

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO**

RICARDO WESLEY ALBERCA CUSTÓDIO

**A VIA DOS LEUCOTRIENOS CONTRIBUI PARA OS EFEITOS
ANTIINFLAMATÓRIOS DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO NA
ASMA?**

São Paulo, SP

2014

RICARDO WESLEY ALBERCA CUSTÓDIO

**A VIA DOS LEUCOTRIENOS CONTRIBUI PARA OS EFEITOS
ANTIINFLAMATÓRIOS DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO NA
ASMA?**

Trabalho apresentado à Universidade
Nove de Julho como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em
Ciências da Reabilitação.

Orientador: Prof. Dr. Rodolfo de Paula Vieira

São Paulo, SP

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Custódio, Ricardo Wesley Alberca.

A via dos leucotrienos contribui para os efeitos antiinflamatórios do treinamento físico aeróbio na asma? / Ricardo Wesley Alberca Custódio. 2015.

119 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2015.

Orientador (a): Prof. Dr. Rodolfo de Paula Vieira.

1. Imunologia. 2. Exercício. 3. Respiratória. 4. Inflamação. 5. Citocinas.

I. Viera, Rodolfo de Paula.

II. Título

CDU 615.8

São Paulo, 21 de janeiro de 2015.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno(a): RICARDO WESLEY ALBERCA CUSTÓDIO

Título da Dissertação: "A via dos leucotrienos contribui para os efeitos antiinflamatórios do treinamento físico aeróbio na asma?"

Presidente: PROF. DR. RODOLFO DE PAULA VIEIRA



Membro: PROF. DR. FLÁVIO AIMBIRE SOARES DE CARVALHO



Membro: PROF. DR. LUIS VICENTE FRANCO DE OLIVEIRA



Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia Pulmonar e do Exercício da Universidade de Nove de Julho, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, processo número 2012/21519-1 (modalidade bolsa de mestrado no país), 2014/09292-7 (modalidade bolsa estágio de pesquisa no exterior - BEPE) e 2012/15165-2 (auxílio jovem pesquisador).

DEDICATÓRIA

A Deus.

A minha mãe, Fátima Aparecida Alberca

A minha avó, Alzira de Oliveira Alberca

A minha esposa, Gabriela Gama Freire Alberca.

Os alicerces da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Rodolfo de Paula Vieira, por ter me aceito como seu aluno e ter tido enorme paciência e pelos ensinamentos tanto sobre ciência quanto sobre a vida.

Aos animais de laboratório, por sua contribuição notável ao desenvolvimento da ciência. Sem eles, este trabalho não poderia ter sido desenvolvido.

Gostaria de agradecer aos meus colegas de laboratório e a todas as pessoas que colaboraram com esse e com os demais projetos que desenvolvi no laboratório.

Aos funcionários, professores e alunos da Universidade Nove de Julho e também da Faculdade de Medicina da USP, os quais colaboraram de alguma forma para o meu trabalho e agregaram conhecimento a minha vida.

À FAPESP, pelas bolsas concedidas, processo número 2012/21519-1 (modalidade bolsa de mestrado no país) e 2014/09292-7 (modalidade bolsa estágio de pesquisa no exterior - BEPE).

RESUMO

Os leucotrienos (LTs) desempenham um papel central na fisiopatologia da asma. O exercício físico aeróbico tem demonstrado ser capaz de reduzir a inflamação asmática. Portanto, este estudo investigou se os efeitos anti-inflamatórios do exercício aeróbico ocorrem devido à inibição da via dos LTs. Quarenta camundongos BALB/c machos foram distribuídos em quatro grupos: Controle, Exercício, OVA e OVA+Exercício. Os camundongos foram sensibilizados e desafiados com ovalbumina. O treinamento aeróbico foi realizado em uma esteira adaptada, em intensidade leve, 5x/semana, 1h/sessão, durante 4 semanas, após o estabelecimento da inflamação das vias aéreas. Células totais e diferenciais foram analisadas no lavado bronco-alveolar (BAL), os níveis de citocinas no BAL, o número de linfócitos e macrófagos na parede das vias aéreas, o remodelamento das vias aéreas (fibras colágenas e elásticas, produção de muco e da espessura do músculo liso brônquico), a hiperresponsividade brônquica, além dos níveis de leucotrieno B₄ (LTB₄) e leucotrieno C₄ (LTC₄) no BAL. Adicionalmente, foi realizada a imunohistoquímica para 5-lipoxigenase (5-LO), LTA₄-hidrolase (LTA₄H), receptor de CysLT₁, receptor de CysLT₂, LTC₄-sintase, receptor 2 de LTB₄ (BLT₂). Os resultados demonstraram que o exercício aeróbico diminuiu o número total de células ($p<0.05$), eosinófilos ($p<0.05$), neutrófilos ($p<0.001$), linfócitos ($p<0.001$) e macrófagos ($p<0.01$) no BAL, bem como o número de linfócitos ($p<0.05$) e os macrófagos ($p<0.01$) na parede das vias aéreas. Além disso, o acúmulo de fibras colágenas ($p<0.01$), fibras elásticas ($p<0.01$) e produção de muco ($p<0.01$) e da espessura do músculo liso brônquico ($p<0.05$) e os níveis de hiperresponsividade brônquica com 25 MCh ($p<0.05$) e 50 MCh ($p<0.01$) foi reduzida nos camundongos

sensibilizados e treinados. Além disso, os níveis de BAL de IL-5 ($p < 0,05$), foram reduzidos, bem como os níveis de LTB₄ ($p < 0,05$). A expressão da 5-LO ($p < 0,05$), LTA₄H ($p < 0,05$), o receptor de CysLT₁ ($p < 0,05$), receptor de CysLT₂ ($p < 0,05$), LTC₄-sintase ($p < 0,05$) e BLT₂ ($p < 0,05$) nos leucócitos peribrônquicos foram reduzidos pelo exercício e a expressão da 5-LO ($p < 0,05$), LTA₄H ($p < 0,05$), o receptor de CysLT₁ ($p < 0,05$), o receptor de CysLT₂ ($p < 0,05$), LTC₄-sintase ($p < 0,05$) e BLT₂ ($p < 0,05$) no epitélio brônquico. Concluimos que o treinamento de intensidade leve reduz fenótipo da asma por inibição da via dos leucotrienos.

Palavras Chave: Asma, Leucotrienos, Exercício, Imunologia, Inflamação

ABSTRACT

Leukotrienes (LTs) play a central role in the pathophysiology of asthma. Aerobic exercise has been shown to be capable of reducing asthmatic inflammation. Therefore, this study investigated whether the anti-inflammatory effects of aerobic exercise are due to inhibition of the pathway of LTs. Forty BALB / c mice were divided into four groups: Control, Exercise, OVA and OVA + Exercise. The mice were sensitized and challenged with ovalbumin. Aerobic training was performed on a adapted treadmill, at low intensity, 5x / week, 1h / session for 4 weeks, after the establishment of airway inflammation. Total and differential cells were analyzed in bronchoalveolar lavage (BAL), cytokine levels in BAL, the number of lymphocytes and macrophages in the airway wall, the airway remodeling (collagen and elastic fibers, mucous production and thickness of bronchial smooth muscle), bronchial hyperresponsiveness, beyond the levels of leukotriene B4 (LTB4) and leukotriene C4 (LTC4) in BAL. In addition, immunohistochemistry was performed for 5-lipoxygenase (5-LO) LTA4 hydrolase (LTA4H) CysLT1 receptor, CysLT2 receptor, LTC4 synthase, LTB4 receptor 2 (BLT2). The results demonstrated that aerobic exercise reduced the total number of cells ($p < 0.05$), eosinophils ($p < 0.05$), neutrophils ($p < 0.001$), lymphocytes ($p < 0.001$) and macrophage ($p < 0.01$) in BAL and the number of lymphocytes ($p < 0.05$) and macrophages ($p < 0.01$) in the airway wall. In addition, the accumulation of collagen fibers ($p < 0.01$), elastic fibers ($p < 0.01$) and mucus production ($p < 0.01$) and the thickness of bronchial smooth muscle ($P < 0.05$) and bronchial hyperresponsiveness levels at 25 MCh ($p < 0.05$) and 50 MCh ($p < 0.01$) were reduced in mice sensitized and trained. Furthermore, BAL IL-5 ($p < 0.05$) were reduced, and the levels of LTB4 ($p < 0.05$). The expression of 5-LO ($p < 0.05$) LTA4H ($p < 0.05$), the CysLT 1 receptor ($p < 0.05$), CysLT 2 receptor ($p < 0.05$), LTC4

synthase ($p < 0.05$) and BLT2 ($p < 0.05$) in peribronchial leukocytes were reduced by exercise and expression of 5-LO ($p < 0.05$) LTA4H ($p < 0.05$), the CysLT 1 receptor ($p < 0.05$), CysLT 2 receptor ($p < 0.05$), LTC4 synthase ($p < 0.05$) and BLT2 ($p < 0.05$) in the bronchial epithelium. We conclude that the low intensity aerobic exercise reduces phenotype of asthma by inhibiting the leukotriene pathway.

Key-words: Asthma, Leukotrienes, Exercise, Immunology, Inflammation

LISTA DE ABREVIATURAS

5-LO: 5-lipoxigenase

Alum: hidróxido de alumínio

CONTROLE: Grupo não sensibilizado e não treinado

Cys1: Receptor 1 de cistenil leucotrieno

Cys2: Receptor 2 de cistenil leucotrieno

CysLTs: Leucotrienos Cystenyl

DC: Célula dendríticas

ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*

FeNO: Fração expirada de óxido nítrico

GRUPO OVA: Grupo sensibilizado com ovalbumina

GRUPO OVA+EXE: Grupo sensibilizado com ovalbumina e treinado

GRUPO EXE: Grupo não sensibilizado e treinado

HE: Hematoxilina/eosina

i.n.: Intranasal

IFN- γ : Interferon gama

IgE: Imunoglobulina E

IL: Interleucina

LBA: Lavado bronco-alveolar

LtA4h: Leucotrieno 4 hidrolase

LtB4: Leucotrieno B4

LtC4: Leucotrieno C4

LTs: Leucotrienos

OVA: Ovalbumina

PAS: Ácido periódico de Schiff

PBS: Salina tamponada de fosfato

PCR: proteína C reativa

PSH: Picrossírius

s.c.: subcutâneo

SUS:Sistema Único de Saúde

TFA: Treinamento físico aeróbio

Th1: *T helper 1*

Th2: *T helper 2*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Modelo Experimental.....	44
Figura 2. Efeitos do TFA sobre a hiperresponsividade brônquica nível basal.....	50
Figura 3. Efeitos do TFA sobre a hiperresponsividade brônquica PBS.....	50
Figura 4. Efeitos do TFA sobre a hiperresponsividade brônquica 6,25MCh.....	51
Figura 5. Efeitos do TFA sobre a hiperresponsividade brônquica 12,5 MCh.....	51
Figura 6. Efeitos do TFA sobre a hiperresponsividade brônquica 25 MCh.....	51
Figura 7. Efeitos do TFA sobre a hiperresponsividade brônquica 50 MCh.....	52
Figura 8. Efeitos do TFA sobre o número total de células no LBA.....	53
Figura 9. Efeitos do TFA sobre o número de neutrófilos no LBA.....	53
Figura 10. Efeitos do TFA sobre o número linfócitos no LBA.....	54
Figura 11. Efeitos do TFA sobre o número eosinófilos no LBA.....	54
Figura 12. Efeitos do TFA sobre o número macrófagos no LBA.....	55
Figura 13. Efeitos do TFA sobre os níveis de IL-5 no LBA.....	56
Figura 14. Efeitos do TFA sobre os níveis de IL-10 no LBA.....	56
Figura 15. Efeitos do TFA sobre os níveis de IFN-gamma no LBA.....	57
Figura 16. Efeitos do TFA sobre os níveis de IL-5 no soro.....	58
Figura 17. Efeitos do TFA sobre os níveis de IL-10 no soro.....	58
Figura 18. Efeitos do TFA sobre os níveis de IFN-g no soro.....	59
Figura 19. Efeitos do TFA sobre o número de linfócitos no espaço peribrônquico....	60
Figura 20. Efeitos do TFA sobre o número de macrófagos no espaço peribrônquico.	60
Figura 21. Efeitos do TFA sobre a porcentagem de fibras colágenas na parede das vias aéreas	61

Figura 22. Efeitos do TFA sobre a porcentagem de fibras elásticas na parede das vias aéreas.....	62
Figura 23. Efeitos do TFA sobre a musculatura lisa na parede das vias aéreas.....	63
Figura 24. Efeitos do TFA sobre os níveis de muco das vias aéreas.....	64
Figura 25. Efeitos do TFA sobre os níveis de LTC ₄ no LBA.....	65
Figura 26. Efeitos do TFA sobre os níveis de LTB ₄ no LBA.....	66
Figura 27. Efeitos do TFA sobre as células inflamatórias peribrônquicas LtA ₄ H/mm ²	67
Figura 28. Efeitos do TFA sobre as células inflamatórias peribrônquicas 5-LO/mm ²	67
Figura 29. Efeitos do TFA sobre as células inflamatórias peribrônquicas LTC ₄ /mm ²	68
Figura 30. Efeitos do TFA sobre as células inflamatórias peribrônquicas CysLt ₁ /mm ²	68
Figura 31. Efeitos do TFA sobre as células inflamatórias peribrônquicas CysLt ₂ /mm ²	69
Figura 32. Efeitos do TFA sobre as células inflamatórias peribrônquicas LtB ₄ /mm ²	69
Figura 33. Efeitos do TFA sobre a área epitelial expressando LtA ₄ H(%).....	70
Figura 34. Efeitos do TFA sobre a área epitelial expressando 5-LO(%).....	71
Figura 35. Efeitos do TFA sobre a área epitelial expressando LtC ₄ (%).....	71
Figura 36. Efeitos do TFA sobre a área epitelial expressando CysLt ₁ (%).....	72
Figura 37. Efeitos do TFA sobre a área epitelial expressando CysLt ₂ (%).....	72
Figura 38. Efeitos do TFA sobre a área epitelial expressando LtB ₄ (%).....	73

Figura 39. Efeitos do TFA sobre o receptor 2 de Leucotrieno B4 no homogenato pulmonar.....	74
---	----

Figura 40. Efeitos do TFA sobre o receptor 2 de Cistenil leucotrieno no homogenato pulmonar.....	75
---	----

SUMÁRIO

1.Introdução	20
1.1 . Asma – Definição	22
1.2 . Asma - Epidemiologia	22
1.3 . Asma – Fisiopatologia	23
1.4 . Asma – Responsividade brônquica	28
1.5 . Atividade Física como terapia	32
1.6 . Leucotrienos	35
1.7 . Exercício Físico e Broncoconstrição.....	38
2.Objetivo	42
2.1. Objetivos Gerais	42
2.2. Objetivos Específicos	42
3.Materiais e Métodos	43
3.1. Animais	43
3.2. Protocolo Experimental	43
3.3. Sensibilização e Desafio dos animais	43
3.4. Treinamento Aeróbio e Teste Físico	44
3.5. Avaliação da responsividade brônquica	45
3.6. Coleta e Análise do Soro de Sangue	46
3.7. Coleta e Análise do Lavado Broncoalveolar (LBA)	46
3.8. Histoquímica e Imunohistoquímica	47
3.8.1. Histoquímica	47
3.8.2. Imunohistoquímica	48
3.9. Análise Estatística	49

4. Resultados	51
4.1. Efeitos do TFA sobre a hiperresponsividade brônquica num modelo experimental de asma	51
4.2. Efeitos do TFA sobre a inflamação alérgica crônica das vias aéreas num modelo experimental de asma	54
4.2.1. Inflamação pulmonar no LBA.....	54
4.2.2. Citocinas no Soro	57
4.2.3. Inflamação pulmonar no espaço peribrônquico	59
4.3. Efeitos do TAF sobre o remodelamento das vias aérea num modelo experimental de asma	60
4.4. Efeitos do TAF sobre os níveis de leucotrienos no LBA.....	64
4.5. Efeitos do TFA sobre a expressão das células inflamatórias peribrônquicas de leucotrieno A4 hidrolase(LTA4H), 5-lipoxigenase(5-LO), leucotrieno C4 sintase (LTC4), receptor Cisteinil leucotrieno 1(Cyslt1), receptor Cisteinil leucotrieno 2 (Cyslt2), receptor leucotrieno B4 (Ltb4r2).....	66
4.6. Efeitos do TFA sobre a expressão de leucotrieno A4 hidrolase(LTA4H), 5-lipoxigenase(5-LO), leucotrieno C4 sintase (LTC4), receptor Cisteinil leucotrieno 1(Cyslt1), receptor Cisteinil leucotrieno 2 (Cyslt2), receptor leucotrieno B4 (Ltb4r2) no epitélio brônquico.....	69
4.7 - Efeitos do TFA sobre a expressão de leucotrieno B4 receptor 2(LTB4r2) e cisteinil leucotrieno receptor 2(Cyslt2) no homogenato pulmonar.....	73

5. Discussão	75
6. Conclusão	79
7. Referências	80
8. Anexos	96
Anexo I – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	96
Anexo II – Paper Publicado.....	100

INTRODUÇÃO

1.1 – Asma – Definição

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, predominantemente alérgica, na qual muitas células e elementos celulares exercem um importante papel. O quadro de inflamação crônica está associado à hiperresponsividade brônquica que leva a episódios recorrentes de dispneia, chiado e tosse, principalmente à noite ou no início da manhã. Estes sintomas estão associados à obstrução brônquica sendo, ao menos, parcialmente reversível espontaneamente ou com tratamento (National Asthma Education and Prevention Program, 2007).

Dependendo da severidade, as limitações do fluxo aéreo podem ser acompanhadas de sintomas como dispneia, chiado, aperto no peito e tosse. A produção de muco nas vias aéreas também é aumentada em alguns pacientes asmáticos, especialmente em pacientes crônicos e pós-exacerbação. A exacerbação na asma consiste de ataques ou de pioras nos sintomas e função pulmonar, elas podem ocorrer de maneira rápida ou progressiva. Em ambas as situações sem tratamento adequado o paciente pode vir a correr risco de vida, são os casos denominados de asma fatal (National Asthma Education and Prevention Program, 2007) e Fuhlbrigge et al., 2012)

1.2 – Asma – Epidemiologia

A incidência mundial de asma é estimada entre 2,65 a 4/1000 ano e é mais comum em crianças até 5 anos com estimativa entre 8,1 a 14/1000 por ano (Gergen,

P. J. e Weiss, K. B. 1995). Além disso, é mais presente em afro-descendentes (12,27%) que em caucasianos (10,47%) (Sircar et AL, 2014).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2005 foram estimados 300 milhões de indivíduos em todo o mundo, 250 mil pessoas morrem prematuramente todos os anos por falta de tratamento adequado (World Health Organization, 2006). O Brasil ocupa a oitava posição mundial em prevalência de asma, com cerca de 273 mil internações e 2.500 óbitos em 2007, gerando custo aproximado de R\$ 98,6 milhões para o Sistema Único de Saúde (SUS) (Neto, A. et al.,2010).

1.3 – Asma – Fisiopatologia

O conceito de inflamação como um grande componente na patologia da asma foi estabelecido a mais de 100 anos, através de estudos de autopsias, através de análises macroscópicas de mudanças morfológicas no tecido pulmonar das vias aéreas de asmáticos (Ueber, C.H., 1882).

A asma é uma síndrome respiratória caracterizada por uma inflamação pulmonar crônica associada a uma obstrução intermitente, hiper-reatividade das vias aéreas e inflamação das vias aéreas que pode ser desencadeada por vários estímulos, como alérgenos ambientais ou infecções virais (National Asthma Education and Prevention Program, 2007 e National Institutes of Health,2009).

Esses estímulos geram um processo inflamatório que acomete o tecido pulmonar e é caracterizada por uma obstrução do fluxo aéreo devido a alterações principalmente da contração da musculatura lisa brônquica. Esta obstrução caracteriza a hiperresponsividade brônquica e ocorre em resposta a uma série de

estímulos endógenos ou exógenos (Holgate ST , 2008 e Holgate ST e Davies DE 2009).

Esse quadro é acompanhado pelo aumento da produção de muco e com o tempo pode levar a mudanças estruturais e funcionais no tecido denominado de remodelamento pulmonar. Sabe-se que a patogênese da asma brônquica encontra-se associada a componentes genéticos e torna-se mais grave com a exposição a fatores ambientais (Holgate ST , 2008 e Holgate ST e Davies DE 2009).

A asma é geralmente classificada entre intrínseca (ou não-alérgica) e extrínseca (ou alérgica), classificação gerada a partir da participação ou não no mecanismo alérgico das imunoglobulinas E (IgE) (Larche M et al, 2003). O processo asmático é dividido em duas fases: a) fase imediata, a principal causa sendo o espasmo muscular da musculatura lisa brônquica, levando a broncoconstrição típica da fisiopatologia; b) fase tardia, quando após um tempo variável de exposição ao antígeno, ocorre uma ação aguda anti-inflamatória levando a um estado crônico de inflamação (Larche M et al, 2003 e Ritz SA et al, 2000).

A inflamação crônica na asma é mediada por citocinas Th2, em sua maioria interleucinas (IL)-4, IL-5 e IL-13, que apresentam um importante papel no remodelamento e manutenção da inflamação (Ritz SA et al, 2000, Robert F e Lemanske Jr, 2000 e Galli SJ et al, 2008).

Sabe-se que a patogênese da asma brônquica encontra-se associada a componentes genéticos e torna-se mais grave com a exposição a fatores ambientais (Holgate ST , 2008 e Holgate ST e Davies DE 2009). Os componentes genéticos que determinam a susceptibilidade à asma podem ser reunidos em quatro grupos principais de genes: o primeiro envolve genes que codificam moléculas associadas com a imunidade inata e imunoregulação (CD14, TLR2, TLR4, TLR6,

TLR10, NOD1, NOD2, IL-10, TGF- β , HLA-DR, HLA-DQ e HLA-DP); o segundo engloba os genes envolvidos com a diferenciação e funções efetoras das células Th2 (GATA2, TBX21, IL-4, IL-13, IL-4RA, IL-5, IL-5A e STAT-6); o terceiro contém os genes envolvidos com a biologia e imunidade das células da mucosa (CCL5, CCL11, CCL24, CCL26, DEFB1, SPINK5, FLG, ADAM33, SCGB1A1) e o quarto grupo envolve os genes associados com as funções pulmonares, remodelamento tecidual e gravidade das doenças (TGF, GPRA, ADRB2, TNF, NOS1) (Steinke JW et al.,2003 e Vercelli D.,2008).

O sistema imunológico é separável em inato (mediados por anticorpos ou humoral) e adaptativo (mediado por células). O sistema humoral é caracterizado pela produção e secreção de anticorpos específico pelos linfócitos B, enquanto que mediada pelas células dependem basicamente de linfócitos T. As células T controlam a função dos linfócitos B e também exercem ações pró-inflamatórias por meio de atividade citotóxica (pelo CD8+ *killer t cell*) e da secreção de citocinas (Roitt IM,1992).

Em muitos casos, especialmente em crianças e adultos jovens, a asma está associada à atopia manifestando-se através mecanismos dependentes da imunoglobulina E (IgE) (Bukantz SC, Lockey RF,1993). Em nível populacional, a contribuição de fenótipo propenso à asma foi estimada em 40% em crianças e em adultos (National Institutes of Health, 2009).

O anticorpo monoclonal *Anti-IgE Nonanaphylactogenic* (E-25) é capaz de atenuar as respostas imediatas e tardias das vias respiratórias, o remodelamento das vias aéreas, a hiperresponsividade, e o fluxo de eosinófilos para a luz das vias aéreas após desafio com alérgeno inalado. Este anticorpo anti-IgE é também eficaz na melhoria dos sintomas e controle da asma em ensaios clínicos. Estas

observações fornecem evidência inequívoca para um papel fundamental da IgE em pacientes asmáticos (Milgrom H et al, 1999 e Fahy JV, 1999).

Pelo menos dois subtipos dos linfócitos T-helper (Th) foram caracterizados de acordo com o seu perfil de produção, ambos tipos liberam IL-3 e GM-CSF, sendo que o subtipo Th1 produz preferencialmente IL-2, estimulando a proliferação de linfócitos T, tipos de interferon (IFN) (que inibe a ativação dos linfócitos B e a síntese de IgE, e do fator de necrose tumoral (TNF) (Humbert M, 1997), enquanto que o subtipo Th2, o subtipo principal envolvido na asma, produz preferencialmente as citocinas IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e IL-16. Essas citocinas são responsáveis pelo desenvolvimento da clássica reação inflamatória e hipersensibilidade mediada pelas células. IL-4 é uma citocina fundamental para a resposta alérgica, promovendo a síntese de IgE, dirigindo as células T ao longo da via de diferenciação para Th2, a *upregulation* da expressão de molécula de adesão vascular celular-1 (VCAM-1), e controlar o nível de expressão do receptor IgE Fc, receptores de citocinas e quimiocinas, e leucócitos envolvidos na cascata alérgica (Humbert M, 1997).

A administração do receptor solúvel de IL-4 para se ligar ao IL-4 livre, impedindo-o de se ligar aos receptores de IL-4 das células, demonstrou efeitos anti-inflamatórios benéficos tanto em modelos animais quanto em humanos (Larche M et al, 2003 e Ritz et al, 2000). A IL-13, outra citocina Th2, possui inúmeros efeitos sobre componentes imunológicos e estruturais envolvidas na asma, e também pode ser um alvo para terapia da asma (Holt PG et al, 1999).

Para a geração de uma resposta imune é primordial a ativação dos linfócitos T por um antígeno apresentado adequadamente pelas células acessórias, com a utilização das moléculas *major histocompatibility complex* (MHC) (de classe II para as células T CD4 + e de classe I para as células T CD8 +). As células dendríticas

são importantes células apresentadoras de antígenos nas vias aéreas. Eles se originam na medula óssea e formam uma extensa rede de células abaixo do epitélio das vias respiratórias (Kay AB, 1991).

A partir desta localização eles migram para os tecidos linfoides locais sob a influência de granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GMCSF), uma citocina liberada por células epiteliais ativadas, fibroblastos, células T, macrófagos e mastócitos. As células dendríticas podem também conduzir a diferenciação das células *naive T-helper* (Th0) para o subtipo Th2 secretando citocinas codificados em conjunto com o cromossomo 5q31-33. (Kay AB, 1991).

A presença de linfócitos ativados e de eosinófilos nas biópsias brônquicas de pacientes atópicos e não atópicos com asma sugere que a interação entre os linfócitos-T e eosinófilos é importante, uma hipótese ainda apoiada pela descoberta de células que expressam a IL-5 em biópsias brônquicas de pacientes atópicos com asma. A IL-5 é uma importante citocina para a regulação dos eosinófilos, o seu nível de expressão nas mucosas das vias aéreas de pacientes com asma correlacionando-se com marcadores de ativação dos linfócitos T e eosinófilos (Bousquet J, 1990).

Na asma crônica, um número aumentado de eosinófilos são encontrados em biópsias brônquicas, mais frequentemente abaixo da membrana basal. A grande maioria dos asmáticos alérgicos ou não alérgicos, incluindo aqueles com asma leve, tem eosinófilos nos brônquios e existe uma associação variável entre a ativação de eosinófilos e a gravidade da asma (Bradley BL et al, 1991) e hiperresponsividade das vias aéreas (Busse WW e Sedgwick JB, 1994).

Os eosinófilos possuem uma grande variedade de propriedades biológicas, incluindo a produção e liberação de radicais livres de oxigênio, eicosanoides (*sulfido-*

peptide leukotrienes) (Broide DH et al, 1992), fator ativador de plaquetas (PAF), citocinas Th2 (Gleich GJ et al, 1993), e fatores de crescimento (Rabe KF et al, 1994). Os eosinófilos ativados podem iniciar a contração dos músculos lisos das vias aéreas (Collins DS et al, 1993), aumentar permeabilidade microvascular (Leff AR, 1994), e induzir hiperresponsividade (Laitinen LA et al, 1985).

Os mastócitos são encontrados nos brônquios de asmáticos e não asmáticos (Busse WW e Sedgwick JB, 1994), se encontrando normalmente em um estado degranulado nas pessoas asmáticas, são importantes liberadores de proteases neutras, especialmente triptase, que tem uma gama de efeitos sobre substratos proteicos incluindo receptores ativadores de protease (Malech HL, Gallin JI, 1987).

Os neutrófilos podem liberar uma vasta variedade de enzimas incluindo proteases que degradam a matriz extracelular (por exemplo, MMP-9 e elastase), espécies reativas de oxigênio, citocinas e quimiocinas, tais como IL-1, o TNF, IL-6, e IL-8 (Wenzel SE et al, 1997).

Os neutrófilos são aumentados nas vias aéreas de pacientes com asma crônica e grave durante exacerbações geradas por vírus ou aos poluentes do ar, mas a sua papel nas alterações fisiopatológicas da asma grave ainda não estão totalmente elucidados (Werb Z et al, 1992).

Os macrófagos secretam uma ampla variedade de produtos, muitos dos quais desempenham um papel importante nos processos de lesão e reparo tecidual (Senior RM et al, 1989), sintetizando e secretando ativadores plasminogênio e um grupo de metaloproteinases que pode degradar diversas macromoléculas da matriz extracelular, incluindo elastina (Vignola AM et al, 1996).

Os macrófagos podem também estar envolvidos na remodelação das vias aéreas através da secreção de fatores de crescimento como *platelet derived growth factor (PDGF)*, *basic fibroblast growth factor (b-FGF)*, e *TGF* (Nath P, 1997).

1.4 – Asma – Responsividade Brônquica

O termo responsividade brônquica é normalmente utilizado para descrever quão rápida e intensa é a resposta das vias aéreas a um agente broncoconstritor (Fixman ED et al, 2007 e Vignola AM et al, 2003). Na asma, a hiperresponsividade brônquica pode ser desencadeada não só por alérgenos, mas também por outros estímulos inespecíficos, dentre eles infecções respiratórias, mudanças de temperatura, baixa umidade, poluição, refluxo gastroesofágico, irritantes inalatórios, exercícios físicos, estimulantes farmacológicos, fatores emocionais e exposição a microrganismos patogênicos ou não (Vignola AM et al, 2003, Chiappara G et al, 2001, Mauad T et al, 2000, Pauwels R et al 1988).

Um importante componente da asma é a instabilidade das vias aéreas na presença de estímulos exógenos ou endógenos, gerando uma reação de broncoconstrição exagerada. Diversos mecanismos propostos para explicar a hiperresponsividade brônquica, mas evidências sugerem que a inflamação é o fator chave (Chiappara G et al, 2001).

O estado de hiperresponsividade na qual as vias aéreas realizam a broncoconstrição muito facilmente e de maneira exagerada pode ser gerada de diferentes maneiras, como através do estímulo das musculaturas da via aérea através de metacolina e histamina, indiretamente pela liberação de substâncias como os cistenil leucotrienos através de células mediadoras como os neutrófilos, macrófagos e mastócitos, ou através de dióxido de enxofre e Bradicinina liberados

por neurônios sensoriais não mielinizadas, ou por uma combinação desses diferentes mecanismos (Chai H, 1975).

A hiperresponsividade pode ser quantificada através da construção de uma curva estímulo-resposta, verificando o posicionamento e a curva gerada por diferentes doses ou concentrações dos bronco-provocativos, normalmente utilizando o teste de volume expiratório forçado em 1 segundo (FEV1) (Sterk PJ et al, 1993).

As medidas de hiperresponsividade têm sido padronizadas com o uso de histamina ou metacolina administrada via inalação aerossol, o ponto de variação entre normal e hiperresponsividade varia de acordo com o método e população analisada.

As consequências da variação do calibre da via aérea incluem sintomas como diminuição do pico fluxo expiratório (PEF) tanto noturno quanto diurno, sendo característica em asmáticos uma diminuição de 20% (Tashkin DP, 1987).

O aumento do tônus basal da via aérea é a base para os testes com broncodilatadores para asma, um aumento de 15% ou mais do FEV1 ou PEF 10 a 20 minutos após a inalação de broncodilatadores de ação rápida são aceitos como diagnóstico para determinar se um indivíduo é ou não asmático (Roorda RJ, 1994).

Existe uma relação não totalmente elucidada entre hiperresponsividade, gravidade da asma, e processo inflamatório. Apesar de glicocorticoides comumente melhorarem os sintomas da asma e diminuírem as evidências de inflamação das vias aéreas, seus efeitos na hiperresponsividade apesar de significantes, nem sempre retornam a níveis normais, sugerindo que o remodelamento pode contribuir para a hiperresponsividade (Holgate S, 1993).

As limitações do fluxo aéreo são geradas pela broncoconstrição aguda, inchaço da via aérea, aumento da produção de muco e remodelamento da via aérea (50).

A broncostricção aguda é um mecanismo que varia com o estímulo, as induzidas por alérgenos, resulta através da liberação de IgE estimulando liberação através dos mastócitos de mediadores como histamina, prostaglandina e leucotrieno que estimulam a contração da musculatura lisa brônquica (Szczeklik A et al, 2001).

Diversos estímulos podem causar a broncoconstricção, como inalação de alérgenos, exercício, ar frio, poluição, componentes químicos e também componentes psicológicos como raiva ou tristeza (Szczeklik A et al, 2001).

Os mecanismos que geram a broncoconstricção utilizam diferentes combinações de ação direta sobre a musculatura lisa, liberação de citocinas pelas células inflamatórias e estímulo local e neural (James AL et al, 1989).

O inchaço da via aérea gera uma diminuição do fluxo aéreo e é gerado pelo edema da parede da via com ou sem contração da musculatura lisa. Esse edema gera um aumento da permeabilidade microvascular e leva ao engrossamento do muco e inchaço, levando a perda de elasticidade do tecido o que contribui para a hiperresponsividade (Shifren A, 2012).

O tratamento farmacológico com broncodilatadores pode aliviar alguns componentes da limitação de fluxo aéreo, mas o inchaço da via aérea é mais efetivamente reduzido com a utilização de medicamentos anti-inflamatórios, especialmente glicocorticoides (Roorda RJ et al, 1994 e Holgate ST, 2007).

Outro fator importante é a formação exagerada de muco e é um dos sintomas que leva mais tempo para ser atenuado, mesmo com a utilização de medicamentos anti-inflamatórios. O aumento da secreção em casos mais graves de asma pode levar a formação de *plugs* (tampões) de muco, ocluindo totalmente a passagem de ar em vias aéreas mais periféricas (Pakhale, 2011).

O remodelamento pulmonar é o termo normalmente utilizado para expressar modificações estruturais que ocorrem nos pulmões, especialmente em situações patológicas (Vignola AM et al, 2005 e Chiappara G, 2001). O remodelamento pulmonar é um processo associado a um desbalanço entre a síntese e degradação de proteínas da matriz extracelular (Mauad T, 2000). Esse desequilíbrio gera mudanças na via aérea incluem o aumento da parede da via aérea, a hipertrofia epitelial, hiperplasia da mucosa, fibrose subepitelial, hiperplasia dos miofibroblastos, hipertrofia e hiperplasia das células da musculatura lisa. O remodelamento é um contínuo processo causado pela lesão gerada pelo alérgeno. Alguns fatores como morte celular e lesões no epitélio podem estar relacionadas a severidade da asma (Pakhale S, 2011).

O grau dessas alterações nas vias aéreas, também tem sido associado aos níveis de gravidade da doença e diminuição da função pulmonar (Vignola AM, 2005) e possível correlação como o aumento à resposta a agentes constritores (Mauad T, 2000)..

1.5 – Atividade Física como terapia

As atuais terapias para a asma não conseguem prevenir ou curar a doença, e atualmente não existem remédios que conseguem reverter totalmente o quadro da doença (Holgate S, 2011). Potenciais efeitos deletérios devido ao uso de longo prazo, altos custos e aderência as medicamentos e tratamentos são alguns dos problemas enfrentados hoje para um controle ideal da doença. Mesmo para as mais novas e caras terapias, como, por exemplo, o omalizumab, somente uma pequena parte da população como asmáticos graves e refratários parecem responder (Disabella V e Sherman C., 1998 e Chandratilleke MG et al, 2012). Opções de

tratamentos eficazes são limitadas, e terapias alternativas são um grande foco da pesquisa no mundo todo (Chandratilleke MG et al, 2012).

O exercício físico tem inúmeros benefícios para indivíduos saudáveis e doentes (Mendes et al, 2010), a recomendação padrão é da realização de 20-30 minutos de 60-85% da frequência cardíaca máxima de 4 à 5 vezes por semana, afim de melhorar não somente o controle da asma, mas a capacidade física geral.

Devendo estarem orientados quando ao uso de medicamentos inalatórios e evitar exercícios em ambientes frios (O'Donnell DE et al, 2008).

A dispneia sofrida durante o exercício ou o medo de que a mesma ocorra são os principais fatores que inibem os asmáticos a praticarem esportes e atividades físicas em grupo (O'Donnell DE et al, 2008 e Maltais F et al, 2008).

Diversos estudos têm investigado os benefícios do exercício físico e reabilitação tanto da asma como de outras doenças pulmonares, como doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (Neder JA , 1999 e Moreira A et al, 2008), que como a asma também é uma doença que gera inflamação crônica da via aérea.

O exercício físico parece ter efeitos benéficos sobre a reduzir a inflamação das vias aéreas, como mostrado por uma redução da proteína C reativa (PCR) (Mendes FAR et al, 2011). A PCR é um marcador de inflamação sistêmico, muitas vezes usado para o acompanhamento da doença durante o tratamento. Em indivíduos asmáticos na ausência de qualquer outra doença inflamatória sistêmica a redução da CRP pode indicar uma redução da inflamação das vias aéreas.

Os exercícios físicos apresentam um efeito importante sobre as espécies reativas de oxigênio: redução em malondialdeído (MDA) e óxido nítrico total de plasma (NO) (Gunay O et al, 2012), diminuição das células totais no escarro e eosinófilos (Silva PL et al, 2011), diminuição soro *endothelin-1* (Segal RJ et al, 2009),

e aumento da adiponectina e diminuição da leptina (Boule NG et al, 2001 e Sutherland TJT et al, 2008) são significativas e pode ser devido a redução na inflamação das vias aéreas. (Boule NG et al, 2001). Um aumento na prevalência de asma e obesidade tem sido associado (Sutherland TJT et al, 2008), porém não se sabe ainda se a presença de asma leva à obesidade ou se a obesidade leva ao desenvolvimento de asma.

Vários estudos têm avaliado a intervenção da prática de exercícios físicos na excreção Fração expirada de óxido nítrico (FeNO), hiperresponsividade brônquica à metacolina ou histamina e broncoespasmo induzido pelo exercício (BIE) com resultados divergentes. Ainda não está totalmente elucidado se o FeNO poderia ser afetada por outras doenças não relacionadas ou outros fatores como estatura e idade (Franklin PJ e Stick SM, 2008 e Jartti, 2012).

Um estudo recente demonstra que a resposta das vias aéreas à metacolina e BIE diminuiu, após 12 semanas de treinamento com ou sem montelukaste (Bonsignore MR et al, 2008). Essas melhoras sugerem que o mecanismo de provocação do exercício é diferente em comparação com metacolina (Bonsignore MR et al, 2008). Em outro estudo com utilização de farmacoterapia e farmacoterapia mais exercício Gunay et al, demonstraram que os níveis de LeE_4 , medidos em amostras de urina através da técnica ELISA, foram reduzidos tanto no grupo que recebeu farmacoterapia quanto no grupo farmacoterapia mais exercício, sem diferença significativa entre ambos ($p>0.05$) (Gunay O et al, 2012).

Um dos maiores problemas nas pesquisas clínicas com asmáticos, é o baixo número de indivíduos, colocando assim um questionamento se essas amostras são realmente representativas (Chandratilleke MG et al, 2012). Existem estudos demonstraram uma melhoria clinicamente significativa no controle da asma

utilizando o *Asthma Control Questionnaire* (ACQ) e melhorias na qualidade de vida utilizando o *Life Questionnaire* (AQLQ) após a aplicação de um programa de exercícios (Jartti T et al, 2012).

O *US Nurses' Health Study* dos EUA realizou um estudo através de seu banco de dados e demonstrou que em 2818 asmáticos que praticavam atividade física moderada, caminhada em ritmo acelerado por 20 minutos, três vezes por semana, pode ser associada a um menor risco de exacerbação da asma, independentemente da gravidade da asma e outras variáveis (Garcia-Aymerich J et al, 2009), este estudo demonstrou que houve uma relação dose-resposta; Quanto maior o nível de atividade física menor o risco de exacerbação da asma (Garcia-Aymerich J et al, 2009).

Em modelos animais diversos estudos tem demonstrado os benefícios do exercício físico aeróbio de baixa e média intensidade no processo inflamatório crônico das vias aéreas, reduzindo os níveis de mediadores pró-inflamatórios e pró-fibróticos, reduzir a eosinofilia no lavado bronco alveolar, diminuir a liberação de citocinas Th2, aumentar a liberação de IL-10, e reverter o remodelamento, densidade peribronquial de eosinófilos e linfócitos, expressão de peribronquial de IL-4 e IL-13, e edema das vias aéreas em animais treinados com inflamação crônica das vias aéreas comparados com animais sedentários com inflamação das vias aéreas (Vieira RP et al, 2007, Vieira RP et al, 2008, R.A. Silva, 2010, Vieira RP et al, 2011, Vieira RP et al, 2011, Olivoa et al, 2012). Outros estudos também relatam a redução da expressão de NF- κ B e diminuição de fatores de crescimento, nos quais é hipotetizado que podem estar envolvidos em processos anormais de reparo tecidual (Chung KF e Barnes PJ, 1999, Kumar A et al, 2004, Ram FS, 2005, Xisto DG et al, 2005, Barnes PJ, 2008, Carroll N e Sly P, 1999, Finkelman FD et al, 2010,).

1.6 – Leucotrienos

Os Leucotrienos (LTs) são importantes mediadores lipídicos envolvidos na asma, nas reações alérgicas e no sistema imune inato (Henderson WR et al, 1996 e Teal S. 2010). Os leucotrienos são alguns dos broncoconstritores mais potentes conhecidos e constituem mediadores importantes da inflamação nas vias respiratórias. Os fármacos que inibem a produção de leucotrienos ou a sua ligação a receptores desempenham um papel no tratamento da asma. (Kemp JP, 2009, Singh RK et al, 2010, Ago H et al, 2007). E podem ser divididos em duas classes: leucotrienos hemoatrativos Leucotrieno B₄ (LTB₄) e gerador de espasmos cistenil LTs (CysLTs: LTC₄, LTD₄, e LTE₄) também classificado como substâncias de reação lenta de anafilaxia (Ago H et al, 2007, Martinez MD et al, 2007).

O LTB₄ exerce uma forte ação quimioatrativa através dos receptores de alta afinidade LTB₄ receptor-1 (BLT1) nas células alvo, sendo rapidamente gerado a partir de células ativas do sistema imune inato como neutrófilos, macrófagos e mastócitos (Henderson R et al, 2002 e Ohnishi H et al, 2008).

Os LTs estão envolvidos nas fases inicial e tardia da reação asmática. Na fase inicial, são liberados juntamente com outros mediadores inflamatórios tais como IgE, PAF e superóxido (Singh RK et al, 2010, Watanabe S et al, 2009). Essa fase, quando não tratada, pode progredir para uma fase tardia caracterizada por edema perivascular, secreção de muco, infiltração da parede brônquica mediada por eosinófilos, monócitos e neutrófilos (Watanabe S et al, 2009, Aggarwal S et al, 2010).

Estudos recentes têm associado à relação entre variações genéticas e a via dos leucotrienos, susceptibilidade a asma, e resposta farmacológica ao tratamento da asma (Ago H et al, 2007 e Kemp JP et al, 2010). Os cistenil leucotrienos (CysLTs)

são uma família de potentes mediadores inflamatórios lipídicos, sintetizados a partir do ácido araquidônico por uma variedade de células incluindo mastócitos, eosinófilos, e basófilos (Singh RK et al, 2010).

O ácido araquidônico é transferido pela proteína ativadora 5-lipoxygenase para 5-lipoxygenase iniciando o processo de oxigenação do ácido araquidônico para o ácido 5(S)-hydroperoxyeicosatetraenoic (5S-HpETE), seguido pela desidratação do instável epóxido leucotrieno A4 (LTA4). A formação crítica da enzima do CysLTs (i.e., LTs C4, D4, e E4) da LTA4 é LTC4 sintase (LTC4S) que é parte da família das proteína ligadoras de membrana envolvidas nos metabolismos de eucosanóide e glutathiona, incluindo a proteína ativadora 5-lipoxygenase, *microsomal glutathione S-transferase* (MGST), e *microsomal prostaglandin synthase* (Martinez MD, 2007).

Cisteinil leucotrienos são gerados por eosinófilos, basófilos, mastócitos, macrófagos, e as células dendríticas mielóides em resposta à ativação (Kanaoka Y et al, 2004). Em cada tipo de célula, o ácido araquidônico é oxidado por 5-lipoxygenase (5-LO) para gerar o instável precursor leucotrieno A4(LTA4) (Malaviya R et al, 103), e subsequentemente, o leucotrieno C4 sintase (LTC4S) converte LTA4 à *parent cis-LT*, LTC4 (Lam BK et al, 104). Após a exportação dependente de energia a partir da célula (Lam BK et al, 1989), a LTC4 sequencialmente convertido para LTD4 (Carter BZ et al, 1998), e depois para as finais e mais estáveis dos cisteinil leucotrienos, LTE4 (Lee CW et al, 1983).

Assim, três diferentes tipos de cistenil leucotrienos (LTC4, LTD4, e LTE4) são gerados a partir de um único intracelular evento pelas sucessivas conversões enzimáticas. Em adição a esta intracelular via, há também um mecanismo intracelular para a geração de cistenil leucotrieno que pode ser realizada por células

que expressam LTC₄S, mas não a enzima proximal 5-LO na via (por exemplo, plaquetas, células endoteliais).

Neste último mecanismo, as células que expressam LTC₄S podem converter LTA₄ extracelular (lançado por neutrófilos ou outras células com uma enzima 5-LO ativo) e pode servir como uma fonte adicional de cistenil leucotrienos em certos estados inflamatórios. (Macclouf J et al, 1994) Em um estudo recente foi demonstrado que as plaquetas aderentes foram responsáveis por aproximadamente 60% da atividade LTC₄S e geração de cistenil leucotrienos por granulócitos de indivíduos com *aspirin exacerbated respiratory disease* (AERD), uma doença consistentemente associada com altos níveis de produção de cistenil leucotrienos (Laidlaw TM et al, 2012).

A bioatividade dos cistenil leucotrienos tem uma grande importância para prática clínica, em particular a sua potência como constritora das musculares lisas, estimulou o interesse nestes mediadores como potencial terapêutico alvo na asma. A capacidade de monitorar os níveis urinários de LTE₄ como um reflexo da sistêmica geração cistenil leucotrienos in vivo permitiram a prova de que cistenil leucotrienos são gerados por indivíduos com exacerbações agudas de asma (Laidlaw TM et al, 2012).

O papel dos cistenil leucotrienos na asma tem sido bem validado pelos ensaios clínicos utilizando as drogas disponíveis. O zileuton um inibidor de 5-LO, consegue reduzir a excreção urinária de cistenil leucotrienos em aproximadamente 50%, e antagonistas seletivo do receptor de cistenil leucotrienos 1 (CysLT₁) conseguem melhorar a função pulmonar e a frequência das exacerbações (Liu MC et al, 1996).

Embora grande parte do foco em leucotrienos na asma é sobre os cistenil leucotrienos, estudos recentes têm definido um importante papel do leucotrienos B4 (LTB4) em modelos experimentais de asma. LTB4 é formado a partir de LTA4 pela LTA4 hidrolase, enzima presente nos leucócitos. Receptores de alta afinidade e de baixa afinidade para o LTB4 designado BLT1 e BLT2 são receptores *G-protein-coupled*, que se encontram na superfície celular (Drazen JM et al, 1992 e Liu MC et al, 1996). A expressão do receptor BLT1 é restrita a leucócitos incluindo células T efectoras e é altamente específico para LTB4, enquanto o receptor BLT2 é expresso em diversas células. Recentemente, ambos os receptores BLT1 e BLT2 foram identificados em vias aéreas humanas nas células do músculo liso (Liu MC et al, 1996). O ligante endógeno para BLT2 é o *12(S)-hydroxyheptadeca-5Z,8E, 10E-trienoic acid (12S-HHT)* (Laidlaw TM e Boyce JA, 2012)

1.7 - Exercício Físico e Broncoconstrição

Um importante papel dos leucotrienos foi identificado na broncoconstrição induzida por exercício (BIE) (Jonathan M et al, 2013), uma condição caracterizada pela falta de ar e tosse devido à broncoconstrição que pode durar de 30-90 minutos após períodos de exercício físico. Existem estudos demonstrando que dentre os asmáticos 40-50% (Cabral AL et al, 1999) e outros demonstrando entre 70-80% (Jeffrey M et al, 1999) dos pacientes apresentam broncoconstrição induzida por exercício quando expostos a testes físicos (Cabral AL et al, 1999 e Jeffrey M et al, 1999).

As razões para essa discrepância podem ser resultado de uma variação na mensuração da broncoconstrição induzida por exercício, variação no limiar para determinar um teste positivo e a população testada. O tipo, duração e intensidade do

exercício e condições ambientais também são fatores fundamentais que podem afetar os resultados dos testes (Pakhale S et al, 2013).

Em recente revisão de literatura por Pakhale et al, o efeito do treinamento físico na inflamação das vias aéreas ainda não é totalmente comprovado e compreendido (Luks V et al, 2013 e Gunay O et al, 2012), entretanto evidências que sugerem que o exercício físico possa reduzir a inflamação da via aeres de asmáticos, dessa forma a atividade física se apresenta como um tratamento acessível, de baixo custo, com outros benefícios a saúde, não invasivo e prazeroso da asma (Gunay O et al, 2012 e Pakhale et al, 2013), em animais os benefícios da asma incluem a diminuição da eosinofilia no lavado broncoalveolar, diminuição das citocinas Th2, aumento da IL-10, e reversão do remodelamento das vias aéreas em treinados asmáticos comparado com seus pares sedentários (Luks et al, 2013).

Em complemento, existe uma diminuição da expressão de proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), um potente estimulador da liberação de histamina e leucotrienos nas vias aéreas de humanos (Chung KF e Barnes PJ, 1999 e Normando VMF et al, 2013).

Asmáticos com broncoconstrição pós-exercício tem uma concentração maior de células epiteliais no escarro induzido além de níveis elevados de cistenil leucotrienos (Hallstrand TS et al, 2005 e Carraro S et al, 2005). Além disso, esses níveis permanecem elevados de 30 minutos à 6 horas após o desafio com exercícios físicos (Hallstrand TS et al, 2005 e Mickleborough TD, 2005). A Liberação de LTB4 também foi identificada após o desafio de exercício em alguns estudos (Mickleborough TD, 2005), mas não todos os estudos (Hallstrand TS et al, 2005).

Estes resultados podem explicar parcialmente os resultados onde ocorre a liberação de MUC5AC em vias respiratórias após desafios com exercícios está

associada com o nível cistenil leucotrieno, que por sua vez está associado com o nível de neuroquinina A, uma vez que a secreção de taquiquininas é para ser um evento importante na desgranulação das células caliciformes (Hallstrand TS et al, 2007).

Existem evidências de que os antagonistas dos receptores CysLT1 e inibidores de 5-LO reduzem a gravidade da broncoconstrição pós exercício tanto na administração a curto prazo quanto na utilização crônica como tratamento para a asma (Hallstrand TS et al, 2006). Em 2007, nos EUA a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o montelucaste, antagonista de CysLT1, para a prevenção do BIE em pacientes com 15 anos de idade ou mais com base em estudos que demonstram a eficácia para a prevenção de BIE quando utilizada uma única dose de 10mg 2 horas antes do (Pearlman DS et al, 2006 e Philip G et al, 2007).

Em pacientes adultos que apresentam BIE, o montelucaste reduziu significativamente a gravidade da broncoconstrição com administrações 2 horas, 12 horas e 24 horas após uma única dose com base na diminuição máxima e melhorou a recuperação pós-exercício do BIE (Pearlman DS et al, 2006). Um segundo estudo mostrou uma eficácia semelhante em 2 horas após uma única dose de montelucaste em comparação com o placebo, mas não conseguiu mostrar uma diferença estatisticamente significativa com 12 horas e 24 horas (Philip G et al, 2007).

Em crianças que apresentam BIE e que estavam utilizando corticosteroides inalados a gravidade do BIE foi reduzida em relação ao placebo no grupo 12 horas após uma única dose, mas não dos grupos 2 horas e 24 horas (Peroni DG et al, 2002). Um estudo recente demonstrou também o efeito do antagonista do receptor de cistenil leucotrieno 1 como aditivo ao salmeterol β_2 -agonista inalado na redução

da resposta das vias aéreas ao respirar ar frio após uma única de estas drogas (Coreno A, 2005).

Existem diversas revisões demonstrando a segurança e eficiência do exercício físico de intensidade, duração e frequências adequadas para o tratamento da asma tanto em modelo animal quanto humano (Ries, AL et al, 2007, Nici, L et al, 2006, Holland, AE e Hill, CJ, 2011, Woods JÁ et al, 2006), mas até o presente momento nenhum artigo investigou as possíveis alterações na via dos leucotrienos.

2. OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo é avaliar se os efeitos antiinflamatórios do TFA leve em um modelo experimental de asma é mediado por alterações nos níveis de CysLTs ou Ltb₄, ou por alterações na expressão de sintases de leucotrienos, 5-lipoxygenase (5-LO) ou LTC(4) sintase.

2.2 – Objetivos Específicos

2.2.1 - Avaliar os efeitos do TFA sobre a inflamação alérgica crônica das vias aéreas num modelo experimental de asma.

2.2.2 - Avaliar os efeitos do TFA sobre o remodelamento das vias aéreas num modelo experimental de asma.

2.2.3 - Avaliar os efeitos do TFA sobre a expressão das sintases de leucotrienos, LTA₄ hidrolase (Lta₄h), leucotrieno C₄ (Ltc₄), cisteinil leucotrieno 1(Cyslt₁), cisteinil leucotrieno 2 (Cyslt₂), leucotrieno B₄ (Ltb₄r₂) e 5-lipoxygenase (5-Lo).

2.2.4 - Avaliar os efeitos do TFA sobre a expressão de leucotrieno B₄ (Ltb₄r₂) e cisteinil leucotrieno 2 (Cyslt₂) no homogenato pulmonar.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Animais

Foram utilizados 80 camundongos machos da linhagem C57Bl/6, adultos jovens, com 06-08 semanas de idade, pesando aproximadamente 15-20g. Os animais foram obtidos do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e mantidos em condições controladas de temperatura (22-25°C) e luminosidade (ciclo 12h claro/12h escuro), e 70% de umidade relativa, na Universidade Nove de Julho. A alimentação constou de água e ração (Purina Labina®, São Paulo, Brasil) “*ad libitum*”.

Os estudos aqui apresentados foram aprovados pelo Comitê da Universidade Nove de Julho (Protocolo de Pesquisa número AN0021_2013 aprovado no dia 21 de novembro de 2013).

3.2 – Protocolo Experimental

Foram utilizados 80 animais C57BL/6 separados em 4 grupos: Controle (n = 20), Exercício (n = 20), Ova (n = 20) e Ova + Exercício (n = 20).

3.3 – Sensibilização e Desafio dos Animais

O modelo de “asma” (inflamação pulmonar alérgica crônica) será induzido através de injeção intra-peritoneal com OVA (20µg/animal) diluída em soro fisiológico (NaCl 0,9%), na proporção de 1g/10ml, correspondendo a 20µg/OVA/animal nos dias 0, 14, 28 e 42, seguidos por inalação com solução de ovalbumina (1%) três vezes por semana, 30min por sessão, a partir do dia 21 até o dia 53 do protocolo experimental.

Para a realização da inalação, os camundongos foram colocados numa caixa de acrílico (30 x 15 x 20 cm) acoplada a um nebulizador ultrassônico (modelo Pulmoclear II Luxo, marca Soniclear®, SP, Brasil) e submetidos à inalação de um aerosol de OVA preparada conforme descrito acima. Os animais não sensibilizados foram receberam injeções intraperitoniais e foram inalados com soro fisiológico.

3.4 – Treinamento Aeróbio e Teste Físico

O treinamento físico aeróbio foi realizado em esteira ergométrica adaptada para camundongos (modelo KT 400, marca Imbramed®, RS, Brasil), por um período de 04 semanas. Na semana anterior ao início do treinamento, os animais foram submetidos a 03 dias de adaptação na esteira ergométrica que constava de 15 minutos de atividade a uma velocidade de 0,3Km/h. Quarenta e oito horas após o terceiro dia de adaptação, os animais foram submetidos a um teste de esforço máximo. O teste consistiu de 05 minutos de aquecimento a uma velocidade de 0,3Km/h que era aumentada em 0,1Km/h a cada 2,5 minutos até a exaustão dos animais. Os animais foram considerados exaustos quando não conseguiam permanecer correndo mesmo após 10 estímulos mecânicos.

A partir dos resultados do teste foram calculadas a intensidade média dos grupos Exercício e Asma e Exercício para prescrição do treinamento aeróbio de intensidade leve. O treinamento foi realizado 05 vezes por semana, 60 minutos por sessão, durante 04 semanas. Após este período, o teste físico foi repetido com o intuito de reavaliar o condicionamento físico dos animais.

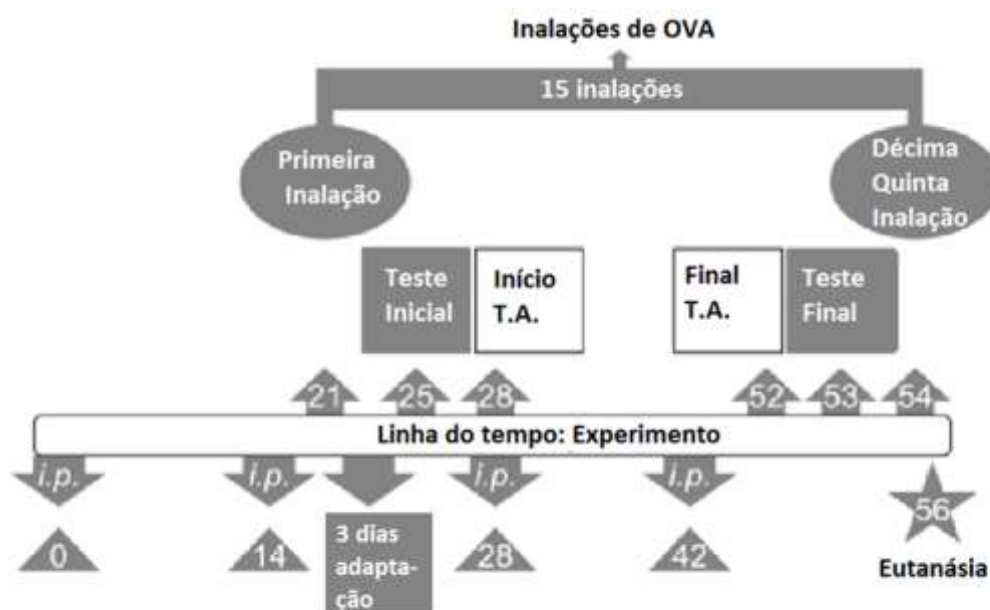


Figura 1. Modelo Experimental

3.5 – Avaliação da Responsividade Brônquica

Um grupo de 5 animais que cada grupo experimental foi utilizado somente para a avaliação da responsividade brônquica.

Vinte quatro horas após a última inalação com OVA ou salina, a responsividade brônquica para metacolina (MCh) foi avaliada em camundongos conscientes usando um sistema de pletismografia de corpo inteiro com fluxo (Buxco Europe, Winchester, Reino Unido).

A literatura demonstra que o Penh tem uma relação teórica com a obstrução das vias aéreas (135). Portanto, a hiperresponsividade brônquica foi avaliada utilizando os valores calculados do Penh como um índice. As medidas basais foram tomadas durante três minutos após a ambientação dos animais. Uma média das medidas foi calculada para este intervalo. Em seguida os camundongos foram expostos à nebulização de solução fisiológica 0,9% por 03 minutos, seguidos pela nebulização das seguintes concentrações de metacolina (6,25, 12,5, 25,0, 50,0

mg/ml). As medidas foram obtidas por 05 minutos (sendo 03 minutos durante a nebulização e 02 minutos após). Os valores do Penh foram calculados como a média de aproximadamente 25 ciclos respiratórios, e as médias dos valores cumulativos foi expressa para cada concentração (Roorda RJ et al, 1994).

3.6 – Coleta e Análise do Soro do Sangue

Foi realizada uma incisão de 3-4 cm na linha mediana do abdômen do animal. Foi então coletada uma amostra de sangue (01ml) na via veia cava inferior utilizando seringa (01ml) e agulha (12,7mm x 0,33mm). As amostras de sangue foram centrifugadas (5000 rpm, 4°C) e o soro aliquotado e armazenado a – 20°C para análises via ELISA.

3.7 – Coleta e Análise do Lavado Broncoalveolar (LBA)

Os animais foram anestesiados com uma solução de Cloridrato de Cetamina (Quetamina) e Cloridrato de Xilazina (Xilazina), Quetamina 100mg/kg e Xilazina 10mg/kg. Os animais foram traqueostomizados e canulados. Os pulmões foram lavados com 1,5ml (03 x 0,5ml) de soro fisiológico estéril (NaCl 0,9%) e 1,0ml de LBA foi recuperado. Este volume foi então centrifugado (1000rpm, durante 7 minutos) a 04°C, e o sobrenadante coletado e armazenado a –20°C para análises futuras via método de ELISA.

O botão de células foi ressuspensionado em 1,0ml de soro fisiológico estéril (NaCl 0,9%) e utilizado para avaliação do número de células total e diferencial. Dez microlitros foram utilizados para a contagem total com corante azul de tripano e cem microlitros foram utilizados para realizar a contagem diferencial após centrifugação (05 min, 450 rpm) (modelo Cytospin-2, *Shandon Instruments*, Sewickley, PA) e

fixação em lâminas com o corante Grün-wald-Giemsa. Foram contadas 300 células por lâmina.

3.8 – Histoquímica e Imunohistoquímica

Imediatamente após a coleta do LBA e do sangue, o pulmão esquerdo do animal foi perfundido com 1 ml de formol 10% durante 24 horas. Após esse período, os pulmões foram cortados no seu maior eixo e foram submetidos a processamento histológico de rotina.

3.8.1 – Histoquímica

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

- Hematoxilina e Eosina - coloração utilizada para avaliação do índice da espessura da musculatura lisa da via aérea.
- Resorcina Fucsina de Weigert com Oxidação – coloração utilizada para avaliação da proporção de volume de fibras elásticas nas vias aéreas, nos vasos e no parênquima pulmonar .
- Picrossírius – coloração utilizada para avaliação da proporção de volume de fibras colágenas nas vias aéreas .
- Ácido periódico de Schiff – coloração utilizada para avaliação do muco.

Foram analisadas 05 vias aéreas de cada animal, avaliados num aumento de 400x, a proporção de volume de fibras de músculo liso, de fibras colágenas, de fibras elásticas e muco foram calculadas como a proporção do número de pontos que incidiram sobre de músculo liso, de fibras colágenas, de fibras elásticas e muco pelo

número de pontos que incidiram na parede das vias aéreas. Os resultados foram expressos em porcentagem.

3.8.2 – Imunohistoquímica

Cortes de tecido colocados em lâminas silanizadas (Sigma Chemical Co.; St. Louis, Missouri, EUA) foram inicialmente desparafinadas e hidratadas e submetidas aos seguintes procedimentos:

Recuperação antigênica:

A recuperação dos sítios antigênicos foi realizada em alta temperatura com solução tampão de ácido cítrico 10mM pH 6 À 95 graus Celsius por 30 minutos, ocorrendo o resfriamento por 20min.

Bloqueio da Peroxidase Endógena

O bloqueio da peroxidase endógena presente nas hemácias é feito com 3 banhos de 5 minutos de água oxigenada 10v (3%), sendo lâminas em seguida lavadas com água corrente, água destilada e tampão salino (PBS)

Bloqueio de Proteínas Inespecíficas

Foi realizado através da imersão das lâminas em solução de caseína (0,5%) em tampão de fosfato pH 7,4 por 5min. em temperatura ambiente e colocadas posteriormente em solução tampão salino (PBS)

Incubação

A incubação foi realizada por 24 horas à 4 graus Celsius com os anticorpos primários diluídos em 0,1% de albumina de soro bovino (BSA). Posteriormente lavadas por duas vezes de 5min. em solução salino (PBS) e incubadas com anticorpo secundário por 30min. Após as lâminas foram lavadas em tampão (PBS) e incubadas com cromógeno Diaminobenzidina (DAB) (sigma-Aldrich Chemie,

Steinheim, Alemanha) por 10min, lavados em água corrente por 10min. e contra-colorados com Hematoxilina de Harris (merck, Darmstadt, Alemanha) por 2min.

Foram utilizados os anti-corpos Lta4h (C-21) SC-23070, Ltc4 (Y-13)-R: SC-22566-R, Cyslt2 (A-14):sc-27918, Cyslt1 (C-16): SC-31172, Ltb4r2(H-49):sc-98841 e 5-Lo(N-19):SC-8885, utilizados de acordo com as orientações do fabricante (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)

Para avaliar a expressão dos anti-corpos nas células inflamatórias peribrônquicas foram analisadas 05 vias aéreas de cada animal, avaliados num aumento de 400x. A área utilizada para a avaliação da densidade de células inflamatórias foi calculada a partir do número de pontos que incidiam na parede das vias aéreas (localizados entre o músculo e a adventícia). A densidade de células foi determinada como o número de células positivas em cada campo, dividido pela área de tecido. A densidade de células foi expressa em células/mm².

Para avaliar a expressão dos anti-corpos no epitélio brônquico, foram analisadas 05 vias aéreas de cada animal, avaliados num aumento de 400x, e foi calculado a proporção do volume de pontos expressando os respectivos anti-corpos pelo número de pontos que incidiram na parede das vias aéreas. Os resultados foram expressos em porcentagem.

3.9 – Análise Estatística

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

One-way ANOVA on Ranks seguido pelo teste de Dunn's para a comparação entre os grupos. Os níveis de significância foram ajustados para 5% ($p < 0.05$). Os gráficos foram elaborados utilizando-se o software GraphPad Prism 3.1 (Califórnia, EUA). Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão (dados paramétricos) e como box plot (dados não paramétricos).

4. Resultados

4.1 - Efeitos do TFA sobre a hiperresponsividade pulmonar

A avaliação da hiperresponsividade pulmonar através da pletismografia de corpo inteiro.

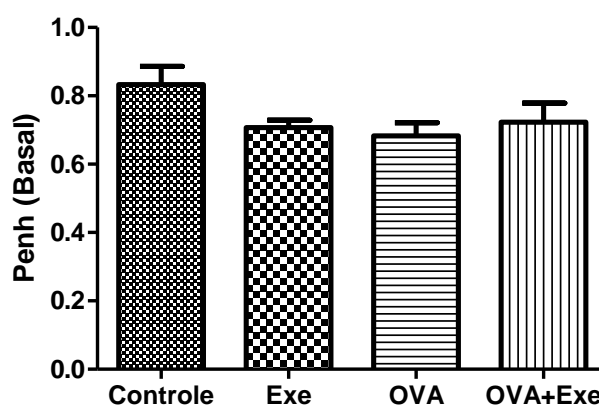


Figura 2. Efeitos do TFA sobre a hiperresponsividade brônquica em níveis basais

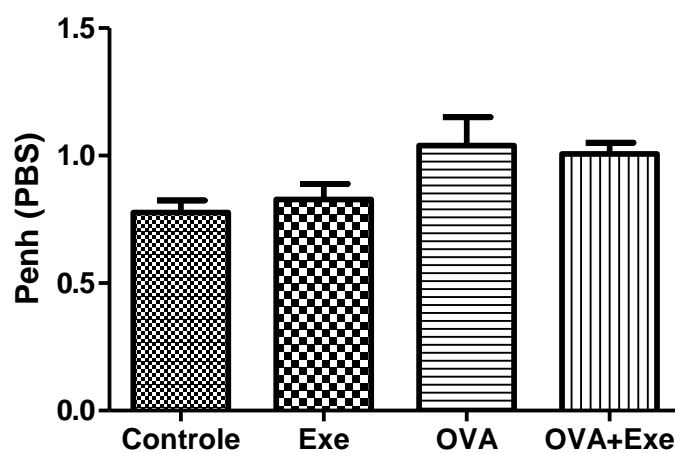


Figura 3. Efeitos do TFA sobre a hiperresponsividade brônquica com expostos à nebulização de PBS.

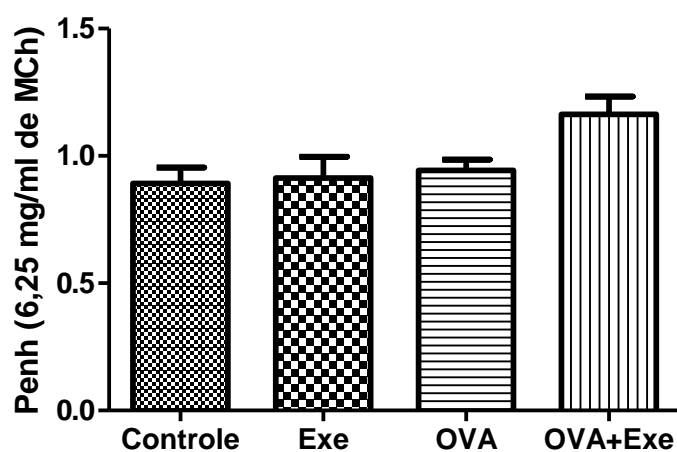


Figura 4. Efeitos do TFA sobre a hiperresponsividade brônquica expostos à nebulização de 6,25 mg/ml de MCh.

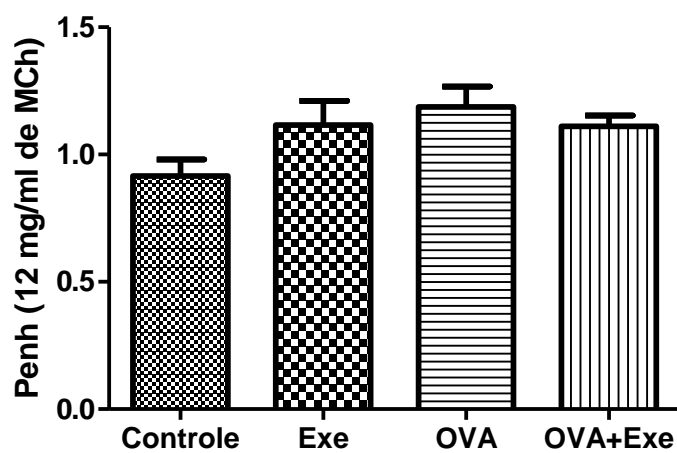


Figura 5. Efeitos do TFA sobre a hiperresponsividade brônquica expostos à nebulização de 12 mg/ml de MCh.

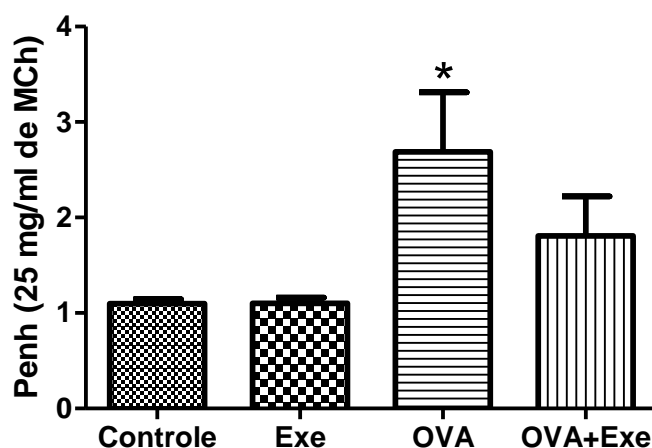


Figura 6. Efeitos do TFA sobre a hiperresponsividade brônquica expostos à nebulização de 25 mg/ml de MCh. * $p < 0,05$ quando comparado aos demais grupos.

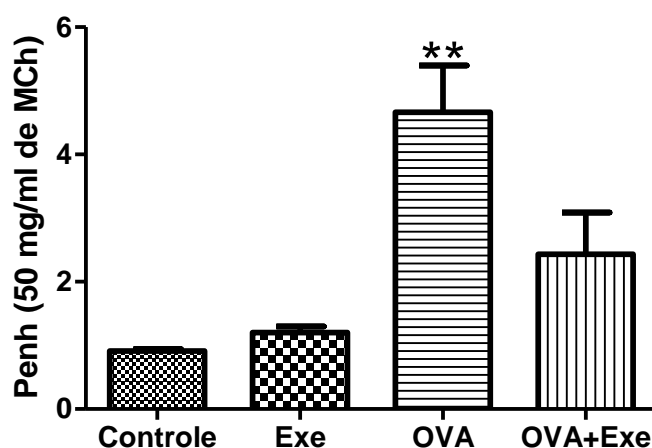


Figura 7. Efeitos do TFA sobre a hiperresponsividade brônquica expostos à nebulização de 50 mg/ml de MCh.. ** $p < 0,01$ quando comparado aos demais grupos.

A hiperresponsividade brônquica foi avaliada pela inalação dos animais com PBS e doses crescentes de metacolina (de 6,25 a 50 mg/ml) (Figuras 2-5). Os animais de todos os grupos não apresentaram diferença significativa no nível Basal e com inalações de PBS, 6,25 mg/ml MCh, 12 mg/ml MCh. Quando submetidos a inalações de 25mg/ml(figura 6) o grupo Ova apresentou diferença($p < 0,05$) em

relação a todos os grupos e com 50mg/ml(figura 7) também apresentou diferença($p<0,01$) em relação a todos os grupos.

De maneira geral, com doses mais elevadas de MCh o exercício físico no animal Ova+Exe se mostrou eficiente para diminuir a hiperresponsividade brônquica de maneira significativa quando comparado ao animal do grupo Ova, mas mantendo-se mais elevada em relação ao grupo não sensibilizado e desafiados, Controle e Exe.

4.2 - Efeitos do TFA sobre a inflamação alérgica crônica das vias aéreas

Essa avaliação já foi realizada através da medida do número de células totais, diferenciais e citocinas no lavado broncoalveolar. Citocinas no LBA e soro. E medida do número de células diferenciais também no espaço peribrônquico.

4.2.1 - Inflamação pulmonar no LBA

O grupo OVA apresentou um aumento do número total de células, bem como de eosinófilos, linfócitos, neutrófilos e macrófagos quando comparado aos demais grupos. O treinamento físico aeróbio, por sua vez, atenuou significativamente tanto o número total como a contagem diferencial de células ($p<0,05$) (Figuras 8-12).

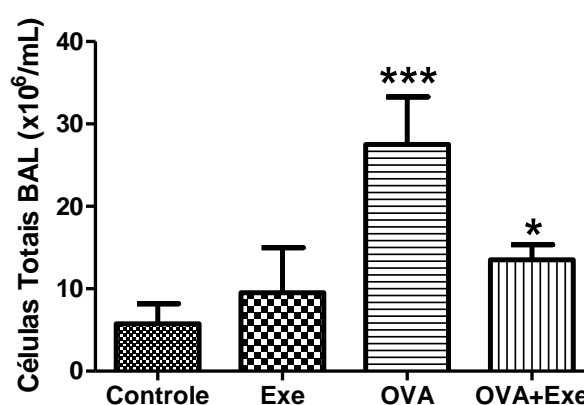


Figura 8. Efeitos do TFA sobre o número total de células no LBA. *** $p<0,001$ quando comparado ao grupo controle; * $p<0,05$ quando comparado ao grupo OVA.

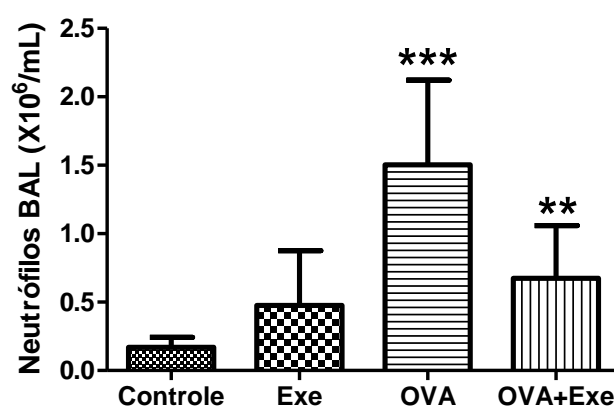


Figura 9. Efeitos do TFA sobre o número de neutrófilos no LBA. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle; ** $p < 0,05$ quando comparado ao grupo OVA.

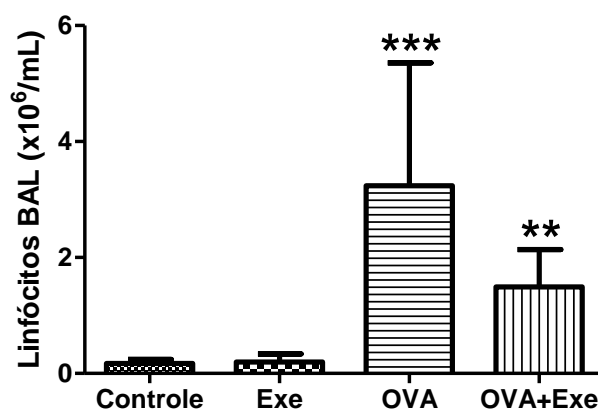


Figura 10. Efeitos do TFA sobre o número linfócitos no LBA. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle; ** $p < 0,05$ quando comparado ao grupo OVA.

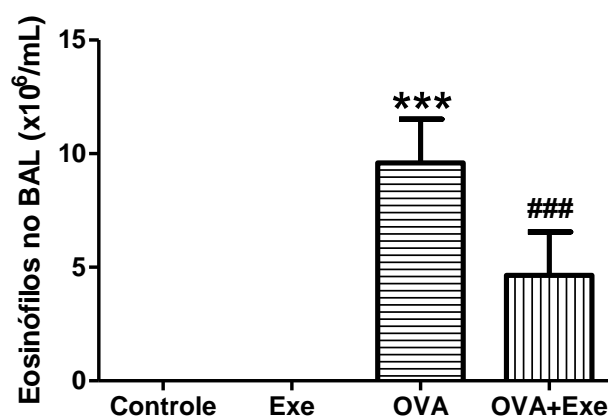


Figura 11. Efeitos do TFA sobre o número eosinófilos no LBA. *** $p < 0,001$ quando comparado aos demais grupos; ### $p < 0,001$ quando comparado ao grupo OVA.

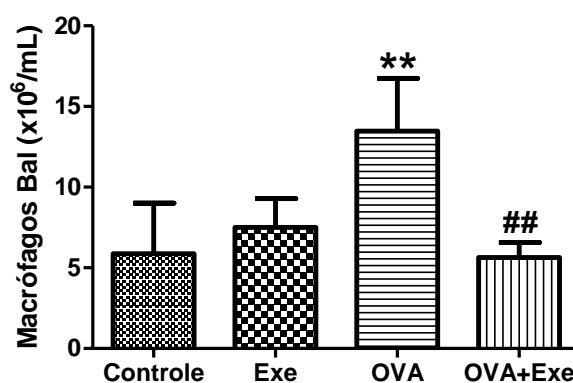


Figura 12. Efeitos do TFA sobre o número macrófagos no LBA. ** $p < 0,05$ quando comparado aos demais grupos; ## $p < 0,05$ quando comparado ao grupo OVA.

O número de células totais no lavado broncoalveolar do grupo Ova foi significativamente aumentado quando comparado ao grupo controle, Exe e Ova+Exe ($p < 0.001$) Mostrando que o treinamento físico modulou a migração de células inflamatórias para o pulmão (figura 8).

Na contagem diferencial ocorreu diferença significativa entre o grupo Ova e os demais grupos nos níveis de neutrófilos($p<0.01$) (figura 9), linfócitos($p<0.01$) (figura 10), eosinófilos ($p<0.01$) (figura 11) e macrófagos($p<0.05$) (figura 12).

Um importante dado foi a capacidade do exercício físico de reduzir o número de eosinófilos no lavado bronco alveolar, visto que a migração de eosinófilos para o pulmão é uma das características fundamentais da inflamação crônica gerada pela asma.

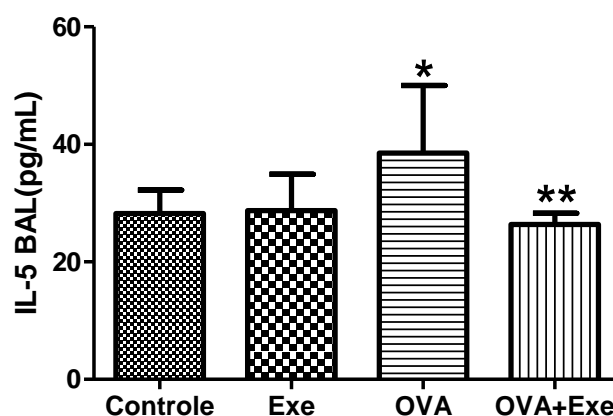


Figura 13. Efeitos do TFA sobre os níveis de IL-5 no LBA. Os valores estão expressos como média dos grupos, e as barras representam o desvio padrão * $p<0,05$, quando comparado ao grupo controle; ** $p<0,05$ quando comparado ao grupo OVA.

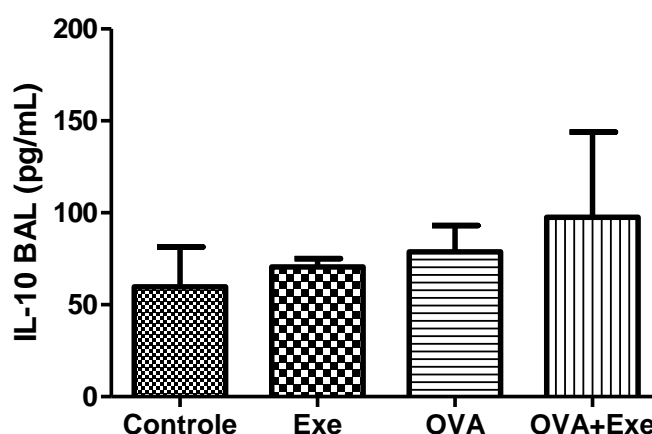


Figura 14. Efeitos do TFA sobre os níveis de IL-10 no LBA. Os valores estão expressos como média dos grupos, e as barras representam o desvio padrão.

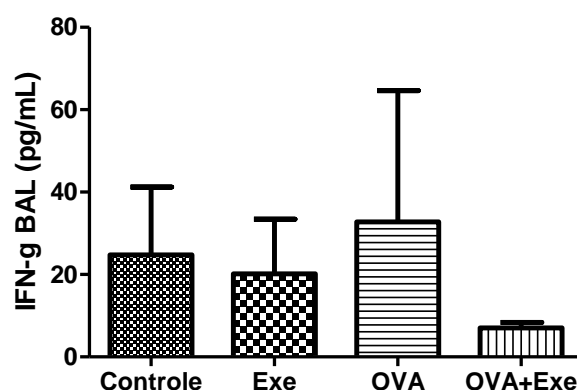


Figura 15. Efeitos do TFA sobre os níveis de IFN-gamma no LBA. Os valores estão expressos como média dos grupos, e as barras representam o desvio padrão.

As figuras 13, 14 e 15 representam os níveis de IL-5, IL-10 e IFN-gamma (respectivamente) obtidos do lavado broncoalveolar. A exposição à OVA aumentou os níveis de IL-5 quando se comparam os grupos OVA e Controle ($p < 0,05$), mas diminuiu no grupo OVA+Exe quando comparado ao grupo OVA ($p < 0,05$) (Figura 13).

Resultado similar ao apresentado em outras pesquisas já realizadas por nosso grupo (Vieira RP et al, 2007 e Vieira RP et al, 2011) . Em contrapartida ao analisar os níveis de IL-10 e IFN-gamma, os grupos não apresentaram diferença estatisticamente significativa (Figura 14 e 15).

4.2.2 - Citocinas no Soro

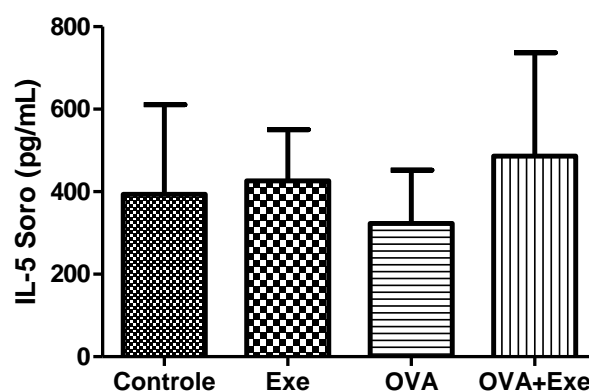


Figura 16. Efeitos do TFA sobre os níveis de IL-5 no soro. Os valores estão expressos como média dos grupos, e as barras representam o desvio padrão.

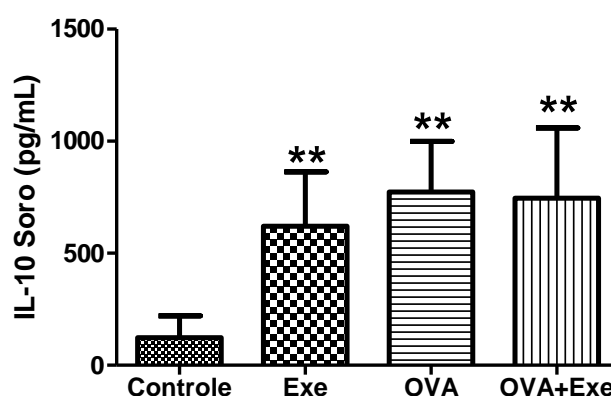


Figura 17. Efeitos do TFA sobre os níveis de IL-10 no soro. Os valores estão expressos como média dos grupos, e as barras representam o desvio padrão
 ** $p < 0,05$, quando comparado ao grupo controle.

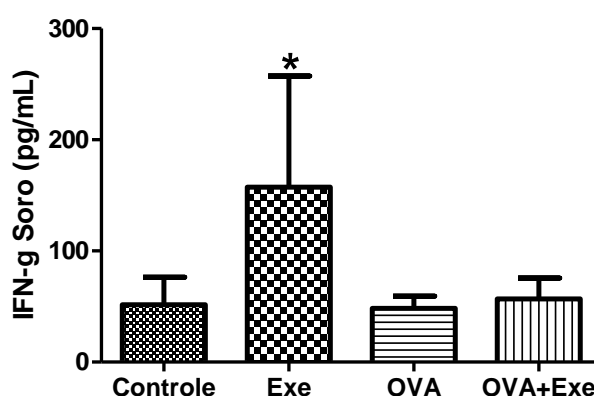


Figura 18. Efeitos do TFA sobre os níveis de IFN-g no soro. * $p < 0.05$ quando comparado a todos os demais grupos.

Na análise dos níveis da citocina IL-5 no soro sanguíneo os grupos não apresentaram diferença significativa (Figura 16). Ao analisar os níveis de IL-10 no soro todos os grupos apresentaram um aumento significativo ao serem comparados com o grupo controle ($p < 0.05$) (Figura 17). Simultaneamente, existe diferença estatística nos níveis de IFN-gama quando os grupos são comparados ao grupo exercício ($p < 0.05$) (Figura 18).

4.2.3 - Inflamação pulmonar no espaço peribrônquico

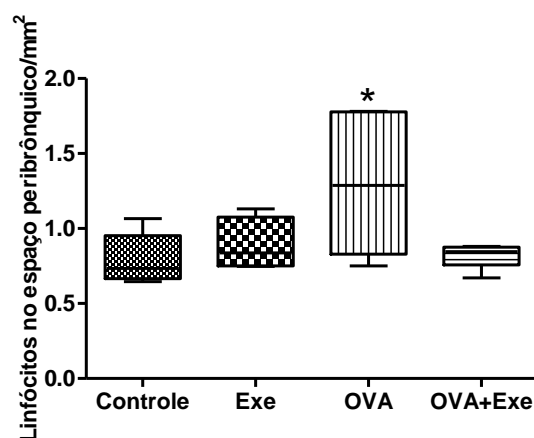


Figura 19. Efeitos do TFA sobre o número de linfócitos no espaço peribrônquico.

* $p < 0.05$ quando comparado a todos os demais grupos.

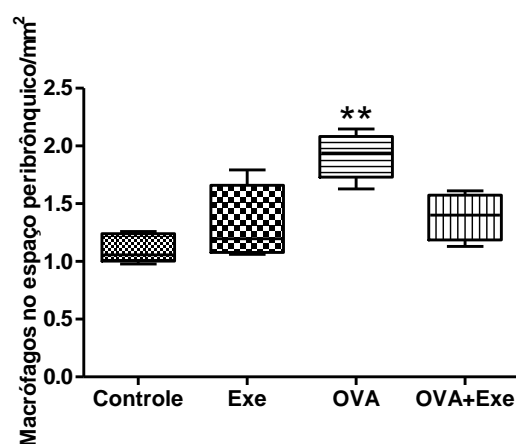


Figura 20. Efeitos do TFA sobre o número de macrófagos no espaço peribrônquico.

** $p < 0.01$ quando comparado a todos os demais grupos.

Foi possível observar uma redução significativa ($p < 0,05$) no número de linfócitos no espaço peribrônquico (figura 19) e no número de macrófagos ($p < 0,01$) no espaço peribrônquico (figura 20). Mas não foi possível encontrar níveis

significantes de neutrófilos e eosinófilos no espaço peribrônquico para que fosse possível realizar uma comparativo entre os grupos (dados não mostrados).

4.3 - Efeitos do TFA sobre o remodelamento das vias aéreas

Lâminas contendo cortes histológicos de 05µm foram submetidas aos seguintes procedimentos.

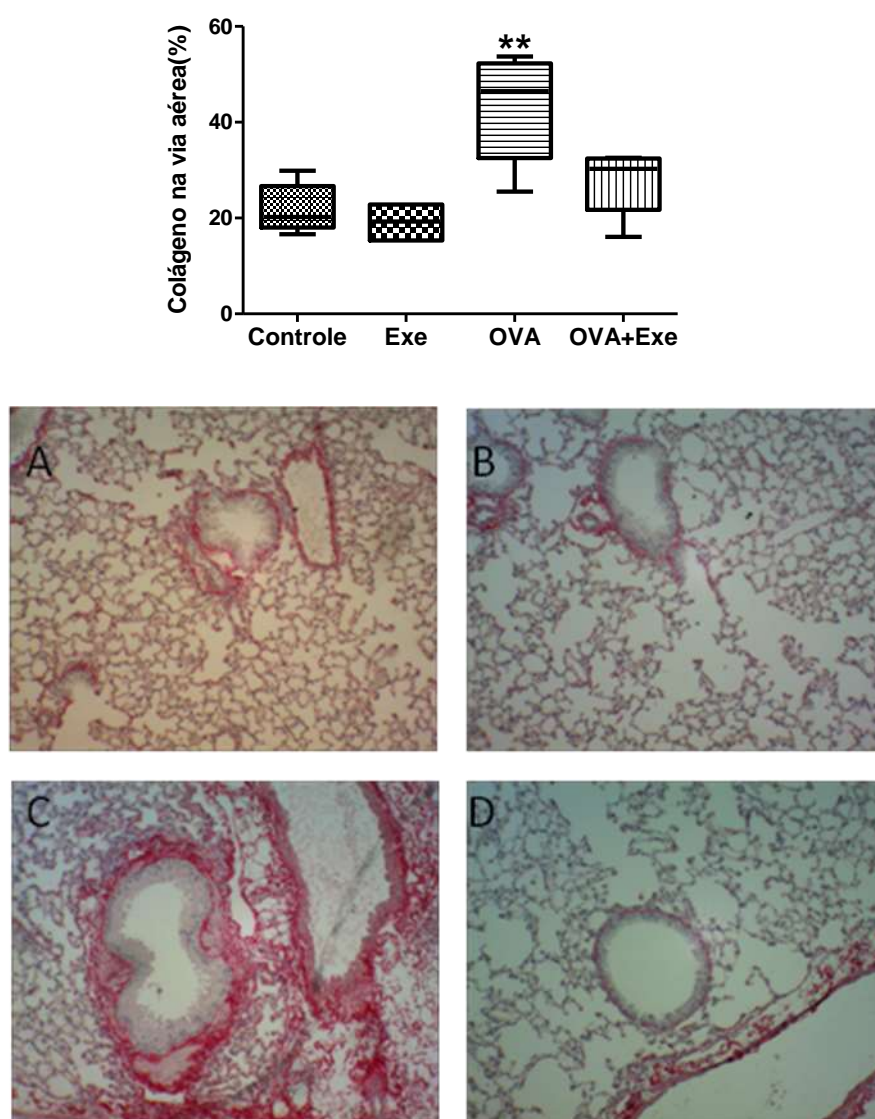


Figura 21. Efeitos do TFA sobre a porcentagem de fibras colágenas na parede das vias aéreas. ** $p < 0.01$ quando comparado a todos os demais grupos. Imagem: A=controle, B=exercício, C=asma, D=asma=exercício

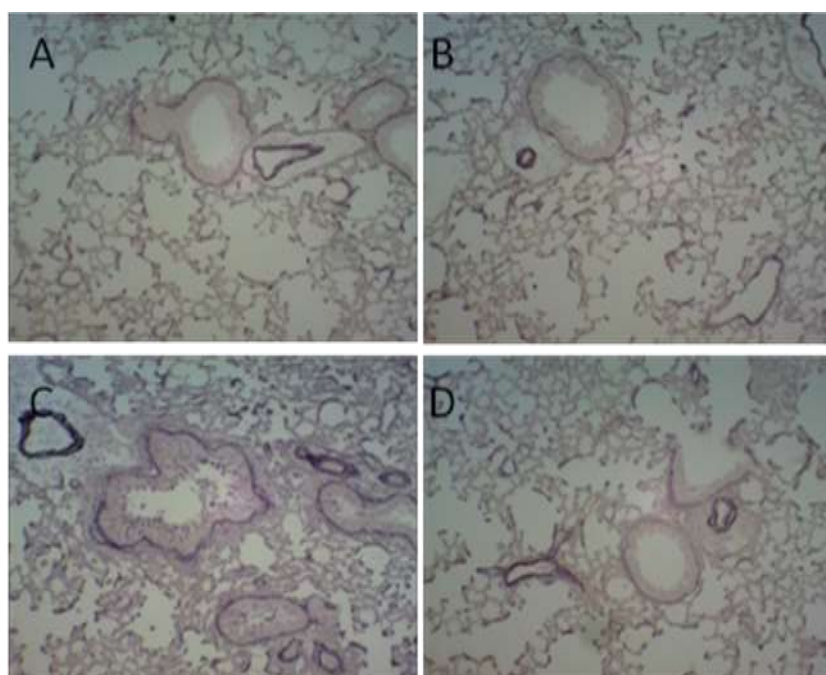
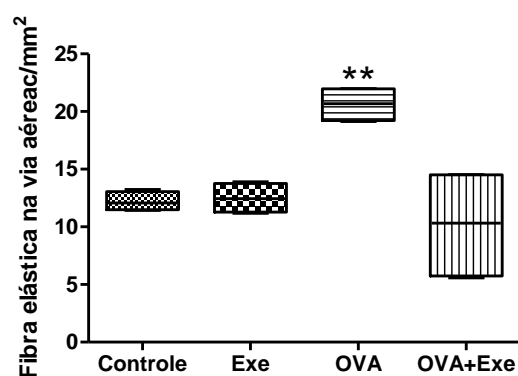


Figura 22. Efeitos do TFA sobre a porcentagem de fibras elásticas na parede das vias aéreas. ** $p < 0.01$ quando comparado a todos os demais grupos. Imagem: A=controle, B=exercício, C=asma, D=asma=exercício

O treinamento físico em animais não sensibilizados não modificou a proporção de volume de fibras colágenas e elásticas nas vias aéreas (respectivamente, figuras 21 e 22). A sensibilização no grupo OVA aumentou significativamente a proporção de volume de fibras colágenas ($p < 0,01$) e elásticas nas vias aéreas ($p < 0,01$) quando comparado aos grupos não sensibilizados e também em relação ao grupo Ova+Exe. Demonstrando que o aumento na deposição

de colágeno e fibras elásticas foram totalmente inibidos pelo exercício físico, mantendo níveis similares aos encontrados em animais não sensibilizados e desafiados.

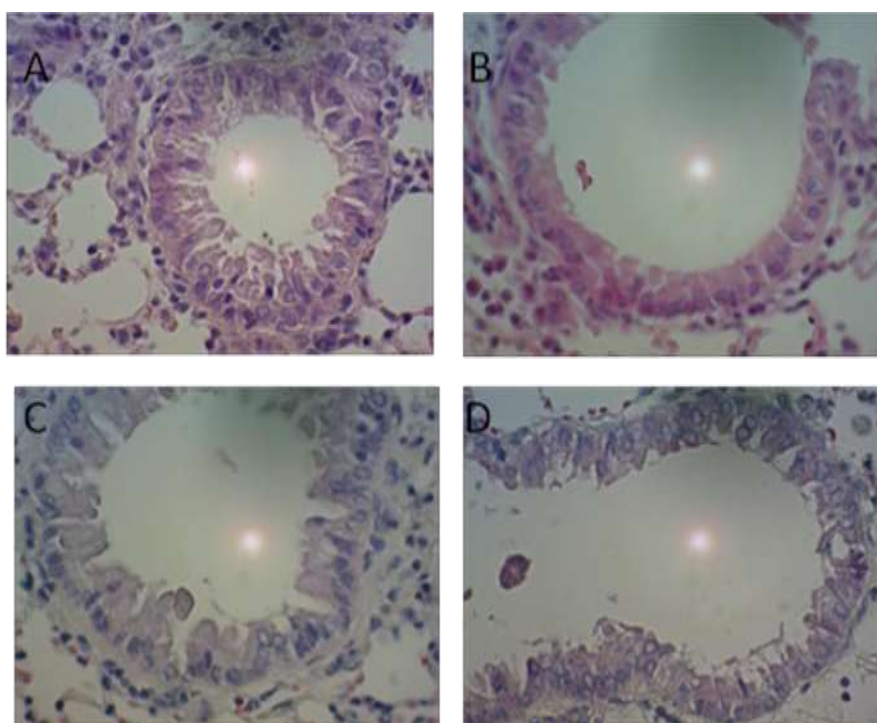
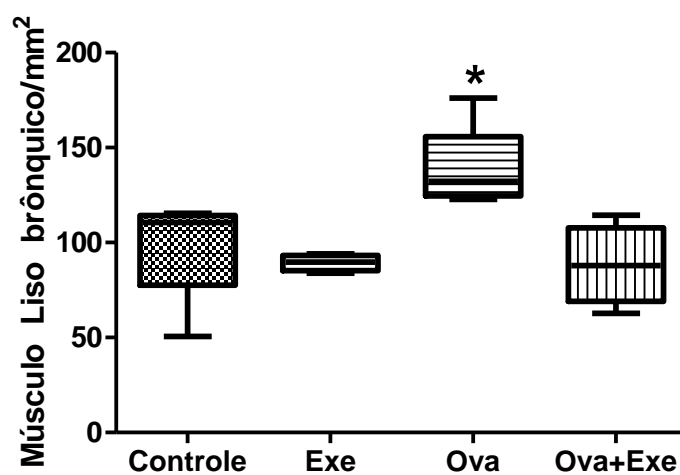


Figura 23. Efeitos do TFA sobre a musculatura lisa na parede das vias aéreas.

* $p < 0.05$ quando comparado a todos os demais grupos. Imagem: A=controle, B=exercício, C=asma, D=asma=exercício

A redução da espessura da musculatura lisa corrobora com pesquisas realizadas anteriormente em nosso laboratório. Mostrando um significativo aumento da musculatura lisa brônquica nos animais sensibilizados do grupo ova($p<0,05$) em comparação com os demais grupos, demonstrando que o exercício físico inibiu de alguma forma a hipertrofia e hiperplasia muscular brônquica. Isso corrobora com a ação dos Cistenil Leucotrienos, nos quais tem uma potente ação bronconstritora, o que levaria a um aumento da musculatura lisa brônquica(Laidlaw TM et al, 2012).

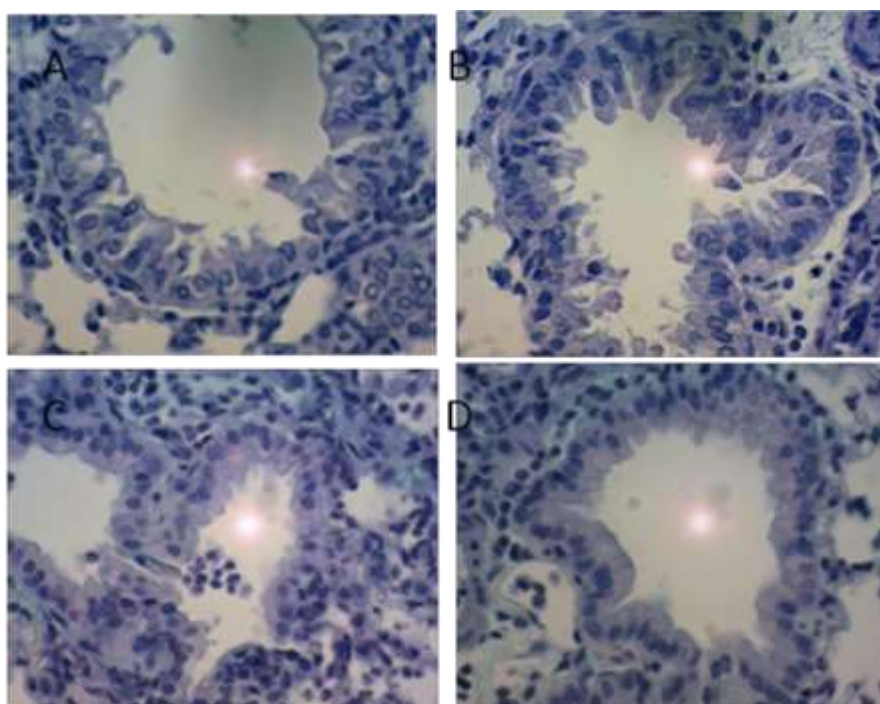
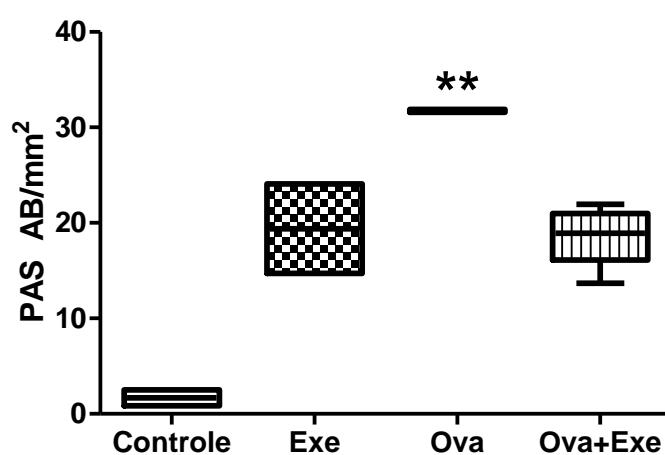


Figura 24. Efeitos do TFA sobre os níveis de muco das vias aéreas. $**p<0.01$ quando comparado a todos os demais grupos. Imagem: A=controle, B=exercício, C=asma, D=asma=exercício

Houve um aumento da produção de muco do grupo OVA em relação a todos os demais grupos($p<0,01$), mas curiosamente o grupo Exe (treinados e não sensibilizado) e também o grupo Ovav+Exe (treinados e sensibilizados) apresentaram um aumento na produção de muco comparado aos animais do grupo Controle (não treinados e não sensibilizados), mas não foi apresentada diferença significativa entre esses grupos.

4.4 - Efeitos do TFA sobre os níveis de leucotrienos no LBA

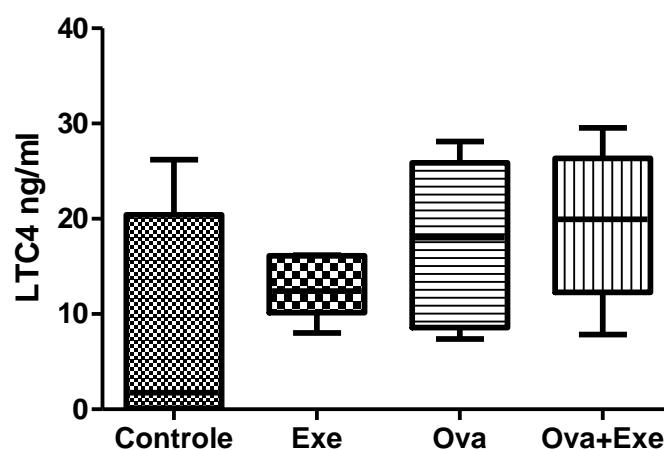


Figura 25. Efeitos do TFA sobre os níveis de LTC4 no LBA. Os valores estão expressos como média dos grupos, e as barras representam o desvio padrão.

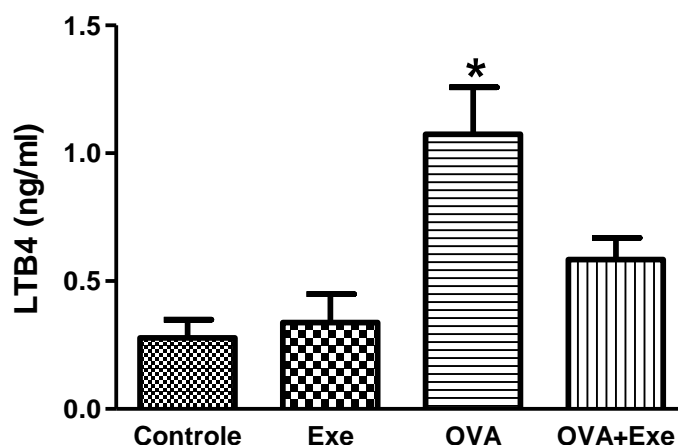


Figura 26. Efeitos do TFA sobre os níveis de LTB4 no LBA. * $p < 0.05$ quando comparado a todos os demais grupos.

Os níveis de LTC4 não apresentaram diferença entre os grupos, em oposição aos níveis de LTB4 onde o grupo OVA apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação a todos os grupos. Demonstrando que o exercício físico foi capaz de alterar os níveis de LTB4 no lavado broncoalveolar. LTB4 é reconhecido como um dos mais potentes quimioatratores de leucócitos, promovendo a quimiotaxia e quimiocinese dos eusínófilos, por isso os resultados apresentados corroboram com os resultados encontrados nos níveis de eosinófilos do LBA (figura 5).

4.5 - Efeitos do TFA sobre a expressão das células inflamatórias peribrônquicas de leucotrieno A4 hidrolase (LTA4H), 5-lipoxigenase (5-LO), leucotrieno C4 sintase (LTC4), receptor Cisteinil leucotrieno 1 (Cyslt1), receptor Cisteinil leucotrieno 2 (Cyslt2), receptor leucotrieno B4 (Ltb4r2)

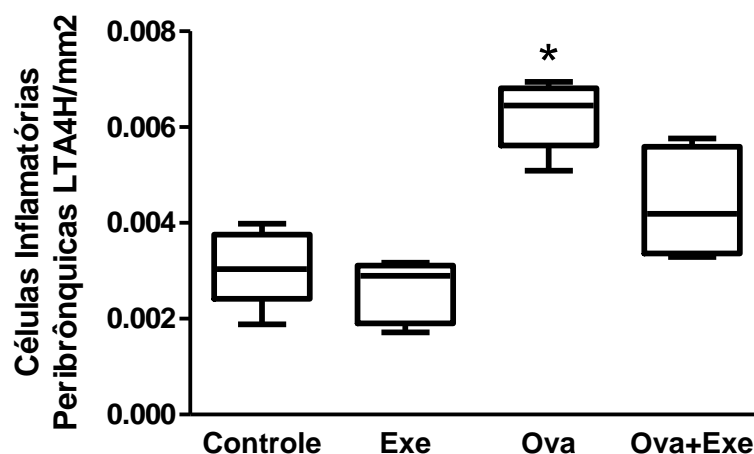


Figura 27. Efeitos do TFA sobre a expressão de leucotrieno A4 hidrolase(LTA4H) nas células peribrônquicas. * $p < 0.05$ quando comparado a todos os demais grupos.

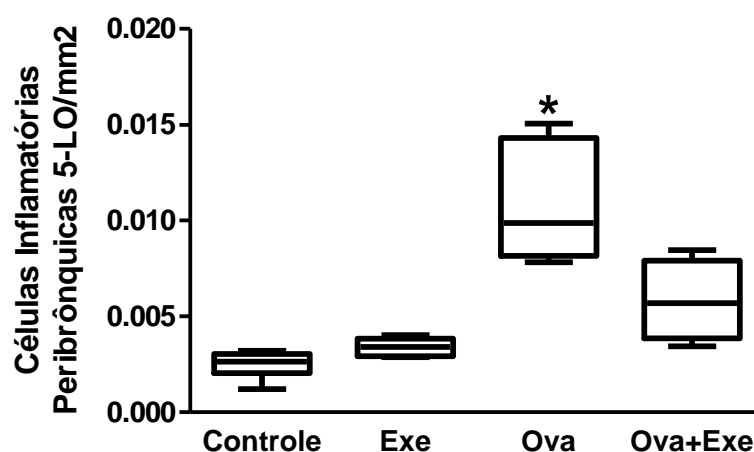


Figura 28. Efeitos do TFA sobre a expressão de 5-lipoxigenase (5-LO) nas células peribrônquicas. * $p < 0.05$ quando comparado a todos os demais grupos.

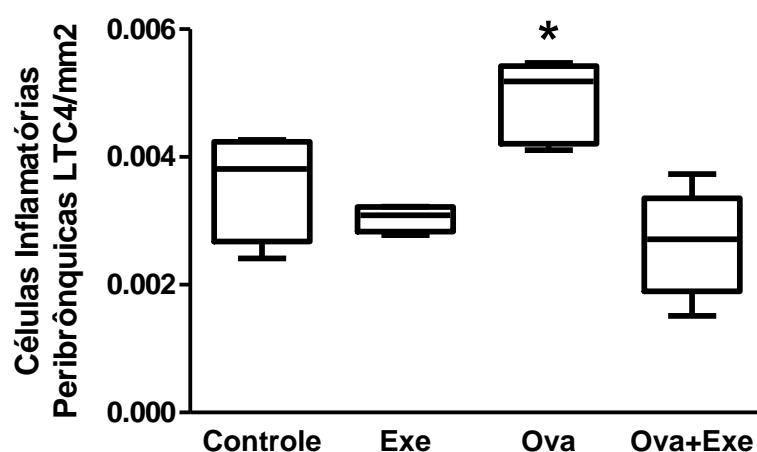


Figura 29. Efeitos do TFA sobre a expressão de leucotrieno C4 sintase (LTC4) nas células peribronquiais. * $p < 0.05$ quando comparado a todos os demais grupos.

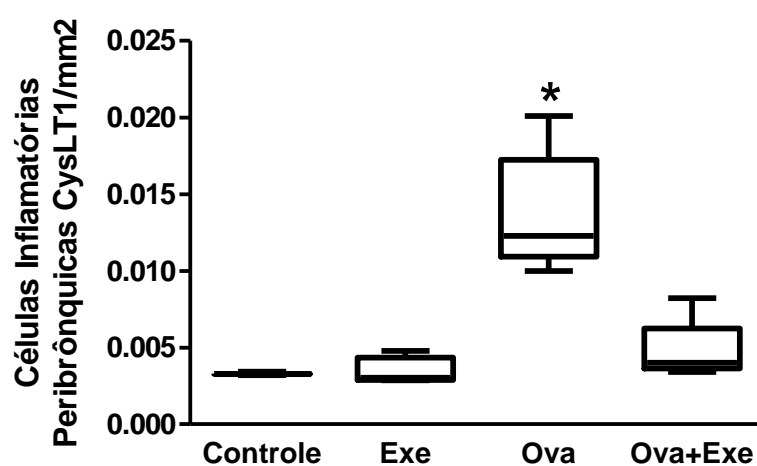


Figura 30. Efeitos do TFA sobre a expressão do receptor de Cistênico Leucotrieno 1 (CysLT1) nas células peribronquiais. * $p < 0.001$ quando comparado a todos os demais grupos.

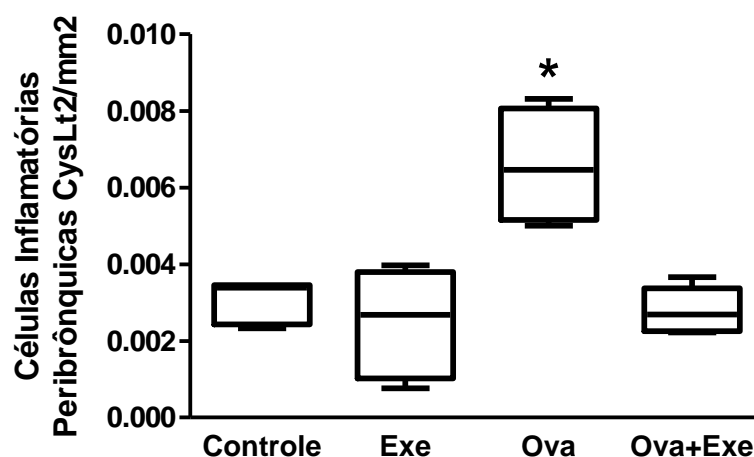


Figura 31. Efeitos do TFA sobre a expressão do receptor de Cistenil Leucotrieno 2 (CysLT2) nas células peribrônquicas. * $p < 0.05$ quando comparado a todos os demais grupos.

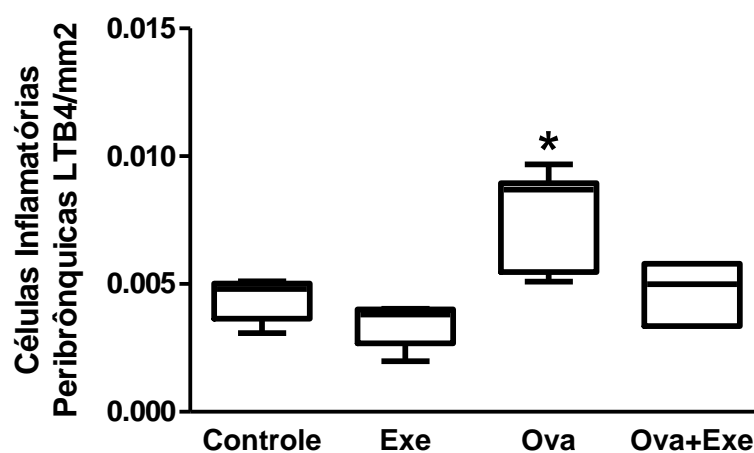


Figura 32. Efeitos do TFA sobre a expressão do receptor 2 de leucotrieno B4 (LTB4) nas células peribrônquicas. * $p < 0.05$ quando comparado a todos os demais grupos.

Os resultados das análises através da técnica de imunohistoquímica demonstraram uma redução significativa na expressão dos leucotrienos pelos leucócitos peribrônquicos (figuras 27, 28, 29, 30, 31 e 32). A expressão do receptor de cistenil leucotrieno 1 apresentou a maior diferença quando comparado o grupo

Ova a todos demais grupos ($p<0,001$), e os receptores de cisteinil leucotrieno 2 e leucotrieno C4 sintase apresentaram diferença significativa ($p<0,05$), dados que não apresentaram correlação com o dado encontrado através da técnica de Elisa no lavado broncoalveolar (figura 25). Em contrapartida os dados encontrados tanto no lavado broncoalveolar, quanto através da análise de imunohistoquímica para o receptor 2 de leucotrieno B4 apresentaram diferença estatisticamente significativa similar ($p<0,05$)(figura 26).

4.6 - Efeitos do TFA sobre a expressão de leucotrieno A4 hidrolase(LTA4H), 5-lipoxigenase(5-LO), leucotrieno C4 sintase (LTC4), receptor Cisteinil leucotrieno 1(Cyslt1), receptor Cisteinil leucotrieno 2 (Cyslt2), receptor leucotrieno B4 (Ltb4r2) no epitélio brônquico

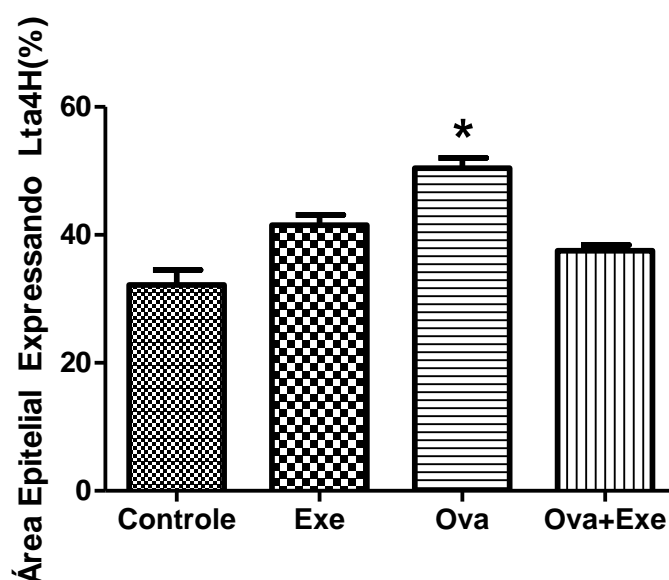


Figura 33. Efeitos do TFA sobre a expressão de leucotrieno A4 hidrolase (LTA4H) no epitélio brônquico. * $p<0.05$ quando comparado a todos os demais grupos

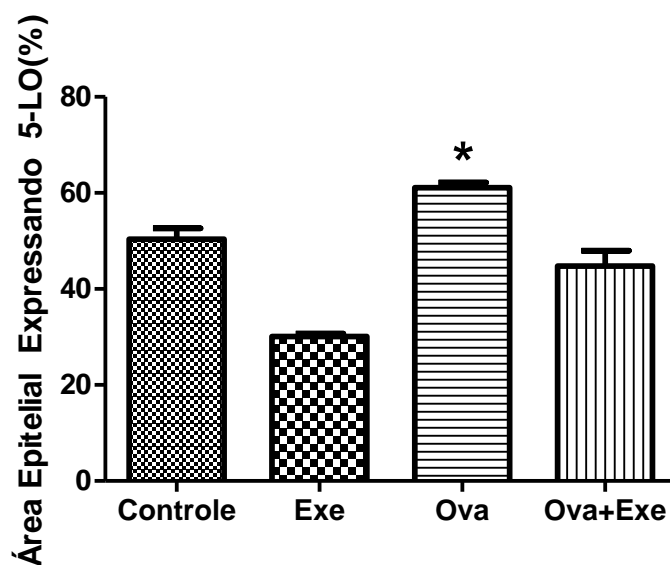


Figura 34. Efeitos do TFA sobre a expressão de 5-lipoxigenase (5-LO) no epitélio brônquico. * $p < 0.05$ quando comparado a todos os demais grupos.

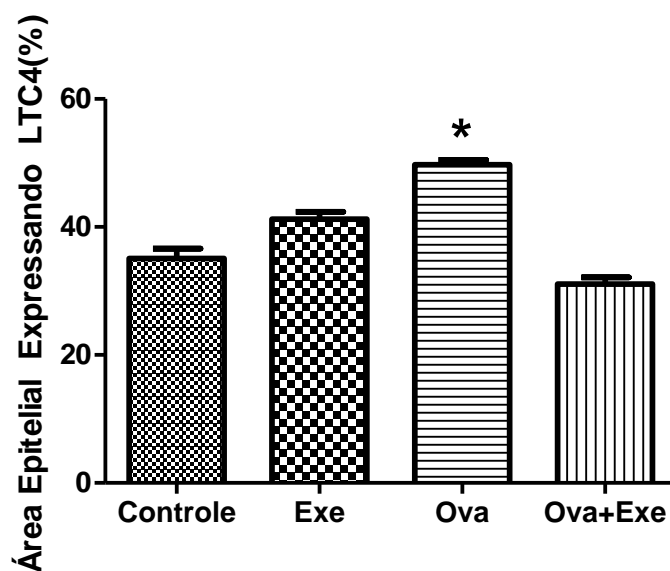


Figura 35. Efeitos do TFA sobre a expressão de leucotrieno C4 sintase(LTC4) no epitélio brônquico. * $p < 0.05$ quando comparado a todos os demais grupos.

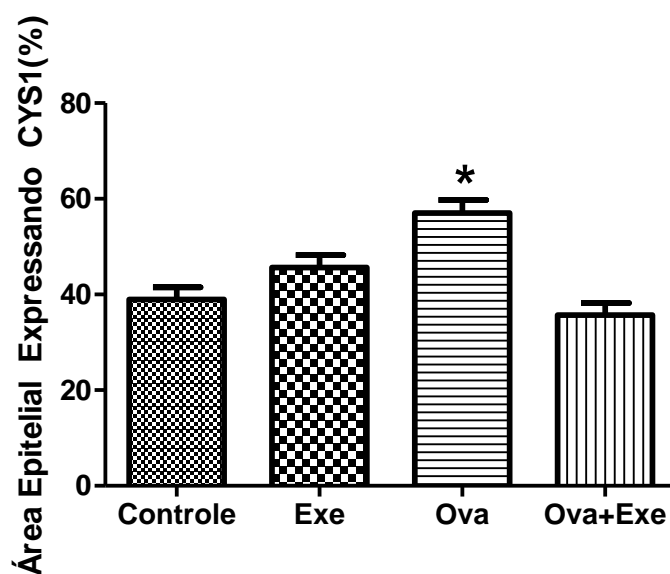


Figura 36. Efeitos do TFA sobre a expressão do receptor de Cistenil Leucotrieno 1 (CysLT1) no epitélio brônquico. * $p < 0.05$ quando comparado a todos os demais grupos.

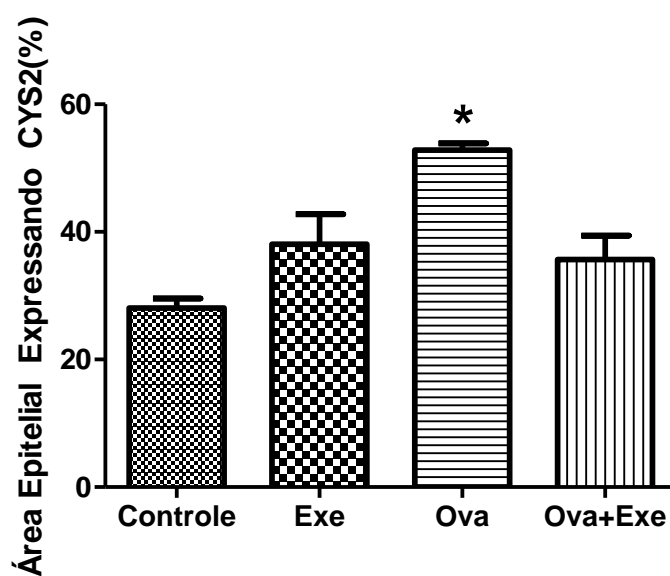


Figura 37. Efeitos do TFA sobre a expressão do receptor de Cistenil Leucotrieno 2 (CysLT2) no epitélio brônquico. * $p < 0.05$ quando comparado a todos os demais grupos.

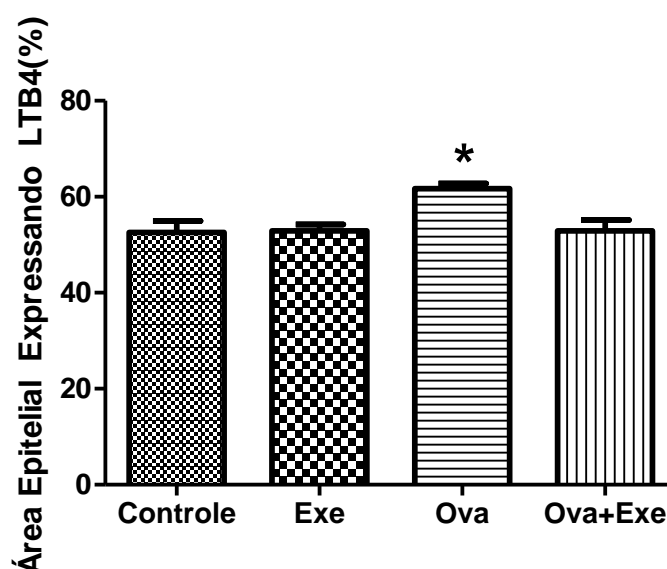


Figura 38. Efeitos do TFA sobre a expressão do receptor 2 de leucotrieno B4 (LTB4) no epitélio brônquico. * $p < 0.05$ quando comparado a todos os demais grupos.

Os resultados das análises através da técnica de imunohistoquímica demonstraram uma redução significativa na expressão dos leucotrienos no epitélio brônquico (figuras 33, 24, 35, 36, 37 e 38), somente recentemente um estudo demonstrou que através de técnicas de cultura celular que o epitélio brônquico tem uma participação na produção dos leucotrienos (Tanabe T et al, 2014).

A expressão de leucotrieno A4 hidrolase(LTA4H), 5-lipoxigenase(5-LO), leucotrieno C4 sintase (LTC4), receptor Cisteinil leucotrieno 1(Cyslt1), receptor Cisteinil leucotrieno 2 (Cyslt2), receptor leucotrieno B4 (Ltb4r2) no epitélio brônquico apresentaram diferença estatística ao comparar o grupo OVA a todos os demais grupos($p < 0,05$), dados que corroboram com os encontrados na expressão dos leucotrienos pelos leucócitos peribrônquicos (figuras 27, 28, 29, 30, 31 e 32) e com os níveis de LTB4 no lavado broncoalveolar(figura 26), mas não apresentaram

correlação com o dado de LTC₄ encontrado através da técnica de Elisa no lavado broncoalveolar (figura 25).

4.7 - Efeitos do TFA sobre a expressão de leucotrieno B₄ receptor 2 (LTB₄r2) e Cisteinil leucotrieno receptor 2(Cyslt2).

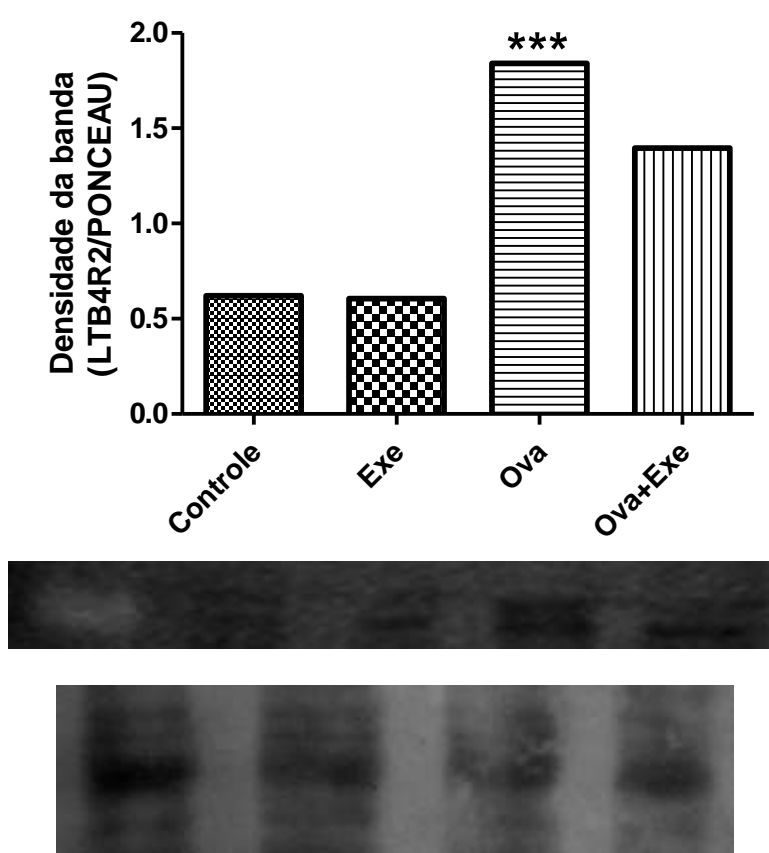


Figura 39. Efeitos do TFA sobre a expressão do receptor 2 de leucotrieno B₄ (LTB₄) no homogenato pulmonar. *** $p < 0.001$ quando comparado a todos os demais grupos. Imagem: A=Anticorpo Ltb4r2, B=Ponceau.

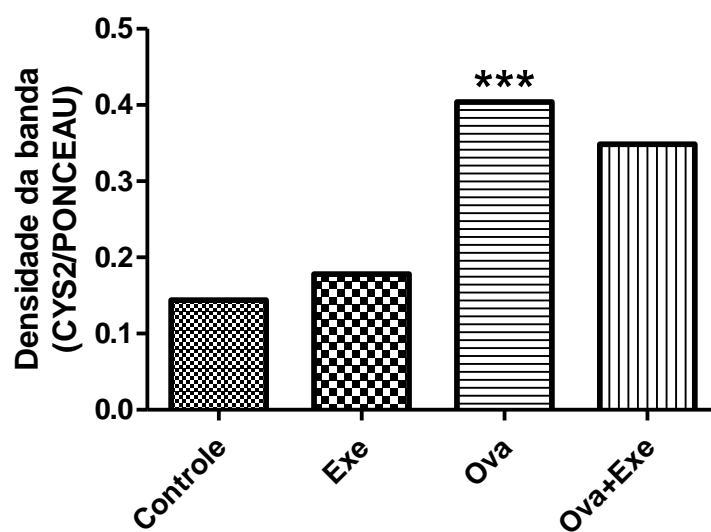


Figura 40. Efeitos do TFA sobre a expressão do receptor 2 de Cistenil leucotrieno receptor 2 (Cys2) no homogenato pulmonar. *** $p < 0.001$ quando comparado a todos os demais grupos. Imagem: A=Anticorpo Cys2, B=Ponceau.

5. Discussão

O presente estudo demonstrou que o treinamento físico de intensidade leve (60% da intensidade máxima em um teste incremental de velocidade), realizado de maneira frequente (5x por semana) com duração de 60min., apresentou uma diminuição significativa entre o grupo Ova e Ova+Exercício ($p<0,001$) na eosinofilia no lavado broncoalveolar induzida pela sensibilização pulmonar alérgica crônica com ovalbumina. Assim como reduziu macrófagos, linfócitos e neutrófilos ($p<0,05$) quando comparamos o grupo Ova e Ova+Exercício, resultado compatível com estudos já presentes na literatura (Vieira RP et al, 2007 e Vieira RP et al, 2011).

As citocinas presentes no lavado broncoalveolar o exercício físico se mostrou capaz de modular os níveis de IL-5 ($p<0,05$) quando comparamos o grupos Ova e Ova+Exercício, que é uma importante citocina que apresentam um importante papel no remodelamento e manutenção da inflamação (Vieira RP et al, 2007). Em contrapartida no presente estudo o exercício não alterou os níveis de IFN-gamma e IL-10 de maneira estatisticamente significativa como em outros estudos envolvendo exercícios físico aeróbio de baixa e média intensidade (Chung KF e Barnes PJ, 1999).

Foi demonstrado uma alteração significativa número de macrófagos no espaço peribrônquico ($p<0.01$) e no número de linfócitos no espaço peribrônquico ($p<0,05$) quando comparado o grupo Ova a todos os demais grupos.

Os resultados do presente estudo sugerem que o treinamento físico aeróbio pode ter papel na redução da migração eosinofílica, possivelmente pela diminuição da síntese de eosinófilos causado pela redução dos níveis de IL-5, que age tanto direta quanto indiretamente promovendo a diferenciação, proliferação, aumento do

recrutamento e da sobrevivência das células inflamatórias na inflamação alérgica (Webb DC et al, 2000).

Esses resultados sugerem que o treinamento físico aeróbio pode exercer um importante papel no tratamento da asma, devido aos seus possíveis efeitos antiinflamatórios, que parecem não estar somente restrito às vias aéreas, mas que também ao parênquima pulmonar.

Nas análises dos níveis de IL-5, IL-10 e IFN-gamma (figuras 12-17). As figuras 12, 13 e 14 representam os níveis de IL-5, IL-10 e IFN-gamma (respectivamente) obtidos do lavado broncoalveolar. A exposição à OVA aumentou os níveis de IL-5 quando se comparam os grupos OVA e Controle ($p < 0,05$), mas diminuiu no grupo OVA+Exe quando comparado ao grupo OVA ($p < 0,05$) (Figura 12).

Resultado similar ao apresentado em outras pesquisas já realizadas por nosso grupo (Vieira RP et al, 2007 e Vieira RP et al, 2011). Em contrapartida ao analisar os níveis de IL-10 e IFN-gamma, tanto no LBA quanto no Soro, os grupos não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) (Figura 13, 14, 16 e 17). Não ocorrendo por tanto alteração nas citocinas na expressão de citocinas Th1 (IFN-gamma) e nem Th2 (IL-10) não demonstrando qualquer desequilíbrio Th1/Th2.

Foi possível observar o efeito do treinamento físico aeróbio sobre a porcentagem de fibras colágenas na parede das vias aéreas ($p < 0,05$), fibras elásticas na parede das vias aéreas ($p < 0,01$) e da espessura da musculatura lisa ($p < 0,05$) quando comparado o grupo Ova a todos os demais grupos. Demonstrando que nosso estudo apresentou características de remodelamento das vias aéreas, modificações já demonstrados em estudos de outros autores (Vieira RP et al, 2011 e Mickleborough TD et al, 2005) e que o exercício físico mostrou um efeito protetor em relação ao remodelamento (Vieira et al, 2011).

Estas alterações estruturais são normalmente relatadas como sendo secundárias à inflamação e resultam num componente irreversível de obstrução das vias aéreas em pacientes asmáticos, especialmente na asma severa e como consequência o paciente, muitas vezes, deixa de responder aos broncodilatadores (Nici, L et al, 2006).

Os leucotrienos são alguns dos broncoconstritores mais potentes conhecidos e constituem mediadores importantes da inflamação nas vias respiratórias. Os fármacos que inibem a produção de leucotrienos ou a sua ligação a receptores desempenham um papel no tratamento da asma (Henderson WR, 1996). A via dos leucotrienos pode ser inibida pelo inibidor da 5-lipoxigenase ou pelos antagonistas do receptor CysLT1(Kemp JP,2009).

Neste estudo foram analisados os níveis de LTB₄ e LTC₄ no LBA, demonstrando modificações significantes nos níveis de LTB₄ ($p < 0,05$) mas não nos níveis de LTC₄ ($p > 0,05$). O LTC₄ é parte dos cistenil leucotrienos (CysLTs: LTC₄, LTD₄, e LTE₄) também classificado como substâncias de reação lenta de anafilaxia (93,94). Demonstrando por tanto que o exercício físico aeróbio, possui uma influência nos níveis de LTB₄ e que sua participação na ação quimioatrativa através dos receptores de alta afinidade LTB₄ receptor-1 (BLT1) nas células alvo(Teal Set al, 2010), pode ser a explicação para a modulação dos níveis de células ativas do sistema imune inato como neutrófilos, macrófagos e mastócitos (Kemp JP,2009).

A influência do TFA na expressão leucotrienos através da técnica de imunohistoquímica, demonstrou uma diferença estatística significativa ao compararmos os níveis do grupo sensibilizado e desafiado(grupo OVA) a todos os demais grupos ($p < 0,05$) tanto nos leucócitos peribrônquicos(figuras 27-32) quando no epitélio(figuras 33-38), demonstrando que o exercício físico diminuiu a expressão

de leucotrieno A4 hidrolase(LTA4H), 5-lipoxigenase(5-LO), leucotrieno C4 sintase (LTC4), receptor Cisteinil leucotrieno 1(Cyslt1), receptor Cisteinil leucotrieno 2 (Cyslt2), receptor leucotrieno B4 (Ltb4r2) em animais sensibilizados, desafiados e treinados(grupo OVA+EXE).

Esses dados corroboram com os encontrados através da técnica de Western Blot no homogenato pulmonar, que demonstraram uma diferença significativa ($p<0,001$) tanto na expressão de LTB4r2 quanto Cys2.(figura 39 e 40)

6. Conclusão

No presente estudo, nós avaliamos a influência do exercício físico em um modelo experimental de asma, onde foi possível constatar que nesse modelo a atividade física aeróbia de intensidade leve reduziu a inflamação e remodelamento pulmonar. A via dos leucotrienos é de fundamental importância para o desencadeamento do processo inflamatório característico da inflamação crônica das vias aéreas, e o exercício físico demonstrou-se como uma ferramenta capaz de reduzir os níveis de LTb₄ no lavado broncoalveolar e também a expressão leucotrieno A₄ hidrolase(LTA₄H), 5-lipoxigenase(5-LO), leucotrieno C₄ sintase (LTC₄), receptor Cisteinil leucotrieno 1(Cyslt₁), receptor Cisteinil leucotrieno 2 (Cyslt₂), receptor leucotrieno B₄ (Ltb₄r₂) tanto nos leucócitos quanto no epitélio brônquico, além da expressão nos níveis de Ltb₄r₂ e Cys₂ no homogenato pulmonar, demonstrando que em modelos animais a redução da inflamação gerada pelo exercício físico é decorrente em parte da redução dos níveis de leucotrienos.

7. Referências

1. Global Initiative for Asthma (GINA) Global Initiative for Asthma (GINA) Global Strategy for Asthma Management and Prevention. 2006; National Heart, Lung, and Blood Institute of Health
2. Fuhlbrigge A, Peden D, Apter AJ, Boushey HA, Camargo CA Jr, Gern J, Heymann PW, Martinez FD, Mauger D, Teague WG, Blaisdell C. Asthma outcomes: exacerbations. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Mar;129(3 Suppl):S34-48. doi: 10.1016/j.jaci.2011.12.983.
3. Gergen, P. J., and Weiss, K. B. (1995). "Epidemiology of asthma" in *Asthma and Rhinitis*, Chap. 3, eds W. W. Busse and S. T. Holgate (Boston, MA: Blackwell Scientific Publications), 17–32
4. Gaurab Sircar, Bodhisattwa Saha, Swati G. Bhattacharya e Sudipto Saha. Allergic asthma biomarkers using systems approaches. *Front. Genet.*, 08 January 2014 | doi: 10.3389/fgene.2013.00308
5. World Health Organization. Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases: a comprehensive approach, 2007.
6. Neto A. C., Botega A., Souza-Machado C., Cerqueira e Silva C.M.P., Prado Junior J.C., Frade J.C.Q.P., Nascimento Junior J.M., Jardim J.R., Meiners M.M.M.A., Camargos P.A.M. França F.P., Hau S.D.. *Doenças Respiratórias Crônicas*. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde 25, 2010.
7. Curschmann H: Ueber. Bronchiolitis exsudative und ihr Verhältniss zum Asthma nervosum. *Dtsch Arch Klin Med* 1882; 32: 1–34.
8. National Asthma Education and Prevention Program N. Expert panel report 3: guidelines for the diagnosis and management of asthma. 2007

9. National Institutes of Health N. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention (GINA). 2009
10. Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy*. 2008 Jun;38(6):872-97.
11. Holgate ST, Davies DE. Rethinking the pathogenesis of asthma. *Immunity*. 2009 Sep;31(3):362-7.
12. Larche M, Robinson DS, Kay AB. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Mar;111(3):450-63.
13. Ritz SA, Gajewska BU, Stämpfli MR, Jordana M. Determinants of the immune-inflammatory response in allergic airway inflammation: overview of antigen presentation and cellular activation. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Nov;106(5 Suppl):S206-12
14. Robert F Lemanske Jr. Inflammatory events in asthma: An expanding equation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* Volume 105, Issue 6, Part 2, Pages S633–S636, June 2000
15. Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature* 2008; 24: 445–454.
16. Steinke JW, Borish L, Rosenwasser LJ. 5. Genetics of hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Feb;111(2 Suppl):S495-501.
17. Vercelli D. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nature reviews*. 2008 Mar;8(3):169-82.
18. Roitt IM. *Immunology, physiology, pathology and clinic*. London: Blackwell Scientific; 1992.
19. Bukantz SC, Lockey RF. IgE immediate hypersensitivity. In: Weiss EB, Stein M, eds. *Bronchial asthma. Mechanisms and therapeutics*. Boston: Little, Brown; 1993. p. 68-79.

20. Milgrom H, Fick RB Jr, Su JQ, Reimann JD, Bush RK, Watrous ML, et al. Treatment of allergic asthma with monoclonal anti-IgE antibody. rhuMAb-E25 Study Group. *N Engl J Med* 1999;341:1966-73.
21. Fahy JV, Cockcroft DW, Boulet LP, Wong HH, Deschesnes F, Davis EE, et al. Effect of aerosolized anti-IgE (E25) on airway responses to inhaled allergen in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1023-7.
22. Humbert M, Corrigan CJ, Kimmitt P, Till SJ, Kay AB, Durham SR. Relationship between IL-4 and IL-5 mRNA expression and disease severity in atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:704- 8.
23. Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, et al. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* 1998;282:2258-61.
24. Holt PG, Stumbles PA, McWilliam AS. Functional studies on dendritic cells in the respiratory tract and related mucosal tissues. *J Leukoc Biol* 1999;66:272- 5.
25. Kay AB. Asthma and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 1991;87:893-910.
26. Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barneon G, Ghavanian N, Enander I, et al. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med* 1990;323:1033-9.
27. Bradley BL, Azzawi M, Jacobson M, Assoufi B, Collins JV, Irani AM, et al. Eosinophils, Tlymphocytes, mast cells, neutrophils, and macrophages in bronchial biopsy specimens from atopic subjects with asthma: comparison with biopsy specimens from atopic subjects without asthma and normal control subjects and relationship to bronchial hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 1991;88:661-74.
28. Busse WW, Sedgwick JB. Eosinophil eicosanoid relations in allergic inflammation of the airways. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 1994;22:241-9.

29. Broide DH, Paine MM, Firestein GS. Eosinophils express interleukin 5 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mRNA at sites of allergic inflammation in asthmatics. *J Clin Invest* 1992;90:1414-24.
30. Gleich GJ, Adolphson CR, Leiferman KM. The biology of the eosinophilic leukocyte. *Annu Rev Med* 1993;44:85-101.
31. Rabe KF, Munoz NM, Vita AJ, Morton BE, Magnussen H, Leff AR. Contraction of human bronchial smooth muscle caused by activated human eosinophils. *Am J Physiol* 1994;267:L326-34.
32. Collins DS, Dupuis R, Gleich GJ, Bartemes KR, Koh YY, Pollice M, et al. Immunoglobulin E-mediated increase in vascular permeability correlates with eosinophilic inflammation. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:677-83.
33. Leff AR. Inflammatory mediation of airway hyperresponsiveness by peripheral blood granulocytes. The case for the eosinophil. *Chest* 1994;106:1202-8.
34. Laitinen LA, Heino M, Laitinen A, Kava T, Haahtela T. Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. *Am Rev Respir Dis* 1985;131:599-606.
35. Malech HL, Gallin JI. Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases. *N Engl J Med* 1987;317:687-94.
36. Wenzel SE, Szeffler SJ, Leung DY, Sloan SI, Rex MD, Martin RJ. Bronchoscopic evaluation of severe asthma. Persistent inflammation associated with high dose glucocorticoids. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:737-43.
37. Werb Z, Underwood J, Rappolee D. The role of macrophage-derived growth factors in tissue repair. In: Van Furth R, ed. *Mononuclear phagocytes*. Dordrecht: Kluwer Academic Press; 1992. p. 404-9.

38. Senior RM, Connolly NL, Cury JD, Welgus HG, Campbell EJ. Elastin degradation by human alveolar macrophages. A prominent role of metalloproteinase activity. *Am Rev Respir Dis* 1989;139:1251-6.
39. Vignola AM, Chanez P, Chiappara G, Merendino A, Zinnanti E, Bousquet J, et al. Release of transforming growth factor-beta (TGF-beta) and fibronectin by alveolar macrophages in airway diseases. *Clin Exp Immunol* 1996;106:114-9.
40. Nath P, Leung SY, Williams AS, et al. Complete inhibition of allergic airway inflammation and remodelling in quadruple IL-4/5/9/13^{-/-} mice. *Clin Exp Allergy* 2007; 37: 1427–1435.
41. Fixman ED, Stewart A, Martin JG. Basic mechanisms of development of airway structural changes in asthma. *Eur Respir J* 2007; 29: 379–389.
42. Vignola AM, Mirabella F, Costanzo G, Giorgi R, Gjomarkaj M, Bellia V, Bonsignori G. Airway remodeling in asthma. *Chest*. 2003; 123:417S-22S. 33- James A. Airway remodeling in asthma. *Curr Opin Pulm Med*. 2005; 11:1-6.
43. Chiappara G, Gagliardo R, Siena A, Bonsignore Mr, Bousquet J, Bonsignore G, Vignola AM. Airway remodelling in the pathogenesis of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2001; 1:85-93.
44. Mauad T, Souza ASL, Saldiva PHN, Dolhnikoff M. Remodelamento brônquico na asma. *J Pneumologia*. 2000; 26:91-98.
45. Pauwels R, Joos G, Van der Straeten M. Bronchial hyperresponsiveness is not bronchial hyperresponsiveness is not bronchial asthma. *Clin Allergy* 1988;18:317-21.
46. Chai H, Farr RS, Froehlich LA, Mathison DA, McLean JA, Rosenthal RR, et al. Standardization of bronchial inhalation challenge procedures. *J Allergy Clin Immunol* 1975;56:323-7.

47. Sterk PJ, Fabbri LM, Quanjer PH, Cockcroft DW, O'Byrne PM, Anderson SD, et al. Airway responsiveness. Standardized challenge testing with pharmacological, physical and sensitizing stimuli in adults. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J* 1993;16 Suppl:53-83.
48. Tashkin DP. Measurement and significance of the bronchodilator response. In: Jenne JW, Murphy S, eds. *Drug therapy for asthma. Lung Biology in Health and Disease Series, Vol. 31*. New York: Marcel Dekker; 1987. p. 535-613.
49. Roorda RJ, Gerritsen J, van Aalderen WM, Schouten JP, Veltman JC, Weiss ST, et al. Followup of asthma from childhood to adulthood: influence of potential childhood risk factors on the outcome of pulmonary function and bronchial responsiveness in adulthood. *J Allergy Clin Immunol* 1994;93:575-84.
50. Holgate S. Mediator and cytokine mechanisms in asthma. *Thorax* 1993;48:103-9.
51. Szczeklik A, Nizankowska E, Sanak M, Swierczynska M. Aspirin-induced rhinitis and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001;1:27- 33.
52. James AL, Pare PD, Hogg JC. The mechanics of airway narrowing in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1989;139:242-6.
53. Holgate ST. Epithelium dysfunction in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Dec;120(6):1233-44; quiz 1245-6.
54. Adrian Shifren, Chad Witt, Chandrika Christie, and Mario Castro, "Mechanisms of Remodeling in Asthmatic Airways," *Journal of Allergy*, vol. 2012, Article ID 316049, 12 pages, 2012. doi:10.1155/2012/316049
55. Pakhale S, Mulpuru S, Boyd M: Optimal management of severe/refractory asthma. *Clinic Med Insights Circ Respir Pulmonary Med* 2011, 5(CMCRPM-5-5535-Pakhale):37.

56. Holgate S: Pathophysiology of asthma: what has our current understanding taught us about new therapeutic approaches? *J Allergy Clin Immunol* 2011, 128(3):495–505.
57. Disabella V, Sherman C. Exercise for asthma patients: little risk, big rewards. *Phys Sportsmed*. 1998;266:75-84
58. Chandratilleke MG, Carson KV, Picot J, Brinn MP, Esterman AJ, Smith BJ: Physical training for asthma. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2012 (5). doi:10.1002/14651858.CD001116.pub3. Art.No.: CD001116.
59. Mendes F.A.R., Gonçalves R.C. Nunes M.P.T. ,Saraiva-Romanholo M.B., Cukier A., Stelmach R., Jacob-Filho W., Martins M.A., Carvalho C.R.F.. Effects of Aerobic Training on Psychosocial Morbidity and Symptoms in Patients With Asthma:A Randomized Clinical Trial *Chest*. 2010;138(2):331-337.
60. O'Donnell DE, Hernandez P, Kaplan A, Aaron S, Bourbeau J, Marciniuk D. Canadian Thoracic Society recommendations for management of chronic obstructive pulmonary disease - 2008 update - highlights for primary care. *Can Respir J* 2008, 15:1A–8A.
61. Maltais F, Bourbeau J, Shapiro S, Lacasse Y, Perrault H, Baltzan M. Effects of home-based pulmonary rehabilitation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Intern Med* 2008, 149(12):869–878.
62. Neder JA, Nery LE, AnC S, Cabral ALB, Fernandes ALG: Short term effects of aerobic training in the clinical management of moderate to severe asthma in children. *Thorax* 1999, 54(3):202–206.
63. Moreira A, Delgado L, Haahtela T, Fonseca J, Moreira P, Lopes C. Physical training does not increase allergic inflammation in asthmatic children. *Eur Respir J* 2008, 32(6):1570–1575.

64. Mendes FAR, Almeida FM, Cukier A: Effects of aerobic training on airway inflammation in asthmatic patients. *Med Sci Sports Exerc* 2011, 43(2):197–203.
65. Gunay O, Onur E, Yilmaz O, Dundar PE, Tikiz C, Var A, et al: Effects of physical exercise on lung injury and oxidant stress in children with asthma. *Allergologia et Immunopathologia* 2012, 40(1):20–24.
66. Silva PL, Mello MT, Cheik NC, Sanches PL, Correia FA, Pian A, et al: Interdisciplinary therapy improves biomarkers profile and lung function in asthmatic obese adolescents. *Pediatr Pulmonol* 2011, 47(1):8–17.
67. Segal RJ, Reid RD, Courneya KS, Sigal RJ, Kenny GP, Prud'Homme DG, et al: Randomized controlled trial of resistance or aerobic exercise in men receiving radiation therapy for prostate cancer. *J Clin Oncol* 2009, 27(3):344–351.
68. Boule NG, Haddad E, Kenny GP, Wells GA, Sigal RJ: Effects of exercise on glycemic control and body mass in type 2 diabetes mellitus: a metaanalysis of controlled clinical trials. *JAMA* 2001, 286(10):1218–1227.
69. Sutherland TJT, Cowan JO, Young S, Goulding A, Grant AM, Williamson A, et al: The Association between Obesity and Asthma: interactions between systemic and airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2008, 178(5): 469–475.
70. Franklin PJ, Stick SM: The value of FeNO measurement in asthma management: the motion against FeNO to help manage childhood asthma—reality bites. *Paediatr Respir Rev* 2008, 9(2):122–126.
71. Jartti T, Wendelin-Saarenhovi M, Heinonen I, Hartiala J, Vanto T: Childhood asthma management guided by repeated FeNO measurements: a meta-analysis. *Paediatr Respir Rev* 2012, 13(3):178–183.

72. Bonsignore MR, La Grutta S, Cibella F: Effects of exercise training and montelukast in children with mild asthma. *Med Sci Sports Exerc* 2008, 40(3):405–412.
73. Gunay O, Onur E, Yilmaz O, Dundar PE, Tikiz C, Var A, et al: Effects of physical exercise on lung injury and oxidant stress in children with asthma. *Allergologia et Immunopathologia* 2012, 40(1):20–24.
74. Garcia-Aymerich J, Varraso R, Anto JM, Camargo CA Jr: Prospective study of physical activity and risk of asthma exacerbations in older women. *Am J Respir Crit Care Med* 2009, 179(11):999–1003.
75. 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*. 2007 Nov 1;176(9):871-7.
76. Vieira RP, de Andrade VF, Duarte AC, Dos Santos AB, Mauad T, Martins MA, Dolhnikoff M, Carvalho CR. Aerobic conditioning and allergic pulmonary inflammation in mice. II. Effects on lung vascular and parenchymal inflammation and remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008 Oct;295(4):L670-9.
77. R.A. Silva, R.P. Vieira, A.C.S. Duarte, F.D.T.Q.S. Lopes, A. Perini, T. Mauad, M.A. Martins and C.R.F. Carvalho Aerobic training reverses airway inflammation and remodelling in an asthma murine model. *Eur Respir J* 2010; 35: 994–1002 DOI: 10.1183/09031936.00049509
78. Vieira RP, Duarte AC, Santos AB, Medeiros MC, Mauad T, Martins MA, Carvalho CR, Dolhnikoff M. Exercise reduces effects of creatine on lung. *Int J Sports Med*. 2009 Sep;30(9):684-90. *Respir Physiol Neurobiol*. 2011 Mar 15;175(3):383-9. doi: 10.1016/j.resp.2011.01.002. Epub 2011 Jan 12.

- 79.Vieira RP, Toledo AC, Ferreira SC, Santos AB, Medeiros MC, Hage M, Mauad T, Martins Mde A, Dolhnikoff M, Carvalho CR. Airway epithelium mediates the anti-inflammatory effects of exercise on asthma. *Respir Physiol Neurobiol*. 2011 Mar 15;175(3):383-9. doi: 10.1016/j.resp.2011.01.002. Epub 2011 Jan 12.
- 80.Clarice R. Olivoa, Rodolfo P. Vieira, Fernanda M. Arantes-Costa, Adenir Perini, Milton Arruda Martins, Celso Ricardo Fernandes Carvalho. Effects of aerobic exercise on chronic allergic airway inflammation and remodeling in guinea pigs *Respiratory Physiology & Neurobiology* 182 (2012) 81– 87
81. Chung KF, Barnes PJ: Cytokines in asthma. *Thorax* 1999, 54:825–857.
82. Kumar A, Takada Y, Boriek AM, Aggarwal BB: Nuclear factor kB: its role in health and disease. *J Mol Med* 2004, 82:434–448.
- 83.Ram FS, Robinson SM, Black PN, Picot J. Physical training for asthma. *Cochrane Database Syst Rev* (4):CD001116, 2005.
- 84.Xisto DG, Farias LL, Ferreira HC, Picanço MR, Amitrano D, Lapa e Silva JR, Negri EM, Mauad T, Carnielli D, Silva LFF, Capelozzi VL, Faffe DS, Zin WA, Rocco PRM. Lung parenchyma remodeling in a murine model of chronic allergic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 171:829–837.
85. Barnes PJ: The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Investig* 2008, 118:3546–3556.
- 86.Caroll N, Sly P. Exercise training as an adjunct to asthma management. *Thorax*. 1999; 54:190-191.
87. Finkelman FD, Hogan SP, Khurana Hershey GK, Rothenberg ME, Wills-Karp M: Importance of cytokines in murine allergic airway disease and human asthma. *J Immunol* 2010, 184:1663–1674.

- 88.Henderson WR Jr, Lewis DB, Albert RK, Zhang Y, Lamm WJ, Chiang GK, Jones F, Eriksen P, Tien YT, Jonas M, Chi EY. The importance of leukotrienes in airway inflammation in a mouse model of asthma. *J Exp Med*. 1996 Oct 1;184(4):1483-94.
- 89.Teal S. Hallstrand and William R. Henderson Jr. An update on the role of leukotrienes in asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2010 February ; 10(1): 60–66. doi:10.1097/ACI.0b013e32833489c3
- 90.Kemp JP. Exercise-induced bronchoconstriction: The effects of montelukast, a leukotriene receptor antagonist. *Ther Clin Risk Manag*. 2009;5:923-33
- 91.R.K. Singh, S. Gupta, S. Dastidar, A. Ray. Cysteinyl Leukotrienes and Their Receptors: Molecular and Functional Characteristics. *Pharmacology* 2010;85:336–349 DOI: 10.1159/000312669
- 92.Ago H, Kanaoka Y, Irikura D, Lam BK, Shimamura T, Austen KF, Miyano M. Crystal structure of a human membrane protein involved in cysteinyl leukotriene biosynthesis. *Nature* 2007;448:609–612. [PubMed: 17632548]
- 93.Martinez Molina D, Wetterholm A, Kohl A, McCarthy AA, Niegowski D, Ohlson E, Hammarberg T, Eshaghi S, Haeggstrom JZ, Nordlund P. Structural basis for synthesis of inflammatory mediators by human leukotriene C4 synthase. *Nature* 2007;448:613–616. [PubMed: 17632546]
- 94.Hirshi Ohnishi, Nobuaki Miyahara and Erwin W Gelfand. The Role of Leukotriene B4 in Allergic Diseases *Allergology International*. 2008;57:291-298
- 95.R. HENDERSON, JR. WILLIAM, LI-OU TANG, SHI-JYE CHU, SHIH-MING TSAO, S. CHIANG K. GERTRUDE, FALA AH JONES, MECHTHILD JONAS, CHONG PAE, HUAIJING WANG, and Y. CHI EMIL "A Role for Cysteinyl Leukotrienes in Airway Remodeling in a Mouse Asthma Model", *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, Vol. 165, No. 1 (2002), pp. 108-116..

96. Watanabe S, Yamasaki A, Hashimoto K, Shigeoka Y, Chikumi H, Hasegawa Y, Sumikawa T, Takata M, Okazaki R, Watanabe M, Yokogawa T, Yamamura M, Hayabuchi T, Gerthoffer WT, Halayko AJ, Shimizu E. Expression of functional leukotriene B₄ receptors on human airway smooth muscle cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Jul;124(1):59-65.e1-3.
97. Aggarwal S, Moodley YP, Thompson PJ, Misso NL. Prostaglandin E₂ and cysteinyl leukotriene concentrations in sputum: association with asthma severity and eosinophilic inflammation. *Clin Exp Allergy*. 2010 Jan;40(1):85-93.
98. Kanaoka Y, Boyce JA. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: cellular distribution and function in immune and inflammatory responses. *J Immunol*. 2004; 173:1503–10. [PubMed: 15265876]
99. Malaviya R, Malaviya R, Jakschik BA. Reversible translocation of 5-lipoxygenase in mast cells upon IgE/antigen stimulation. *J Biol Chem*. 1993; 268:4939–44. [PubMed: 8444871]
100. Lam BK, Penrose JF, Freeman GJ, Austen KF. Expression cloning of a cDNA for human leukotriene C₄ synthase, an integral membrane protein conjugating reduced glutathione to leukotriene A₄. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91:7663–7. [PubMed: 8052639]
101. Lam BK, Owen WF Jr, Austen KF, Soberman RJ. The identification of a distinct export step following the biosynthesis of leukotriene C₄ by human eosinophils. *J Biol Chem*. 1989; 264:12885–9. [PubMed: 2753893]
102. Carter BZ, Shi ZZ, Barrios R, Lieberman MW. gamma-glutamyl leukotrienase, a gamma-glutamyl transpeptidase gene family member, is expressed primarily in spleen. *J Biol Chem*. 1998; 273:28277–85. [PubMed: 9774450]

103. Lee CW, Lewis RA, Corey EJ, Austen KF. Conversion of leukotriene D4 to leukotriene E4 by a dipeptidase released from the specific granule of human polymorphonuclear leucocytes. *Immunology*. 1983; 48:27–35. [PubMed: 6293969]
104. Maclouf J, Antoine C, Henson PM, Murphy RC. Leukotriene C4 formation by transcellular biosynthesis. *Ann N Y Acad Sci*. 1994; 714:143–50. [PubMed: 8017763]
105. Laidlaw TM, Kidder MS, Bhattacharyya N, et al. Cysteinyl leukotriene overproduction in aspirin exacerbated respiratory disease is driven by platelet-adherent leukocytes. *Blood*. 2012; 119:3790–8. [PubMed: 22262771]
106. Laidlaw TM, Kidder MS, Bhattacharyya N, et al. Cysteinyl leukotriene overproduction in aspirin exacerbated respiratory disease is driven by platelet-adherent leukocytes. *Blood*. 2012; 119:3790–8. [PubMed: 22262771]
107. Drazen JM, O'Brien J, Sparrow D, et al. Recovery of leukotriene E4 from the urine of patients with airway obstruction. *Am Rev Respir Dis*. 1992; 146:104–8. [PubMed: 1320817]
108. Liu MC, Dube LM, Lancaster J. Acute and chronic effects of a 5-lipoxygenase inhibitor in asthma: a 6-month randomized multicenter trial. Zileuton Study Group. *J Allergy Clin Immunol*. 1996; 98:859–71. [PubMed: 8939149]
- 109.. Laidlaw TM, Boyce JA. Cysteinyl leukotriene receptors, old and new; implications for asthma. *Clin Exp Allergy*. 2012 Sep;42(9):1313-20. doi: 10.1111/j.1365-2222.2012.03982.x.
110. Jonathan M. Gaffin, Alisha Bouzaher, BA and Wanda Phipatanakul. Rethinking the Prevalence of Exercise Induced Bronchoconstriction in Patients with Asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2013 December ; 111(6): . doi:10.1016/j.anai.2013.10.005.
111. Cabral AL, Conceicao GM, Fonseca-Guedes CH, Martins MA. Exercise-induced

bronchospasm in children: effects of asthma severity. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:1819–1823. [PubMed: 10351925]

112. Jeffrey M. Drazen, Elliot Israel, and Paul M. O'Byrne..Treatment of Asthma with Drugs Modifying the Leukotriene Pathway. *N Engl J Med* 1999; 340:197-206 January 21, 1999 DOI: 10.1056/NEJM199901213400306

113.Smita Pakhale, Vanessa Luks, Andrew Burkett and Lucy Turner. Effect of physical training on airway inflammation in bronchial asthma: a systematic review *BMC Pulmonary Medicine* 2013, 13:38 <http://www.biomedcentral.com/1471-2466/13/38>

114.Vanessa Luks, Andrew Burkett, Lucy Turner and Smita Pakhale. Effect of physical training on airway inflammation in animal models of asthma: a systematic review. *BMC Pulmonary Medicine* 2013, 13:24 <http://www.biomedcentral.com/1471-2466/13/24>

115.Gunay O, Onur E, Yilmaz O, Dundar PE, Tikiz C, Var A, et al: Effects of physical exercise on lung injury and oxidant stress in children with asthma. *Allergologia et Immunopathologia* 2012, 40(1):20–24.

116.Chung KF, Barnes PJ: Cytokines in asthma. *Thorax* 1999, 54:825–857.

120.Valéria Marques Ferreira Normandoa, Flavia Mazzoli-Rocha b, Dayse Kelly Molina Moreira b, Bárbara Chaves Barcellos b, Domingos Wanderley Picanc, o-Dinizc, Walter Araújo Zinb, Regular exercise training attenuates pulmonary inflammatory responses to inhaled alumina refinery dust in mice. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 186 (2013) 53–60


117. Hallstrand TS, Moody MW, Aitken ML, Henderson WR Jr. Airway immunopathology of asthma with exercise-induced bronchoconstriction. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:586–593. [PubMed: 16159628]

118. Carraro S, Corradi M, Zanconato S, Alinovi R, Pasquale MF, Zacchello F, Baraldi E. Exhaled breath condensate cysteinyl leukotrienes are increased in children with exercise-induced bronchoconstriction. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:764–770. [PubMed: 15805996]
119. Hallstrand TS, Moody MW, Wurfel MM, Schwartz LB, Henderson WR Jr, Aitken ML. Inflammatory basis of exercise-induced bronchoconstriction. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:679–686. [PubMed: 15947280]
120. Mickleborough TD, Lindley MR, Ray S. Dietary salt, airway inflammation, and diffusion capacity in exercise-induced asthma. *Med Sci Sports Exerc* 2005;37:904–914. [PubMed: 15947713]
121. Hallstrand TS, Debley JS, Farin FM, Henderson WR Jr. Role of MUC5AC in the pathogenesis of exercise-induced bronchoconstriction. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:1092–1098. [PubMed: 17321575]
122. Hallstrand TS, Henderson WR Jr. Role of leukotrienes in exercise-induced bronchoconstriction. *Curr Allergy Asthma Rep* 2009;9:18–25. [PubMed: 19063820]
127. Pearlman DS, van Adelsberg J, Philip G, Tilles SA, Busse W, Hendeles L, Loeys T, Dass SB, Reiss TF. Onset and duration of protection against exercise-induced bronchoconstriction by a single oral dose of montelukast. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006;97:98–104. [PubMed: 16892789]
123. Philip G, Villaran C, Pearlman DS, Loeys T, Dass SB, Reiss TF. Protection against exercise-induced bronchoconstriction two hours after a single oral dose of montelukast. *J Asthma* 2007;44:213–217. [PubMed: 17454341]
124. Peroni DG, Piacentini GL, Ress M, Bodini A, Loiacono A, Aralla R, Boner AL. Time efficacy of a single dose of montelukast on exercise-induced asthma in children. *Pediatr Allergy Immunol* 2002;13:434–437. [PubMed: 12485319]

125. Coreno A, Skowronski M, West E, El-Ekiaby A, McFadden ER Jr. Bronchoprotective effects of single doses of salmeterol combined with montelukast in thermally induced bronchospasm. *Chest* 2005;127:1572–1578. [PubMed: 15888830]
126. Ries, A. L. et al. Pulmonary Rehabilitation : Joint ACCP/AACVPR Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest* 131, 4S–42S (2007).
127. Nici, L. et al. American Thoracic Society/European Respiratory Society statement on pulmonary rehabilitation. *American journal of respiratory and critical care medicine* 173, 1390–413 (2006)
128. Holland, A. E. & Hill, C. J. New horizons for pulmonary rehabilitation. *Physical Therapy Reviews* 16, 3–9 (2011)
129. Woods JA, Vieira VJ, Keylock KT. Exercise, inflammation, and innate immunity. *Neurol Clin.* 2006; 24:585-599.
130. Lomask M. Further exploration of the penh parameter. *Exp Toxicol Pathol.* 2006; 57:13-20.
131. Webb DC, McKenzie AN, Koskinen AM, Yang M, Mattes J, Foster PS. Integrated signals between IL-13, IL-4, and IL-5 regulate airways hyperreactivity. *J Immunol.* 2000; 165:108-113.
132. Fish JE, Peters S. Airway remodeling and persistent airway obstruction in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1999; 104:509-516.
133. Tanabe T, Shimokawaji T, Kanoh S, Rubin BK. Secretory phospholipases A2 are secreted from ciliated cells and increase mucin and eicosanoid secretion from goblet cells. *Chest.* 2014 Nov 27. doi: 10.1378/chest.14-0258. [Epub ahead of print]

8. Anexos

Anexo I



UNINOVE
Universidade Nove de Julho

Protocolo de Pesquisa referente ao Projeto nº AN0021_2013

Título do Projeto: A via dos leucotrienos contribui para os efeitos antiinflamatórios do treinamento físico aeróbio na asma?	
Orientador: Rodolfo de Paula Vieira	
Aluno: Ricardo Wesley Alberca Custódio	

Objetivos:
Avaliar os efeitos do TFA sobre a inflamação alérgica crônica das vias aéreas num modelo experimental de asma. Avaliar os efeitos do TFA sobre o remodelamento das vias aéreas num modelo experimental de asma. Avaliar os efeitos do TFA sobre os níveis de leucotrienos (LTB) (LTB4 e CysLTB) no lavado broncoalveolar e no homogenato de tecido pulmonar num modelo experimental de asma. Avaliar os efeitos do TFA sobre a expressão das sintases de leucotrienos, 5-lipoxygenase (5-LO) e LTC(4) sintase. Avaliar os efeitos do TFA sobre a expressão dos receptores de leucotrienos, receptor BLT1, receptor BLT2, receptor cysLT1 e receptor cysLT2.

Métodos:
Serão utilizados 20 camundongos C57Bl/6 machos, divididos em 4 grupos experimentais (Controle, n = 5), (Exercício, n = 5), (Asma, n = 5) e (Asma + Exercício, n = 5). O modelo de "asma" (inflamação pulmonar alérgica crônica) será induzido através de injeção intraperitoneal com ovalbumina nos dias 0 e 14, seguidos por inalação com solução de ovalbumina (1%) três vezes por semana, a partir do dia 21 até o dia 53 do protocolo experimental. O modelo de "exercício" realizará treinamento físico aeróbio de baixa intensidade, 5x/semana, 60 minutos/sessão.

Animais (procedência, raça, linhagem, número de animais, peso, sexo):
Procedência: Biotério de criação da UNINOVE
Raça/linhagem: *Mus musculus* (Camundongo), C57Bl/6 machos
Número de animais: 20
Peso: 20-25g
Sexo: C57Bl/6 machos

Condições de alojamento e nutrição:
Alimentação: Acesso à ração Labina Purina ad libitum; *fonte de água:* Acesso à água filtrada ad libitum; *lotação - Número de animais/area:* 5 animais por caixa no biotério de manutenção da UNINOVE; e *exaustão do ar.*

Medidas para evitar estresse e/ou dor nos animais:
Procedimento Anestésico e/ou Analgésico (incluir dose e vias de administração):
 Pentobarbital sódico (50mg/kg)
 Doses: 50 mg/kg, pela via intraperitoneal.

Descreve que não será usada manobra analgésica, pois:
 Refere não haver dor envolvida no modelo.

UNINOVE

Universidade Nove de Julho

Eutanásia: *Sob anestesia, e após coleta de 1ml de sangue, os animais serão eutanaziados através da retirada do coração. Esclarecemos ainda que em nenhuma hipótese os camundongos poderão ser sacrificados em câmara de CO2 pelo fato do CO2 interferir com as análises pulmonares que realizaremos.*

Pertinência e valor científico do estudo proposto:

Este estudo será relevante pois até o momento nenhum estudo avaliou os efeitos do treinamento físico aeróbio sobre a via dos leucotrienos na asma. Portanto, o presente estudo objetiva avaliar se os efeitos antiinflamatórios do treinamento físico aeróbio na asma é mediado, pelo menos em parte, pela inibição da síntese de leucotrienos ou mesmo pela inibição da expressão dos receptores de leucotrienos.

UNINOVE

Universidade Nove de Julho

Protocolo de Pesquisa referente ao Projeto nº AN0021_2013

Título do Projeto: A via dos leucotrienos contribui para os efeitos antiinflamatórios do treinamento físico aeróbio na asma?

Apresentado a esta Comissão para análise ética, foi considerado:

☒ **Aprovado**, sendo que este projeto deverá permanecer arquivado por 05 (cinco) anos nesta Secretaria.

☐ Com pendência, devendo o Pesquisador encaminhar as modificações sugeridas, e iniciar a coleta de dados somente após a aprovação do projeto por este Comitê.

☐ Não-Aprovado

Comentário:

Favor enviar relatório após a finalização do projeto.

São Paulo, 21 de novembro de 2013

Prof. Dra. Kátia De Angelis
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais da
Universidade Nove de Julho

UNINOVE



Universidade Nove de Julho

Protocolo de Pesquisa referente ao Projeto nº AN0021_2013

Título do Projeto: A via dos leucotrienos contribui para os efeitos antiinflamatórios do treinamento físico aeróbio na asma?

Orientador: Rodolfo de Paula Vieira

Aluno: Ricardo Wesley Alberca Custódio

Objetivos:

Avaliar os efeitos do TFA sobre a inflamação alérgica crônica das vias aéreas num modelo experimental de asma. Avaliar os efeitos do TFA sobre o remodelamento das vias aéreas num modelo experimental de asma. Avaliar os efeitos do TFA sobre os níveis de leucotrienos (LTB₄ e CysLTB) no lavado broncoalveolar e no homogenato de tecido pulmonar num modelo experimental de asma. Avaliar os efeitos do TFA sobre a expressão das sintases de leucotrienos, 5-lipoxygenase (5-LO) e LTC(4) sintase. Avaliar os efeitos do TFA sobre a expressão dos receptores de leucotrienos, receptor BLT1, receptor BLT2, receptor cysLT1 e receptor cysLT2.

Métodos:

Serão utilizados 60 camundongos C57Bl/6 machos, divididos em 4 grupos experimentais (Controle, n = 15), (Exercício, n = 15), (Asma, n = 15) e (Asma + Exercício, n = 15). O modelo de "asma" (inflamação pulmonar alérgica crônica) será induzido através de injeção intra-peritoneal com ovalbumina nos dias 0 e 14, seguidos por inalação com solução de ovalbumina (1%) três vezes por semana, a partir do dia 21 até o dia 53 do protocolo experimental. O modelo de "exercício" realizará treinamento físico aeróbio de baixa intensidade, 5x/semana, 60 minutos/sessão.

Animais (procedência, raça, linhagem, número de animais, peso, sexo):

Procedência: Biotério de criação da UNINOVE

Raça/linhagem: *Mus musculus* (Camundongo), C57Bl/6 machos

Número de animais: 60

Peso: 20-25g

Sexo: C57Bl/6 machos

Condições de alojamento e nutrição:

Alimentação: Acesso à ração Labina Purina ad libitum; fonte de água: Acesso à água filtrada ad libitum; lotação - Número de animais/area: 5 animais por caixa no biotério de manutenção da UNINOVE; e exaustão do ar.

Medidas para evitar estresse e/ou dor nos animais:

Procedimento Anestésico e/ou Analgésico (incluir dose e vias de administração):

Pentobarbital sódico (50mg/kg)

Doses: 50 mg/kg, pela via intraperitoneal.

Descreve que não será usada manobra analgésica, pois:

Refere não haver dor envolvida no modelo.

UNINOVE

Universidade Nove de Julho

Eutanásia: *Sob anestesia, e após coleta de 1ml de sangue, os animais serão eutanaziados através da retirada do coração. Esclarecemos ainda que em nenhuma hipótese os camundongos poderão ser sacrificados em câmara de CO2 pelo fato do CO2 interferir com as análises pulmonares que realizaremos.*

Pertinência e valor científico do estudo proposto:

Este estudo será relevante pois até o momento nenhum estudo avaliou os efeitos do treinamento físico aeróbio sobre a via dos leucotrienos na asma. Portanto, o presente estudo objetiva avaliar se os efeitos antiinflamatórios do treinamento físico aeróbio na asma é mediado, pelo menos em parte, pela inibição da síntese de leucotrienos ou mesmo pela inibição da expressão dos receptores de leucotrienos.

De acordo.

Início: 01/11/2014

Término: 31/02/2015

Apresentado a esta Comissão para análise ética, foi considerado:

(X) Aprovado, sendo que este projeto deverá permanecer arquivado por 05 (cinco) anos nesta Secretaria.

() Com pendência, devendo o Pesquisador encaminhar as modificações sugeridas, e iniciar a coleta de dados somente após a aprovação do projeto por este Comitê.

() Não-Aprovado

Comentário:

- Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEUA-UNINOVE, o relatório final sobre a pesquisa (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

São Paulo, 21 de outubro de 2014

Prof. Dra. Kátia De Angelis
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais da
Universidade Nove de Julho

Anexo II

Author's personal copy

Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 134 (2014) 57–63



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jphotobiol

Low level laser therapy reduces acute lung inflammation in a model of pulmonary and extrapulmonary LPS-induced ARDS



Manoel Carneiro Oliveira Jr.^a, Flávia Regina Greiffo^a, Nicole Cristine Rigonato-Oliveira^a, Ricardo Wesley Alberca Custódio^a, Vanessa Roza Silva^a, Nilsa Regina Damaceno-Rodrigues^b, Francine Maria Almeida^c, Regiane Albertini^a, Rodrigo Álvaro B. Lopes-Martins^a, Luis Vicente Franco de Oliveira^a, Paulo de Tarso Camillo de Carvalho^a, Ana Paula Ligeiro de Oliveira^a, Ernesto César P. Leal Jr.^a, Rodolfo P. Vieira^{a,*}

^a Nove de Julho University, Rua Vergueiro 239/245, São Paulo, SP CEP 01504-000, Brazil

^b University of São Paulo, School of Medicine, Department of Pathology (UM 59), Av. Doutor Arnaldo 455, São Paulo, SP CEP 01246-000, Brazil

^c University of São Paulo, School of Medicine, Department of Clinical Medicine (UM 20), Av. Doutor Arnaldo 455, São Paulo, SP CEP 01246-000, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 December 2013

Received in revised form 21 March 2014

Accepted 26 March 2014

Available online 4 April 2014

Keywords:

ARDS

LPS

LLLT

Lung inflammation

Cytokines

Bronchoalveolar lavage

ABSTRACT

The present study aimed to investigate the effects low level laser therapy (LLLT) in a LPS-induced pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome (ARDS) in BALB/c mice. Laser (830 nm laser, 9 J/cm², 35 mW, 80 s per point, 3 points per application) was applied in direct contact with skin, 1 h after LPS administration. Mice were distributed in control (n = 6; PBS), ARDS IT (n = 7; LPS orotracheally 10 µg/mouse), ARDS IP (n = 7; LPS intra-peritoneally 100 µg/mouse), ARDS IT + Laser (n = 9; LPS intra-tracheally 10 µg/mouse), ARDS IP + Laser (n = 9; LPS intra-peritoneally 100 µg/mouse). Twenty-four hours after last LPS administration, mice were studied for pulmonary inflammation by total and differential cell count in bronchoalveolar lavage (BAL), cytokines (IL-1β, IL-6, KC and TNF-α) levels in BAL fluid and also by quantitative analysis of neutrophils number in the lung parenchyma. LLLT significantly reduced pulmonary and extrapulmonary inflammation in LPS-induced ARDS, as demonstrated by reduced number of total cells (p < 0.001) and neutrophils (p < 0.001) in BAL, reduced levels of IL-1β, IL-6, KC and TNF-α in BAL fluid and in serum (p < 0.001), as well as the number of neutrophils in lung parenchyma (p < 0.001). LLLT is effective to reduce pulmonary inflammation in both pulmonary and extrapulmonary model of LPS-induced ARDS.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The acute respiratory distress syndrome (ARDS) is defined as respiratory failure from inflammatory response that leads to alteration of alveolar-capillary permeability, pulmonary edema and hypoxemia refractory to high oxygen flow [26,17]. Although several causes of ARDS result in a uniform pathology, in the last stage, evidence suggests that the pathophysiology may differ according to the type of primary insult. Thus, two forms of ARDS have been described: ARDS with direct effects on lung epithelial cells; ARDS reflecting lung involvement secondary to a systemic inflammatory response, being the center of the injury, the pulmonary endothelial cell [26,17].

Many studies show that the prevalence of intrapulmonary ARDS is higher when compared with extrapulmonary [23]. However [8] demonstrate an equal prevalence of both types, and this issue remains controversial [8]. From pulmonary causes, pneumonia is the most direct cause of injury, followed by aspiration of gastric contents and pulmonary trauma [23]. The rate of death from pulmonary and extrapulmonary insults varies considerably, however, [25], shows an increase in mortality in the group of direct etiology, while [8] found a direct relationship between lung injury and increased mortality.

The scientific literature has reported anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (LLLT) in models of acute lung injury [4–7]. Furthermore, a growing number of clinical studies are demonstrating the efficacy and safety of LLLT for different pulmonary diseases, as asthma and chronic obstructive pulmonary diseases (COPD) [15,9,10,14]. For instance, some studies also have demonstrated that application of LLLT for the treatment of patients with

* Corresponding author. Tel.: +55 11 3385 9222; fax: +55 11 3385 9066.

E-mail address: rodrelema@yahoo.com.br (R.P. Vieira).

chronic obstructive bronchitis accelerates the elimination of clinical symptoms, increases its efficiency, promotes drainage function of the bronchi, facilitates standardization the immune status of the patient, and contributes to the optimization of lipid peroxidation [10,14].

Therefore, the present study was designed aiming to fill a lack of information regarding the effects of LLLT in a model of pulmonary and extrapulmonary LPS-induced ARDS in BALB/c mice.

2. Materials and methods

2.1. Animals and experimental groups

Thirty-eight male BALB/c mice weighing between 25 and 30 g were obtained from the Animal Facility of the Nove de Julho University. All experimental procedures with animals care followed the international recommendations for the use and care of animals and were approved by the local ethical committee. All mice were housed in bright rooms with controlled temperature (21–23 °C) and humidity (45–65%) and 12–12 h light/dark cycle, with access to food and water *ad libitum*.

The animals were divided into 5 groups: control ($n = 6$), LPS orotracheal ($n = 7$), intra-peritoneal LPS ($n = 7$), orotracheal LPS + laser ($n = 9$), intra-LPS Laser peritoneal + ($n = 9$).

2.2. Pulmonary and extrapulmonary model of LPS-induced ARDS

For the pulmonary model of LPS-induced ARDS, under anesthesia (ketamine 100 mg/kg and xylazine 10 mg/kg), using a 100 μ l micropipette, animals received LPS (10 μ g/mouse) diluted in 50 μ l of PBS through an orotracheal instillation as previously described [27]. For the extrapulmonary model of LPS-induced ARDS, animals received LPS (100 μ g/mouse) diluted in 50 μ l of PBS through an intra-peritoneal injection.

2.3. LLLT protocol

One hour after LPS administration, LLLT treated groups received infrared laser administration [continuous wave, 830 nm, 3 J/cm², 35 MW, 80 s per point (3 points per application)], where point 1 was in the end part of trachea, point 2 in the right lung and the point 3 in the left lung, in direct contact with skin. These 3 points application totalized 240 s and an energy of 9 J/cm². In total, LLLT groups received the LLLT as described above for 3 times, in a 1 h interval between each application.

2.4. Blood collection, processing and analysis

Under anesthesia, the abdomen was open the 1 ml of blood was collected via cava vein using a syringe without anti-coagulant and immediately centrifuged at 950 g, 4 °C, during 7 min. The serum was collected and stored at –70 °C for cytokines measurement.

2.5. Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF)

Aiming to access lung inflammation, the number of total and differential cells count in BALF was performed. Briefly, under anesthesia, mice were submitted to tracheotomy and cannulated. Then, using a 1 ml syringe, a 3 \times 0.5 ml PBS washing was applied and the recovery material was centrifuged at 800 g, at 4 °C during 7 min. The supernatant was stored at –70 °C for cytokines analysis and the cell pellet was resuspended in 1 ml PBS. The number of total cells was counted using a hemacytometer (Neubauer chamber) and the differential cells count were

performed through a cytospin preparation, stained with Diff Quick and 300 cells were counted according to the hematological characteristic [13,20].

2.6. Inflammatory mediators in BALF and in serum

The levels of pro-inflammatory cytokines IL-1beta, IL-6, KC and TNF-alpha and of anti-inflammatory cytokine IL-10 was evaluated in the BALF according to the manufacturer's instructions.

2.7. Histomorphometric study

To evaluate the effects of LLLT on parenchymal inflammation, one the hallmarks of ARDS, the lungs were collected, fixed in 10% formalin and submitted to histological routine. Briefly, 5 μ m thick lung slices were stained with hematoxylin and eosin. Then, 15 aleatory fields of the lung parenchyma of each mouse were photographed. By using the software Image Pro Plus 4.0, the air and tissue area of all photomicrographs were determined. The number of polymorphonuclear (PMN) cells (notably neutrophils) was counted in each photo according the morphological criteria by an experienced research, blinded to the group's description. Then, the number of PMN cells per square millimeter of lung tissue was presented.

3. Results

3.1. Inflammation in Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) and in lung tissue in the pulmonary model of ARDS

Fig. 1 shows the inflammatory profile in BALF (total cells – panel 1A; neutrophils – panel 1B) and the number of polymorphonuclear cells (notably neutrophils – panel 1C) and the representative photomicrographs of control (panel 1D), LPS IT (panel 1E) and LPS IT + laser (panel F) in the pulmonary (IT) model of ARDS. The results shows that intra-tracheal administration of LPS significantly increased the number of total cells ($p < 0.001$) and neutrophils ($p < 0.001$) in BALF when compared with control group. On the other hand, LLLT significantly reduced the number of total cells ($p < 0.001$) and neutrophils ($p < 0.01$) when compared with LPS group. LLLT also significantly reduced the number of polymorphonuclear cells in the lung parenchyma ($p < 0.001$; panels 1C until 1F).

3.2. Cytokines levels in BALF in the pulmonary model of ARDS

Fig. 2 shows the levels of IL-1beta, IL-6, KC, TNF-alpha and IL-10 in BALF in a pulmonary model of ARDS (panels 2A–E, respectively). Panel 2A–D shows that LLLT significantly reduced intra-tracheal LPS increased IL-1beta, IL-6, KC and TNF-alpha ($p < 0.05$). Panel 2E shows that no differences in the levels of IL-10 were found when all groups were compared ($p > 0.05$).

3.3. Cytokines levels in serum in the pulmonary model of ARDS

Fig. 3 shows the serum levels of IL-6 and TNF-alpha in a pulmonary model of ARDS (panels 3A and 3B, respectively). In the panel 3A, the results show that LLLT significantly reduced intra-tracheal LPS increased IL-6 levels ($p < 0.01$). In panel 3B, the results show that LLLT significantly reduced intra-tracheal LPS increased TNF-alpha levels ($p < 0.001$).

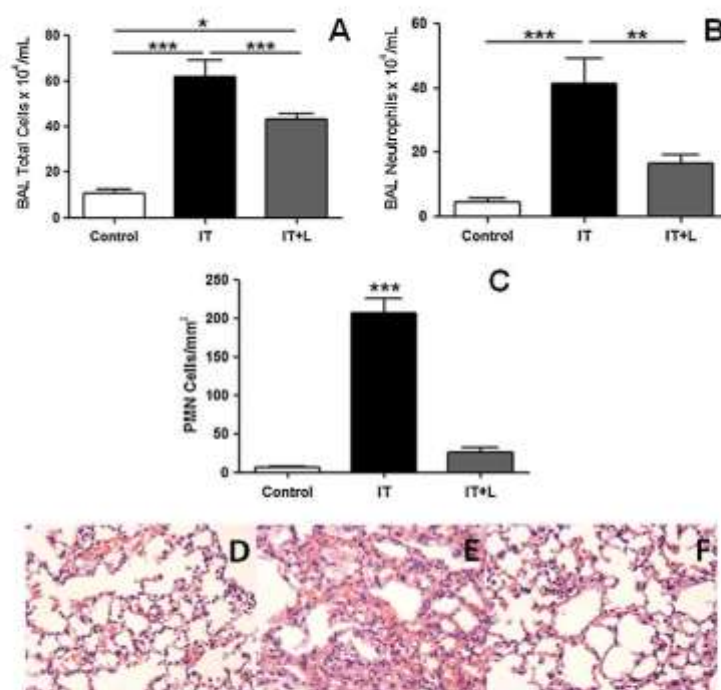


Fig. 1. Inflammatory profile in BALF (total cells – panel A; neutrophils – panel B) and the number of polymorphonuclear cells in the lung parenchyma (notably neutrophils – panel C) and the representative photomicrographs of control (panel D), LPS IT (panel E) and LPS IT + laser (panel F) in the pulmonary (IT) model of ARDS. In panel A, B and C, *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$.

3.4. Inflammation in Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) and in lung tissue in the extrapulmonary model of ARDS

Fig. 4 shows the inflammatory profile in BALF (total cells – panel 4A; neutrophils – panel 4B) and the number of polymorphonuclear cells (notably neutrophils – panel 4C) and the representative photomicrographs of control (panel 4D), LPS IP (panel 4E) and LPS IP + laser (panel 4F) in the extrapulmonary (IP) model of ARDS. The results show that intra-peritoneal (IP) administration of LPS significantly increased the number of total cells ($p < 0.001$) and neutrophils ($p < 0.001$) in BALF when compared with control group. On the other hand, LLLT significantly reduced the number of total cells ($p < 0.001$) and neutrophils ($p < 0.001$) when compared with LPS group. LLLT also significantly reduced the number of polymorphonuclear cells in the lung parenchyma ($p < 0.001$; panels 4C until 4F).

3.5. Cytokines levels in BALF in the extrapulmonary model of ARDS

Fig. 5 shows the levels of IL-1 β , IL-6, KC, TNF- α and IL-10 in BALF in a pulmonary model of ARDS (panels 5A–E, respectively). Panel 5A shows that intra-peritoneal LPS administration significantly increased the levels of IL-1 β ($p < 0.001$), while LLLT significantly reduced its levels, compared with LPS group ($p < 0.01$). Panel 5B and 5C shows that intra-peritoneal LPS administration significantly increased the levels of IL-6 ($p < 0.001$) and KC ($p < 0.001$), respectively, while LLLT significantly reduced its levels, compared with LPS group ($p < 0.001$). Panel 5D shows that while intra-peritoneal LPS

administration significantly increased the levels of TNF- α ($p < 0.01$), LLLT significantly reduced its levels ($p < 0.01$). Similarly to intra-tracheal model of intra-pulmonary ARDS, in the extrapulmonary model of ARDS (intra-peritoneal LPS administration), no differences were observed in the levels of IL-10 ($p > 0.05$).

3.6. Cytokines levels in serum in the pulmonary model of ARDS

Fig. 6 shows the serum levels of IL-6 and TNF- α in an extrapulmonary model of ARDS (panels 6A and 6B, respectively). In the panel 6A, the results show that LLLT significantly reduced intra-peritoneal LPS increased IL-6 levels ($p < 0.001$). In panel 6B, the results show that LLLT significantly reduced intra-peritoneal LPS increased TNF- α levels ($p < 0.05$).

4. Discussion

The present study showed for the first time the effects of LLLT (830 nm) reducing the acute pulmonary inflammation in a pulmonary and extrapulmonary model of LPS-induced ARDS in BALB/c mice, revealing that LLLT (830 nm) may inhibit acute pulmonary inflammation independent of etiology of primary insult.

Acute respiratory distress syndrome (ARDS) presents high rates of morbidity and mortality and the amount and the state (activation and apoptosis rate) of the neutrophils may be correlated with the diseases severity and prognosis [11]. In the present study, we found that both models (pulmonary and extrapulmonary) of LPS-induced ARDS significantly increased the migration

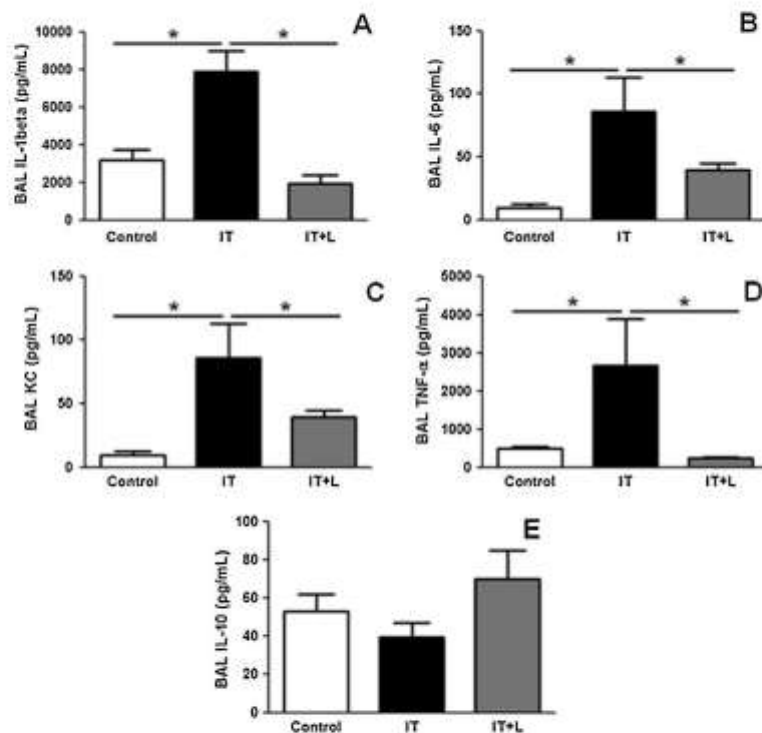


Fig. 2. Cytokines levels (IL-1beta, IL-6, KC, TNF-alpha and IL-10) in BALF in a pulmonary (IT) model of ARDS, in panel A, B, C and D, * $p < 0.05$.

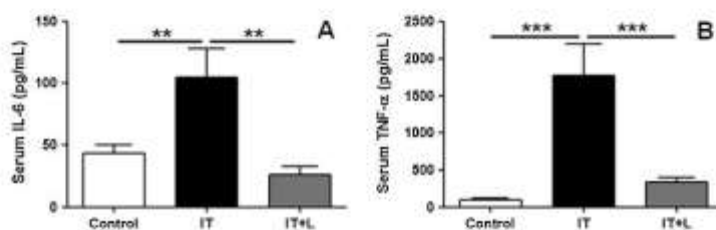


Fig. 3. Cytokines levels (IL-6 and TNF-alpha) in serum in a pulmonary (IT) model of ARDS [panels A and B, respectively]. In panel A, ** $p < 0.01$ and in panel B, *** $p < 0.001$.

of neutrophils to the lungs, accordingly to the previous studies [17,23,13,20]. In the physiopathology of ARDS, neutrophils contribute to the lung injury releasing several mediators, i.e. free radicals, proteases, cytokines and chemokines [17]. Furthermore, the activation of neutrophils has been directly linked with ARDS' severity and mortality [11]. In this way, our results showed that LLT was effective to reduce the migration of neutrophils to the lungs, as demonstrated through neutrophils counting in bronchoalveolar lavage and also by the quantitative analysis of the neutrophils number in the lung parenchyma. These anti-inflammatory effects of LLT on neutrophils recruitment is particularly important, since that such effect was observed in pulmonary and extrapulmonary model of LPS-induced ARDS, reinforcing the beneficial effects of LLT independent of the diseases etiology. This results are also in

agreement with previous studies that have demonstrated that LLT was able to reduce neutrophils migration in model of intestinal ischemia-reperfusion induce ARDS [4–7].

The modulation of neutrophilic inflammation in ARDS have been attributed to release of several pro-inflammatory cytokines, for instance, IL-1beta, IL-6, IL-8 and TNF-alpha [17]. Interleukin 1 beta (IL-1beta) is a potent pro-inflammatory cytokine and its increased levels in patients developing ARDS are related with poor prognosis of disease [19]. IL-1beta is thought to play a central role in the beginning of inflammatory process and the neutrophils to be the main source of IL-1beta release in during diverse inflammatory response [3]. IL-1beta also increases neutrophils survival, contributing for non-resolution of the inflammation [3]. In the present study we found increased levels of IL-1beta in both, pulmonary

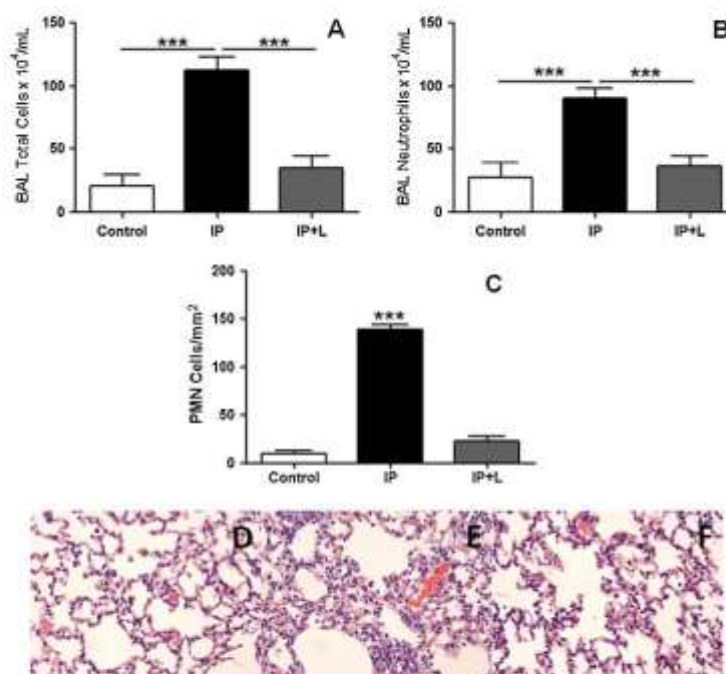


Fig. 4. Inflammatory profile in BALF (total cells – panel A; neutrophils – panel B) and the number of polymorphonuclear cells in the lung parenchyma (notably neutrophils – panel C) and the representative photomicrographs of control (panel D), LPS i.t. (panel E) and LPS i.t. + laser (panel F) in the extra-pulmonary (IP) model of ARDS. In panel A, B and C, ****p* < 0.001.

and extrapulmonary models of ARDS, in agreement with the current literature [17,3]. The present study also revealed that LLLT was capable to decrease the levels of IL-1beta in both models of ARDS, pointing out the inhibitory effects of LLLT on the pro-inflammatory mediators involved in the pathophysiology of ARDS. Of note, a study has been found similar results concerning the suppressive effects of LLLT on the levels of IL-1beta, however, in a model of extra-pulmonary LPS-induced ARDS in rats [2].

Interleukin 6 (IL-6) is considered a pleiotropic cytokine, presenting a central role in the pathophysiology of ARDS, beyond to be correlated with poor prognosis for disease [19,3,22,21]. The levels of IL-6 are increased in the lungs and also in the blood of humans and also in animal models of ARDS [19,3,22,21]. In the present study we found increased levels of IL-6 in Bronchoalveolar Lavage Fluid and in serum of mice in both pulmonary and extrapulmonary model of LPS-induced ARDS. Of note, in both models, LLLT was able to significantly reduce IL-6 levels in Bronchoalveolar Lavage Fluid and also in serum, to values very close to values of control group. These findings are extremely relevant, since that increased levels of IL-6 are involved in the perpetuation of the inflammatory state and also in pro-coagulant response in ARDS [19,12].

Interleukin 8 (IL-8) and its functional homologue in mice (CXCL1/KC) present a central role in the pathophysiology of ARDS, primarily mediating the chemotaxis for neutrophils [19,3]. However, IL-8 and CXCL1/KC also presents other important effects in the inflammatory process in ARDS, for instance, increasing of neutrophils survival [19,3,18], and also are related with ARDS severity

and mortality. In the present study we found that in both models (pulmonary and extrapulmonary) of LPS-induced ARDS the pulmonary levels of CXCL1/KC are significantly elevated. On the other hand, in the present study, we also found that LLLT significantly reduced the pulmonary levels of CXCL1/KC, event that may be involved in the anti-inflammatory effects of LLLT.

Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) is a cytokine involved in neutrophils adhesion and activation, and coagulation and edema formation, especially during events of acute lung inflammation [24,1]. This cytokine is accredited to be involved in IL-6 stimulation and release, playing a central role in the inflammatory process in ARDS [24,1]. Also, increased levels of TNF-alpha are found in the lungs and also in the systemic circulation of patients developing ARDS, reinforcing its role in the pathophysiology of the disease [19,22,21]. In the present study we found that the pulmonary and the extra-pulmonary model of LPS-induced ARDS coherently induced increases in the BALF and serum levels of TNF-alpha. On the contrary, LLLT significantly reduced the TNF-alpha levels in both models and also in both sites, in the lungs (in BALF) and also in the systemic circulation (in serum). These inhibitory effects of LLLT are particularly important, considering the potent pro-inflammatory effects and the central role of TNF-alpha in the pathophysiology of ARDS. Also, these results are in agreement with previous studies that have demonstrated that LLLT significantly reduced the mRNA expression of TNF-alpha in a model of immune-complex induce lung injury [1] and also in an ex-vivo study using rat bronchi, where LLLT reduced bronchi hyper reactivity to cholinergic agonist through a TNF-alpha dependent mechanism [16].

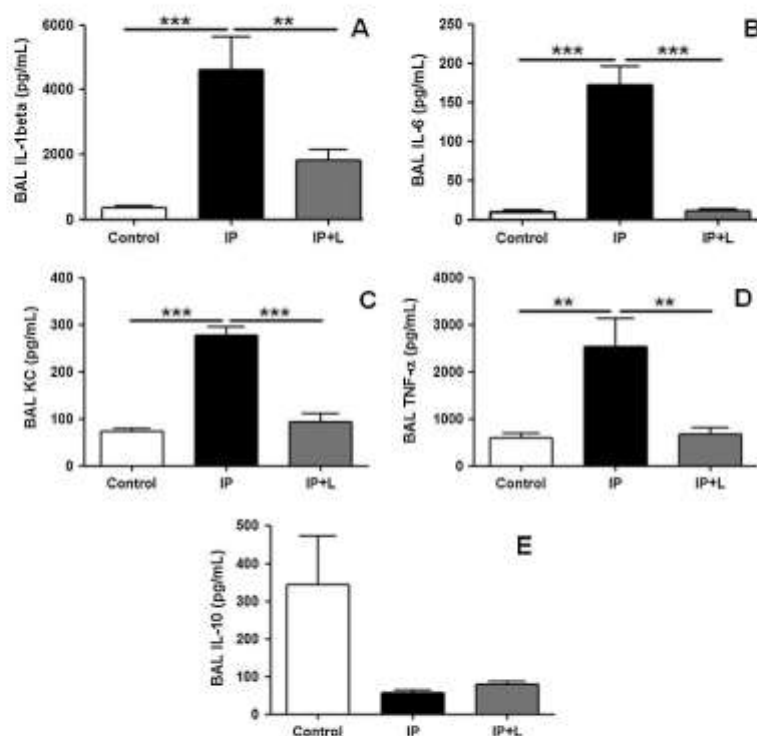


Fig. 5. Cytokines levels (IL-1beta, IL-6, KC, TNF-alpha and IL-10) in BALF in a extrapulmonary (IP) model of ARDS. In panel A, B, C and D, *** $p < 0.001$ and ** $p < 0.01$.

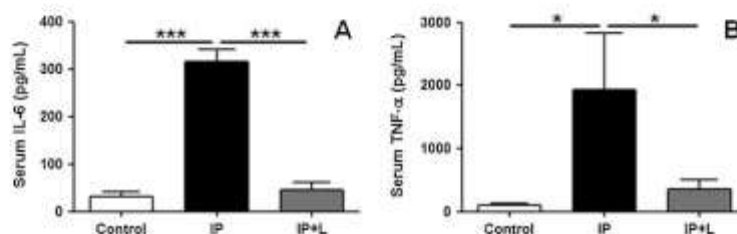


Fig. 6. Cytokines levels (IL-6 and TNF-alpha) in serum in an extrapulmonary (IP) model of ARDS (panels A and B, respectively). In panel A, *** $p < 0.001$ and in panel B, * $p < 0.05$.

Therefore, we conclude that LLLT present important anti-inflammatory effects against the LPS-induced acute respiratory distress syndrome, independent of etiology of disease.

Conflict of interest

None.

Acknowledgements

This study was supported by FAPESP (2012/15165-2) and Nove de Julho University – UNINOVE. Manoel Carneiro de Oliveira-Filho has received a master's fellowship from UNINOVE. Flavia Regina Greiffo has received a master's fellowship from FAPESP (2012/

23305-9). Ricardo Wesley Alberca Custodio has received a master's fellowship from FAPESP (2012/21519-1).

References

- [1] F. Aimbire, R. Albertini, M.T.T. Pacheco, H.C. Castro-Faria-Neto, P.S.L.M. Leonardo, V.V. Iversen, R.A.B. Lopes-Martins, J.M. Bjundal, Low-level laser therapy induces dose-dependent reduction of TNF's levels in acute inflammation, *Photo Laser Surg.* 24 (1) (2006) 33–37.
- [2] F. Aimbire, A.P. Ligeiro de Oliveira, R. Albertini, J.C. Cunha, C.B. Ladeira de Campos, J.P. Lyon, J.A. Silva Jr., M.S. Costa, Low level laser therapy (LLLT) decreases pulmonary microvascular leakage, neutrophil influx and IL-1β levels in airway and lung from rat subjected to LPS-induced inflammation, *Inflammation* 31 (3) (2008) 188–197.
- [3] J.S. Cho, Y. Guo, R.I. Ramai, F. Heiboni, S.B. Plaisier, C. Xuan, J.L. Granick, H. Matsushima, A. Takashima, Y. Iwakura, A.L. Chung, G. Cheng, D.J. Lee, S.J. Simon, I.S. Miller, Neutrophil-derived IL-1β is sufficient for abscess formation in

- immunity against *Staphylococcus aureus* in mice, *PLoS Pathogens* 8 (11) (2012) e1003047.
- [4] F.M. De Lima, R. Albertini, Y. Dantas, A.L. Maia-Filho, L. Santana Ede, H.C. Castro-Faria-Neto, C. França, A.B. Villavende, F. Aimbire, Low-level laser therapy restores the oxidative stress balance in acute lung injury induced by gut ischemia and reperfusion, *Photochem. Photobiol.* 89 (1) (2013) 179–188.
 - [5] F.M. De Lima, L.M. Moreira, A.B. Villavende, R. Albertini, H.C. Castro-Faria-Neto, F. Aimbire, Low-level laser therapy (LLLT) acts as cAMP-elevating agent in acute respiratory distress syndrome, *Lasers Med. Sci.* 26 (3) (2011) 389–400.
 - [6] F.M. De Lima, A.B. Villavende, R. Albertini, J.C. Coróia, R.L. Carvalho, E. Muniz, T. Araújo, J.A. Silva, F. Aimbire, Dual effect of low-level laser therapy (LLLT) on the acute lung inflammation induced by intestinal ischemia and reperfusion: Action on anti- and pro-inflammatory cytokines, *Lasers Surg. Med.* 43 (5) (2011) 410–420.
 - [7] F.M. De Lima, L. Vitorini, F. Coelho, R. Albertini, A.C. Breithaupt-Faloppa, W.T. de Lima, F. Aimbire, Suppressive effect of low-level laser therapy on tracheal hyper responsiveness and lung inflammation in rat subjected to intestinal ischemia and reperfusion, *Lasers Med. Sci.* 28 (2) (2013) 551–564.
 - [8] M.D. Eisner, T. Thompson, L.D. Hudson, J.M. Luce, D. Hayden, D. Schoenfeld, M.A. Matthay, Acute Respiratory Distress Syndrome Network, Efficacy of low tidal volume ventilation in patients with different clinical risk factors for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164 (2) (2001) 231–236.
 - [9] N.A. Faradzheva, Efficiency of a combination of fulvaerensis and helium-neon laser in the multimodality treatment of patients with bronchial asthma, *Probl. Tuberk. Bolon Legk.* 8 (2007) 50–53.
 - [10] U.R. Farkhutdinov, Sh.U. Farkhutdinov, Effect of laser radiation on production of reactive oxygen species in the blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease, *Bull. Exp. Biol. Med.* 144 (2) (2007) 238–240.
 - [11] L. Flalkow, L. Fochecatto Filho, M.C. Bozzetti, A.R. Milani, E.M. Rodrigues Filho, R.M. Lufinski, P. Pierozzi, R.M. de Moura, J.C. Prolla, E. Vachon, G.P. Downey, Neutrophil apoptosis: a marker of disease severity in sepsis and sepsis-induced acute respiratory distress syndrome, *Critical Care* 10 (6) (2006) R155.
 - [12] P.K. Fu, C.L. Wu, T.H. Tsai, C.L. Hsieh, Anti-inflammatory and anticoagulative effects of paenol on LPS-induced acute lung injury in rats, *Evid. Based. Compl. Altern. Med.* (2012) 837533.
 - [13] C.T.R. Gonçalves, C.G.R. Gonçalves, F.M. Almeida, E.D.T.Q.S. Lopes, L.F.F. Silva, T. Marcourakis, H.C. Castro-Faria-Neto, R.P. Vieira, M. Dolnikoff, Protective effects of aerobic exercise on acute lung injury induced by LPS in mice, *Critical Care* 16 (5) (2012) R199.
 - [14] E.P. Kashanikata, A.A. Fedorov, Low-intensity laser radiation in the combined treatment of patients with chronic obstructive bronchitis, *Vopr. Kiroch. Fizioter. lech. Fiz. Kult.* 2 (2009) 19–22.
 - [15] Iu.S. Lamyshlev, N.V. Aydeeva, N.D. Gaborov, N.P. Krasavina, G.A. Tikhonova, S.I. Tkacheva, Efficacy of low intensity laser irradiation and sodium nedocronal in the complex treatment of patients with bronchial asthma, *Ver. Arkh.* 74 (3) (2002) 25–28.
 - [16] F. Malra de Lima, M.S. Costa, R. Albertini, J.A. Silva Jr, F. Aimbire, Low level laser therapy (LLLT): attenuation of cholinergic hyperactivity R2-adrenergic hyporesponsiveness and TNF- α mRNA expression in rat bronchi segments in E. coli lipopolysaccharide-induced airway inflammation by a NF- κ B dependent mechanism, *Lasers Surg. Med.* 41 (1) (2009) 68–74.
 - [17] G. Matute-Bello, C.W. Frevert, T.R. Martin, Animal models of acute lung injury, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 295 (3) (2008) L379–L399.
 - [18] H.M. McGettrick, J.M. Lord, K.Q. Wang, G.E. Rainger, C.D. Buckley, G.B. Nash, Chemokine- and adhesion-dependent survival of neutrophils after transmigration through cytokine-stimulated endothelium, *J. Leukocyte Biol.* 79 (4) (2006) 779–788.
 - [19] G.U. Meduri, S. Headley, G. Kohler, F. Stein, E. Tulley, et al., Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ARDS. Plasma IL-1 beta and IL-6 levels are consistent and efficient predictors of outcome over time, *Chest* 107 (4) (1995) 1062–1073.
 - [20] D.S. Ramos, C.R. Olivo, F.D.T.Q.S. Lopes, A.C. Toledo, M.A. Martins, R.A.L. Osório, M. Dolnikoff, W. Ribeiro, R.P. Vieira, Low-intensity swimming training partially inhibits lipopolysaccharide-induced acute lung injury, *Med. Sci. Sports Exerc.* 42 (1) (2010) 113–119.
 - [21] M. Rojas, R.E. Parker, N. Thuen, C. Carretero, S.S. Iyer, M. Bueno, L. Mraz, N. Cantares, A.L. Mota, A.A. Stencenko, K.L. Brigham, Infusion of freshly isolated autologous bone marrow derived mononuclear cells prevents endotoxin-induced lung injury in an ex-vivo perfused swine model, *Stem Cell Res. Ther.* 4 (2) (2013) 26.
 - [22] O.F. Sharifov, X. Xu, A. Gaggari, W.E. Grizzle, V.K. Mishra, J. Horvath, S.H. Litovsky, M.N. Palgunachari, C.R. White, G.M. Ananthasubalan, H. Gupta, Anti-inflammatory mechanisms of apolipoprotein a-I mimetic peptide in acute respiratory distress syndrome secondary to sepsis, *PLoS One* 8 (5) (2013) e64486.
 - [23] P.L. Silva, C.S. Garcia, P.A. Mantas, V.R. Cagido, E.M. Negri, M.R. Damasceno-Rodrigues, G.M. Ventura, P.T. Bozza, W.A. Zin, V.L. Capeluzi, P. Pelosi, P.R. Rocco, Early short-term versus prolonged low-dose methylprednisolone therapy in acute lung injury, *Eur. Respir. J.* 33 (3) (2009) 634–645.
 - [24] D.G. Souza, A.C. Soares, V. Pinhu, et al., Increased mortality and inflammation in tumor necrosis factor- α stimulated gene-14 transgenic mice after ischemia and reperfusion injury, *Am. J. Pathol.* 160 (5) (2002) 1755–1765.
 - [25] G. Senthilalingam, K. Regan, B.F. Kengh, C.J. Morgan, T.W. Evans, Influence of direct and indirect etiology on acute outcome and 6-month functional recovery in acute respiratory distress syndrome, *Crit. Care Med.* 29 (3) (2001) 562–568.
 - [26] The ARDS Definition Task Force, Acute respiratory distress syndrome: the Berlin definition, *JAMA* 307 (23) (2012) 2526–2533.
 - [27] R.P. Vieira, T. Müller, M. Grimm, V. von Gerner, B. Voth, T. Dörk, S. Cicko, C.K. Ayata, S. Sorichter, B. Hubay, R. Zisot, D. Ferrari, A. Kirischuk, G. Zsöel, J.C. Virchow, J.M. Boeyens, M. Ildiz, Purinergic receptor type 8 contributes to airway inflammation and remodeling in experimental allergic airway inflammation, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 184 (2) (2011) 215–223.