

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

VINÍCIUS JOSÉ DE OLIVEIRA

**Efeitos da natação sobre os parâmetros morfofuncionais e imunológicos em  
um modelo murino de inflamação pulmonar induzido pelo alérgeno  
recombinante Blo t 5 do ácaro *Blomia tropicalis***

Uberlândia  
2018

VINÍCIUS JOSÉ DE OLIVEIRA

**Efeitos da natação sobre os parâmetros morfofuncionais e imunológicos em  
um modelo murino de inflamação pulmonar induzido pelo alérgeno  
recombinante Blo t 5 do ácaro *Blomia tropicalis***

Dissertação apresentada ao Colegiado do  
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e  
Parasitologia Aplicadas como parte de  
obtenção do título de mestre.

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi  
***Orientador***

Uberlândia  
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

O48e  
2018      Oliveira, Vinicius José de, 1990  
            Efeitos da natação sobre os parâmetros morfofuncionais e  
            imunológicos em um modelo murino de inflamação pulmonar induzido  
            pelo alérgeno recombinante Blo t 5 do ácaro *Blomia tropicalis* / Vinicius  
            José de Oliveira. - 2018.  
            76 f. : il.

            Orientador: Ernesto Akio Taketomi.  
            Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
            Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.  
            Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.130>  
            Inclui bibliografia.

            1. Imunologia - Teses. 2. Pulmões - Doenças - Teses. 3. Natação -  
            Uso terapêutico - Teses. 4. Alérgenos - Teses. I. Taketomi, Ernesto Akio.  
            II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em  
            Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

---

CDU: 612.017

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Vinícius José de Oliveira**

“Efeitos da natação sobre os parâmetros morfofuncionais e imunológicos em um modelo murino de inflamação pulmonar induzido pelo alérgeno recombinante Blo t 5 do ácaro *Blomia tropicalis*”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 19 de fevereiro de 2018.

Prof.ª. Dra. Raquel Annoni – UFTM

Prof. Dr. Guilherme Morais Puga - FAEFI/UFU

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi (orientador) - ICBIM/UFU

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar e, antes de tudo, quero agradecer a Deus por ter me proporcionado esta oportunidade, pela força para conseguir chegar até aqui e por tudo que ele tem abençoado para mim durante minha caminhada acadêmica.

Agradeço aos meus pais, Adilso e Lucimar, por todo apoio e confiança em mim depositados, afinal esta conquista não é só minha, é nossa.

Agradeço a minha irmã, Bruna, por todo apoio, conselhos e por acreditar em mim muito mais do que eu mesmo.

Agradeço ao meu namorado, Cláudio Henrique, por ter me aturado durante os períodos finais dessa fase, por ouvir minhas reclamações e por acreditar em mim de uma maneira encantadora, você foi essencial para que eu chegasse até aqui.

Agradeço ao professor Ernesto Akio Taketomi por ter aceitado me orientar nessa jornada, por todo apoio e por todo conhecimento transmitido, sem isso eu não teria chegado até aqui.

Agradeço ao professor Jair Pereira da Cunha Júnior por todas as conversas, pelo apoio e pelo conhecimento transmitido.

Agradeço aos meus amigos e parceiros de laboratório, Isabella, Hellen, Karine, Alessandro, Laura, Alfredo e Greice, por todos os momentos de risadas, de discussões, de aprendizado, obrigado por tornar meus dias mais alegres e minha jornada mais calma e agradável.

Agradeço também ao professor Robinson Sabino e a Léia Sousa pela parceria firmada entre o LALIC e o departamento de Fisiologia, por colaborar com as análises que incrementaram meu projeto para que ele chegasse ao fim.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais pelo investimento em mim através da Bolsa de Estudos.

Por fim, gostaria de agradecer a Universidade Federal de Uberlândia e ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas pelo investimento em meu projeto e na transmissão do conhecimento necessários para obtenção do título de Mestre.

*“Se você quer um arco-íris, tem que aguentar a chuva.”*

(BUCHSBAUM, 2004)

## RESUMO

Modelos experimentais de inflamação pulmonar têm sido comumente utilizados para compreender a fisiopatologia das doenças pulmonares inflamatórias. Pela primeira vez, desenvolvemos um modelo experimental de inflamação pulmonar usando o alérgeno recombinante Blo t 5 (rBlo t 5) do ácaro *Blomia tropicalis*, para descrever os efeitos promovidos pela natação, de moderada intensidade, neste modelo. A sequência de Blo t 5 foi clonada no vetor pET28a e utilizou-se para transformação *E. coli* BL21, sendo purificada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. Em seguida, camundongos BALB/c foram sensibilizados duas vezes com 25 µg do alérgeno recombinante (i.p.) e 5 µg intranasais (i.n.) em intervalos de 7 dias, seguidos por quatro instilações i.n. diárias e submetidos à natação (TA) durante 4 semanas. Foram avaliados o volume corrente, frequência respiratória e volume-minuto, os níveis de anticorpos IgG específicos e as subclasses de IgG (IgG1 e IgG2a), citocinas e lactato plasmático. Encontramos um aumento no volume corrente ( $p < 0,001$ ) após exposição a altas concentrações de Metacolina e níveis aumentados de IgG anti-rBlo t 5 ( $p < 0,0001$ ) e suas subclasses no grupo rBLOT5, com uma diminuição desses parâmetros no grupo rBLOT5-TA. Houve diminuição nas células totais ( $p < 0,0001$ ) e nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 ( $p < 0,01$ ), IFN- $\gamma$  ( $p < 0,05$ ) e TNF ( $p < 0,01$ ), no grupo rBLOT5-TA. Podemos concluir que o exercício aeróbico, mesmo em intensidade moderada, é indicado para atenuação do processo inflamatório pulmonar em doenças pulmonares.

**Palavras-chave:** doenças pulmonares, natação, *Blomia tropicalis*, proteína recombinante Blo t 5.

## ABSTRACT

Experimental models for lung inflammation have been commonly used to understand the pathophysiology of the inflammatory lung diseases. For the first time, we developed an experimental model of lung inflammation using the recombinant Blo t 5 protein (rBlo t 5) from the mite *Blomia tropicalis*, in order to analysis the effects promoted by swimming (TA) at moderate intensity in this model. The Blo t 5 sequence was cloned in pET28a vector and used to transform BL21 *E. coli* strain, and it was purified in a nickel affinity chromatography. Then, BALB/c mice were sensitized two times with 25 µg recombinant protein (i.p.) and 5 µg (i.n.) at intervals of 7 days, followed by four daily intranasally instillations, and submitted to swimming for 4 weeks. The tidal volume, respiratory frequency, volume-minute, levels of specific IgG antibodies and IgG subclasses (IgG1 and IgG2a), cytokines and lactate from blood were evaluated. We found an increase in tidal volume ( $p<0,001$ ) after exposure to high concentrations of methacholine and increased levels of total IgG anti-rBlo t 5 ( $p<0.0001$ ) and their subclasses in rBLOT5 group, with a decrease in these parameters in rBLOT5-TA group. There was a decrease in total cells ( $p<0,0001$ ) and in the proinflammatory cytokines levels, like IL-6 ( $p<0,01$ ), IFN- $\gamma$  ( $p<0,05$ ) and TNF ( $p<0,01$ ) in rBLOT5-TA group. We can conclude that aerobic exercise, even at moderate intensity, is indicated for attenuation of pulmonary inflammatory process in lung diseases.

**Keywords:** lung diseases, swimming, *Blomia tropicalis*, recombinant Blo t 5 protein.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Sistema respiratório humano.....	16
<b>Figura 2</b> – Volumes e capacidades pulmonares padronizados.....	18
<b>Figura 3</b> – Sequência gênica do alérgeno Blo t 5.....	34
<b>Figura 4</b> - Design experimental.....	40
<b>Figura 5</b> – Cargas suportadas pelos camundongos no Teste Progressivo de Carga (TPC).....	48
<b>Figura 6</b> – Função respiratória basal.....	51
<b>Figura 7</b> - Análise do volume corrente durante o teste de broncoprovocação com Metacolina (TBM).....	52
<b>Figura 8</b> - Contagem de células no BALF.....	54
<b>Figura 9</b> – Produção de anticorpos da classe IgG e subclasses IgG1 e IgG2a específicos a rBlo t 5 no BALF.....	56
<b>Figura 10</b> – Níveis de citocinas presentes no BALF de animais dos diferentes grupos.....	58

**LISTA DE TABELA**

**Tabela 1.** Níveis de lactato plasmáticos.....49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – Graus Celsius

µg – Microgramas

µL – Microlitros

ABTS – 2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]-diammonium salt

ANOVA – Análise de Variância

BALF – Fluido de lavagem broncoalveolar

CaCl<sub>2</sub> – Cloreto de cálcio

CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono

DAMPs – Padrões Moleculares Associados a Danos

DO – Densidade óptica

DP – Desvio padrão

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

ELISA – Ensaio imunoenzimáticos

FcγRI – Receptores de alta afinidade para IgG

FcεRI – Receptores de alta afinidade para IgE

Fig. – Figura

g – Gramas

I.E. – Índice ELISA

i.n. – Intranasal

i.p. – Intraperitoneal

IFN-γ – Interferon-gama

IgA – Imunoglobulina A

IgE – Imunoglobulina E

IgG – Imunoglobulina G

IgG1 – Imunoglobulina G, subclasse 1

IgG2a – Imunoglobulina G, subclasse 2a

IL – Interleucina

IL-1ra – Receptor antagonista de IL-1

IL-2R – Receptor de interleucina 2

IPTG - Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

kDa – Peso molecular em quiloDaltons

kg – Quilogramas  
LB Broth – Caldo Luria Bertani Broth  
M – Molar  
MFI – Intensidade Média de Fluorescência  
mg – Miligramas  
mg/dL – Miligramas por decilitros  
MHC II – Complexo principal de histocompatibilidade de classe II  
MiliQ – Água ultrapura  
mL – Mililitros  
mm – Milímetros  
mM – Milimolar  
mmol/L – Milimolar por litro  
NaCl – Cloreto de sódio  
ng/mL – Nanogramas por mililitros  
NK – *Natural killer*  
nm – Nanômetros  
NO – Óxido nítrico  
PAMPs – Padrões Moleculares Associados a Patógenos  
PBS – Tampão fosfato-salino  
PBS-T – PBS-Tween 20  
PBS-TM – PBS-Tween 20 com Molico  
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase  
pET28a-rBlo t 5 – Vetor de expressão pET28a com o construto do rBlo t 5  
PMSF – Phenylmethanesulfonyl fluoride  
rBlo t 5 – Alérgeno recombinante de Blo t 5  
rBLOT5 – Grupo experimental expostos à rBlo t 5 e não treinados  
rBLOT5-TA – Grupo experimental expostos à rBlo t 5 e treinados  
SDS-PAGE – Gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio  
SOCS3 – *Suppressor of cytokine signaling 3*  
SR – Sistema respiratório  
TA – Grupo experimental não expostos à rBlo t 5 e treinados  
TBM – Teste de Broncoprovocação com Metacolina  
TGF- $\beta$  - Fator de transformação do crescimento beta

Th – T *helper*

Th1 – T *helper* tipo 1

Th2 – T *helper* tipo 2

Th17 – T *helper* tipo 17

TLRs – Receptores do tipo *Toll-like*

TMB – 3,3',5,5' – tetrametilbenzidina

TNF – Fator de necrose tumoral

TPC – Teste Progressivo de Carga

Treg – T reguladoras

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	16
1.1 Sistema respiratório .....	16
1.2 Ácaros da poeira domiciliar .....	23
1.3 Exercício físico e resposta imune.....	26
2 JUSTIFICATIVA .....	31
3 HIPÓTESES.....	32
4 OBJETIVOS .....	33
4.1 Objetivo geral .....	33
4.2 Objetivos específicos .....	33
5 MATERIAL E MÉTODOS .....	34
5.1 Produção do alérgeno recombinante Blo t 5 .....	34
5.2 Animais .....	39
5.3 Protocolo de exposição ao alérgeno rBlo t 5.....	39
5.4 Protocolo de treinamento .....	40
5.5 Mensuração dos níveis de lactato sanguíneo .....	42
5.6 Análise da função respiratória.....	43
5.7 Coleta e processamento do lavado broncoalveolar .....	44
5.8 Detecção de anticorpos no BALF.....	44
5.9 Detecção de citocinas no BALF .....	46
5.10 Análise estatística .....	47
6 RESULTADOS .....	48
6.1 Influência da carga de treinamento no condicionamento físico dos camundongos .....	48
6.2 Influência da natação nos níveis de lactato plasmáticos.....	49
6.3 Influência da natação nas alterações da função pulmonar induzidas pela inflamação.....	49
6.4 Influência da natação sobre a hiperreatividade das vias aéreas.....	52
6.5 Influência da natação no infiltrado celular nos pulmões.....	53
6.6 Influência da natação sobre a produção de anticorpos específicos para rBlo t 5.....	55
6.7 Influência da natação sobre a imunomodulação de citocinas no BALF .....	57

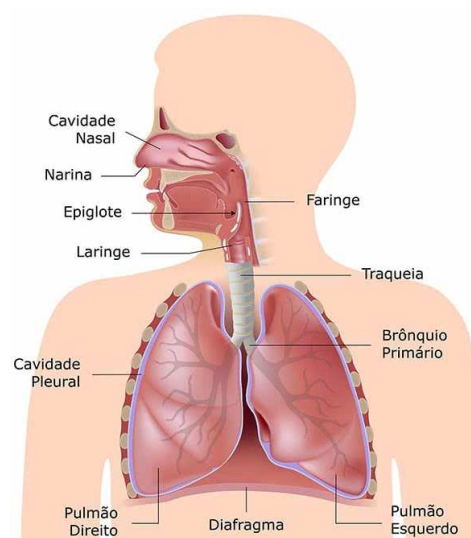
7 DISCUSSÃO .....	59
8 CONCLUSÃO.....	65
REFERÊNCIAS.....	66
ANEXO.....	76
Aprovação da Comissão de Ética na Utilização de Animais .....	76

## 1 INTRODUÇÃO

Para o entendimento dos dados descritos nesta dissertação se faz necessário o entendimento de alguns aspectos relacionados a composição e função do sistema respiratório, da fisiologia e da imunopatologia respiratória, em particular a pulmonar e da importância dos ácaros da poeira domiciliar quanto à sua capacidade de induzir doenças neste sistema, assim como a capacidade imunomodulatória promovida pelo exercício sobre o processo inflamatório.

### 1.1 SISTEMA RESPIRATÓRIO

Classicamente, o sistema respiratório (SR) é dividido em vias aéreas superiores e vias aéreas inferiores. As vias aéreas superiores são formadas por órgãos que se situam externamente à caixa torácica como o nariz externo, a cavidade nasal, a faringe e a laringe. Já as vias aéreas inferiores são constituídas pelos órgãos localizados internamente a caixa torácica como a traqueia, os brônquios, os bronquíolos, os alvéolos pulmonares e os pulmões (LOWE e ANDERSON, 2015), como representado na Figura 1.



**Figura 1 – Sistema respiratório humano.** O sistema respiratório é constituído pelo nariz, cavidade nasal, faringe, laringe, traqueia, brônquios e pulmões. Disponível em: <http://www.anatomiadocorpo.com/sistema-respiratorio/>



Na espécie humana o SR é fundamental para sua sobrevivência, sendo responsável pelo mecanismo de troca gasosa (hematose) com o ar atmosférico, processo realizado nos alvéolos pulmonares, para garantir que a concentração de oxigênio seja mantida no sangue e a retirada do dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), dejetado do metabolismo celular, do sangue para o exterior. O oxigênio é o principal combustível no processo químico onde ocorre a queima da glicose oriunda dos alimentos, transformando-a em energia para as tarefas do dia-a-dia, e além da hematose, o SR auxilia na regulação da temperatura corporal, na manutenção do pH do sangue, além de estar envolvido na fala e no olfato (LEVITZKY, 2008; HSIA *et al.*, 2013; PATWA e SHAH, 2015).

#### 1.1.1 FISILOGIA PULMONAR

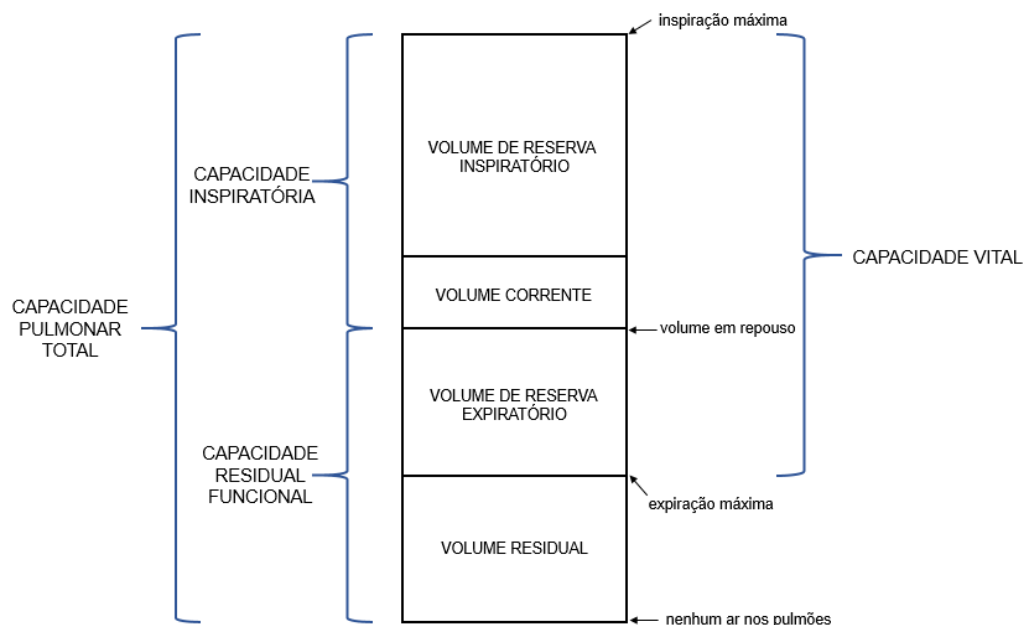
A mecânica respiratória desde a incursão do ar até a hematose é dependente da interação entre órgãos e mecanismos específicos. Os pulmões não são capazes de se insuflar para entrada do ar, sendo dependentes das forças dos músculos da respiração que diferentemente da musculatura cardíaca não se contraem espontaneamente. Cada incursão respiratória é desencadeada no cérebro, nos grupos de neurônios localizados no bulbo, que envia uma mensagem eferente à musculatura inspiratória (diafragma e intercostais externos) para início da insuflação pulmonar, desde que a caixa torácica esteja intacta, sendo capaz de expandir-se para que o ar penetre no SR através do nariz ou da boca (SHARMA e GOODWIN, 2006; LEVITZKY, 2008; KLING, 2011).

O ar que entra pelo nariz é filtrado, aquecido até a temperatura corporal e umedecido nas conchas nasais, onde entra em contato com a primeira linha de defesa deste sistema, penetrando nas vias respiratórias pela nasofaringe, passando pela glote e laringe até chegar à árvore brônquica. Após passar pelas vias aéreas condutoras, o ar inspirado chega aos alvéolos onde entra em contato com o sangue venoso misto nos capilares pulmonares participando da hematose. O ar que entra pela boca, penetra pela orofaringe e segue o caminho após a passagem pela glote, conforme descrito para o ar inalado pelo nariz (SHARMA e GOODWIN, 2006; LEVITZKY, 2008; KLING, 2011).

A superfície alveolar possui uma composição especializada com o intuito de permitir a hematose. Ela é constituída principalmente por uma fina camada de células epiteliais escamosas, as células alveolares tipo I, entre as quais estão entremeadas as células alveolares cuboides tipo II mais volumosas, responsáveis pela produção de uma camada líquida que reveste os alvéolos e permitem as trocas gasosas. Além destas células, existem os macrófagos alveolares fagocíticos móveis, que patrulham a superfície alveolar e fagocitam as partículas inspiradas que não ficaram retidas nos cílios presentes em diversas partes do SR (OCHS *et al.*, 2004; LEVITZKY, 2008).

Após a hematose, os músculos responsáveis pela expiração (abdominais e intercostais internos) são ativados via sistema nervoso central promovendo a expiração ativa, onde o ar flui para fora dos alvéolos até que a pressão alveolar entre em equilíbrio com a pressão atmosférica (LEVITZKY, 2008).

O volume de ar que entra e sai dos pulmões é dependente da mecânica respiratória, da musculatura envolvida no processo, do tamanho dos pulmões, do peso do indivíduo e de condições fisiológicas normais e patológicas. Existem quatro volumes pulmonares padronizados e quatro capacidades pulmonares padronizadas, que consistem em dois ou mais volumes padronizados em combinação (BARRETO, 2002; LEVITZKY, 2008), como mostra a Figura 2.



**Figura 2 – Volumes e capacidades pulmonares padronizados.** Adaptado de Levitzky (2008).

O volume corrente é o volume de ar que entra ou sai pelo nariz ou pela boca durante uma incursão respiratória, já o volume residual é o volume de gás deixado nos pulmões após uma expiração máxima forçada e o volume de reserva expiratório é o volume de gás que é expelido pelos pulmões durante uma expiração forçada máxima que começa no final de uma expiração corrente normal, enquanto que o volume de reserva inspiratório é o volume de gás que é inalado pelos pulmões durante uma inspiração forçada máxima que começa no final de uma inspiração corrente normal (BARRETO, 2002; LEVITZKY, 2008).

Em relação as capacidades pulmonares padronizadas, a capacidade residual funcional refere-se ao volume de gás que permanece nos pulmões no final de uma expiração corrente normal e a capacidade inspiratória é referente ao volume de ar que é inalado para dentro dos pulmões durante um esforço inspiratório máximo que começa no final de uma expiração corrente normal, já a capacidade pulmonar total é o volume de ar nos pulmões após um esforço inspiratório máximo, enquanto que a capacidade vital é o volume de ar expelido pelos pulmões durante uma expiração forçada máxima que começa após uma expiração forçada máxima (BARRETO, 2002; LEVITZKY, 2008).

Considerando que o comportamento mecânico do pulmão é baseado em suas propriedades elásticas e em seu volume, a mensuração dos volumes pulmonares oferece informações clinicamente importantes uma vez que muitos estados patológicos podem alterar volumes pulmonares específicos ou suas relações mútuas, sendo a técnica da espirometria a mais utilizada para a determinação destes volumes (BARRETO, 2002; DE CASTRO PEREIRA *et al.*, 2007). A espirometria (do latim *spirare* = respirar + *metrum* = medida) é a medida do ar que entra e sai dos pulmões. Pode ser realizada durante respiração lenta ou durante manobras expiratórias forçadas, sendo um teste que permite o diagnóstico e a quantificação dos distúrbios ventilatórios (DE CASTRO PEREIRA *et al.*, 1996; RUBIN, 2005; DE CASTRO PEREIRA *et al.*, 2007).

### 1.1.2 MECANISMOS DE DEFESA PULMONARES

Todos os dias, cerca de 10.000 litros de ar são inspirados e penetram as vias aéreas até chegar nos alvéolos pulmonares, porém nesse ar podem conter alguns antígenos como poeira e ácaros da poeira domiciliar, pólenes, esporos fúngicos, cinzas, microrganismos como vírus e bactérias, substâncias químicas e gases tóxicos. Os antígenos inalados podem se depositar no trato respiratório como resultado da impactação ou sedimentação provenientes da passagem do ar pelas vias aéreas. Assim, a estrutura das vias aéreas e sua segmentação progressiva, a filtração do ar e o transporte mucociliar compõem os principais mecanismos de defesa mecânicos do SR. Enquanto que a interação entre os macrófagos residentes do tecido pulmonar e as células imunes efetoras compõem, predominantemente, os mecanismos imunológicos de defesa pulmonar (LEVITZKY, 2008; LOPES *et al.*, 2010).

Dependendo da localização, do tamanho e da composição destas partículas podem haver diferentes estímulos para limpeza e eliminação destes antígenos, como por exemplo, materiais irritantes grandes ou o acúmulo de secreções nas vias aéreas altas são removidos rapidamente com reflexo de tosse ou espirro, uma vez que as partículas menores podem ser depositadas na superfície do trato respiratório desencadeando uma resposta mucociliar e das células de defesa do sistema imune (LEVITZKY, 2008; LOPES *et al.*, 2010).

O mecanismo de defesa mecânico, inicia-se nas narinas que impedem, através dos cílios e do turbilhonamento do ar, a passagem dos antígenos inalados, seguidos do fechamento da glote. Quando essa atitude defensiva mais imediata do SR não é capaz de reter estas partículas, tornam-se importantes outros meios, incluindo o transporte mucociliar, já que todo o trato respiratório, desde as vias aéreas superiores até os bronquíolos terminais, é revestido por um epitélio ciliar coberto de muco. O material que se deposita no muco é deslocado continuamente para cima na direção da faringe, ao alcançá-la ele é deglutido, expectorado (tosse ou espirro) ou removido quando o indivíduo assoa o nariz (LEVITZKY, 2008; LOPES *et al.*, 2010).

A defesa imunológica do SR é composta por diversos fatores e estímulos divididos entre a resposta imune inata e resposta imune adquirida (ou adaptativa). Os principais componentes da imunidade inata são as células fagocíticas (neutrófilos e macrófagos), as células *natural killer* (NK) e as células dentríticas (HALLSTRAND *et al.*, 2014; WHITSETT e ALENGHAT, 2015). Estas células atuam no reconhecimento dos Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) e Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMPs) através dos receptores *Toll-like* (TLRs) presentes em

suas superfícies que associadas a produção de mucinas antimicrobianas e o movimento ciliar auxiliam na defesa do SR através da limpeza/eliminação (*clearance*) do ambiente pulmonar.

Apesar deste mecanismo inato ser bastante eficiente, alguns antígenos e também microrganismos conseguem ultrapassar ou mesmo resistir aos mecanismos de defesa natural, e a proteção do SR é, criticamente, dependente das respostas imunológicas adaptativas.

A resposta imune adaptativa é dividida em imunidade humoral e celular, no qual cada uma delas desempenha diferentes funções desde a proliferação e diferenciação celular culminando na produção de anticorpos ou em células imunes efectoras. Além disso, este perfil de resposta imunológica tem uma incrível capacidade para distinguir os diferentes patógenos e moléculas, incluindo até mesmo aqueles que apresentam grande semelhança sendo, por isso, sendo também chamada de imunidade específica (CURTIS, 2005; IWASAKI e MEDZHITOV, 2015).

A resposta imune celular é mediada pela ação das células T associada a produção de citocinas, que são moléculas proteicas, glicosiladas ou não, que enviam diversos sinais estimulatórios, modulatórios ou mesmo inibitórios para as diferentes células do sistema imunológico (TURNER *et al.*, 2014). As células T auxiliares CD4<sup>+</sup> (T *helper* - Th) ajudam os macrófagos a eliminar antígenos fagocitados e auxiliam as células B a produzirem anticorpos, sofrendo diferenciação de acordo com o microambiente pulmonar, dando origem a respostas Th1, Th2, T regulatórias (Treg), entre outras (LOPES *et al.*, 2010).

A resposta Th1 está relacionada com a defesa contra microrganismos intracelulares e vírus, enquanto a resposta Th2 é mais efetiva contra os helmintos e bactérias extracelulares. Além disso, as células Treg produzem a interleucina-10 (IL-10) e/ou o Fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ) e estão envolvidas na modulação da resposta imune, impedindo ou diminuindo as consequências das reações de hipersensibilidade e das doenças autoimunes (MILLS e MCGUIRK, 2004). Outrossim, as células T também podem exercer sua função através da citotoxicidade mediada por células T CD8<sup>+</sup> ou através da secreção de citocinas que vão ativar macrófagos para destruir os agentes intracelulares (LOPES *et al.*, 2010).

As principais citocinas envolvidas na resposta Th1 são o Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), o Fator de necrose tumoral (TNF), a IL-2, IL-6 e IL-12, enquanto que as citocinas envolvidas na resposta Th2 são a IL-4, IL-5 e IL-13.

O IFN- $\gamma$  é responsável pela limitação da propagação de infecções virais e das parasitoses, aumenta a expressão dos genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I e II, e em monócitos e macrófagos estimula a produção de receptores de alta afinidade (Fc $\gamma$ RI) para imunoglobulinas G (IgG), além de induzir a síntese de TNF por estas células. O TNF é a principal citocina com atividade biológica de citólise e citoestase em diferentes linhagens neoplásicas, tendo ação antitumoral bem definida (DINARELLO, 2007).

Já a IL-2 é o principal fator estimulador de células T, sendo um fator de crescimento e ativação para todas as subpopulações de linfócitos T, induzindo a expansão clonal de células T ativadas. A IL-6 é uma citocina pleiotrópica que influencia respostas imune antígeno-específicas e reações inflamatórias, sendo um dos maiores mediadores da fase aguda da inflamação. Em adição, a IL-12 possui importante função em estimular células NK, além de estar envolvida na expressão de fatores transcricionais relacionados com o desenvolvimento de células Th1 e concomitante inibição do desenvolvimento de fatores transcricionais relacionados com as células Th2 (DINARELLO, 2007; TURNER *et al.*, 2014).

Em relação as citocinas de perfil Th2, a IL-4 tem como função determinar o perfil da resposta imune em Th2, induzindo a diferenciação e proliferação de células B, aumentando a expressão de MHC II nas células apresentadoras de antígenos, além de aumentar a expressão de receptores de alta afinidade para IgE (Fc $\epsilon$ RI) em mastócitos e basófilos. Já a IL-5 possui a função de estimular o crescimento e diferenciação de eosinófilos. Por fim, a IL-13 inibe a atividade quimiotática e fagocitária de monócitos/macrófagos; reduz expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12), diminuindo a resposta inflamatória (DINARELLO, 2007; TURNER *et al.*, 2014).

Os mecanismos efetores desencadeados pela resposta imune humoral para combater os antígenos que entram no SR através do ar incluem a neutralização antigênica, a opsonização, a fagocitose e a ativação da via clássica do complemento (LOPES *et al.*, 2010). A neutralização é mediada pelas isoformas de IgG e IgA de alta afinidade, que requer sensibilização prévia, a opsonização é feita por algumas isoformas de IgG, enquanto que a ativação do complemento é mediada pelos anticorpos da classe IgM e subclasse de IgG, principalmente a IgG1 humana (SANO e KUROKI, 2005).

O muco que reveste as vias aéreas superiores contém grandes quantidades de anticorpos da classe IgA, conferindo proteção a infecções virais e, provavelmente, dificultando a aderência bacteriana à mucosa. Já nas vias aéreas inferiores, anticorpos das classes IgG e IgA apresentam-se em menores quantidades, fornecendo auxílio à opsonização não imunológica dos pneumócitos e consequentemente a fagocitose por macrófagos alveolares e neutrófilos (TWIGG, 2005).

Alguns antígenos presentes no ar são capazes de promover a sensibilização alérgica em indivíduos geneticamente predispostos, nestes casos, encontra-se grandes quantidades de IgE antígeno-específico promovendo a sensibilização de mastócitos que ao degranular, liberam aminas vasoativas causando os sintomas iniciais das crises alérgicas respiratórias como coriza, produção de muco e hiperreatividade das vias aéreas (GAUTRIN *et al.*, 2000; PATELIS *et al.*, 2014).

Com o intuito de entender melhor como funciona o processo inflamatório pulmonar, os modelos em animais experimentais tornaram-se uma ferramenta valiosa na pesquisa, pois descrevem a fisiopatologia do processo, mostrando a ação de vários mecanismos imunológicos envolvidos, como a produção de citocinas, quimiocinas, imunoglobulinas, receptores celulares, entre outros mediadores específicos dessas doenças, assim como os mecanismos envolvidos no tratamento destas patologias (BARRIOS, 2008; MOORE e HOGABOAM, 2008; BARON *et al.*, 2012).

## 1.2 ÁCAROS DA POEIRA DOMICILIAR

Dentro do contexto de inflamação pulmonar induzida por antígenos presentes no ar inalado durante a respiração, deve ser dada especial atenção para os ácaros da poeira domiciliar, uma vez que as proteínas que compõe o corpo e as fezes dos ácaros são capazes de induzir uma resposta imune e, em indivíduos predispostos geneticamente, induzir doenças alérgicas. O Brasil, por ser um país tropical, fornece meios propícios para o crescimento e proliferação destas espécies, pois apresenta temperatura em torno de 28 a 30°C e umidade relativa do ar média de 82% (BINOTTI *et al.*, 2001; CHENG YI *et al.*, 2006).

Os ácaros que vivem na poeira são microscópicos (0,1 a 0,6 mm de comprimento), de corpo ovoide, com 8 patas articuláveis e hábitos alimentares que consistem na alimentação de restos de pele humana e detritos orgânicos presentes no ambiente (BOQUETE *et al.*, 2006; CLARKE *et al.*, 2015; MASON *et al.*, 2015). Entre as espécies de ácaros que habitam essencialmente a poeira estão as espécies *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* e *Blomia tropicalis* (GAO *et al.*, 2007; TAN *et al.*, 2012), sendo a espécie *Blomia tropicalis* a mais prevalente entre elas no Brasil (CARVALHO *et al.*, 2013).

#### 1.2.1 *BLOMIA TROPICALIS* E SEUS ALÉRGENOS

Os ácaros da espécie *Blomia tropicalis* foram descritos pela primeira vez em 1973, com tamanho entre 230 e 365 µm e forma globular, após um estudo morfofuncional realizado por Van Bronswijk e colaboradores. Neste estudo, eles definiram sua classificação taxonômica como reino Metazoa, filo Arthropoda, classe Arachnida, Subclasse Acari, ordem Astigmata, família Echimyopodidae, gênero *Blomia* e espécie *Blomia tropicalis* (YAN CHUA *et al.*, 2007).

Inicialmente esta espécie de ácaro foi classificada como ácaros de armazenagem, pois eram encontrados em fazendas, porém com o passar dos anos eles foram sendo encontrados dentro do ambiente doméstico, na poeira e alojados em locais como colchões, cortinas, bichos de pelúcia, carros, entre outros locais onde é possível a deposição de poeira (BOQUETE *et al.*, 2006; CLARKE *et al.*, 2015; MASON *et al.*, 2015). Com isso, ela tem se tornado uma espécie de importância médica cuja relevância se baseia na sua capacidade de interagir com o sistema imune desencadeando respostas inflamatórias levando ao desenvolvimento, em casos de exposição contínua, de doenças alérgicas (THOMAS *et al.*, 2007).

Diversos estudos realizados pelo mundo comprovaram que existe uma grande quantidade de indivíduos sensibilizados (atópicos) a alérgenos de *Blomia tropicalis*, sendo que a maioria deles apresentavam algum processo inflamatório proveniente desta atopia, desde asma, rinite e dermatite atópica (GELLER, 2000; MORI *et al.*, 2001; PIRES *et al.*, 2002; TRAKULTIVAKORN e NUGLOR, 2002; MANOLIO *et al.*, 2003; MARTINEZ JIMENEZ *et al.*, 2010; SADE *et al.*, 2010; ALVAREZ-CASTELLO *et*



*al.*, 2012; JULIA-SERDA *et al.*, 2012; JEEVARATHNUM *et al.*, 2015; PEFURA-YONE *et al.*, 2015), demonstrando a relevância destes alérgenos, uma vez que antígenos derivados do ácaro *Blomia tropicalis* como a Blo t 5 também foi encontrada contaminando alimentos, como cereais (HUSSEIN e ELAWAMY, 2015).

De acordo com o Subcomitê de nomenclatura de alérgenos (WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-committee), banco de dados aprovado pela Organização Mundial de Saúde e pela União Internacional de Sociedades de Imunologia, existem 14 alérgenos da espécie *Blomia tropicalis* cadastrados (WHO/IUIS). Entre eles existem alguns com funções bioquímicas bem definidas, como o Blo t 1 que apresenta função de cisteína protease, o Blo t 3 cuja função é de uma tripsina, o Blo t 19 que apresenta função homóloga a um peptídeo antimicrobiano, enquanto alguns deles, como o Blo t 5 e o Blo t 21, não apresentam ainda essas informações por falta de estudos que comprovem suas funções bioquímicas.

Contudo, o alérgeno Blo t 5 têm sido o mais estudado e bem caracterizado na literatura (KUO *et al.*, 2003; YI *et al.*, 2004; CHAN *et al.*, 2008; NAIK *et al.*, 2008), principalmente após o advento das técnicas de biologia molecular que auxiliaram na caracterização morfológica e na produção destes alérgenos em laboratórios de pesquisa, através da tecnologia de proteínas recombinantes. Estudos demonstraram que rBlo t 5 é reconhecido pela IgE de 12 a 98% dos pacientes com alergia ou asma em todo o mundo (SHEK *et al.*, 2010; KIDON *et al.*, 2011; ZAKZUK *et al.*, 2013) e confere maior especificidade aos ensaios de sorodiagnóstico do que o extrato de ácaro inteiro, mostrando baixa reatividade cruzada com *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Ascaris lumbricoides* (CARVALHO *et al.*, 2013). No entanto, não existem na literatura estudos com modelos experimentais que induziram a inflamação pulmonar utilizando o rBlo t 5, para entender seus efeitos imunomoduladores *in vivo*.

Diante da prevalência mundial da sensibilização aos antígenos de *Blomia tropicalis* e do seu potencial em induzir um perfil inflamatório pulmonar que, sob exacerbação, pode levar a danos irreversíveis do SR, a busca de formas baratas e não farmacológicas de tratamentos para patologias inflamatórias respiratórias tem aumentado em grande escala, a maioria delas por indicação profissional, sendo o exercício físico aeróbico o mais indicado devido a sua capacidade de modular a resposta imune (TERRA *et al.*, 2012).

### 1.3 EXERCÍCIO FÍSICO E RESPOSTA IMUNE

As respostas promovidas pelo exercício, tanto em processos inflamatórios pulmonares agudos como crônicos, afetam diversos componentes do sistema imune, levando em consideração a intensidade, duração e a frequência do exercício, onde o exercício de intensidade moderada, em especial, estimulam parâmetros relacionados à imunidade celular e humoral, levando ao controle dos processos inflamatórios agudos, promovidos por infecções, e crônicos, como em doenças inflamatórias crônicas (PRESTES *et al.*, 2010; TERRA *et al.*, 2012). Contudo, o exercício pode, paradoxalmente, tanto promover melhora como debilitar a resposta imune; dependendo do tipo de exercício e do nível de aptidão física de cada indivíduo (MINETTO *et al.*, 2005; PRESTES *et al.*, 2010).

O exercício físico influencia na resposta imune de diversas maneiras, sendo suas principais ações o recrutamento e atividade funcional das células da resposta imune inata assim como na resposta imune adaptativa, envolvendo citotoxicidade de células T CD8+ e produção de anticorpos pelas células B (BIGLEY e SIMPSON, 2015; PEAKE *et al.*, 2015; CAMARGO HIZUME-KUNZLER *et al.*, 2017). Porém, pouco se sabe sobre a influência do exercício físico de moderada intensidade sobre os parâmetros imunes, especialmente no caso de que esta intensidade de exercício tem sido bastante praticada pela população em geral (SAXTON *et al.*, 2003; PEAKE *et al.*, 2015).

Além disso, existe uma diferença na modulação da resposta imune em relação aos efeitos agudos e crônicos promovidos pelo exercício. As alterações da resposta imune, temporárias, causadas por uma sessão de exercício são conhecidas como resposta aguda ao exercício, uma vez que as modificações provocadas no sistema imunológico em função da prática regular do exercício são conhecidas como resposta crônica ao exercício, sendo este último o foco de análise proposto para o estudo desta dissertação (ROSA *et al.*, 2002; DOS SANTOS *et al.*, 2011; FREITAS *et al.*, 2016).

#### 1.3.1 EXERCÍCIO FÍSICO E RESPOSTA DO SISTEMA IMUNE INATO E ADAPTATIVO

Na resposta imune celular, o exercício físico atua em diferentes células envolvidas na resposta imune inata, como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, células NK, e na resposta imune adaptativa, que envolve principalmente células T (CD4+ e CD8+) e células B e seus produtos (TERRA *et al.*, 2012).

Diversos elementos estão envolvidos no comportamento dos neutrófilos e na resposta imune ao exercício, como mediadores neuroendócrinos, liberação de esteroides, produção de citocinas e produção de radicais livres. A ativação da fibra muscular aumenta a liberação de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), levando à síntese de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF e IL-1 $\beta$ , que regulam a expressão de selectinas pelas células endoteliais, atraindo neutrófilos para a região, além de promover a degranulação de neutrófilos (BUTTERFIELD *et al.*, 2006; TERRA *et al.*, 2012).

Quanto aos macrófagos, os exercícios aeróbicos prolongados e extenuantes diminuem a expressão de receptores TLRs em sua superfície comprometendo a apresentação de antígenos e modulando o perfil de resposta Th1 pró-inflamatória. Esse efeito anti-inflamatório impede o dano tecidual causado pelos mediadores inflamatórios e reduz o risco de doenças inflamatórias crônicas, pois aumentam sua capacidade microbicida e a produção de citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF e óxido nítrico (NO) (GLEESON *et al.*, 2006; KIZAKI *et al.*, 2008).

As células dendríticas possuem uma importante função na apresentação de antígenos para células T, promovendo sua ativação e expansão clonal. O treinamento de moderada intensidade, durante um período de 5 semanas, é capaz de induzir um aumento na expressão de moléculas MHC II em células dendríticas e produção de citocinas, principalmente a IL-12, sugerindo a capacidade da influência do exercício sobre a modulação da resposta no sistema imune inato (CHIANG *et al.*, 2007).

Já as células NK, linfócitos com citotoxicidade natural para células infectadas por vírus e células tumorais, apresentam grande sensibilidade ao estresse promovido pelo exercício físico, uma vez que a adrenalina e as catecolaminas liberadas durante o treinamento contribuem para o recrutamento de células NK, a partir das paredes endoteliais para a circulação geral promovendo sua redistribuição do sangue periférico para os outros tecidos, sugerindo que a NK pode ser um potencial elo entre a atividade física regular e o estado de saúde geral (TIMMONS e CIESLAK, 2008; BIGLEY e SIMPSON, 2015).

Outro importante perfil celular que sofre influência do exercício físico são os linfócitos. O número de linfócitos começa a diminuir cinco minutos após o término do

exercício, provavelmente devido ao efeito persistente do cortisol liberado durante o treinamento associado à apoptose celular, uma vez que um percentual maior de apoptose de linfócitos em humanos tem sido descrito imediatamente após a realização de exercícios de alta intensidade (HSU *et al.*, 2002; STEENBERG *et al.*, 2002; NAVALTA *et al.*, 2007).

Alguns estudos demonstraram que o número absoluto de linfócitos T e de células T CD4+ e a expressão do receptor de IL-2 (IL-2R) em células T aumentou em indivíduos submetidos a exercícios de intensidade moderada (KOHUT e SENCHINA, 2004; SHIMIZU *et al.*, 2008; TERRA *et al.*, 2012). Outros estudos têm confirmado que o exercício físico de moderada intensidade é capaz de aumentar a citotoxicidade das células T CD8+, assim como interferir no *switch* (mudança) de classe de imunoglobulinas produzidas pelos linfócitos B (WOODS *et al.*, 2003; WITARD *et al.*, 2012).

### 1.3.2 EXERCÍCIO FÍSICO E PRODUÇÃO DE CITOCINAS

Vários autores têm relatado um aumento nas concentrações séricas de citocinas anti-inflamatórias após diferentes tipos de exercício, como o exercício de alta intensidade (SUZUKI *et al.*, 2003), exercício de resistência (HIROSE *et al.*, 2004; NIEMAN *et al.*, 2004), corridas do tipo *downhill* (MALM *et al.*, 2004), ciclismo intenso (TOFT *et al.*, 2002), corridas e ciclismo de resistência (NIEMAN *et al.*, 2004), e em modelos experimentais murinos de natação (AVILA *et al.*, 2015; BRUGGEMANN *et al.*, 2015). As principais citocinas anti-inflamatórias são IL-10 e TGF- $\beta$ , as quais podem, entre outras funções, inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1, IL-2, IL-12, IL-18, IFN- $\gamma$  e TNF (SUZUKI *et al.*, 2002; TOFT *et al.*, 2002; PETERSEN e PEDERSEN, 2005; SILVA e MACEDO, 2011).

Dentre as citocinas citadas, a IL-6 é uma citocina secretada particularmente durante a atividade física, sendo produzida pelo tecido muscular estriado esquelético, pelos leucócitos e células endoteliais e sua ação é pleiotrópica, sendo a sua atividade reguladora bastante importante na resposta de fase aguda no exercício físico. Ela estimula a síntese das citocinas anti-inflamatórias como o receptor antagonista de IL-

1 (IL-1ra) e IL-10, além do estímulo à liberação de receptores solúveis para TNF (MOLDOVEANU *et al.*, 2001; PETERSEN e PEDERSEN, 2005).

Já a IL-10 possui como função o bloqueio na apresentação de antígenos pelos macrófagos, a inibição na produção de IL-1 $\beta$ , TNF e quimiocinas pelos macrófagos e linfócitos e, conseqüentemente, a finalização da resposta inflamatória. Ela é considerada a principal citocina anti-inflamatória secretada em mamíferos, sendo capaz de ser estimulada por diversos mecanismos celulares e pelo exercício físico, através do aumento na produção de *Suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3) que promove a ativação celular via *forkhead box P3* (Foxp3) (PETERSEN e PEDERSEN, 2005; FLYNN *et al.*, 2007).

Outra citocina anti-inflamatória secretada após o exercício físico é a TGF- $\beta$ . Poucos estudos mensuraram sua produção e relação com atividade física, porém a citocina foi detectada em biopsias de músculo esquelético de atletas submetidos a exercícios de alta intensidade, cuja concentração estava elevada em intervalos de meses de treinamento (GUMUCIO, 2015; BOHM *et al.*, 2016).

O aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias durante o exercício possivelmente se dá para restringir reações pró-inflamatórias em resposta ao dano na musculatura esquelética causadas pelo exercício (TOFT *et al.*, 2002), como também para manutenção e melhora do processo inflamatório promovido por diferentes agentes (SUZUKI *et al.*, 2002; SILVA e MACEDO, 2011; PEAKE *et al.*, 2015).

### 1.3.3 EXERCÍCIO FÍSICO E RESPOSTA IMUNE HUMORAL

Durante um processo inflamatório existe o aumento da síntese de anticorpos que buscam inativar o agente causador, seja ele intra ou extracelular. Alguns estudos mostram o aumento dos anticorpos séricos após exercícios de alta intensidade, cuja explicação se baseia no fato de que o volume plasmático que se segue ao exercício é menor (POORTMANS, 1971).

Outra explicação para este padrão de aumento dos anticorpos seria decorrente do afluxo de proteínas do compartimento extra para o intravascular, representadas principalmente por linfa rica em anticorpos. Outro estudo relacionando IgA secretora e exercício mostrou comportamento diferente em relação às outras

imunoglobulinas, onde foi vista uma diminuição de até 50% dos valores basais em atletas de elite após esforço intenso, relacionando tal achado com maior incidência de infecções de vias aéreas superiores em atletas submetidos a grandes esforços (COSTA ROSA e VAISBERG, 2002).

Em modelos experimentais murinos como a asma, os autores encontraram uma diminuição dos níveis de IgE no soro dos animais submetidos a diferentes tipos de exercícios com alta intensidade de treinamento (BRUGGEMANN *et al.*, 2015; CAMARGO HIZUME-KUNZLER *et al.*, 2017), cuja explicação está associada aos níveis significativos de produção de IL-10 detectados, sendo ela uma citocina capaz de induzir o *switch* de classe de anticorpos em linfócitos B para IgG (IgG4 em humanos e IgG1 em camundongos), diminuindo as reações de hipersensibilidade do tipo I medida por anticorpos IgE.

## 2 JUSTIFICATIVA

Diante da alta taxa de sensibilização em países tropicais a alérgenos derivados de *Blomia tropicalis*, como o Blo t 5, e a complexidade do processo inflamatório promovido por este alérgeno, o uso de modelos experimentais para o estudo desse fenômeno são de grande valia para o entendimento desse complexo processo. Além disso, entender como o exercício físico aeróbico atua na atenuação deste processo inflamatório vem de encontro com a correta indicação do treinamento físico ideal para controle das doenças inflamatórias pulmonares e entendendo como esses mecanismos agem, vão corroborar para maior compreensão do controle do processo inflamatório induzido pelos exercícios físicos, os quais futuramente podem ser aplicados em pesquisas envolvendo seres humanos portadores de doenças pulmonares crônicas.

### 3 HIPÓTESES

Em relação à inflamação pulmonar ocasionada pela exposição experimental em camundongos ao alérgeno recombinante Blo t 5 e o emprego de exercícios físicos, temos como hipóteses:

H<sub>0</sub>: O condicionamento físico aeróbico, promovido pela natação em moderada intensidade, não produzirá nenhum efeito sobre a função pulmonar e resposta inflamatória das vias aéreas nos animais expostos ao alérgeno recombinante Blo t 5.

H<sub>1</sub>: O condicionamento físico aeróbico, promovido pela natação em moderada intensidade, promoverá efeitos benéficos sobre a função pulmonar e resposta inflamatória das vias aéreas nos animais expostos ao alérgeno recombinante Blo t 5.



## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos crônicos promovidos pela natação de moderada intensidade sobre parâmetros morfofuncionais e imunológicos em um modelo murino de inflamação pulmonar induzida pelo alérgeno recombinante Blo t 5.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar o condicionamento físico dos camundongos submetidos ou não à natação;
- 2) Caracterizar a função pulmonar e a hiperreatividade das vias aéreas dos camundongos submetidos ou não à natação;
- 3) Realizar a contagem total e diferencial de células no lavado broncoalveolar (BALF) dos camundongos dos diferentes grupos;
- 4) Detectar os níveis de anticorpos (IgE, IgG e suas subclasses IgG1 e IgG2a) específicos ao alérgeno rBlo t 5 no BALF dos camundongos dos diferentes grupos;
- 5) Comparar os níveis de citocinas (IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- $\gamma$  e TNF) nas amostras do BALF dos camundongos dos diferentes grupos.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 PRODUÇÃO DO ALÉRGENO RECOMBINANTE Blo t 5

A produção, expressão e purificação do alérgeno recombinante Blo t 5 (rBlo t 5) foi realizada seguindo os passos descritos por CARVALHO *et al.* (2013), conforme descrito a seguir.

#### 5.1.1 SELEÇÃO DA SEQUÊNCIA GÊNICA DO ALÉRGENO BLO T 5

A seleção da sequência gênica codificante do alérgeno Blo t 5, proveniente do ácaro da poeira domiciliar *Blomia tropicalis*, foi realizada utilizando os dados armazenados nos bancos de genes do Pubmed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), cujo código de acesso é U59102. O gene do alérgeno em questão apresenta uma sequência de 537 pares de bases e codifica um produto proteico de 134 aminoácidos, como mostra a Figura 3, com destaque na cor vermelha a sequência codificante utilizada para produção do construto recombinante.

```

AAAACACTCACAAATCCACAACTCAAACAACAATGAAGTTCGCCATCGTTCTTATTGCCTGCTTTGCCGCTTCGGT
TTTGGCTCAAGAGCACAAGCCAAAGAAGGATGATTTCCGAAACGAATTCGATCACTTGTTGATCGAACAGGCAAA
CCATGCTATCGAAAAGGGAGAACATCAATTGCTTTACTTGCAACACCAACTCGACGAATTGAATGAAAACAAGAGC
AAGGAATTGCAAGAGAAAATCATTGAGAACTTGATGTTGTTTGCGCCATGATCGAAGGAGCCCAAGGAGCTTTG
GAACGTGAATTGAAGCGAACTGATCTTAACATTTTGAACGATTCAACTACGAAGAGGCTCAAACCTCAGCAAGA
TCTTGCTTAAGGATTTGAAGGAAACCGAACAAAAAGTGAAGGATTTCAAACCCAATAAAATTTAGAATTGTACAAT
TTTACATTTTGTATGATTAATGTCAATAAATGTTCAATAAATAAATTCATTTTAACTATAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

**Figura 3 – Sequência gênica do alérgeno Blo t 5.** A figura mostra a sequência gênica do alérgeno Blo t 5 do ácaro *Blomia tropicalis* (GenBank: U59102) composta por 537 pb, cujas sequências nas cores vermelhas destacam os 134 aminoácidos que codificam o gene utilizado na produção do construto recombinante.

#### 5.1.2 CONSTRUÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO PET28A

Após a seleção da sequência gênica codificante do alérgeno Blo t 5, foram desenhados pares de primers (*forward*: CCC GGA TCC ATG AAG TTC GCC ATC GTTC; e *reverse*: GGG CTC GAG TTA TTG GGT TTG AAT ATC), que foram

produzidos pela empresa GenScript (New Jersey, E.U.A.) e adquiridos pelo Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica da UFU.

Então, os primers foram submetidos à amplificação gênica através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), as sequências sintéticas foram ligadas ao vetor pUC57 e sub-clonadas no vetor de expressão pET28a (Millipore, Massachusetts, U.S.A.), utilizando as enzimas de restrição BamHI/XhoI. Este processo foi realizado com o intuito de inserir nos construtos uma cauda de histidina, aminoácido com afinidade pela molécula de níquel, para auxiliar no processo de purificação do alérgeno recombinante.

### 5.1.3 PRODUÇÃO DE CÉLULAS BACTERIANAS COMPETENTES

A produção de células bacterianas competentes para transformação e posteriormente expressão do alérgeno recombinante rBlo t 5 foi realizada com bactérias *Escherichia coli*. Para transformação, foi realizado um pré-inóculo de *E. coli* da cepa BL21 (Novagen, E.U.A.), previamente crescida por 18 horas, em meio de crescimento bacteriano Caldo Luria Bertani Broth (LB Broth) contendo 10 g/L de tryptone, 5 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de cloreto de sódio (NaCl) (Sigma-Aldrich, E.U.A.), sendo incubadas *overnight* em estufa (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

Após incubação, 250 µL do pré-inóculo foram transferidos para 25 mL de meio LB Broth, mantidos em incubação sob agitação (180 rpm, 37°C) até atingirem a densidade óptica (DO) 0.3, mensurada no espectrofotômetro (BioTek, E.U.A.) sob comprimento de onda de 600 nm. Então, os tubos foram centrifugados (3000xg por 15 minutos), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi ressuspensão em 5 mL de solução de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) a 50 mM sob suave agitação do tubo.

A suspensão celular formada foi novamente centrifugada nas condições descritas, o sobrenadante descartado e o *pellet* formado foi colocado no gelo e ressuspensão lentamente em 500 µL da solução de CaCl<sub>2</sub> a 50 mM, seguido do acréscimo de 250 µL de meio LB Broth. Após este processo, as células já são consideradas competentes para o processo de transformação utilizando o vetor de expressão pET28a com o construto do rBlo t 5 (pET28a-rBlo t 5).

#### 5.1.4 REAÇÃO DE TRANSFORMAÇÃO DA *E. COLI*/BL21 COM PET28A-RBLO T 5

Para transformação das bactérias competentes foi realizada a incubação de 20 µL da suspensão celular, cuja DO lida no espectrofotômetro fosse igual 0.6, com 20 ng do vetor de expressão pET28a-rBlo t 5, no gelo durante 5 minutos. Após esse período foi realizado o choque térmico nas suspensões, que consiste em manter as suspensões bacterianas durante 3 minutos em banho-maria à 42°C e subsequente banho de gelo por 10 minutos, para afastamento das células da membrana externa da bactéria com o intuito de internalizar o vetor de expressão.

Após o choque térmico, foram adicionadas as suspensões 250 µL de meio SOC (0,5% de extrato de levedura, 2% de tryptone, glicose a 20 mM, NaCl a 10 mM, cloreto de potássio a 2,5 mM, cloreto de magnésio a 10 mM e sulfato de magnésio a 10 mM) (Quiagen, E.U.A.) e a reação foi incubada durante 1 hora sob agitação orbital (180 rpm, 37°C).

Ao término do período de incubação, diferentes volumes da suspensão bacteriana (10 µL, 15 µL, 25 µL, 50 µL, 150 µL) foram distribuídos em placas de Petri contendo meio de crescimento bacteriano LB Ágar (10 g/L de peptone 140, 5 g/L de extrato de leveduras, 5 g/L de NaCl e 12 g/L de Ágar) e 10 µg/mL de Ampicilina (Sigma-Aldrich, E.U.A.), e incubadas em estufa (18 horas à 37°C). As colônias transformadas foram aquelas capazes de crescerem nesse meio seletivo, assim, elas foram coletadas e armazenadas à -20°C em meio LB Broth contendo 10 µg/mL de Ampicilina e glicerol (v/v).

#### 5.1.5 INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DO ALÉRGENO RBLO T 5 EM *E. COLI*/BL21

Para indução da expressão do alérgeno recombinante rBlo t 5 foram utilizadas as bactérias transformadas. Após descongelamento da bactéria transformada, foi realizado um pré-inóculo onde foram transferidos 350 µL de bactérias competentes para um erlenmeyer com 100 mL de meio LB Broth e kanamicina (50 mg/mL), o qual foi mantido *overnight* na estufa (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

No dia seguinte, foi realizada a leitura da DO da suspensão pelo espectrofotômetro (DO = 0,4), o volume total do erlenmeyer foi transferido para outro erlenmeyer contendo 1 L de meio LB Broth e kanamicina, e esta nova suspensão foi mantida sob agitação (180 rpm, 37°C) por 18 horas, onde atingiu a DO de 0,6 indicada para o processo de indução.

Antes da indução, uma amostra de 10 mL foi coletada e armazenada à -20°C, servindo para futuras análises eletroforéticas como controle negativo do processo de indução. Então, foram adicionados à suspensão Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) a 0,2 mM (Sigma-Aldrich, E.U.A.) e incubou-se por 5 horas sobre agitação (180 rpm, 37°C).

Passadas as 5 horas, uma amostra de 10 mL foi coletada e armazenada à -20°C, servindo para futuras análises eletroforéticas como controle positivo do processo de indução. Continuamente, a suspensão foi dividida em tubos falcon de 50 mL e centrifugadas (3000xg por 10 minutos), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* contendo as bactérias armazenado à -80°C até o processo de purificação do alérgeno recombinante rBlo t 5.

#### 5.1.6 PURIFICAÇÃO DO ALÉRGENO RBLO T 5

Para purificação do alérgeno recombinante foi utilizada a técnica de cromatografia de afinidade com resina de Níquel-Agarose (Ni-NTA Agarose) (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), uma vez que o alérgeno possui uma cauda de histidina que tem afinidade pelo Níquel.

A coluna de Níquel foi montada em um suporte, lavada com 25 mL de água ultrapura (MiliQ), então foi injetado nela 25 mL do tampão de equilíbrio (TrisHCl a 50 mM, NaCl a 500 mM, TritonX a 0,2%, Imidazol a 10mM e MiliQ) utilizado para reequilibrar os íons presentes na coluna. Após esta etapa foi realizada a preparação das bactérias para coleta do material contendo o rBlo t 5 que seria purificado pela coluna.

Os *pellets* foram retirados do freezer e deixados a temperatura ambiente. Logo após o descongelamento, as bactérias foram ressuspensas em tampão de lise (Phenylmethanesulfonyl fluoride - PMSF a 200 mM, TrisHCl a 50 mM, NaCl a 500 mM,

Sacarose a 200 mM, TritonX a 0,2%, Imidazol a 10mM) na razão de 3 mL de tampão para 1 g de *pellet*, até a solução ficar homogênea. Então acrescentou-se 15 mg de Lisozima (Sigma-Aldrich, E.U.A.), homogeneizou-se bem e incubou-se por 15 minutos no gelo. Após incubação foram realizados os ciclos de criólise, onde as amostras foram colocadas no nitrogênio líquido e depois em banho-maria à 37°C até descongelar, sendo cada etapa repetida 10 vezes.

Após a criólise, a solução foi incubada no gelo e submetida à sonicação (SONOPLUS Ultrasonic Homogenizers, Bandelin), compostos de 10 ciclos de 30 segundos à 50 W, para rompimento das células e dos corpos de inclusão, liberando o alérgeno recombinante. Então, a solução foi centrifugada à 10.000xg por 10 minutos e, em seguida, o sobrenadante foi coletado e o sedimento descartado.

O sobrenadante coletado foi filtrado em filtros para seringas de 0,22 µm (Millipore, Massachusetts, U.S.A.) e injetados na coluna após a passagem de todo o tampão de equilíbrio. Logo após a passagem do sobrenadante na coluna foi realizado novamente a passagem de 25 mL do tampão de equilíbrio.

Em seguida, foram injetados na coluna 25 mL do primeiro tampão de eluição (Tris-HCl a 50 mM e Imidazol a 75 mM), sendo todo o volume coletado para posterior quantificação proteica. Na sequência, foram injetados 25 mL do segundo tampão de eluição (Tris-HCl a 50 mM e Imidazol a 250 mM), cujas amostras eluídas foram coletadas para quantificação proteica. Após esse processo a coluna foi lavada novamente com 50 mL de MiliQ e então foram injetados 50 mL do tampão de regeneração (Tris-HCl a 500 mM, NaCl a 1 M e Imidazol a 500 mM). Para armazenamento da coluna foram injetados 15 mL de etanol a 25%.

As amostras coletadas foram submetidas a análise eletroforética em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 15%, em condições desnaturantes e não redutoras, com o intuito de averiguar a presença das bandas proteicas nas amostras. Aquelas que apresentaram as bandas de rBlo t 5, cujo peso molecular é 14 kDa, foram dialisadas contra PBS em membrana de 12 kDa (Millipore, Massachusetts, U.S.A.). Após a diálise, para a retirada dos contaminantes de endotoxinas, as amostras foram submetidas a cromatografia de afinidade em resina de Polimixina B, posteriormente submetidas a quantificação proteica através do método de Bradford (BRADFORD, 1976) e armazenadas à -80°C até o uso.

## 5.2 ANIMAIS

Foram utilizados no estudo 24 camundongos estéreis, da linhagem BALB/c, fêmeas, com idade de 6 a 8 semanas, provenientes do Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da UFU. Eles foram mantidos em um ambiente com temperatura e umidade controladas, alimentação *ad-libitum*, em ciclo de claro-escuro de 12 horas. Todos os experimentos propostos para este estudo foram aprovados Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da UFU, sob protocolo CEUA 048/17 (Anexo 1).

Os camundongos foram divididos em 4 grupos: grupo **Controle**: não expostos à rBlo t 5 e não treinados; grupo **TA**: não expostos à rBlo t 5 e treinados; grupo **rBLOT5**: expostos à rBlo t 5 e não treinados; e grupo **rBLOT5-TA**: expostos à rBlo t 5 e treinados.

## 5.3 PROTOCOLO DE EXPOSIÇÃO AO ALÉRGENO rBlo t 5

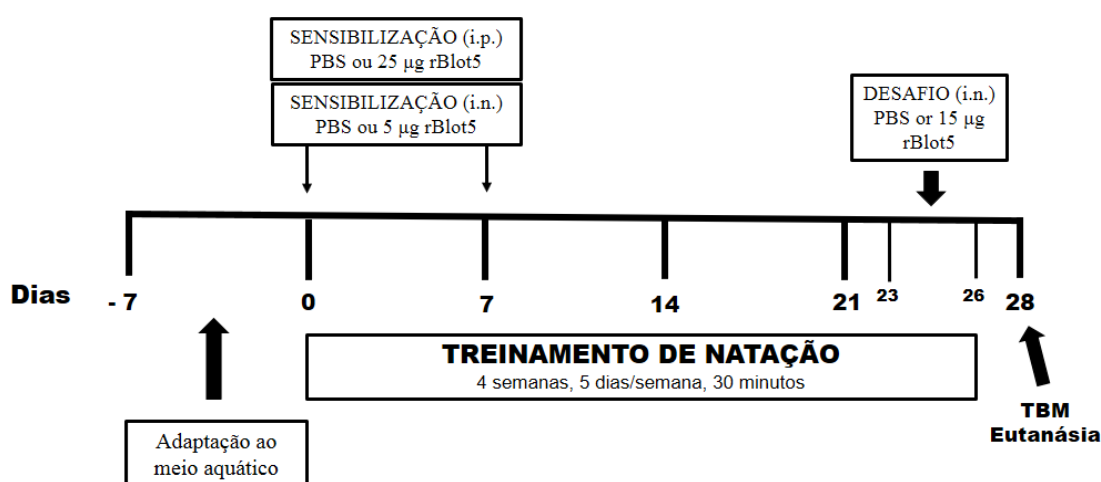
O protocolo de exposição dos camundongos à rBlo t 5 foi realizado em diferentes intervalos de tempo e através de diferentes vias de exposição, com base em protocolos já descritos (REDDY *et al.*, 2012; ABBRING, SUZANNE *et al.*, 2017; HASPELAGH *et al.*, 2017), sendo o design experimental ilustrado na Figura 4.

Nos dias 0 e 7, os camundongos dos grupos rBLOT5 e rBLOT5-TA foram sensibilizados, por via intraperitoneal (i.p.), com 100 µL de uma solução composta por 25 µg de rBlo t 5 associadas a 2 mg de hidróxido de alumínio adsorvidos em tampão fosfato-salino (PBS), enquanto que os animais dos demais grupos foram sensibilizados via i.p. com 100 µL de PBS.

Uma hora após a sensibilização via i.p., os camundongos foram anestesiados com uma mistura de Cloridrato de ketamina (100 mg/kg) e Cloridrato de xilazina (10 mg/kg) para realização da sensibilização pulmonar à rBlo t 5 através da instilação nasal (i.n.). Após anestesia, foram realizadas instilações nasais com 5 µg da proteína dissolvidos em 40 µL de PBS, sendo este volume o necessário para que ocorram

aspiração e distribuição pulmonar adequadas sem oferecer riscos de afogamento aos animais (SOUTHAM *et al.*, 2002). Os animais dos grupos Controle e TA receberam instilações nasais com 40 µL de PBS.

Posteriormente, entre os dias 23 e 26 foram realizados os desafios antigênicos. Para isso, os camundongos foram anestesiados, conforme descrito anteriormente, e realizadas instilações nasais de 15 µg de rBlo t 5 dissolvidas em 40 µL de PBS nos animais dos grupos rBLOT5 e rBLOT5-TA, enquanto que nos animais dos demais grupos foram realizadas instilações nasais com 40 µL de PBS.



**Figura 4 - Design experimental.** O protocolo de exposição ao rBlo t 5 e o protocolo de treinamento da natação estão ilustrados no esquema acima. A adaptação ao meio aquático foi iniciada no dia -7, o treinamento de natação ocorreu no dia 0 a 26 do experimento. As exposições antigênicas (i.p. e i.n.) ocorreram aos 0 e 7 dias concomitante ao protocolo de natação, bem como os desafios i.n. aconteceram do 23º ao 26º dia. Após 48 horas da última instilação nasal, os animais foram submetidos ao TBM (Teste de Broncoprovocação com Metacolina) e depois foram eutanasiados.

#### 5.4 PROTOCOLO DE TREINAMENTO

O treinamento foi realizado em um aquário de vidro contendo as seguintes dimensões: altura de 380 mm, comprimento 900 mm e largura 300 mm, dividido em 12 compartimentos/raias de dimensões 150 x 150 mm. O volume de água utilizado para os procedimentos foi de 40 cm³ e a temperatura água mantida entre 32 ±3°C. O design experimental das etapas descritas a seguir está ilustrado na Figura 4.



#### 5.4.1 ADAPTAÇÃO AO AMBIENTE AQUÁTICO

Para adaptação ao ambiente aquático, os camundongos dos grupos TA e rBLOT5-TA foram colocados no aquário dos dias -7 até o dia -5, em intervalos crescentes de tempo, que variaram de 10 minutos (dia -7) até 30 minutos (dia -5), com aumento progressivo da carga de treinamento presa a cauda, que variaram de 0 (dia -7), 2% (dia -6) até 10% (dia -5) do peso corporal total do animal.

#### 5.4.2 TESTE PROGRESSIVO DE CARGA

Para avaliação da capacidade funcional os camundongos foram submetidos ao Teste Progressivo de Carga (TPC) ao final de cada semana de treinamento. Os animais dos grupos TA e rBLOT5-TA foram colocados individualmente em uma raia do aquário, com uma sobrecarga de 2% do peso corporal preso à cauda e a cada três minutos foram acrescentados mais 2% do peso corporal, sem interrupção do exercício até o momento de exaustão (ALMEIDA *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2014; BRUGGEMANN *et al.*, 2015).

A exaustão foi caracterizada pela imersão do animal de cinco a sete segundos sem que o mesmo retornasse à superfície quando então o camundongo foi retirado da raia, secado com o auxílio de uma toalha e colocado novamente na gaiola.

#### 5.4.3 NATAÇÃO COM INTENSIDADE MODERADA DE TREINAMENTO

Para definição da intensidade de treinamento foi realizado um teste piloto, de acordo com a metodologia do treinamento proposta abaixo e mensurados os níveis de lactato sérico conforme descrito no item 4.5. A literatura afirma que se a diferença de produção de lactato entre o 10º e 30º minuto após a sessão de treinamento for menor do que 1 mmol/L define tal intensidade do treinamento como moderada (AVILA *et al.*, 2015; BRUGGEMANN *et al.*, 2015).

Após adaptação ao ambiente aquático e a realização do TPC, os camundongos dos grupos TA e rBLOT5-TA foram então submetidos a sessões de natação com intensidade moderada de treinamento, sendo utilizado o protocolo baseado em estudos prévios disponíveis na literatura científica (ALMEIDA *et al.*, 2009; CECHELLA *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2014; BRUGGEMANN *et al.*, 2015).

O treinamento, como mostra a figura 2, foi realizado durante 4 semanas, 5 dias por semana, com sessões de treinamento de 30 minutos, onde o camundongo treinava com uma carga acoplada à base da cauda equivalente a 50% da carga máxima no TPC. Os animais dos grupos Controle e rBLOT5 foram mantidos durante o mesmo intervalo de tempo e sem adição de carga em outro tanque com 2 cm de água na mesma temperatura que a da piscina dos animais treinados. Após o término da sessão de treinamento, os camundongos foram retirados do aquário e do tanque, secados com o auxílio de uma toalha e colocados novamente em suas respectivas gaiolas.

## 5.5 MENSURAÇÃO DOS NÍVEIS DE LACTATO SANGUÍNEO

A intensidade do treinamento da natação foi determinada através da mensuração dos níveis de lactato secretados após as sessões de treinamento (AVILA *et al.*, 2015; BRUGGEMANN *et al.*, 2015). Para isso, foram coletados 20 µL de sangue de uma secção realizada na cauda dos camundongos ao 10° e 30° minutos após a última sessão semanal de treinamento dos animais dos grupos TA e rBLOT5-TA. Para comparação, os animais dos grupos Controle e rBLOT5 foram submetidos a uma sessão de treinamento nos mesmos dias e então amostras de sangue foram coletadas conforme descrito para os animais dos outros grupos.

Após a coleta, o sangue foi colocado em microtubos do tipo eppendorf de 200 µL com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,01 mM, para evitar a coagulação e as amostras foram centrifugadas (300 g, 10 minutos) e o plasma coletado. A mensuração foi realizada utilizando o Kit de Lactato Enzimático (LabTest, Brasil) conforme as instruções do fabricante, onde primeiramente preparam-se em eppendorfs alíquotas para análise do *blank* (solução sem presença de lactato) e do Padrão (solução com lactato de concentração conhecida e azida sódica a 0,09%).

Para o *blank* utilizou-se 10 µL de MiliQ e 1 mL do reagente de trabalho fornecido pelo Kit, para o Padrão utilizou-se 10 µL da solução Padrão e 1 mL do reagente de trabalho, e para as amostras utilizou-se 10 µL do plasma de cada amostra e 1 mL do reagente de trabalho. Então os microtubos foram colocados em banho-maria à 37°C durante 5 minutos e foi realizada a leitura das absorbâncias pelo espectrofotômetro no comprimento de onda de 550 nm.

As concentrações de lactato, em mg/dL, presentes nas amostras foram determinadas pelo cálculo realizado através da fórmula: **Absorbância da amostra/Absorbância do padrão x 40**. Para conversão dos valores em Unidades Internacionais (mmol/L), foi realizada a multiplicação dos valores em mg/dL por 0,111.

## 5.6 ANÁLISE DA FUNÇÃO RESPIRATÓRIA

A função respiratória dos camundongos foi avaliada através da técnica de espirometria, cujos parâmetros analisados foram o volume corrente, a frequência respiratória e o volume-minuto dos animais. Esses dados foram obtidos sob condições basais e também após o Teste de Broncoprovocação com Metacolina (TBM). Sendo este teste utilizado no diagnóstico e na quantificação da hiperreatividade brônquica.

No 28º dia, os camundongos foram anestesiados, conforme descrito no item 4.3, alocados no espirômetro, que possui uma câmara hermética conectada a um nebulizador e um sensor espirométrico (SpirometerFE141, ADInstruments, Sydney, Austrália), e os dados foram mensurados durante 5 minutos para obtenção dos dados basais.

Após a primeira análise, foi realizado o TBM, no qual os camundongos foram nebulizados durante 2 minutos com doses crescentes de Metacolina [6,25, 12,5, 25 e 50 mg/ml (Sigma-Aldrich, U.S.A.)] diluídas em PBS e o animal foi monitorado durante um período de 6 minutos (REDDY *et al.*, 2012). Os dados foram coletados em volts, processados pelo sistema Power Lab (ADInstruments, Sydney, Austrália), que, através do programa LabChart, converte os dados referentes ao volume corrente de volts em mL e calcula a frequência respiratória e o volume-minuto. Os dados referentes ao TBM foram expressos e analisados através do volume corrente.

## 5.7 COLETA E PROCESSAMENTO DO LAVADO BRONCOALVEOLAR

Após a análise da função pulmonar, os camundongos foram eutanasiados através da inoculação via i.p. de uma dose letal de Pentobarbital (Nembutal™, Ceva Santé Animale, Holanda, 600 mg/kg). Em seguida foi realizada uma incisão medial na região ventral do pescoço do animal para acesso cirúrgico da traqueia, foi inserida uma cânula (PE-250, Critchley, Austrália), com auxílio de um microscópio cirúrgico (DF Vasconcellos, modelo MC-M1232), para a manutenção pérvia das vias aéreas. Então para coleta do fluido de lavagem broncoalveolar (BALF) foram realizadas duas aspirações manuais suaves após inoculação de 700 µL de PBS-EDTA gelado a 0,05 mM (VERHEIJDEN *et al.*, 2015; ABBRING, S. *et al.*, 2017)

O BALF foi centrifugado (400xg, 6 min) e o sobrenadante foi colhido e congelado a -80°C até análise posterior e o sedimento celular foi ressuspenso em 1 mL de PBS-EDTA a 0,05 mM para contagem das células. A contagem de células totais foi realizada na câmara de Neubauer (BOECO, Alemanha) utilizando a solução Azul de Tripano a 0,4% (Sigma-Aldrich, U.S.A.), enquanto que a contagem diferencial das células foi realizada em lâminas de microscopia após a coloração pelo método de May Grünwald-Giemsa (Bioclin/Quibasa, Brasil). Os tipos celulares observados ao microscópio óptico foram expressos em percentagem, após a contagem de 100 células (RODRIGUES *et al.*, 2012).

## 5.8 DETECÇÃO DE ANTICORPOS NO BALF

Para detecção e quantificação de anticorpos das classes IgE, IgG e suas subclasses IgG1 e IgG2a no BALF foram realizados ensaios imunoenzimáticos (ELISA), sendo o ELISA sanduiche para IgE total e o ELISA indireto para IgG e suas subclasses, conforme descrito por Miranda *et al.* (2011), com algumas modificações.

Para detecção de IgE total no BALF foi utilizado o kit Mouse IgE ELISA Quantitation Set (Bethyl Laboratories, Inc, E.U.A.), conforme as orientações do fornecedor. Placas com 96 poços de alta afinidade (Costar, Corning Laboratories,

U.S.A.) foram sensibilizadas com 1 µL/poço do anticorpo anti-IgE de camundongo produzido em cabras diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M e pH 9,6 (100 µL/poço) e mantidas em temperatura ambiente por 1 hora. Então as placas foram lavadas com tampão de lavagem (Tris a 50 mM, NaCl a 0,14 mM, Tween 20 a 0,05%) e bloqueadas por 30 minutos em temperatura ambiente com 200 µL/poço de tampão de bloqueio (Tris a 50 mM, NaCl a 0,14 mM, soro albumina bovina a 1%).

Após o bloqueio as placas foram lavadas novamente e incubadas com 50 µL/poço das amostras de BALF puras e 50 µL/poço das amostras da curva de diluição seriada do padrão de IgE (250 ng/mL, 125 ng/mL, 62.5 ng/mL, 31.25 ng/mL, 15.62 ng/mL, 7.8 ng/mL, 3.9 ng/mL, 0 ng/mL) por 1 hora em temperatura ambiente. Após 1 hora, as placas foram lavadas e em seguida, adicionou-se o anticorpo de detecção conjugado com peroxidase diluído na solução de bloqueio em 1:75.000 e elas foram incubadas em temperatura ambiente por mais 1 hora. Na sequência as placas foram lavadas e a reação revelada com o substrato enzimático TMB, utilizando o ácido sulfúrico à 0.18 M como solução de parada. Então foi realizada a leitura da DO no espectrofotômetro sob comprimento de onda de 450 nm e a quantificação de IgE foi realizada no *software* Microplate Manager® (BioRad Laboratories, E.U.A.) utilizando a curva de diluição seriada do padrão como valores de referência.

Para detecção de IgG específica ao alérgeno rBlo t 5 no BALF, as placas foram sensibilizadas com 3 µg/poço de rBlo t 5 diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M e pH 9,6 e mantidas *overnight* à 4°C. No dia seguinte, elas foram lavadas com PBS-Tween 20 (PBS-T) e os sítios inespecíficos de ligação dos poços foram bloqueados com 150 µL/poço de PBS-T-Molico (PBS-TM) a 5% por 1 hora em temperatura ambiente. Então a placa foi lavada novamente com PBS-T e as amostras foram aplicadas em duplicatas (50 µL/poço) diluídas em PBS-TM, na diluição de 1:50, e incubadas por 1 hora à 37°C.

Após incubação as placas foram lavadas novamente com PBS-T, foram adicionados aos poços 50 µL do anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, E.U.A.) diluído em PBS-TM, na diluição de 1:1000 e incubadas novamente à 37°C por 1 hora. Passado este tempo, a placa foi lavada novamente e realizada a revelação da reação utilizando um substrato enzimático comercial ABTS® (Sigma-Aldrich, E.U.A.). Após a revelação, foi realizada a leitura da DO no espectrofotômetro sob comprimento de onda de 405 nm.

Para detecção das subclasses IgG1 e IgG2a específicas ao alérgeno rBlo t 5 no BALF, o ELISA realizado seguiu basicamente as mesmas etapas realizadas para detecção de IgG, no entanto, para a realização do bloqueio e como diluente das etapas subsequentes foi utilizado o PBS-TM à 1%, as amostras de soro foram diluídas 1:10 e ficaram incubadas por 2 horas, os anticorpos primários utilizados foram o anti-IgG1 de camundongo produzido em cabras e o anti-IgG2a de camundongo produzido em cabras, ambos na diluição de 1:250, e o anticorpo secundário utilizado foi o IgG de coelho anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase, na diluição de 1:1000 (Sigma-Aldrich, E.U.A.) com incubação por 1 hora à 37°C.

Os resultados foram expressos em Índice ELISA (I.E.), calculados de acordo com a seguinte fórmula:

$$I.E. = \frac{DO \text{ da amostra}}{DO \text{ do controle} + 3\delta}$$

onde DO significa média da densidade óptica da amostra testada (positivas e controles negativos),  $\delta$  significa desvio-padrão das densidades ópticas das amostras do controle negativo. Os valores de I.E. maiores do que 1,2 foram considerados positivos para presença dos anticorpos.

Após a análise dos dados individuais, foi calculado a razão da produção de IgG1 por IgG2a (IgG1/IgG2a) para avaliar o perfil de polarização da resposta imune humoral dos camundongos submetidos ao treinamento da natação.

## 5.9 DETECÇÃO DE CITOCINAS NO BALF

A produção de citocinas de perfil Th1 (IL-6, IFN- $\gamma$  e TNF), Th2 (IL-4 e IL-10) e Th17 (IL-17A) foram mensuradas no BALF através da técnica de *Cytometric Bead Array* (CBA), utilizando-se o CBA Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (BD Pharmingen, U.S.A.), seguindo as instruções do fabricante. As amostras do BALF e os padrões de citocinas foram incubados com microesferas (*beads*) de captura, que apresentam tamanho e fluorescência conhecidos, além de possuírem em sua superfície anticorpos específicos que permitem a ligação das citocinas nas respectivas *beads*.

A seguir, foram adicionados nas amostras 50  $\mu$ L do anticorpo de detecção conjugado com Ficoeritrina (PE) e os tubos incubados por 2 horas na ausência completa de luz. Após este período, adicionou-se 1mL do tampão de lavagem e as amostras foram centrifugadas (200 g por 5 minutos). Os sedimentos contendo as *beads* foram ressuspensos em 300  $\mu$ L do mesmo tampão de lavagem e as amostras foram submetidas à análise no citômetro de fluxo (BD FACSAria III™, BD Pharmingen, U.S.A.).

Os dados obtidos foram analisados pelo *software* FCAP Array versão 1.0.1 (BD Pharmingen, E.U.A.), levando em consideração os limites de detecção de cada citocina através da fluorescência emitida pela *bead*. Os dados analisados foram expressos em Intensidade Média de Fluorescência (MFI).

## 5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

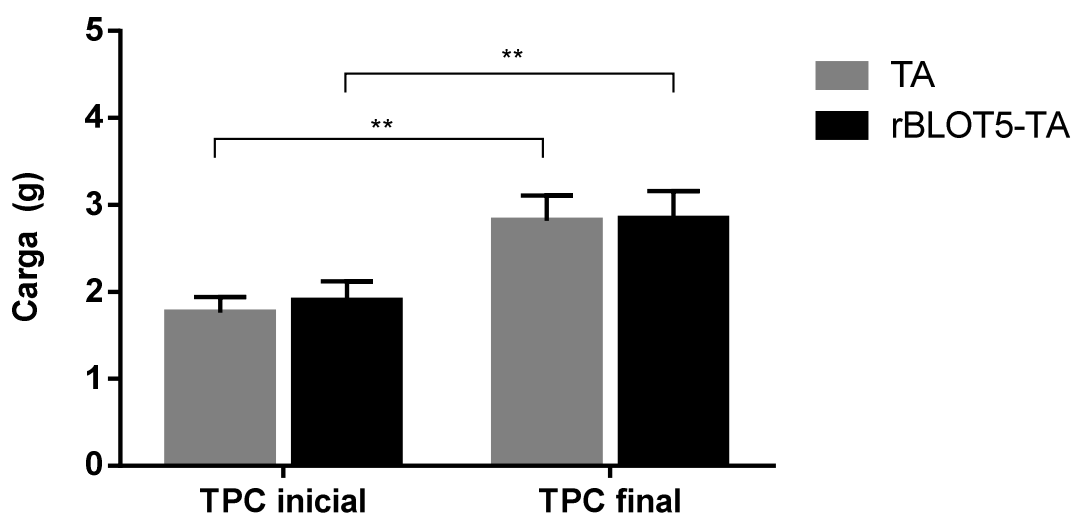
A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 6 (San Diego, CA, EUA) onde a normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados com distribuição paramétrica foram avaliados pelo teste de Análise de Variância (ANOVA), seguidos pelos testes de comparação múltipla para comparação entre grupos, sendo o pós-teste de Tukey para análise dos dados da função respiratória basal, do número total de células no BALF e da produção da imunoglobulina IgG; o pós-teste de Bonferroni para os dados do TBM, o pós-teste de Hom-Sidak para os dados referentes a proporção relativa de leucócitos no BALF, o pós-teste de Sidak para os dados referentes a produção das imunoglobulinas IgG1 e IgG2a.

Os dados com distribuição não paramétrica foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguidos pelos testes de comparação múltipla para comparação entre grupos, sendo o pós-teste de Sidak utilizado para análise dos dados referentes as cargas do TPC e o pós-teste de Dunn para análise da produção de citocinas no BALF. Para análise dos dados referentes a razão IgG1/IgG2a foi utilizado o Test t Student. Foram considerados significativos os valores de  $p < 0,05$ .

## 6 RESULTADOS

### 6.1 INFLUÊNCIA DA CARGA DE TREINAMENTO NO CONDICIONAMENTO FÍSICO DOS CAMUNDONGOS

Para manutenção da carga de treinamento foram realizados semanalmente, no sexto dia de cada semana de treinamento, o Teste Progressivo de Carga (TPC) nos animais dos grupos TA e rBLOT5-TA. O treinamento através da natação promoveu uma melhora do condicionamento físico dos camundongos dos grupos TA e rBLOT5-TA, uma vez que houve um aumento significativo das cargas suportadas no TPC quando comparados os testes realizados na primeira e na última semana de treinamento, como mostra a Figura 5.



**Figura 5 – Cargas suportadas pelos camundongos no Teste Progressivo de Carga (TPC).** A figura mostra as cargas, mensuradas em gramas (g), suportadas pelos camundongos dos grupos TA e rBLOT5-TA no TPC realizado na primeira e na última semana de treinamento. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio-padrão. As diferenças estatisticamente significantes foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis com teste de comparações múltiplas de Sidak. \*\* $p < 0,01$ .



## 6.2 INFLUÊNCIA DA NATAÇÃO NOS NÍVEIS DE LACTATO PLASMÁTICOS

Os níveis de lactato plasmáticos foram mensurados no 10<sup>º</sup> e 30<sup>º</sup> minutos após a última sessão de treinamento da primeira e da quarta semana, com o intuito de se avaliar a intensidade de treinamento, sendo que o aumento inferior a 1 mmol/L entre os períodos analisados confere ao treinamento uma intensidade moderada.

A tabela 1 mostra os valores mensurados dos níveis de lactato plasmáticos nos períodos descritos. Os dados mostram uma pequena alteração, não significativa, dos níveis de lactato nos grupos TA e rBLOT5-TA na quarta semana em relação a primeira semana, onde o grupo que apresenta a inflamação pulmonar submetido a natação apresentou os maiores níveis de lactato. Os animais do grupo rBLOT5 apresentaram maiores níveis de produção de lactato após a sessão de treinamento em relação ao grupo Controle mesmo sem serem submetidos a sessões semanais de treinamento.

**Tabela 1. Níveis de lactato plasmáticos.** Os valores (média  $\pm$  DP) da concentração de lactato no sangue são expressos em mmol/L medidos no quinto dia após a sessão de treino na primeira (1<sup>a</sup> semana) e na última semana (4<sup>a</sup> semana).  $\neq$  Os animais dos grupos Controle e rBLOT5 foram submetidos ao protocolo de exercício apenas nos dias da coleta de sangue para análise das concentrações de lactato.  $\S$  A coleta de sangue dos grupos TA e rBLOT5-TA foi realizada após o quinto dia da sessão de treino semanal.

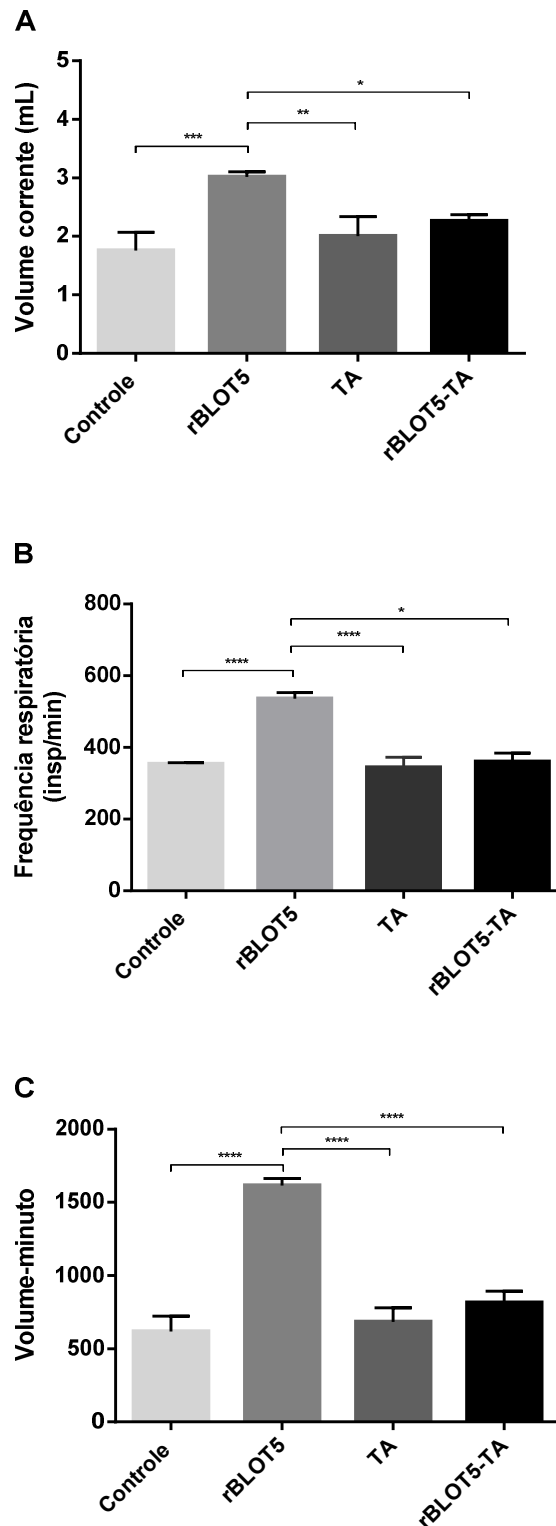
Tempo		Grupos			
		Controle $\neq$	rBLOT5 $\neq$	TA $\S$	rBLOT5-TA $\S$
1 <sup>a</sup> semana	10 <sup>º</sup> min	2,34 $\pm$ 0,43	3,12 $\pm$ 0,54	3,94 $\pm$ 1,03	4,06 $\pm$ 1,00
	30 <sup>º</sup> min	3,11 $\pm$ 0,89	4,10 $\pm$ 0,39	4,15 $\pm$ 0,99	5,58 $\pm$ 0,49
4 <sup>a</sup> semana	10 <sup>º</sup> min	2,89 $\pm$ 0,66	3,77 $\pm$ 0,43	4,01 $\pm$ 1,10	4,97 $\pm$ 0,35
	30 <sup>º</sup> min	3,55 $\pm$ 0,71	4,13 $\pm$ 0,74	4,99 $\pm$ 0,76	5,23 $\pm$ 0,82

## 6.3 INFLUÊNCIA DA NATAÇÃO NAS ALTERAÇÕES DA FUNÇÃO PULMONAR INDUZIDAS PELA INFLAMAÇÃO

Para avaliar a função pulmonar dos camundongos envolvidos nos diferentes modelos experimentais estudados foi realizada a espirometria, onde mensurou-se os seguintes parâmetros basais: volume corrente (Fig. 6A), frequência respiratória (Fig.

6B) e o volume-minuto, resultado da multiplicação dos dois primeiros parâmetros (Fig. 6C).

Em todos os parâmetros avaliados houve um aumento significativo naqueles mensurados nos camundongos do grupo rBLOT5 em comparação com os animais dos demais grupos. O volume-minuto do grupo rBLOT5 foi o parâmetro que obteve maior alteração em relação aos outros grupos, alcançando um  $p < 0,0001$  quando comparados com os demais, como mostra a Figura 6.

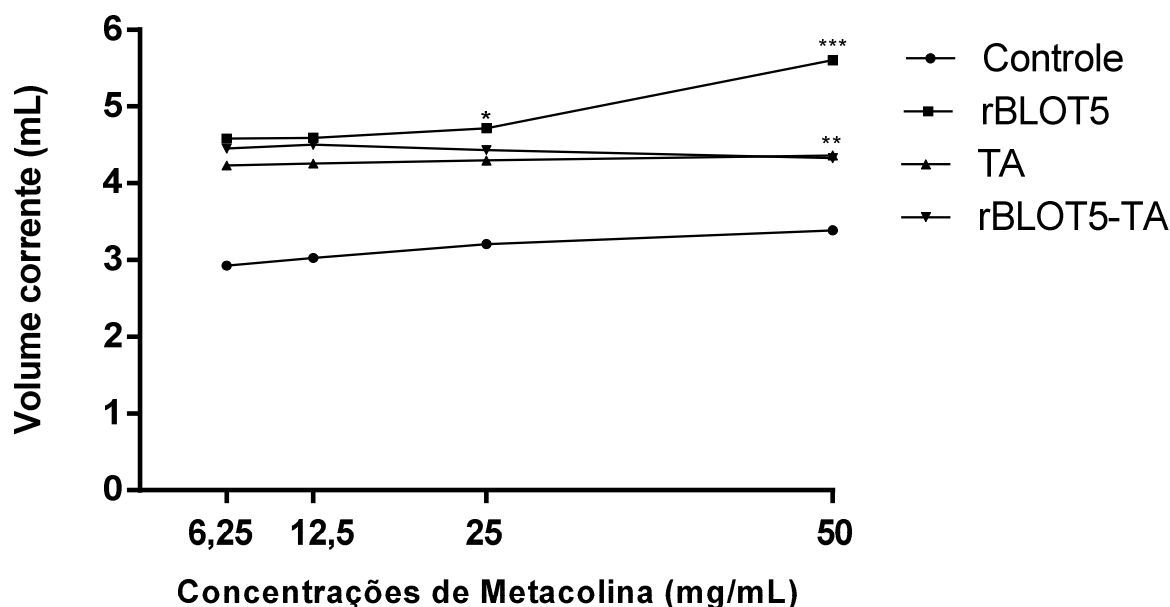


**Figura 6 – Função respiratória basal.** Função respiratória basal dos animais dos grupos experimentais mensurados através da espirometria no 28º dia. A Fig. 6A mostra os dados referentes ao volume corrente mobilizado pelos animais durante o ciclo respiratório, a Fig. 6B mostra os dados referentes a frequência respiratória dos animais, enquanto a Fig. 6C mostra o volume-minuto obtido pela multiplicação do volume corrente pela frequência respiratória. Os valores são expressos como média  $\pm$  DP. As diferenças estatisticamente significantes foram determinadas pelo teste *One-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Tukey. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

#### 6.4 INFLUÊNCIA DA NATAÇÃO SOBRE A HIPERREATIVIDADE DAS VIAS AÉREAS

Para análise da hiperreatividade das vias aéreas dos camundongos foi realizado o Teste de Broncoprovocação com Metacolina (TBM), onde os animais foram nebulizados com doses crescentes de Metacolina (6.25, 12.5, 25 e 50 mg/mL) e então avaliado o volume corrente mobilizado por eles durante um período de 6 minutos pela técnica de espirometria.

A Figura 7 mostra que o parâmetro volume corrente não responde as pequenas concentrações de Metacolina em todos os grupos experimentais. Contudo, após a exposição a doses maiores do broncoconstritor, como 25 e 50 mg/mL, houve um aumento significativo do volume corrente no grupo rBLOT5, enquanto que no grupo rBLOT5-TA houve uma diminuição significativa deste parâmetro após a inalação de 50 mg/mL de Metacolina.



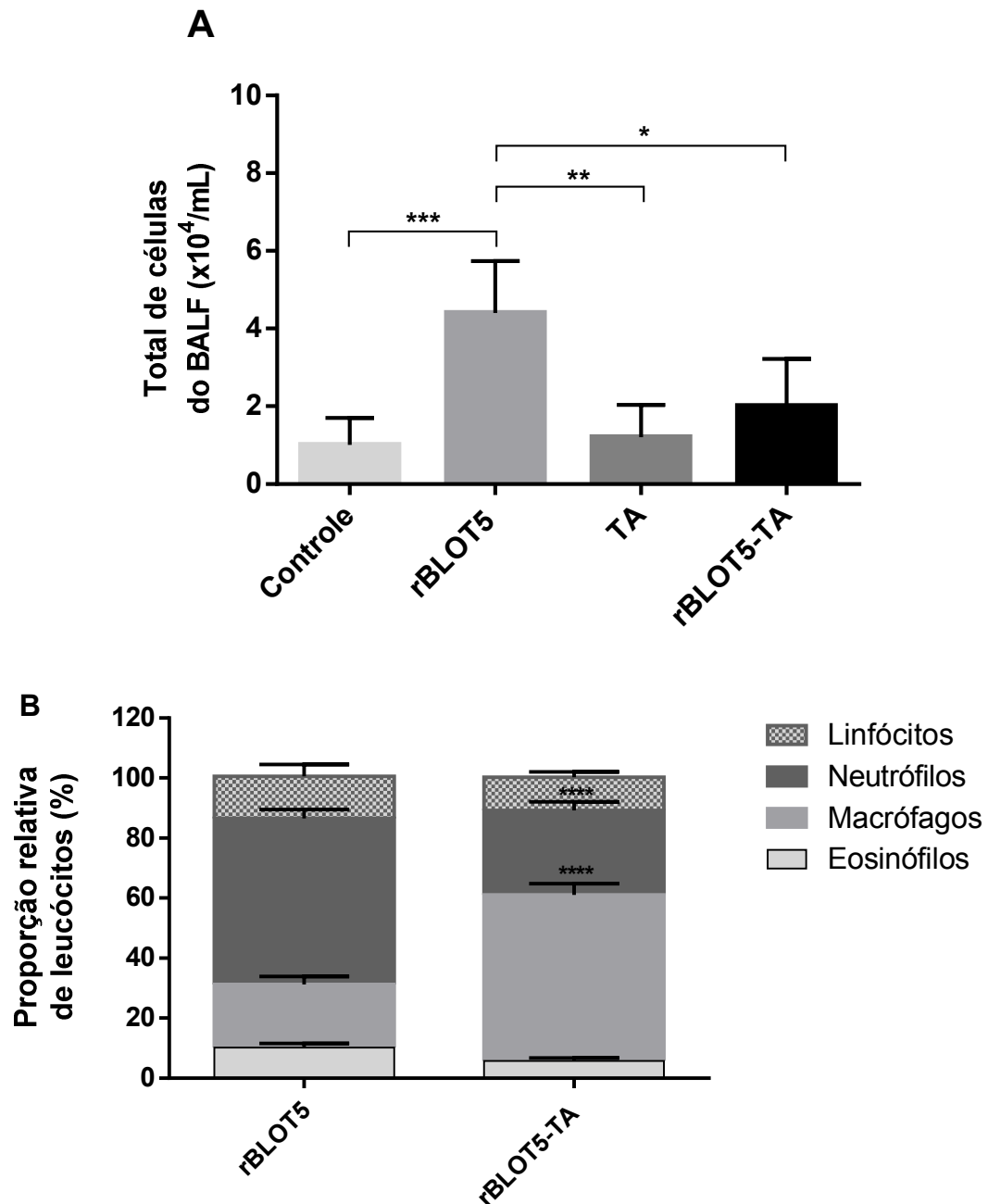
**Figura 7 - Análise do volume corrente durante o teste de broncoprovocação com Metacolina (TBM).** Análise do volume corrente (mL) após a exposição dos camundongos às concentrações crescentes de Metacolina no TBM (6.25, 12.5, 25 e 50 mg/mL). Os valores são expressos como média  $\pm$  DP. As diferenças estatisticamente significantes foram determinadas pelo teste *Two-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas da Bonferroni. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

## 6.5 INFLUÊNCIA DA NATAÇÃO NO INFILTRADO CELULAR NOS PULMÕES

Para análise do infiltrado celular nas vias aéreas dos camundongos foi realizada a contagem total e contagem diferencial (porcentagem relativa de leucócitos) das células coletadas no BALF, com técnicas específicas para tais fins.

Em relação a contagem total de células (Fig. 8A), houve uma redução significativa do número de células no BALF dos animais do grupo rBLOT5-TA em relação ao grupo rBLOT5. Além disso, observou-se também que o BALF dos camundongos do grupo rBLOT5 apresentou uma quantidade de células significativamente maior quando comparado com os grupos Controle e TA.

Quanto ao perfil de leucócitos presentes no BALF dos animais com inflamação pulmonar, a natação promoveu um aumento significativo na proporção de macrófagos e uma redução significativa na proporção de neutrófilos no BALF dos animais dos grupos rBLOT5-TA quando comparados com o grupo rBLOT5 (Fig. 8B).

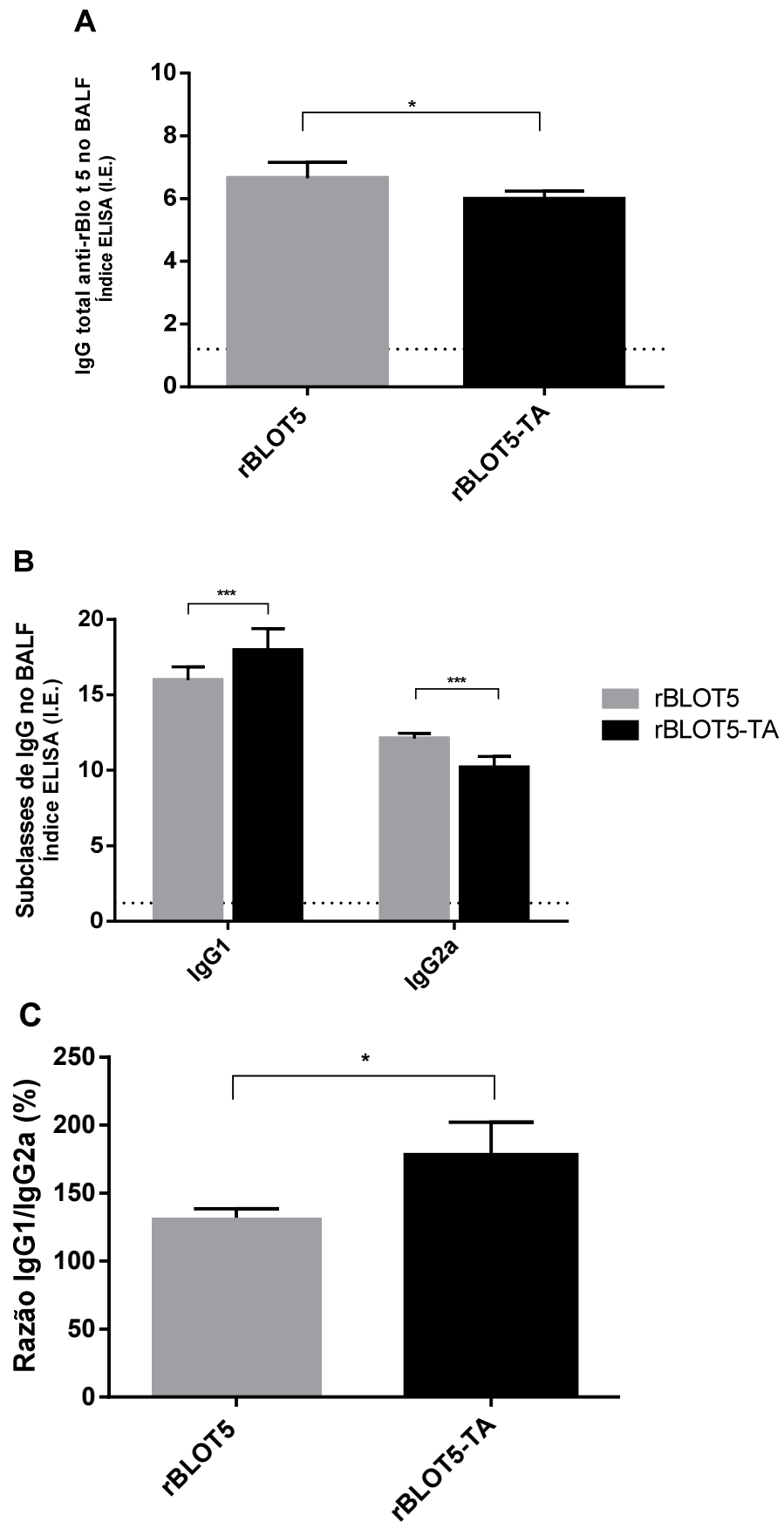


**Figura 8 - Contagem de células no BALF.** Número total de células do BALF nos diferentes grupos de estudo está representado na Fig. 8A. Os valores estão expressos como média  $\pm$  DP. As diferenças estatisticamente significantes foram determinadas pelo teste *One-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Tukey. A contagem diferencial das células do BALF dos grupos rBLOT5 e rBLOT5-TA está ilustrada na Fig. 8B. Os valores são expressos como média  $\pm$  DP da proporção relativa de leucócitos. A análise estatística foi realizada através do *Two-way* ANOVA com o teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,0001$ .

## 6.6 INFLUÊNCIA DA NATAÇÃO SOBRE A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS PARA rBlo t 5

A análise da resposta imune humoral, através da produção de anticorpos das classes IgE, IgG e subclasses IgG1 e IgG2a específicos a rBlo t 5 no BALF foi realizada através do ELISA indireto. Em relação a IgE total não foram detectadas a produção destes anticorpos no fluido analisado (dados não mostrados), sugerindo que o modelo proposto não promoveu o *switch* de classe para os anticorpos IgE.

Quanto aos anticorpos da classe IgG específicos para rBlo t 5 foi observada uma diminuição significativa dos anticorpos no BALF dos camundongos do grupo rBLOT5-TA quando comparados com os animais do grupo rBLOT5 (Fig. 9A). Em relação as subclasses de IgG, foram encontrados um aumento significativo na produção de IgG1 anti-rBlo t 5 no BALF dos animais do grupo rBLOT5-TA e uma diminuição significativa da subclasse IgG2a específica nestes animais (Fig. 9B). A Figura 9C mostra a relação IgG1/IgG2a, em porcentagem, evidenciando um aumento significativo nesta razão, onde a soroconversão de IgG1 obteve predominância em torno de 178% em relação a IgG2a no BALF dos camundongos do grupo rBLOT5-TA.



**Figura 9 – Produção de anticorpos da classe IgG e subclasses IgG1 e IgG2a específicos a rBlo t 5 no BALF.** A Fig. 9A mostra o Índice ELISA (I.E.) de IgG total presentes no BALF dos camundongos

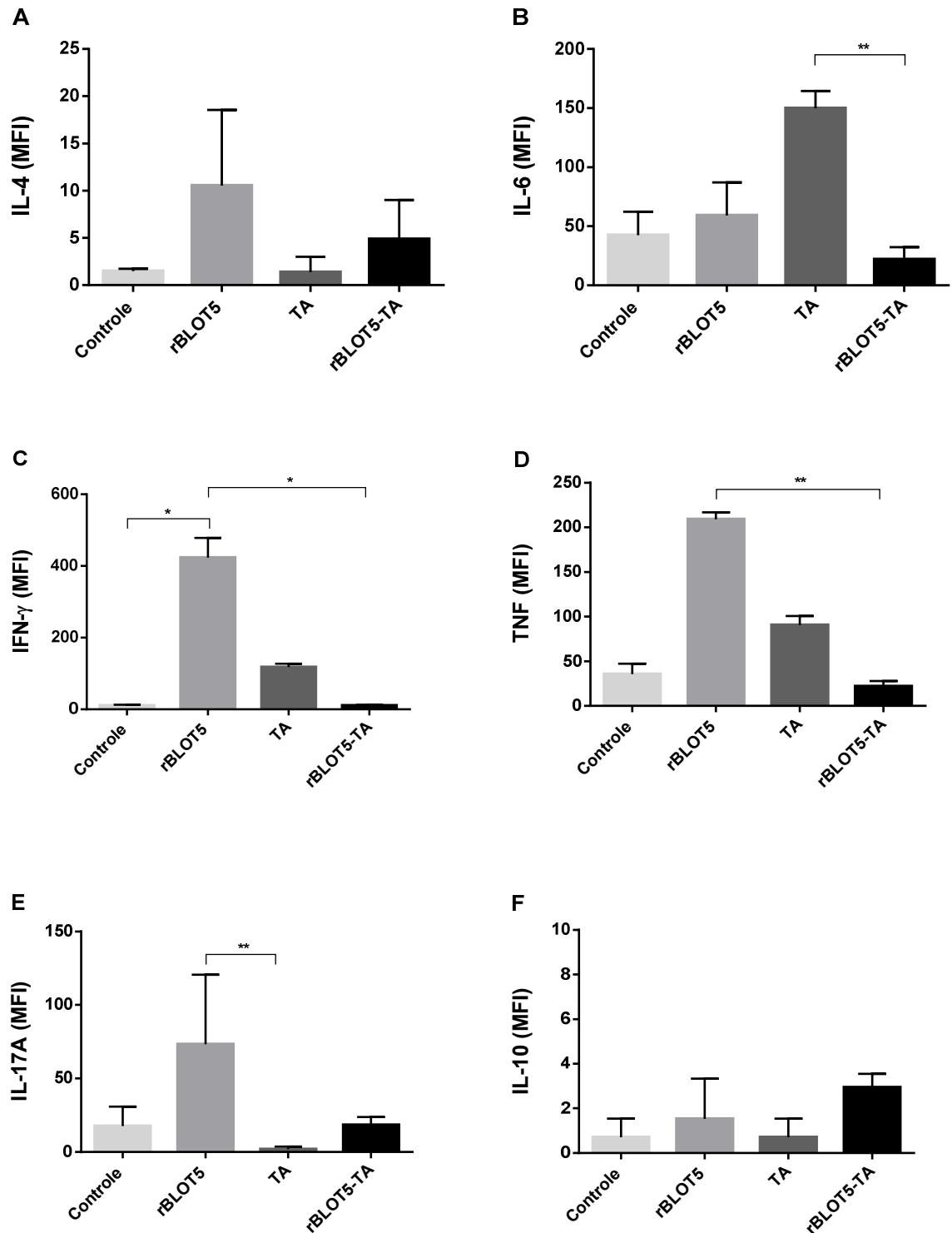


submetidos a instilação nasal com rBlo t 5 dos grupos rBLOT5 e rBLOT5-TA. Os valores são expressos como média  $\pm$  DP. As diferenças estatisticamente significantes foram determinadas pelo teste *One-way* ANOVA com teste de comparações múltiplas de Tukey. A Fig. 9B mostra o I.E. das subclasses de IgG (IgG1 e IgG2a) presentes no BALF. Os valores são expressos como média  $\pm$  DP. A análise estatística foi realizada através do *Two-way* ANOVA com o teste de comparações múltiplas de Sidak. A linha pontilhada nas figuras 9A e 9B representam o limite de positividade do Índice ELISA ( $> 1.2$ ). A Fig. 9C mostra a relação entre as subclasses de IgG (IgG1/IgG2a). Os valores são expressos como média  $\pm$  DP. A análise estatística foi realizada através do Teste *t Student*. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

## 6.7 INFLUÊNCIA DA NATAÇÃO SOBRE A IMUNOMODULAÇÃO DE CITOCINAS NO BALF

A análise da presença de citocinas no BALF foi realizada através da técnica de *Citometric Bead Array* (CBA), onde foram mensuradas a intensidade média de fluorescência (MFI) das *beads* conjugadas com anticorpos específicos para as seguintes citocinas: IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- $\gamma$  e TNF.

O treinamento através da natação induziu uma diminuição significativa nos níveis de citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$  ( $p < 0,05$ ) e TNF ( $p < 0,001$ ) no BALF no grupo rBLOT5-TA em relação ao grupo rBLOT5, diminuição de IL-6 ( $p < 0,001$ ) no grupo rBLOT5-TA quando comparado ao grupo TA, e também diminuição da IL-17A ( $p < 0,05$ ) no grupo TA quando comparado ao grupo rBLOT5. Em relação aos níveis de IL-4 e IL-10 no BALF, não houve diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos estudados (Fig. 10A-F).



**Figura 10 – Níveis de citocinas presentes no BALF de animais dos diferentes grupos.** A intensidade mediana de fluorescência (MFI) das citocinas, IL-4 (Fig. 10A), IL-6 (Fig. 10B), IFN- $\gamma$  (Fig. 10C), TNF (Fig. 10D), IL-17A (Fig. 10E) e IL-10 (Fig. 10F) presentes no BALF está representada nas respectivas figuras. Os valores estão expressos como média  $\pm$  DP. As diferenças estatisticamente significantes foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis com teste de comparações múltiplas de Dunn. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

## 7 DISCUSSÃO

A inflamação é um processo complexo, capaz de atingir todo o sistema respiratório após a exposição à antígenos exógenos, sendo dependente de diversos mecanismos imunológicos, desde os humorais até os celulares (MARTIN e FREVERT, 2005; LOPES *et al.*, 2010). Este estudo é inédito no que diz respeito à indução do processo inflamatório pulmonar em modelos murinos através da exposição ao alérgeno recombinante Blo t 5 do ácaro *Blomia tropicalis*, assim como os efeitos promovidos pelo treinamento da natação neste processo, uma vez que o uso de modelos experimentais surge como uma ferramenta valiosa, com a finalidade de mostrar de maneira acessível e segura os mecanismos envolvidos na evolução do processo inflamatório.

Neste contexto, os estudos relacionados à inflamação pulmonar induzida por ácaros da poeira domiciliar aumentaram significativamente, demonstrando a sua importância por serem espécies cosmopolitas e, particularmente em regiões tropicais, incluindo o Brasil, a espécie *Blomia tropicalis* é a mais prevalente entre eles. Entre os alérgenos de *Blomia tropicalis*, o Blo t 5 foi o mais estudado e também o melhor descrito até o presente momento, principalmente em relação à produção e aplicação de seu alérgeno recombinante, o rBlo t 5 (KUO *et al.*, 2003; LIM *et al.*, 2004; YI *et al.*, 2004; CHAN *et al.*, 2008; NAIK *et al.*, 2008). Porém, nosso estudo foi o primeiro a demonstrar seus efeitos imunomodulatórios em um modelo experimental *in vivo* de inflamação pulmonar.

Em relação ao exercício físico aeróbico, alguns estudos já mostraram os efeitos anti-inflamatórios promovidos pela natação de diferentes intensidades em modelos experimentais murinos de inflamação pulmonar induzidos por diferentes antígenos como Lipopolissacarídeo (RAMOS *et al.*, 2010), fumaça de cigarro (TOLEDO *et al.*, 2012), poluição (AVILA *et al.*, 2015) e ovoalbumina - OVA (BRUGGEMANN *et al.*, 2015). Portanto, no presente estudo buscou-se avaliar o efeito promovido pela natação de moderada intensidade de treinamento sobre a função pulmonar, a resposta imune humoral (produção de anticorpos), a resposta imune celular (recrutamento de células e produção de citocinas) e o perfil histopatológico pulmonar do modelo murino com ou sem a exposição ao alérgeno rBlo t 5.

Após cada semana de treinamento foi observado um aumento da carga suportada pelos camundongos no TPC nos grupos TA e rBLOT5-TA, condizente com a melhora do condicionamento físico dos animais, já que os mesmos suportaram cargas cada vez maiores de treinamento no decorrer das semanas. Alguns autores trazem informações de que a melhora do condicionamento físico possa ser mensurada através do aumento da carga suportada pelos animais, assim como o tempo de duração dos testes físicos até a exaustão. Neste contexto, Ramos *et al.* (2010) mostraram que o aumento do condicionamento físico dos animais submetidos à natação de baixa intensidade foi comprovado através do aumento significativo do tempo de duração do último teste físico em relação ao teste inicial dos animais dos grupos submetidos ao treinamento.

Associado à melhora do condicionamento físico, este estudo mostrou que a natação foi capaz de promover um aumento nos níveis de lactato plasmático entre a primeira e a quarta semana de treinamento, cujas diferenças mensuradas entre dois intervalos de tempo (10<sup>o</sup> e 30<sup>o</sup> minutos após a sessão de treinamento) menores do que 1 mmol/L podem ser caracterizados como intensidade moderada de treinamento. Corroborando com estes dados, Avila *et al.* (2015) e Bruggemann *et al.* (2015) mostraram que camundongos submetidos a natação de alta intensidade produziam níveis maiores do que 1 mmol/L de lactato plasmático quando mensurados nos intervalos de tempo descritos acima.

A inflamação altera a função pulmonar, influenciando a cinética dos volumes respiratórios avaliados nos camundongos, onde foi possível observar um aumento do volume corrente mobilizado pelos animais durante um ciclo respiratório, associado à elevação da frequência respiratória. Estes dados mostram que a inflamação pulmonar induzida pelo rBlo t 5 aumenta o volume corrente basal, proporcionando uma demanda maior na busca pelo ar a fim de manter a fisiologia respiratória funcional durante as trocas gasosas. Porém, a natação foi capaz de manter a fisiologia respiratória funcional, já que os animais do grupo rBLOT5-TA mobilizavam volumes correntes e possuíam a frequência respiratória próxima dos camundongos do grupo Controle.

Um estudo demonstrou que ocorre aumento do volume corrente de animais com inflamação pulmonar alérgica após exposição a altas doses do broncoconstritor (VAICKUS *et al.*, 2010). Neste sentido, a hiperreatividade das vias aéreas dos animais em resposta à metacolina, um agonista colinérgico não-seletivo capaz de promover a broncoconstrição, foi observada em nosso trabalho através do aumento do volume

corrente após administração de altas doses deste fármaco no grupo rBLOT5, possivelmente para compensar a dispneia devido ao aumento do distúrbio pulmonar em resposta à Metacolina.

Em concordância com outros estudos, observou-se que os camundongos com inflamação pulmonar apresentaram um aumento no recrutamento celular para o pulmão, fato analisado pelo aumento das células totais presentes no BALF, enquanto que os camundongos submetidos à natação de intensidade moderada apresentaram diminuição destas células presentes no fluido (RAMOS *et al.*, 2010; TOLEDO *et al.*, 2012; AVILA *et al.*, 2015; BRUGGEMANN *et al.*, 2015). As células inflamatórias desempenham um papel fundamental na inflamação pulmonar, como a produção de citocinas e quimiocinas responsáveis pela atração de novas células para o tecido e contribuindo para a remodelamento e obstrução das vias aéreas (MARTIN e FREVERT, 2005; BARRIOS, 2008), sendo a atividade física capaz de promover a diminuição do recrutamento celular atenuando o processo inflamatório instalado nos pulmões (TERRA *et al.*, 2012).

Entre as células presentes no BALF, os camundongos submetidos à natação apresentaram um aumento significativo de macrófagos e concomitantemente diminuição de neutrófilos no BALF. Exercícios aeróbicos diminuem a expressão de receptores do tipo *Toll* (*Toll-like receptor*) em macrófagos e comprometem a apresentação de antígenos para os linfócitos T, impedindo a resposta inflamatória Th1, sendo esse efeito anti-inflamatório capaz de impedir o dano tecidual causado pelos mediadores inflamatórios (GLEESON *et al.*, 2006). Quanto aos neutrófilos, geralmente o primeiro tipo celular recrutado para o sítio da inflamação (GAVRIELI *et al.*, 2008). A diminuição deste perfil celular encontrada nos animais que foram submetidos a exercícios de moderada intensidade demonstra a atenuação do processo inflamatório, corroborando com estudos que têm demonstrado essas modulações no recrutamento celular promovido pela natação alterando o fenótipo dessas células de um estado pró-inflamatório (M1) para um fenótipo anti-inflamatório (M2) (AVILA *et al.*, 2015; BRUGGEMANN *et al.*, 2015).

Este estudo mostrou um aumento significativo da imunoglobulina G (IgG) e suas isoformas IgG1 e IgG2a específicas ao rBlo t 5 nos grupos que receberam instilações nasais do alérgeno recombinante, então, podemos postular que esses anticorpos estão envolvidos no processo patológico da inflamação pulmonar. As imunoglobulinas da classe G são as mais abundantes nas respostas imunes humorais

secundárias e a ativação da via clássica do sistema complemento é um mecanismo importante para avaliar a inflamação pulmonar (XIAO, 2012; BRUHNS e JONSSON, 2015).

Até o presente momento, nenhum estudo tem descrito a produção de anticorpos IgG específicos em modelos experimentais, em detrimento da IgE específica como a classe de anticorpos mais analisada devido a seu papel na manutenção da inflamação alérgica, particularmente as pulmonares (BRUGGEMANN *et al.*, 2015; CAMARGO HIZUME-KUNZLER *et al.*, 2017). Assim, este estudo é pioneiro na análise da presença desta classe de imunoglobulinas específicas a rBlo t 5, além de mostrar que o condicionamento físico por meio da natação de moderada intensidade é capaz de induzir diminuição desses anticorpos no grupo rBLOT5-TA.

Uma interpretação alternativa quanto a diminuição destes anticorpos no BALF dos camundongos que foram submetidos à natação é que os mecanismos de imunorregulação capazes de estimular as células produtoras de IL-10 podem estar envolvidos neste modelo experimental, uma vez que foram encontrados níveis mais altos da subclasse IgG1 do que IgG2a específicas ao alérgeno rBlo t 5, um anticorpo não fixador de complemento, embora não tenham sido detectadas diferenças significativas na produção de IL-10 entre todos os grupos estudados.

A produção de citocinas durante a inflamação pulmonar amplificam a inflamação através da ativação de vários mediadores que atuam diretamente para promover a diferenciação, a proliferação e o aumento do recrutamento e sobrevivência de células inflamatórias nos pulmões (ROBINSON *et al.*, 1992; HARRISS e ATKINSON, 2013; CECHELLA *et al.*, 2014). Esta produção pode ser modulada por uma série de estímulos, dentre os quais podemos citar estresse hormonal, estresse oxidativo e exercício físico (CANNON, 2000; TERRA *et al.*, 2012). Este estudo também mostrou que a atividade física promove uma diminuição das citocinas IL-6, IFN- $\gamma$  e TNF no BALF dos camundongos do grupo rBLOT5-TA, condizente com o efeito anti-inflamatório já descrito na literatura.

A IL-6 já foi chamada de fator exercício ou miocina, com atividade reguladora do processo inflamatório, sendo considerada na literatura como o principal agente regulador da resposta de fase aguda no exercício físico. Essa citocina é produzida em concentrações mais elevadas pelo tecido muscular estriado esquelético, pelos leucócitos e células endoteliais, sendo sua secreção relacionada à intensidade,

duração e quantidade de massa muscular envolvida no exercício físico (PETERSEN e PEDERSEN, 2005).

As citocinas IFN- $\gamma$  e TNF são produzidas por monócitos, macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, células musculares lisas e esqueléticas, e são consideradas “citocinas-alarme”, pois elas são estimuladas por eventos relacionados diretamente à lesão tecidual, como por exemplo, o contato com um antígeno não próprio, fatores bioquímicos e inflamatórios como a histamina, prostaglandinas e leucotrienos (SMITH, 2000; BASSEL-DUBY e OLSON, 2006). O exercício físico é capaz de regular a produção destas citocinas através da produção e secreção, principalmente, de estímulos para síntese das citocinas anti-inflamatórias como o receptor antagonista de IL-1 (IL-1ra) e IL-10, além do estímulo à liberação de receptores solúveis para TNF (PETERSEN e PEDERSEN, 2005; SILVA e MACEDO, 2011).

O rBlo t 5 foi capaz de promover um aumento significativo na produção de IL-17A mensurada no BALF dos camundongos do grupo rBLOT5 em comparação com os demais grupos. Esta citocina é uma das 7 isoformas da família IL-17 e tem como função a proteção contra bactérias e fungos extracelulares, devido a sua capacidade de recrutar neutrófilos para áreas infectadas, além de ter um papel importante no desenvolvimento de doenças autoimunes (WEAVER *et al.*, 2007; MARTI *et al.*, 2009; NORMANTON e MARTI, 2013). Estes dados mostram que a exposição dos animais a este antígeno recombinante começou a desenvolver uma resposta de característica mais propícia a respostas alérgicas, associado ao aumento, não significativo, da produção de IL-4 no mesmo grupo. Contudo, o período de exposição ao alérgeno rBlo t 5 parece não ter sido suficiente para desencadear uma resposta alérgica típica no modelo de inflamação pulmonar empregado neste estudo.

A IL-10 é considerada a principal citocina reguladora dos processos inflamatórios, sendo secretada após diversos estímulos, sendo o exercício físico um deles. Dentre algumas funções específicas desempenhadas pela IL-10 estão o bloqueio na apresentação de antígenos pelos macrófagos, a inibição na produção de IL-1 $\beta$  e TNF e quimiocinas pelos macrófagos e linfócitos, induzir a mudança de classe de anticorpo (*switch* de anticorpo) para IgG1 em camundongos e, conseqüentemente, a finalização da resposta inflamatória (SMITH, 2000; PETERSEN e PEDERSEN, 2005; SILVA e MACEDO, 2011). Porém, quando se trata do exercício físico, a produção de IL-10 parece estar relacionada diretamente com a intensidade e à

duração do treinamento (MATHUR e PEDERSEN, 2008; GLEESON *et al.*, 2011; SILVA e MACEDO, 2011). Neste sentido, Avila *et al.* (2015) e Bruggemann *et al.* (2015) têm encontrado aumento significativo na produção de IL-10 nos camundongos submetidos à natação de alta intensidade por um período de 6 semanas de treinamento, independente do perfil inflamatório induzido nos modelos estudados. Em nosso estudo que foi empregado a natação de moderada intensidade não foi possível detectar aumento significativo da produção de IL-10 no BALF do grupo rBLOT5-TA. No nosso caso, a atenuação do processo inflamatório observada principalmente pela diminuição de neutrófilos no BALF e aumento da razão dos anticorpos IgG1/IgG2a possa talvez ser mediada pela produção de outras citocinas imunoregulatórias, como a IL-6, IFN- $\gamma$  e TNF.

Por fim, os dados descritos mostram que o exercício aeróbico como a natação promove, de forma natural e biológica, a indução de efeitos anti-inflamatórios mesmo quando realizadas em intensidade moderada. Assim, pode-se concluir que o condicionamento físico aeróbico por meio da natação de intensidade moderada é indicado para a atenuação do processo inflamatório pulmonar em doenças pulmonares, e estudos adicionais precisam ser realizados tanto experimentais incluindo exercícios de alta intensidade por um período mais prolongado bem como envolver pacientes com doenças pulmonares crônicas para confirmar os benefícios dos exercícios aeróbicos no controle do processo inflamatório.



## 8 CONCLUSÃO

Esse estudo mostrou pela primeira vez que o rBlo t 5 é capaz de induzir uma inflamação pulmonar em camundongos BALB/c no modelo proposto para este fim. Além disso, os dados apresentados mostraram que a natação de moderada intensidade é capaz de atenuar o processo inflamatório pulmonar induzido pelo alérgeno rBlo t 5, assim como de promover uma melhora na capacidade física funcional dos animais. Sendo assim, esses dados sugerem que o exercício físico modula a fisiopatologia e atenua a progressão da inflamação pulmonar, podendo constituir a natação de moderada intensidade como uma opção terapêutica não-farmacológica para o controle deste processo patológico no modelo experimental murino proposto, vindo de encontro a negação da hipótese  $H_0$  e validando a hipótese  $H_1$  propostas por este estudo.

## REFERÊNCIAS

- ABBRING, S. et al. Raw Cow's Milk Prevents the Development of Airway Inflammation in a Murine House Dust Mite-Induced Asthma Model. **Front Immunol**, v. 8, 2017.
- ALMEIDA, P. W. et al. Swim training suppresses tumor growth in mice. **J Appl Physiol** (1985), v. 107, n. 1, p. 261-5, Jul 2009. ISSN 8750-7587 (Print)
- ALVAREZ-CASTELLO, M. et al. [Sensitization to mites and occupational allergens in bakery workers of la habana, cuba]. **Rev Alerg Mex**, v. 59, n. 1, p. 9-15, Jan-Mar 2012. ISSN 0002-5151 (Print)
- AVILA, L. C. et al. Effects of High-Intensity Swimming on Lung Inflammation and Oxidative Stress in a Murine Model of DEP-Induced Injury. **PLoS One**, v. 10, n. 9, p. e0137273, 2015. ISSN 1932-6203.
- BARON, R. M. et al. Genetically manipulated mouse models of lung disease: potential and pitfalls. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 302, n. 6, p. L485-97, Mar 15 2012. ISSN 1040-0605 (Print).
- BARRETO, S. S. M. Volumes pulmonares. **J Pneumol**, v. 28, n. Supl 3, p. 83-94, 2002.
- BARRIOS, R. Animal Models of Lung Disease. In: ZANDER, D. S.; POPPER, H. H., *et al* (Ed.). **Molecular Pathology of Lung Diseases**. New York, NY: Springer New York, 2008. p.144-149. ISBN 978-0-387-72430-0.
- BASSEL-DUBY, R.; OLSON, E. N. Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. **Annu Rev Biochem**, v. 75, p. 19-37, 2006. ISSN 0066-4154 (Print)
- BIGLEY, A. B.; SIMPSON, R. J. NK cells and exercise: implications for cancer immunotherapy and survivorship. **Discov Med**, v. 19, n. 107, p. 433-45, Jun 2015. ISSN 1539-6509.
- BINOTTI, R. S. et al. House dust mites in Brazil-an annotated bibliography. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 8, p. 1177-1184, 2001. ISSN 0074-0276.
- BOHM, A. et al. TGF-beta Contributes to Impaired Exercise Response by Suppression of Mitochondrial Key Regulators in Skeletal Muscle. **Diabetes**, v. 65, n. 10, p. 2849-61, Oct 2016. ISSN 0012-1797.
- BOQUETE, M. et al. House dust mite species and allergen levels in Galicia, Spain: a cross-sectional, multicenter, comparative study. **J Investig Allergol Clin Immunol**, v. 16, n. 3, p. 169-76, 2006. ISSN 1018-9068 (Print)

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976. ISSN 0003-2697 (Print)

BRUGGEMANN, T. R. et al. Effects of Swimming on the Inflammatory and Redox Response in a Model of Allergic Asthma. **Int J Sports Med**, v. 36, n. 7, p. 579-84, Jun 2015. ISSN 0172-4622.

BRUHNS, P.; JONSSON, F. Mouse and human FcR effector functions. **Immunol Rev**, v. 268, n. 1, p. 25-51, Nov 2015. ISSN 0105-2896.

BUCHSBAUM, P. **Frases Geniais Que Você Gostaria de Ter Dito**. Rio de Janeiro: Editor Publicizes, 2004. 101.

BUTTERFIELD, T. A.; BEST, T. M.; MERRICK, M. A. The Dual Roles of Neutrophils and Macrophages in Inflammation: A Critical Balance Between Tissue Damage and Repair. **J Athl Train**, v. 41, n. 4, p. 457-65, Oct-Dec 2006. ISSN 1062-6050 (Print).

CAMARGO HIZUME-KUNZLER, D. et al. Aerobic Exercise Decreases Lung Inflammation by IgE Decrement in an OVA Mice Model. **Int J Sports Med**, v. 38, n. 6, p. 473-480, Jun 2017. ISSN 0172-4622.

CANNON, J. G. Inflammatory Cytokines in Nonpathological States. **News Physiol Sci**, v. 15, p. 298-303, Dec 2000. ISSN 0886-1714 (Print)

CARVALHO, K. D. A. et al. Blomia tropicalis Blo t 5 and Blo t 21 recombinant allergens might confer higher specificity to serodiagnostic assays than whole mite extract. **BMC Immunology**, v. 14, n. 1, p. 11, February 27 2013. ISSN 1471-2172.

CECHELLA, J. L. et al. Moderate swimming exercise and caffeine supplementation reduce the levels of inflammatory cytokines without causing oxidative stress in tissues of middle-aged rats. **Amino Acids**, v. 46, n. 5, p. 1187-95, May 2014. ISSN 0939-4451.

CHAN, S. L. et al. Nuclear magnetic resonance structure and IgE epitopes of Blo t 5, a major dust mite allergen. **J Immunol**, v. 181, n. 4, p. 2586-96, Aug 15 2008. ISSN 0022-1767.

CHENG YI, F. et al. Molecular cloning of Blomia tropicalis allergens-a major source of dust mite allergens in the tropics and subtropics. **Inflammation & Allergy-Drug Targets**, v. 5, n. 4, p. 261-266, 2006. ISSN 1871-5281.

CHIANG, L. M. et al. Modulation of dendritic cells by endurance training. **Int J Sports Med**, v. 28, n. 9, p. 798-803, Sep 2007. ISSN 0172-4622 (Print)

CLARKE, D. et al. Dynamics of house dust mite transfer in modern clothing fabrics. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v. 114, n. 4, p. 335-40, Apr 2015. ISSN 1081-1206.

COSTA ROSA, L. F. P. B.; VAISBERG, M. W. Influências do exercício na resposta imune. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 8, p. 167-172, 2002. ISSN 1517-8692.

CURTIS, J. L. Cell-mediated adaptive immune defense of the lungs. **Proc Am Thorac Soc**, v. 2, n. 5, p. 412-6, 2005. ISSN 1546-3222 (Print)

DE CASTRO PEREIRA, C. A. et al. I CONSENSO BRASILEIRO SOBRE ESPIROMETRIA 1996. **J Pneumol**, v. 22, p. 3, 1996.

DE CASTRO PEREIRA, C. A.; SATO, T.; RODRIGUES, S. C. Novos valores de referência para espirometria forçada em brasileiros adultos de raça branca. **J Bras Pneumol**, v. 33, n. 4, p. 397-406, 2007.

DINARELLO, C. A. Historical Review of Cytokines. **Eur J Immunol**, v. 37, n. Suppl 1, p. S34-45, Nov 2007. ISSN 0014-2980 (Print).

DOS SANTOS, C. et al. O efeito do exercício físico agudo e crônico na resposta imunológica de indivíduos portadores do HIV. **RBPFE-Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício**, v. 1, n. 4, 2011. ISSN 1981-9900.

FLYNN, M. G.; MCFARLIN, B. K.; MARKOFSKI, M. M. The Anti-Inflammatory Actions of Exercise Training. **Am J Lifestyle Med**, v. 1, n. 3, p. 220-235, May 2007. ISSN 1559-8276

FREITAS, M. P. et al. PHYSICAL EXERCISE EFFECTS ON THE IMMUNE SYSTEM IN POSTMENOPAUSAL WOMEN: SYSTEMATIC REVIEW. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 22, n. 5, p. 420-425, 2016. ISSN 1517-8692.

GAO, Y. F. et al. Identification and characterization of a novel allergen from *Blomia tropicalis*: Blo t 21. **J Allergy Clin Immunol**, v. 120, 2007.

GAUTRIN, D. et al. Incidence and determinants of IgE-mediated sensitization in apprentices: a prospective study. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 162, n. 4, p. 1222-1228, 2000. ISSN 1535-4970.

GAVRIELI, R. et al. **The Effect of Aerobic Exercise on Neutrophil Functions.** 2008. 1623-8.

GELLER, M. *Blomia tropicalis* sensitization as a risk factor for the development of allergic rhinitis. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v. 84, n. 3, p. 369, Mar 2000. ISSN 1081-1206

GLEESON, M. et al. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 9, p. 607-15, Aug 5 2011. ISSN 1474-1733.

GLEESON, M.; MCFARLIN, B.; FLYNN, M. Exercise and Toll-like receptors. **Exerc Immunol Rev**, v. 12, p. 34-53, 2006. ISSN 1077-5552 (Print)

GUMUCIO, J. P. TGF- $\beta$  superfamily signaling in muscle and tendon adaptation. v. 43, n. 2, p. 93-9, Apr 2015. ISSN 0091-6331 (Print).

HALLSTRAND, T. S. et al. Airway epithelial regulation of pulmonary immune homeostasis and inflammation. **Clin Immunol**, v. 151, n. 1, p. 1-15, Mar 2014. ISSN 1521-6616.

HARRISS, D. J.; ATKINSON, G. Ethical standards in sport and exercise science research: 2014 update. **Int J Sports Med**, v. 34, n. 12, p. 1025-8, Dec 2013. ISSN 0172-4622.

HASPELAGH, E. et al. Murine Models of Allergic Asthma. **Methods Mol Biol**, v. 1559, p. 121-136, 2017. ISSN 1064-3745.

HIROSE, L. et al. Changes in inflammatory mediators following eccentric exercise of the elbow flexors. **Exerc Immunol Rev**, v. 10, p. 75-90, 2004. ISSN 1077-5552 (Print)

HSIA, C. C. W. et al. Evolution of Air Breathing: Oxygen Homeostasis and the Transitions from Water to Land and Sky. **Compr Physiol**, v. 3, n. 2, p. 849-915, Apr 2013.

HSU, T. G. et al. Leukocyte mitochondria alterations after aerobic exercise in trained human subjects. **Med Sci Sports Exerc**, v. 34, n. 3, p. 438-42, Mar 2002. ISSN 0195-9131 (Print)

HUSSEIN, A. H.; ELAWAMY, W. Quantitation of Blomia tropicalis allergen Blo t 5 in cereal and cereal-based foods consumed in the Nile Delta, Egypt. **Am J Trop Med Hyg**, v. 93, n. 1, p. 194-7, Jul 2015. ISSN 0002-9637.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. **Nat Immunol**, v. 16, n. 4, p. 343-53, Apr 2015. ISSN 1529-2908.

JEEVARATHNUM, A. C. et al. Prevalence of Blomia tropicalis allergy in two regions of South Africa. **S Afr Med J**, v. 105, n. 7, p. 567-9, Sep 21 2015. ISSN 0256-9574 (Print).

JULIA-SERDA, G. et al. Prevalence of sensitization to Blomia tropicalis among young adults in a temperate climate. **J Asthma**, v. 49, n. 4, p. 349-54, May 2012. ISSN 0277-0903.

KIDON, M. I. et al. Mite component-specific IgE repertoire and phenotypes of allergic disease in childhood: the tropical perspective. **Pediatr Allergy Immunol**, v. 22, 2011.

KIM, S. H.; KIM, E. K.; CHOI, E. J. High-intensity swimming exercise increases dust mite extract and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene-derived atopic dermatitis in BALB/c mice. **Inflammation**, v. 37, n. 4, p. 1179-85, Aug 2014. ISSN 0360-3997.

KIZAKI, T. et al. Adaptation of macrophages to exercise training improves innate immunity. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 372, n. 1, p. 152-6, Jul 18 2008. ISSN 0006-291x.

KLING, M. A. A review of respiratory system anatomy, physiology, and disease in the mouse, rat, hamster, and gerbil. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 14, n. 2, p. 287-337, 2011. ISSN 1094-9194.

KOHUT, M. L.; SENCHINA, D. S. Reversing age-associated immunosenescence via exercise. **Exerc Immunol Rev**, v. 10, p. 6-41, 2004. ISSN 1077-5552 (Print)

KUO, I. C. et al. An extensive study of human IgE cross-reactivity of Blo t 5 and Der p 5. **J Allergy Clin Immunol**, v. 111, n. 3, p. 603-9, Mar 2003. ISSN 0091-6749 (Print)

LEVITZKY, M. G. **LANGE Pulmonary Physiology**. México: McGraw-Hill Interamericana, 2008. 280 ISBN 978-85-7726-053-9.

LIM, L. H. et al. High-level expression of a codon optimized recombinant dust mite allergen, Blo t 5, in Chinese hamster ovary cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 316, n. 4, p. 991-6, Apr 16 2004. ISSN 0006-291X (Print)

LOPES, A. J.; NORONHA, A.; MAFORT, T. Mecanismos de defesa do aparelho respiratório. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 9, n. 2, 2010. ISSN 1983-2567.

LOWE, J.; ANDERSON, P. **Stevens & Lowe's Human Histology**. Elsevier, 2015. 448 ISBN 9780323314664.

MALM, C. et al. Leukocytes, cytokines, growth factors and hormones in human skeletal muscle and blood after uphill or downhill running. **J Physiol**, v. 556, n. Pt 3, p. 983-1000, May 1 2004. ISSN 0022-3751 (Print)

MANOLIO, T. A. et al. Correlates of sensitization to *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus* in asthma in Barbados. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 131, n. 2, p. 119-26, Jun 2003. ISSN 1018-2438 (Print)

MARTI, L. et al. Alterations in cytokine profile and dendritic cells subsets in peripheral blood of rheumatoid arthritis patients before and after biologic therapy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1173, n. 1, p. 334-342, 2009. ISSN 1749-6632.

MARTIN, T. R.; FREVERT, C. W. Innate Immunity in the Lungs. **Proc Am Thorac Soc**, v. 2, n. 5, p. 403-11, Dec 2005. ISSN 1546-3222 (Print).

MARTINEZ JIMENEZ, N. E.; AGUILAR ANGELES, D.; ROJAS RAMOS, E. [Sensitization to *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*, farinae and siboney prevalence in patients with rhinitis, allergic asthma, or both, in a population of a metropolitan area of Mexico City]. **Rev Alerg Mex**, v. 57, n. 1, p. 3-10, Jan-Feb 2010. ISSN 0002-5151 (Print)

MASON, H. J. et al. Levels of house dust mite allergen in cars. **Arh Hig Rada Toksikol**, v. 66, n. 3, p. 209-12, Sep 1 2015. ISSN 0004-1254.

MATHUR, N.; PEDERSEN, B. K. Exercise as a Mean to Control Low-Grade Systemic Inflammation. **Mediators Inflamm**, v. 2008, 2008. ISSN 0962-9351 (Print).

MILLS, K. H.; MCGUIRK, P. Antigen-specific regulatory T cells--their induction and role in infection. **Semin Immunol**, v. 16, n. 2, p. 107-17, Apr 2004. ISSN 1044-5323 (Print)

MINETTO, M. et al. Differential responses of serum and salivary interleukin-6 to acute strenuous exercise. **Eur J Appl Physiol**, v. 93, n. 5-6, p. 679-86, Mar 2005. ISSN 1439-6319 (Print)

MOLDOVEANU, A. I.; SHEPHARD, R. J.; SHEK, P. N. The cytokine response to physical activity and training. **Sports Med**, v. 31, n. 2, p. 115-44, Feb 2001. ISSN 0112-1642 (Print)

MOORE, B. B.; HOGABOAM, C. M. Murine models of pulmonary fibrosis. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 294, n. 2, p. L152-60, Feb 2008. ISSN 1040-0605 (Print)

MORI, J. C. et al. Determination of *Blomia tropicalis*-specific IgE and IgG subclasses in atopic dermatitis patients. **Allergy**, v. 56, n. 2, p. 180-4, Feb 2001. ISSN 0105-4538 (Print)

NAIK, M. T. et al. Roles of structure and structural dynamics in the antibody recognition of the allergen proteins: an NMR study on *Blomia tropicalis* major allergen. **Structure**, v. 16, n. 1, p. 125-36, Jan 2008. ISSN 0969-2126 (Print)

NAVALTA, J. W.; SEDLOCK, D. A.; PARK, K. S. Effect of exercise intensity on exercise-induced lymphocyte apoptosis. **Int J Sports Med**, v. 28, n. 6, p. 539-42, Jun 2007. ISSN 0172-4622 (Print)

NIEMAN, D. C. et al. Influence of carbohydrate ingestion on immune changes after 2 h of intensive resistance training. **J Appl Physiol (1985)**, v. 96, n. 4, p. 1292-8, Apr 2004. ISSN 8750-7587 (Print)

NORMANTON, M.; MARTI, L. C. Current data on IL-17 and Th17 cells and implications for graft versus host disease. **Einstein (Sao Paulo)**, v. 11, n. 2, p. 237-246, 2013. ISSN 1679-4508.

OCHS, M. et al. The number of alveoli in the human lung. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 169, n. 1, p. 120-4, Jan 1 2004. ISSN 1073-449X (Print)

PATELIS, A. et al. Aeroallergen and food IgE sensitization and local and systemic inflammation in asthma. **Allergy**, v. 69, n. 3, p. 380-7, Mar 2014. ISSN 0105-4538.

PATWA, A.; SHAH, A. Anatomy and physiology of respiratory system relevant to anaesthesia. **Indian J Anaesth**, v. 59, n. 9, p. 533-41, Sep 2015. ISSN 0019-5049 (Print).

PEAKE, J. M. et al. Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: regulatory mechanisms and exercise effects. **Exerc Immunol Rev**, v. 21, p. 8-25, 2015. ISSN 1077-5552 (Print)

PEFURA-YONE, E. W.; AFANE-ZE, E.; KUABAN, C. [Sensitization to *Blomia tropicalis* among asthmatic patients in Yaounde, Cameroon]. **Rev Mal Respir**, v. 32, n. 1, p. 24-9, Jan 2015. ISSN 0761-8425.

PETERSEN, A. M.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. **J Appl Physiol (1985)**, v. 98, n. 4, p. 1154-62, Apr 2005. ISSN 8750-7587 (Print)

PIRES, M. C. et al. Reactivity of anti-*Blomia tropicalis* IgG and IgE in patients with atopic dermatitis. **Clin Exp Dermatol**, v. 27, n. 4, p. 309-13, Jun 2002. ISSN 0307-6938 (Print)

POORTMANS, J. R. Serum protein determination during short exhaustive physical activity. **J Appl Physiol**, v. 30, n. 2, p. 190-2, Feb 1971. ISSN 0021-8987 (Print)

PRESTES, J.; FOSCHINI, D.; DONATTO, F. F. EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE O SISTEMA IMUNE PHYSICAL EXERCISES EFFECT ON THE IMMUNE SYSTEM. **Revista de Atenção à Saúde (antiga Rev. Bras. Ciên. Saúde)**, v. 4, n. 7, 2010. ISSN 2359-4330.

RAMOS, D. S. et al. Low-intensity swimming training partially inhibits lipopolysaccharide-induced acute lung injury. **Med Sci Sports Exerc**, v. 42, n. 1, p. 113-9, Jan 2010. ISSN 0195-9131.



REDDY, A. T.; LAKSHMI, S. P.; REDDY, R. C. Murine model of allergen induced asthma. **J Vis Exp**, n. 63, p. e3771, May 14 2012. ISSN 1940-087x.

ROBINSON, D. S. et al. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. **N Engl J Med**, v. 326, n. 5, p. 298-304, Jan 30 1992. ISSN 0028-4793 (Print)

RODRIGUES, A. M. et al. Proposta de um modelo murino de curta duração de resposta pulmonar alérgica aguda sem utilização de adjuvante. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 38, p. 595-604, 2012. ISSN 1806-3713.

ROSA, C.; BICUDO, L. F. P.; VAISBERG, M. W. Influências do exercício na resposta imune. **Revista brasileira de Medicina do Esporte**, 2002. ISSN 1517-8692.

RUBIN, A. S. Espirometria na prática médica Spirometry in medical practice. **Revista AMRIGS**, v. 49, n. 3, p. 183-194, 2005.

SADE, K.; ROITMAN, D.; KIVITY, S. Sensitization to Dermatophagoides, Blomia tropicalis, and other mites in atopic patients. **J Asthma**, v. 47, n. 8, p. 849-52, Oct 2010. ISSN 0277-0903.

SANO, H.; KUROKI, Y. The lung collectins, SP-A and SP-D, modulate pulmonary innate immunity. **Mol Immunol**, v. 42, n. 3, p. 279-87, Feb 2005. ISSN 0161-5890 (Print)

SAXTON, J. M. et al. Peripheral blood leucocyte functional responses to acute eccentric exercise in humans are influenced by systemic stress, but not by exercise-induced muscle damage. **Clin Sci (Lond)**, v. 104, n. 1, p. 69-77, Jan 2003. ISSN 0143-5221 (Print)

SHARMA, G.; GOODWIN, J. Effect of aging on respiratory system physiology and immunology. **Clin Interv Aging**, v. 1, n. 3, p. 253-60, Sep 2006. ISSN 1176-9092 (Print).

SHEK, L. P. et al. Specific profiles of house dust mite sensitization in children with asthma and in children with eczema. **Pediatr Allergy Immunol**, v. 21, n. 4 Pt 2, p. e718-22, Jun 2010. ISSN 0905-6157.

SHIMIZU, K. et al. Effect of moderate exercise training on T-helper cell subpopulations in elderly people. **Exerc Immunol Rev**, v. 14, p. 24-37, 2008. ISSN 1077-5552 (Print)

SILVA, F. O. C. D.; MACEDO, D. V. Physical exercise, inflammatory process and adaptive condition: an overview. **Revista Brasileira de Cineantropometria & Desempenho Humano**, v. 13, n. 4, p. 320-328, 2011. ISSN 1980-0037.

SMITH, L. L. Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? **Med Sci Sports Exerc**, v. 32, n. 2, p. 317-31, Feb 2000. ISSN 0195-9131 (Print)

SOUTHAM, D. S. et al. Distribution of intranasal instillations in mice: effects of volume, time, body position, and anesthesia. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 282, n. 4, p. L833-9, Apr 2002. ISSN 1040-0605 (Print)

STEENSBERG, A. et al. Prolonged exercise, lymphocyte apoptosis and F2-isoprostanes. **Eur J Appl Physiol**, v. 87, n. 1, p. 38-42, May 2002. ISSN 1439-6319 (Print)

SUZUKI, K. et al. Exhaustive exercise and type-1/type-2 cytokine balance with special focus on interleukin-12 p40/p70. **Exerc Immunol Rev**, v. 9, p. 48-57, 2003. ISSN 1077-5552

SUZUKI, K. et al. Systemic inflammatory response to exhaustive exercise. Cytokine kinetics. **Exerc Immunol Rev**, v. 8, p. 6-48, 2002. ISSN 1077-5552 (Print)

TAN, K. W. et al. NMR Structure and IgE Epitopes of Blo t 21, a Major Dust Mite Allergen from *Blomia tropicalis*. **J Biol Chem**, v. 287, n. 41, p. 34776-85, Oct 5 2012. ISSN 0021-9258 (Print).

TERRA, R. et al. Effect of exercise on immune system: response, adaptation and cell signaling. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 18, n. 3, p. 208-214, 2012. ISSN 1517-8692.

THOMAS, W. R. et al. Pyroglyphid house dust mite allergens. **Protein Pept Lett**, v. 14, n. 10, p. 943-53, 2007. ISSN 0929-8665 (Print)

TIMMONS, B. W.; CIESLAK, T. Human natural killer cell subsets and acute exercise: a brief review. **Exerc Immunol Rev**, v. 14, p. 8-23, 2008. ISSN 1077-5552 (Print)

TOFT, A. D. et al. Cytokine response to eccentric exercise in young and elderly humans. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 283, n. 1, p. C289-95, Jul 2002. ISSN 0363-6143 (Print)

TOLEDO, A. C. et al. Aerobic exercise attenuates pulmonary injury induced by exposure to cigarette smoke. **Eur Respir J**, v. 39, n. 2, p. 254-64, Feb 2012. ISSN 0903-1936.

TRAKULTIVAKORN, M.; NUGLOR, T. Sensitization to *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Blomia tropicalis* extracts and recombinant mite allergens in atopic Thai patients. **Asian Pac J Allergy Immunol**, v. 20, n. 4, p. 217-21, Dec 2002. ISSN 0125-877X (Print)

TURNER, M. D. et al. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1843, n. 11, p. 2563-2582, 2014. ISSN 0167-4889.

TWIGG, H. L., 3RD. Humoral immune defense (antibodies): recent advances. **Proc Am Thorac Soc**, v. 2, n. 5, p. 417-21, 2005. ISSN 1546-3222 (Print)

VAICKUS, L. J. et al. Assessing Pulmonary Pathology by Detailed Examination of Respiratory Function. **Am J Pathol**, v. 177, n. 4, p. 1861-9, Oct 2010. ISSN 0002-9440

VERHEIJDEN, K. A. et al. Dietary galacto-oligosaccharides prevent airway eosinophilia and hyperresponsiveness in a murine house dust mite-induced asthma model. **Respir Res**, v. 16, p. 17, Feb 7 2015. ISSN 1465-9921.

WEAVER, C. T. et al. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. **Annu Rev Immunol**, v. 25, p. 821-52, 2007. ISSN 0732-0582 (Print)

WHITSETT, J. A.; ALENGHAT, T. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. **Nat Immunol**, v. 16, n. 1, p. 27-35, Jan 2015. ISSN 1529-2908.

WHO/IUIS, A. N. S.-C. *Blomia tropicalis* allergens. Online.

WITARD, O. C. et al. High-intensity training reduces CD8+ T-cell redistribution in response to exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v. 44, n. 9, p. 1689-97, Sep 2012. ISSN 0195-9131.

WOODS, J. A. et al. Exercise training increases the naive to memory T cell ratio in old mice. **Brain Behav Immun**, v. 17, n. 5, p. 384-92, Oct 2003. ISSN 0889-1591 (Print)

XIAO, J. J. Pharmacokinetic models for FcRn-mediated IgG disposition. **J Biomed Biotechnol**, v. 2012, p. 282989, 2012. ISSN 1110-7243.

YAN CHUA, K. et al. The *Blomia tropicalis* allergens. **Protein and peptide letters**, v. 14, n. 4, p. 325-333, 2007. ISSN 0929-8665.

YI, F. C. et al. Immunoglobulin E reactivity of native Blo t 5, a major allergen of *Blomia tropicalis*. **Clin Exp Allergy**, v. 34, 2004. Disponível em: < <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2004.02107.x> >.

ZAKZUK, J. et al. Early life IgE responses in children living in the tropics: a prospective analysis. **Pediatr Allergy Immunol**, v. 24, n. 8, p. 788-97, Dec 2013. ISSN 0905-6157.

## ANEXO

### APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS



Universidade Federal de Uberlândia  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)  
Rua Ceará, S/N - Bloco 2D, sala 02 – CEP 38405-315  
Campus Umuarama – Uberlândia/MG – Ramal (VoIP) 3423;  
e-mail: [ceua@propp.ufu.br](mailto:ceua@propp.ufu.br); [www.comissoes.propp.ufu.br](http://www.comissoes.propp.ufu.br)

#### ANÁLISE FINAL Nº 182/17 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 048/17

Projeto Pesquisa: "Efeitos promovidos pela natação nos parâmetros imunológicos e morfofuncionais de camundongos asmáticos sensibilizados com ácaros da poeira domiciliar".

Pesquisador Responsável: Ernesto Akio Taketomi

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

Situação: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: A CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 07 de novembro de 2017.

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão  
Coordenador da CEUA/UFU  
Portaria nº 665/17