

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA**

**JEFFERSON COMIN JONCO AQUINO JUNIOR**

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO SOBRE A RESPOSTA  
PULMONAR E SISTÊMICA DE CAMUNDONGOS OBESOS ASMÁTICOS**

**São Paulo, SP  
2015**

JEFFERSON COMIN JONCO AQUINO JUNIOR

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO SOBRE A RESPOSTA  
PULMONAR E SISTÊMICA DE CAMUNDONGOS OBESOS ASMÁTICOS**

Dissertação apresentada à  
Universidade Nove de Julho  
para obtenção do título de  
Mestre em Medicina

Orientador: Prof. Dr. Rodolfo  
de Paula Vieira

**São Paulo, SP  
2015**

## FICHA CATALOGRÁFICA

**Aquino Junior, Jefferson Comin Jonco.**

***Efeitos do treinamento físico aeróbio sobre a resposta pulmonar e sistêmica de camundongos obesos./Jefferson Comin Jonco Junior. 2015.***

**111 f.**

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

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

***1. Asma. 2. Exercício. 3. Inflamação. 4.Pulmão. 5.Obesidade. 6.Imunologia. 7.Treinamento aeróbio.***

***I. Vieira, Rodolfo de Paula. II. Título***

**CDU 616**


São Paulo, 17 de dezembro de 2015.

**TERMO DE APROVAÇÃO**

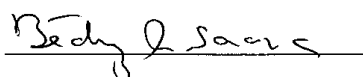
Aluno: Jefferson Comin Jonco Aquino Júnior

Título da Dissertação: **“Efeitos do treinamento físico aeróbico sobre a resposta pulmonar e sistêmica de camundongos obesos asmáticos”.**

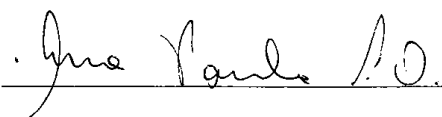
Presidente: Prof. Dr. Rodolfo de Paula Vieira



Membro: Profa. Dra. Beatriz Saraiva Manguiera Romanholo



Membro: Profa. Dra. Ana Paula Ligeiro de Oliveira



## **DEDICATÓRIA**

Dedico a conclusão deste mestrado a minha estimada mãe Maristela Comin, por ter me incentivado durante toda a minha vida e ter dado suporte a realização dos meus sonhos e ambições.

A minha avó Neyde Comin e meu avô Zito, por terem me educado e me ensinado sobre os valores da vida.

Aos meus irmãos Rodrigo Szabo e Alessandra Maria Szabo, por sempre me alegrarem com sua simples presença. Meus tios, Pedro Sávio Vaz de Lima e Monica Monninger pelo apoio.

A minha amada companheira Ana Roberta Almeida de Oliveira, que partilhou das minhas aflições, mas sempre me serviu de alicerce para que eu pudesse prosseguir com a certeza de estar optando pelo caminho certo. E que além disso, também compactua dos mesmos ideais que os meus.

Ao meu Prof. Francisco Santana Júnior por ter apresentado o esporte que me fez chegar até aqui, mas que sempre irá me servir como filosofia de vida. Bem como a minha equipe e família.

Dedico também aos meus amigos que me alegram durante os momentos de dificuldade.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por eu poder me levantar todos os dias e ir em busca dos meus objetivos, sempre com fé e esperança para transpor as barreiras impostas pelas adversidades.

Aos seres que involuntariamente me cederam à vida em prol do conhecimento científico.

A Universidade Nove de Julho (UNINOVE), todo corpo docente da pós-graduação Stricto Sensu, direção e administração, pela oportunidade concedida.

Meu orientador o Prof. Dr. Rodolfo de Paula Vieira, pelo suporte e por ter acreditado no meu potencial, visando melhorar as minhas habilidades e formação.

A Prof. Dra. Ana Paula Ligeiro de Oliveira pela ajuda e conselhos. Bem como aos meus colegas e amigos do Laboratório de Imunologia Pulmonar e do Exercício (LABPEI): Ana Roberta Almeida, Manoel Carneiro, Erasmo Assumpção, Alana Dias, Auriléia Aparecida Brito, Nicole Rigonato-Oliveira, Gabriel Moraes, Thomas Durigon, Elias El-Mafarjeh, Ricardo Wesley e Paulo Rogério Pereira.

Gostaria de agradecer ao professor Dr. Mário José Abdalla Saad da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pela colaboração para que o projeto fosse desenvolvido. E também aos professores Dr. Luiz Osório Leiria e Dra. Dioze Guadagnini, pelo comprometimento e disposição ao decorrer do projeto.

Aos professores da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), Dr. Milton de Arruda Martins e Dra. Fernanda Magalhães Arantes Costa do Laboratório de Investigações Médicas 20 (LIM20).

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por fornecer apoio financeiro concedido pelos projetos 2014/12755-9 e 2012/15165-2, para que o projeto proposto fosse realizado buscando a contribuição ao mundo acadêmico e científico.

## RESUMO

Asma é uma doença inflamatória crônica, que acomete as vias aéreas com remodelamento e hiper-reatividade. A obesidade pode influir no desenvolvimento e gravidade da asma. O treinamento físico aeróbio (TA), apresenta efeitos anti-inflamatórios nas vias aéreas dos asmáticos reduzindo a inflamação sistêmica. Utilizando um modelo experimental de asma em camundongos obesos, objetivamos avaliar os efeitos do treinamento físico aeróbio na inflamação, remodelamento e reatividades das vias aéreas. Foram usados 40 camundongos C57Bl/6 machos pesando entre 18-22 gramas, divididos em: (n = 8 / grupo): Controle (C), Controle Obeso (CO), Exercício Obeso (EO), Asma (HDM), Asma e Obeso (HDMO), Exercício Asma Obeso (EHO). Os animais foram inicialmente submetidos à uma dieta hiperlipídica durante 10 semanas, seguido do protocolo de indução de "asma" via administração de 100ug de HDM (*Dermatophagoides pteronyssinus* - HDM) via intra-traqueal, (1X/semana, por 8 semanas). O treinamento físico aeróbio em esteira (60% da intensidade máxima, 25% de inclinação, 1h/sessão, 5x/semana, durante 5 semanas) com início após a terceira administração de HDM. Foram avaliados, a reatividade brônquica, a celularidade no lavado broncoalveolar (LAB), o diferencial de células na parede das vias aéreas, o remodelamento brônquico, e citocinas (Th1, Th2, Th17 e adipocinas) no lavado broncoalveolar e no soro. Foram encontradas aumento de células no LAB e no soro, bem como o de citocinas pró-inflamatórias, fibras de colágeno e elásticas no grupo HDMO em comparação com os demais. O TA foi capaz de aumentar os níveis de IL 10 no LAB, sendo capaz de reverter diversos aspectos inflamatórios e estruturais da asma.

Palavras-chave: asma, exercício, inflamação, pulmão, obesidade, imunologia, treinamento aeróbio

## ABSTRACT

Asthma is a chronic inflammatory disease that affects the airways with remodeling and hyper-reactivity. Obesity can influence the development and severity of asthma. The aerobic training (AT), has anti-inflammatory effects in the airways of asthmatics reducing systemic inflammation. Using an experimental model of asthma in obese mice, aimed to assess the effects of aerobic exercise training on inflammation, remodeling and airway reactivity. Were used 40 mice C57BL / 6 mice weighing between 18-22 grams, divided into: (n = 8 / group): control (C), Obese Control (CO), Exercise Obese (EO), Asthma (HDM), Asthma and Obese (HDMO), Exercise Asthma Obese (EHO). The animals were initially subjected to a high-fat diet for 10 weeks, followed by the induction protocol "asthma" means administration of 100ug of HDM (Dermatophagoides pteronyssinus - HDM) intra-tracheal (1X / week for 8 weeks). The aerobic treadmill training (60% of full power, 25% grade, 1h / session, 5x / week for 5 weeks) beginning after the third administration of HDM. Were evaluated bronchial responsiveness, cell in bronchoalveolar lavage (BAL), differential cells in the airway wall, the bronchial remodeling, and cytokines (Th1, Th2, Th17 and adipokines) in bronchoalveolar lavage fluid and serum. They found an increase of the LAB cells and serum, as well as the pro-inflammatory cytokines, collagen and elastic fibers in HDM group compared with the other. The AT could increase IL-10 levels in the LAB, being able to reverse many of the structural and inflammatory aspects of asthma.

Keywords: asthma, exercise, inflammation, lung, obesity, immunology, aerobic training



## Sumário

1 Introdução .....	1
2 Objetivos .....	9
2.1 Objetivo Geral .....	9
2.2 Objetivos Específicos .....	10
3 Materiais e métodos .....	10
3.1 Animais e grupos experimentais .....	10
3.2 Modelo experimental de obesidade .....	10
3.3 Modelo experimental de "asma" - inflamação pulmonar alérgica crônica usando <i>House Dust Mite (HDM)</i> .....	11
3.4 Treinamento físico aeróbio de intensidade moderada como intervenção terapêutica (treinamento iniciando após o estabelecimento da obesidade e da inflamação pulmonar alérgica crônica) .....	11
3.5 Avaliação da inflamação pulmonar no lavado broncoalveolar (LBA) .....	12
3.6 Avaliação dos níveis de citocinas no LBA e no soro por ELISA .....	12
3.7 Avaliação da inflamação e remodelamento das vias aéreas através da histologia .....	13
3.8 Avaliação da reatividade pulmonar .....	13
3.9 Avaliação da glicêmica .....	13
3.10 Análise estatística .....	14
4 Resultados .....	14
5 Discussão .....	78
6 Considerações Finais .....	86
Referências .....	87
ANEXO I .....	97

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Massa Corporal Inicial.....	15
<b>Figura 2</b> - Massa corporal segunda pesagem .....	16
<b>Figura 3</b> - Massa corporal terceira pesagem .....	17
<b>Figura 4</b> - Massa corporal quarta pesagem .....	18
<b>Figura 5</b> - Massa corporal, pesagem final .....	19
<b>Figura 6</b> - Dextro inicial.....	20
<b>Figura 7</b> - Dextro final .....	21
<b>Figura 8</b> - Dextro comparativo .....	22
<b>Figura 9</b> - Células totais no LBA .....	23
<b>Figura 10</b> - Eosinófilos no LBA .....	24
<b>Figura 11</b> - Neutrófilos no LBA .....	25
<b>Figura 12</b> - Linfócitos no LBA .....	26
<b>Figura 13</b> - Macrófagos no LBA.....	27
<b>Figura 14</b> - Células totais no sangue .....	28
<b>Figura 15</b> - Eosinófilos no sangue .....	29
<b>Figura 16</b> - Neutrófilos no sangue .....	30
<b>Figura 17</b> - Linfócitos no sangue .....	31
<b>Figura 18</b> - Macrófagos no sangue.....	32
<b>Figura 19</b> - Interleucina 1ra no LBA.....	33
<b>Figura 20</b> - Interleucina 4 no LBA .....	34
<b>Figura 21</b> - Interleucina 5 no LBA .....	35
<b>Figura 22</b> - Interleucina 6 no LBA .....	36
<b>Figura 23</b> - Interleucina 10 no LBA .....	37
<b>Figura 24</b> - Interleucina 13 no LBA .....	38
<b>Figura 25</b> - Interleucina 17 no LBA .....	40
<b>Figura 26</b> - Interleucina 23 no LBA .....	41
<b>Figura 27</b> - TNF $\alpha$ no LBA .....	42
<b>Figura 28</b> - Adiponectina no LBA.....	43
<b>Figura 29</b> - Leptina no LBA.....	44
<b>Figura 30</b> - Resistina no LBA.....	45
<b>Figura 31</b> - CXCL1/KC no LBA .....	46
<b>Figura 32</b> - Interleucina 1 $\beta$ no LBA .....	47

<b>Figura 33</b> - Interleucina 1ra no soro.....	48
<b>Figura 34</b> - Interleucina 4 no soro.....	49
<b>Figura 35</b> - Interleucina 5 no soro.....	50
<b>Figura 36</b> - Interleucina 6 no soro.....	51
<b>Figura 37</b> - Interleucina 10 no soro.....	52
<b>Figura 38</b> - Interleucina 13 no soro.....	53
<b>Figura 39</b> - Interleucina 17 no soro.....	54
<b>Figura 40</b> - Interleucina 23 no soro.....	55
<b>Figura 41</b> - TNF $\alpha$ no Soro.....	56
<b>Figura 42</b> - Adiponectina no soro.....	57
<b>Figura 43</b> - Leptina no soro.....	58
<b>Figura 44</b> - Resistina no soro.....	59
<b>Figura 45</b> - CXCL1/KC no soro.....	60
<b>Figura 46</b> - Interleucina 1 $\beta$ no Soro .....	61
<b>Figura 47</b> - Lâminas coradas com HE .....	62
<b>Figura 48</b> - Eosinófilos no espaços peribrônquico .....	63
<b>Figura 49</b> - Neutrófilos no espaço peribrônquico .....	64
<b>Figura 50</b> - Linfócitos no espaço peribrônquico .....	65
<b>Figura 51</b> - Macrófagos no espaço peribrônquico .....	66
<b>Figura 52</b> - Lâminas coradas com Picrossírius.....	67
<b>Figura 53</b> - Lâminas coradas com RFO.....	68
<b>Figura 54</b> - Percentual de colágeno nas vias aéreas.....	69
<b>Figura 55</b> - Percentual de fibras elásticas nas vias aéreas .....	70
<b>Figura 56</b> - BUXCO Basal.....	71
<b>Figura 57</b> - BUXCO Salina.....	72
<b>Figura 58</b> – BUXCO 6,25MCh mg/mL .....	73
<b>Figura 59</b> - BUXCO 12,5MCh mg/mL .....	74
<b>Figura 60</b> - BUXCO 25MCh mg/mL .....	75
<b>Figura 61</b> - BUXCO 50MCh mg/mL .....	76
<b>Figura 62</b> - BUXCO comparativo .....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS

Th0 – Células T helper 0

Th1 – Células T helper 1

Th2 – Células T helper 2

Treg – Células T reguladoras

NK – Natural Killer

TNF $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral Alpha

MCP1 – Proteínas Químio-atraente de monócitos

M1 – Macrófagos ativados por citocinas Th1

M2 – Macrófagos ativados por citocinas Th2

IL – Interleucina

AKT – Proteína Quinase B

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade

DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

NFK $\beta$  – Fator Nuclear Kappa  $\beta$

IgG – Imunoglobina G

IgE – Imunoglobina E

LBA – Lavado Bronco Alveolar

TA – Treinamento Físico Aeróbio

UNINOVE – Universidade Nove de Julho

Grupo C – Grupo Controle

Grupo CO – Grupo Controle Obeso

Grupo EO – Grupo Exercício Obeso

Grupo HDMO – Grupo “House Dust Mite”

Grupo EHO – Grupo Exercício, “House Dust Mite” e Obeso

HDM – House Dust Mite (Ácaro de Poeira Doméstica)

UNICAMP – Universidade de Campinas

RS – Rio Grande do Sul

Mg - Miligramas

Kg – Kilogramas

PBS – Tampão Fosfato-Salino

ELISA – “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”(Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima)

HE – Hematoxilina

PSH - Picrossírius

Penh –Enhanced Pause

## 1 Introdução

O sobrepeso e a obesidade são crescentes desafios de saúde pública, principalmente em regiões economicamente desenvolvidas ou em desenvolvimento. As tendências para tal crescimento continuam, sendo que os estudos e previsões apontam que em 2030 até 57,8% da população adulta mundial poderá ser obesa ou estar acima do peso (1). Dados apontam que para casos de Diabetes e doenças associadas, mais de 55 milhões de pessoas são acometidas por essas doenças, há ainda uma projeção de que na Europa estes números aumentem para 64 milhões em 2030(2). Pessoas obesas são mais propensas ao desenvolvimento de doenças cardiometabólicas e também de doenças respiratórias (1,3-7). De maneira geral podemos citar que a obesidade está associada a um aumento da incidência de diabetes, infarto agudo do miocárdio, hipertensão arterial, síndrome metabólica, insuficiência cardíaca e respiratória, asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (1,3-7).

Existem diversos fatores que podem levar um indivíduo a um aumento excessivo da massa corporal, entre eles: causas genéticas, metabólicas, neuroendócrinas e psicológicas. Entretanto, o agente que mais predispõe o ganho de massa corporal em determinada população são as modificações no comportamento dietético (8-11).

As mudanças sociais dietéticas associadas com o crescimento econômico, modernização, e a globalização do mercado alimentício(12-13), bem como a industrialização, o rápido crescimento no serviço do setor técnico e tecnológico resulta em uma diminuição do gasto energético no trabalho, assim como nas atividades domésticas (14). Em adição as mudanças dietéticas supracitadas, a substituição de alimentos com carboidratos complexos, frutas, vegetais e peixes por alimentos ricos em carboidratos refinados, gorduras animais e óleos vegetais, por alimentos processados, “*fastfoods*”, confeitos e bebidas doces contribuem para o aumento da população obesa ao redor do mundo. (14-17)

O tecido adiposo branco compreende grande parte da composição corporal, correspondendo a cerca de 40% a massa corpórea de indivíduos com sobrepeso e obesidade. Sabe-se que este é o maior estoque de energia e também desempenha diversas funções endócrinas. Se tratando de tecido adiposo branco, as células que o

compõe são capazes de liberar uma multiplicidade de lipídios e porções de proteínas, assim como ácidos graxos mobilizados pelo processo de lipólise. Diversos hormônios pleotrópicos são sintetizados e secretados pelos adipócitos, sendo que os mais proeminentes seriam a leptina e a adiponectina (18-22).

O tecido adiposo branco pode ser dividido em dois principais depósitos, entre eles o tecido adiposo visceral (compreendendo cerca de 10% do total), e o subcutâneo (cerca de 85%), sabe-se que diversos depósitos menores de tecido adiposo estão espalhados ao redor do corpo, distribuídos na periferia dos órgãos, como o coração, rins e linfonodos. Comparado com o tecido adiposo subcutâneo, o visceral desempenha uma atividade metabólica maior e mais forte associada aos riscos metabólicos (23).

A obesidade é um importante fator capaz de influir sobre a gravidade da asma, ou até mesmo em desencadear o desenvolvimento desta doença. Embora muito se tenha associado a obesidade influenciando na asma apenas pelos processos inflamatórios, existem crescentes evidências sugerindo que a relação da asma e obesidade não estão necessariamente correlacionadas apenas pelo processo inflamatório Th2 clássico, e que possivelmente alguns hormônios poderiam estar envolvidos nessa relação (24).

É sabido que o tecido adiposo visceral possui grande potencial imune, com grandes concentrações de leucócitos. Onde há células CD4 e CD8, T reguladoras (Treg), natural killer (NK), células  $\beta$ , mastócitos, eosinófilos e macrófagos (24-33).

Quando a alimentação em demasia resulta no aumento da massa do tecido adiposo branco, a eficiência deste em estocar energia é comprometida. Há o aumento dos níveis de fatores pró-inflamatórios produzidos pelos adipócitos como citocinas (TNF $\alpha$ ), quimiocinas (MCP1). Adicionalmente a liberação de ácidos graxos promovem alterações na quantidade e no fenótipo dos leucócitos, que obviamente aumentam a inflamação do tecido adiposo(34-37).

É sugerido que os processos inflamatórios resultantes de um quadro de obesidade estejam relacionados com uma lipotoxicidade, acrescida de um estresse do retículo endoplasmático devido a queima de lipídios, e também uma hipóxia devido a diminuição da difusão de oxigênio nos adipócitos, e a ativação de receptores “Toll-like” (38-41)

É relevante ressaltar que o tecido adiposo branco em indivíduos obesos contém um número elevado de macrófagos quando comparado a pessoas não obesas, e estes macrófagos podem ser ativados tanto pelo ponto de vista morfológico (células gigantes) quanto funcional (produção de citocinas) (4). Além do fato da quantidade aumentada de macrófagos, ocorre a diferenciação destes de macrófagos M2 em M1 quando comparado a indivíduos eutróficos. Esses macrófagos M1 se posicionam ao redor dos adipócitos necrosados no tecido inflamado, formando “crown-like structures” e produzindo quantidades expressivas de citocinas pró-inflamatórias como IL6 e TNF $\alpha$ , além disso, tais acontecimentos contribuem para a resistência local e sistêmica à insulina (32,33)

Os eosinófilos são importantes leucócitos com papel fundamental para as respostas alérgicas e infestações parasitárias. Estas células são responsáveis pela produção de IL4(30). Entretanto, a produção de eosinófilos na medula óssea e o recrutamento para o tecido adiposo branco é controlado pela IL5 (42,43).

Células T reguladoras (Treg) estão presentes em larga escala no tecido adiposo de modelos experimentais eutróficos. Em contrapartida, o mesmo não ocorre em modelos experimentais obesos e até mesmo em humanos obesos. Logo, a quantidade de tecido adiposo pode influir sobre a modulação e a regulação do número de Treg aumentando ou diminuindo o quadro inflamatório, e por consequência influenciando sobre a função metabólica. É sabido que as Treg são necessárias para manutenção de um ambiente anti-inflamatório no estado estacionário do tecido adiposo em indivíduos eutróficos. Onde as Treg no tecido adiposo expressam grandes quantidades de IL10, e em sinergismo para a ação destas citocinas os adipócitos também apresentam grandes quantidades de receptores de IL10. Ressalta-se que os níveis de IL10 por meio das Treg mantém o estado dos macrófagos em M2(43). É apontado que adipócitos tratados com IL10, que fosforilam Akt, diminuem os níveis do agente quimioatratante MCP1, além do que há a captação aumentada de glicose via estímulo da insulina (26,32,44). Assim as Treg são uma população de células de suma importância para o impedimento das respostas imunes autodestrutivas no tecido adiposo, e a diminuição destas células agrava o ambiente inflamatório (45).

Ao contrário das células T adaptativas que são capazes de reconhecer lipídios apresentados por moléculas de classe MHC, as células iNKT possuem como característica a capacidade de reconhecer lipídios apresentados por moléculas CD1d.



Células Dendríticas, macrófagos, células B e T são células apresentadoras de antígeno que são capazes de expressar CD1d. Entretanto o mesmo acontece em células hematopoiéticas, epiteliais, hepatócitos e adipócitos. Logo, é possível constatar que diversas células no tecido adiposo podem interagir diretamente com as NK (46-48). Outra característica de suma importância a ser ressaltada é a capacidade destas células em produzir com rapidez citocinas Th1 e Th2, após a ativação via apresentação do CD1d(49)

Os mais comuns tipos de doenças inflamatórias que acometem as vias aéreas são a asma e a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), onde a incidência destas é muito grande ao redor do mundo. A prevalência de asma em países desenvolvidos é de aproximadamente 10% em adultos e crianças, já em países em desenvolvimento a prevalência é menor, mas ressalta-se que estes números estão aumentando rapidamente. Os sintomas clínicos da asma são, o estreitamento das vias aéreas, devido a hiperplasia e hipertrofia, o aumento da produção de muco, e a hiper-responsividade. Onde, tais características podem ser atribuídas como resultado da inflamação orquestrada por citocinas Th2(50).

No caso da asma estudos demonstram que há a presença de eosinófilos no pulmão, e que estes estimulam as células “T-helper tipo 2” (Th2) pela presença de antígenos. Dessa forma, observa-se a presença de uma resposta Th2 exacerbada, com concomitante predominância de eosinófilos e linfócitos Th2 (linfócitos CD4+). Há também a liberação de grandes quantidades de mediadores pró-inflamatórios, como as IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. (8,9), TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, acabam sendo encontrados em indivíduos com asma e DPOC e amplificam a resposta inflamatória, através da ativação do NF-K $\beta$  levando ao aumento dos níveis de genes inflamatórios(4).

Para que ocorra a diferenciação das células Th0 em células Th2 é necessária a transcrição do fator GATA de ligação a proteína 3 (GATA3). Como esperado, nas vias aéreas de pacientes asmáticos é encontrado grande quantidade de GATA3. A citocina IL33, um membro da família de citocinas da IL1 promove a diferenciação das células Th2(51-52).

Como já citado a IL 4 desempenha grande importância na diferenciação nas células Th2 provindas de Th0, e pode ser importante na sensibilização a partir da exposição de alérgenos. Outra peculiaridade atribuída a esta citocina, é que ela

exerce função na troca do isotipo de células B e níveis de IgG pela produção de IgE. A IL 13 possui a capacidade de mimetizar a IL4 no sentido de induzir a secreção de IgE e promover alterações estruturais nas vias aéreas, mas não cabe a esta a diferenciação das células Th2 (53).

A IL5 desempenha grande importância na inflamação mediada por eosinófilos, estando envolvida na diferenciação de eosinófilos no interior da medula óssea e prolongando a vida dessas células (53).

Estudos clínicos tem associado que tanto os níveis aumentada de IL 6, quanto de seus receptores (IL 6R) tem sido diferente em asmáticos e em controles saudáveis, quando associado a disfunção das vias aéreas. Onde a presença aumentada de IL 6R pode contribuir para a severidade da asma. Ressalta-se que níveis aumentados de IL 6 no muco de pacientes asmáticos tem sido encontrado juntamente com grandes quantidades de eosinófilos e neutrófilos, onde obviamente tais características corroboram com a inflamação das vias aéreas e resultam no comprometimento da eficiência da via (54). Estudos utilizando um modelo experimental de OVA e também de IL 6 *knockout*, indicam que a presença de IL 6 aumenta a quantidade de eosinófilos e de citocinas Th2 no pulmão (55).

As células T reguladoras possuem papel fundamental para a regulação do quadro inflamatório, sendo que estas são capazes de produzir IL 10. Se tratando ainda da IL 10, esta é uma importante citocina pleotrópica e imunoregulatória secretada principalmente por macrófagos, mas também pode ser expressada por células Th1 e linfócitos Th2, bem como por células dendríticas, linfócitos B, monócitos e mastócitos. A atividade da IL 10 é mediada por seus receptores (IL 10R). A IL 10 inibe a capacidade de monócitos e macrófagos em apresentar antígenos para células T via a inibição de MHC II, e também diminui os níveis de citocinas inflamatórias como IL 1, IL 6, IL 8, IL 12 e TNF $\alpha$  (56).

Se tratando da IL 13, esta também é capaz de desempenhar importante papel na asma, sendo que a mesma pode influir sobre a hiper-responsividade característica na asma e também sobre o remodelamento das vias aéreas, que abrangeria a hiperplasia das células caliciformes, proliferação do músculo liso e fibrose subepitelial. Logo, a partir deste conhecimento, esta citocina tem sido alvo de estudo para a descoberta de novos tratamentos terapêuticos (57-58). A IL 13 estimula os níveis de

diversas quimiocinas, como a CCL11(58). Muito tem se correlacionado os níveis de IL 13 com o aumento de algumas células do sistema imune. Entretanto, estas células não são apenas de resposta inflamatória Th2, incluindo outras formas de resposta inflamatória do tipo T, como células Th1, NK, mastócitos, basófilos e eosinófilos (58).

A IL 17 é definida como uma citocina pró inflamatória produzida por células T ativadas em resposta ao estímulo dos receptores destas células, sendo que a IL 17 e citocinas como a IL 21, IL 22 e IL 23 cooperam para uma multiplicidade de efeitos inflamatórios (59). Evidentemente a IL 17, bem como a resposta inflamatória Th17 contribuem para a inflamação crônica e destruição da matriz extracelular. Acredita-se que a produção desta citocina, bem como da IL 21 e outras produzidas por células Th17 podem participar a patogênese de doenças autoimunes (59). A IL 17 também pode estar expressa em altas concentrações em resposta a infestações bacterianas, fúngicas e manifestações alérgicas (60).

Receptores específicos de IL 17 são expressos na superfície de diversas células, inclusive no epitélio, no músculo de vias aéreas e no endotélio vascular de vias aéreas (61).

A estabilidade da IL 17 é controlada pela IL 23, sendo que os receptores de IL 23 (IL 23R) também são expressos em diversas células do sistema imune, como Linfócitos T, células NK, monócitos e células dendríticas. Recentemente tem se estudado a associação entre a IL 23R e as doenças inflamatórias, onde a ativação desses receptores estão diretamente relacionada no processo de diferenciação e manutenção das células Th17. Evidentemente em decorrência das funções exercidas pela IL 23 e sua influência na resposta inflamatória Th17, esta citocina tem sido alvo de estudos relacionados a inflamação das vias aéreas, inclusive no estudo da asma (62).

Macrófagos pulmonares alveolares obtidos de indivíduos obesos são excepcionalmente sensíveis à leptina (4, 5). Dessa forma, estudos epidemiológicos apontam que níveis aumentados de leptina estão associados a uma maior prevalência e gravidade da asma (4, 5). Portanto, o tecido adiposo não possui a mera função de reservatório de energia. Entre as adipocinas mais estudadas e produzidas pelo tecido adiposo, pode se observar a leptina e resistina (pró-inflamatórias) ou adiponectina(anti-inflamatórias) (2,3). O aumento de citocinas pró-inflamatórias

produzidas pelo tecido adiposo, como por exemplo, o TNF- $\alpha$  possuem papel fundamental para o desenvolvimento da síndrome metabólica (4).

Sabe-se que as adipocinas possuem um potencial sobre os pulmões de provocar ou exacerbar a asma. (2,3). As adiponectinas desempenham papel na regulação de energia. Alguns estudos sugerem que a leptina e a adiponectina influem sobre as condições de inflamação pulmonar como a asma e o DPOC (5). Devido à presença de adiponectina e seus receptores no pulmão e também a diminuição nas concentrações deste hormônio em indivíduos obesos, é plausível que a perda dos efeitos anti-inflamatórios da adiponectina durante a obesidade contribuam para a prevalência da asma ou da gravidade desta patologia. (2)

Considerando que em indivíduos normais há a presença de adiponectina e de seus receptores no pulmão, e que em indivíduos obesos os níveis tanto de adiponectina quanto de seus receptores é diminuída. Muito tem se relacionado esta molécula com a prevalência e a severidade da asma nas populações obesas.

A diminuição de adiponectina em camundongos induzidos a obesidade ou deficientes desta adipocina, possuem propensão em desenvolver Diabetes do tipo 2 e aterosclerose. E ainda especula-se que a administração exógena de adiponectina poderia proteger esses camundongos do desenvolvimento destas patologias(5).

Se tratando de doenças pulmonares e mais precisamente da asma.É observado que, a adiponectina administrada em camundongos desafiados com um alérgeno resulta na redução acentuada da hiper-reatividade das vias respiratórias e dos níveis de citocinas Th2 nos pulmões(45,46). Já outro estudo afirma que a administração de adiponectina sobre as mesmas condições de um modelo experimental de asma, resultou numa supressão acentuada da hiper-reatividade das vias respiratórias, e uma diminuição do quadro inflamatório e também inibe o aumento da espessura do músculo liso das vias aéreas desse modelo (47)

Ao se tratar dos efeitos da Leptina sobre o sistema imune e mais precisamente sobre as funções pulmonares, é sugerido que a obesidade aumenta as concentrações de Leptina. Entretanto, este aumento é relacionado com o agravamento da severidade da asma(5).

Observou-se um aumento da hiper-reatividade pulmonar de um modelo experimental de asma suplementado com Leptina por infusão. Em contrapartida, não se observou o aumento de citocinas do Lavado Bronco Alveolar (LBA) e também dos níveis de eosinófilos. Essa administração exógena de Leptina resultou no aumento de IgE. Nos camundongos não obesos a administração de Leptina resulta em concentrações séricas igualmente observadas em camundongos obesos, onde há o aumento das respostas inflamatórias quando há a exposição a um agente alergênico. Atribui-se estes resultados pertinentes a inflamação pela ativação de receptores do tipo Toll Like (66-68).

A Resistina é considerada uma adipocina pró-inflamatória, e tem essa denominação em decorrência da sua capacidade no desenvolvimento da resistência à insulina e concomitantemente ao desenvolvimento de Diabetes do tipo II. A Resistina também possui efeitos na angiogênese, na proliferação de células musculares lisas, e que invariavelmente são processos pertinentes no desenvolvimento da asma(69).

A Diretriz Americana de Atividade Física, recomenda que 150 minutos de atividade física moderada por semana ou 75 minutos de atividade física de intensidade vigorosa por semana é capaz de melhorar as capacidades cardiometabólicas e consequentemente diminuir os riscos e a prevalência de doenças associadas a dislipidemia, hipertensão e resistência à insulina (71).

A prática da atividade física aeróbica dependendo da intensidade é considerada o gatilho mais comum para o broncoespasmo em pacientes asmáticos (72).

Entretanto, o exercício aeróbio de intensidade baixa diminuiu o broncoespasmo de um modelo experimental de asma utilizando ratos desafiados com ovoalbumina, e ainda aumentou a capacidade física deste modelo com o treinamento físico aeróbio crônico. Onde houveram alterações benéficas tanto morfológicas quanto endócrinas (72).

A intensidade moderada do treinamento aeróbio (TA) é capaz de regular e normalizar os padrões de células Th no tecido pulmonar de asmáticos. É sugerido que este tipo de exercício age via a dessensibilização de receptores "Homing pulmonares Th2" específicos de quimiocinas. Logo, o TA de intensidade moderada pode influir sobre as respostas celulares o que resultaria em um aumento da função pulmonar (73)

OTA reduz o remodelamento vascular induzido por ovalbumina quando avaliado pela espessura do músculo liso, colágeno e teores de fibra elástica. Logo, há achados que evidenciam os benefícios extensivos do TA para a diminuição da inflamação pulmonar alérgica crônica, achados estes que corroboram para a diminuição da dispnéia e broncoespasmo induzido pelo exercício, além da melhora da capacidade aeróbica e da qualidade de vida (74,75). Um programa de treinamento físico aeróbio de intensidade moderada pode melhorar o controle asmático em indivíduos adultos (75). O TA melhora a mecânica respiratória reduzindo a resposta imunológica Th2. Tais efeitos aparentemente ocorrem em decorrência da diminuição dos níveis de NF-kB e pelo aumento dos níveis de citocinas anti-inflamatórias (74,75).

O TA é capaz de modular a resposta epitelial em um modelo experimental de asma, diminuindo os níveis de diversas citocinas pró-inflamatórias e agentes pró-fibroticos, onde há o aumento dos níveis da IL 10(74).

Embasado no levantamento dos dados presentes na literatura e na relevância do assunto visando o enriquecimento científico afim de promover novas afirmativas e hipóteses, é de extrema importância e necessidade a investigação dos efeitos do treinamento físico aeróbio como tratamento terapêutico em um modelo experimental de obesidade e doença alérgica inflamatória crônica.

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral**

Investigar os efeitos do treinamento físico aeróbio como forma de tratamento terapêutico em um modelo experimental de asma obeso.

## **2.2 Objetivos Específicos**

Avaliar os efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade moderada sobre a inflamação, remodelamento e reatividade pulmonar em um modelo experimental de inflamação alérgica crônica em camundongos obesos. Mensurando os efeitos da terapêutica proposta sobre os níveis das citocinas Th1, Th2 e Th17 nos pulmões e na circulação sistêmica.

## **3 Materiais e métodos**

### **3.1 Animais e grupos experimentais**

Os animais foram obtidos do biotério central da Universidade Nove de Julho (UNINOVE). E mantidos em condições controladas de umidade (50%-60%), luminosidade (12h claro/12 h escuro) e temperatura (22°C - 25°C) no biotério de experimentação da UNINOVE.

Os animais foram distribuídos de forma aleatória em cinco grupos experimentais (n = 6): Controle (C - grupo não obeso, não sensibilizado e não treinado), Controle Obeso (CO – grupo obeso, não sensibilizado e não treinado), Exercício + Obeso (EO – grupo obeso, não sensibilizado e submetido ao treinamento), HDM + Obeso (HDMO – grupo sensibilizado com HDM, obeso e não treinado), Exercício + HDM + Obeso (EHO – grupo treinado, sensibilizado com HDM e obeso), e adicionalmente houve a necessidade de um grupo HDM (grupo apenas sensibilizado com HDM), sendo que apenas alguns parâmetros foram analisados.

Foram utilizados 40 Camundongos C57Bl/6, machos, com 7 semanas de idade, pesando aproximadamente 18-22 gramas.

### **3.2 Modelo experimental de obesidade**

Os animais foram submetidos a uma dieta hiperlipídica durante todo o período do estudo, que foi de 18 semanas. Sendo que as 10 semanas iniciais foram necessárias para o ganho de massa corporal e indução da obesidade. Somente a partir da 11ª semana os animais foram submetidos ao protocolo de administração do “House Dust Mite” (HDM) ou Ácaro de Poeira Doméstica, afim de mimetizar a doença

a ser pesquisada, após 3 administrações de HDM (1X/semana) ocorreu o início do protocolo de exercício. A dieta hiperlipídica utilizada consistiu em uma ração com composição rica em gorduras (55%), cedida pelo Laboratório de Pesquisa em Obesidade e Diabetes da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, coordenado pelo Prof. Dr. Mario José Abdalla Saad.

### **3.3 Modelo experimental de "asma" - inflamação pulmonar alérgica crônica usando *House Dust Mite* (HDM)**

No presente estudo foi utilizado um modelo de administração intra-traqueal de HDM, no qual a sensibilização ocorreu diretamente através do contato com a mucosa brônquica, tornando-se um modelo mais fidedigno à patogênese da asma (77,78). Para isso, primeiramente, os animais precisaram ser anestesiados com ketamina (100mg/kg) e xilazina (10mg/kg) e então 100 mg do extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Greer Laboratories, Lenoir, NC) foram dissolvidos em 50 µl de PBS e administrados por via intra-traqueal nos dias 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 49. Ressaltando que o primeiro dia da administração de HDM ocorreu após a indução da obesidade dos animais e que os grupos experimentais obesos receberam a dieta hiperlipídica até o último dia do protocolo experimental.

### **3.4 Treinamento físico aeróbio de intensidade moderada como intervenção terapêutica (treinamento iniciando após o estabelecimento da obesidade e da inflamação pulmonar alérgica crônica)**

Os animais foram adaptados em esteira ergométrica para camundongos (Imbramed, RS, Brasil) durante 3 dias (0,5km/h) por 15 minutos (79-81). No dia seguinte foram submetidos ao teste de esforço conforme previamente descrito (79-81). O teste de esforço foi repetido ao final do protocolo para avaliar quanto os animais melhoraram ou não o condicionamento físico (79-81). Os animais foram treinados a uma intensidade moderada, correspondendo a 60% da máxima velocidade alcançada



no teste de esforço (81). O treinamento de intensidade moderada foi realizado durante 5 semanas, 5 vezes por semana, 1 hora por sessão de treinamento (79-81).

Para o protocolo de HDM, o treinamento aeróbio iniciou no dia 17 do protocolo, uma vez que conforme já demonstrado, no dia 17 (após as três administrações iniciais de HDM), os animais já apresentam inflamação, remodelamento e hiperresponsividade das vias aéreas (82,83).

Os experimentos foram realizados 24 horas após o último desafio com alérgeno (HDM) e o teste físico final, e após anestesia dos animais com ketamina (100mg/kg) e xilazina (10mg/kg).

### **3.5 Avaliação da inflamação pulmonar no lavado broncoalveolar (LBA)**

Após anestesia e traqueotomia, os animais foram canulados e os pulmões foram lavados 3 x 0,5 mL de PBS (total 1,5 mL de PBS). O volume do lavado recuperado foi centrifugado a 12 G, a 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi armazenado a -70°C para posterior análise das citocinas por meio de ELISA. O botão celular foi ressuspensionado em 1 mL de PBS e a determinação do número de células totais no LBA foi realizada por meio de contagem na Câmara de *Neubauer* (79-81,84). Alíquotas do material ressuspensionado foram utilizadas para preparação de lâminas de *cytospin* as quais foram coradas utilizando o Kit Instant Prov, seguindo as recomendações do fabricante (onde 300 células foram contadas para a determinação da contagem diferencial) no microscópio de fluorescência da marca OLYMPUS, utilizando um aumento de 40x. (79-81,84).

### **3.6 Avaliação dos níveis de citocinas no LBA e no soro por ELISA**

Foram avaliados os níveis de IL-1ra, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-23, TNF-alfa, Adiponectina, Leptina e Resistina no LBA e no soro. Foram avaliados através dos kits ELISPOT da BD Bioscience e/ou da R&D Systems, conforme instrução das companhias.

### **3.7 Avaliação da inflamação e remodelamento das vias aéreas através da histologia**

Com o intuito de avaliar os efeitos do treinamento físico aeróbio sobre a densidade de eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e macrófagos no espaço peribrônquico e sobre a proporção de volume de fibras colágenas na parede das vias aéreas, o pulmão esquerdo foi coletado e fixado em paraformoldeído por 24 horas. Os cortes de 4µm foram realizados e as lâminas coradas com HE para detecção dos eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e macrófagos e com Picrossírius para detecção das fibras de colágeno (79, 81). Foi elaborada também a coloração com Resorcina Fucsina com Oxidação, para a avaliação de fibras elásticas. A análise quantitativa da densidade de eosinófilos, linfócitos e macrófagos peribrônquicos e da proporção de volume de fibras de colágeno na parede das vias aéreas foi realizada através da técnica morfométrica conforme previamente descrito (79-81).

### **3.8 Avaliação da reatividade pulmonar**

Para a avaliação da atividade brônquica, foi utilizado o sistema Buxco, onde os resultados são fornecidos via o índice Penh (índice de reatividade brônquica), que leva em conta o tempo inspiratório e expiratório, conforme previamente descrito (85). O sistema necessita do fornecimento de doses seriadas de Metacolina, nas concentrações de 6,25;12,5;25;50. Onde, os animais permaneceram contidos em “boxes” e submetidos a inalação desta substância (85).

### **3.9 Avaliação da glicêmica**

Afim de obter dados referentes aos efeitos do protocolo de obesidade sobre possíveis alterações glicêmicas no modelo experimental proposto, foram coletadas amostras sanguíneas da porção distal da cauda dos animais. Onde a obtenção dos

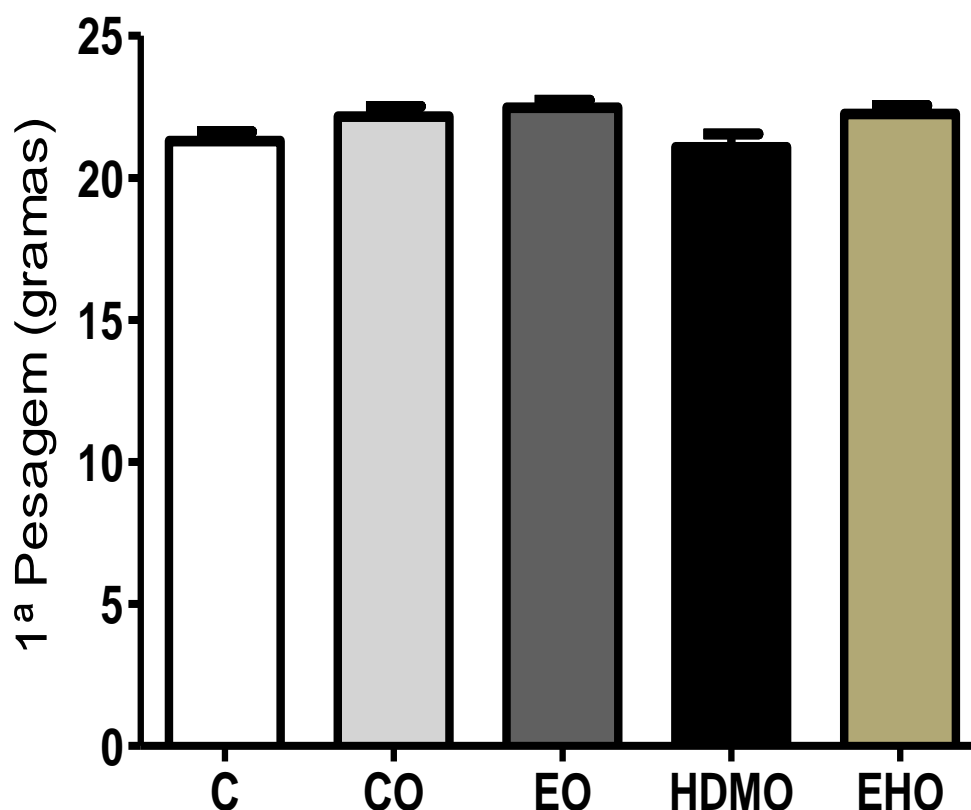
valores numéricos correspondentes foi feita via a leitura em glicosímetro digital (ACCU – CHEK Active, Roche). As amostras foram coletadas em dois momentos, sendo um no início e outro no término do experimento, o primeiro ocorreu no momento da aquisição dos animais, e este segundo foi antes da eutanásia dos animais.

### **3.10 Análise estatística**

Os dados foram analisados através do software SigmaStat 3.1 (Califórnia, EUA). A distribuição da normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados com distribuição paramétrica foram submetidos ao teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls para comparação entre os grupos. Os dados com distribuição não paramétrica foram submetidos ao teste One-way ANOVA on Ranks seguido pelo teste de Dunn's para a comparação entre os grupos. Os níveis de significância foram ajustados para 5% ( $p < 0.05$ ). Os gráficos foram elaborados utilizando-se o software GraphPad Prism 3.1 (Califórnia, EUA).

## **4 Resultados**

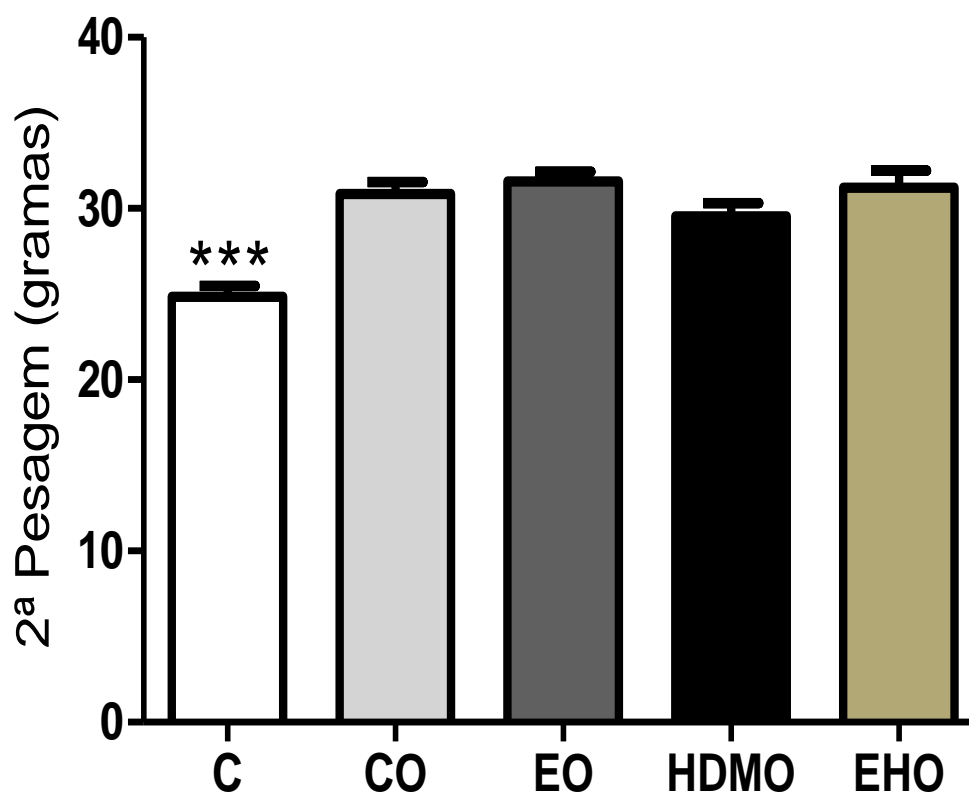
Os cinquenta camundongos de linhagem C57/BL6 foram divididos em cinco grupos experimentais. Sendo quatro destes grupos foram submetidos a uma dieta hiperlipídica, onde foi necessário um período para a promoção do ganho de massa corporal correspondente a 10 semanas iniciais.



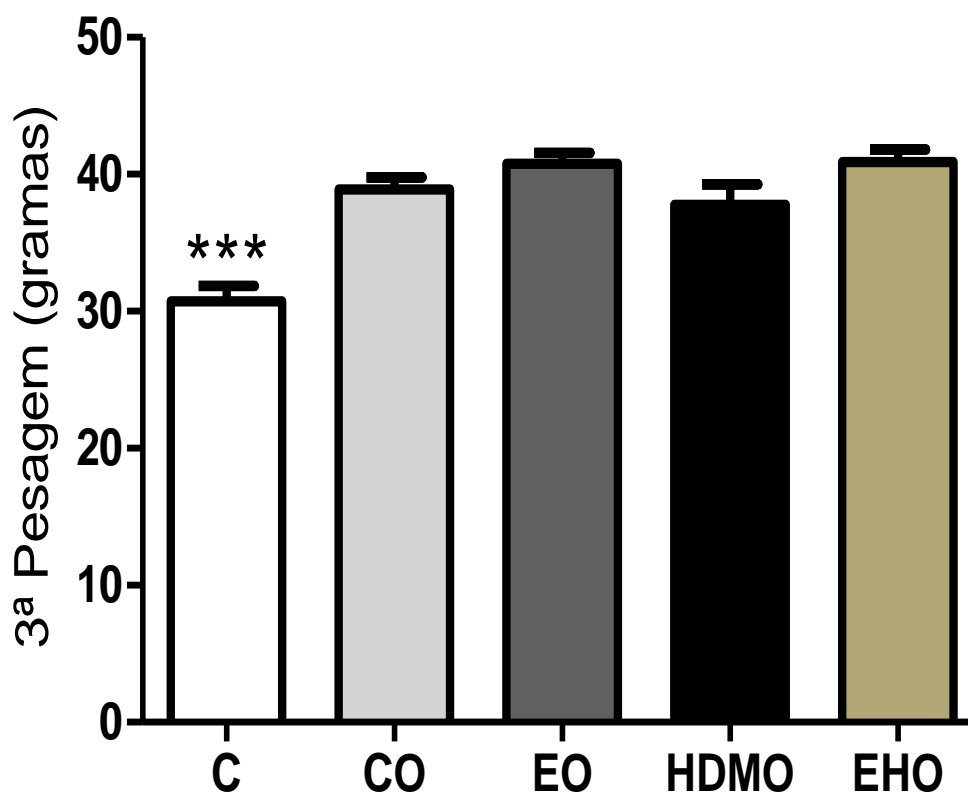
**Figura 1** -Massa corporal Inicial dos grupos experimentais.Valores expressos como médias e desvio padrão.

A massa corporal de todos os grupos foi mensurada com intervalos de quatro semanas a partir do início do experimento até o dia da eutanásia. Os animais foram pesados sobre as mesmas condições, e com o mesmo equipamento durante a pesquisa.

O protocolo para o aumento de massa corporal dos grupos obesos via a oferta de uma dieta hiperlipídica, foi capaz de promover diferenças estatisticamente significantes dos grupos obesos quando comparado com o grupo C ( $p < 0,001$ ) nas quatro semanas iniciais do experimento (Figura 2). Os mesmos resultados se replicaram durante a terceira aferição da massa corporal dos animais (Figura 3).

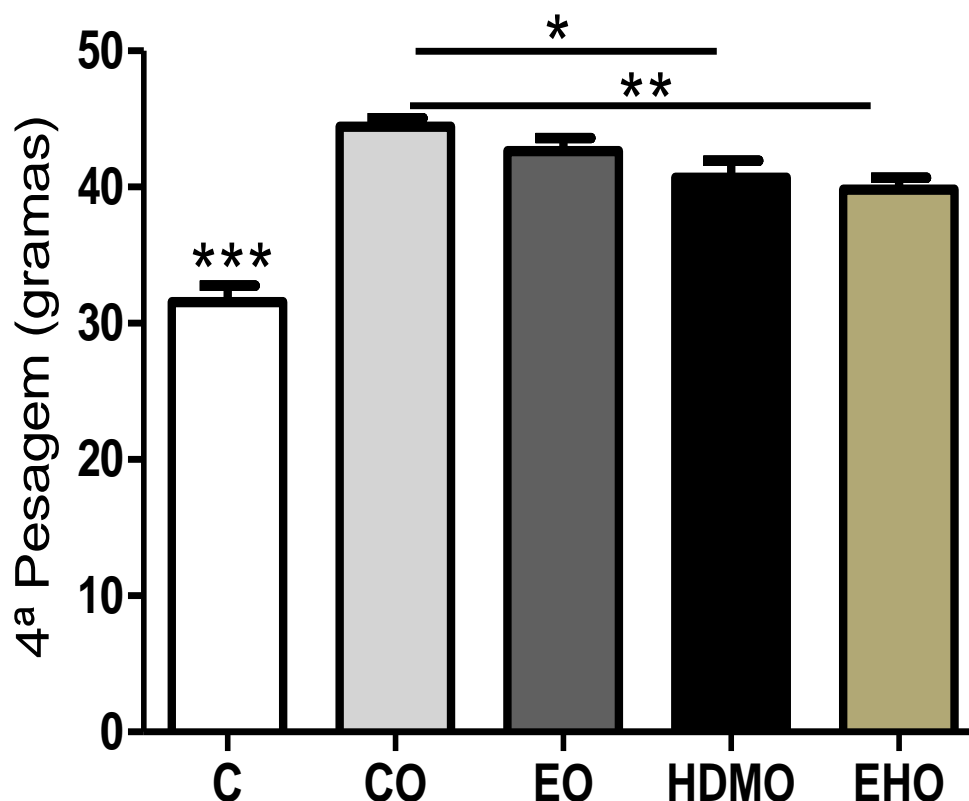


**Figura 2** -Segunda pesagem, massa corporal mensurada dos grupos experimentais. Valores expressos como médias e desvio padrão. Diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,001$ ) do grupo C comparado com os demais. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .



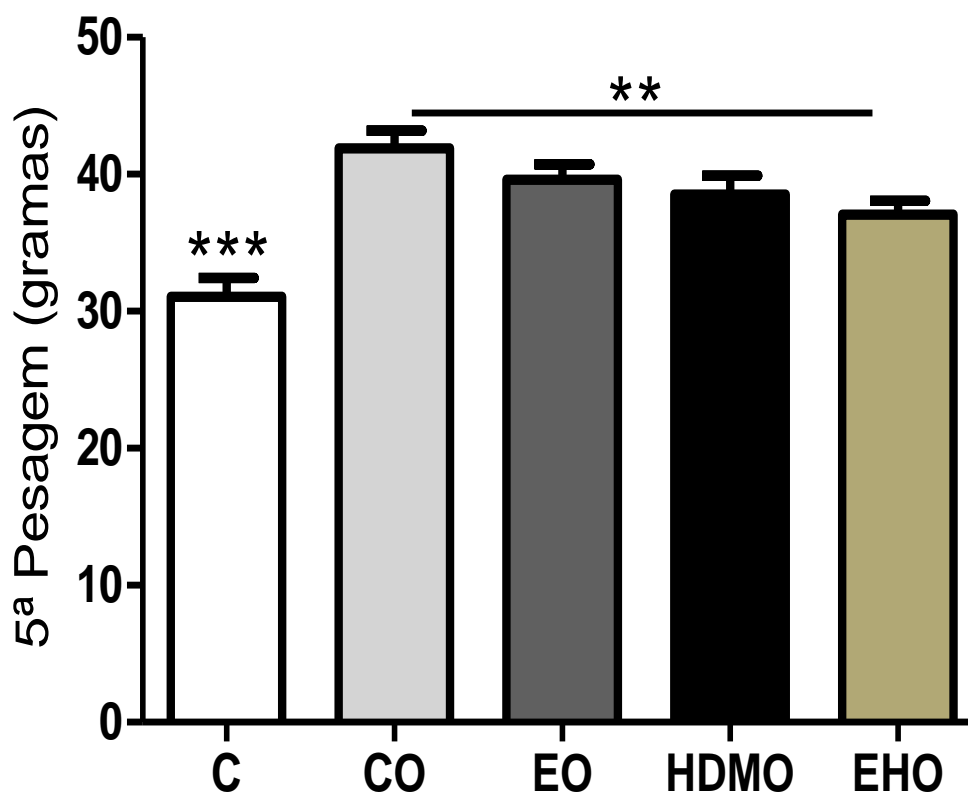
**Figura 3** -Efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade moderada sobre a massa corporal dos grupos experimentais. Terceira pesagem, massa corporal mensurada dos grupos experimentais. Valores expressos como médias e desvio padrão. Diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,001$ ) do grupo C comparado com os demais. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Na quarta pesagem os grupos submetidos ao protocolo de obesidade mantiveram as diferenças quando comparados ao grupo C ( $p < 0,001$ ). Entretanto, o grupo CO apresentou valor de massa corporal superior quando comparado com o grupo HDMO ( $p < 0,05$ ) e com o grupo EHO ( $p < 0,01$ ) (Figura 4). Não foi possível mensurar o consumo calórico diário de cada grupo e tampouco o consumo de cada animal. Mas a oferta de alimento para os camundongos foi feita de maneira livre, ou seja, os animais possuíam uma farta disposição de ração.



**Figura 4** -Efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade moderada sobre a massa corporal dos grupos experimentais. Quarta pesagem, massa corporal mensurada dos grupos experimentais. Valores expressos como médias e desvio padrão. Diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,001$ ) do grupo C comparado com os demais, e do grupo CO comparado com HDM ( $p < 0,05$ ) e EHO ( $p < 0,01$ ). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

No último registro referente a massa corporal feito imediatamente antes da eutanásia e sobre as mesmas condições das demais pesagens, foi possível constatar que o grupo C apresentou menor massa corporal quando comparado com os outros grupos ( $p < 0,001$ ). O mesmo foi observado no grupo EHO quando comparado com o CO ( $p < 0,01$ ).

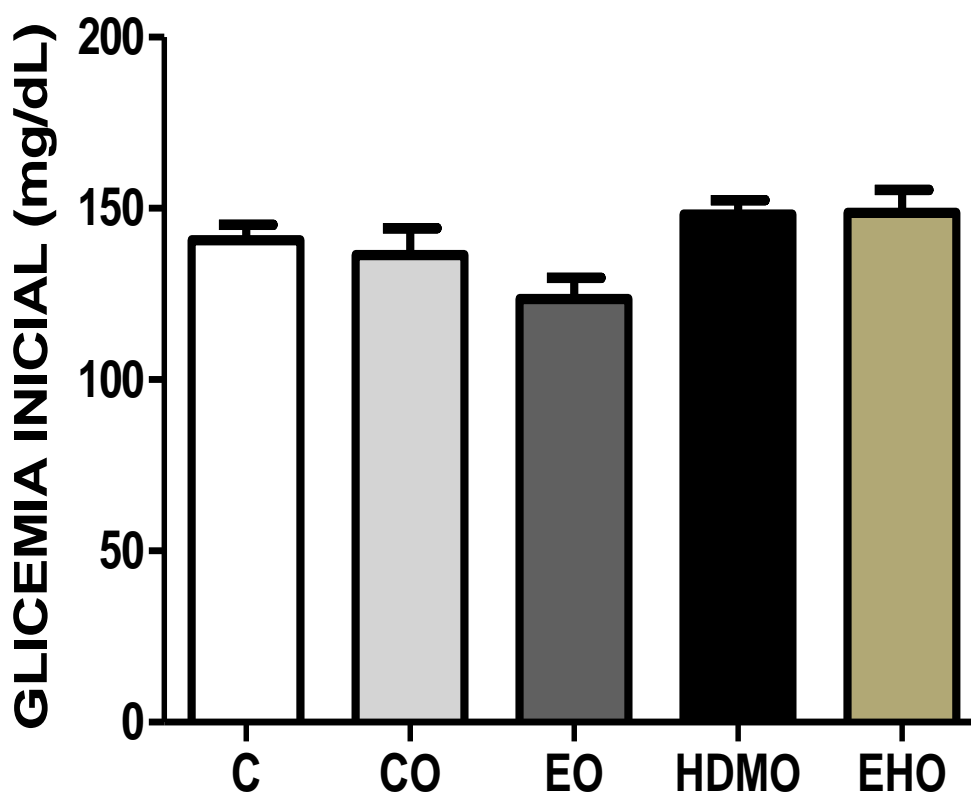


**Figura 5** -Efeitos do treinamento físico aeróbio de intensidade moderada sobre a massa corporal dos grupos experimentais. Quinta pesagem, massa corporal mensurada dos grupos experimentais. Valores expressos como médias e desvio padrão. Diferenças estatisticamente significantes do grupo C ( $p<0,001$ ) comparado com os demais, e do grupo CO quando comparado com HDM ( $p<0,05$ ) e EHO ( $p<0,01$ ). \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ .

Afim de obter dados referentes aos efeitos do protocolo de obesidade sobre possíveis alterações glicêmicas no modelo experimental proposto, foram coletadas amostras sanguíneas da porção distal da cauda dos animais. A obtenção dos valores numéricos correspondentes foi feita via a leitura em glicosímetro digital (ACCU – CHEK Active, Roche). As amostras foram coletadas em dois momentos, sendo um no início e outro no término do experimento, este segundo ocorreu antes da eutanásia dos animais. Vale ressaltar que ambas foram feitas sobre as mesmas condições, e em momentos antes da primeira e da última pesagem.

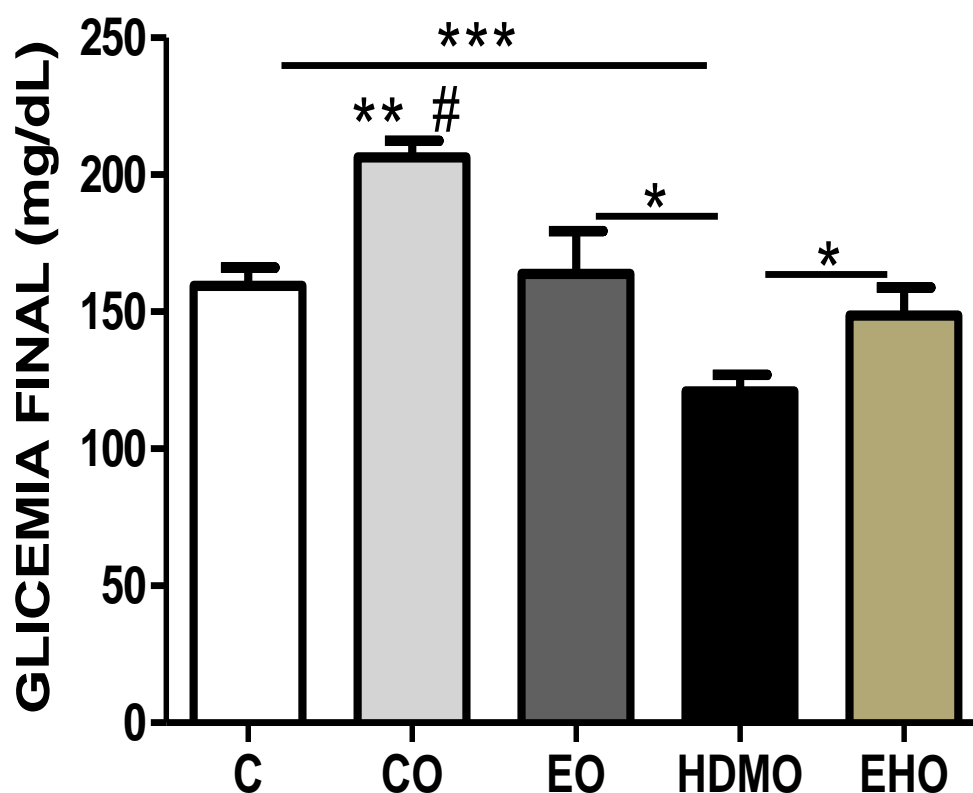


Os valores glicêmicos foram comparados entre os grupos experimentais, e também no momento inicial e final. As primeiras amostras para análise da glicose não revelaram diferenças entre os grupos (Figura 6).



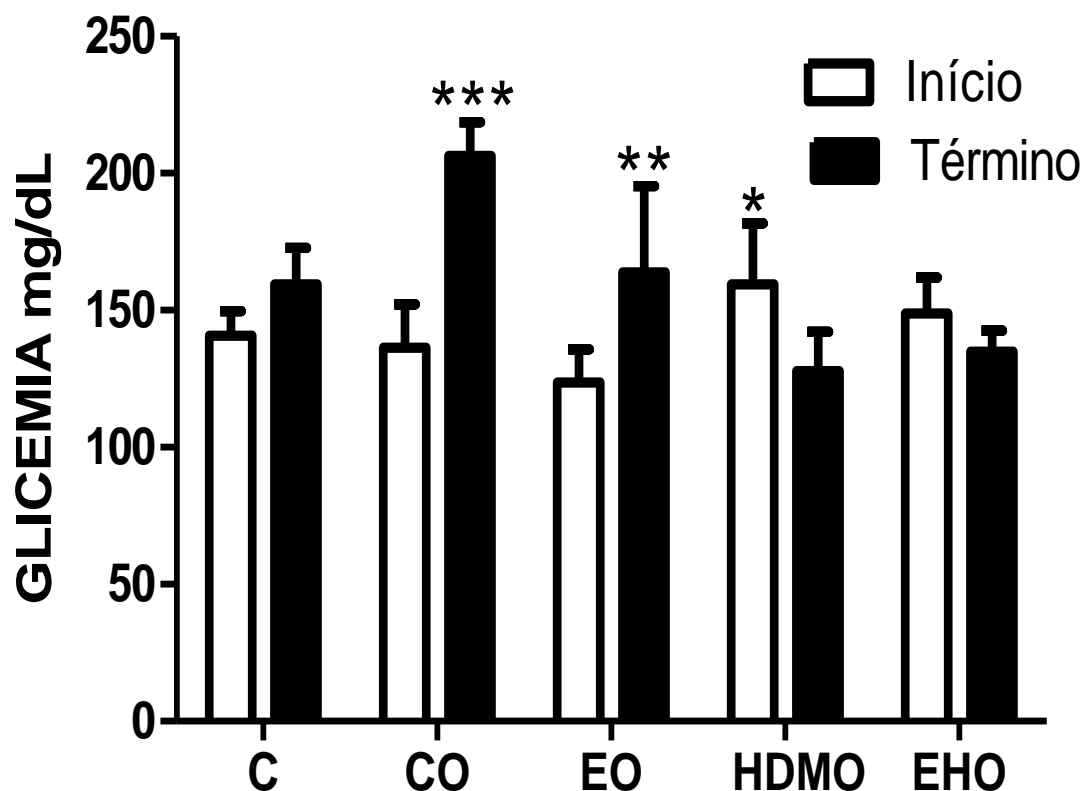
**Figura 6** –Dextro inicial. Análise glicêmica dos grupos experimentais no momento inicial do experimento. Valores expressos como médias e desvio padrão. Sem diferenças entre os grupos experimentais.

Nos dados obtidos na última coleta, foram constatados resultados estatisticamente significantes entre os grupos. O grupo C apresentou valores reduzidos quando comparado ao grupo CO ( $p < 0,01$ ) e HDM ( $p < 0,05$ ). O grupo CO esteve com glicemia aumentada em relação ao EO ( $p < 0,01$ ), HDM ( $p < 0,001$ ) e EHO ( $p < 0,01$ ). O grupo EO apresentou alterações quando comparado ao grupo HDMO ( $p < 0,05$ ). E por fim, o grupo EHO demonstrou maiores valores comparados ao HDM ( $p < 0,05$ ) (Figura 7).



**Figura 7** –Dextro final. Análise glicêmica dos grupos experimentais no momento final do experimento. Grupo C, menores valores quando comparado ao CO (\*\* $p < 0,01$ ) e HDM (\*\* $p < 0,05$ ). Diferenças entre o grupo CO comparado ao EO (# $p < 0,01$ ), HDM (# $p < 0,001$ ) e EHO (# $p < 0,01$ ). Valores reduzidos do grupo HDMO comparado a EO (\* $p < 0,05$ ) e EHO (\* $p < 0,05$ ). Valores expressos como médias e desvio padrão. Sem diferenças entre os grupos experimentais.

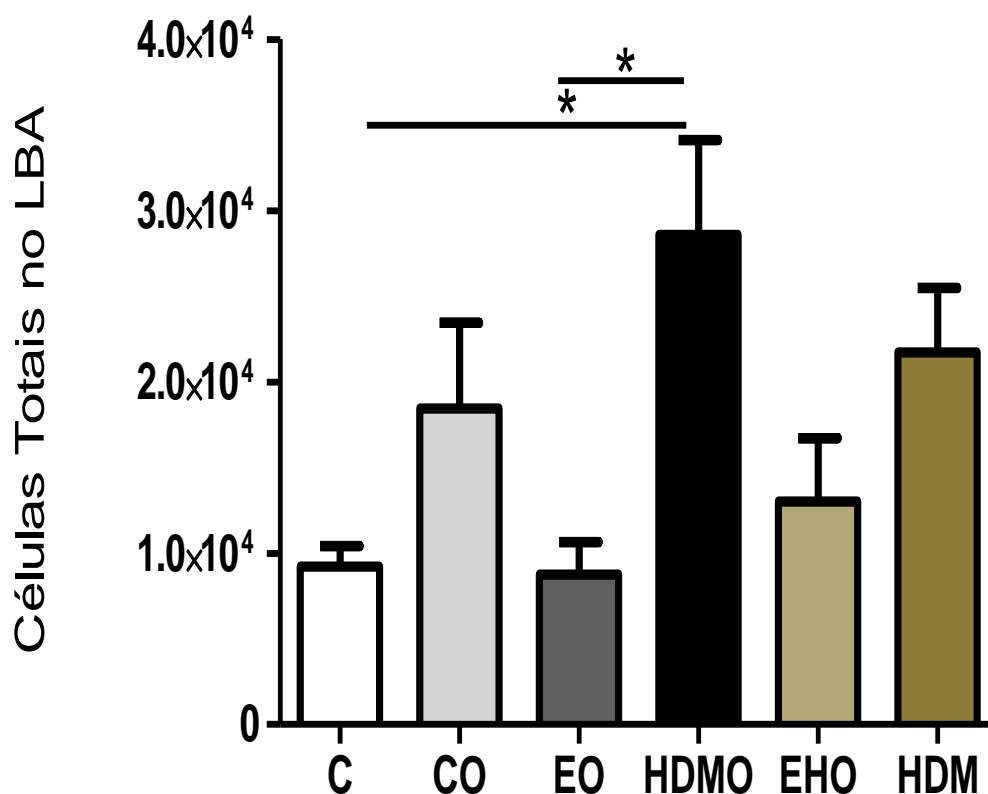
A fim de fazer um comparativo entre a glicemia antes e depois do experimento, foi elaborado um gráfico com ambos os dados agrupados e divididos por grupos. Os resultados afirmam que na segunda coleta os valores ficaram aumentados nos grupos CO ( $p < 0,001$ ) e EO ( $p < 0,01$ ) em comparação com a primeira. Já o mesmo não ocorreu com o grupo HDMO, que demonstrou menores valores na segunda amostra coletada ( $p < 0,05$ ) (Figura 8).



**Figura 8** –Dextro Comparativo.Dados referentes a glicemia inicial e final. Valores expressos como médias e desvio padrão. Diferenças estatisticamente significantes entre o início e o término do experimento nos grupos CO ( $p<0,001$ ), EO ( $p<0,01$ ), e HDM ( $p<0,05$ ). \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ .

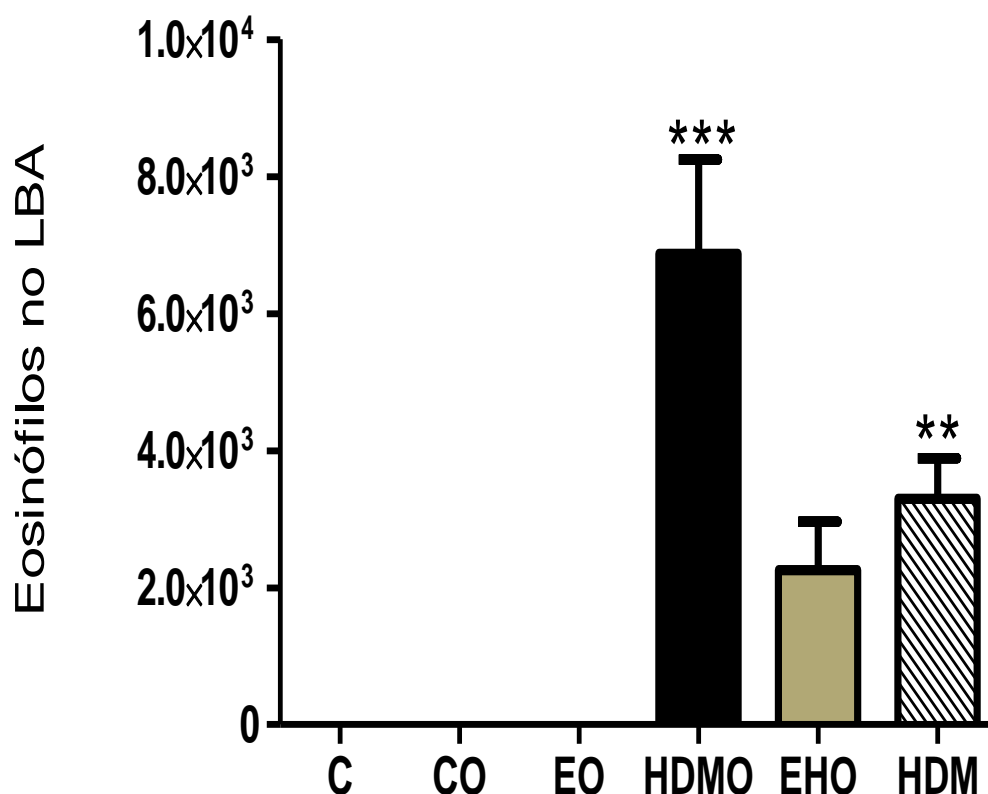
Uma das avaliações feitas para a inflamação pulmonar foi feita via a quantificação de células totais (Figura 9) e diferenciais (Figuras 10, 11, 12 e 13) no lavado Bronco Alveolar (LBA). O protocolo de inflamação pulmonar proposto, bem como treinamento físico de intensidade moderada foi capaz de influir sobre o número total de células e eosinófilos (Figuras 9 e 10). Entretanto, não foi possível constatar alterações em relação a quantidade de neutrófilos, linfócitos e macrófagos (Figuras 11, 12 e 13).

A avaliação de células totais do Lavado Bronco Alveolar (LBA) revelou que o grupo HDMO apresentou maior quantidade de células totais quando comparado aos grupos C ( $p<0,05$ ) e EO ( $p<0,05$ ) (Figura 9).



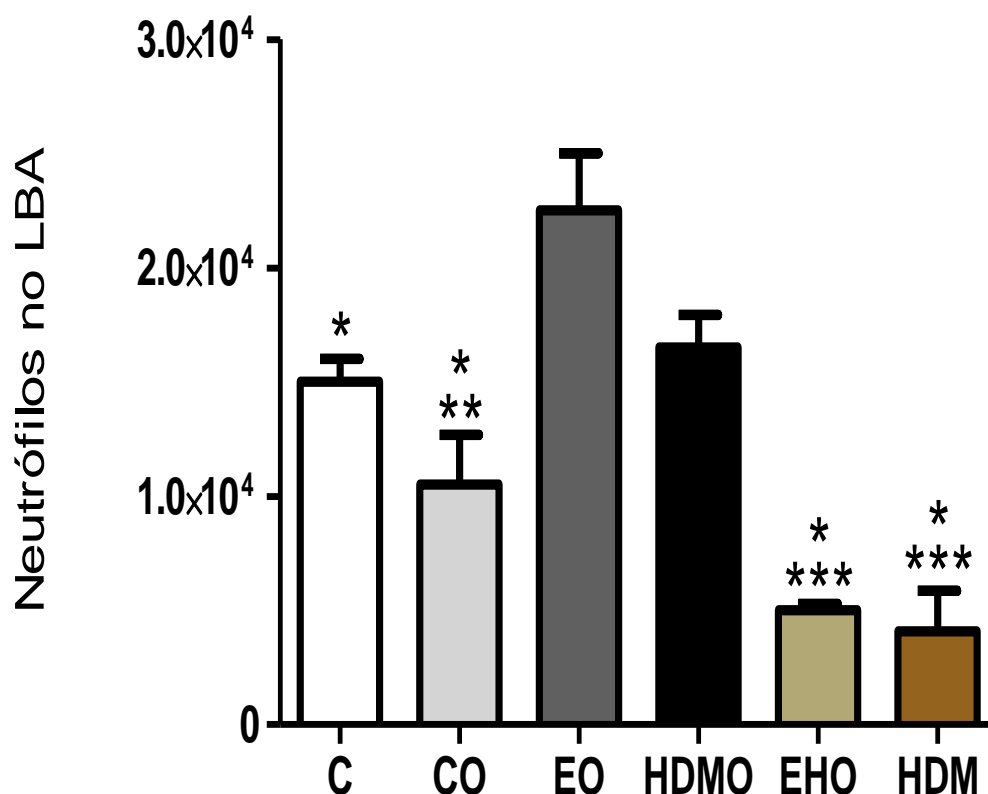
**Figura 9** –Células Totais no LBA.Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbio de intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobre os valores de células totais do LBA, em valores absolutos. Valores expressos como médias e desvio padrão. \* $p<0,05$ .

Na avaliação da presença de Eosinófilos do LBA o grupo HDMO apresentou diferenças em relação ao grupo C ( $p<0,05$ ). O valor de Eosinófilos do grupo HDMO esteve diferenciado em comparação com o grupo CO ( $p<0,01$ ). Os animais do grupo HDMO obtiveram resultados alterados em relação ao EO ( $p<0,01$ ). O grupo HDMO também apresentou diferenças em confronto com os dados do grupo EHO ( $p<0,01$ ) (Figura 10).



**Figura 10** – Eosinófilos no LBA. Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbio de intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobre os valores de eosinófilos no LBA, em valores absolutos. Valores expressos como médias e desvio padrão. \*\*\* $p < 0,001$  do grupo HDMOO comparado com os demais grupos; \*\*\* $p < 0,001$  do grupo HDMO comparado com os demais grupos.

Os protocolos propostos para o aumento de massa corporal, treinamento aeróbio de intensidade moderada e de inflamação pulmonar alérgica crônica, não foram capazes de influir sobre a quantidade de neutrófilos no LBA. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes no comparativo entre os grupos nos valores referentes a presença de neutrófilos no LBA (Figura 11).

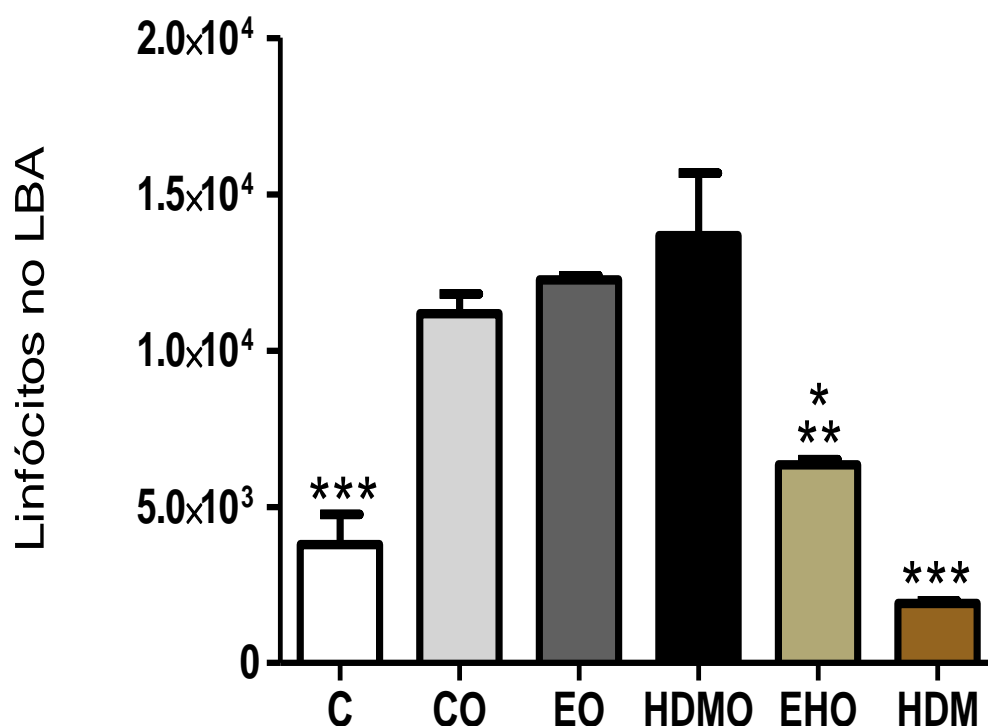


**Figura 11** – Neutrófilos no LBA. Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbico de intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobre os valores de neutrófilos no LBA, em valores absolutos. Valores expressos como médias e desvio padrão. \* $p < 0,05$  em comparação do grupo C versus CO, EHO e HDM; \* $p < 0,05$  em comparação do grupo CO versus C, EO e HDMO; \*\* $p < 0,01$  do grupo CO versus EO e HDMO; \* $P < 0,05$  do grupo EHO versus CO;  $p < 0,05$  do grupo HDMO versus CO; \*\*\* $p < 0,001$  do grupo EHO versus C, CO, EO e HDMO; \*\*\* $p < 0,001$  do grupo HDMO versus C, CO, EO e HDMO.

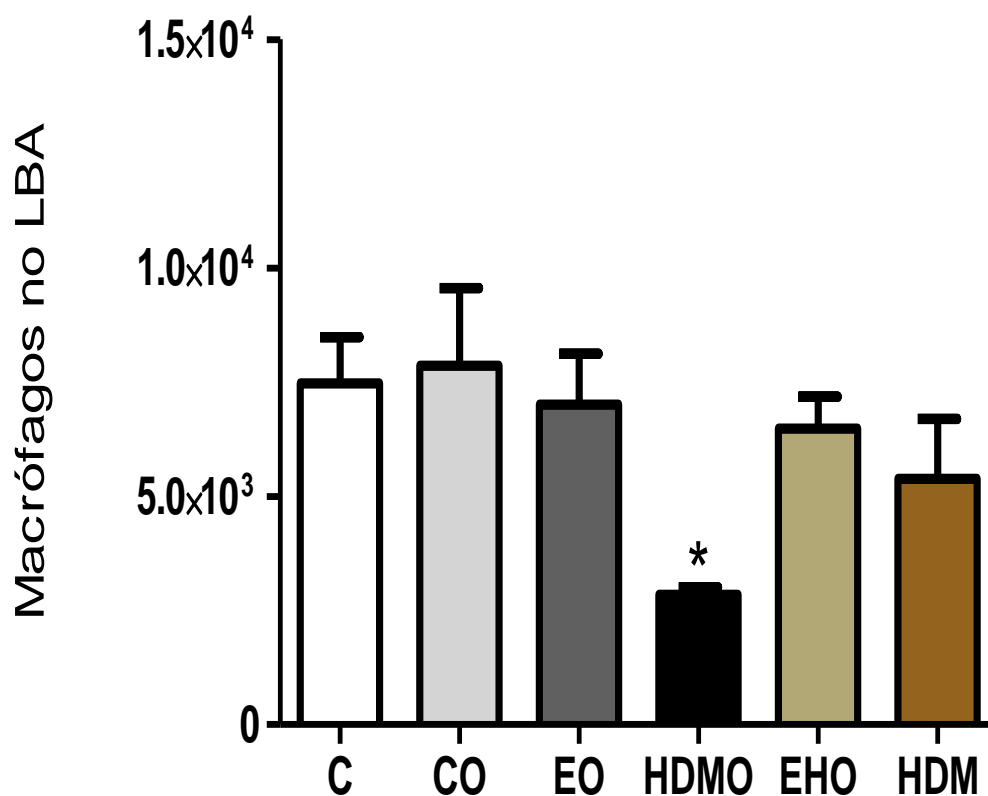
Através da análise proposta para a obtenção de dados relevantes a quantidade de células diferenciais no LBA, foi possível constatar que os protocolos utilizados durante o experimento em função de responder os questionamentos e alcançar os objetivos visados, não influíram também sobre a quantidade de linfócitos no LBA. Dessa forma, não foi possível obter diferenças estatisticamente significantes entre os grupos experimentais na avaliação de linfócitos no LBA (Figura 12).

Ainda se tratando da avaliação da inflamação pulmonar alérgica crônica e da possível influência que a obesidade pode ter no agravamento ou desenvolvimento

deste quadro, além da utilização do exercício físico de intensidade moderada a ser utilizado como forma terapêutica para o tratamento das patologias discutidas. Observamos que a quantidade de macrófagos no LBA não se diferenciou em nenhum dos grupos experimentais pesquisados (Figura 13).



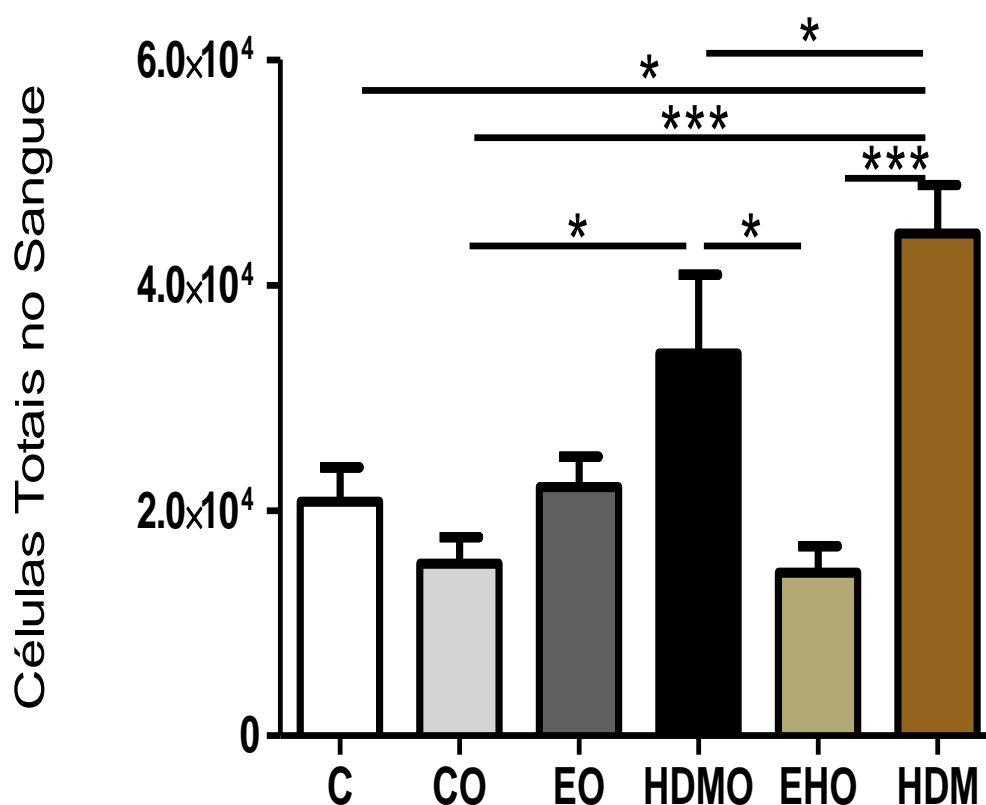
**Figura 12 – Linfócitos no LBA.** Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbico de intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobre os valores de linfócitos no LBA, em valores absolutos. Valores expressos como médias e desvio padrão. \*\*\* $p < 0,001$  do grupo C versus os grupos CO, EO e HDMO; \*\* $p < 0,01$  do grupo EHO versus HDMO; \* $p < 0,05$  do grupo EHO versus os grupos EO e CO; \*\*\* $p < 0,001$  do grupo HDMO versus os grupos CO, EO e HDMO.



**Figura 13** – Macrófagos no LBA. Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbico de intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobre os valores de macrófagos no LBA, em valores absolutos. Valores expressos como médias e desvio padrão. \* $p < 0,05$  do grupo HDMO versus os demais grupos.



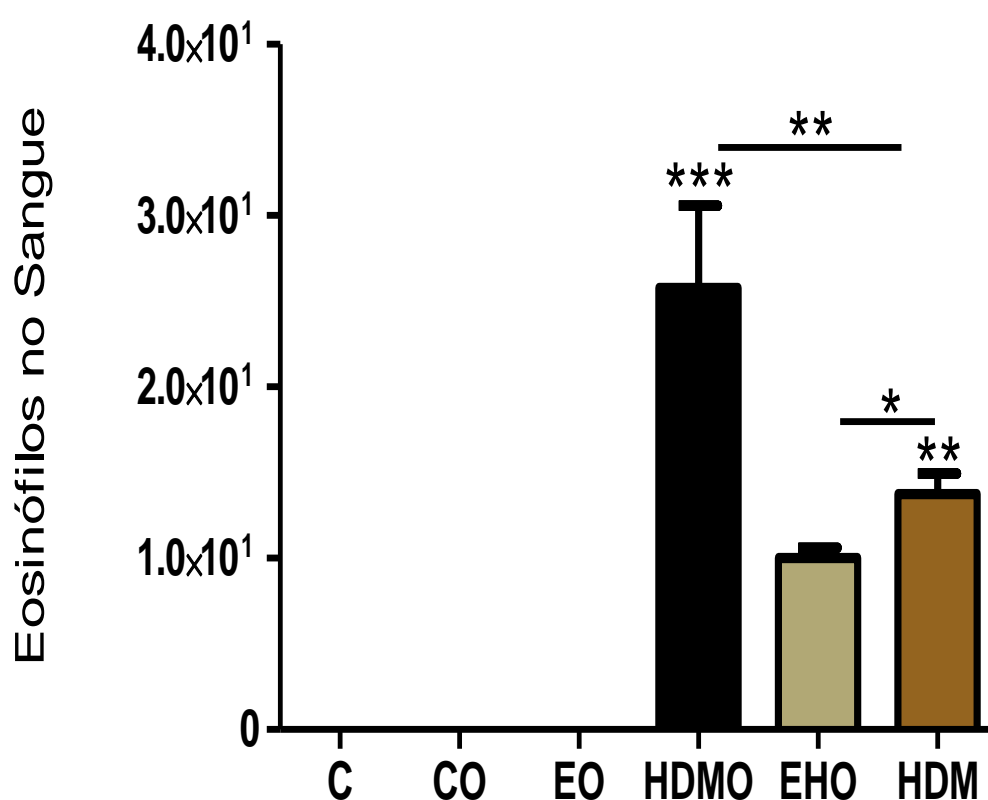
O protocolo de inflamação alérgica crônica foi capaz de aumentar a quantidade de células totais no sangue do grupo HDMO quando comparado aos grupos CO ( $p<0,05$ ) e EHO ( $p<0,05$ ). O treinamento físico aeróbio de intensidade moderada foi capaz de manter o grupo EHO com os valores de células sanguíneas totais semelhantes aos grupos C, CO e EO (Figura 14). A quantidade de eosinófilos no sangue do grupo HDMO esteve aumentada quando comparada aos demais ( $p<0,001$ ) (Figura 15). Em relação ao comparativo dos outros grupos, não foi possível constatar resultados com relevância estatisticamente significativa. Na contagem diferencial de células sanguíneas não foi possível obter resultados com diferenças significativas em relação aos neutrófilos, e macrófagos (Figura 16 e 17). Em contrapartida o grupo HDMO apresentou menores valores de linfócitos em relação ao grupo C e EHO ( $p<0,001$ ) e também no comparativo entre o grupo CO e EO ( $p<0,01$ ) (Figura 18).



**Figura 14** –Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbio de intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobre os valores de células totais no sangue, em valores absolutos. Valores expressos como médias e desvio padrão. \* $p<0,05$  do grupo em comparação com o grupo HDMO; \*\*\* $p<0,001$  do grupo em comparação com o grupo HDMO.

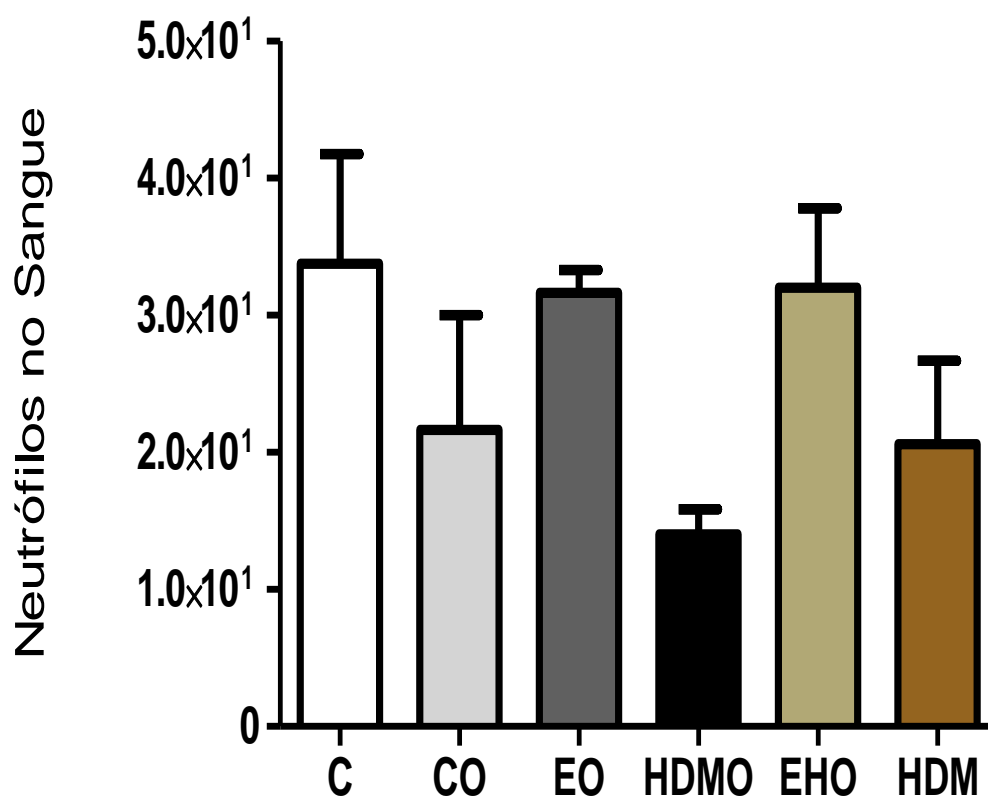
grupo CO versus HDMO; \*\*\* $p < 0,001$  do grupo CO versus HDM; \* $p < 0,05$  do grupo HDMOO versus os grupos EHO e HDM.

O protocolo proposto para a promoção da inflamação alérgica crônica, foi capaz de promover um aumento expressivo na quantidade de eosinófilos avaliada no sangue do grupo HDMO em comparação com os outros grupos. Logo, observa-se que os eosinófilos no sangue estiveram aumentados no grupo HDMO em relação aos grupos C, CO, EO e EHO (Figura 15).



**Figura 15** – Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbico de intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobre os valores de eosinófilos no sangue, em valores absolutos. Valores expressos como médias e desvio padrão. \*\*\* $p < 0,001$  do grupo HDMOO versus os grupos C, CO, EO e EHO;  $p < 0,01$  do grupo HDMOO versus HDM; \* $p < 0,05$  do grupo EHO versus HDM; \*\* $p < 0,01$  do grupo HDMO versus os grupos C, CO e EO.

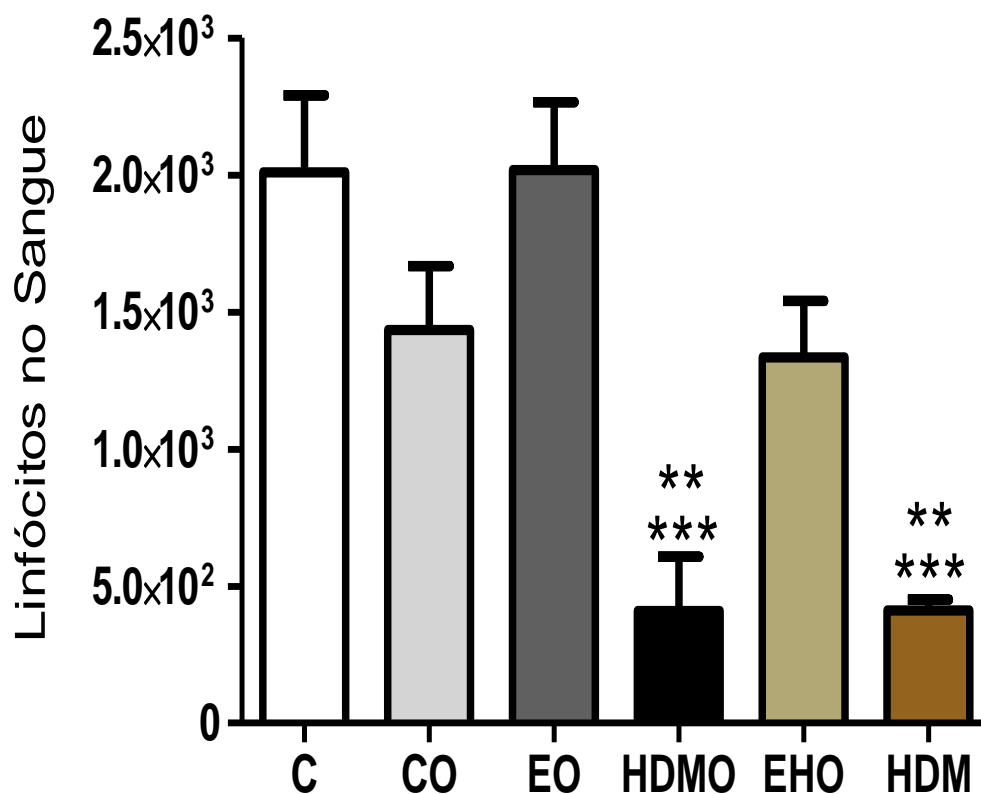
Os protocolos de treinamento físico de intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade não foram capazes de influir sobre a quantidade de neutrófilos no sangue em nenhum dos grupos experimentais.



**Figura 16** – Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbico de intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobre os valores de neutrófilos no sangue, em valores absolutos. Valores expressos como médias e desvio padrão. Não foram observadas diferenças entre os grupos

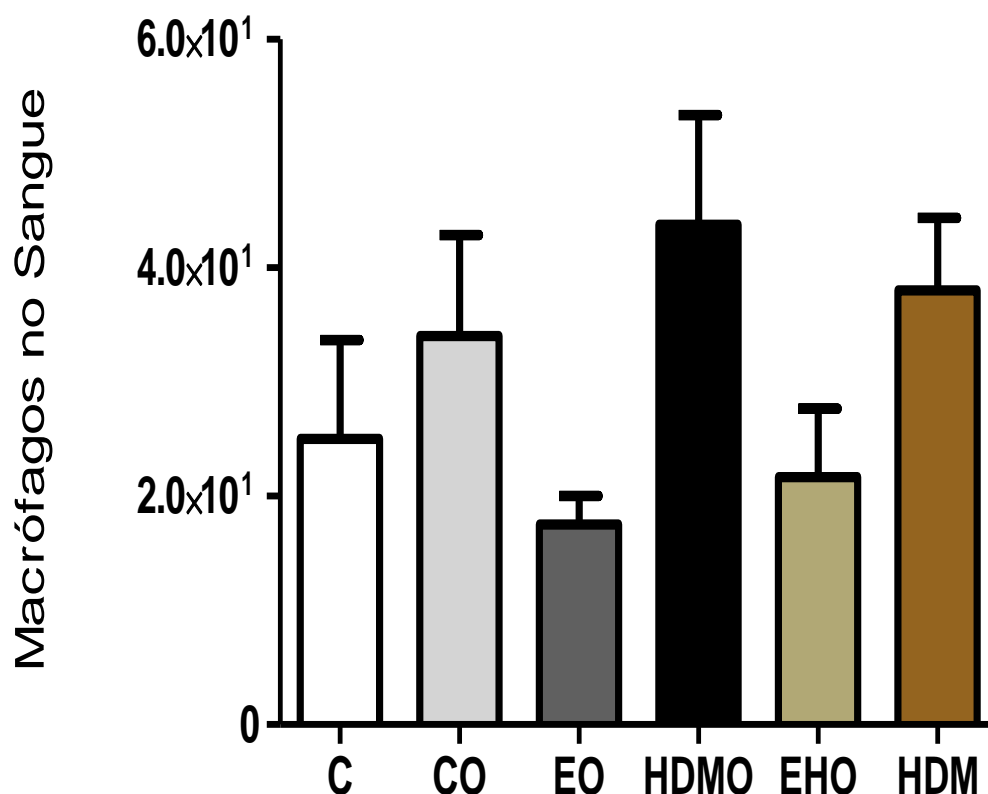
É possível observar que os valores de linfócitos no sangue estiveram menores no grupo HDMO em relação ao grupo C ( $p < 0,001$ ) e no grupo EHO ( $p < 0,001$ ). Adicionalmente o grupo HDMO também apresentou valores reduzidos em relação ao

grupo CO ( $p<0,01$ ) e ao EO ( $p<0,01$ ). Em relação aos demais grupos não foi possível obter resultados que diferissem entre os grupos (Figura 17).



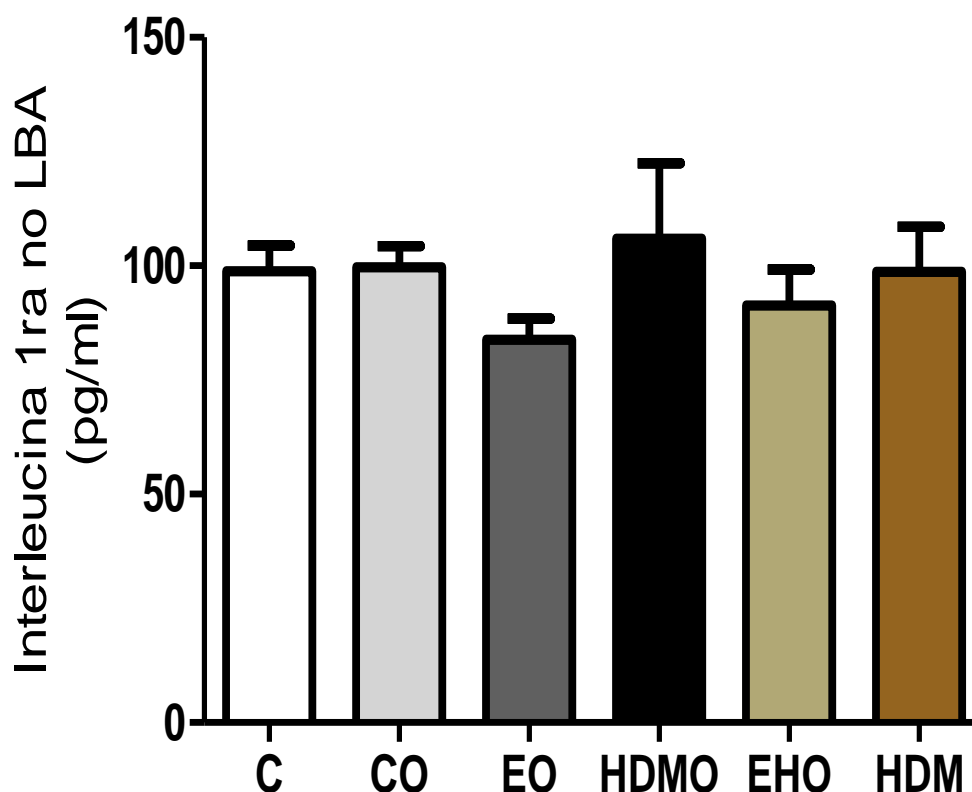
**Figura 17** –Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbio de intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobre os valores de neutrófilos no sangue, em valores absolutos. Valores expressos como médias e desvio padrão. \*\*\* $p<0,001$  grupo HDMOO versus os grupos C e EO; \*\*\* $p<0,001$  do grupo HDMO versus C e EO; \*\* $p<0,01$  do grupo HDMOO versus CO e EHO; \*\* $p<0,01$  do grupo HDMO em comparação com os grupos CO e EHO.

Os protocolos de treinamento físico aeróbio de intensidade moderada, obesidade e inflamação pulmonar alérgica crônica não foram capazes de provocar diferenciações na quantidade de macrófagos no sangue entre os grupos estudados (Figura 18).



**Figura 18** –Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbio de intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobre os valores de macrófagos no sangue, em valores absolutos. Valores expressos como médias e desvio padrão. Não foram observadas diferenças entre os grupos.

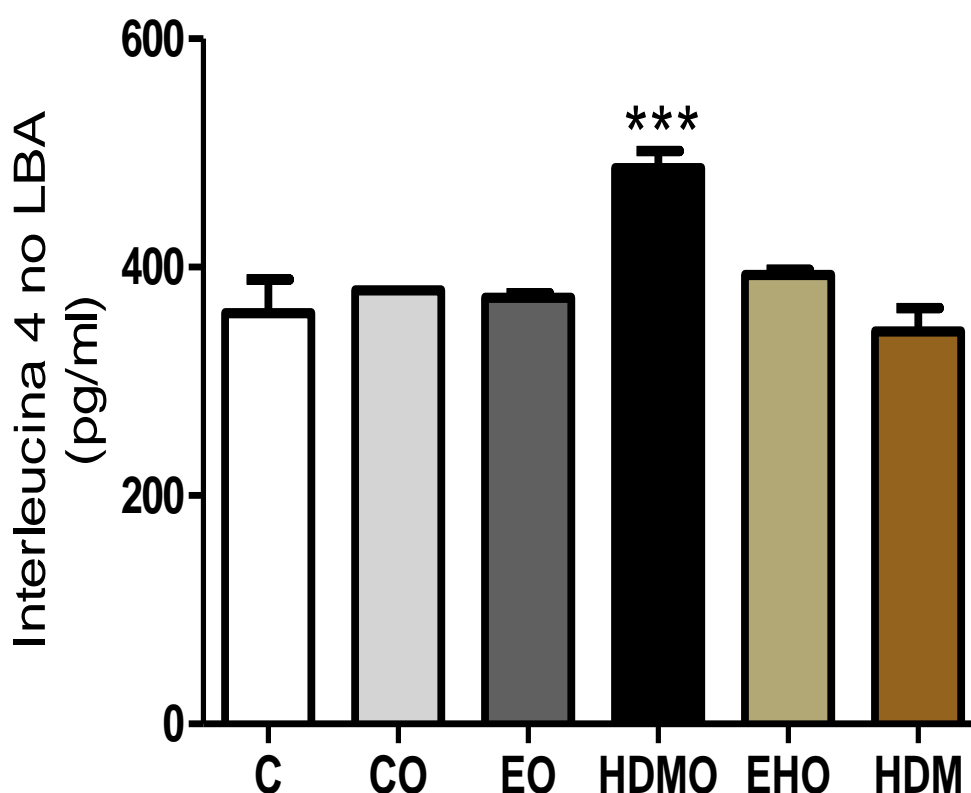
O treinamento físico aeróbio de intensidade moderada não foi capaz de modificar os valores de IL 1ra na avaliação do LBA. Essa constatação é feita uma vez que, não houve alterações estatisticamente significativas em nenhum dos grupos, mesmo ao se comparar os grupos treinados com os grupos C e CO (Figura 19).



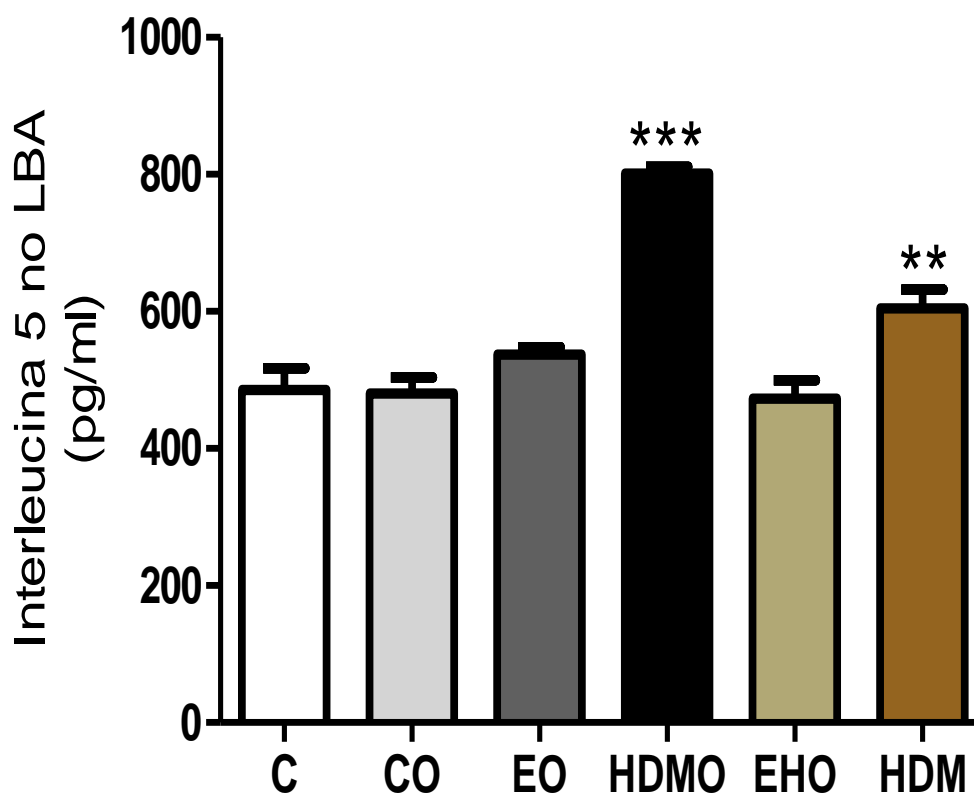
**Figura 19** –Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbio de intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobre os valores de IL 1ra no LBA, em pg/mL. Valores expressos como médias e desvio padrão. Não foi possível observar diferenças entre os grupos.

O protocolo de inflamação pulmonar alérgica crônica em conjunto com o de obesidade, foi capaz de promover um aumento significativo no valor de IL 4 no LBA do grupo HDMO em comparação com o grupo C ( $p < 0,05$ ). Entretanto, não foram observados resultados significativos no comparativo do grupo HDMO com os demais grupos submetidos ao protocolo de obesidade (Figura 20). Se tratando ainda do grupo submetido aos protocolos tanto de obesidade quanto de inflamação pulmonar, é possível verificar que na avaliação da IL 5 no LBA via ELISA, foi constatado que o grupo HDMO obteve aumento desta citocina em comparação com os outros grupos experimentais pesquisados ( $p < 0,001$ ) (Figura 21).

Para a compreensão da devida relevância dos dados apresentados na presente pesquisa, é de suma importância que se ressalte que embora o grupo EHO não tenha apresentado valores menores de IL 4 quando comparado ao grupo HDMO (Figura 20), o mesmo não ocorre para os dados referentes a IL 5. Uma vez que o grupo EHO tenha resultados menores estatisticamente significantes quando confrontado com o grupo HDMO ( $p < 0,001$ ) (Figura 21).



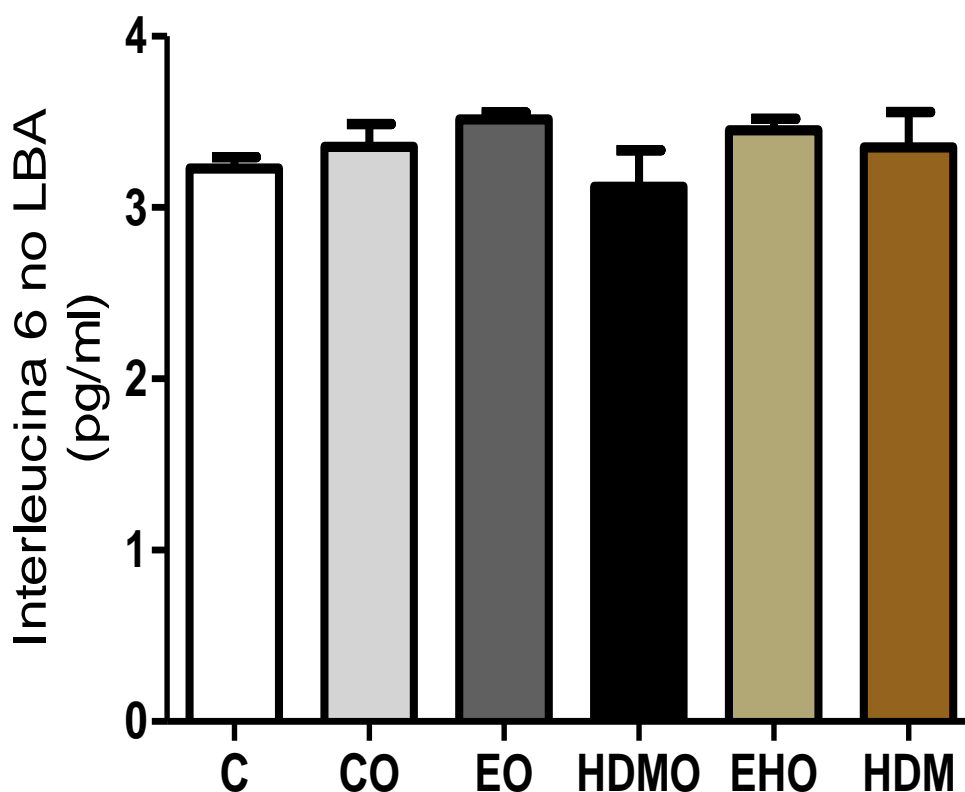
**Figura 20** – Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbio de intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobre os valores de IL 4 no LBA, em pg/mL. Valores expressos como médias e desvio padrão. \*\*\* $p < 0,001$  do grupo HDMO em comparação com os demais grupos.



**Figura 21** –Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbio de intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobre os valores de IL 5 no LBA, em pg/mL. Valores expressos como médias e desvio padrão. \*\*\* $p < 0,001$  do grupo HDMO em comparação com os grupos EHO, EO, CO e C. \*\* $p < 0,01$  do grupo HDMO versus os grupos C, CO, EO, HDMO e EHO.



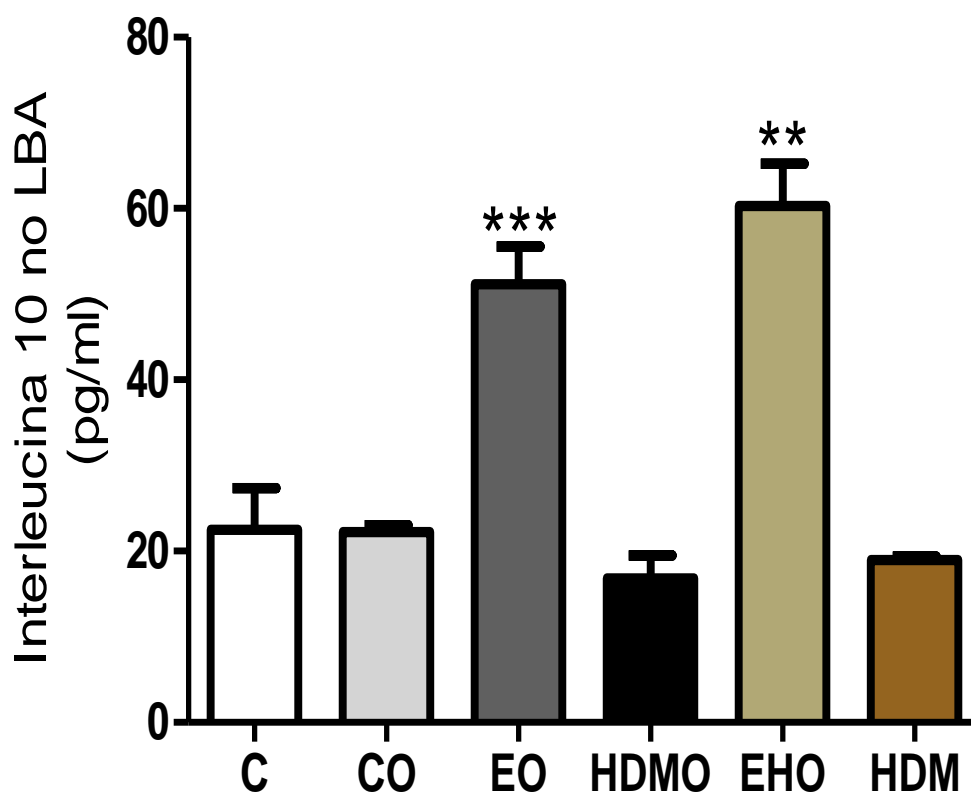
Os protocolos de obesidade, inflamação pulmonar alérgica crônica e tampouco do treinamento físico aeróbio de intensidade moderada não foram capazes influir sobre os níveis de IL 6 no LBA dos grupos experimentais, conforme avaliado via ELISA (Figura 22).



**Figura 22** –Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbio de intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobre os valores de IL 6 no LBA, em pg/mL. Valores expressos como médias e desvio padrão. Não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais.

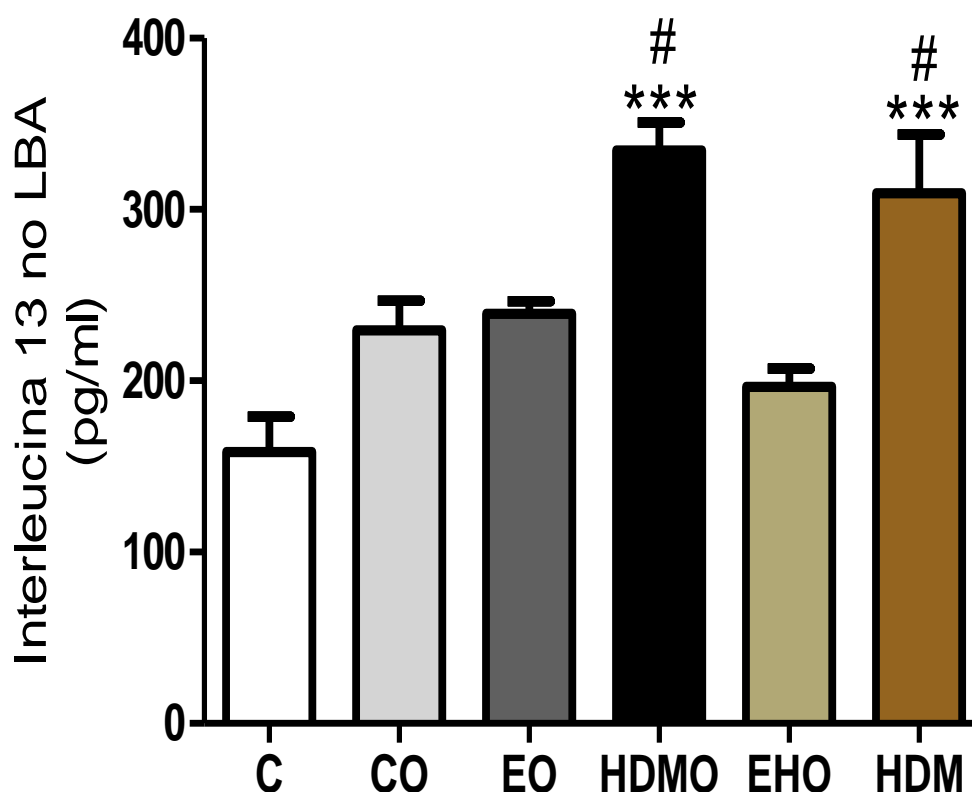
É possível verificar que os grupos submetidos ao treinamento físico aeróbio de intensidade moderada possuíam valores maiores e estatisticamente significantes de IL 10 em comparação com os demais grupos. O grupo EO possuiu maiores valores quando comparado ao grupo C ( $p < 0,01$ ). Ainda se tratando do grupo EO, este também teve maior quantidade de IL 10 em comparação com os grupos CO ( $p < 0,05$ ) e HDM ( $p < 0,05$ ) (Figura 23). Já o grupo EHO possuiu valores maiores em comparação

com os grupos HDM ( $p<0,01$ ), CO ( $p<0,01$ ) e C ( $p<0,01$ ). Já os demais grupos não obtiveram diferenças estatisticamente relevantes no comparativo entre si, mesmo se tratando dos valores do grupo HDMO.



**Figura 23** – Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbico de intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobre os valores de IL 10 no LBA, em pg/mL. Valores expressos como médias e desvio padrão. \*\*\* $p<0,001$  do grupo EO em comparação com os grupos C, CO, HDMO e HDM; \*\* $p<0,01$  do grupo EHO versus os grupos C, CO, HDMO e HDM.

Os protocolos propostos para o aumento de massa corporal, treinamento aeróbio de intensidade moderada e de inflamação pulmonar alérgica crônica, não foram capazes de influir sobre a quantidade IL 13 no LBA. Dessa forma, não foi possível constatar diferenças estatisticamente significantes no comparativo entre os grupos nos valores referentes a esta citocina no LBA (Figura 24).

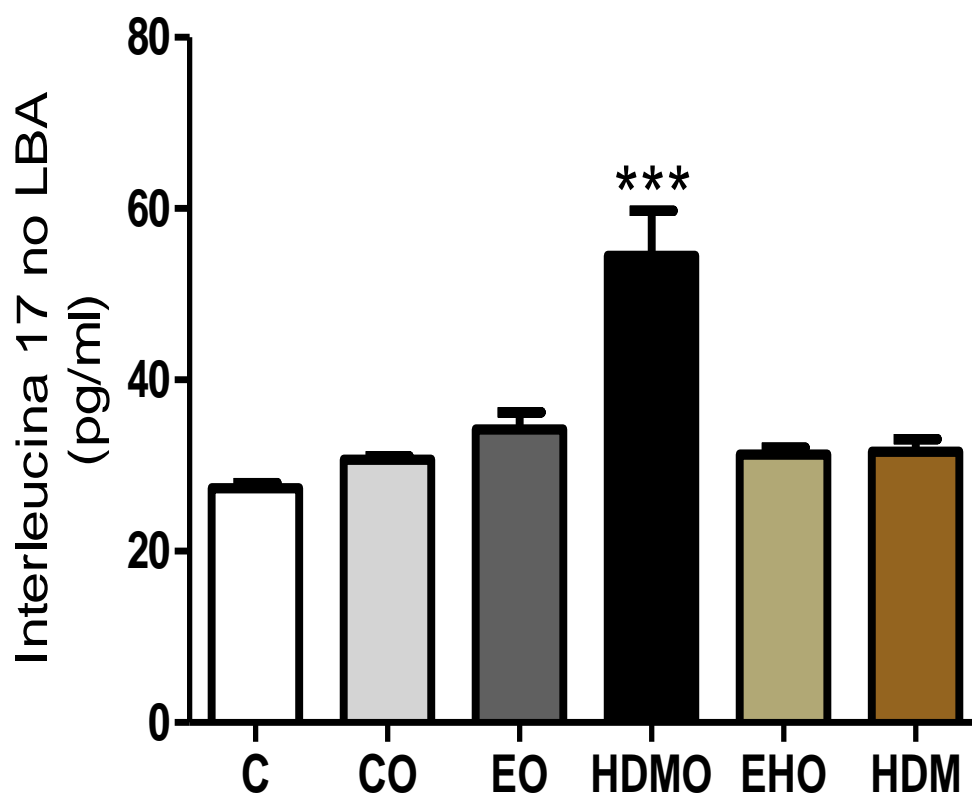


**Figura 24** –Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbio de intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobre os valores de IL 13 no LBA, em pg/mL. Valores expressos como médias e desvio padrão. \*\*\* $p < 0,001$  no grupo HDMO versus os grupos C e EHO; \*\*\* $p < 0,001$  no grupo HDMO versus os grupos C e EHO; # $p < 0,01$  do grupo HDMO em comparação com os grupos CO e EO; # $p < 0,01$  do grupo HDMO versus os grupos CO e EO.

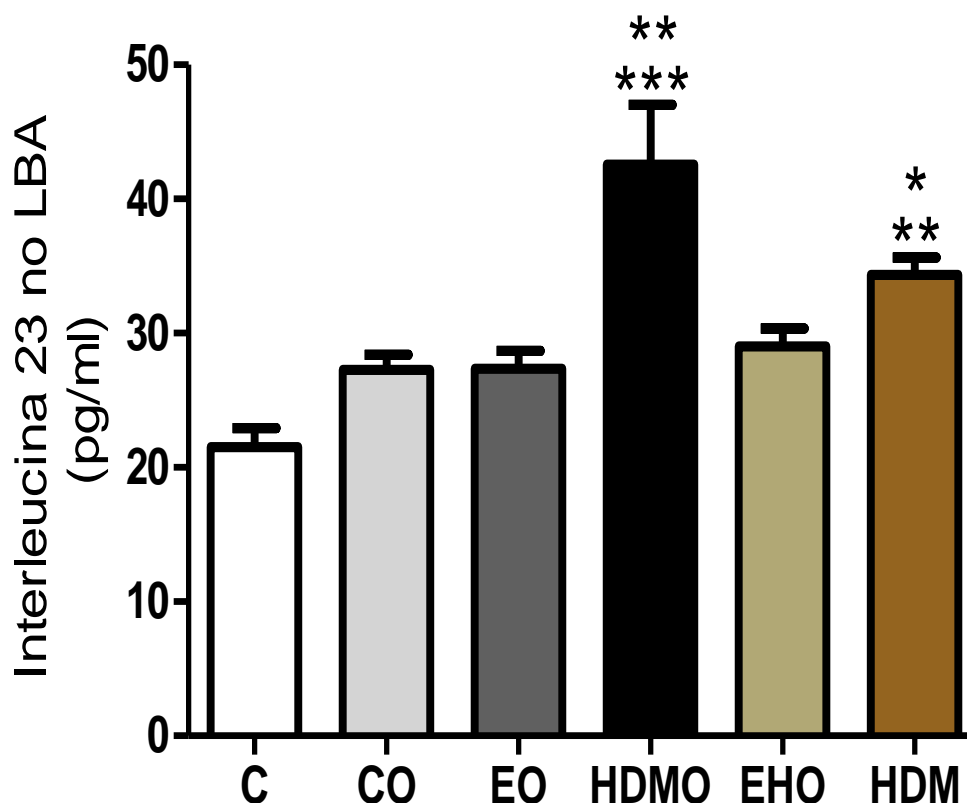
O protocolo de inflamação pulmonar alérgica crônica em conjunto com o de promoção ao aumento de massa corporal objetivando caracterizar um quadro de obesidade, pode promover o aumento de IL 17 no LBA em comparação com o grupo

C ( $p<0,001$ ), ao grupo CO ( $p<0,05$ ), e aos grupos EO e EHO ( $p<0,01$ ). Entretanto, o grupo EHO que também foi submetido aos mesmos protocolos do HDM e adicionalmente ao de treinamento físico aeróbio de intensidade moderada como forma terapêutica objetivando influir sobre os aspectos inflamatórios que permeiam os assuntos estudados, não foi possível observar diferenças estatisticamente significativas quando em comparação com os grupos C, CO e EO (Figura 25).

Através da avaliação da IL 23 no LBA foi possível constatar que o grupo C obteve resultados menores em relação ao grupo CO ( $p<0,05$ ), bem como quando em comparação com o grupo HDMO ( $p<0,01$ ). Entretanto, todos os grupos submetidos ao protocolo para a promoção do aumento da massa corporal não obtiveram resultados estatisticamente significantes quando comparados entre si. Mas vale a ressalva de que apenas os grupos submetidos ao treinamento físico aeróbio de intensidade moderada, obtiveram resultados de IL 23 no LBA sem diferença com o grupo C (Figura 26)



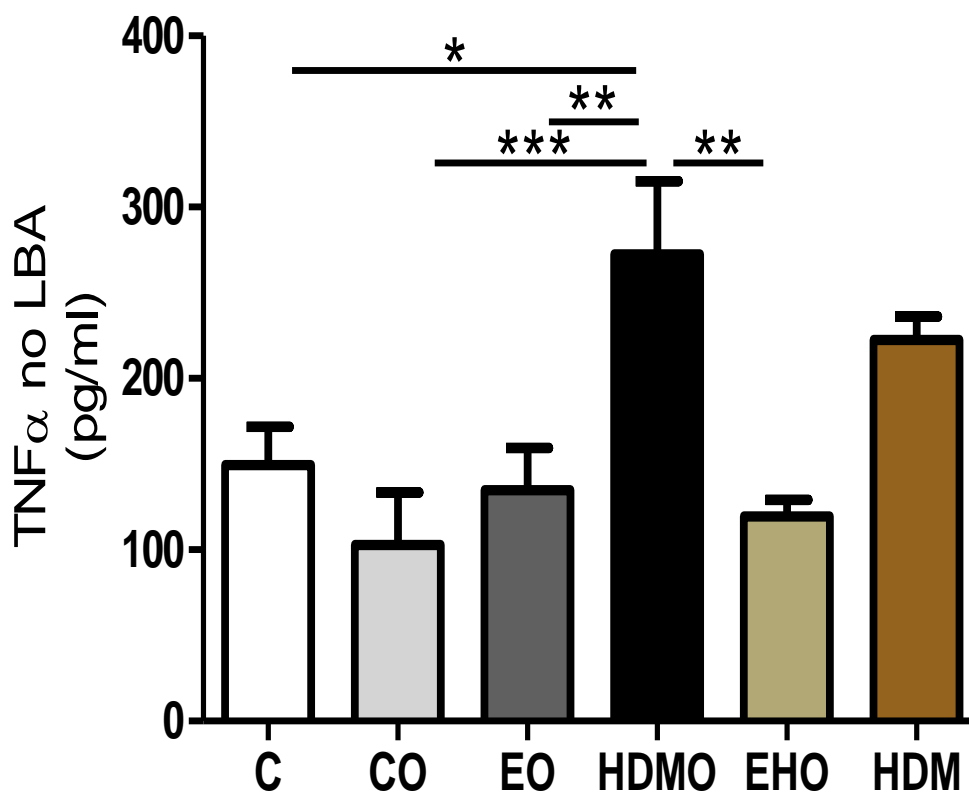
**Figura 25** – Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbio de intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobre os valores de IL 17 no LBA, em pg/mL. Valores expressos como médias e desvio padrão. \*\*\* $p < 0,001$  do grupo HDMO versus os demais grupos.



**Figura 26** –Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbio de intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobre os valores de IL 23 no LBA, em pg/mL. Valores expressos como médias e desvio padrão. \*\*\* $p < 0,001$  no grupo HDMO comparado com o grupo C; \*\* $p < 0,01$  no grupo HDMO comparado com os grupos CO, EO e EHO; \*\* $p < 0,01$  no grupo HDMO versus os grupos CO, EO e EHO; \* $p < 0,05$  no grupo HDMO versus HDMO.

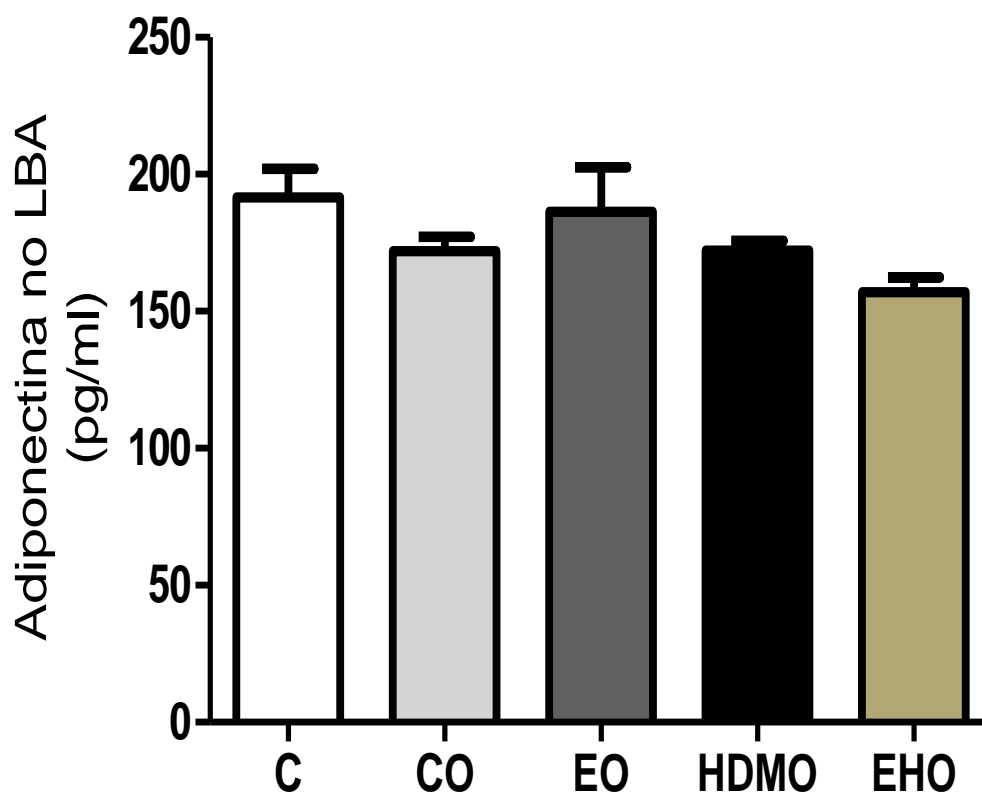
Na avaliação do  $\text{TNF}\alpha$  no LBA foi possível constatar que o grupo C obteve resultado menor estatisticamente significativo em comparação com o grupo HDMO ( $p < 0,05$ ), porém o mesmo não ocorreu ao comparar este grupo com os demais. O grupo CO também obteve resultado menor comprovado estatisticamente em comparação com o grupo HDMO ( $p < 0,01$ ). O grupo EO apresentou resultados menores de  $\text{TNF}\alpha$  em relação ao grupo HDMO ( $p < 0,01$ ). O grupo EHO também apresentou valores estatisticamente significativos e menores quando confrontado com os resultados do HDM ( $p < 0,01$ ). Subtraindo o grupo HDMO, os demais grupos não

apresentaram diferenças significantes nos valores apresentados e comparados entre si (Figura 27).



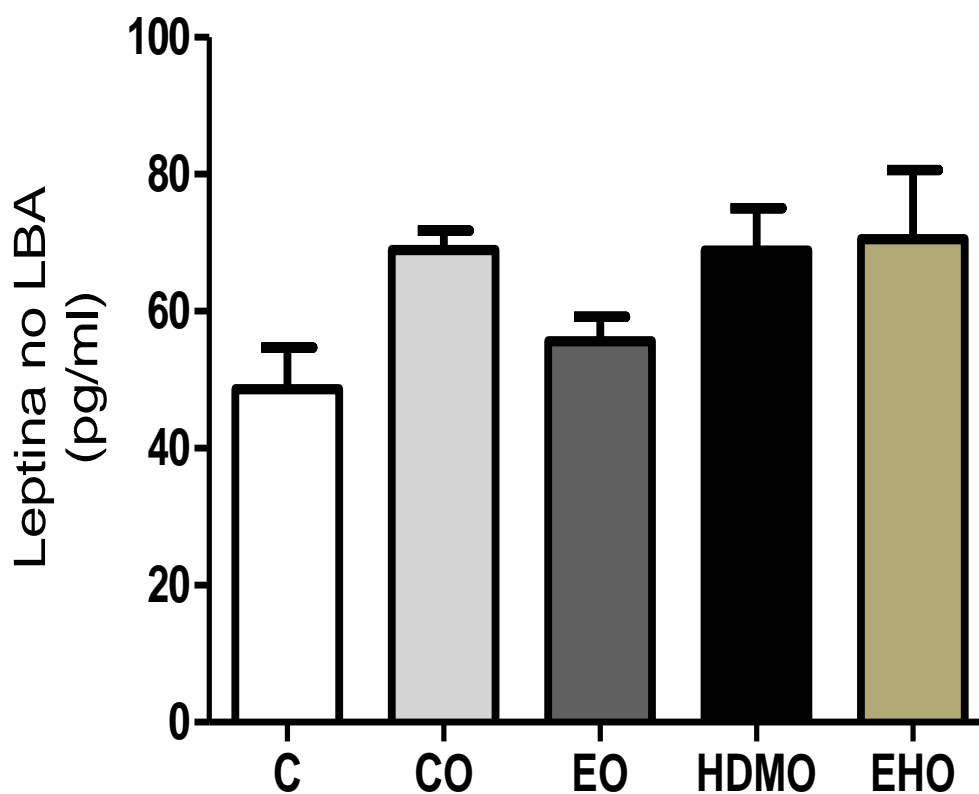
**Figura 27** –Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbio de intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobre os valores de TNFα no LBA, em pg/mL. Valores expressos como médias e desvio padrão. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

O protocolo de aumento da massa corporal objetivando caracterizar um modelo experimental de obesidade, bem como os demais protocolos propostos de treinamento físico aeróbio de intensidade moderada e o de inflamação pulmonar alérgica crônica não foram capazes de promover variações das adipocinas, tanto a anti-inflamatória Adiponectina, quanto as pró-inflamatórias Leptina e Resistina avaliadas no LBA. Os dados referentes a Adiponectina são ilustrados na Figura 28, já os resultados da Leptina e Resistina no LBA demonstrados na Figura 29 e 30, respectivamente.

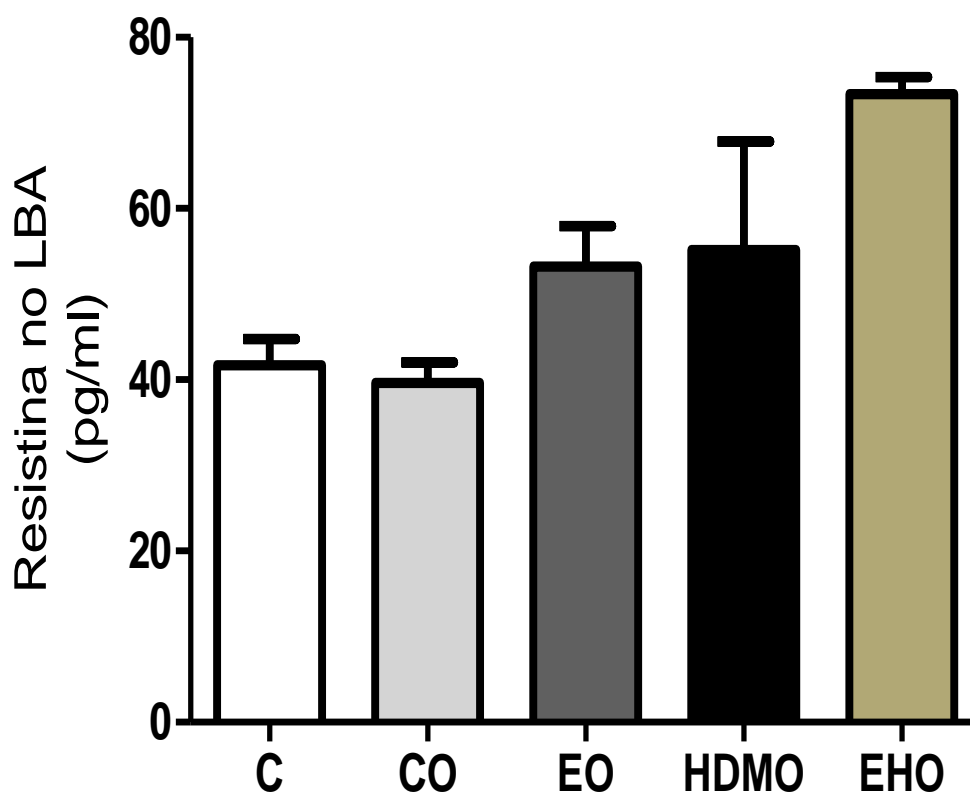


**Figura 28** –Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbio de intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobre os valores de adiponectina no LBA, em pg/mL. Valores expressos como médias e desvio padrão. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$





**Figura 29** –Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbio de intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobre os valores de leptina no LBA, em pg/mL. Valores expressos como médias e desvio padrão. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$



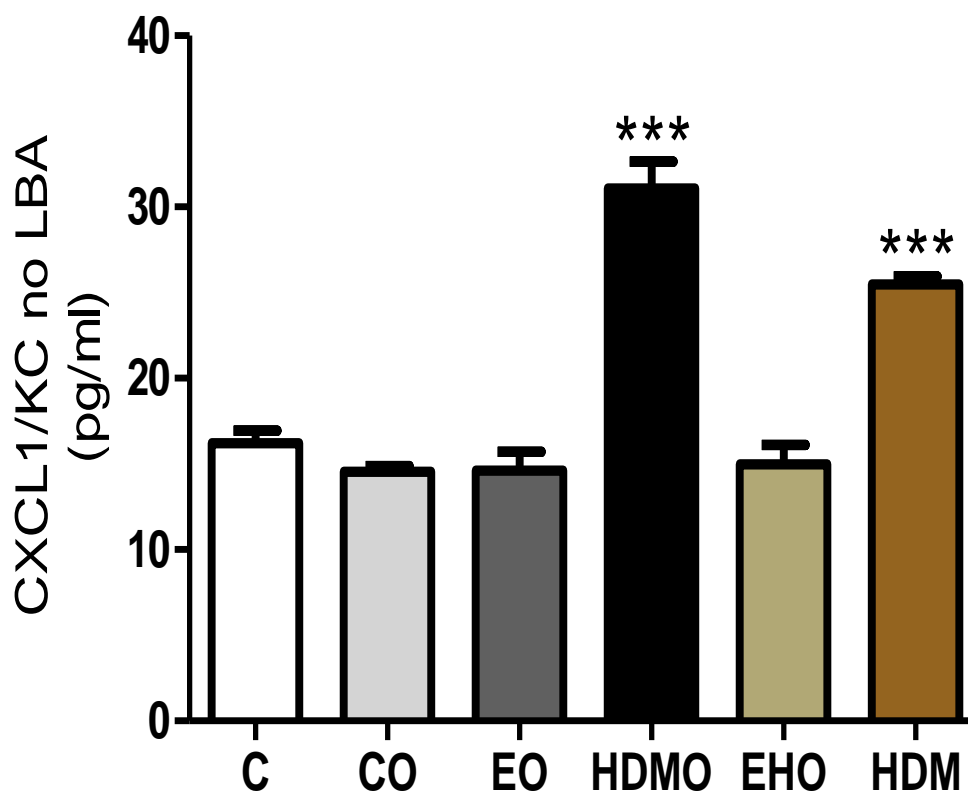
**Figura 30** –Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbio de intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobre os valores de resistina no LBA, em pg/mL. Valores expressos como médias e desvio padrão. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$

Adicionalmente ao projeto proposto, foram avaliados também as citocinas CXCL1/KC e também a IL 1 $\beta$  no LBA e também no Soro.

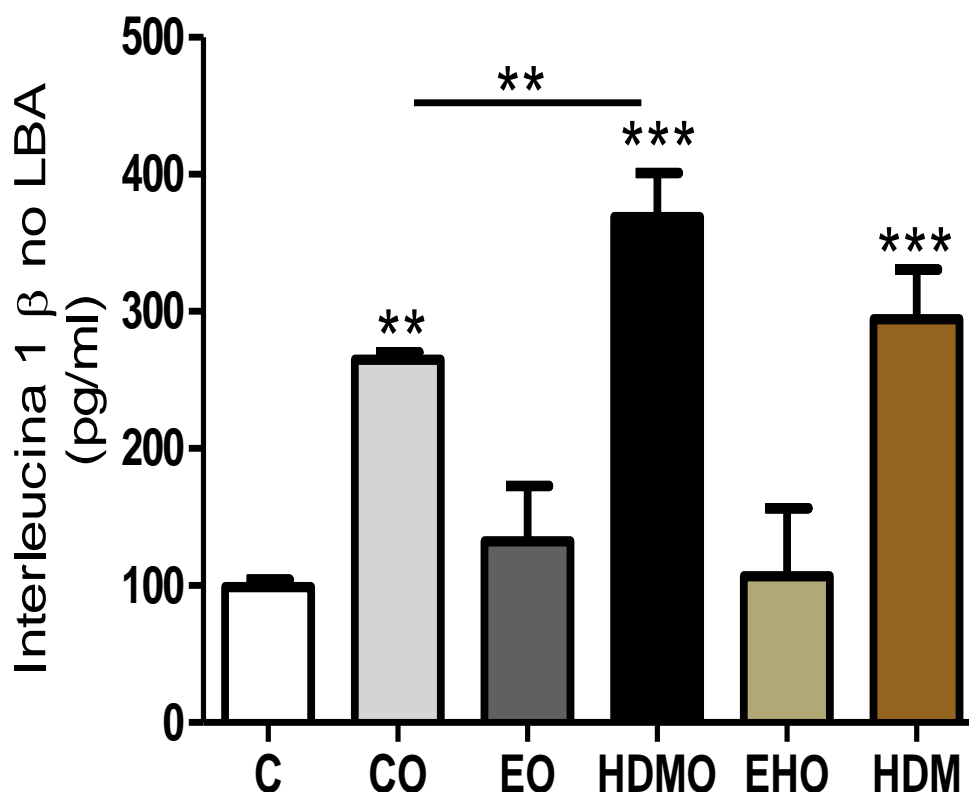
Foi observado que no modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica em adição ao modelo aumento de massa corporal foi capaz de promover um aumento nos níveis da citocina CXCL1/KC, uma vez que estes estiveram aumentados quando comparados com os demais grupos experimentais propostos. Tal resultado é embasado por valores que demonstram serem maiores do grupo HDMO em relação aos outros grupos, assumindo uma diferença estatisticamente significativa de  $p < 0,001$ , conforme demonstrado na Figura 31.

Os mesmos modelos de inflamação pulmonar e de obesidade foram capazes de aumentar os níveis da citocina IL 1 $\beta$  no LBA no grupo HDMO em comparação com

os grupos C e EO ( $p<0,001$ ). Também foi possível observar que a IL 1 $\beta$  esteve diminuída no grupo EHO quando comparada com o grupo HDMO ( $p<0,01$ ) (Figura 32)



**Figura 31** –Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbiode intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobreos valores de CXCL1/KC no LBA, em pg/mL. Valores expressos como médias e desvio padrão. \*\*\* $p<0,001$  no grupo HDMOO em comparação com os demais grupos.\*\*\* $p<0,001$  no grupo HDMO versus os demais grupos.

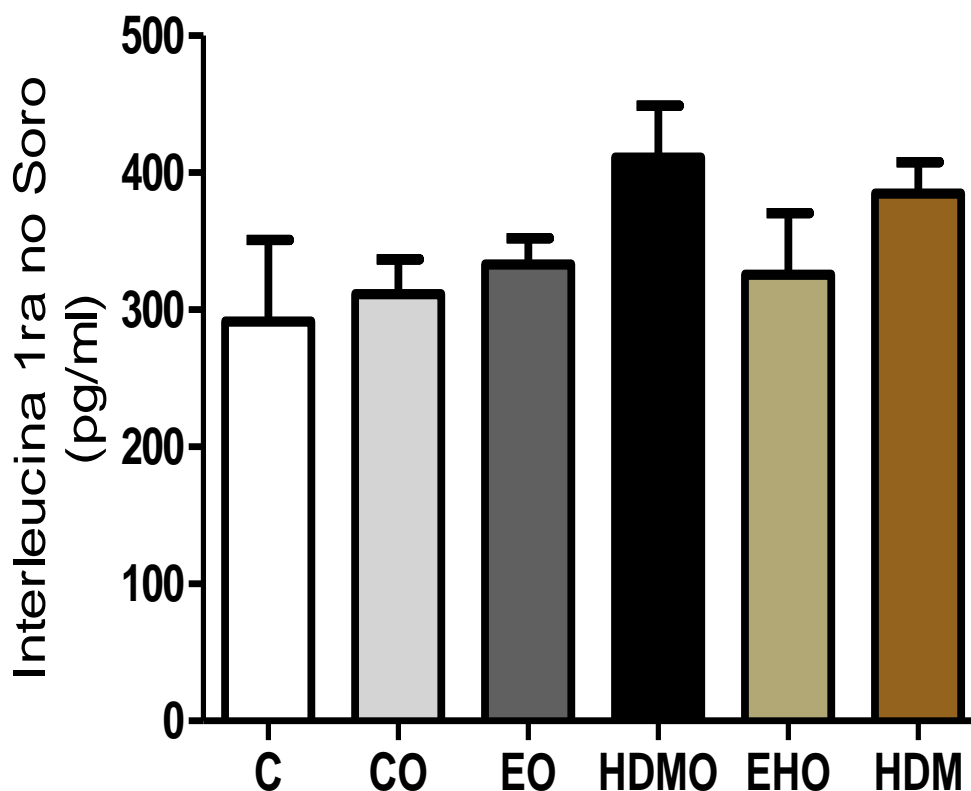


**Figura 32** –Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbio de intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobre os valores de IL 1β no LBA, em pg/mL. Valores expressos como médias e desvio padrão. \*\* $p < 0,01$  o grupo CO versus os grupos C, EO e EHO; \*\*\* $p < 0,001$  no grupo HDMO em comparação com os grupos C, EO e EHO; \*\* $p < 0,01$  no grupo HDMO em comparação com o grupo CO; \*\*\* $p < 0,001$  no grupo HDMO em comparação com os grupos C, EO e EHO.

Afim de obter dados referentes a inflamação sistêmica provocada pelos protocolos experimentais propostos, foram avaliadas citocinas no soro obtidas no momento da eutanásia dos animais.

Nenhum dos grupos submetidos aos diferentes protocolos abordados, e nem mesmo aos protocolos que ocorreram em concomitância durante o projeto foi capaz de influir sobre os níveis da IL 1ra. Dessa forma não houveram diferenças

estatisticamente significantes desta citocina na comparação entre os grupos investigados (Figura 33)

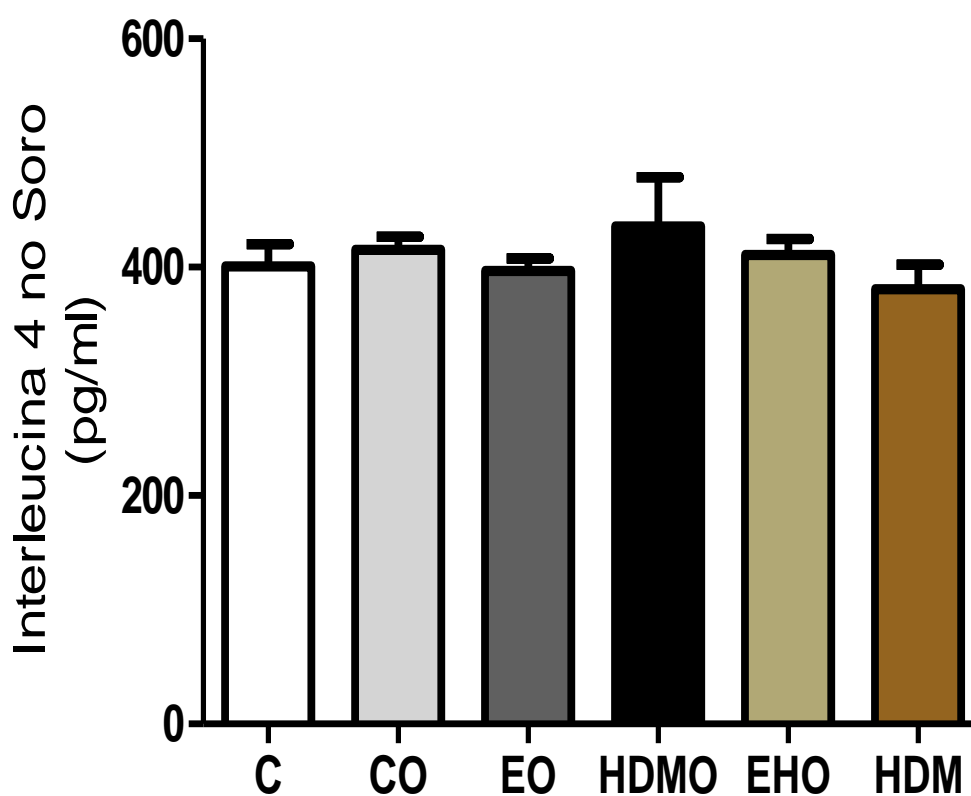


**Figura 33** –Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbiode intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobreos valores de IL 1ra no Soro, em pg/mL. Valores expressos como médias e desvio padrão. Não foram observadas diferenças entre os grupos.

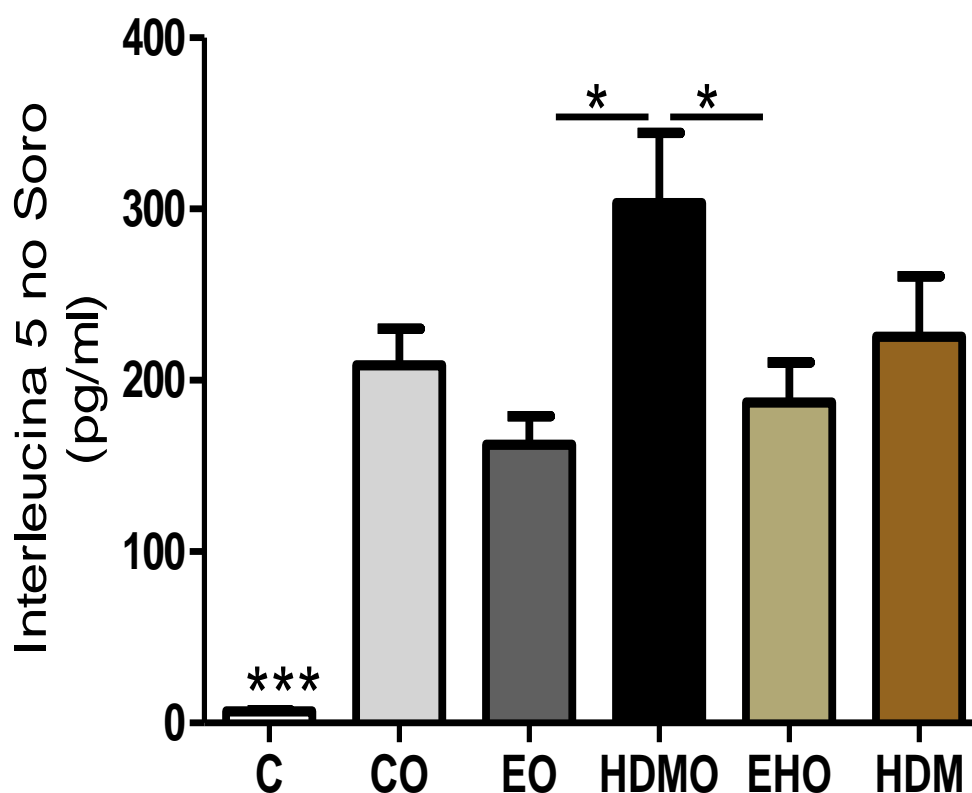
Não foi possível observar diferenças entre os grupos experimentais em relação os níveis de IL4 no soro, já que os resultados referentes aos valores obtidos não apresentaram significância estatística.

Os protocolos propostos de inflamação pulmonar, obesidade e treinamento físico de intensidade moderada foram capazes de alterar os níveis de IL 5 no soro dos animais. Tal afirmativa é embasada pelo fato de o grupo C que não foi submetido a protocolo algum, possuir níveis diminuídos desta citocina quando comparado com os

demais grupos pesquisados ( $p < 0,001$ ). O grupo CO apresentou níveis de IL 5 diminuídas em comparação com o grupo HDMO. O grupo EO demonstrou baixas quantidades de IL 5 quando comparada com o grupo HDMO ( $p < 0,01$ ). O grupo EO também obteve valores inferiores de IL 5 em relação ao grupo HDMO ( $P < 0,01$ ). Entretanto, vale ressaltar que possivelmente o protocolo de treinamento físico aeróbio de intensidade moderada pode ter promovido uma diminuição nos níveis desta citocina, uma vez que o grupo EHO não apresentou diferenças em relação ao grupo EO (Figura 35).

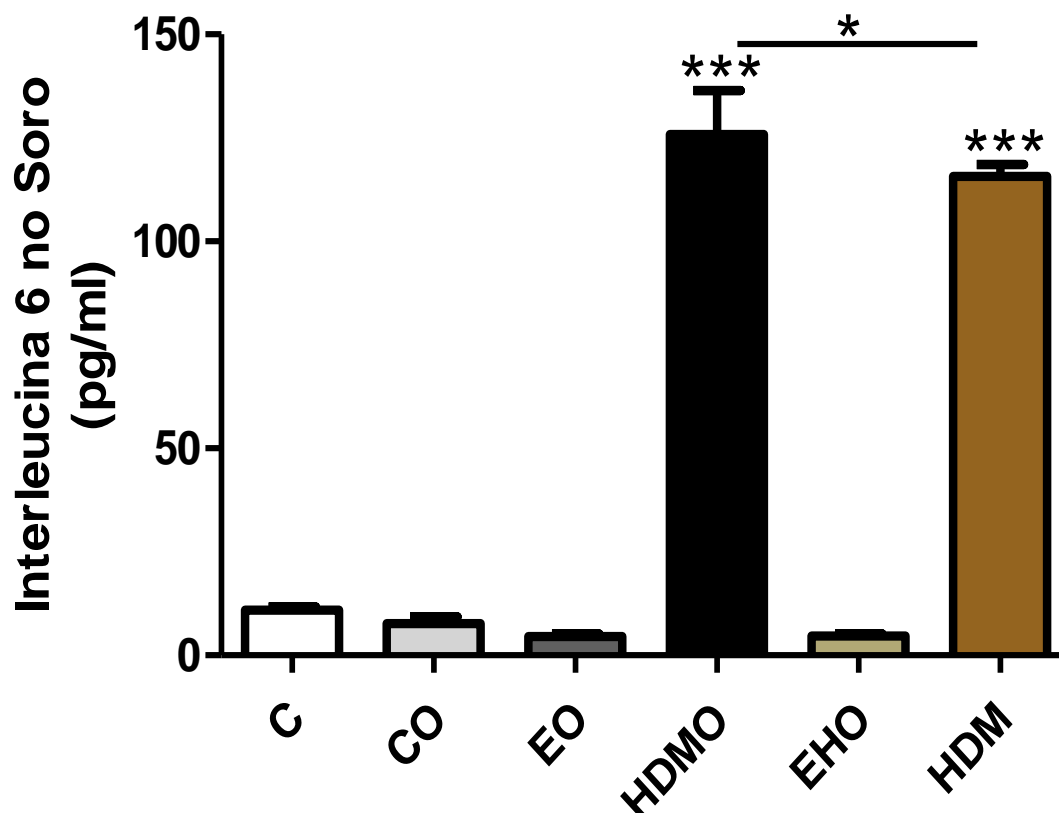


**Figura 34** –Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbio de intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobre os valores de IL 4 no Soro, em pg/mL. Valores expressos como médias e desvio padrão. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$



**Figura 35** –Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbico de intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobre os valores de IL 5 no Soro, em pg/mL. Valores expressos como médias e desvio padrão. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$

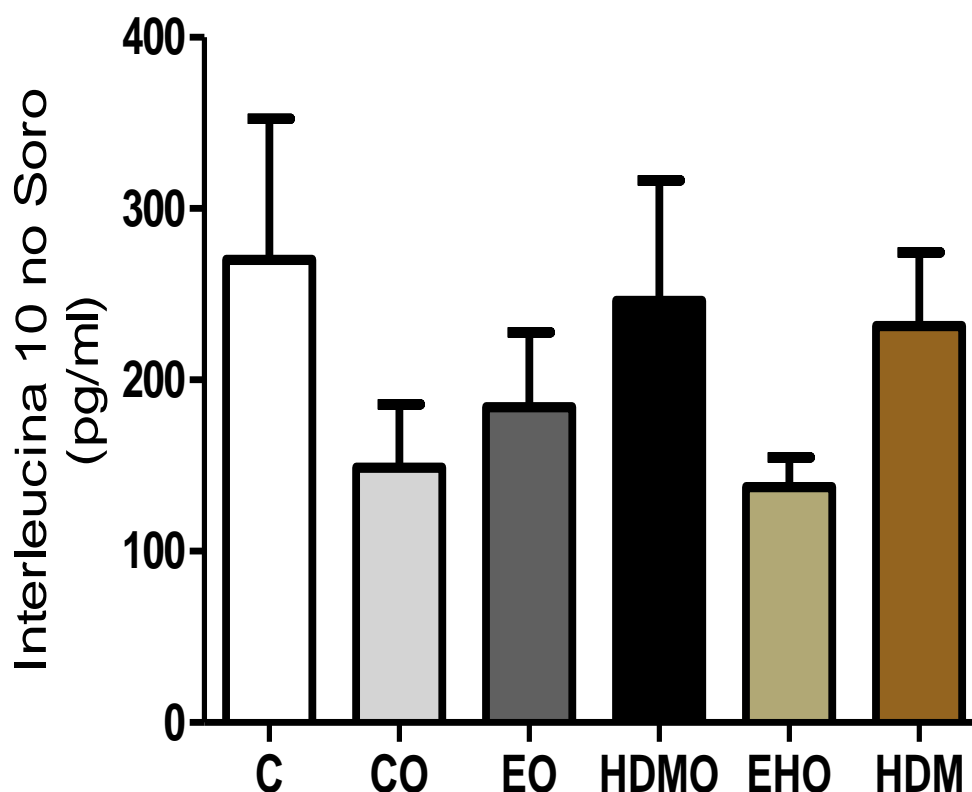
Via o protocolo de inflamação pulmonar alérgica crônica em adição com o de aumento de massa corporal, foi possível constatar que o grupo submetido a estes obteve grande diferença de IL 6 no soro quando comparado com os demais grupos experimentais. Dessa forma o grupo HDMO apresentou maiores níveis de IL 6 comparado com os outros grupos ( $p < 0,001$ ) (Figura 36).



**Figura 36** –Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbio de intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobre os valores de IL 6 no Soro, em pg/mL. Valores expressos como médias e desvio padrão. \*\*\* $p < 0,001$  no grupo HDMO versus os demais grupos; \* $p < 0,05$  no grupo HDMO em comparação com o grupo HDMO; \*\*\* $p < 0,001$  no grupo HDMO versus os demais grupos, exceto HDMO.

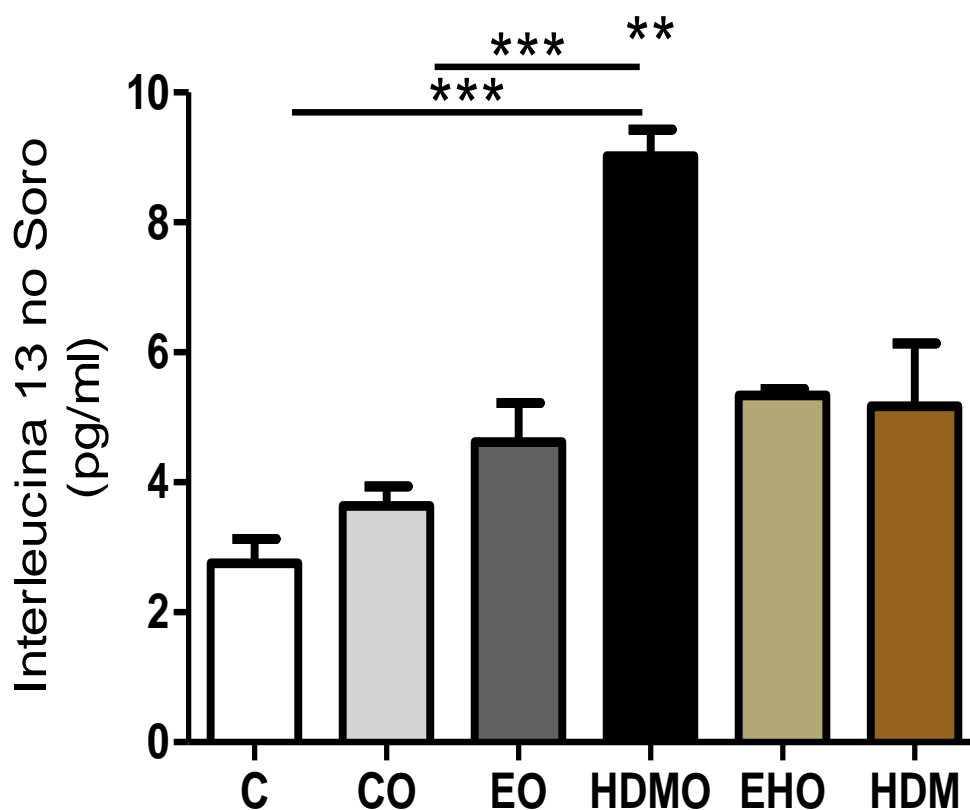
Ao se tratar dos níveis de IL 10 no soro, o treinamento físico aeróbio de intensidade moderada não foi capaz de diferenças entre os grupos, bem como o protocolo de inflamação pulmonar alérgica crônica e tampouco o de aumento da massa corporal (Figura 37).





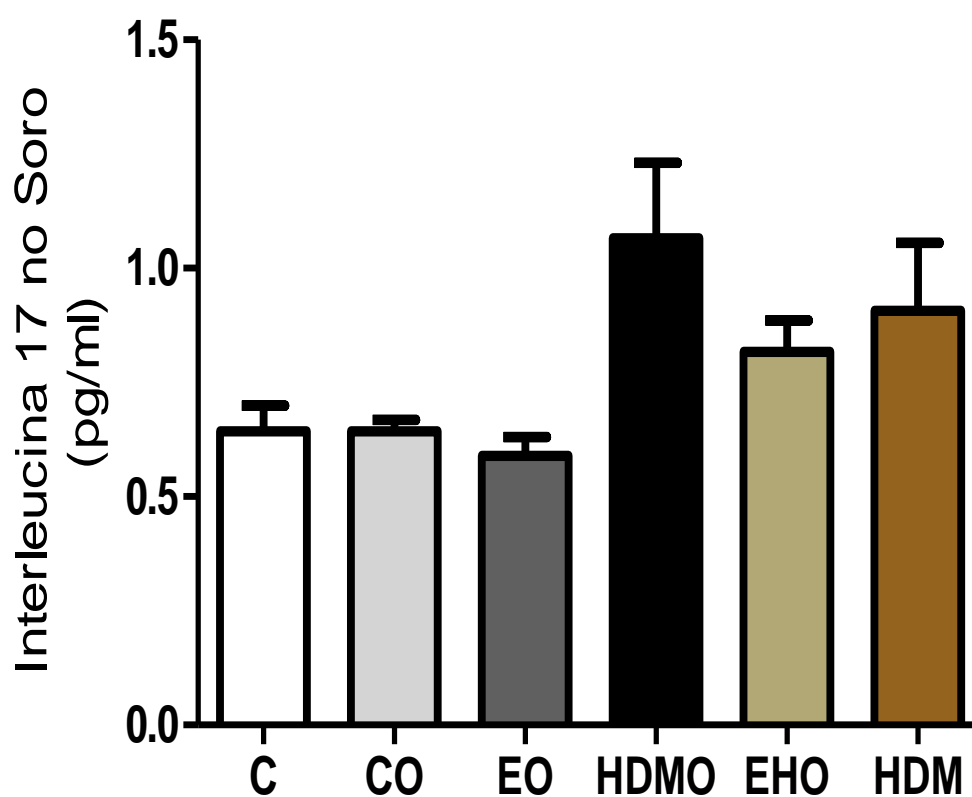
**Figura 37** –Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbio de intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobre os valores de IL 10 no Soro, em pg/mL. Valores expressos como médias e desvio padrão. Não foram observadas diferenças entre os grupos.

Em relação a IL 13 foi possível constatar que o grupo C apresentou menores valores em relação ao grupo EO ( $p < 0,05$ ). Ainda se tratando do grupo C, este também apresentou níveis reduzidos quando comparado com o grupo HDMO ( $p < 0,001$ ). O submetido a dieta hiperlipídica apresentou menores valores em relação ao grupo HDMO ( $p < 0,001$ ). O grupo EO também obteve valores diminuídos em relação ao grupo HDMO ( $p > 0,001$ ). E por fim, também foi possível observar diferenças entre os dois grupos que foram submetidos ao mesmo protocolo de obesidade e de inflamação pulmonar, mas o grupo EHO que teve como tratamento terapêutico o treinamento físico aeróbio obteve menores níveis de IL 13 em relação ao grupo HDMO ( $p < 0,01$ ) (Figura 38).

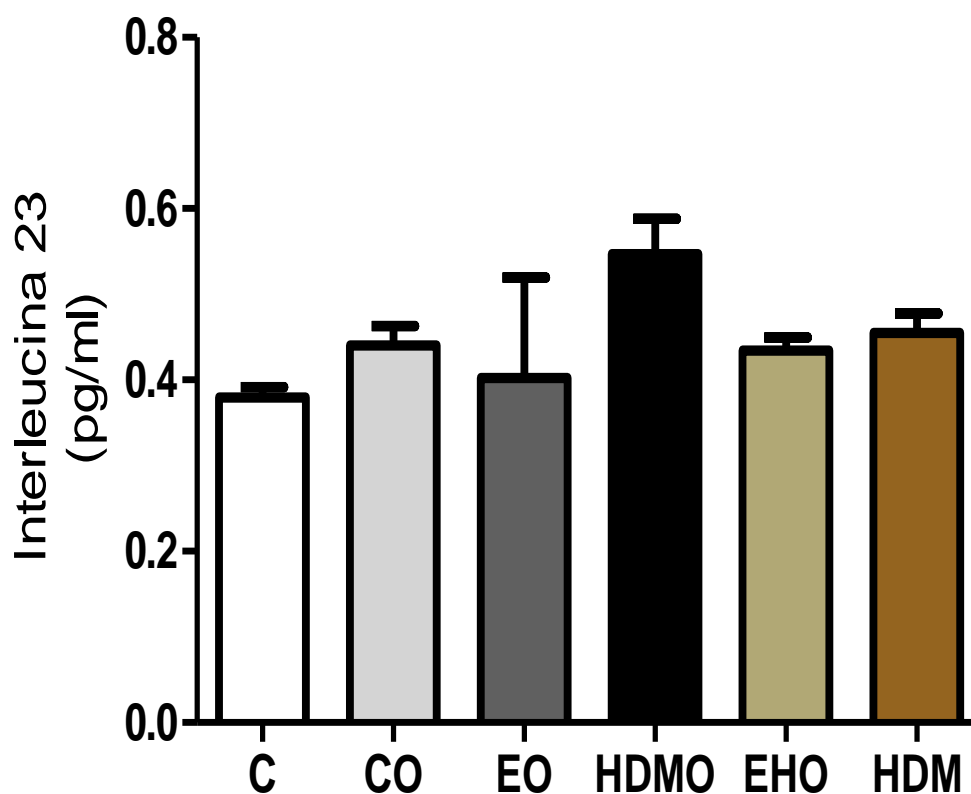


**Figura 38** –Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbio de intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobre os valores de IL 13 no Soro, em pg/mL. Valores expressos como médias e desvio padrão. \*\*\* $p < 0,001$  no grupo HDMOO em comparação com os grupos C e CO; \*\* $p < 0,01$  no grupo HDMOO em comparação com os grupos EO, EHO e HDM.

As diferenças promovidas pelos diversos protocolos utilizados na presente pesquisa foram capazes de influir sobre as IL 17 e 23 no LAB. Entretanto, o mesmo não ocorreu na avaliação destas mesmas citocinas no Soro. Os dados referentes aos níveis destas interleucinas não revelam diferenças com comprovação estatisticamente significativa no confronto de dados entre os grupos experimentais estudados (Figura 39).

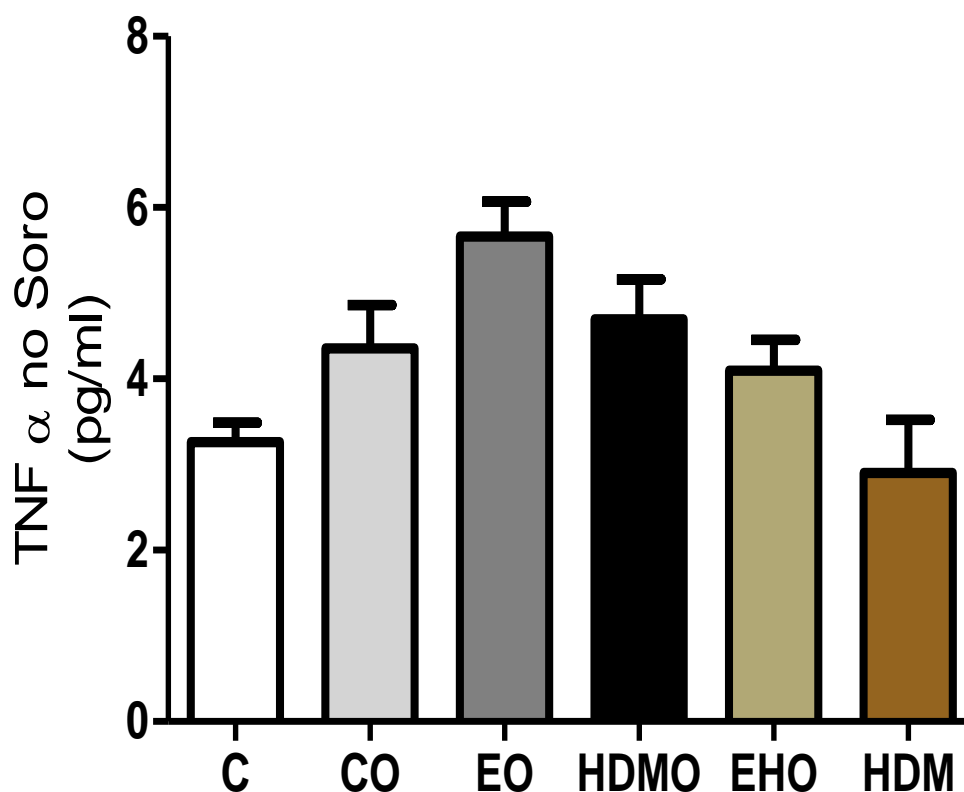


**Figura 39** –Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbio de intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobre os valores de IL 17 no Soro, em pg/mL. Valores expressos como médias e desvio padrão. Não foram observadas diferenças entre os grupos.



**Figura 40** –Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbiode intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobreos valores de IL 23 no Soro, em pg/mL. Valores expressos como médias e desvio padrão. Não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais.

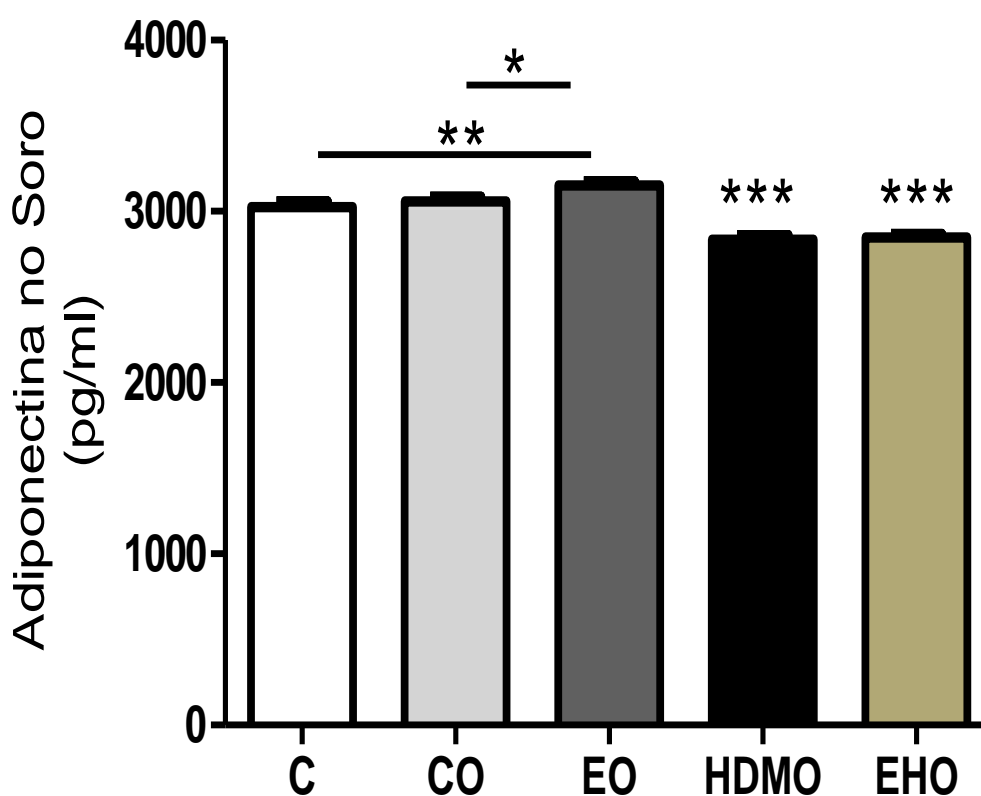
Os protocolos de aumento de massa corporal, treinamento físico aeróbio de intensidade moderada e inflamação pulmonar alérgica crônica, uma vez que os resultados não apontam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos pesquisados (Figura 41).



**Figura 41** –Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbio de intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobre os valores de TNF $\alpha$  no Soro, em pg/mL. Valores expressos como médias e desvio padrão. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$

Na presente pesquisa foi possível observar que os dois grupos submetidos aos protocolos de aumentos de massa corpora, e de inflamação pulmonar alérgica crônica apresentaram diferenças nos níveis de adiponectina quando comparado com os demais grupos. O grupo EHO apresentou menores níveis de adiponectina quando comparado com o grupo EO ( $p < 0,001$ ). O grupo EHO também apresentou menores valores de adiponectina quando comparado com o grupo CO ( $p < 0,001$ ). Ainda se

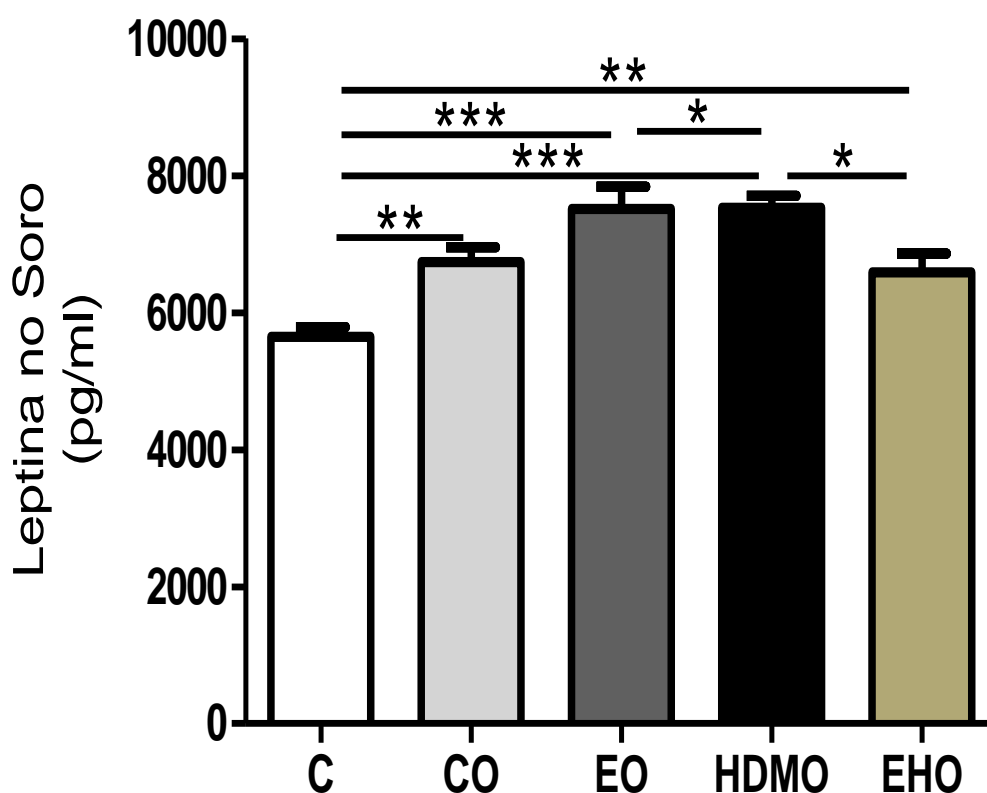
tratando do grupo EHO, o mesmo também teve menores valores de adiponectina em relação ao grupo C ( $p<0,001$ ). O grupo HDMO apresentou menores valores de adiponectina quando comparado com o grupo EO ( $p<0,001$ ). Também foram obtidas diferenças relativas a quantidade desta adipocina, quando comparado o grupo HDMO com o CO ( $p<0,001$ ). O grupo HDMO também apresentou diferenças estatisticamente significativas, com menores valores de adiponectina quando comparado com o grupo C ( $p<0,001$ ). O grupo EO apresentou menores valores de adiponectina quando comparado ao grupo C ( $p<0,01$ ). Ainda se tratando do grupo EO, o mesmo também apresentou menores níveis de adiponectina em comparação com o CO ( $p<0,05$ ) (Figura 42).



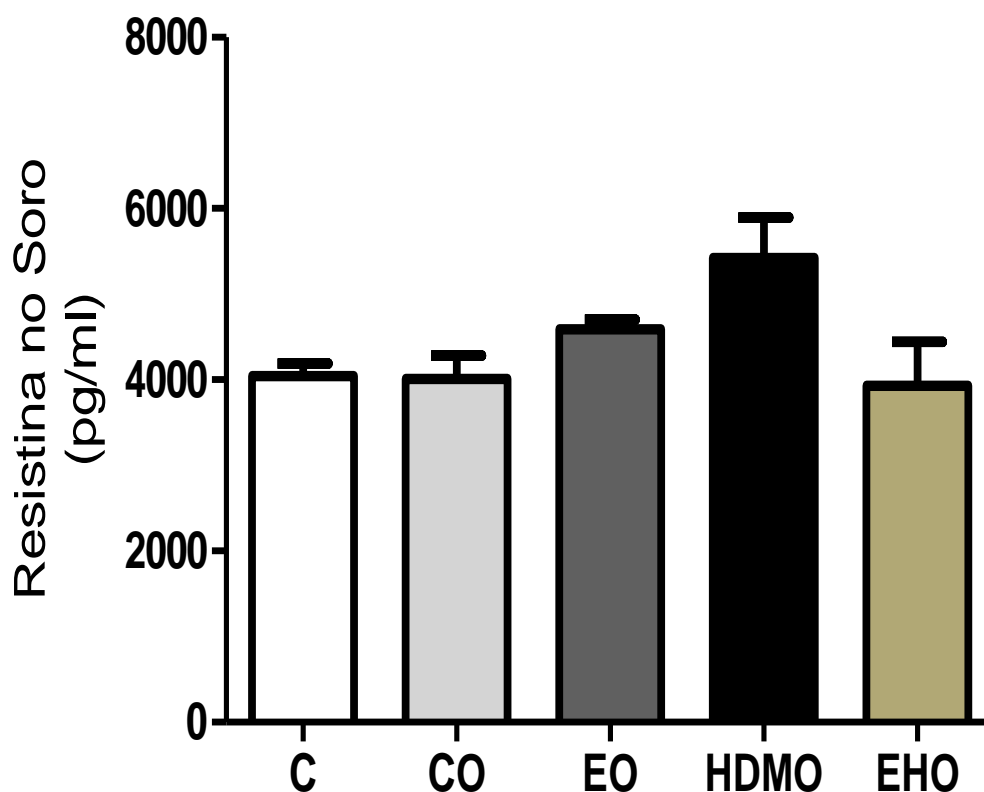
**Figura 42** –Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbio de intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobre os valores de adiponectina no Soro, em pg/mL. Valores expressos como médias e desvio padrão. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$

Em relação a leptina no sangue os seguintes comparativos foram estabelecidos. Menores níveis de leptina do grupo C em relação ao grupo CO ( $p<0,01$ ). O grupo C também apresentou menores níveis de leptina em comparação com o grupo HDMO ( $p<0,001$ ) e EO ( $p<0,001$ ). Os valores de leptina também estiveram diminuídos do grupo C em comparação com o EHO ( $p<0,01$ ). O grupo HDMO também apresentou menores valores do que o grupo EO ( $p<0,05$ ). O grupo HDMO demonstrou maiores níveis de HDM em relação do que o EHO ( $p<0,05$ ) (Figura 43).

Em relação a resistina no soro não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (Figura 44).



**Figura 43** –Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbio de intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobre os valores de leptina no Soro, em pg/mL. Valores expressos como médias e desvio padrão. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$



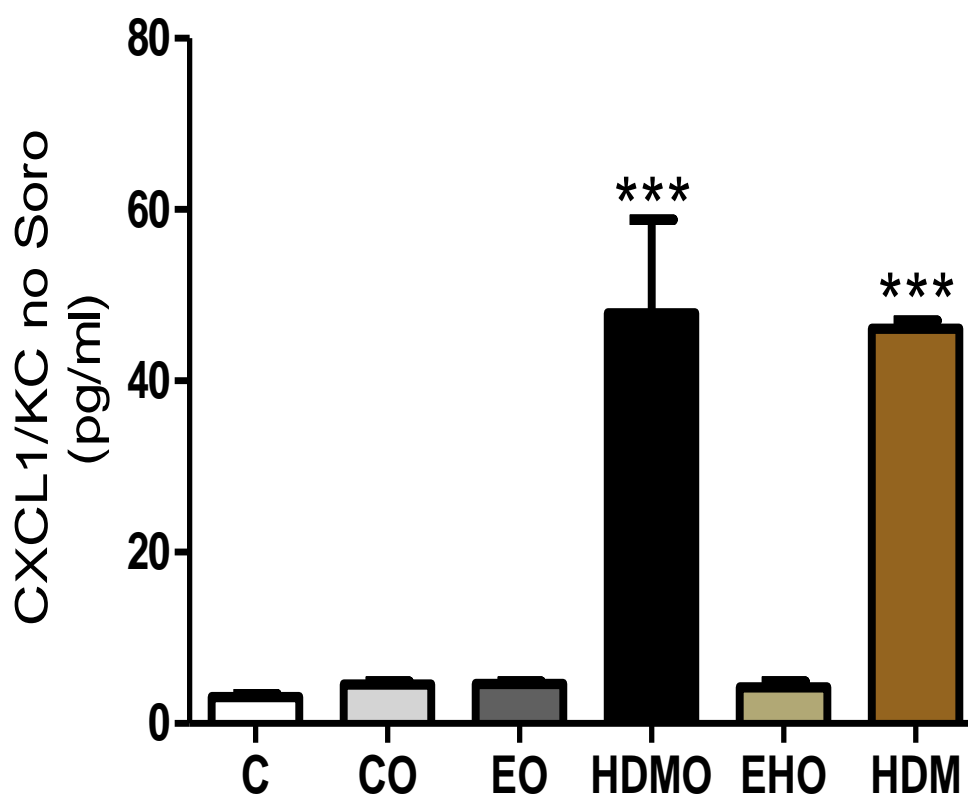
**Figura 44** –Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbio de intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobre os valores de resistina no Soro, em pg/mL. Valores expressos como médias e desvio padrão. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$

Em relação aos níveis de CXCL1/KC no soro obteve-se que o grupo HDMO apresentou maiores valores com diferenças estatisticamente significativas em relação aos demais grupos. E não foram encontradas diferenças entre os demais grupos (Figura 45).

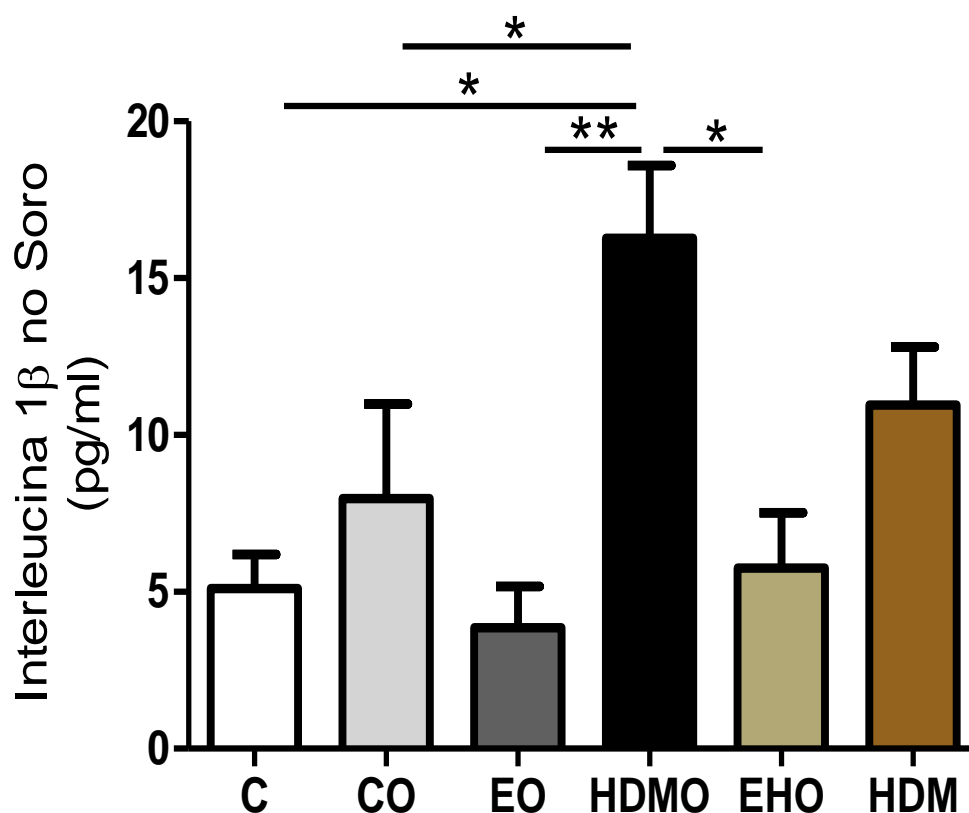
Foram obtidas diferenças estatisticamente significativas de IL 1 $\beta$  no Soro entre os grupos. Como observado, o grupo CO apresentou maiores valores desta citocina em relação a C ( $p < 0,05$ ). Obteve-se que o grupo CO teve maiores valores de IL 1 $\beta$  do que o grupo EO ( $p < 0,05$ ). Ainda se tratando de IL 1 $\beta$ , o grupo C apresentou menores valores desta citocina em relação ao grupo HDMO ( $p < 0,01$ ). O grupo HDMO apresentou elevados níveis de IL 1 $\beta$  quando comparado com o grupo EO ( $p < 0,01$ ) e



também em confronto com o grupo EHO ( $p < 0,01$ ). O treinamento físico aeróbio de intensidade moderada no grupo EHO, foi capaz de promover níveis de IL 1 $\beta$  semelhantes ao do grupo EO e C, uma vez que não foi possível obter diferenças estatisticamente significativas (Figura 46).

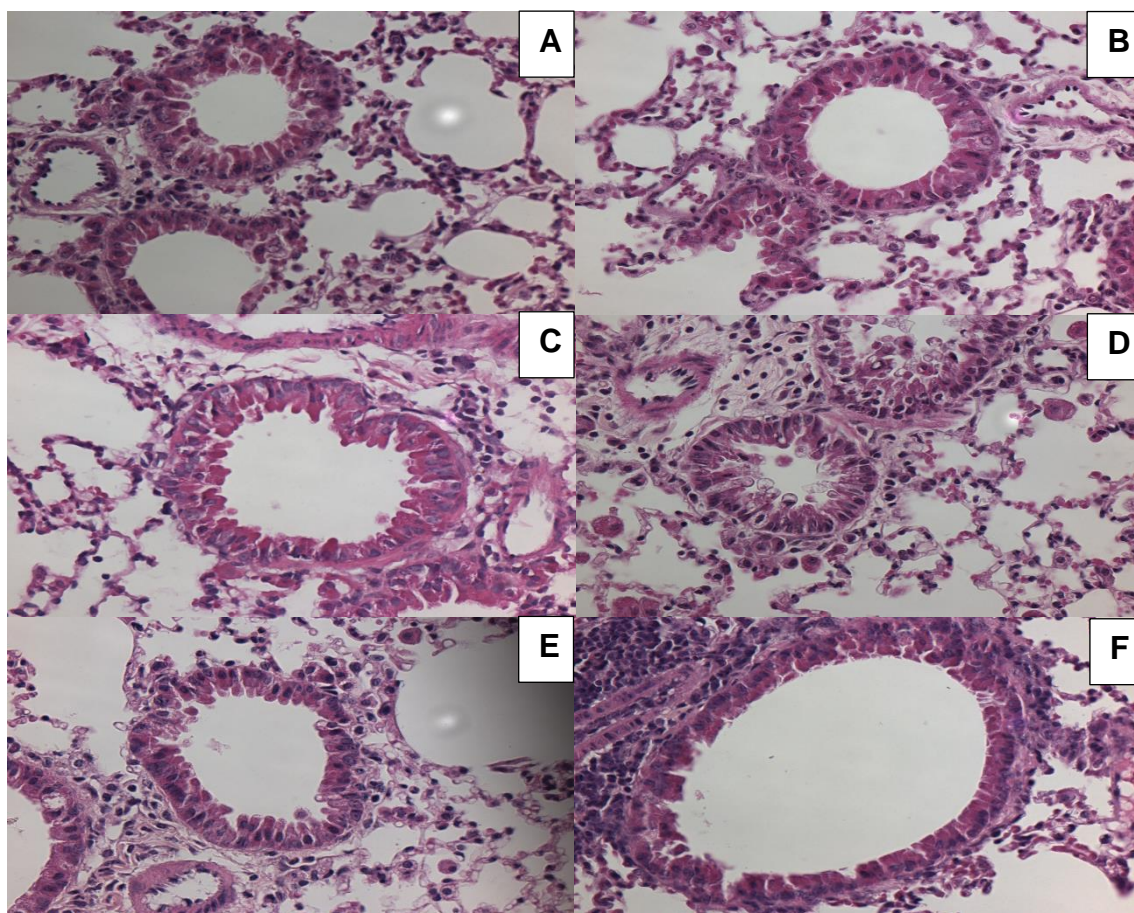


**Figura 45** –Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbio de intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobre os valores de CXCL1/KC no Soro, em pg/mL. Valores expressos como médias e desvio padrão. \*\*\* $p < 0,001$  no grupo HDMO versus os grupos C, CO, EO e EHO; \*\*\* $p < 0,001$  no grupo HDMO em comparação com os grupos C, CO, EO e EHO.



**Figura 46** –Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbio de intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobre os valores de IL 1 $\beta$  no Soro, em pg/mL. Valores expressos como médias e desvio padrão. \* $p < 0,05$  no grupo HDMO em comparação com os grupos C, CO e EHO. \*\* $p < 0,01$  no grupo HDMO versus EO.

Para a obtenção de dados referentes a contagem de células diferenciais feitas no espaço peribrônquico, foi feita a análise de imagem (Figura 47)



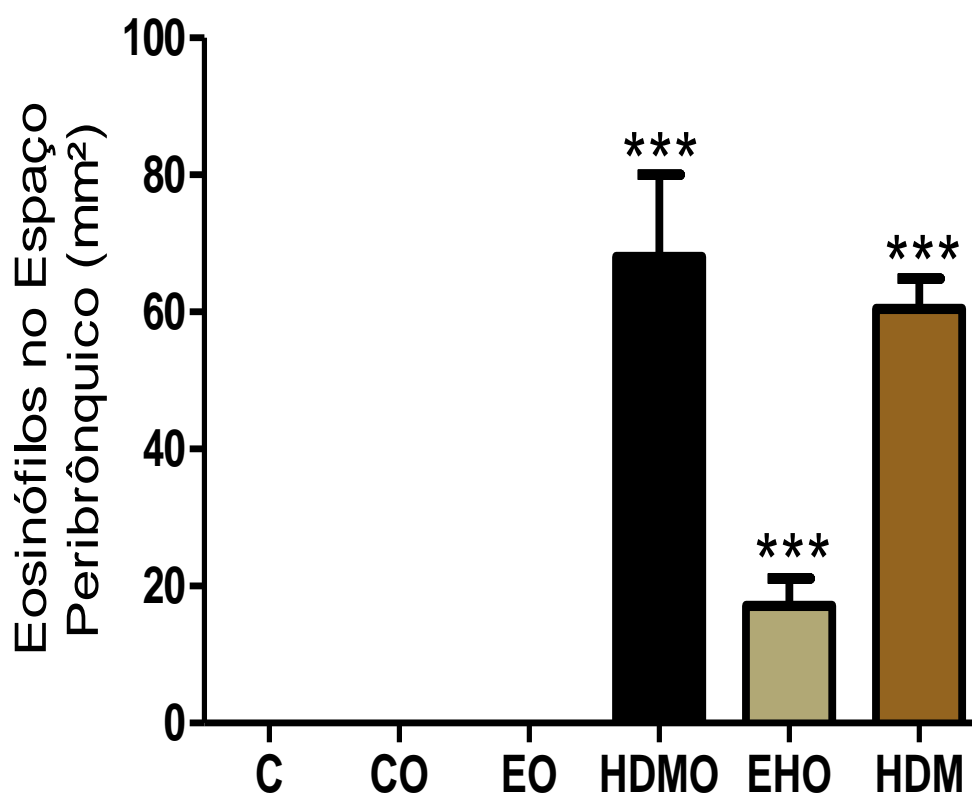
**Figura 1** - Lâminas coradas com HE

**Figura47** –Lâminas de HE.A: Grupo C; B Grupo CO; C Grupo EO; D Grupo HDMOO;E Grupo EHO; F Grupo HDMO.

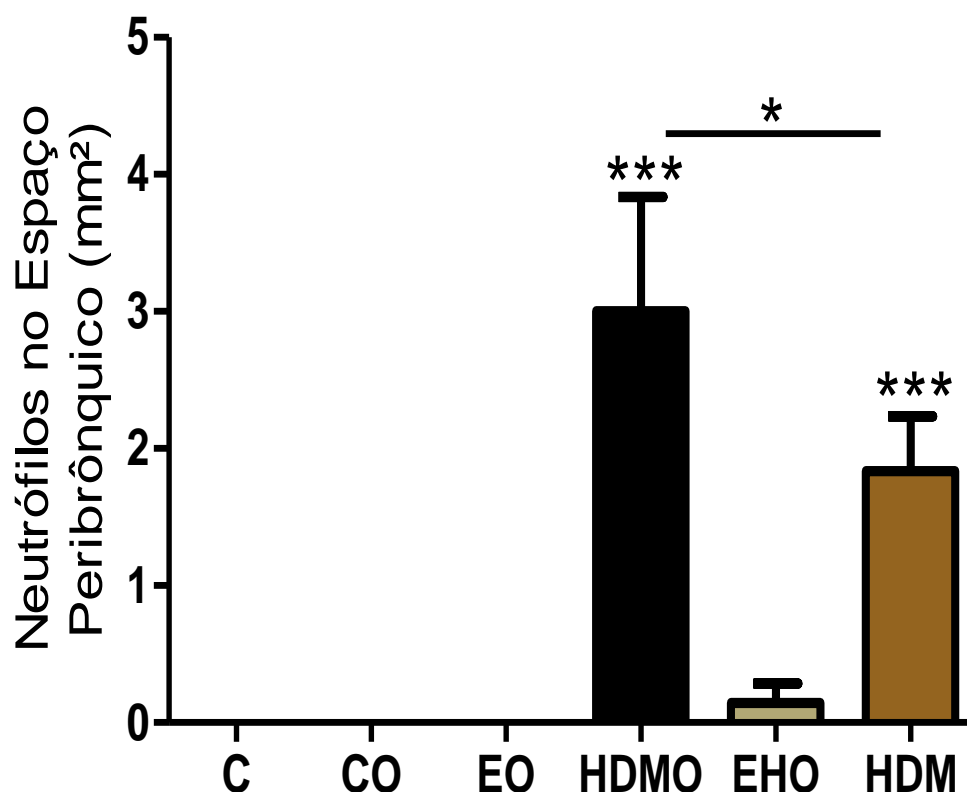
Se tratando de eosinófilos, obteve-se que o grupo HDMO apresentou diferenças estatisticamente significativas em relação aos demais ( $p < 0,001$ ). Vale ressaltar que o grupo EHO submetido aos protocolos de promoção do aumento da massa corporal, inflamação pulmonar alérgica crônica, e treinamento físico aeróbio de intensidade moderada não apresentou diferenças em relação ao grupo C, CO e EO (Figura 48).

Nos neutrófilos avaliados no espaço peribrônquico avaliados via a análise de imagem revelaram que o grupo HDMO apresentou diferenças estatisticamente significativas em relação aos demais grupos ( $p < 0,001$ ). E que o grupo EHO também

não apresentou diferenças em relação aos demais, os resultados obtidos em relação aos macrófagos foram semelhantes aos obtidos com os eosinófilos (Figura 49)

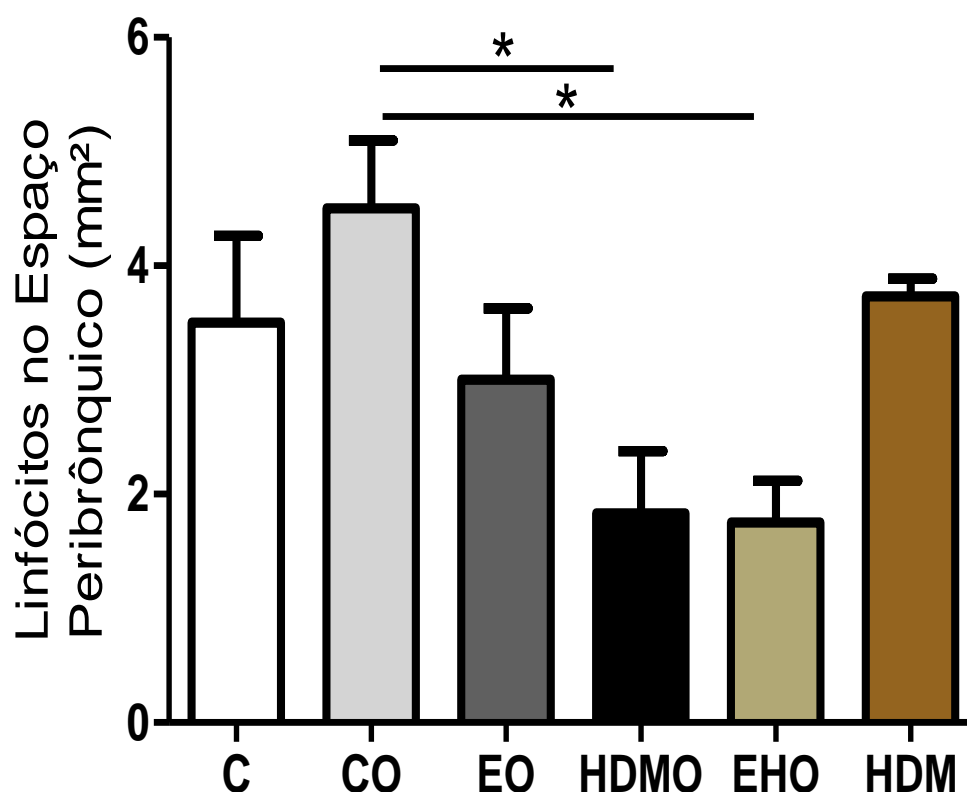


**Figura 48** – Eosinófilos no espaço peribrônquico. Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbico de intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobre os valores de Eosinófilos no Espaço Peribrônquico, em mm². \*\*\* $p < 0,001$  no grupo HDMO em comparação com os demais grupos; \*\*\* $p < 0,001$  no grupo EHO em comparação com os demais grupos;  $p < 0,001$  no grupo HDMO versus os demais grupos.



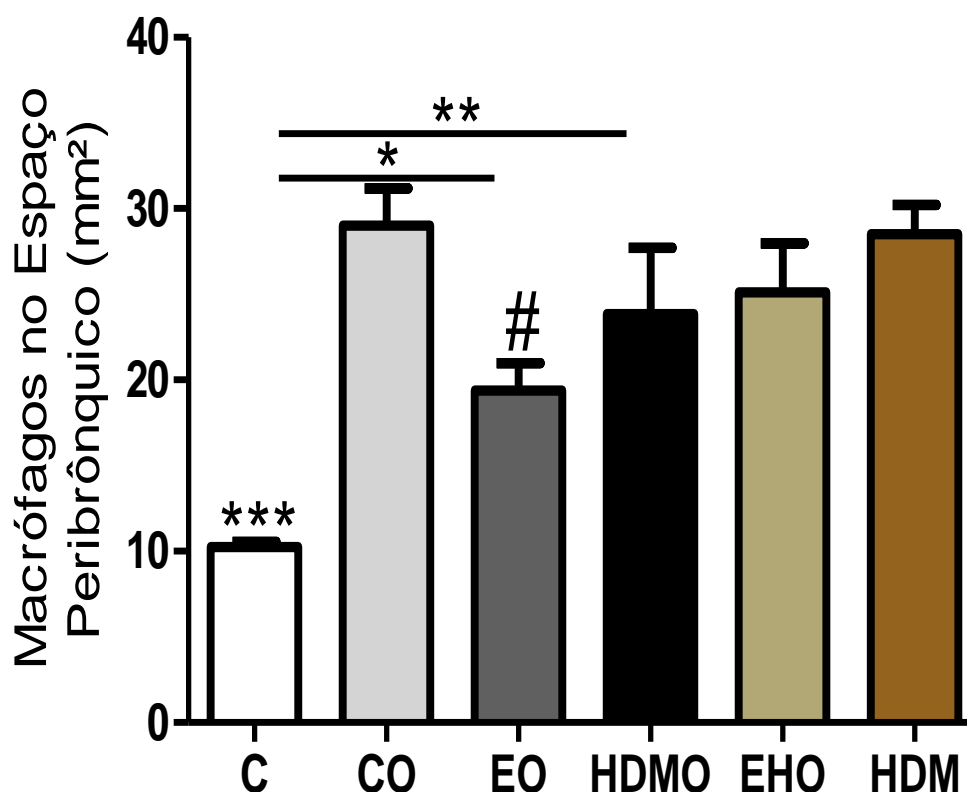
**Figura 49** –Neutrófilos no espaço peribrônquico. Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbico de intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobre os valores de Neutrófilos no Espaço Peribrônquico, em mm<sup>2</sup>. Valores expressos como médias e desvio padrão. \*\*\* $p < 0,001$  no grupo HDMO em comparação com os demais grupos; \* $p < 0,05$  no grupo HDMO versus o grupo HDM; \*\*\* $p < 0,001$  no grupo HDMO versus os demais grupos.

Em relação a contagem de linfócitos no espaço peribrônquico, observa-se que o grupo que apresentou diferenças estatisticamente significantes em relação aos demais foi o grupo CO. Os resultados apontam que o grupo CO esteve com valores aumentados de linfócitos quando comparado aos grupos HDM ( $p < 0,05$ ) e EHO ( $p < 0,05$ ) (Figura 50).



**Figura 50** –Linfócitos no espaço peribrônquico.Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbiode intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobreos valores de linfócitos no Espaço Peribrônquico, em mm<sup>2</sup>. Valores expressos como médias e desvio padrão. \*p<0,05 no grupo CO em comparação com o grupo HDMOO; p<0,05 no grupo CO versus o EHO.

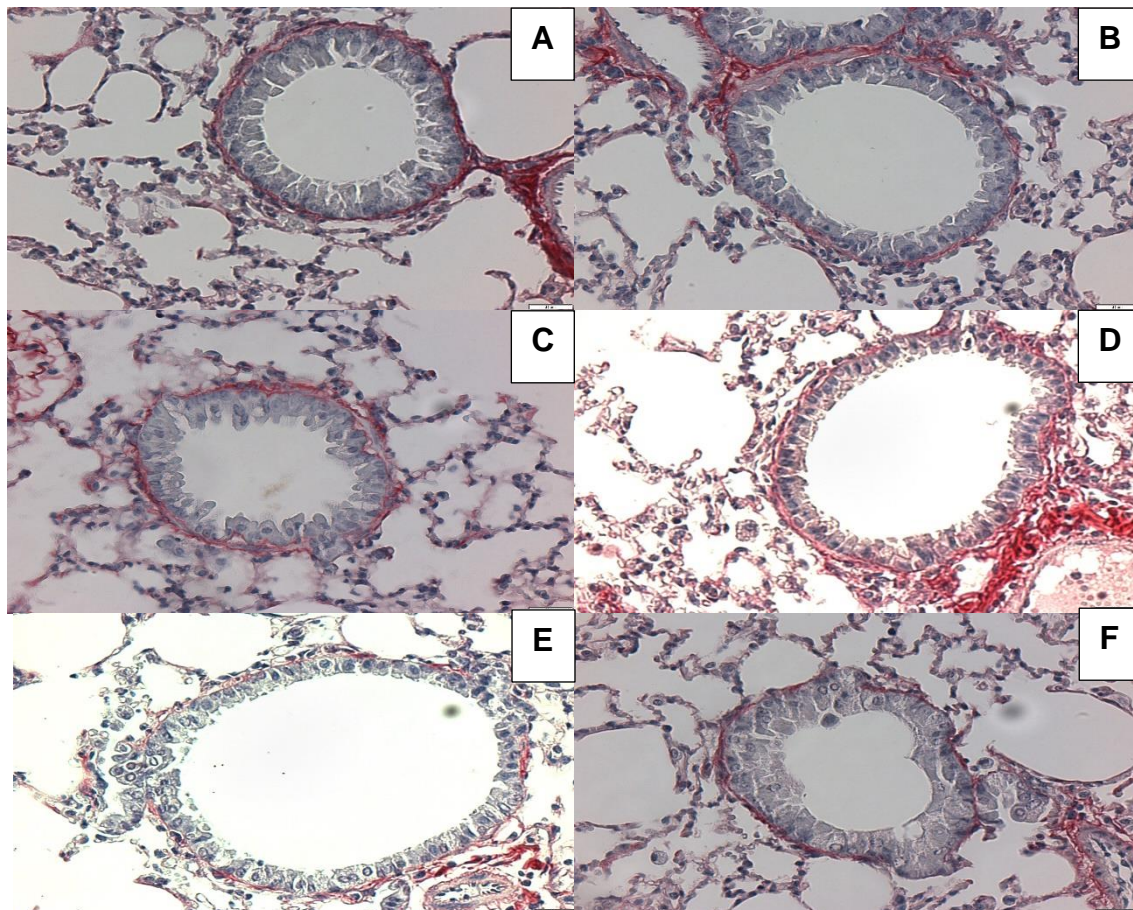
Nos macrófagos avaliados no espaço peribrônquico, constatou-se que o grupo C apresentou números reduzidos quando comparado aos demais grupos (p<0,001). O grupo CO demonstrou maior quantidade de macrófagos quando comparado com o grupo EO (p<0,05) (Figura 51).



**Figura 51** –Macrófagos no espaço peribrônquico. Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbico de intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobre os valores de macrófagos no Espaço Peribrônquico, em mm<sup>2</sup>. Valores expressos como médias e desvio padrão. \*\*\* $p < 0,001$  no grupo C em comparação com os grupos CO, EHO e HDM; \*\* $p < 0,01$  no grupo C em comparação com o grupo HDMO; \* $p < 0,05$  no grupo C em comparação com o grupo EO; # $p < 0,05$  no grupo EO em comparação com os grupos HDMO, EHO e HDM.



Para a obtenção de dados referentes ao percentual da deposição de fibras de colágeno na parede das vias aéreas foi feita a análise de imagem em lâminas coradas com Picrossírius (Figura 52)

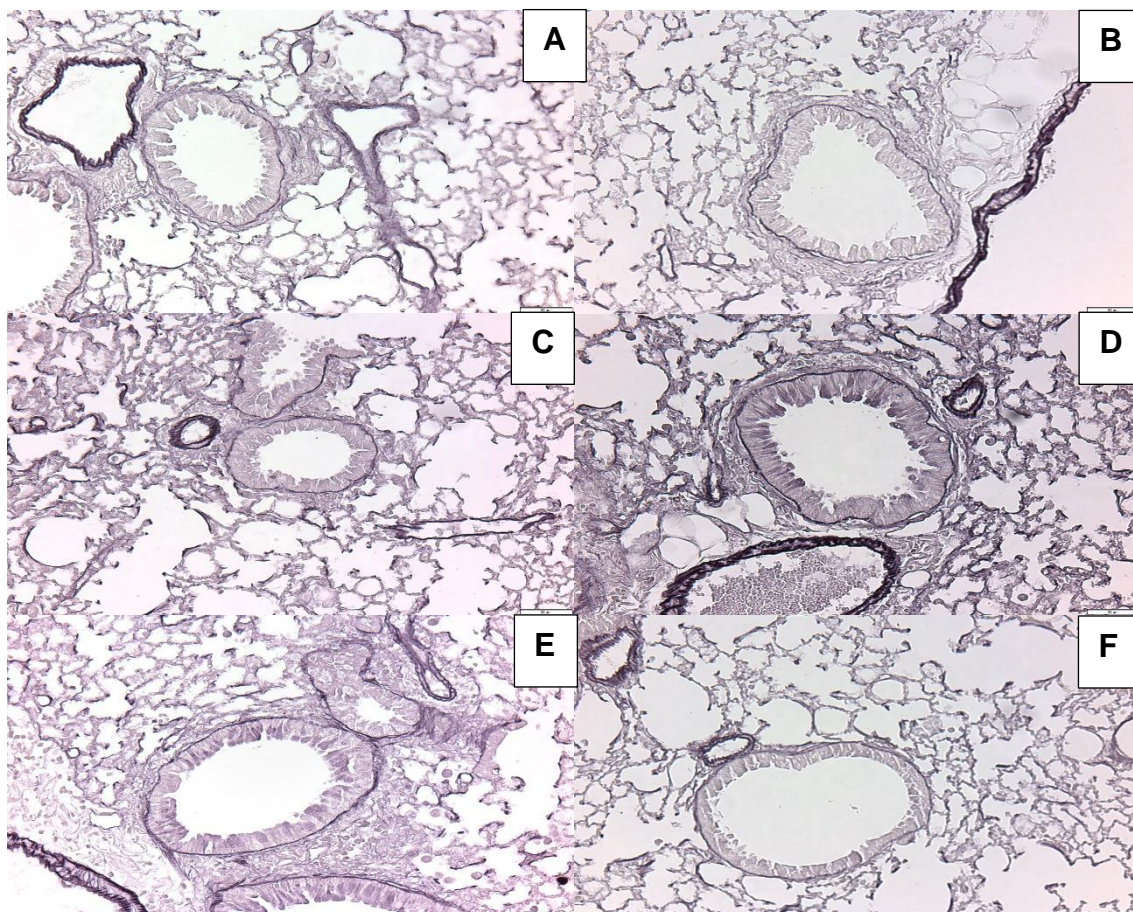


**Figura 2** - Lâminas coradas com Picrossírius

**Figura 52** –Lâminas coradas com Picrossírius.A: Grupo C; B Grupo CO; C Grupo EO; D Grupo HDMOO; E Grupo EHO; F Grupo HDMO



Para a obtenção de dados referentes ao percentual da deposição de fibras de colágeno na parede das vias aéreas foi feita a análise de imagem em lâminas coradas com Resorcina-Fuccina de Weigert com oxidação (Figura 53)

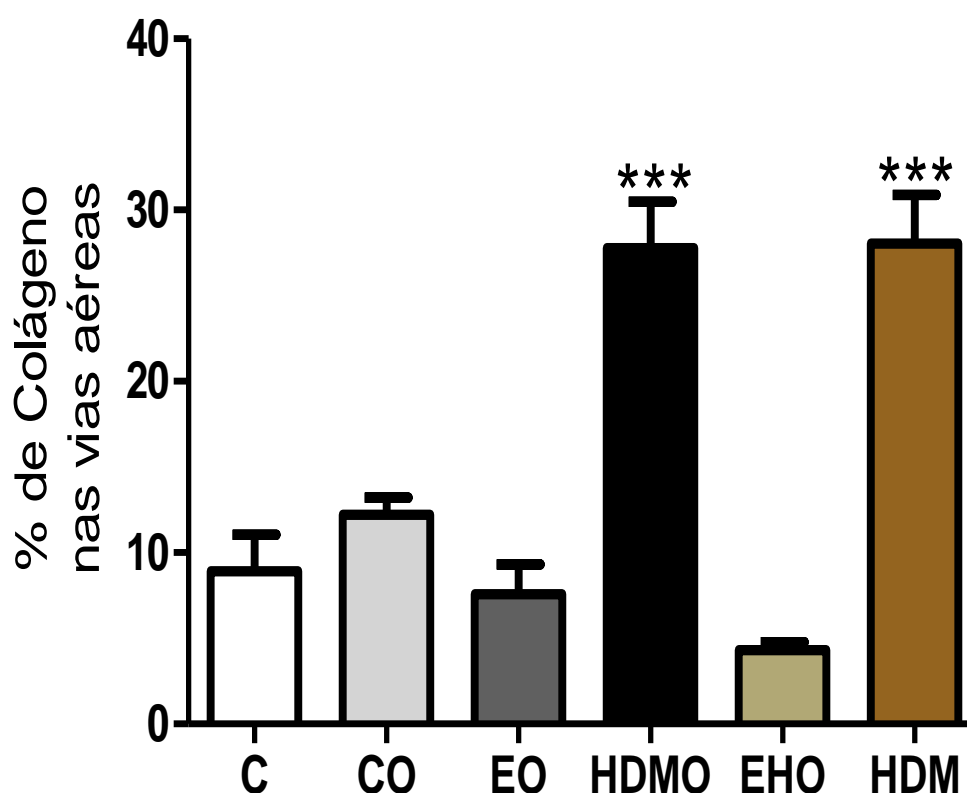


**Figura 3** - Lâminas coradas com RFO

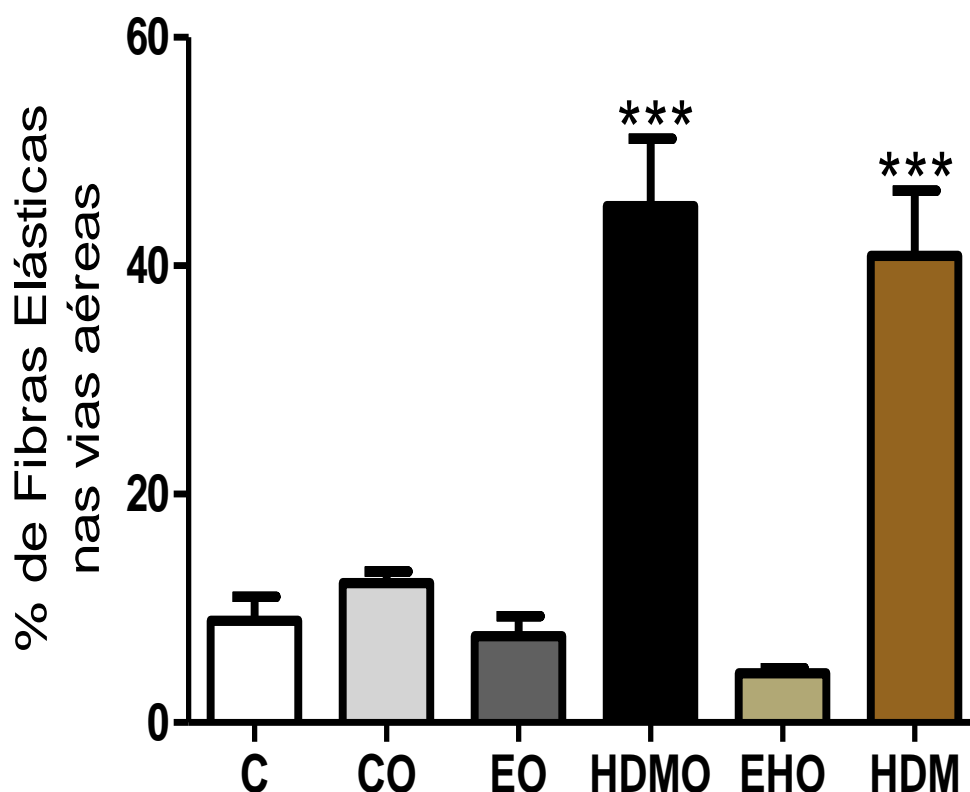
**Figura 53** –Lâminas coradas com Resorcina-Fuccina de Weigert com oxidação A: Grupo C; B Grupo CO; C Grupo EO; D Grupo HDMOO; E Grupo EHO; F Grupo HDMO

O grupo HDMO apresentou maior deposição de colágeno no espaço peribrônquico do que os demais grupos ( $p < 0,001$ ). Ressaltando que não foi possível constatar outras diferenças entre os demais grupos (Figura 54).

Em relação ao percentual da deposição de fibras elásticas nas paredes das vias aéreas, obteve-se que o grupo HDMO apresentou maiores percentuais de fibras elásticas em comparação com os demais grupos ( $p<0,001$ ). Em contrapartida, os outros grupos experimentais não demonstraram diferenças estatisticamente significativas quando comparados entre si, mesmo se tratando do grupo EHO (Figura 55).



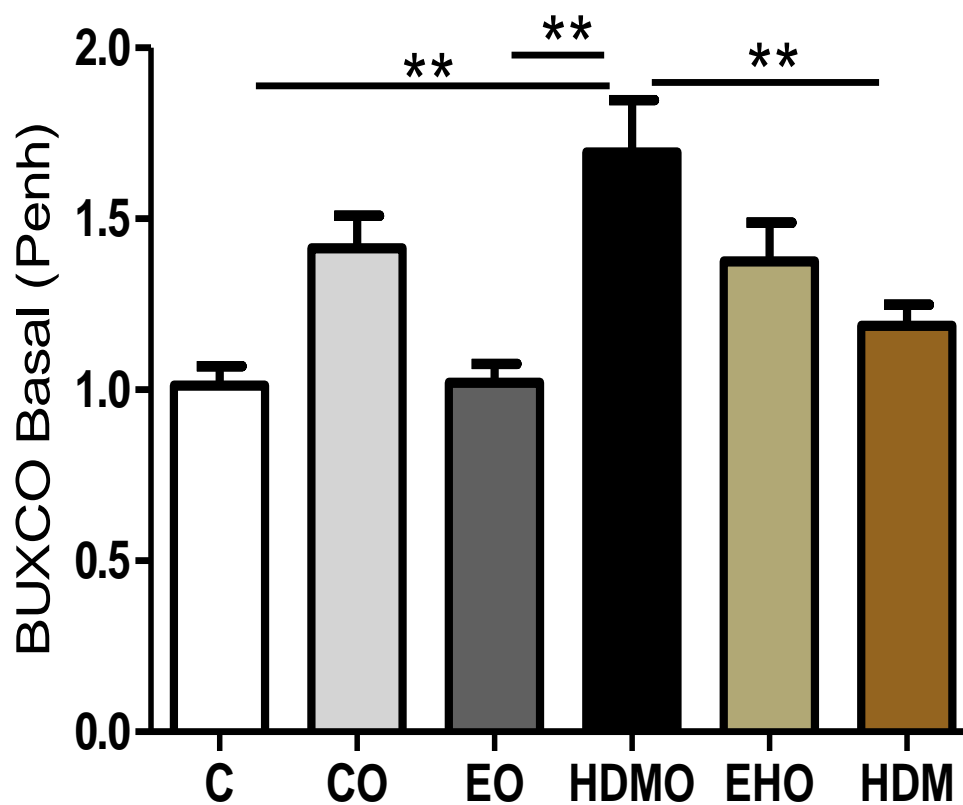
**Figura 54** – Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbico de intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobre o percentual de colágeno nas vias aéreas. Valores expressos como médias e desvio padrão. \*\*\* $p<0,001$  no grupo HDMO em comparação com os grupos C, CO, EO e EHO; \*\*\* $p<0,001$  no grupo HDMO versus os grupos C, CO, EO e EHO.



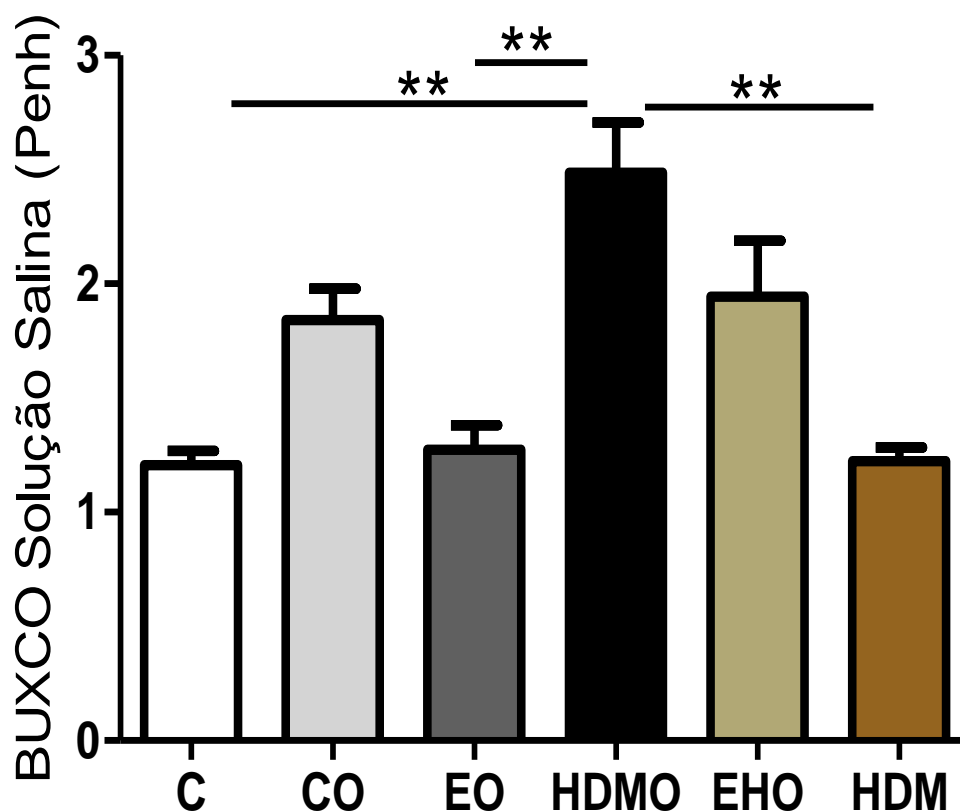
**Figura 55** – Efeitos dos protocolos de treinamento físico aeróbico de intensidade moderada, inflamação pulmonar alérgica crônica e obesidade sobre o percentual de fibras elásticas nas vias aéreas. Valores expressos como médias e desvio padrão. \*\*\* $p < 0,001$  no grupo HDMO versus os grupos C, CO, EO e EHO; \*\*\* $p < 0,001$  no grupo HDMO em comparação com os grupos C, CO, EO e EHO.

A avaliação da reatividade brônquica foi feita via a utilização do equipamento de pletismografia do sistema BUXCO, onde os valores são expressos via escala PENH. O protocolo consistiu na coleta de dados basais e em seguida com a inalação de uma solução salina (PBS), posteriormente doses crescentes de Metacolina (6,25 mg/mL; 12,5 mg/mL; 25 mg/mL; e 50 mg/mL) também foram fornecidas para a inalação destes animais.

Em uma situação basal o grupo HDMO demonstrou maior reatividade brônquica em comparação com o grupo C e com o grupo EO, e os mesmos resultados foram replicados durante a inalação de uma solução salina (PBS).

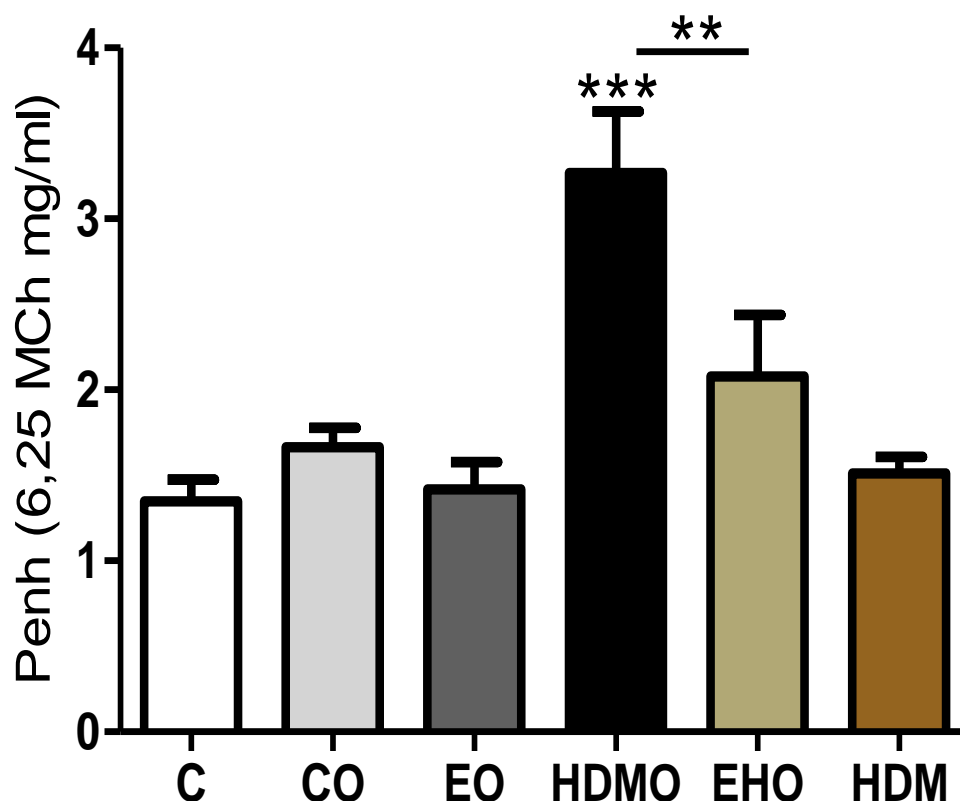


**Figura 56** – Efeito do treinamento físico aeróbio de intensidade moderada sobre a reatividade brônquica. Valores expressos como médias e erro padrão. \*\* $p < 0,01$  no grupo HDMO em comparação com os grupos C, EO e HDM.



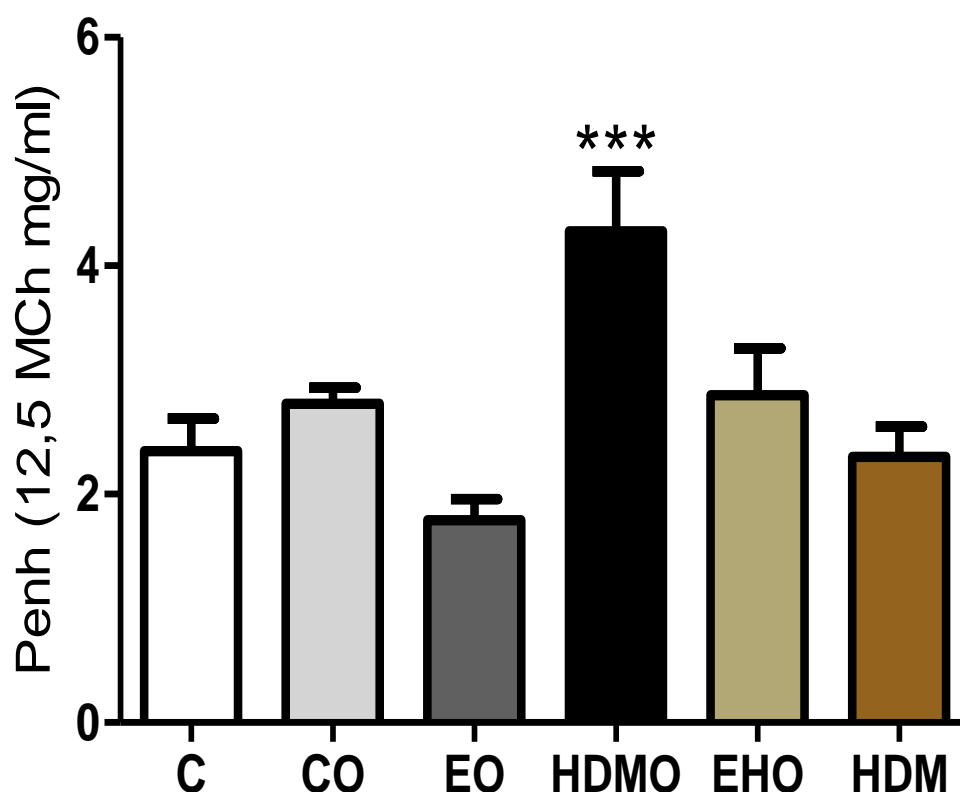
**Figura 57** – Efeito do treinamento físico aeróbio de intensidade moderada sobre a reatividade brônquica. Valores expressos como médias e erro padrão. \*\* $p < 0,01$  no grupo HDMO versus os grupos C, EO e HDM.

Durante a terceira etapa do protocolo avaliativo que consistiu na inalação de 6,25 MCh mg/mL, o grupo HDMOO apresentou diferenças quando comparado com os demais grupos.



**Figura 58** – Efeito do treinamento físico aeróbio de intensidade moderada sobre a reatividade brônquica. Valores expressos como médias e erro padrão. \*\*\* $p < 0,001$  no grupo HDMO em comparação com os grupos C, CO, EO e HDM; \*\* $p < 0,01$  no grupo HDMO versus o grupo EHO.

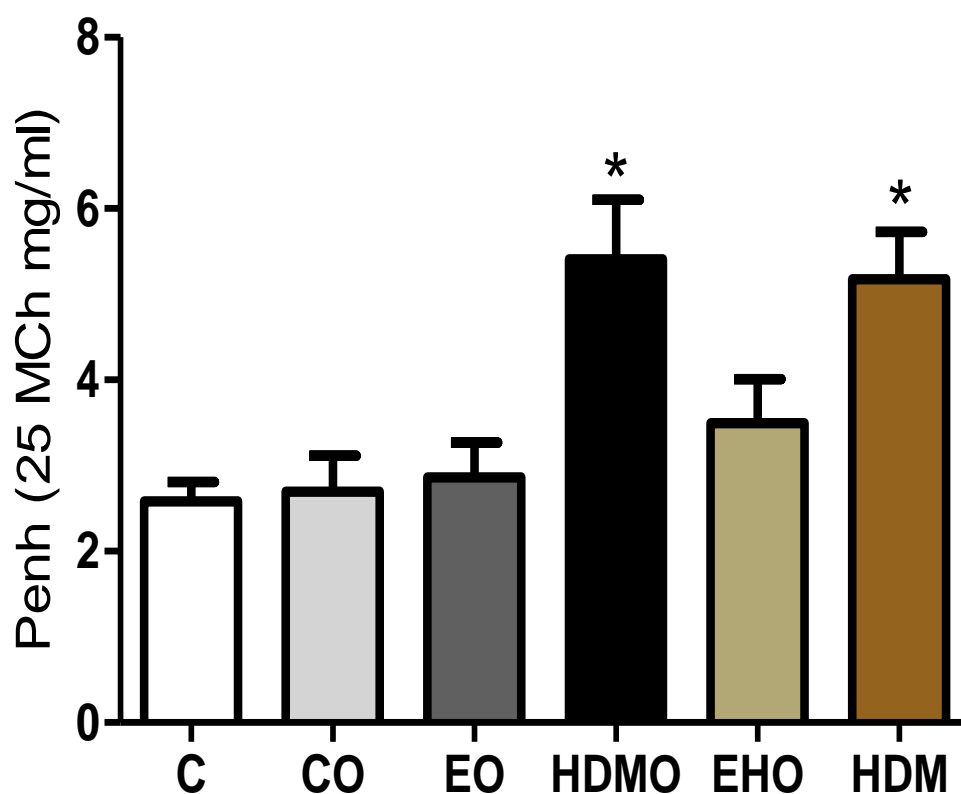
Embora que os resultados comparativos entre os grupos tenham se replicado durante a inalação de Metacolina com uma concentração de 12,5 mg/mL. As significâncias das diferenças não se mantiveram as mesmas em relação aos resultados anteriores.



**Figura 59** – Efeito do treinamento físico aeróbio de intensidade moderada sobre a reatividade brônquica. Valores expressos como médias e erro padrão. \*\*\* $p < 0,001$  no grupo HDMO em comparação com os demais.

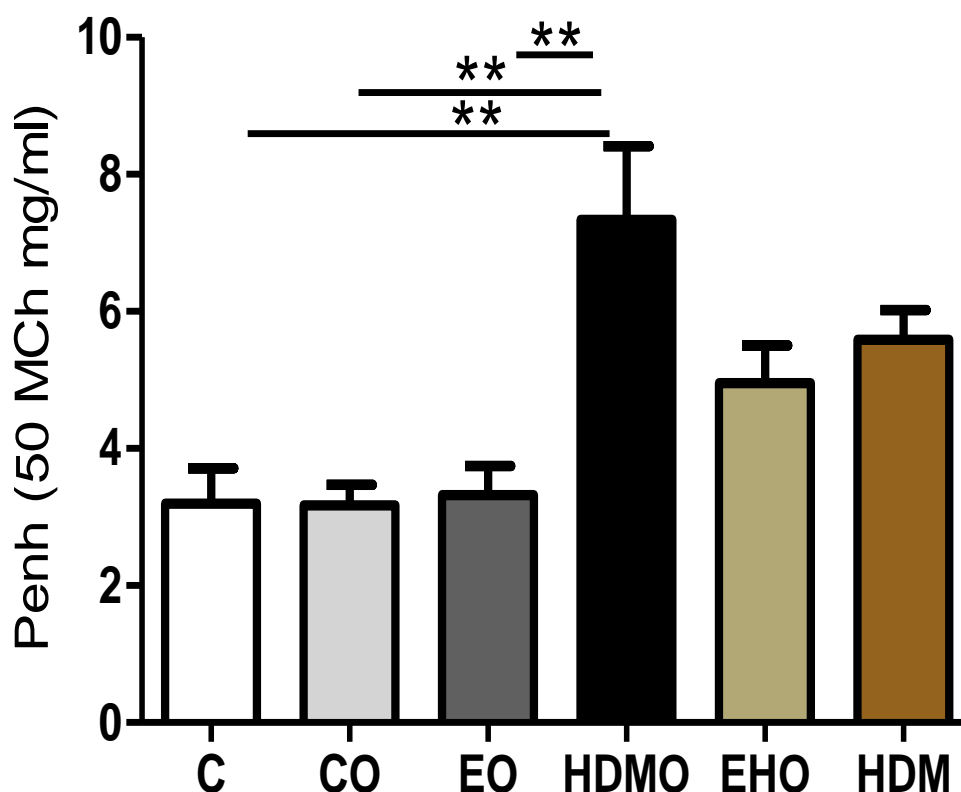
O grupo HDMOO apresentou maiores valores na escala Penh em comparação com os demais grupos durante a etapa inalatória com uma concentração de 25mg/mL de Metacolina.

Foi constatado que grupo HDMOO também apresentou diferenças quando comparado aos demais com uma concentração de 50mg/mL. Entretanto, houveram variações entre as significâncias, sendo que  $p < 0,01$  do grupo HDMOO comparado com C, EO e EHO. A diferença do grupo HDMOO em confronto com o grupo CO foi de  $p < 0,05$ .



**Figura 60** – Efeito do treinamento físico aeróbio de intensidade moderada sobre a reatividade brônquica. Valores expressos como médias e erro padrão. \* $p < 0,05$  no grupo HDMO versus os grupos C, CO, EO e EHO; \* $p < 0,05$  no grupo HDM versus os grupos C, CO, EO e EHO.



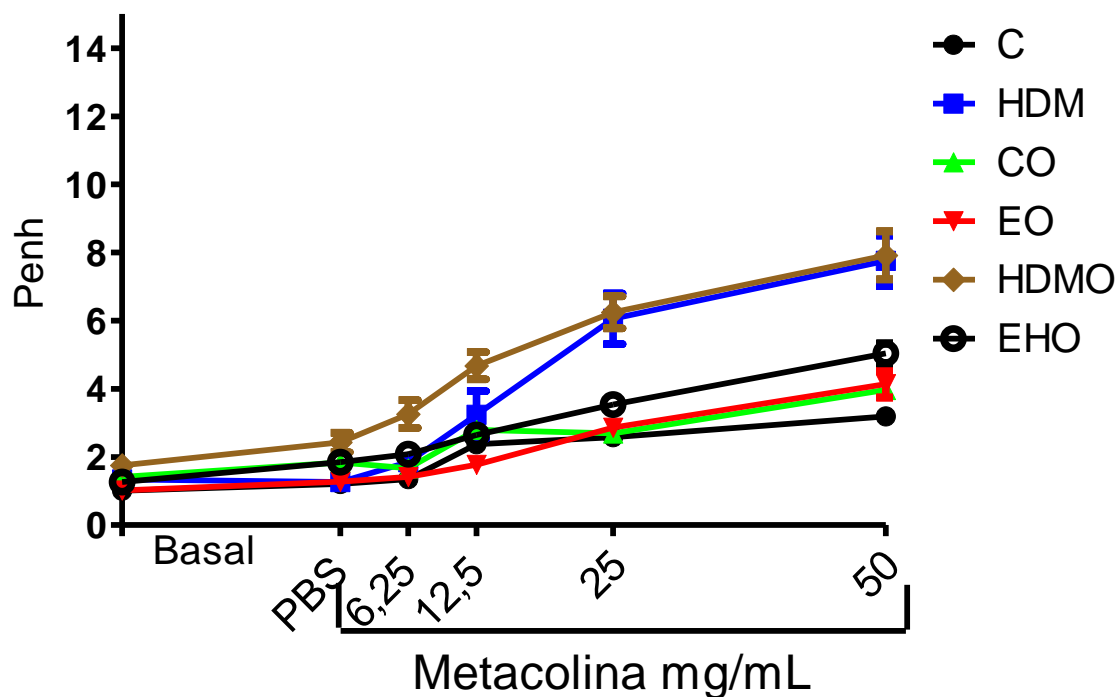


**Figura 61** – Efeito do treinamento físico aeróbio de intensidade moderada sobre a reatividade brônquica. Valores expressos como médias e erro padrão. \*\* $p < 0,01$  no grupo HDMO em relação aos grupos C, CO e EO.

O grupo HDMOO obteve maiores valores de reatividade brônquica, correspondendo a uma inalação de 25mg/mL de metacolina. Ressaltasse que o grupo EHO não apresentou diferenças estatisticamente significativas quando comparado aos grupos C, CO e EO. Dessa forma pode se especular sobre a eficiência do treinamento físico em relação a reatividade brônquica.

Em condições basais os animais do grupo HDMOO apresentaram alterações quando comparados ao grupo C ( $p < 0,01$ ) e EO ( $p < 0,01$ ). Quando submetidos a inalação de uma solução salina o grupo HDMOO apresentou alterações na comparação com o grupo C ( $p < 0,01$ ) e EO ( $p < 0,01$ ). Os animais do grupo HDMOO apresentaram alteração na escala Penh sobre a inalação de 6,25 MCh mg/mL quando comparado ao aos demais grupos ( $p < 0,01$ ). Quando submetidos a solução de 12,5 MCh mg/mL o grupo HDMOO manteve diferenças estatisticamente significantes em relação aos outros grupos ( $p < 0,05$ ). Foram observadas diferenças do grupo HDMOO

ao inalar a solução de 25 MCh mg/mL em comparação com os demais grupos ( $p<0,05$ ). Nos dados referentes a inalação de Metacolina sob a concentração de 50 mg/mL foi possível constatar que o grupo HDMOO se diferenciou dos demais ( $p<0,05$ ). Em nenhuma das etapas do protocolo de avaliação da reatividade brônquica foi possível constatar diferenças entre os grupos C, CO, EO e EHO (Figura 56).



**Figura 62** – Efeito do treinamento físico aeróbio de intensidade moderada sobre a reatividade brônquica. Valores expressos como médias e erro padrão. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ .

## 5 Discussão

O presente estudo demonstrou a eficácia do protocolo adotado para um modelo experimental de obesidade via a oferta de uma dieta hiperlipídica que objetivasse o aumento de massa corporal total dos camundongos C57/BL6. Sendo que os grupos submetidos inicialmente a dieta proposta demonstraram aumento de massa corporal após o primeiro mês, e que os mesmos resultados se replicaram aos dois meses de consumo da dieta.

Nota-se que após doze semanas com o protocolo de aumento de massa corporal em concomitância com o de inflamação pulmonar alérgica crônica, os camundongos submetidos a este segundo se diferenciam em relação a massa corporal quando em comparação com o grupo que se manteve apenas submetido ao consumo da dieta hiperlipídica.

Segundo a terceira edição das Diretrizes Brasileiras de Obesidade publicada em 2009, de maneira geral não é difícil identificar e reconhecer os traços que caracterizem um sujeito com sobrepeso e/ou obesidade. Entretanto é necessário que se investigue os níveis de risco de doenças associadas, e para isso é importante a utilização de certas formas de quantificação, entre elas a mensuração da massa corporal (86).

Uma determinação de obesidade em ratos foi proposta por Lee em 1928 (87). Tal determinação consiste na divisão da raiz cúbica do peso em gramas pelo comprimento naso-caudal em milímetros e multiplicado por 1000. Dessa forma o resultado configuraria um índice nutritivo como mensuração da obesidade estabelecendo uma correlação da massa gorda com o índice proposto. Entretanto, para a adoção desta técnica seria necessário a associação com a circunferência abdominal e dados metabólicos do modelo experimental (87).

Embora o índice de Lee pareça extremamente factível para o trabalho desenvolvido, ressalta-se que o autor utilizou um modelo experimental de obesidade de outra espécie.

Na leitura do glicosímetro digital constatou-se que os animais iniciaram o experimento com valores homogêneos de glicose. Entretanto, a última aferição referente a este dado, apontou que houveram variações nos resultados coletados.

Sendo que o grupo o grupo HDMOO possuiu valores inferiores dos demais, e que os grupos submetidos ao treinamento físico aeróbio também apresentaram diminuição de glicose quando comparado com o grupo CO.

É sabido que a pratica de atividade física pode melhor e contribuir para a redução de determinados aspectos relacionados com a obesidade, entre eles a diminuição da massa corporal total, e resistência à insulina (88,89). Ao se tratar da resistência insulínica, o treinamento físico aeróbio feito via natação contribuiu com para a supressão da hiperglicemia. Outro ponto importante desta terapêutica é que o controle de secreção da insulina e a sensibilidade a insulina são protegidas pelo exercício físico (89).

O número de células no LBA do grupo HDMOO esteve aumentada quando comparada com o grupo C e o grupo EO. Obteve-se também que a quantidade de Eosinófilos deste grupo, também se encontrou aumentada em comparação com os demais grupos. Se tratando do grupo EHO o qual também foi submetido ao protocolo de inflamação pulmonar alérgica crônica, a quantidade de eosinófilos deste também esteve reduzida em confronto com os valores encontrados no grupo HDMOO.

Dessa forma é possível que o treinamento físico aeróbio possa ter reduzido de maneira eficaz a quantidade de células totais e também de eosinófilos no LBA.

Os valores referentes a contagem total de células no sangue estiveram aumentados no grupo HDMOO em comparação com o demais, o que pode indicar uma mobilização do sistema imune em resposta a determinada doença, assim corroborando para um quadro inflamatório sistêmico. A quantidade eosinófilos no sangue esteve aumentada no grupo HDMOO em relação aos demais, vale lembrar que o mesmo tipo de célula também apresentou maiores níveis de concentração no LBA em relação aos demais grupos. Tais resultados corroboram com a eficiência do protocolo proposto, que objetivou a obtenção de um modelo experimental obeso que apresentasse uma inflamação pulmonar alérgica crônica (asma).

A quantidade de linfócitos investigados no sangue se mostrou com diferenças estatisticamente significativas no grupo HDMOO em relação aos demais grupos, exceto ao CO. Dessa forma, os resultados apontam que o grupo HDMOO obteve concentrações expressivamente menores de linfócitos sanguíneos. Não foram

observadas variações de macrófagos e neutrófilos nas amostras coletadas para análise.

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas superiores que podendo ter sua fisiopatologia desenvolvida pelo contato constante com um alérgeno. Esta doença pode ser caracterizada principalmente pela infiltração de eosinófilos, ativação de mastócitos e predominância de células Th2, concomitante a tais eventos há também um remodelamento das vias aéreas que pode comprometer a eficiência desta estrutura para a passagem de ar e corroborando para a obstrução brônquica (50). Existem alguns biomarcadores presentes no escarro, no ar exalado, e no sangue de pacientes asmáticos. Entre eles, a presença de eosinófilos (50, 90).

Ainda se tratando das análises feitas nas amostras referentes ao LBA, os níveis de IL 4 estiveram aumentados no grupo HDMO em comparação ao grupo C. Em relação aos valores da IL 5 também foram encontrados valores expressivamente maiores no grupo HDMO em comparação com os demais grupos.

Embora que a IL4 seja uma citocina de extrema importância nos aspectos imunológicos referentes a concepção da asma, e também desempenhando um papel fundamental na ativação de células que caracterizam uma resposta Th2, não foi possível encontrar diferenças entre os grupos desta citocina nas amostras de soro analisadas.

Além dos achados da IL5 no LAB, foi possível encontrar diferenças desta citocina nas amostras de soro. O grupo C apresentou valores menores com diferenças significativas em relação aos demais. O grupo HDMO demonstrou valores expressivamente maiores de IL 5 quando comparado com os demais grupos, ressaltando a comparação deste grupo com o grupo EHO.

Não foram encontradas diferenças entre os diversos grupos experimentais na citocina IL 6 nas amostras do LBA. De outra forma, as amostras de soro resultaram em um aumento expressivo de IL 6 no grupo HDMO em confronto com os demais grupos. O treinamento físico aeróbio foi capaz de reduzir os níveis de IL 6 no soro, sendo esta uma afirmativa embasada pelo fato de o grupo EHO não apresentou diferenças estatisticamente diferentes dos demais grupos não sensibilizados com o ácaro de poeira doméstica.

Os níveis de IL 13 no LAB, não foi possível identificar diferenças significantes entre os grupos. Contudo, na análise desta citocina no soro foram encontradas diferenças entre os grupos. Constatou-se que o grupo EO alcançou maiores níveis quando comparado com o grupo C. O grupo HDMO apresentou diferenças em comparação com o grupo C, CO, EO e EHO. Desta forma é possível que o treinamento físico aeróbio de intensidade moderada possa ter influenciado nos valores de IL 13, pois os achados apontam uma diferença de  $p < 0,01$  de valores inferiores desta citocina no grupo EHO em comparação com o grupo HDMO.

É sabido que células Th2 são caracterizadas pela secreção de IL 4, IL 5 e IL 13. Sendo que a IL 4 desempenha papel de extrema importância na diferenciação de células Th2 derivadas de Th0 em resposta a exposição a um alérgeno (50,91). A IL 13 é capaz de desempenhar certas funções mimetizando a IL 4, influenciando sobre células B para a liberação de IgE e posterior ligação aos mastócitos (50,57,58). No caso da IL 5, os níveis desta citocina relacionada com o recrutamento de eosinófilos em quadros de alergia e também em infestações parasitárias (57).

Dessa forma pode-se considerar que a IL 4 seja capaz de promover uma resposta inflamatória Th2. Mas tanto a IL 4 quanto a IL 6, além de possuírem essa mesma capacidade em relação a resposta inflamatória Th2, elas também conseguem bloquear o desenvolvimento de Treg (92). É sabido que no caso de doenças inflamatórias crônicas, os níveis de receptores de IL 6 (sIL-6R) é aumentada (93). Em contrapartida, o complexo entre sIL-6R e IL-6 tem sido associado com a inibição do desenvolvimento de células CD4+, além de perturbações na função supressora de modelos de asma e doenças inflamatórias do intestino (92,93).

Os resultados de IL 17, apontam que o grupo HDMO obteve maiores valores desta citocina em comparação com os demais grupos, mesmo que o comparativo refira significâncias estatísticas diferentes. A IL 23 analisada no LAB do grupo HDMO esteve aumentada quando comparada com o grupo C. De outra forma, o grupo CO também obteve diferenças em relação ao grupo C. No caso do TNF $\alpha$  o grupo HDMO apresentou maiores valores em relação aos demais grupos.

Não obstante os resultados de IL 17, 23 e TNF $\alpha$  no soro não apontam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos investigados na presente pesquisa.

É sabido que tanto a IL 17, IL 23 e também a TNF $\alpha$ , são influentes citocinas da resposta inflamatória Th17 (94).

Em relação as adipocinas investigadas e levantadas como substancias que poderiam influir sobre a resposta inflamatória do modelo experimental proposto no LBA, mais precisamente ao se tratar da adiponectina, leptina e resistina. Não foram obtidos resultados com diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais referentes as amostras de LBA.

É possível que a adiponectina no soro dos grupos EHO e HDM tenham sofrido influência do protocolo que visou mimetizar a asma, pois estes dois apresentaram menores valores desta adipocina quando comparados com os demais grupos. Todavia, tal análise afirma que o grupo EO apresentou maiores valores desta em comparação com todos os outros grupos.

Como era de se esperar a análise de leptina no soro mostra que o grupo CO, EO, HDM e EHO apresentaram maiores níveis em relação ao grupo C. Entretanto, o grupo EHO demonstrou aumento dos níveis desta adipocina em comparação com o grupo HDMO. O grupo EHO possuiu menores valores de em comparação com o HDM.

As concentrações de resistina se demonstraram indiferentes entre os grupos experimentais, tanto nas amostras de LAB quanto nas de soro.

No grupo HDMO o protocolo de inflamação pulmonar alérgica crônica resultou em níveis aumentados de CXCL1/KC, tanto no LAB quanto no soro. Em contrapartida o exercício foi capaz de reduzir os valores desta citocina no LBA, uma vez que os resultados apontam que não houveram diferenças entre os EHO, EO, CO e C.

A IL 8 exerce papel extremamente influente em quadros inflamatórios, agindo de forma a contribuir para o recrutamento e ativação de neutrófilos, tal eficiência desta interleucina é atribuída a grande níveis e variedade de receptores presentes na superfície destas células do sistema imune. Roedores não possuem IL 8, mas possuem quimiocinas como a CXCL1/KC que podem ser consideradas homólogas funcionais desta interleucina (95,96).

Estudo experimentais demonstram que é viável inibir a IL 8 (CXCL1/KC). Por exemplo via a nebulização de soro fisiológico hipertônico, que objetiva interferir a

interação entre a IL8 e seus receptores (97). Outra forma já pesquisada é via a administração de anti-inflamatórios in vitro (98,99).

Foram encontrados valores superiores de IL 1 $\beta$  no LAB do grupo HDMO quando comparado com o grupo C, EO e EHO. A tratamento terapêutico utilizado na pesquisa garantiu que os níveis desta citocina estivessem diminuídos nos grupos treinado em relação ao grupo HDMO, não apresentando diferenças entre o grupo C, EO e EHO.

A família das IL 1 possuem significativa influência sobre diversas atividades biológicas. A necessidade na investigação sobre a IL 1B concerne na sua capacidade em induzir respostas inflamatórias, em especial neutrofílicas(50,100)

Sugere-se que em doenças pulmonares neutrofílicas crônicas tais como a asma grave neutrofílica com resistência a corticoesteróides, e a doença pulmonar obstrutiva crônica a IL 1B pode estar relacionada com a hipoventilação, hipoperfusão e reoxigenação (100,101)

Estudos apontam que a produção e níveis de adiponectina é inversamente proporcional a quantidade de tecido adiposo branco de um determinado indivíduo. E que esta é negativamente correlacionada com a massa de gordura visceral, inflamação, doença visceral, doença cardíaca, e outros tipos de doenças. Contudo, a adiponectina está associada a sensibilidade insulínica e a redução de massa corporal (69,102).

Via a exposição crônica a um alérgeno verificou-se que o grupo HDMO apresentou maior quantidade de eosinófilos comparado aos demais grupos. E que até mesmo o grupo EHO, o qual também foi submetido a exposição alérgica não apresentou diferenças dos outros grupos que não passaram por este protocolo.

Há também os resultados referentes a presença de neutrófilos no espaço peribrônquico, e é apontado de que apenas o grupo HDMO apresentou maiores quantidades deste tipo celular em relação aos demais. E mais uma vez o grupo EHO não apresentou diferenças significativas quando comparado com os grupos C, CO e EO. Dessa forma, os achados anteriormente citados para a quantidade de eosinófilos se replicam para o mesmo comparativo em relação aos neutrófilos.



O grupo CO apresentou maior quantidade de linfócitos com resultados estatisticamente significantes no espaço peribrônquico em relação ao grupo HDMO e EHO. Dessa forma pode-se levantar a hipótese de que a administração ácaro de poeira doméstica provavelmente exerça influência sobre a presença destas células.

Citocinas liberadas predominantemente por células T, orquestram uma série de reações imunológicas importantes em um quadro inflamatório como o observado na asma (50). Pacientes asmáticos apresentam um aumento no número de células Th CD4+ nas vias aéreas, com predominância do subtipo de células Th2 (50,92).

Em um modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica no qual os camundongos foram sensibilizados com OVA. Sugere-se que o exercício físico possa promover uma diminuição da migração de células Th, em modelos submetidos ao treinamento físico, e que dessa forma se reduziu a presença destas células em resposta a um antígeno (103)

A quantidade de macrófagos encontradas no grupo C foi significativamente menor em relação aos demais. E outro achado sobre este tipo de células é que o grupo CO apresentou maior número de células em comparação com o grupo EO.

Os macrófagos são as células primárias do sistema imune inato, desempenhando diversas funções que vão desde a regulação tecidual como o desenvolvimento, homeostase e reparo. Entretanto, essas diversas funções estão relacionadas com o a ativação destas células via a ação de determinado fenótipo em resposta a um estímulo que resultará a uma rápida resposta imunológica (103,104).

Na avaliação referente a reatividade pulmonar feita com a utilização do sistema BUXCO, no qual consistiu na coleta de dados basais seguido por uma oferta inalatória de uma solução salina (PBS) e posteriormente de doses seriadas de Metacolina (6,25 a 50 mg/mL) a todos os grupos experimentais. Verificou-se que o grupo submetido ao protocolo correspondente a inflamação pulmonar alérgica crônica e ao de aumento de massa corporal total (grupo HDMO), obteve resultados com diferenças estatisticamente significativas em comparação com os demais em todas as etapas realizadas. Resultados esses que apontam tais diferenças mesmo sob condições basais de avaliação até a inalação com maior concentração de Metacolina.

A deposição de fibras de colágeno nas vias aéreas foram significativamente maiores no grupo HDMO. Os mesmos achados a respeito das fibras de colágeno foram observados nos resultados referentes ao percentual de fibras elásticas nas vias aéreas. Ou seja, o único grupo que apresentou diferenças significativas em relação aos demais, com aumento do percentual da deposição de fibras elásticas, foi o grupo HDMO. O grupo EHO apresentou valores semelhantes aos demais grupos para ambas as proteínas de matriz extracelular. Sendo assim, é possível que a proposta de treinamento físico aeróbio também tenha influído sobre o remodelamento das vias aéreas analisadas.

O remodelamento consiste em alterações estruturais dos pulmões, onde este é secundário à inflamação. No caso de pacientes asmáticos, principalmente em casos graves desta doença é preconizado que o remodelamento é um aspecto irreversível da obstrução das vias aéreas (105).

É sabido que a IL 13 é particularmente um interessante alvo terapêutico para o tratamento da asma, uma vez que esta citocina é fortemente relacionada a mudanças estruturais importantes durante o desenvolvimento da doença, ou seja, muito do remodelamento observado atribuído a esta interleucina (50). Conforme já citado anteriormente, em modelos animais e em pesquisa com humanos, tal fenômeno inclui a fibrose subepitelial, e proliferação do músculo liso e de células caliciformes (50, 105-108). Em sumula é constatado que a IL 13 pode agir diretamente colaborando para a hiper-reatividade brônquica característica de pacientes asmáticos (50).

Observa-se o aumento da quantidade de células caliciformes que por consequência resultam também em maior produção de muco no remodelamento das vias aéreas de asmáticos. Há também o aumento da deposição de fibras de colágeno (tipo I, III e V), bem como o de fibronectina (106). O comprometimento da eficiência da via aérea em exercer sua função, também é provocado pela hipertrofia e hiperplasia das células do músculo liso que envolve a via. Dessa forma a somatória das características citadas, resulta na diminuição (estreitamento) do calibre da via, devido as alterações estruturais sofridas (105-108).

Em estudo realizado afim de avaliar o método mais eficiente para mensurar a reatividade brônquica de crianças asmáticas, chegou-se à conclusão de que a MCh foi capaz de desencadear maior incidência de broncoespasmos relacionados

positivamente com tosse e desconfortos no peito em comparação com um protocolo que consistiu em um desafio de exercício físico (109).

Animais sensibilizados com o ácaro de poeira doméstica (House Dust Mite), demonstraram significativo aumento da reatividade pulmonar ou hiper-reatividade quando comparados ao grupo controle quando desafiados com concentrações diferentes de Metacolina (110). A hiper-reatividade observada em casos de asma é resultado do aumento da deposição de proteínas de matriz extracelular nas vias aéreas que age em sinergismo para a limitação de passagem do ar pela via aérea podendo ser em resposta a um gatilho desencadeador de uma crise asmática.

Na análise das citocinas IL 10 e IL 1ra, não foi possível detectar nenhuma diferença significativa entre os grupos experimentais, sendo que o mesmo aconteceu ao quantificar a IL 1ra no LBA. Contudo, foi possível constatar que o grupo EO e o grupo EHO apresentaram quantidades maiores de IL 10 no LBA em comparação com os demais grupos. Dessa forma, especula-se de que o exercício físico de intensidade moderada pode ter promovido um aumento desta citocina em comparação com os demais. Não foram encontradas diferenças entre os dois grupos treinados.

Estudos realizados em modelos experimentais de inflamação pulmonar, utilizando como tratamento terapêutico o treinamento físico aeróbio de intensidade leve ou moderada, afirmam que os efeitos que promovem melhora do quadro inflamatório das vias aéreas e/ou parênquima são atribuídos os níveis de IL 1ra e também principalmente a IL 10 (74,75,79,80).

O treinamento aeróbio é possível que se diminua a dispnéia e o broncoespasmo induzidos pelo exercício, além da evidente melhora da capacidade aeróbia e qualidade de vida. Tais benefícios ocorrem em resposta a diminuição da resposta inflamatória Th 2 e melhora da mecânica respiratória. Além do aumento da IL 10 e IL 1ra, há também a diminuição de NF Kb (82-85).

## **6 Considerações Finais**

Através dos achados do presente estudo, pode-se concluir que o treinamento físico de intensidade moderada possui potencial em influir de maneira benéfica a diminuição dos sintomas encontrados na asma, e que normalmente são agravados

quando somados a um quadro de obesidade. Sobretudo, tais vantagens da terapêutica adotada influem via a diminuição local e sistêmica de citocinas inflamatórias que orquestram certas alterações estruturais e funcionais do pulmão.

Embasado pelos resultados encontrados e na pesquisa literária feita, pode-se afirmar que os benefícios supracitados devem ser atribuídos principalmente ao aumento dos níveis de IL 10 no LAB. Todavia, foram encontradas variações das citocinas Th1, Th2 e Th17 tanto no LAB quanto no soro.

## Referências

1. Kelly T, Yang W, Chen CS, Reynolds HE. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *Int J Obes (Lond)* 32: 1431-1437.10.1038/ijo.2008.102
2. Whiting D. R., Guariguata L., Weil C., Shaw J. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2011;94(3):311–321. doi: 10.1016/j.diabres.2011.10.029.
3. Bobbioni-Harsch E, Pataky Z, Makoundou V, et al. From metabolic normality to cardiometabolic risk factors in subjects with obesity. *Obesity*. 2012;20(10):2063–2069.
4. Fantuzzi, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunologic*. 2005; 115(5):911-919
5. Sood A, Shore AS. Adiponectin, leptin, and resistin in asthma: basic mechanisms through population studies. *J Allergy*. 2013 Oct 30, 2013

6. Youssef DM, Eldehidy RM, Shokry M, Eldehidy EM. The influence of leptin on Th1/Th2 balance in obese children with asthma. *J Bras de Pneumologia*. 2013 Sept./Oct. vol.39 n°5
7. Golbidi S, Laher I. Exercise induced adipokine changes and the metabolic syndrome. *J Diabetes Res*. 2014; 2014: 726861
8. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic; WHO Technical Report Series 894; Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2000.
9. Wyka J, Hirschberg L, Żechałko-Czajkowska A. Nutritional determination of obesity in adults from Wrocław. *RoczPanstwZaklHig*. 2007;58:541–8.
10. Wellman NS, Friedberg B. Causes and consequences of adult obesity: health, social and economic impacts in the United States. *Asia Pac J ClinNutr*. 2002;11(Suppl 8):S705–9.
11. World Health Organization. Global. Obesity and overweight: fact sheet; Strategy on Diet, Physical Activity, and Health; Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2003.
12. Hawkes C. Uneven dietary development: linking the policies and processes of globalization with the nutrition transition, obesity and diet-related chronic diseases. *Global Health*. 2006;28:4.
13. Hawkes C. The role of foreign direct investment in the nutrition transition. *Public Health Nutr*. 2005;8:357–65.
14. Popkin BM. The nutrition transition and obesity in the developing world. *J Nutr*. 2001;131:871S–3S
15. Martinez-Gonzalez MA, Martinez JA, Hu FB, Gibney MJ, Kearney J. Physical inactivity, sedentary lifestyle and obesity in the European Union. *Int J ObesRelatMetabDisord*. 1999;23:1192–201.
16. Popkin BM. The nutrition transition in low-income countries: an emerging crisis. *Nutr Rev*. 1994;52:285–98.
17. Krzysztozek, J., Wierzejska, E., & Zielińska, A. (2015). Obesity. An analysis of epidemiological and prognostic research. *Archives of Medical Science : AMS*, 11(1), 24–33. doi:10.5114/aoms.2013.37343
18. Trayhurn P.. Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. *Physiol Rev* (2013) 93:121.10.1152/physrev.00017.2012
19. Cinti S. The adipose organ. Prostaglandins Leukocytes Essential Fatty Acids (2005) 73:9–1510.1016/.2005.04.010
20. Trayhurn P, Wood IS.. Adipokines: Inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* (2004) 92:347–55.10.1079/BJN20041213

21. Zhang YY, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM.. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homolog. *Nature* (1994) 372:425–32.10.1038/372425a0
22. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Mizuno K, Matsuzawa Y, Matsubara K.. Analysis of an expression profile of genes in the human adipose tissue. *Gene* (1997) 190:227–35.10.1016/S0378-1119(96)00730-5
23. Kershaw EE & Flier JS 2004 Adipose tissue as an endocrine organ. *Jour of Clin Endocr and Metab* 89 2548–2556.
24. Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, Dorfman R, Wang Y, Zielenski J, Mastronardi F *et al.* 2009 Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nature Med* 15 921–929.
25. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, Otsu M, Hara K, Ueki K, Sugiura S *et al.* 2009 CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nature Med* 15 914–920.
26. Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, Lee J, Goldfine AB, Benoist C, Shoelson S *et al.* 2009 Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nature Med* 15 1593–1599.
27. Lynch L, O'Shea D, Winter DC, Geoghegan J, Doherty DG & O'Farrelly C 2009 Invariant NKT cells and CD1d(+) cells amass in human omentum and are depleted in patients with cancer and obesity. *European Jour of Immunology* 39 1893–1901.
28. Winer DA, Winer S, Shen L, Wadia PP, Yantha J, Paltser G, Tsui H, Wu P, Davidson MG, Alonso MN *et al.* 2011 B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. *Nature Med* 17 610–617.
29. Liu J, Divoux A, Sun J, Zhang J, Clement K, Glickman JN, Sukhova GK, Wolters PJ, Du J, Gorgun CZ *et al.* 2009 Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nature Med* 15 1594–1595.
30. Wu D, Molofsky AB, Liang HE, Ricardo-Gonzalez RR, Jouihan HA, Bando JK, Chawla A & Locksley RM 2011 Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science* 332 243–247.
31. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL & Ferrante AW Jr. 2003 Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Jour of Clin Invest* 112 1796–1808.
32. Lumeng CN, Bodzin JL & Saltiel AR 2007 Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *Jour of Clin Invest* 117 175–184.
33. Wentworth JM, Naselli G, Brown WA, Doyle L, Phipson B, Smyth GK, Wabitsch M, O'Brien PE & Harrison. Pro-inflammatory CD11c+CD206+ adipose tissue

macrophages are associated with insulin resistance in human obesity. *Diab* 1648–1656.

34. Hotamisligil GS, Shargill NS & Spiegelman BM 1993 Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 25987–25591.

35. Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R & Simsolo RB The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *Journ of Clin Invest* 952111–952119.

36. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K *et al.* 2006 MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *Jour of Clin Invest* 116 1494–1505.

37. Nguyen MT, Favelyukis S, Nguyen AK, Reichart D, Scott PA, Jenn A, Liu Bryan R, Glass CK, Neels JG & Olefsky JM 2007 A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *Jour of Biol Chem* 28235279–28235292.

38. Unger RH & Scherer PE 2010 Gluttony, sloth and the metabolic syndrome: a roadmap to Lipotoxicity. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 21 345–352.

39. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Görgün C, Glimcher LH & Hotamisligil GS 2004 Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306 457–461.

40. Halberg N, Khan T, Trujillo ME, Wernstedt, Asterholm I, Attie AD, Sherwani S, Wang ZV, Landskroner-Eiger S, Dineen S, Magalang UJ *et al.* 2009 Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue. *Molecular and Cellular Biology* 29 4467–4483.

41. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H & Flier JS 2006 TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *Jourof Clin Invest* 116 3015–3025

42. Mould AW, Matthaei KI, Young IG & Foster PS 1997 Relationship between interleukin-5 and eotaxin in regulating blood and tissue eosinophilia in mice. *Jourof Clinical Investigation* 99 1064–1071. (doi:10.1172/JCI119234)

43. Molofsky AB, Nussbaum JC, Liang HE, Van Dyken SJ, Cheng LE, Mohapatra A, Chawla A & Locksley RM 2013 Innate lymphoid type 2 cells sustain visceral adipose tissue eosinophils and alternatively activated macrophages. *Jourof Experimental Med* 210 535–549.

44. Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, Vasta V, Manganiello VC, Beavo JA, Rudensky AY. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* 2007. 445 771–775.

- 45 Mark A Exley, Laura Hand, Donal O'Shea, and Lydia Lynch Interplay between the immune system and adipose tissue in obesity J Endocrinol 223 (2) R41-R48
46. Matsuda JL, Naidenko OV, Gapin L, Nakayama T, Taniguchi M, Wang CR, Koezuka Y & Kronenberg M 2000 Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. J Exp Med 192:741–192754.
47. Brigl M & Brenner MB 2004 CD1: antigen presentation and T cell function. Annual Review of Immunology 22 817–890.
48. Berzins SP, Smyth MJ & Baxter AG 2011 Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease. Nat Reviews. Immun 11 131–142.
49. Simoni Y, Diana J, Ghazarian L, Beaudoin L & Lehen A 2013 Therapeutic manipulation of natural killer (NK) T cells in autoimmunity: are we close to reality? Clin and Exper Immunology 171 8–19.
50. Barnes PJ, The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. J Clin Invest. 118. 3546-3556.
51. Caramori, G., et al. 2001. Expression of GATA family of transcription factors in T-cells, monocytes and bronchial biopsies. Eur. Respir. J. 18:466–473.
52. Maneechotesuwan, K., et al. 2007. Regulation of Th2 cytokine genes by p38 MAPK-mediated phosphorylation of GATA-3. J. Immunol. 178:2491–2498.
53. Stirling, R.G., van Rensen, E.L., Barnes, P.J., and Chung, K.F. 2001. Interleukin-5 induces CD34(+) eosinophil progenitor mobilization and eosinophil CCR3 expression in asthma. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 164:1403–1409.
54. Chu DK, Al-Garawi A, Llop-Guevara A, et al. Therapeutic potential of anti-IL-6 therapies for granulocytic airway inflammation in asthma. *Allergy, Asthma, and Clin Immunol: Official J of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immun.* 2015;11(1):14.
55. Wang J, Homer RJ, Chen Q, Elias JA. Endogenous and exogenous IL-6 inhibit aeroallergen-induced Th2 inflammation. J Immunol. 2000;165:4051–61.
56. Trifunović J, Miller L, Debeljak Ž, Horvat V. Pathologic patterns of interleukin 10 expression--a review. Biochem Med (Zagreb). 2015;25(1):36-48.
57. Wills-Karp, M. 2004. Interleukin-13 in asthma pathogenesis. Immunol. Rev. 202:175–90.
58. Kuperman, D.A., et al. 2002. Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. Nat. Med. 8:885–889.
59. Shabgah AG, Fattahi E, Shahneh FZ. Interleukin-17 in human inflammatory diseases. Post Dermatol Alergol. 2014 Aug;31(4):256-261



60. Sarkar S, Cooney LA, Fox DA (2010) The role of T helper type 17 cells in inflammatory arthritis. *ClinExpImmunol* 159:225–237
61. Halwani R, Al-Kufaidy R, Vazquez-Tello A, Pureza MA, BaHammam AS, Al-Jahdali H, Alnassar SA, Hamid Q, Al-Muhsen S. IL-17 Enhances Chemotaxis of Primary Human B Cells during Asthma. *PLoSOne*. 2014 Dec 10;9(12):e114604
62. Li, Y. and Hua, S. (2014), Mechanisms of pathogenesis in allergic asthma: Role of interleukin-23. *Respirology*, 19: 663–669. doi: 10.1111/resp.1229
63. Scherer PE. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes*.2006;55(6):1537–1545.
64. Shore SA, Terry RD, Flynt L, Xu A, Hug C. Adiponectin attenuates allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness in mice. *Jourof Allergy and Clinical Immunology*.2006;118(2):389–395.
65. Ionescu LI, Alphonse RS, Arizmendi N, et al. Airway delivery of soluble factors from plastic-adherent bone marrow cells prevents murine asthma. *American Jourof Respiratory Cell and Molecular Biology*.2012;46(2):207–216.
66. Shore SA, Rivera-Sanchez YM, Schwartzman IN, Johnston RA. Responses to ozone are increased in obese mice. *Jourof Applied Phys*. 2003;95(3):938–945.
67. Williams AS, Leung S-Y, Nath P, et al. Role of TLR2, TLR4, and MyD88 in murine ozone-induced airway hyperresponsiveness and neutrophilia. *Jourof Applied Physiology*. 2007;103(4):1189–1195.
68. Johnston RA, Theman TA, Terry RD, Williams ES, Shore SA. Pulmonary responses to acute ozone exposure in fasted mice: effect of leptin administration. *Jour of Applied Phys*. 2007;102(1):149–156.
69. Hirai H, Satoh H, Kudoh A, Watanabe T. Interaction between resistin and adiponectin in the proliferation of rat vascular smooth muscle cells. *Mol and Cel Endocr*. 2013;366(1):108–116.
70. Ram, F.S.F., Robinson, S.M., Black, P.N., et al., 2009. Physical training for asthma (Cochrane Review). In: The Cochrane Library, Issue 1.
71. Thompson PD, Buchner D, Pina IL, Balady GJ, Williams MA, Marcus BH, Berra K, Blair SN, Costa F, Franklin B, Fletcher GF, Gordon NF, Pate RR, Rodriguez BL, Yancey AK, and Wenger NK. Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease: a statement from the Council on Clinical Cardiology (Subcommittee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention) and the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism (Subcommittee on Physical Activity). *Circulation* 107: 3109-3116, 2003.
72. Qingwu Qin, Juntao F, Chengping H, Xi C, Ling Q, Yuanyuan L. Low-Intensity Aerobic Exercise Mitigates Exercise-Induced Bronchoconstriction by Improving the Function of Adrenal Medullary Chromaffin Cells in Asthmatic Rats Vol. 234(2014) No. 2 October p 99-110

73. 2Kari J. Dugger, Taylor Chrisman, Ben Jones, Parker Chastain, Kacie Watson, Kim Estell, Kurt Zinn, Lisa Schwiebert. 14) V Moderate Aerobic Exercise Alters Migration Patterns of Antigen Specific T helper Cells within an Asthmatic Lung. *Brain Behav Immun*. 2013 Nov; 2014 No. 2 October p. 99-110
74. 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
75. Silva RA, Vieira RP, Duarte AC, Lopes FD, Perini A, Mauad T, Martins MA, Carvalho CR. Aerobic training reverses airway inflammation and remodelling in an asthma murine model. *Eur Respir J*. 2010 May;35(5):994-1002.
76. Mendes FA, Gonçalves RC, Nunes MP, Saraiva-Romanholo BM, Cukier A, Stelmach R, Jacob-Filho W, Martins MA, Carvalho CR. Effects of aerobic training on psychosocial morbidity and symptoms in patients with asthma: a randomized clinical trial. *Chest*. 2010 Aug;138(2):331-7.
77. Lowder T, Dugger K, Deshane J, Estell K, Schwiebert LM. Repeated bouts of aerobic exercise enhance regulatory T cell responses in a murine asthma model. *Brain Behav Immun*. 2010 Jan;24(1):153-9.
78. Pastva A, Estell K, Schoeb TR, Atkinson TP, Schwiebert LM. Aerobic exercise attenuates airway inflammatory responses in a mouse model of atopic asthma. *J Immunol*. 2004 Apr 1;172(7):4520-6.
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):383-389.
80. Silva RA, Vieira RP, Duarte AC, Lopes FD, Perini A, Mauad T, Martins MA, Carvalho CR. Aerobic training reverses airway inflammation and remodelling in an asthma murine model. *Eur Respir J*. 2010 May;35(5):994-1002.
81. 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.
82. Müller T, Vieira RP, Grimm M, Dürk T, Cicko S, Zeiser R, Jakob T, Martin SF, Blumenthal B, Sorichter S, Ferrari D, Di Virgillio F, Idzko M. A potential role for P2X7R in allergic airway inflammation in mice and humans. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011 Apr;44(4):456-64.
83. Vieira RP, Müller T, Grimm M, von Gernler V, Vetter B, Dürk T, Cicko S, Ayata CK, Sorichter S, Robaye B, Zeiser R, Ferrari D, Kirschbaum A, Zissel G, Virchow JC, Boeynaems JM, Idzko M. Purinergic receptor type 6 contributes to airway inflammation and remodeling in experimental allergic airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Jul 15;184(2):215-23

84. 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.
85. Vieira RP, Duarte AC, Claudino RC, Perini A, Santos AB, Moriya HT, Arantes-Costa FM, Martins MA, Carvalho CR, Dolhnikoff M. Creatine supplementation exacerbates allergic lung inflammation and airway remodeling in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007 Dec;37(6):660-7. Epub 2007 Jul 19.
86. Godoy-Matos AF, Oliveira J, et al. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. Diretrizes Brasileiras de Obesidade. ABESO 2009.
87. Bernardis LL, Patterson BD. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *J Endocrinol*. 1968 Apr;40(4):527-8.
88. Karstoft K, Pedersen BK. Exercise and type 2 diabetes: Focus on metabolism and inflammation. *Immunol Cell Biol* 2015 Nov 16
89. Marinho Rodolfo, Moura Leandro Pereira de, Rodrigues Bárbara de Almeida, Pauli Luciana Santos Souza, Silva Adelino Sanchez Ramos da, Ropelle Eloize Cristina Chiarreotto et al . Effects of different intensities of physical exercise on insulin sensitivity and protein kinase B/Akt activity in skeletal muscle of obese mice. Einstein (São Paulo) [Internet]. 2014 Mar [cited 2016 Jan 08] ; 12( 1 ): 82-89.
90. Li R, Yang G, Yang R, Peng X, Li J. Interleukin-33 and receptor ST2 as indicators in patients with asthma: a meta-analysis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2015;8(9):14935-14943.
91. Barnes, P.J.. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat. Rev. Immunol* 2008. 8:183–192.
92. Ray A, Khare A, Krishnamoorthy N, Qi Z, Ray P. Regulatory T Cells in Many Flavors Control Asthma. *Mucosal Immunol*. 2010;3 (3):216-229.
93. Doganci A, et al. The IL-6R alpha chain controls lung CD4+CD25+ Treg development and function during allergic airway inflammation in vivo. *J Clin Invest*. 2005;115:313–325.
94. Marashian S, Mortaz E, Jamaati H, Alavi-Moghaddam M, Kiani A, Abedini A, Garssen J, M. Adcock I, Velayati A. Role of Innate Lymphoid Cells in Lung Disease. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology* 2015;14(4):346-360
95. Rot. A., Von Andrian. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells. *Rev Immunol*. 2004. 22. 891-928
96. Hol J, Wilhelmsen L, Haraldsen G. The murine IL-8 homologues KC, MIP-2 and LIX are found in endothelial cytoplasmic granules but not in Weibel Palade Bodies. *Jour of Leuk Biol*. 2009 87. 3 501-508

97. Reeves E.P., Williamson M., O'Neill S.J., Greally P., McElvaney N.G. Nebulized hypertonic saline decreases IL-8 in sputum of patients with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2011;183:1517–1523.
98. Tabary O., Escotte S., Couetil J.P., Hubert D., Dusser D., Puchelle E., Jacquot J. Genistein inhibits constitutive and inducible NF- $\kappa$ B activation and decreases IL-8 production by human cystic fibrosis bronchial gland cells. *Am. J. Pathol.* 1999;155:473–481.
99. Gambari R., Borgatti M., Lampronti I., Fabbri E., Brognara E., Bianchi N., Piccagli L., Yuen M.C., Kan C.W., Hau D.K., et al. Corilagin is a potent inhibitor of NF- $\kappa$ B activity and downregulates TNF- $\alpha$  induced expression of IL-8 gene in cystic fibrosis IB3-1 cells. *Int. Immunopharmacol.* 2012;13:308–315.
100. Hoffman H, Wanderer A. Inflammasome and IL-1 $\beta$ -Mediated Disorders. *Curr Aller Asthma* 2010 10(4): 229–235.
101. Wanderer AA. Corticosteroid resistance in pulmonary neutrophilic inflammatory disorders and rationale for adjunct IL-1{beta} targeted therapy. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009;41:246–247.
102. X. Wang C. Obesity, Inflammation, and Lung Injury (OILI): The Good. *Mediators of Inflammation.* 2014;2014:978463. doi:10.1155/2014/978463
103. Dugger KJ, Chrisman T, Jones B, Chastain P, Watson K, Estell K, Zinn K, Shwiebert L. Moderate Aerobic Exercise Alters Migration Patterns of Antigen Specific T helper Cells within an Asthmatic Lung. *Brain Behav Immun.* 2013 Nov; 34: 10.1016/j.bbi.2013.07.011.
104. Chung, E. S., Chauhan, S. K., Jin, Y., Nakao, S., Hafezi-Moghadam, A., van Rooijen, N., Zhang, Q., Chen, L., Dana, R. (2009) Contribution of macrophages to angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor receptor-3-specific ligands. *The American journal of pathology* 175, 1984-92. 2.
105. Gambari R., Borgatti M., Lampronti I., Fabbri E., Brognara E., Bianchi N., Piccagli L., Yuen M.C., Kan C.W., Hau D.K., et al. Corilagin is a potent inhibitor of NF- $\kappa$ B activity and downregulates TNF- $\alpha$  induced expression of IL-8 gene in cystic fibrosis IB3-1 cells. *Int. Immunopharmacol.* 2012;13:308–315.
106. Brewster CE, et al. Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1990;3:507–511.
107. Woodruff PG, et al. Hyperplasia of smooth muscle in mild to moderate asthma without changes in cell size or gene expression. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;169:1001–1006.
108. Bara I, Ozier A, Tunon de Lara JM, Marthan R, Berger P. Pathophysiology of bronchial smooth muscle remodelling in asthma. *Eur Respir J.* 2010;36:1174–1184.
109. Ting-Ting Z, Jia-Hua P. Comparison of clinical application of exercise challenge test and methacholine challenge test in measurement of airway hyperresponsiveness. *Journ of Contem Pediat* 2015;12:1066-1069

110. Verheijden K, Willemsen L, Braver S, Leusink-Muis T, Delsing D, Garssen J, Kraveneveld A, Folkerts G. Dietary galacto-oligosaccharides prevent airway eosinophilia and hyperresponsiveness in a murine house dust mite-induced asthma model. *Respir Res* 2015;16(1):17



## ANEXO I

UNINOVE

Universidade Nove de Julho

Protocolo de Pesquisa referente ao Projeto nº AN0034.2014

Título do Projeto: Efeitos do Treinamento Físico Aeróbico em Camundongos Obesos Asmáticos

Orientador: : Prof. Dr. Rodolfo de Paula Vieira

Aluno: Jefferson Comin Jonco Aquino Junior

**Objetivos:** Avaliar os efeitos do treinamento físico aeróbico de intensidade moderada sobre a inflamação, remodelamento e hiperresponsividade pulmonar em um modelo experimental de asma em camundongos obesos. De maneira especial, o presente projeto objetiva avaliar os efeitos do treinamento físico aeróbico sobre os níveis das citocinas Th1, Th2 e Th17 nos pulmões e na circulação sistêmica de camundongos submetidos ao modelo experimental de asma em camundongos obesos.

### Método: 3. Materiais e Métodos

**Indução da obesidade:** Os animais serão submetidos a uma dieta hiperlipídica (55% de lipídios) durante um período de 10 semanas.

Os animais serão distribuídos de forma aleatória em quatro grupos experimentais (n = 10): Controle Obeso (CO – grupo obeso, não sensibilizado e não treinado), Exercício + Obeso (EO – grupo obeso, não sensibilizado e submetido ao treinamento), Asma + Obeso (AO – grupo sensibilizado com HDM, obeso e não treinado), Exercício + Asma + Obeso (EAO – grupo treinado, sensibilizado com HDM e obeso).

#### 3.2 Modelo experimental de obesidade

Os animais serão submetidos a uma dieta hiperlipídica durante todo o período do estudo, que será de 18 semanas. As 10 semanas iniciais serão necessárias para a indução da obesidade, e somente a partir da 11ª semana os animais serão submetidos ao protocolo de "asma", e após 3 administrações de HDM (1X/semana) haverá o protocolo de exercício. A dieta hiperlipídica será utilizada para que se tornem obesos, sendo utilizada uma ração com composição rica em gorduras (55%), cedida pelo Laboratório de Pesquisa em Obesidade e Diabetes da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, coordenado pelo Prof. Dr. Mario José Abdalla Saad.

#### 3.3 Modelo experimental de "asma" - inflamação pulmonar alérgica crônica usando House Dust Mite (HDM)

No presente estudo utilizaremos o modelo de administração intra-traqueal de HDM, no qual a sensibilização ocorre diretamente através do contato com a mucosa brônquica, tornando-se um modelo mais fidedigno à patogênese da asma (16, 17). Para isso, primeiramente, os animais serão anestesiados com ketamina (100mg/kg) e xilazina (10mg/kg) e então 100 mg do extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Greer Laboratories, Lenoir, NC) serão dissolvidos em 50 µl de PBS e administrados por via intra-traqueal nos dias 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 49. Ressaltando que o primeiro dia da administração de HDM ocorrerá após a indução da obesidade dos animais e que os grupos experimentais obesos irão receber a dieta hiperlipídica até o dia da eutanásia.

#### 3.4 Treinamento físico aeróbico de intensidade moderada como intervenção terapêutica (treinamento iniciando após o estabelecimento da obesidade e da inflamação pulmonar alérgica crônica)

Os animais serão adaptados em esteira ergométrica para camundongos (Imbramed, RS, Brasil) durante 3 dias (0,5km/h) por 15 minutos (18-20). No dia seguinte serão submetidos ao teste de esforço conforme previamente descrito (18-20). O teste de esforço será repetido ao final do protocolo para avaliar quanto os animais melhoraram ou não o condicionamento físico (18-20). Os animais serão treinados a uma intensidade moderada, correspondendo a 60% da máxima velocidade alcançada no teste de esforço (21). O treinamento de intensidade moderada será realizado durante 5 semanas, 5 vezes por semana, 1 hora por sessão de treinamento (19-21).

Para o protocolo de HDM, o treinamento aeróbico irá iniciar no dia 17 do protocolo, uma vez que conforme já demonstrado, no dia 17 (após as três administrações iniciais de HDM), os animais já apresentam inflamação, remodelamento e hiperresponsividade das vias aéreas (14, 15).

Os experimentos serão sempre realizados 24 horas após o último desafio com alérgeno (HDM) e o teste físico final, e após anestesia dos animais com ketamina (100mg/kg) e xilazina (10mg/kg). Assim sendo, serão realizadas as seguintes avaliações.



### 3.5 Avaliação da inflamação pulmonar no lavado broncoalveolar (LBA)

Após anestesia e traqueotomia, os animais serão canulados e os pulmões serão lavados com 3 x 0,5 ml de PBS (total 1,5 ml de PBS). O volume do lavado recuperado será centrifugado a 1000 rpm a 4°C por 5 minutos. O sobrenadante será armazenado a -70°C para posterior análise das citocinas por meio de ELISA. O botão celular será ressuspensionado em 1 ml de PBS e a determinação do número de células totais no LBA será realizada por meio de contagem na Câmara de Neubauer (18-22). Aliquotas do material ressuspensionado serão utilizadas para preparação de lâminas de citospin as quais serão coradas com May-Grunwald-Giemsa (onde 300 células serão contadas para a determinação da contagem diferencial) (18-22).

### 3.6 Avaliação dos níveis de citocinas no LBA e no soro por ELISA

Os níveis de IL-1ra, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-23, TNF-alfa, Adiponectina, Leptina e Resistina no LBA e no soro serão avaliados através dos kits ELISPOT da BD Bioscience e/ou da R&D Systems, conforme instrução das companhias.

### 3.7 Avaliação da inflamação e remodelamento das vias aéreas através da histologia

Com o intuito de avaliar os efeitos do treinamento físico aeróbio sobre a densidade de eosinófilos, linfócitos e macrófagos no espaço peribronquico e sobre a proporção de volume de fibras colágenas na parede das vias aéreas, o pulmão esquerdo será coletado e fixado em paraformaldeído por 24 horas. Os cortes de 4µm serão realizados e as lâminas coradas com HE ou Luna para detecção dos eosinófilos, linfócitos e macrófagos e com Picrossírius para detecção das fibras de colágeno (14, 15, 23-26). A análise quantitativa da densidade de eosinófilos, linfócitos e macrófagos peribronquiais e da proporção de volume de fibras de colágeno na parede das vias aéreas será realizada através da técnica morfométrica conforme previamente descrito (14, 15, 23-26).

### 3.8 Avaliação da hiperresponsividade brônquica

Para a avaliação da hiperresponsividade brônquica, será utilizado o sistema Buxco, onde será avaliado o Penh (índice de hiperresponsividade brônquica), que leva em conta o tempo inspiratório e expiratório, conforme previamente descrito (27). O agente broncoconstritor que será utilizado para a realização da curva dose-resposta será a metacolina, conforme previamente descrito (27).

### 3.9 Análise estatística

Os dados serão analisados através do software SigmaStat 3.1 (Califórnia, EUA). A distribuição da normalidade dos dados será avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados com distribuição paramétrica serão submetidos ao teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls para comparação entre os grupos. Os dados com distribuição não paramétrica serão submetidos ao teste One-way ANOVA on Ranks seguido pelo teste de Dunn's para a comparação entre os grupos. Os níveis de significância serão ajustados para 5% ( $p < 0.05$ ). Os gráficos serão elaborados utilizando-se o software GraphPad Prism 3.1 (Califórnia, EUA).

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

Os animais serão obtidos do biotério de criação da Universidade Nove de Julho e serão utilizados 40 Camundongos C57Bl/6, machos, com 7 semanas de idade, pesando aproximadamente 18-22 gramas.

### Condições de alojamento e nutrição:

Os animais serão mantidos em condições controladas de umidade (50%-60%), luminosidade (12h claro/12h escuro) e temperatura (22°C - 25°C) no biotério de experimentação da Universidade Nove de Julho.

### Medidas para evitar estresse e/ou dor nos animais: Não há estresse intencional.

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

- Administração de ketamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), intraperitoneal.

### Eutanásia:

anestesia intraperitoneal com ketamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e exsanguinação da aorta abdominal.

**Pertinência e valor científico do estudo proposto:**

O grupo possui ampla experiência no tema proposto, sendo muito relevante para a área de conhecimento.

**Data de início:** 01/11/2014

**Data de término:** 01/10/2016

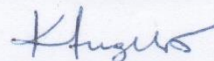
**Apresentado a este Comitê para análise ética, foi considerado:**

- (x) Aprovado, sendo que este projeto deverá permanecer arquivado por 05 (cinco) anos nesta Secretaria.  
( ) Com pendência (relacionar), devendo o Pesquisador encaminhar as modificações sugeridas, e iniciar a coleta de dados somente após a aprovação do projeto por este Comitê.  
( ) Não-Aprovado

**Comentários:**

- Acrescentar no projeto a via de administração dos anestésicos e o método de eutanásia conforme consta no formulário.
- 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, 23 de setembro de 2014



Prof. Dra. Kátia De Angelis  
Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animais  
Universidade Nove de Julho