa de TF apresentaram uma redução das IgE totais e específicas, apesar de não ter mostrado diminuição do número de eosinófilos nas vias aéreas. Deste modo, o efeito do TF na produção de imunoglobulinas permanece pouco compreendido.

A resposta inflamatória alérgica é modulada e ampliada pela resposta celular Th2 através das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 (Kips, 2001; Holgate,

2004; Nath et al., 2007). Embora o início e desenvolvimento da resposta alérgica ainda não estejam totalmente compreendidos, Mosmann e Hoffman (1989) sugeriram que ele se dá devido ao desbalanço da resposta Th1/Th2. De acordo com esta hipótese, conhecida como hipótese da higiene, a diferenciação em linfócitos Th2 com conseqüente produção de IL-4, IL-5 e IL-13 são atribuídas a redução do perfil Th1 (IL-2 e IFN-γ).

O papel do TF na resposta imune Th1 tem sido estudado, entretanto seu efeito na resposta Th2 é pouco compreendido. Existem evidências mostrando que o TF de intensidade leve ou moderada pode modular a resposta Th1 aumentando a citotoxidade natural *in vivo* e *in vitro* (Macneil & Hoffman-Goetz, 1993). Por outro lado, parece que o efeito do TF sobre a resposta imune depende da intensidade da atividade física. Smith (2003) sugere que o TF de alta intensidade pode suprimir a resposta Th1 e, possivelmente, aumentar a resposta Th2. Estes resultados são substanciados por estudos que sugerem que o TF de alta intensidade pode causar uma imunossupressão (Baral et al., 1984; Araneo et al., 1991; Birkeland et al., 1995; Bagby et al., 1996).

Apesar do efeito do TF na resposta Th2 ser pouco conhecido, existem evidências indicando que ele pode ser benéfico em indivíduos asmáticos. Neste sentido, o estudo realizado por Neder & colaboradores (1999) sugere que crianças asmáticas submetidas ao TF apresentam uma melhora clínica com redução do consumo de broncodilatadores de longa duração. Além disto, Fanelli & colaboradores (2007) sugerem que crianças asmáticas submetidas a um programa de TF fazem um menor uso de corticosteróides.

Porém, os mecanismos pelo qual estes efeitos são obtidos não foram estudados até o presente momento. Pastva et al., (2005) mostraram que a redução da inflamação pulmonar alérgica decorrente do TF ocorre possivelmente devido pela regulação de glucocorticoide endógeno. Por outro lado, Vieira et al., (2007) mostraram que a redução da inflamação pulmonar alérgica não envolve uma modificação da expressão de Th1 (IL-2 e IFN-γ), mas sim devido ao aumento expressão da citocina regulatória IL-10.

A partir dos achados de Vieira et al., (2007), nós investigamos o efeito do TF na expressão de IL-10 e IL-1ra no nosso modelo experimental e nossos resultados mostram que ambas citocinas estavam aumentadas nos animais sensibilizados e treinados, o que poderia explicar a redução da inflamação alérgica. Entretanto, não podemos descartar o efeito dos glicocorticoides já que este hormônio não foi avaliado neste estudo.

O remodelamento das vias áreas é considerado um processo secundário derivado da inflamação da asma alérgica. E tanto a inflamação e o remodelamento provocam estreitamento das vias aéreas prejudicando o fluxo de ar, provocando HRB e piora da função pulmonar no asmático (Jeffery, 2001; Mauad et al., 2007; Broide, 2008). A reversão do remodelamento tem sido vista como importante para o tratamento de asmáticos objetivando a redução da obstrução brônquica. Pastva et al., (2004) demonstraram que o TF em animais sensibilizados reduziu o efeito da inflamação na arquitetura pulmonar bem como a expressão de muco e o número de células de *goblet*. Em complemento, Vieira et al., (2007) mostraram que o TF reduziu o remodelamento das vias aéreas mais

especificamente pela redução da deposição de fibras de colágeno e elástica bem como a redução do espessamento do músculo liso. No presente estudo, nós também verificamos que o TF reduziu o remodelamento das vias aéreas quantificado pela reversão da deposição de fibras de colágeno e elástica, pelas reduções do espessamento do músculo liso e da expressão de muco pelo epitélio.

Acreditamos que tais efeitos tenham repercutido na mecânica respiratória, visto que verificamos uma redução da resistência e elastância pulmonar. Entendemos que estes achados são bastante relevantes uma vez o remodelamento piora a função pulmonar em asmáticos (Beale et al., 1952; Brown et al., 1984) e em camundongos com inflamação pulmonar alérgica (Tomioka et al., 2002).

Apesar dos nossos resultados demonstrarem que o TF reduz a inflamação e reverte o remodelamento da vias aéreas em camundongos com inflamação pulmonar alérgica, nós reconhecemos as limitações desse estudo. Um deles diz respeito ao próprio modelo experimental que tenta mimetizar o que ocorre na asma, porém reconhecidamente, animais não adquirem essa patologia. Através do processo de sensibilização os camundongos passam a apresentar características similares à asma, e quando esse alérgeno é retirado voltam ao estado normal. Outro importante fator é que destacamos neste estudo que os animais já apresentavam inflamação e remodelamento no 28º dia, apesar de não termos avaliado nenhuma dessas características nesse dia específico, isso ocorreu devido o próprio desenho experimental, porém estudos anteriores já confirmaram

inflamação e remodelamento em camundongos no 28º dia (Tanaka et al., 2002; Yamauchi et al., 2008). Contudo, o nosso grupo teve a confirmação da migração de leucócitos e da deposição de colágeno já a partir do 28º dia, o que foi confirmado no mesmo modelo por outros de estudos realizados complementarmente.

Sugerimos também cuidados na transposição do treinamento físico para humanos asmáticos, pois mais estudos são necessários para aumentar o corpo de informações sobre o assunto.

6 - CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo sugerem que o treinamento físico aeróbico inibe a migração de eosinófilos e linfócitos CD3+ e CD4+ e o remodelamento das vias aéreas bem como reduz as alterações da mecânica respiratória em animais com inflamação pulmonar alérgica. Estas alterações parecem ser associadas a redução das citocinas Th2 sem alteração das citocinas Th1. Nossos resultados sugerem ainda que estes efeitos do treinamento físico podem ser decorrentes da regulação pelas citocinas IL-10 e IL-1ra.

Estes resultados sugerem que o treinamento físico aeróbio, normalmente utilizado em programas de reabilitação de pacientes asmáticos, pode ter um papel importante modulando a inflamação pulmonar alérgica. Porém, a transposição dos nossos resultados para pacientes asmáticos é limitada e o efeito do treinamento físico na inflamação pulmonar em pacientes asmáticos precisa ser mais estudado.

7 - REFERÊNCIAS

1. Global Initiate for Asthma (GINA), from workshop report of global strategy for asthma management and prevention issued 1995 and revised 2006. Publication of national institutes of health. Http://www.ginasthma.org. Data do ultimo acesso: 01/03/2009.

2. Barnes PJ. Pathophysiology of asthma. Br J Clin Pharmacol 1996;42:3-10.

3. The International Study of Asthma and Allergy in Childhood (ISAAC) Steering Committee. Worldwide variation in prevalence of asthma symptoms: The International Study of Asthma and Allergy in Childhood (ISAAC). Eur Respir J 1998;12:315-35.

4. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Ações Básicas de Saúde, Estatísticas de Mortalidade, 2000.

5. Ministério da Saúde. Disponível em: http://sna.saude.gov.br/imprimir.cfm ?id=1268. Data do ultimo acesso: 05/05/2009.

6. Muro S, Minshall LM, Hamid QA. The pathology of chronic asthma. Clinics in Chest Medicine vol 21; 2:225-244, 2000.

7. Holgate ST. Cytokine and anti-cytokine therapy for the treatment of asthma and allergic disease. Cytokine 28 (2004) 152-157.

8. Kay AB. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. Trends Mol Med 2005; 11:148–52.

9. James AL, Wenzel S. Clinical relevance of airway remodelling in airway diseases. Eur Respir J 2007; 30: 134–155.

10. Broide DH. Immunologic and inflammatory mechanisms that drive asthma progression to remodeling. J Allergy Clin Immunol 2008;121:560-70.

11. Siddiqui S, Sutcliffe A, Shikotra A, Woodman L, Doe C, McKenna S, Wardlaw A, Bradding P, Pavord I, Brightling C. Vascular remodeling is a feature of asthma and nonasthmatic eosinophilic bronchitis. J Allergy Clin Immunol 2007;120:813-9.

12. Rydell-Törmänen K, Uller L, Erjefält JS. Remodeling of extra-bronchial lung vasculature following allergic airway inflammation. Respiratory Research 2008, 9:18 doi:10.1186/1465-9921-9-18.

13. Xisto DG, Farias LL, Ferreira HC, Picanço MR, Amitrano D, Silva LJR, 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.

14. Hamelmann E, Takeda K, Oshida A, Gelfand EW. Role of IgE in the development of allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness a murine model. Allergy; 1999:54, 297-305.

15. Holgate ST. Pathogenesis of asthma. Clinical and Experimental Allergy 2008;38:872- 897.

16. Ferreira MA. Inflammation in allergic asthma: initiating events, immunological response and risk factors. Respirology 2004;9(1):16-24.

17. Busse WW, Lemanske RF Jr. Asthma. N Engl J Med, 2001: 344: 350-362.

18. Mosmann VR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RI. Two types of murine helper t cell clone: I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. The Journal of Immunology 1986;7(136):2348-2356.

19. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology 1989: 7; 145-173.

20. Romagnani S: Induction of TH1 and TH2 responses: a key role for the 'natural' immune response? Immunol Today 1992, 13:379-381.

21. Robinson DS. Th-2 cytokines in allergic disease. British Medical Bulletin 2000;56:(4):956-968.

22. Gajewski TF (a), Fitchi FW. Anti-proliferative effect of IFN-γ in immune regulation: I IFN-γ inhibit the proliferation of Th2 but not Thl murine helper T lymphocyte cloned. The Journal of Immunology 1988;12(140):4245-4252.

23. Ying S, Humbert M, Barkans J, et al. Expression of IL-4 and IL-5 mRNA and protein product by CD4+ and CD8+ T cells, eosinophils, and mast cells in bronchial biopsies obtained from atopic and nonatopic (intrinsic) asthmatics. J Immunol 1997;158:3539–44.

24. Li L, Xia Y, Nguyen A, Lai YH, Feng L, Mosmann TR, Lo D. Effects of Th2 Cytokines on Chemokine Expression in the Lung: IL-13 Potently induces eotaxin expression by airway epithelial cells. The Journal of Immunology 1999;162: 2477–2487.

25. Cohn L, Elias JA, Chupp GL. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. Annu Rev Immunol, 2004: 22: 789-815.

26. Brightling CE, Symon FA, Birring SS, Bradding P, Pavord ID, Wardlaw AJ. T lymphocytes and bronchial submucosa is a feature of asthma and eosinophilic bronchitis. J Allergy Clin Immunol 2002;110:899-905.

27. Ma Y, Hayglass KT, Becker AB, Halayko, Basu S, Simons FER, Peng Z. Novel cytokine peptide-based vaccines: an interleukin-4 vaccine suppresses airway allergic responses in mice. Allergy 2007: 62: 675-682.

28. Menzies-Gow AN, Flood-Page PT, Robinson DS, Kay AB. Effect of inhaled interleukin-5 on eosinophil progenitors in the bronchi and bone marrow of asthmatic and non-asthmatic volunteers. Clinical and Experimental Allergy, 37, 1023–1032, 2007.

29. Nath P, Leung SY, Williams AS, Noblew A, Xiew S, McKenziez ANJ, et al. Complete inhibition of allergic airway inflammation and remodelling in quadruple IL-4/5/9/13$^{-/-}$ mice. Clinical and Experimental Allergy 2007; 37:1427-1435.

30. Foster PS, Hogan SP, Yang M, Mattes J, Young IG, Matthaei KI, et al. Interleukin-5 and eosinophils as therapeutic targets for asthma. Trends Mol Med 2002;8:162-7.

31. Komai M, Tanaka H, Masuda T, Nagao K, Ishizaki M, Sawada M, Nagai H. Role of Th2 responses in the development of allergen-induced airway remodelling in a murine model of allergic asthma. British Journal of Pharmacology (2003) 138, 912 - 920.

32. Romagnani S. Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance. J Allergy Clin Immunol 2004;113:395-400.

33. Fallon PG, Jolin HE, Smith P, Emson CL, Townsend MJ, Fallon R, Smith P, McKenzie ANJ. IL-4 Induces characteristic th2 responses even in the combined absence of IL-5, IL-9, and IL-13. Immunity 2002;7(17):7–17.

34. Del Prete GF, Maggi E, Parronchi P et al. IL-4 is an essential factor for the IgE synthesis induced in vitro by human T cell clones and their supernatants. / Immunol 1988; 140: 4193-8.

35. Vercelli, D., H. H. Jabara, R. P. Lauener, and R. S. Geha. 1990. IL-4 inhibits the synthesis of IFN-g and induces the synthesis of IgE in human mixed lymphocyte cultures. J. Immunol. 144:570.

36. Tang C, Inman MD, van Rooijen N, Yang P, Shen H, Matsumoto K, et al. Th Type 1-Stimulating activity of lung macrophages inhibits th2-mediated allergic airway inflammation by an IFN-γ-dependent mechanism. The Journal of Immunology, 2001;166:1471–1481.

37. Foster PS, Hogan SP, Ramsay AJ, Matthaei KI, Young IG. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airway hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. J. Exp. Med. 1996;183:195–201.

38. Hogan SP, koskinen A, Foster PS. Interleukin-5 and eosinophils induce airway damage and bronchial hyperreactivity during allergic airway inflammation in BALB/c mice. Immumology and Cell Biology (1997) 75, 284-288

39. Leckie MJ, ten Brinke A, Khan J et al. Effects of an ineterleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyperreactivity and the late asthmatic reaction. Lancet 2000; 356:2144–8.

40. Cho JY, Miller M, Baek KJ, Han JW, Nayar J, Lee SY, et al. Inhibition of airway remodeling in IL-5-deficient mice. J Clin Invest. 2004;113:551-60.

41. Webb DC, Cai Y, Matthaei KI, Foster PS. Comparative roles of IL-4, IL-13, and IL-4Rα in dendritic cell maturation and CD4+ Th2 Cell Function. The Journal of Immunology, 2007, 178: 219-227.

42. Castro M, Chaplin DD, Walter MJ, Holtzman MJ. Could asthma be worsened by stimulating the T-helper type 1 immune response? Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2000:22: 143–146.

43. Davies DE, Wicks J, Powell RM, Puddicombe SM, Holgate ST. Airway remodeling in asthma: new insights. J Allergy Clin Immunol 2003;111:215-25.

43. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WB, Johnson M, Vignola AM. Asthma: from bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. Am J Respir Crit Care Med, 2000;161:1720–1745.

44. Hogaboam CM, Blease K, Mehrad B, Steinhauser ML, Standiford TJ, Kunkel SL, Lukacs NW. Chronic airway hyperreactivity, goblet cell hyperplasia, and peribronchial fibrosis during allergic airway disease induced by Aspergillus fumigatus. Am J Pathol. 2000;156:723–732.

45. Jeffery PK. Inflammation and remodeling in the adult and child with asthma. Pediatr Pulmonol 2001;21:3-16.

46. Lloyd CM and Robinson DS. Allergen-induced airway remodelling. Eur Respir J. 2007; 29: 1020-1032.

47. Zhu Z, Homer RJ, Wang Z et al. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. J Clin Invest 1999; 103:779-88.

48. Kuperman DA, Huang X, Koth LL et al. Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. Nat Med 2002; 8:885-9.

49. Ordonez CL, Khashayar R, Wong HH, et al. Mild and moderate asthma is associated with airway goblet cell hyperplasia and abnormalities in mucin gene expression. Am J Respir Crit Care Med 2001; 163: 517-523.

50. Gueders MM, Foidart JM, Noel A, Cataldo DD. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in the respiratory tract: potential implications in asthma and other lung diseases. Eur J Pharmacol 533:133-144, 2006.

51. Reinhardt AK, Bottoms SE, Laurent GJ, McAnulty RJ. Quantification of collagen and proteoglycan deposition in a murine model of airway remodeling. Respiratory Research 2005;6(30):1-13.

52. Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. Lancet. 1989;1:520-524.

53. Araújo BB, Dolhnikoff M, Silva LF, Elliot J, Lindeman JH, Ferreira DS, et al. Extracellular matrix components and regulators within the airway smooth muscle in asthma. Eur Respir J 2008;32:61-9.

54. Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. J Cell Sci 115: 3719–3727, 2002.

55. Bumbacea D, Campbell D, Nguyen L et al. Parameters associated with persistent airflow obstruction in chronic severe asthma. Eur. Respir. J. 2004;24:122-128.

56. Bucchieri F, Puddicombe SM, Lordan JL et al. Asthmatic bronchial epithelium is more susceptible to oxidantinduced apoptosis. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol, 2002;27:179-185.

57. Panettieri RA Jr. Airway smooth muscle: an immunomodulatory cell. J. Allergy Clin. Immunol. 2002;110:S269-S274.

58. Ebina M, Takahashi T, Chiba T, Motomiya M. Cellular hypertrophy and hyperplasia of airway smooth muscles underlying bronchial asthma. A 3-D morphometric study. Am Rev Respir Dis 1993; 148: 720-726.

59. Heard BE, Hossain S. Hyperplasia of bronchial smooth muscle in asthma. J. Pathol. 1973;110:319-332.

60. Roth M, Johnson PR, Borger P et al. Dysfunctional interaction of C_EBPalpha and the glucocorticoid receptor in asthmatic bronchial smooth-muscle cells. N. Engl. J. Med. 2004;351:560-574.

61. Bentley JK, Deng H, Linn MJ, Lei J, Dokshin GA, Fingar DC, Bitar KN, Henderson Jr WR, Hershenson MB. Airway smooth muscle hyperplasia and hypertrophy correlate with glycogen synthase kinase-3β phosphorylation in a mouse model of asthma. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2008 Nov 14. [Epub ahead of print]

62. Nakae S, Lunderius C, Ho LH, Schäfer B, Tsai M, Galli S. Mechanisms of asthma and allergic inflammation: TNF can contribute to multiple features of ovalbumin-induced allergic inflammation of the airways in mice. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 119(3): 680-686, 2007.

63. Shore SA, Johnston RA. Obesity and asthma. Pharmacology & Therapeutics 110 (2006) 83-102.

64. Chung KF. Airway smooth muscle cells: contributing to and regulating airway mucosal inflammation? Eur Respir J 2000; 15: 961-968.

65. Sumi Y. and Hamid Q. Airway remodeling in asthma. Allergology International. 2007;56:341-348.

66. Cambach W, Chadwick-straver RV, Wagenaar RC, Van Keimpema AR, Kemper HC. The effects of a community-based pulmonary rehabilitation programme on exercise tolerance and quality of life: a randomized controlled trial. Eur Respir J, 10(1):104-13, 1997

67. British Thoracic Society (BTS). BTS Statement, Pulmonary rehabilitation. Thorax; 56: 827-834, 2001.

68. Lemaigre V, Bergh OVD, Van Hasselt K, De Peuter S, Victoir A, Verleden G. Understanding participation in an asthma self-management program. CHEST; 128:3133–3139, 2005.

69. ATS/ERS Statement on Pulmonary Rehabilitation. Am J Respir Crit Care Med, 173, 1390–1413, 2006.

70. Ries L, Bauldof GS, Carlin B, Casaburi R, Emery C, Mahler DA, Make B, Rochester CL, ZuWallack R,Herrerias C. Pulmonary Rehabilitation. Joint ACCP/AACVPR Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. Chest,131:5, 4S-42S, 2007.

71. Emtner M, Herala M, Stalenheim G.High-intensity physical training in adults with asthma. A 10-week rehabilitation program.*Chest* 1996; 109(2):323-30.

72. Basaran S, Guler-Uysal F, Ergen N, Seydaoglu G, Bingol-Karakoc G¸ Altintas DU. Effects of physical exercise on quality of life, exercise capacity and pulmonary function in children with asthma. J Rehabil Med 2006; 38: 130-135.

73. Fanelli A, Cabral ALB, Neder JA, Martins MA, Carvalho CRF. Exercise training and disease control and quality of life in asthmatic children. Med. Sci. Sports Exer., Vol. 39, No. 9, pp. 1474-1480, 2007.

74. Weisgerber M, Webber K, Meurer J, Danduran M, Berger S, Flores G. Moderate and Vigorous Exercise Programs in Children With Asthma: Safety, parental satisfaction, and asthma outcomes. Pediatr Pulmonol.2008. DOI 10.1002/ppul.20895,2-8.

75. Welsh L, Kemp JG, Roberts RGD. Effects of physical conditioning on children and adolescents with asthma. Sports Med 2005; 35 (2): 127-141.

76. Disabella V, Sherman C. Exercise for asthma patients. Phys Sports Med 1998; 26: 75-85.

77. Clark CJ, Cochrane LM. Physical activity and asthma. Current Opinion in Pulmonary Medicine 1999;5:68-75.

78. Ram FSF, Robinson SM, Black PN, Picot J. Physical training for asthma (Cochrane Review). In: The Cochrane Library, Issue 1, 2009. Oxford: Update Software.

79. Sly RM, Harper RT, Rosselot I. The effect of physical conditioning upon asthmatic children. Ann Allergy 1972; 30: 86-94.

80. Fitch KD, Morton AR, Blanksby BA. Effects of swimming training on children with asthma. Arch Dis Child 1976; 51:190-4.

81. Neder JA, Nery LE, Silva AC, Cabral ALB, Fernandes ALG. Short term effects of aerobic training in the clinical management of moderate to severe asthma in children. Thorax, 54:202-206, 1999.

82. Tinkelman DG. Childhood asthma pathophsiology and treatment. Nova York: Marcel Dekker, 1987.

83. Petersen AMW, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. J Appl Physiol 98: 1154–1162, 2005.

84. Cooper DM, Radom-Aizik S, Schwindt C, Zaldivar F Jr. Dangerous exercise: lessons learned from dysregulated inflammatory responses to physical activity. J Appl Physiol 103: 700–709, 2007.

85. Nieman DC, Johanssen LM, Lee JW, Arabatzis K. Infectious episodes in runners before and after the Los Angeles marathon. J Sports Med Phys Fitness 1990;30:316-28.

86. Smith LL. Overtraining, excessive exercise, and altered immunity. Is this a t helper-1 versus t helper-2 lymphocyte response? Sports Med 2003; 33 (5): 347-364.

87. Shephard RJ. Sepsis and mechanisms of inflammatory response: is exercise a good model? *Br J Sports Med* 2001;35:223-230.

88. Pedersen BK, Fischer CP. Physiological roles of muscle-derived interleukin-6 in response to exercise. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2007;10:265–271.

89. Pedersen BK, Akerström TCA, Nielsen AR, Fischer CP. Role of myokines in exercise and metabolism. J Appl Physiol 103: 1093–1098, 2007.

90. 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 172: 4520-4526, 2004.

91. 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 19: 413-422, 2005.

92. Vieira RP, Claudino RC, Duarte AC, Santos AB, Perini A, Faria Neto HC, Mauad T, Martins MA, Dolhnikoff M, Carvalho CR. Aerobic exercise decreases chronic allergic lung inflammation and airway remodeling in mice. Am J Respir Crit Care Med 176:871-877, 2007.

93. Fust A, LeBellego F, Iozzo RV, Roughley PJ, Ludwig MS. Alterations in lung mechanics in decorin-deficient mice. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2005;288: L159-L166.

94. Hantos Z, Collins RA, Turner DJ, Jánosi TZ, Sly PD. Tracking of airway and tissue mechanics during TLC maneuvers in mice. J Appl Physiol 2003;95:1695-1705.

95. Vieira, Rodolfo de Paula. Efeitos do treinamento físico aeróbico sobre a inflamação pulmonar alérgica em camundongos. Tese de doutorado apresentada a Faculdade de Medicina da USP, 2007.

96. Behmer OA, de Tolosa EMC, Freitas Neto AG. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo: Livraria Editora, 1976.

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

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

99. Carroll NG, Mutavdzic S, James AL. Increased mast cells and neutrophils in submucosal mucous glands and mucus plugging in patients with asthma. Thorax. 2002 Aug;57(8):677-82.

100. 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 IκB kinase β-dependent genes in airway epithelium. PNAS 2005; 102(49):17723–17728.

101. Dolhnikoff M, Mauad T, Ludwig MS. Extracellular matrix and oscillatory mechanics of rat lung parenchyma in bleomycin-induced fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 1999 Nov;160(5 Pt 1):1750-7.

102. Azar HA and Espinoza CG. Diagnostic immunohistochemistry and electron microscopy of "Undifferentiated" malignant tumors. In: Manual of Clinical Laboratory Immunology, 3th ed., edited by Noel R. Rose, Herman Friedman and John L. Fahey. Washington, 1986, p.926-930.

103. Weibel ER. Morphometry: stereological theory and practical methods. In: J. Gil, Editor, Models of Lung Disease - Microscopy and Structural Methods, Marcel Dekker, New York; 1990:199-247.

104. Fink G, Kaye C, Spitzer SA. Cardiopulmonary exercise testing in asthmatic patients. Harefuah. 1992 Mar 15;122(6):364-7, 407.

105. Gonçalves RC. Efeito do treinamento aeróbio na capacidade funcional, qualidade de vida, ansiedade, depressão e óxido nítrico exalado de adultos com asma persistente moderada ou grave. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências, 2006.

106. Garcia-Aymerich J, Varraso R, Antó JM, Camargo Jr. CA. Prospective Study of Physical Activity and Risk of Asthma Exacerbations in Older Women. Am J Respir Crit Care Med Vol 179. pp 999-1003, 2009.

107. Wills-Karp M: Murine models of asthma in understanding immune dysregulation in human asthma. Immunopharmacology 2000;48:263-268.

108. Wegmann M. Animal models of chronic experimental asthma-strategies for the identification of new therapeutic targets. Journal of Occupational Medicine and Toxicology 2008;3(Suppl 1):S4,1-5.

109. Vieira RP, Andrade VF, Silva ACD, Santos ABG, Mauad T, Martins MA, Dolhnikoff M, Carvalho CRF Aerobic conditioning and allergic pulmonary inflammation in mice II: effects on lung vascular and parenchymal inflammation and remodeling. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. Em última revisão. 2008.

110. McLachlan CR, Poulton R, Car G, Cowan J, Filsell S, Greene JM, Taylor DR, Welch D, Williamson A, Sears MR, Hancox RJ. Adiposity, asthma, and airway inflammation. J Allergy Clin Immunol 2007;119:634-9.

111. Litonjua AA, Sparrow D, Weiss S. The FEF25-75/FVC ratio is associated with methacholine airway hyperresponsiveness. Am J Respir Crit Care Med 1999; 159:1574-9.

112. Johnston RA, Zhu M, Rivera-Sanchez YM, Lu FL, Theman TA, Flynt L, Shore SA. Allergic airway responses in obese mice. Am J Respir Crit Care Med 2007;176: 650-658.

113. Rausch ME, Weisberg S, Vardhana P, Tororiello DV. Obesity in C57BL/6j mice is characterized by adipose tissue hypoxia ad cytotoxic T-cell infiltration. International Int J Obes (Lond). 2008;32(3):451-63.

114. Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. Nature 1998;394:897-901.

115. Shore S, Shinkai S, Rhind S, et al. Immune responses to training: how critical is training volume? J Sports Med Phys Fitness 1999;39:1–11.

116. Mackinnon LT. Exercise and immunoglobulins. Exerc Immunol Rev 1996;2:1–34.

117. Mackinnon LT, Chick TW, van As A, et al. Decreased secretory immunoglobulins following intense endurance exercise. Sports Training and Medical Rehabilitation 1989;1:209–18.

118. Shephard RJ. Overview of the epidemiology of exercise immunology. Immunol Cell Biol 2000;78:485–95.

119. Silva-Duarte AC, Vieira RP, Perini A, Santos ABG, Medeiros MCR, Mauad T, Martins MA, Carvalho CRF.Aerobic conditioning inhibits ovalbumin allergic sensitization and airway inflammation in mice. Clinical & Experimental Allergy, submetido em 12/01/09.

120. Oshiba A, Hamelmann E, Takeda K, et al. Passive transfer of immediate hypersensitivity and airway hyperresponsiveness by allergen-specific IgE and IgG1 in mice. J Clin Invest 1996;97:1398-1408.

121. Hamelmann E, Cieslewicz G, Schwarze J, Ishizuka T, Joetham A, Heusser C, Gelfand EW. Anti-interleukin 5 but not anti-IgE prevents airway inflammation and airway hyperresponsiveness. Am J Respir Crit Care Med 1999;160:934–941.

122. Renz H, Lack G, Saloga J, Schwinzer R, Bradley K, Loader J, Kupfer A, Larsen GL, Gelfand EW. Inhibition of IgE production and normalization of airways responsiveness by sensitized CD8 T cells in a mouse model of allergen-induced sensitization. J Immunol. 1994 Jan 1;152(1):351-60.

123. Moreira A, Delgado L, Haahtela T, Fonseca J, Moreira P, Lopes C, Mota J, Santos P, Rytilä P, Castel-Branco MG. Physical training does not increase allergic inflammation in asthmatic children. Eur Respir J.2008; 32: 1570-1575.

124. Kips JC. Cytokines in asthma. Eur Respir J 2001; 18: Suppl. 34, 24s–33s.

125. Macneil B, Hoffman-Goetz L. Chronic exercise enhances in vivo and in vitro cytotoxic mechanisms of natural immunity in mice. J Appl Physiol 74: 388–395, 1993.

126. Baral E, Blomgren H, Rotstein S. Effect of estrogens on human blood lymphocyte subpopulations in vitro. J Clin Lab Immunol 15: 195–197, 1984.

127. Araneo BA, Dowell T, Diegel M, Daynes RA. Dihydrotestosterone exerts a depressive influence on the production of interleukin-4 (IL-4), IL-5, and gamma-interferon, but not IL-2 by activated murine T cells. Blood 78: 688–699, 1991.

128. Birkeland SA, Storm H, Lamm LU, Barlow L, Blohme I, Forsberg B, Eklund B, Fjeldborg O, Friedberg M, Frodin L, Glattre E, Halvorsen S, Holm NV, Jakonsen A, Jørgensen HE, Ladefoged J, Lindholm T, Lundgren G, Pukkala E. Cancer after renal transplantation in the Nordic countries, 1964–1986. Int J Cancer 60: 183–189, 1995.

129. Bagby GJ, Crouch LD, Shepherd RE. Exercise and cytokines: spontaneous and elicited responses. In: Exercise and Immune Function, edited by L. Hoffman-Goetz. Boca Raton, FL: CRC, 1996, 55–78.

130. Beale HD, Fowler WS, Comroe JH Jr. Pulmonary function studies in 20 asthmatic patients in the symptom-free interval. J Allergy 1952;23:1-10.

131. Brown PJ, Greville HW, Finucane KE. Asthma and irreversible airflow obstruction. Thorax 1984;39:131-136.

132. Tomioka S, Bates JHT, Irvin CG. Airway and tissue mechanics in a murine model of asthma: alveolar capsule vs. forced oscillations. J Appl Physiol 93: 263–270, 2002.

133. Tanaka H, Masuda T, Tokuoka S, Takahashi Y, Komai M, Nagao K, Nagai H. Time course study on the development of allergen-induced airway remodeling in mice: the effect of allergen avoidance on established airway remodeling. Inflamm. Res. 51 (2002) 307–316.

134. Yamauchi E, Shoji S, Nishihara M, Shimoda T, Nishima S. contribution of lung fibroblast migration in the fibrotic process of airway remodeling in asthma. Allergology International. 2008;57:73-7.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo