

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

VINÍCIUS JOSÉ DE OLIVEIRA

Efeito sinérgico da suplementação oral com L-glutamina e da natação de moderada intensidade na modulação da resposta imune na asma experimental

Uberlândia

2024

VINÍCIUS JOSÉ DE OLIVEIRA

Efeito sinérgico da suplementação oral com L-glutamina e da natação de moderada intensidade na modulação da resposta imune na asma experimental

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como parte para obtenção do título de doutor.

Orientador: Dr. Ernesto Akio Taketomi

Uberlândia

2024

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

O48 2024	<p>Oliveira, Vinícius José de, 1990- Efeito sinérgico da suplementação oral com L-glutamina e da natação de moderada intensidade na modulação da resposta imune na asma experimental [recurso eletrônico] / Vinícius José de Oliveira. - 2024.</p> <p>Orientador: Ernesto Akio Taketomi. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.te.2024.277 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Imunologia. I. Taketomi, Ernesto Akio, 1963-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 612.017</p>
-------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Tese de Doutorado nº 162				
Data:	28/03/2024	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	17 h 50 min
Matrícula do Discente:	11813IPA006				
Nome do Discente:	Vinícius José de Oliveira				
Título do Trabalho:	Efeito sinérgico da suplementação oral com L-glutamina e da natação de moderada intensidade na modulação da resposta imune na asma experimental				
Área de concentração:	Imunobiologia dos processos alérgicos, autoimunes e tumorais				
Linha de pesquisa:	Biotecnologia empregada no diagnóstico e controle de doenças				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Análise dos efeitos da suplementação com aminoácidos não essenciais associada ao exercício físico sobre biomarcadores fisiológicos e imunológicos na asma experimental				

Em 28 de março de 2024, às 14:00 horas, reuniu-se por vídeo conferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta pelos membros titulares: Ernesto Akio Taketomi - ICBIM - UFU (Presidente) orientador do candidato; Dra. Iasmin Aparecida Cunha de Araújo - Pós-doc - DBHEM/ICBIM/UFU; Prof. Dr. Guilherme Moraes Puga - FAEFI / UFU; Prof. Dr. Alexandre Gonçalves - IMEPAC Araguari; Prof. Dr. Cesar Augusto França Abrahão - IFC / HMSJ.

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Prof. Ernesto Akio Taketomi, apresentou a Comissão Examinadora e a candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação, o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

APROVADO

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos,

conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Ernesto Akio Taketomi, Professor(a) do Magistério Superior**, em 03/04/2024, às 15:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Iasmin Aparecida Cunha Araújo, Usuário Externo**, em 03/04/2024, às 16:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cesar Augusto França Abrahão, Usuário Externo**, em 03/04/2024, às 20:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alexandre Gonçalves, Usuário Externo**, em 03/04/2024, às 21:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Morais Puga, Professor(a) do Magistério Superior**, em 04/04/2024, às 09:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5311123** e o código CRC **2633DB86**.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço à Deus por essa etapa vencida. Hoje, em profunda gratidão e humildade, dirijo-me a Ele para expressar minha mais sincera gratidão pela conclusão bem-sucedida do meu doutorado. Em cada página escrita, em cada desafio enfrentado e em cada momento de superação, reconheço a Tua orientação e o Teu amor inabalável que me sustentaram.

“Porque sou eu que conheço os planos que tenho para vocês”, diz o Senhor, “planos de fazê-los prosperar e não de causar dano, planos de dar a vocês esperança e um futuro.” Jeremias capítulo 29, versículo 11.

Aos camundongos participantes dos modelos experimentais expresso meu respeito e gratidão. Cada experimento, cada resultado, foi possível graças à sua dedicação silenciosa nos bastidores do laboratório. Ao longo desta jornada de pesquisa, esses pequenos seres desempenharam um papel crucial, permitindo-me investigar e compreender uma série de fenômenos biológicos complexos. Seu papel fundamental em minha pesquisa nunca será esquecido, e os resultados alcançados serão um testemunho duradouro de sua importância.

Agradeço também à minha família pelo seu amor incondicional, apoio inabalável e compreensão ao longo dos anos. Identifico especialmente os meus pais, Adilso e Lucimar, por terem sido fontes de inspiração e por terem me ensinado os valores fundamentais que me guiaram durante este percurso acadêmico. Além disso, reconheço o apoio e amor de minha irmã Bruna em todo processo.

Ao meu orientador, professor Doutor Ernesto Akio Taketomi, expresso minha sincera gratidão pela orientação sábia, paciência infinita e apoio incansável ao longo deste projeto. Seus *insights* e conselhos foram inestimáveis e moldaram significativamente o curso desta pesquisa.

Aos meus companheiros de Laboratório, Laura, Thiago e Alessandro, agradeço por compartilharem comigo não apenas os desafios, mas também os momentos de alegria ao longo deste percurso. Suas discussões estimulantes e apoio mútuo foram fundamentais para o meu crescimento pessoal e acadêmico.

Agradeço aos membros da banca avaliadora da Tese pela sua dedicação em revisar este trabalho e fornecer valiosas sugestões e críticas construtivas.

Dirijo minha gratidão ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas e às técnicas administrativas, Lucélia e Cláudia, por resolverem os inúmeros problemas que surgiram durante todo o processo desde minha admissão no Programa até a finalização e defesa dessa Tese.

Este trabalho é dedicado a todos aqueles que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a sua realização. Obrigado por fazerem parte desta jornada.

“E um homem não me define,
Minha casa não me define,
Minha carne não me define,
Eu sou meu próprio lar.”

Compositores: Andrei Martinez Kozyreff / Juliana Strassacapa / Mateo Piracés-Ugarte / Rafael Gomes / Sebastián Piracés-Ugarte

RESUMO

Introdução: Os tratamentos não farmacológicos para o controle da asma desempenham um papel significativo na melhoria da qualidade de vida dos pacientes, complementando a abordagem convencional baseada em medicamentos. Intervenções como a educação sobre a doença e a prática regular de exercícios físicos, têm demonstrado impactos positivos na gestão da asma. **Objetivo:** Avaliar os efeitos promovidos pela suplementação oral com o aminoácido L-glutamina e da natação de moderada intensidade, isoladamente ou associados, sobre os parâmetros imunológicos e morfofuncionais de um modelo experimental de asma. **Materiais e métodos:** 120 camundongos BALB/c fêmeas, com 20 gramas aproximadamente e idades entre 5 e 8 semanas, foram sensibilizados duas vezes com 50 µg de ovoalbumina (OVA) grade V (i.p.) em intervalos de 7 dias. Sequencialmente, na fase de desafios os animais receberam instilações com 20 µL de uma suspensão contendo 10 µg de OVA grade V durante cinco dias. Como tratamento os animais foram submetidos à natação de moderada intensidade 5 vezes por semana durante quatro semanas; e receberam o suplemento oral de L-glutamina em doses de 1 g/kg do peso do animal nos mesmos períodos da natação. Foram avaliados o volume corrente, frequência respiratória e volume-minuto, condicionamento físico, os níveis de anticorpos IgE e IgG específicos à OVA e as subclasses de IgG (IgG1 e IgG2a), citocinas, lactato plasmático e histopatologia pulmonar. A análise estatística foi realizada pelo *Graph Pad Prism 6*. **Resultados:** Após seguir um programa de natação e suplementação por quatro semanas, os camundongos demonstraram melhora no condicionamento físico, redução na liberação de lactato plasmático, recuperação dos parâmetros respiratórios basais, diminuição nos níveis de citocinas com perfil Th2 (IL-5) e aumento nas citocinas regulatórias (IL-10) e com perfil Th1 (IFN-γ). Além disso, observou-se uma restauração histológica nos pulmões. Contudo, entre os grupos analisados, não foram registradas variações significativas na resposta imunológica humoral dos animais asmáticos submetidos às terapias utilizadas. **Conclusão:** A natação e a suplementação com L-glutamina demonstraram um impacto significativo no efeito anti-inflamatório da asma experimental. Identificou-se que as terapêuticas aplicadas modularam as respostas imunológicas associadas à asma. A combinação dessas duas abordagens mostrou efeitos sinérgicos, reduzindo a inflamação brônquica na asma experimental.

Palavras-chave: Asma Brônquica; Exercício Aeróbico; Glutamina; Imunoalergologia.

ABSTRACT

Introduction: Non-pharmacological treatments for asthma control play a significant role in improving the quality of life for patients, complementing the conventional drug-based approach. Interventions such as disease education and regular physical exercise have demonstrated positive impacts on asthma management. **Aim:** Evaluate the effects promoted by oral supplementation with the amino acid L-glutamine and moderate-intensity swimming, either individually or combined, on the immunological and morphofunctional parameters of an experimental model of asthma. **Materials and Methods:** 120 female BALB/c mice, weighing approximately 20 grams and aged between 5 and 8 weeks, were sensitized twice with 50 µg of ovalbumin (OVA) grade V (i.p.) at 7-day intervals. Sequentially, during the challenge phase, the animals received instillations of 20 µL of a suspension containing 10 µg of OVA grade V for five days. As a treatment, the animals underwent moderate-intensity swimming five times a week for four weeks and received oral supplementation of L-glutamine at doses of 1 g/kg of the animal's weight during the same periods as swimming. Parameters evaluated included tidal volume, respiratory rate, minute volume, physical conditioning, specific IgE and IgG antibody levels to OVA, IgG subclasses (IgG1 and IgG2a), cytokines, plasma lactate, and lung histopathology. Statistical analysis was performed using Graph Pad Prism 6. **Results:** After following a swimming and supplementation program for four weeks, mice showed improved physical conditioning, reduced release of plasma lactate, recovery of baseline respiratory parameters, decreased levels of Th2 profile cytokines (IL-5), increased regulatory cytokines (IL-10), and Th1 profile cytokines (IFN-γ). Additionally, histological restoration in the lungs was observed. However, among the analyzed groups, no significant variations were recorded in the humoral immune response of asthmatic animals subjected to the therapies used. **Conclusion:** Swimming and L-glutamine supplementation demonstrated a significant impact on the anti-inflammatory effect of experimental asthma. It was identified that the applied therapies modulated immune responses associated with asthma. The combination of these two approaches showed synergistic effects, reducing bronchial inflammation in experimental asthma.

Keywords: Bronchial Asthma; Aerobic Exercise; Glutamine; Immunology and Allergy.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 Fisiopatologia da asma	14
2.2 Exercício físico e resposta imune	17
2.3 Aminoácidos e resposta imune	21
3 HIPÓTESES	25
4 OBJETIVOS	26
4.1 Objetivo geral	26
4.2 Objetivos específicos	26
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
5.1 Aspectos éticos da pesquisa.....	27
5.2 Modelos experimentais	27
5.3 Análise da função respiratória.....	32
5.4 Processamento e análise de materiais biológicos.....	32
5.5 Análise estatística	36
6 RESULTADOS	37
6.1 Influência da variação da carga do TPC sobre a performance dos camundongos	37
6.2 Efeitos do treinamento sobre os níveis de lactato plasmáticos	38
6.3 Efeitos dos protocolos terapêuticos no funcionamento pulmonar dos camundongos	38
6.4 Efeitos dos protocolos terapêuticos sobre a resposta imune humoral	41
6.5 Efeitos dos protocolos terapêuticos sobre a secreção de citocinas	42
6.6 Análise histopatológica pulmonar dos grupos experimentais.....	44
7 DISCUSSÃO	45
8 CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS	53
ANEXO.....	64
Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais	64

1 INTRODUÇÃO

A asma é uma doença inflamatória crônica heterogênea das vias aéreas que acometeu mais de 260 milhões de pessoas em todo o mundo em 2019 (BUSH, 2019), variando de 1% a 18% da população (ASHER et al., 2017; SORIANO et al., 2020). Embora os mecanismos fisiopatológicos da asma ainda não sejam totalmente compreendidos, pode-se concluir que é uma doença inflamatória crônica multifatorial das vias aéreas que leva a sintomas clínicos como chiado, falta de ar, aperto no peito e, às vezes, tosse (BUSH, 2019).

Um mecanismo molecular essencial associado à asma é a inflamação do tipo 2, presente na maioria (embora não em todos) dos pacientes com essa condição. As respostas imunológicas tipo 2 (T2) nas vias aéreas são predominantemente conduzidas por células epiteliais, nervos sensoriais do tipo C, células linfoides inatas do grupo 2 (ILC2), eosinófilos, mastócitos, basófilos, células T auxiliares do tipo 2 (Th2), células B produtoras de IgE, entre outras (PIJNENBURG; FLEMING, 2020; HABIB; PASHA; TANG, 2022).

A inflamação e a remodelação patológica das vias aéreas são elementos essenciais na manifestação da asma. As principais modificações histopatológicas dessas vias são o aumento na deposição de proteínas da matriz extracelular e proteoglicanos, dano epitelial, hiperplasia e hipertrofia das células musculares lisas das vias aéreas, metaplasia das células caliciformes e hipersecreção de muco, angiogênese, neuroplasticidade das vias aéreas e fibrose subepitelial (BOULET, 2017; BOULET, 2018; KISTEMAKER; PRAKASH, 2019).

Apesar do amplo uso de corticosteroides inalados para gerenciar a asma, essas abordagens não conseguem reverter o processo contínuo de remodelação patológica das vias aéreas (BOULET, 2018; VARRICCHI et al., 2022). Portanto, há necessidade não atendida na asma, podendo ser suplementada com estratégias terapêuticas inovadoras. Evidências recentes sugerem que o condicionamento físico aeróbico (RAMACHANDRAN et al., 2021) e a suplementação exógena com aminoácidos não essenciais, como a glutamina (OLIVEIRA et al., 2016), podem resultar na atenuação do processo inflamatório de doenças crônicas pulmonares, como a asma.

A realização desta pesquisa é motivada pela necessidade de compreender os efeitos da combinação entre a suplementação oral com L-glutamina e a natação de

moderada intensidade sobre os parâmetros clínicos da asma experimental, visando potenciais indicações de terapias não farmacológicas que sejam aplicadas à doença e melhorem o estado clínico dos animais. Assim, os resultados alcançados podem fornecer *insights* para investigações futuras envolvendo pacientes humanos.

Embora haja evidências na literatura de que a suplementação com L-glutamina aumenta sua biodisponibilidade nos fluidos corporais e beneficia processos metabólicos e imunológicos, como a produção de energia para células de rápida divisão e a atividade antioxidante, não há ainda confirmação sobre seu uso em pacientes com doenças alérgicas, como a asma. Diante desse cenário, esta pesquisa se dedica a explorar o sinergismo da combinação da suplementação com o exercício físico, contribuindo para o avanço do conhecimento nessa área específica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 FISIOPATOLOGIA DA ASMA

A asma, que atingiu cerca de 260 milhões de pessoas em todo o mundo em 2019 (BUSH, 2019), é uma condição inflamatória crônica heterogênea das vias respiratórias. Uma característica distintiva da asma é a restrição variável do fluxo de ar, manifestando-se por sintomas como falta de ar, tosse, sibilância e aperto no peito (BUSH, 2019; VARRICCHI et al., 2022). A diversidade do distúrbio imunológico se reflete em diferentes fenótipos e endótipos, que diferem em causas, mecanismos patogênicos, sintomas e gravidade (VARRICCHI et al., 2022).

Com fundamentação na principal rota imuno-inflamatória em questão, são descritos distintos endótipos para categorizar a asma, incluindo o tipo 2-alto (T2-alto), tipo 2-baixo (T2-baixo) e subtipos mistos. Esses endótipos englobam diversas vias fisiopatológicas comuns, abrangendo subtipos genéticos e epigenéticos, aspectos metabólicos, neurais e de remodelação (AGACHE, 2019; CEVHERTAS et al., 2020; AGACHE et al., 2021).

Na asma T2-alto, estímulos do sistema imunológico, como alérgenos, antígenos virais e bacterianos, desencadeiam a ativação de células efetoras primárias envolvidas no processo inflamatório alérgico, como mastócitos e eosinófilos, por meio da interação com IgE específica (BARTEMES; KITA, 2012; FAHY, 2015). Além disso, teorias modernas indicam que a imunidade tipo 2 (T2) pode ser predominantemente impulsionada por disfunções nos tecidos, particularmente disfunção das células que compõe a barreira epitelial, em contraste com a ativação direta por meio do reconhecimento de antígenos (AGACHE et al., 2021).

As citocinas derivadas de células epiteliais brônquicas e das células linfoides inatas do grupo 2 (ILC2) desencadeiam o desenvolvimento asma T2-alto ao estimular a ativação das células dendríticas (DC) e induzir alterações fenotípicas nas vias aéreas, como a hiperreatividade brônquica. Isso é seguido pela migração das células dendríticas para os tecidos linfoides secundários (TLS), onde apresentam o alérgeno às células T *naïve*, orientando-as em direção a um perfil T *helper 2* (Th2).

Essas citocinas derivadas de células epiteliais brônquicas [Linfopoiatina Estromal Tímica (TSLP), Interleucina (IL) 33 e IL-25], conhecidas como alarminas, atuam iniciando eventos imunológicos que intermedeiam a ativação, sobrevivência e

liberação de citocinas do perfil Th2 pelas ILC2, tais como a IL-4, IL-13, IL-5, anfiregulina e IL-9 (VARRICCHI et al., 2018; JOHANSSON; MCSORLEY, 2019; AGACHE et al., 2021; BOROWCZYK et al., 2021).

No entanto, diversos desencadeadores, como proteases em alérgenos (ácaros, fungos, polens, insetos), antígenos virais, bacterianos e estímulos inespecíficos como poluentes, fumaça de cigarro, podem ativar as ILC2. Essa ativação é induzida pelas alarminas, especialmente a TSLP, produzida pelas células epiteliais das vias aéreas. Essas células ILC2 liberam citocinas como IL-5, IL-13 e IL-9, resultando em eosinofilia, hipersecreção pela ativação de células caliciformes/remodelamento pela ativação de fibroblastos produtoras de colágeno e ativação de mastócitos. Por outro lado, as ILC2 não produzem IL-4, o que leva à ausência da produção de anticorpos IgE pelas células B. Isso caracteriza a asma com o endotipo T2-alto eosinofílico não alérgico (RUSSELL; BRIGHTLING, 2017; GAUVREAU et al., 2020).

O perfil celular fundamental no desenvolvimento da asma T2-alto é constituído pelos eosinófilos. Essas células e seus mediadores desempenham um papel fundamental na patogênese tanto da asma mediada por IgE quanto da asma não mediada por IgE, contribuindo para a promoção da asma eosinofílica alérgica e não alérgica, respectivamente. Para tanto, a citocina-chave responsável pela indução da quimiotaxia e ativação dos eosinófilos é a IL-5 (BARTEMES; KITA, 2012; FAHY, 2015).

A asma T2-baixo apresenta uma complexa heterogeneidade ainda não completamente compreendida. Essa condição envolve diversos fenótipos, destacando-se o papel crucial de mastócitos, macrófagos e neutrófilos, ou uma combinação destas células imunológicas (NAIR; SURETTE; VIRCHOW, 2021; WENZEL, 2021). De forma simplificada, é conhecida como asma não eosinofílica, caracterizando-se por diferentes endotipos inflamatórios, predominantemente associados à ação dos neutrófilos.

Neste contexto, Gauvreau et al. (2020) destacaram a influência da TSLP (linfopoetina estromal tímica) produzida pelas células epiteliais em resposta a estímulos antigênicos como vírus, bactérias e poluentes. Essa proteína desencadeia a ativação de macrófagos e células dendríticas, as quais apresentam antígenos às células T helper, desenvolvendo predominantemente para o perfil Th17. Este perfil é caracterizado pela produção de citocinas, incluindo IL-17A, IL-17F, IL-22 e TNF α (fator

de necrose tumoral alfa). Simultaneamente, as células ILC precursoras podem alternativamente diferenciar-se em células linfoides inatas do grupo 3 (ILC3), atuando sinergicamente como reguladores importantes da inflamação T17. As citocinas produzidas por essas células ILC3/T17 ativam as células epiteliais bronquiais para a produção de moléculas promotoras de neutrofilia, como CXCL-8 (quimiocina [C-X-C motif] ligante 8), conhecida também como IL-8, e GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos).

Além disso, a TSLP desencadeia alterações estruturais que contribuem para o remodelamento da via aérea, envolvendo a ativação de células do músculo liso aéreo, plasmócitos e fibroblastos produtores de colágeno (RUSSELL; BRIGHTLING, 2017; GAUVREAU et al., 2020). Ainda, de acordo com Russell e Brightling (2017), embora raras, a asma pode se manifestar em dois outros endotipos, a paucigranulocítica, onde não há infiltração significativa de eosinófilos ou neutrófilos, e a mista (eosinofílica e granulocítica), que envolve inflamação tanto T2 quanto T1/T17, condição inflamatória que raramente ocorre simultaneamente. Esses autores destacam que o endotipo T2-baixo isolado genuíno pode ser muito menos comum do que se pensa atualmente. Muitos pacientes com asma do endotipo T2-baixo podem, na verdade, ter o endotipo T2-alto, que pode estar mascarado pelo uso de corticosteroides.

Portanto, é importante considerar que sintomas persistentes em pacientes aparentemente tratados com corticosteroides para T2-baixo podem estar relacionados a outros mecanismos e fatores, tanto relacionados à asma quanto não relacionados. Entretanto, em ambos os endótipos da asma, o processo imunopatológico é complexo e exige uma expressão coordenada de fatores fibrogênicos e angiogênicos, resultando em alterações estruturais profundas nas paredes brônquicas provocando o remodelamento das vias aéreas. Essas modificações contribuem para a redução do calibre das vias aéreas, manifestando-se clinicamente em limitações no fluxo de ar e sintomas respiratórios (YICK et al., 2012; LIU et al., 2021).

A reestruturação das vias respiratórias pode impactar tanto as vias aéreas de maior calibre quanto as de menor calibre. Essa condição é marcada por modificações como a transformação das células caliciformes, o acúmulo de proteínas na matriz subepitelial, o desenvolvimento de fibrose, a intensificação da expressão de fatores angiogênicos, e o aumento da hiperplasia/hipertrofia das células musculares lisas das vias respiratórias (HOUGH et al., 2020; LIU et al., 2021; VARRICCHI et al., 2022).

Assim, para o manejo eficiente de pacientes com asma, é essencial encontrar um equilíbrio apropriado entre a aplicação de tratamentos personalizados, guiados pelas diretrizes de gravidade e abordagens específicas adaptadas à medicina de precisão. Ajustar as abordagens clínicas e de pesquisa relacionadas à asma diante de desafios significativos é de extrema importância para progredir nesse campo (AGACHE et al., 2021).

Embora o GINA recomende o uso de corticosteroides inalados em todos os estágios/ graus de gravidade da asma (do estágio 1 ao 5) (GINA, 2023) para o controle dos seus sintomas, essas estratégias não conseguem, em muitos casos, reverter o processo contínuo de remodelação patológica das vias aéreas (BOULET, 2018; VARRICCHI et al., 2022). Portanto, existe uma urgência em desenvolver abordagens terapêuticas inovadoras para atender a essa demanda não atendida. Assim, a indicação da prática de exercícios físicos (VALERIANI et al., 2017) e utilização de suplementação exógena com aminoácidos (KO et al., 2008) constituem uma boa oportunidade para regulação imunológica da asma.

2.2 EXERCÍCIO FÍSICO E RESPOSTA IMUNE

Engajar-se em atividade física e/ou exercício físico, sem depender de medicamentos, é uma eficaz estratégia para prevenir e tratar diversas doenças crônicas. Inclusive, algumas evidências científicas têm contribuído para estabelecer uma relação positiva entre um estilo de vida fisicamente ativo e benefícios para a saúde (GARBER et al., 2011; SCHEFFER; LATINI, 2020).

A prática regular de exercícios é uma modificação no estilo de vida destinada a reduzir a incidência e a mortalidade associadas a doenças da civilização, como obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares e câncer. Até recentemente, acreditava-se que o treinamento regular de exercícios recreativos era benéfico, enquanto exercícios intensos, realizados por atletas profissionais, poderiam ter possíveis consequências prejudiciais (KUROWSKI et al., 2022).

Graças à melhoria nas funções musculoesqueléticas, cardiorrespiratórias e metabólicas, bem como nos aspectos relacionados ao sono, controle da dor, cognição, aprendizagem e memória, a prática de exercícios físicos se configura como uma ferramenta clínica primária não farmacológica para prevenir diversas doenças

cuja fisiopatologia está associada à ativação aguda ou sustentada do sistema imunológico (LLAMAS-VELASCO et al., 2016; NIEMAN; WENTZ, 2019).

De maneira geral, o exercício físico de intensidade moderada e repetida melhora a resposta da função imunológica, fortalece a capacidade antioxidante, diminui o estresse oxidativo e aprimora a eficiência na produção de energia, resultando assim na redução da incidência de doenças inflamatórias (GLEESON et al., 2011; SCHEFFER; LATINI, 2020).

Em geral, a maioria dos estudos que investigam o impacto do exercício nos parâmetros imunológicos e inflamatórios em nível sistêmico concentra-se em exercícios agudos, em vez de considerar exercícios regulares. Além disso, futuros estudos devem levar em conta que as células imunológicas não são a única fonte de proteínas inflamatórias, como IL-6 e periostina, e que os músculos desempenham um papel significativo como fontes de proteínas liberadas na corrente sanguínea durante o exercício (FEBBRAIO; PEDERSEN, 2002; ÖZDEMIR et al., 2014).

O exercício promove a fagocitose, atividade antitumoral, metabolismo reativo de oxigênio e nitrogênio, além de estimular a quimiotaxia dos macrófagos teciduais (WALSH et al., 2011). Os macrófagos teciduais são caracterizados por sua diversidade e plasticidade, podendo adotar um fenótipo pró-inflamatório (M1) ou anti-inflamatório (M2), em resposta a diferentes estímulos. O fenótipo M1 surge da estimulação por ligantes do Receptores *Toll-Like* (TLR) e IFN- γ , enquanto o fenótipo M2 é resultado da estimulação alternativa dos macrófagos por IL-4/IL-13 (SICA et al., 2012).

A transição do fenótipo de macrófagos M1 para M2 tem sido sugerida como uma possível base para os efeitos anti-inflamatórios e, em certa medida, broncoprotetores do exercício (KUROWSKI et al., 2022). Até o momento, a influência do exercício nas polarizações dos macrófagos tem sido predominantemente investigada em modelos animais, nos quais a transição do fenótipo de macrófagos M1 para M2 foi observada (GOH; GOH; ABBASI, 2016; RUFFINO et al., 2016).

Poucos estudos têm se dedicado à investigação das células dendríticas (CDs) no contexto do exercício. Devido ao seu papel na instrução de células T *naïve* durante o processo de diferenciação, as CDs podem impactar a intensidade e a natureza da resposta dependente de linfócitos T (KUROWSKI et al., 2022).

A indução de linfocitose por episódios agudos de exercício tem sido extensivamente documentada em estudos com seres humanos (KUROWSKI et al.,

2022). Tanto as células T CD4+ quanto as T CD8+ aumentam em número após exercícios intensos, sendo esse aumento proporcional à intensidade do exercício. No entanto, devido à sua contagem basal mais elevada no sangue periférico, as células T CD4+ apresentam um aumento em números absolutos maior. Em contrapartida, devido à maior densidade do receptor β 2-adrenérgico nas células T CD8+, elas são mais responsivas ao exercício e exibem aumentos relativos mais significativos após o exercício (SHAW et al., 2018).

Ambas as subpopulações de células T reagem de maneira distinta a períodos variáveis de recuperação entre episódios únicos de exercício. Embora tanto os linfócitos CD4+ quanto os CD8+ falhem em retornar aos números basais após curtos períodos de recuperação, um exercício agudo subsequente resulta em um aumento mais proeminente nos números de células T CD8+ em comparação com as células T CD4+ (RONSEN et al., 2002).

As alterações induzidas pelo exercício nos números de células T regulatórias (Treg) parecem depender da intensidade e duração do exercício. Atualmente, não há dados consistentes sobre o efeito do exercício agudo nos números de células T CD4+CD25+FoxP3+, e pouco se sabe sobre os mecanismos subjacentes aos potenciais efeitos nas células Treg (KUROWSKI et al., 2022).

Por exemplo, sugere-se que a aparente diminuição nas Tregs observada após eventos como triatlos ou maratonas pode ser resultado tanto de apoptose celular quanto de redistribuição para tecidos periféricos. Descobriu-se recentemente que a contagem de Tregs apresenta uma resposta bifásica ao exercício agudo, indicando a necessidade de mais pesquisas sobre a modulação da resposta dependente de Treg (CLIFFORD et al., 2017).

A prática de atividade física moderada também está associada a um aumento nos níveis de IgA salivar, evidenciando os efeitos benéficos anti-inflamatórios e imunomoduladores da atividade física regular. Estudos indicam um aumento nos níveis de IgG no soro imediatamente após o exercício agudo e ao longo de períodos prolongados de treinamento repetido. No entanto, as investigações sobre a IgM sérica e IgD celular durante o exercício intensivo apresentam resultados ambíguos, com relatos tanto de diminuições quanto de aumentos (KUROWSKI et al., 2022).

Por conseguinte, é necessário realizar mais pesquisas abordando diferentes padrões e intensidades de exercícios, especialmente em condições crônicas de saúde, como a asma.

2.2.1 EXERCÍCIO FÍSICO E ASMA

Estudos prévios indicaram que o exercício aeróbico tem a capacidade de inibir e reverter o processo inflamatório e de remodelação das vias aéreas em modelos de camundongos com asma (VIEIRA et al., 2007; CARSON et al., 2013). Esse efeito é mediado pelo aumento da expressão das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-1ra, resultando na redução das citocinas pró-inflamatórias Th2, como IL-4, IL-5 e IL-13, que desempenham um papel crucial na manutenção da inflamação crônica e remodelação das vias aéreas (FEHRENBACH; WAGNER; WEGMANN, 2017; MORAES-FERREIRA et al., 2022).

Em um modelo murino de asma, Mackenzie et al. (2016) examinaram como um único episódio de exercício moderado influenciou a maturação e ativação das CD4. Nessas condições, observou-se uma redução na maturação das CD4, indicada pela expressão alterada de MHC-II, CD80, CD83 e CD86 (MACKENZIE et al., 2016).

A relação entre o exercício vigoroso e os níveis de IgE não foi amplamente explorada, e há uma notável variação individual nas mudanças nos níveis de IgE durante o exercício, possivelmente devido à influência genética na síntese e liberação de IgE. Além disso, sugere-se que o treinamento físico moderado pode resultar em uma redução nos níveis totais de IgE, tanto total quanto específica para alérgenos (KUROWSKI et al., 2022).

Consonante à resposta imune humoral, em modelos animais, o treinamento aeróbico apropriado reduz os níveis de IgE e IgG nas fases iniciais e diminui a liberação de fatores inflamatórios, aliviando os sintomas da asma alérgica aguda (HIZUME-KUNZLER et al., 2017).

Brüggemann et al. (2015) demonstraram em modelo experimental murino de asma submetido à natação uma redução nos níveis elevados de IgE total, IL-1, IL-4, IL-5 e IL-6, assim como uma diminuição no número total de células, linfócitos e eosinófilos no fluido de lavagem broncoalveolar, além do aumento nos níveis de IL-10 e glutathione. Os seus resultados sugerem que os efeitos anti-inflamatórios nos pulmões, observados após três semanas de natação de alta intensidade no modelo de asma induzida por OVA, podem ser, pelo menos em parte, mediados pela redução do estresse oxidativo e pelo aumento na produção de IL-10 (BRÜGGEMANN et al., 2015).

Outro ponto crucial da inflamação crônica e remodelação das vias respiratórias em pacientes com asma é a excessiva presença de células inflamatórias no tecido subepitelial, ocasionando danos locais nos tecidos/células e a liberação abundante de diversos mediadores pró-inflamatórios e pró-fibróticos. Isso perpetua o ciclo de dano e reparo (MORAES-FERREIRA et al., 2022). Em um estudo utilizando um modelo de asma em camundongos, foi evidenciado que o exercício aeróbico reduz a infiltração de macrófagos e eosinófilos nas vias respiratórias (FRANÇA-PINTO et al., 2015).

Outro estudo com modelo experimental de asma submetido ao treinamento moderado demonstrou a redução de eosinófilos, CD3+, CD4+, IL-4, IL-5, IL-13, NF- κ B, remodelação das vias aéreas, síntese de muco, aumento em IL-10 e IL-1ra, independentemente de Foxp3 (SILVA et al., 2010).

Lee et al. (2019) demonstraram uma inibição significativa nos aumentos dos níveis de IL-4, IL-5, IL-13, histamina, leucotrieno D4 e triptase no fluido broncoalveolar (BALF) de camundongos asmáticos submetidos à natação. Além disso, o treinamento suprimiu eficazmente a formação de muco, a fibrose pulmonar e a hipertrofia do músculo liso das vias aéreas nos tecidos pulmonares. Associado aos achados, eles encontraram uma diminuição significativa dos níveis de fator de necrose tumoral- α , IL-6 e a produção de prostaglandina E2 no BALF (LEE et al., 2019).

Assim, como uma estratégia não farmacológica, evidências crescentes indicam que o exercício aeróbico proporciona consideráveis benefícios ao diminuir a inflamação e remodelação das vias aéreas, conforme estudos realizados em modelos de camundongos com asma (SILVA et al., 2010; ALBERCA-CUSTÓDIO et al., 2016).

2.3 AMINOÁCIDOS E RESPOSTA IMUNE

Em um nível fundamental, os aminoácidos desempenham um papel de extrema importância como os elementos constituintes essenciais das proteínas presentes em células e tecidos do organismo. Seguindo a água, eles representam o segundo composto mais prevalente nos mamíferos (GROHMANN et al., 2017). A obtenção de aminoácidos pode ocorrer através de fontes endógenas e/ou exógenas, como a dieta, e sua disponibilidade desempenha um papel fundamental na sobrevivência, manutenção e reprodução celular (GROHMANN et al., 2017; CRUZAT et al., 2018).

Dentre os 20 aminoácidos presentes no código genético, a glutamina exemplifica de maneira destacada a versatilidade do metabolismo de aminoácidos e sua influência na função imunológica. Este aminoácido, que predomina em quantidade e flexibilidade no organismo, desempenha um papel crucial no metabolismo intermediário, na transferência de nitrogênio entre órgãos através do transporte de amônia (NH₃) entre tecidos, e na manutenção do equilíbrio do pH (GROHMANN et al., 2017; CRUZAT et al., 2018).

Presente em praticamente todas as células, a glutamina é capaz de servir como substrato para a síntese de nucleotídeos (purinas, pirimidinas e aminoaçúcares), nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), antioxidantes, e diversas outras vias biossintéticas relacionadas à preservação da integridade e função celular (CURI et al., 2014; CRUZAT et al., 2014).

A glutamina presente nas células do sistema imunológico passa por um processo de transformação conhecido como glutaminólise, onde é oxidada parcialmente a dióxido de carbono, resultando na formação de glutamato, alanina e aspartato. Essa degradação da glutamina e a subsequente produção de amônia desempenham um papel crucial na síntese de purinas e pirimidinas, essenciais para a formação de ácidos desoxirribonucleico e nucleico ribossômico (CRUZAT et al., 2014; SHAH et al., 2020).

A presença adequada de glutamina no organismo é fundamental para regular as expressões gênicas nas células do sistema imunológico, influenciando sua proliferação controlada por meio da ativação de quinases reguladas por sinal extracelular (ERK) e quinases c-Jun N-terminal (JNK). Essas quinases, por sua vez, estimulam os fatores de transcrição JNK e proteína ativadora 1 (AP-1), resultando na transcrição de genes relacionados à proliferação celular (CURI et al., 2005; CURI et al., 2016; SHAH et al., 2020).

Em conjunto, a quantidade apropriada de glutamina possibilita a expressão de marcadores de superfície em células linfocíticas primárias, como CD25, CD45RO e CD71, além da síntese de citocinas (IFN- γ , TNF- α e IL-6) (CURI et al., 2005; CURI et al., 2016; SHAH et al., 2020). Em relação ao mecanismo molecular da Glutamina, foi notado que aumentar a quantidade deste composto por via oral pode ativar a resposta imunológica facilitada pelas células T em camundongos (KEW et al., 1999).

Em determinadas condições de estresse como queimaduras graves, sepse, infecções, procedimentos cirúrgicos significativos e exercícios intensos, a glutamina

pode ser considerada um aminoácido essencial condicional, uma vez que a quantidade produzida pode não ser suficiente para manter a função adequada dos órgãos e células (CURI et al., 2017; SOARES et al., 2019; ROGERI et al., 2020).

Quando a concentração de glutamina diminui em situações de estresse, linfócitos, macrófagos e neutrófilos enfrentam comprometimento em sua função e desempenho. Isso resulta em uma diminuição na explosão oxidativa de neutrófilos, uma queda em algumas populações de linfócitos T, uma deterioração na capacidade proliferativa das células T e uma redução na capacidade fagocítica dos macrófagos. Essas condições levam à imunossupressão, aumentando o risco de desenvolvimento de infecções, como as do trato respiratório superior (BASSIT et al., 2002; ROGERI e ROSA, 2005; CURI et al., 2017; SOARES et al., 2019).

2.3.1 L-GLUTAMINA E ASMA

Em um experimento utilizando um modelo murino de asma, a administração intraperitoneal de L-glutamina demonstrou suprimir a presença de eosinófilos nas vias aéreas, a produção de muco, as citocinas do tipo 2 nas vias aéreas e a hiperreatividade tardia delas. Este efeito foi atribuído, pelo menos em parte, à capacidade da glutamina de reduzir a atividade da fosfolipase A2 citosólica (cPLA2) (KO et al., 2008).

As enzimas fosfolipase A2 (PLA2) desempenham um papel na hidrólise de fosfolipídios de membrana, resultando na produção de ácido araquidônico, o qual é posteriormente metabolizado em mediadores lipídicos inflamatórios através das vias da ciclo-oxigenase e da lipoxigenase, gerando prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos. Esses mediadores foram previamente associados à indução de eosinofilia e broncoconstrição nas vias aéreas (TRIGGIANI et al., 2005; PNIEWSKA et al., 2014).

Em uma investigação subsequente sobre os efeitos e mecanismos da glutamina na inibição do recrutamento de neutrófilos para as vias aéreas em um modelo murino de asma, observou-se que a glutamina suprimiu a presença de neutrófilos nas vias aéreas ao inibir a fosforilação da cPLA2, em parte, através da desativação da p38 MAPK nos pulmões asmáticos (LEE et al., 2012).

Em casos de asma grave, os neutrófilos são considerados importantes na manutenção da doença e durante as exacerbações, sendo que nesses pacientes há

resistência aos esteroides (BRUIJNZEEL; UDDIN; KOENDERMAN, 2015). O mecanismo exato pelo qual a glutamina inibe a fosforilação da cPLA2 foi posteriormente analisado, sendo determinado que a glutamina desfosforila a cPLA2 de maneira indireta, através da desfosforilação da p38 mediada pela MAPK fosfatase-1 (MKP-1) (LEE et al., 2015; NOLIN et al., 2019).

Além dos estudos supracitados, KO et al., (2008) encontraram que a glutamina inibe a fosforilação e a atividade enzimática da fosfolipase A2 citosólica nas vias aéreas, inibe o recrutamento de neutrófilos e eosinófilos nas vias aéreas, inibe a produção de citocinas do tipo Th2 e a produção de muco nas vias aéreas. Além disso, eles identificaram que esse aminoácido inibe a hiper-reatividade das vias aéreas tardiamente, mas não precocemente, possivelmente pelo fato de que a administração de glutamina intraperitoneal aumentou sua biodisponibilidade no plasma e nos pulmões (KO et al., 2008).

3 HIPÓTESES

Em relação à associação entre a suplementação oral com L-glutamina e a natação como tratamentos para a asma experimental, têm-se como hipóteses:

Hipótese *nula*: A natação de moderada intensidade, associada à suplementação oral com L-glutamina, não produzirão efeitos benéficos sobre a função pulmonar e resposta inflamatória das vias aéreas nos animais expostos à OVA.

Hipótese *alternativa*: A natação de moderada intensidade, associada à suplementação oral com L-glutamina, produzirão efeitos benéficos sobre a função pulmonar e resposta inflamatória das vias aéreas nos animais expostos à OVA.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos promovidos pela suplementação oral com o aminoácido L-glutamina e da natação de moderada intensidade, isoladamente ou associados, sobre os parâmetros imunológicos e morfofuncionais de um modelo experimental de asma.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar o condicionamento físico dos camundongos submetidos a natação de intensidade moderada;
- 2) Caracterizar a função pulmonar dos camundongos submetidos aos diferentes delineamentos experimentais;
- 3) Verificar a secreção de lactato pelos animais submetidos à natação;
- 4) Detectar os níveis de anticorpos (IgE, IgG e suas subclasses IgG1 e IgG2a) específicos para o alérgeno ovoalbumina dos camundongos dos diferentes grupos experimentais;
- 5) Identificar os níveis de citocinas (IL-5, IL-6, IL-10 e IFN- γ) nas amostras teciduais pulmonares dos animais dos diferentes delineamentos experimentais;
- 6) Constatar os níveis de citocinas (IL-6 e IL-10) nas amostras teciduais musculares das patas traseiras dos animais submetidos à natação;
- 7) Descrever as características histopatológicas inflamatórias dos pulmões dos camundongos dos diferentes grupos experimentais.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Toda a experimentação com animais vivos não-humanos, essencialmente de grupos vertebrados, realizada para elaboração dessa tese foi elaborada com base na utilização humanitária de animais com finalidade de pesquisa científica, seguindo as diretrizes estabelecidas pelo *Institute for Laboratory Animal Research* (ILAR, 2011) e Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) (BRASIL, 2008).

Assim, o anexo 1 traz o documento emitido pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) que aprovou, sob cadastro de número 024/20, o desenvolvimento desta pesquisa experimental.

5.2 MODELOS EXPERIMENTAIS

Os camundongos da espécie *Mus musculus* são os animais de primeira escolha para pesquisas de doenças alérgicas, como a asma. Isso se deve ao fato de que este modelo experimental desenvolve características patológicas semelhantes às doenças em seres humanos; além disso, são uma espécie de baixo custo de manutenção, de fácil alojamento e manejo. Contudo, a escolha assertiva da linhagem para esses estudos é de extrema importância (BATES et al., 2009).

Os camundongos consanguíneos da linhagem BALB/c, está entre os modelos mais utilizados na investigação biomédica, sendo particularmente o modelo de escolha na área da imunologia, potencialmente indicado para pesquisas envolvendo a asma. Estudos mostraram que a linhagem em questão produz níveis elevados de imunoglobulinas da classe IgE contra antígenos alergênicos como a ovalbumina (OVA), antígeno este não relacionado causalmente à asma, e outros alérgenos (GUALDI et al., 2010; DUTRA et al., 2017).

Além disso, comprovou-se que os animais expostos a OVA secretam maiores concentrações de citocinas de perfil Th2 (IL-4 e IL-5) pelas células pulmonares sensibilizadas, quando comparados, por exemplo, com animais da linhagem C57BL/6. Mesmo diante de uma gama de linhagens murinas disponíveis para fins de pesquisa, outras linhagens são pouco utilizadas em modelos de asma, por não serem muito

sensíveis à sensibilização e ao desafio a alérgenos (GUALDI et al., 2010; DUTRA et al., 2017). Destarte, fora escolhida a linhagem BALB/c para realização da pesquisa descrita nesta tese.

A proposta do n amostral para a pesquisa foi realizada no *software* estatístico *G Power* 3.1.9.4. Para isso foi considerado o nível de confiabilidade de 95% e as variáveis exigidas para este cálculo foram atribuídas de acordo com *Cunningham e McCrum-Gardner* (2007). No *software* as médias e o grau de dispersão utilizadas para o cálculo tomaram por base a variação na secreção da citocina IL-4 nos grupos controles e grupos com asma experimental, uma vez que essa citocina é essencial para o desenvolvimento do quadro inflamatório característico da asma (YANG et al., 2017).

Foram utilizados no estudo 120 camundongos estéreis, da linhagem BALB/c, fêmeas, com idade de 5 a 8 semanas, pesando aproximadamente 20 gramas, provenientes do setor de criação da Rede de Biotérios de Roedores (REBIR) da UFU. Os animais foram mantidos durante todo o período de realização da pesquisa na área de experimentação da REBIR-UFU, localizada no bloco 4U do Campus Umuarama.

Os camundongos foram alojados em um ambiente com temperatura e umidade controladas, com água e alimentação *ad-libitum*, em ciclo invertido de claro-escuro de 12 horas, em gaiolas com 32 cm de comprimento, 20 cm de largura e 21 cm de altura, forradas com maravalha. As gaiolas ficaram condicionadas em estantes isoladoras com sistema de injeção e exaustão de ar.

A densidade populacional de cada gaiola foi de 4 a 5 animais por grupo experimental, sendo os animais incluídos no programa de enriquecimento ambiental oferecido pela REBIR-UFU. A estrutura física de alojamento dos animais estava de acordo com o Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica do CONCEA (BRASIL, 2019).

O delineamento experimental foi realizado em triplicatas independentes e os procedimentos realizados nos devidos grupos estão representados na tabela 1.

Tabela 1 – Delineamento experimental.

Delineamento experimental		
Grupo	n	Procedimento realizado
Controle	15	Tratamento com solução fosfato-salina.
L-glt	15	Tratamento com o suplemento de L-glutamina pela via oral (gavagem).
Nat	15	Tratamento através da natação de moderada intensidade.
L-glt + Nat	15	Tratamento com suplementação oral e natação.
Asma	15	Indução da asma experimental.
Asma + L-glt	15	Tratamento dos camundongos asmáticos com suplementação oral.
Asma + Nat	15	Tratamento dos camundongos asmáticos com natação.
Asma + L-glt + Nat	15	Tratamento dos camundongos asmáticos com suplementação oral e natação.

Legenda: L-glt: L-glutamina; Nat: Natação.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2024).

5.2.1 INDUÇÃO DA ASMA EXPERIMENTAL

Para mimetização da asma em camundongos, a fase de sensibilização e a fase de desafios devem ser realizadas nos modelos experimentais (AUN et al., 2017). O primeiro contato com o alérgeno, de forma sistêmica, caracteriza a sensibilização e repetidas reexposições constituem a fase de desafio (NIALS; UDDIN, 2008; LAMBRECHT et al., 2009). O antígeno alergênico utilizado foi a ovalbumina (OVA). A ovalbumina é a proteína mais abundante encontrada na clara de ovo, em torno de 55% da concentração proteica total (SANO et al., 1999). Ela é sintetizada em grandes escalas por empresas da área biomédica, possibilitando sua aquisição em grandes quantidades e com baixo custo financeiro.

Na fase de sensibilização antigênica, nos dias zero e sete cada camundongo recebeu, pela via intraperitoneal (i.p.), 100 µL de uma suspensão contendo 50 µg de OVA grade V (SIGMA Chemical, St. Louis, MO) e 2 mg/mL de adjuvante hidróxido de alumínio - Al (OH)₃ (VETEC, Rio de Janeiro, RJ), adsorvidas em solução fosfato-salina (*Phosphate-Buffered Saline* - PBS).

Na fase de desafio antigênico, nos dias 14, 17, 18 e entre os dias 21 e 25, cada camundongo recebeu, pela via intranasal (i.n.), 20 µL de uma suspensão contendo 10 µg de OVA grade V (SIGMA Chemical, St. Louis, MO) diluídas em PBS. O desafio intranasal foi realizado imobilizando gentilmente os animais pela pele do dorso e posicionando-os com a cabeça voltada para cima. Com o auxílio de uma pipeta volumétrica a solução antigênica foi instilada lentamente, tomando precauções ao

liberar o volume para evitar sufocar o animal (SHIMIZU, 2004). Como o volume foi administrado lentamente, não foi necessário anestésias os animais.

5.2.2 SUPLEMENTAÇÃO COM L-GLUTAMINA

A suplementação com o aminoácido não essencial L-glutamina comercial (Probiótica, Brasil - produto registrado no Ministério da Saúde sob o nº 6.6294.0013) foi realizada através da gavagem. Entre os dias 7 e 25, os camundongos receberam uma dose de 1 g/kg do peso do animal de suplemento (SELLMANN et al., 2015; VASCONCELOS et al., 2019) diluídos em um volume de 150 µL de água mineral. Nos grupos experimentais que praticaram a natação, a administração do suplemento ocorreu 30 minutos após o término de cada sessão de treinamento. Nos grupos experimentais que não foram suplementados realizou-se apenas a administração do mesmo volume água nas condições descritas para os demais grupos.

5.2.3 TREINAMENTO AERÓBICO: NATAÇÃO

A intensidade de treinamento escolhida foi a moderada, devido ao fato de que ela é responsável por promover alterações em parâmetros do sistema imunológico, induzindo uma resposta regulatória, assim como uma resposta de perfil Th1, possibilitando o controle de respostas de perfil Th2, como na asma (TERRA et al., 2018). A realização do exercício físico aeróbico foi realizada com base no protocolo descrito por Oliveira (2018), com algumas alterações.

Para realização do treinamento foi utilizado um aquário de polietileno, com altura de 0,76 m, diâmetro de 1,51 m e diâmetro da base de 1,16 m. O volume de água utilizado para os procedimentos foi de 0,9 m³ e a temperatura água mantida entre 32 ±3°C.

Os animais foram adaptados ao ambiente aquático na semana anterior ao início do treinamento, conforme preconizado por (BRUGGEMANN et al., 2015). Entre os dias 8 e 25 do período experimental, o treinamento foi realizado 5 dias por semana, com sessões de treinamento de 30 minutos, no qual o camundongo treinava com uma carga acoplada à base da cauda equivalente a 3% do seu peso corporal, conforme determinado por pesquisa anterior realizada por Oliveira (2018).

A pesagem dos camundongos foi realizada semanalmente, sempre no mesmo horário do dia para minimizar variações decorrentes do ciclo circadiano. Os animais foram pesados individualmente em uma balança de precisão, sendo manuseados com cuidado para evitar estresse adicional. Os dados foram registrados de forma sistemática e essa abordagem metodológica estruturada assegurou a obtenção de resultados confiáveis e contribuiu para a validade interna da pesquisa.

Em casos de exaustão durante a sessão de treinamento, os camundongos eram retirados da água, secos com o auxílio de uma toalha e colocados novamente em suas gaiolas. A exaustão foi caracterizada pela imersão do animal de cinco a sete segundos, sem que ele retornasse à superfície (ALMEIDA et al., 2009; OLIVEIRA, 2018). Nesses casos, os animais eram submetidos a outra sessão de treinamento em dia posterior da semana, pois era necessário que eles treinassem 5 dias em cada semana.

Os animais dos grupos experimentais que não realizavam a natação foram mantidos durante o mesmo intervalo de tempo em outro tanque, com 2 cm de água na mesma temperatura que a do aquário dos animais submetidos ao treinamento. Finalizada a sessão de treinamento, os camundongos eram retirados do tanque, secos e alojados em suas respectivas gaiolas (OLIVEIRA, 2018).

5.2.4 TESTE PROGRESSIVO DE CARGA

Para confirmar se o treinamento aeróbico estava produzindo adaptação fisiológica e promovendo um treinamento de intensidade moderada, uma vez que estava sendo usada uma carga de treinamento igual a 3% do peso corporal do animal (OLIVEIRA, 2018), foi realizado o Teste Progressivo de Carga (TPC) ao final de cada semana de treinamento.

No TPC, os animais dos grupos submetidos à natação, foram individualmente posicionados no aquário, com uma sobrecarga inicial de 2% do peso corporal fixada à cauda. A cada três minutos, adicionava-se 2% adicional do peso corporal, sem interrupção do exercício, até que os animais atingissem o ponto de exaustão (ALMEIDA et al., 2009; KIM et al., 2014; BRUGGEMANN et al., 2015). A exaustão foi determinada quando o camundongo permanecia submerso por cinco a sete segundos sem retornar à superfície (ALMEIDA et al., 2009; OLIVEIRA, 2018). Nesse momento, o animal era retirado da raia, seco com uma toalha e alojado na gaiola.

5.3 ANÁLISE DA FUNÇÃO RESPIRATÓRIA

A análise da função respiratória dos camundongos foi realizada no 27º dia, 48 horas após a realização dos últimos procedimentos experimentais em cada grupo. Utilizou-se a técnica de espirometria, em que foram mensurados os parâmetros volume corrente, frequência respiratória e volume-minuto – produto da multiplicação do volume corrente pela frequência respiratória. Os dados foram obtidos sob respiração espontânea e com os animais anestesiados (OLIVEIRA, 2018). O protocolo anestésico foi administrado pela via intraperitoneal, contendo 100 mg/kg de Cloridrato de Cetamina e 10 mg/kg de Cloridrato de Xilazina.

A partir da confirmação do plano anestésico, os camundongos foram alocados no espirômetro, que possui uma câmara hermética conectada a um nebulizador e um sensor espirométrico (SpirometerFE141, ADInstruments, Sydney, Austrália). Os dados foram coletados durante 3 minutos para cada animal, sendo expressos em *volts*, processados pelo sistema *Power Lab* (ADInstruments, Sydney, Austrália). Logo, as informações foram transferidas para o *software* LabChart que converte os dados referentes ao volume corrente de volts em mL e calcula a frequência respiratória e o volume-minuto (OLIVEIRA, 2018).

5.4 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DE MATERIAIS BIOLÓGICOS

Após a análise da função respiratória, com os animais ainda anestesiados, foi realizada a coleta de sangue. Então os camundongos foram eutanasiados pela técnica de deslocamento cervical, para coleta dos materiais biológicos.

5.4.1 COLETA DE SANGUE E ANÁLISE DO PLASMA

Com o camundongo ainda sob efeito da anestesia, foi realizada a coleta de sangue via punção do plexo retro-orbital. Para realização da coleta o pesquisador segurou o animal pela pele do dorso promovendo uma leve protusão do globo ocular, de maneira que o olho ficou voltado para cima. Então o tubo capilar para hematócrito foi posicionado no canto medial do olho com uma angulação de 30 a 45 graus, sendo inserido e rotacionando até início do fluxo sanguíneo (BOGDANSKE et al., 2010).

Foram coletados um volume de aproximadamente 1 mL de sangue em tubos do tipo *ependorf* com ácido etilenodiamino tetra-acético.

Para coleta do plasma os tubos foram centrifugados a 300 g, em 4°C, por 10 min. As amostras de plasma foram alicotadas, etiquetadas, congeladas a -20 °C e encaminhadas para o Laboratório Clínico da REBIR-UFU para dosagens de aspartato aminotransferase (AST), de alanina aminotransferase (ALT), de creatinina e de ureia. Essas análises bioquímicas são responsáveis por informar se os experimentos realizados promoveram lesão hepática e/ou lesão renal nos camundongos.

Para avaliação dos níveis de lactato secretados após as sessões de treinamento, conforme relatado por Oliveira (2018), foram extraídos 20 µL de sangue da cauda dos camundongos no 10° e 30° minuto após a última sessão de treinamento, da primeira e da quarta semana, nos animais dos grupos Nat, L-glt + Nat, Asma + Nat e Asma + L-glt + Nat. A mensuração dos níveis de lactato foi conduzida utilizando o Kit de Lactato Enzimático (LabTest, Brasil), seguindo as orientações do fabricante, após a separação do plasma sanguíneos das amostras coletadas.

5.4.2 COLETA DOS PULMÕES E MUSCULATURA DA PATA TRASEIRA

Após a eutanásia, os camundongos foram estabilizados em decúbito dorsal em uma mesa cirúrgica. Com o auxílio de um bisturi cirúrgico as cavidades abdominal e torácica foram abertas e os órgãos expostos. Foram localizados e coletados os pulmões e o baço de cada animal. Em seguida, a pele da pata posterior direita foi rebatida, o músculo gastrocnêmio dissecado e coletado.

O pulmão direito e a musculatura da pata traseira direita foram imediatamente imersos em meio de cultivo celular RPMI 1640 incompleto, sem glutamina, contendo coquetel inibidor de protease (cOplete™, Roche, Sigma). O pulmão esquerdo foi fixado em formalina tamponada a 4%, por 24 hs, para interromper a degradação do tecido via autólise ou contaminação por microrganismos.

Com a conclusão das coletas citadas, as carcaças foram embaladas em material próprio, lacradas com fita adesiva e destinadas à um freezer com temperatura de -20°C até o descarte apropriado realizado pela equipe da REBIR-UFU.

5.4.3 PREPARO DO HOMOGENATO TECIDUAL

Os pulmões e músculos da pata direita traseira foram levados para um homogeneizador do tipo *Potter-Elvehjen* e homogeneizado 2 vezes durante 1 minuto, com intervalo de 30 segundos entre cada etapa. Então, o preparo foi centrifugado. O sobrenadante foi armazenado em freezer com temperatura de -20°C até análise.

5.4.4 HISTOPATOLOGIA PULMONAR

Ao término das 24 hs de fixação do tecido pulmonar esquerdo, os órgãos foram transferidos para solução de álcool etílico a 70% e mantidos até o início do processo de parafinização. Este processo começou com a desidratação dos materiais em tubos com diferentes concentrações de álcool etílico (70, 80, 90 e 100%), onde as amostras eram mantidas por 30 minutos em cada concentração. Então elas foram transferidas para tubos contendo xilol por mais 30 minutos, seguindo para tubos contendo parafina líquida que foi responsável para formação do "bloco" de parafina contendo o fragmento do tecido em seu interior.

O corte histológico dos blocos parafinizados foi processado com a espessura de 5 µm, com o auxílio de um micrótomo. A partir de então as lâminas foram encaminhadas para aplicação dos corantes histológicos. Elas foram coradas com Hematoxilina & Eosina (HE) para descrição de parâmetros teciduais gerais e perfil inflamatório (VEDOVA et al., 2020).

5.4.5 DETECÇÃO DE CITOCINAS E ANTICORPOS

O ensaio *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) de captura (sanduiche) para detecção das citocinas IL-5, IL-6, IL-10 e IFN-γ foi realizado de acordo com o protocolo especificado no kit comercial do fabricante (BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA). Neste ensaio foram utilizadas as amostras de homogenato pulmonar e muscular puras.

Para identificar a presença de anticorpos da classe IgG específicos para o alérgeno OVA no homogenato pulmonar, as placas foram revestidas com 3 µg de OVA por poço, diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M e pH 9,6, deixadas em repouso durante a noite a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas com PBS-*Tween* 20 (PBS-T) e os locais não específicos de ligação foram bloqueados com 150 µL de PBS-T-Molico (PBS-TM) a 5% por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida,

as placas foram novamente lavadas com PBS-T, e as amostras, diluídas em PBS-TM na proporção de 1:50, foram aplicadas em duplicatas (50 µL por poço) e incubadas por 1 hora a 37°C.

Após a incubação, as placas foram novamente lavadas com PBS-T, e 50 µL de anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA), diluído em PBS-TM na proporção de 1:1000, foram adicionados aos poços, seguido de nova incubação a 37°C por 1 hora. Após esse período, as placas foram lavadas novamente, e a reação foi revelada utilizando o substrato enzimático comercial ABTS® (Sigma-Aldrich, EUA). Após a revelação, a absorbância foi medida no espectrofotômetro a um comprimento de onda de 405 nm.

Para identificação das subclasses IgG1 e IgG2a específicas para OVA no homogenato pulmonar, o ensaio ELISA seguiu essencialmente os mesmos procedimentos empregados na detecção de IgG. Contudo, para o bloqueio e como diluente nas etapas subsequentes, empregou-se uma solução de PBS-TM a 1%. As amostras foram diluídas em uma proporção de 1:10 e incubadas por 2 horas. Os anticorpos primários utilizados consistiram em anti-IgG1 de camundongo produzido em cabras e anti-IgG2a de camundongo produzido em cabras, ambos diluídos a 1:250. O anticorpo secundário empregado foi o IgG de coelho anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase, diluído a 1:1000 (Sigma-Aldrich, E.U.A.), com incubação por 1 hora a 37°C.

A absorbância foi lida no espectrofotômetro de Microplacas (Epoch BioTek Instruments, Inc., USA) a um comprimento de onda de 405 nm, e os resultados foram apresentados por meio do Índice ELISA (I.E.), conforme descrito por Oliveira (2018). Valores de I.E. superiores a 1,2 foram considerados positivos para presença de anticorpos na amostra (OLIVEIRA, 2018).

A fim de quantificar a IgE contra OVA no homogenato pulmonar, a placa de 96 poços foi sensibilizada com 3 µg por poço de solução de OVA e incubada durante a noite a 4 °C. Posteriormente, os poços foram lavados com uma solução PBS-T. Em seguida, uma solução PBS contendo 3% de soro albumina bovina (BSA) foi adicionada para bloquear reações inespecíficas, e a placa foi incubada por mais 1 hora a 37 °C. Após a lavagem dos poços, as amostras de homogenato foram aplicadas sem diluição (puras).

Após 2 horas a 37 °C, os poços foram lavados, e 50 µL de anti-IgE biotinizada (Sigma), diluída em PBS-BSA 0,1% (1:1000), foram adicionados. Após 1 hora, a

reação foi incubada com estreptavidina-peroxidase (Sigma), diluída 1:500. Os poços foram então lavados, e a reação foi revelada pela incubação com 50 µL de solução ABTS (Sigma) durante 30 minutos.

A absorbância foi lida no espectrofotômetro de Microplacas (Epoch BioTek Instruments, Inc., USA) a um comprimento de onda de 405 nm, e os resultados foram expressos como Índice ELISA (IE). Valores de IE acima de 1,0 foram considerados como positivos.

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi conduzida por meio do *software GraphPad Prism 6* (San Diego, CA, EUA), no qual a normalidade dos dados foi verificada através do teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Os dados que apresentaram distribuição paramétrica foram submetidos ao teste de Análise de Variância (ANOVA), seguido pelos testes de comparação múltipla para a análise entre grupos. Os dados com distribuição não paramétrica foram analisados por meio do teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelos testes de comparação múltipla para a comparação entre grupos.

6 RESULTADOS

Os testes pilotos demonstraram que a indução da asma experimental e a suplementação com L-glutamina não promoveram alteração hepáticas e renais nos camundongos (dados não relatados na tese). Portanto, o protocolo descrito no delineamento experimental de cada grupo foi realizado e os resultados são expressos a seguir.

6.1 INFLUÊNCIA DA VARIAÇÃO DA CARGA DO TPC SOBRE A PERFORMANCE DOS CAMUNDONGOS

A prática de natação resultou em aprimoramento do condicionamento físico dos camundongos pertencentes aos grupos Nat, L-glt + Nat e Asma + L-glt + Nat, evidenciado pelo aumento significativo das cargas suportadas no TPC ao comparar os testes realizados na primeira e última semana de treinamento, conforme apresentado na Figura 1.

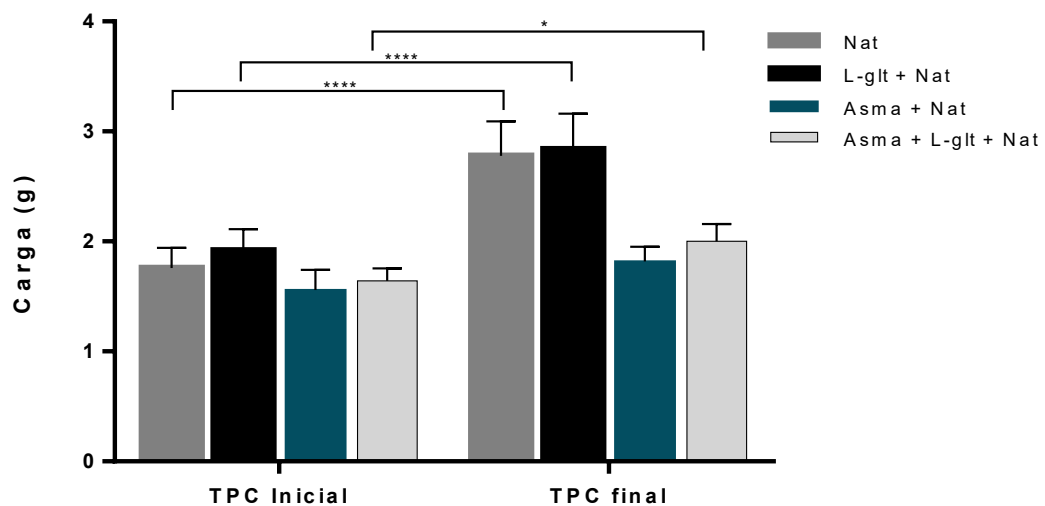


Figura 1 - Cargas suportadas pelos camundongos no Teste Progressivo de Carga (TPC). A ilustração exibe as quantidades de carga, medidas em gramas (g), que foram sustentadas pelos camundongos dos grupos experimentais Nat, L-glt + Nat, Asma + Nat e Asma + L-glt + Nat o Teste Progressivo de Carga (TPC) conduzido na etapa inicial e final do período de treinamento. Os resultados são apresentados como média \pm desvio-padrão. As discrepâncias estatisticamente significativas foram identificadas por meio do teste de *Kruskal-Wallis*, com a realização do teste de comparações múltiplas de *Sidak*. Os asteriscos indicam a significância estatística com $p < 0,01$.

6.2 EFEITOS DO TREINAMENTO SOBRE OS NÍVEIS DE LACTATO PLASMÁTICOS

A tabela 2 exibe as mensurações dos níveis de lactato plasmático no 10^o e 30^o minuto, após a última sessão de treinamento da primeira e da quarta semana, nos camundongos dos grupos Controle, Nat, L-glt + Nat, Asma + Nat e Asma + L-glt + Nat.

Os dados indicam uma pequena variação, sem relevância estatística, nos níveis de lactato mensurados entre os grupos Nat, L-glt + Nat, Asma + Nat e Asma + L-glt + Nat quando comparados ao grupo controle na primeira semana de treinamento. Em contrapartida, os camundongos do grupo L-glt + Nat apresentaram um aumento significativo intragrupo entre a 1^a e a 4^a semana, representado na tabela pelo símbolo §. Além disso, o grupo apresentou uma secreção de lactato significativamente menor na quarta semana quando comparado aos grupos Controle, Nat, Asma + Nat e Asma + L-glt + Nat.

Tabela 2. Níveis de lactato plasmáticos. Os valores da concentração de lactato no plasma, expressos em mmol/L com média e desvio-padrão, foram registrados no quinto dia após a sessão de treino, tanto na primeira semana quanto na última semana. As diferentes letras sobrescritas nas mesmas linhas representam uma variação significativa entre os tempos de análise nos diferentes grupos. O símbolo § representado no grupo L-glt + Nat indica variação significativa intragrupo na secreção de lactato entre a 1^a e a 4^a semana de treinamento.

		Grupos experimentais				
		Controle	Nat	L-glt + Nat §	Asma + Nat	Asma + L-glt + Nat
1 ^a semana	10 ^o min	3,01 ± 1,30	2,84 ± 0,77	3,04 ± 1,03	3,12 ± 0,54	3,34 ± 0,43
	30 ^o min	4,33 ± 0,87	3,21 ± 0,12	3,15 ± 0,99	3,62 ± 0,39	3,91 ± 0,89
4 ^a semana	10 ^o min	4,12 ± 1,05 ^a	3,09 ± 1,06 ^b	1,01 ± 1,10 ^c	3,77 ± 0,43 ^b	2,99 ± 0,66 ^b
	30 ^o min	4,91 ± 1,72 ^a	3,95 ± 0,38 ^b	1,99 ± 0,76 ^c	4,13 ± 0,74 ^b	3,55 ± 0,71 ^b

6.3 EFEITOS DOS PROTOCOLOS TERAPÊUTICOS NO FUNCIONAMENTO PULMONAR DOS CAMUNDONGOS

Nas análises do volume corrente (Fig. 2A), da frequência respiratória (Fig. 2B) e do volume-minuto (Fig. 2C), observou-se um incremento significativo nos valores registrados nos camundongos do grupo Asma em comparação com os animais dos outros grupos experimentais. O volume-minuto do grupo Asma destacou-se como o

parâmetro com maior índice de alterações significativas em comparação com os demais grupos, atingindo uma significância estatística de $p < 0,0001$.

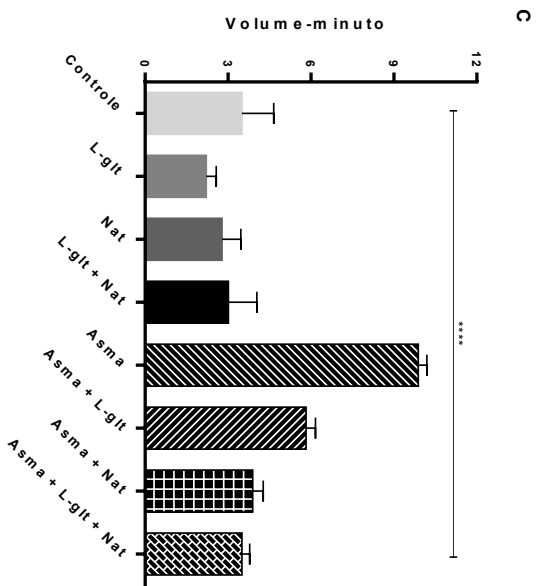
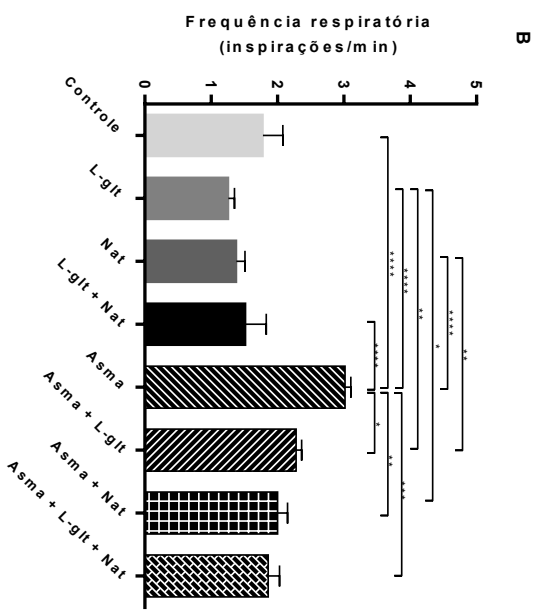
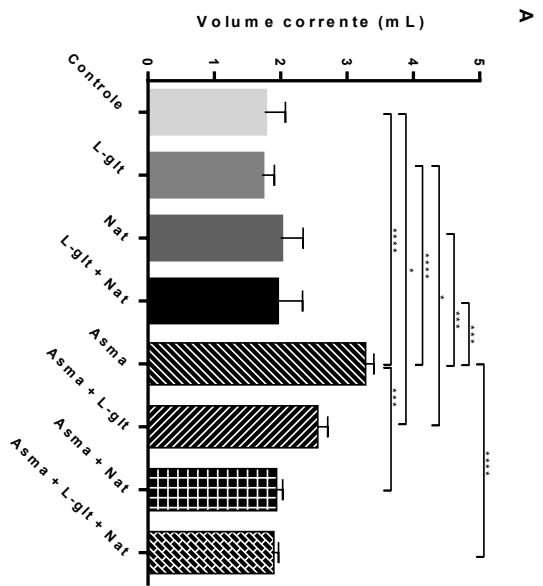


Figura 2 - Função respiratória basal. Nos grupos experimentais a avaliação da função respiratória basal foi realizada por meio da espirometria no 28º dia. Na Figura 2A, estão apresentados os dados relativos ao volume corrente mobilizado pelos animais durante o ciclo respiratório, enquanto a Figura 2B exibe os dados relacionados à frequência respiratória. A Figura 2C representa o volume-minuto, obtido multiplicando-se o volume corrente pela frequência respiratória. Os resultados são expressos como média \pm desvio-padrão. A análise estatística das diferenças significativas foi conduzida por meio do teste *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de comparações múltiplas de *Tukey*. Os valores de significância foram indicados como * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

6.4 EFEITOS DOS PROTOCOLOS TERAPÊUTICOS SOBRE A RESPOSTA IMUNE HUMORAL

O cálculo dos Índices ELISA identificou uma diferença significativa nas amostras de homogenato pulmonar dos camundongos, tanto para a classe de anticorpo IgE anti-OVA, quanto para a classe IgG anti-OVA. Essa diferença foi encontrada quando comparados os grupos asmáticos contra o grupo controle. Não foi encontrada diferença significativa quando comparados os grupos asmáticos entre si. A figura 3 traz maiores detalhes sobre essas diferenças.

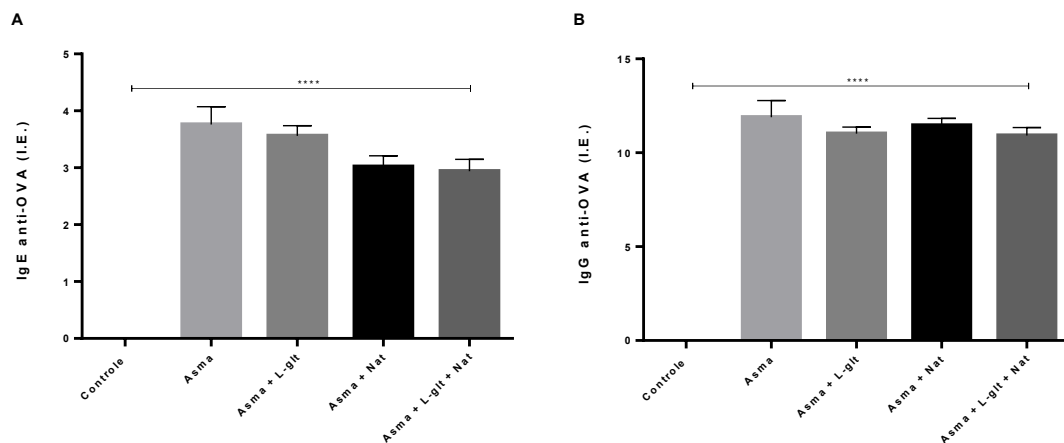


Figura 3 – Níveis de anticorpos das classes IgE e IgG contra OVA no homogenato pulmonar. A Figura 3A exibe o Índice ELISA (I.E.) de IgE contra OVA no homogenato pulmonar de camundongos que mimetizaram a asma experimental. Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão (DP). As diferenças estatisticamente significativas foram determinadas por meio do teste *One-way* ANOVA com o teste de comparações múltiplas de *Tukey*. Na Figura 3B, está sendo representado o I.E. da classe de IgG contra o mesmo antígeno e na mesma amostra biológica, com os valores expressos como média \pm dp. As diferenças estatisticamente significativas foram determinadas por meio do teste *One-way* ANOVA com o teste de comparações múltiplas de *Tukey*. Os valores de significância foram indicados como **** $p < 0,0001$.

Em relação as subclasses de IgG contra OVA, o cálculo dos Índices ELISA identificou uma diferença significativa nas amostras de homogenato pulmonar tanto de IgG1 quanto IgG2a dos grupos asmáticos contra os grupos controles. Além disso, foi possível indicar uma diferença estatística entre os I.E. de IgG1 contra IgG2a do grupo Asma, como mostra a figura 4.

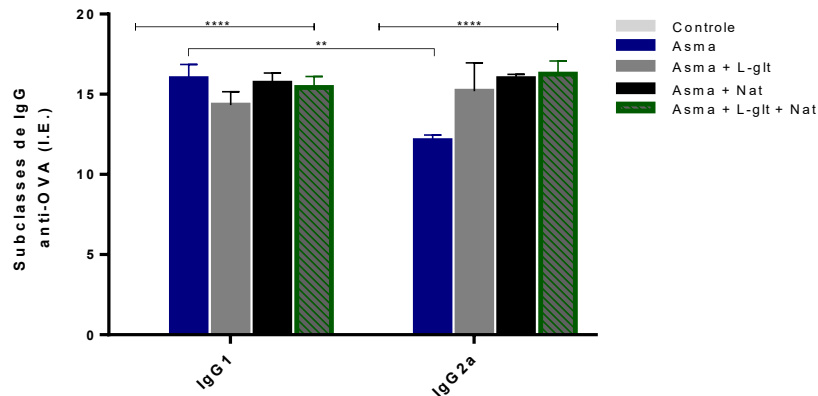


Figura 4 – Níveis de anticorpos das subclasses IgG1 e IgG2a contra OVA no homogenato pulmonar. A Figura 4 exibe os índices ELISA (I.E.) das subclasses IgG (IgG1 e IgG2a) contra OVA no homogenato pulmonar de camundongos. A análise estatística foi realizada através do *Two-way* ANOVA com o teste de comparações múltiplas de *Sidak*. Os valores de significância foram indicados como ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$.

6.5 EFEITOS DOS PROTOCOLOS TERAPÊUTICOS SOBRE A SECREÇÃO DE CITOCINAS

Os camundongos do grupo Asma apresentaram um perfil de secreção de citocinas padrão para modelos experimentais de asma crônica, conforme mostra a figura 5. Esse padrão é composto por uma secreção significativa de IL-5 e IL-6, citocinas pró-inflamatórias de perfil Th2 e Th1, respectivamente, de acordo com a representação das figuras 5A e 5B.

Além disso, foi possível identificar que os animais do grupo mencionado apresentaram um perfil significativo na diminuição de secreção das citocinas IL-10, citocina de perfil regulatório, quando comparados com animais dos grupos Asma + Nat e Asma + L-glt + Nat (Figura 5C). Ademais, identificou-se que a natação induziu um aumento significativo na secreção de IFN- γ , citocina de perfil Th1, nos grupos Asma + Nat e Asma + L-glt + Nat quando comparados com o grupo Asma (Figura 5D).

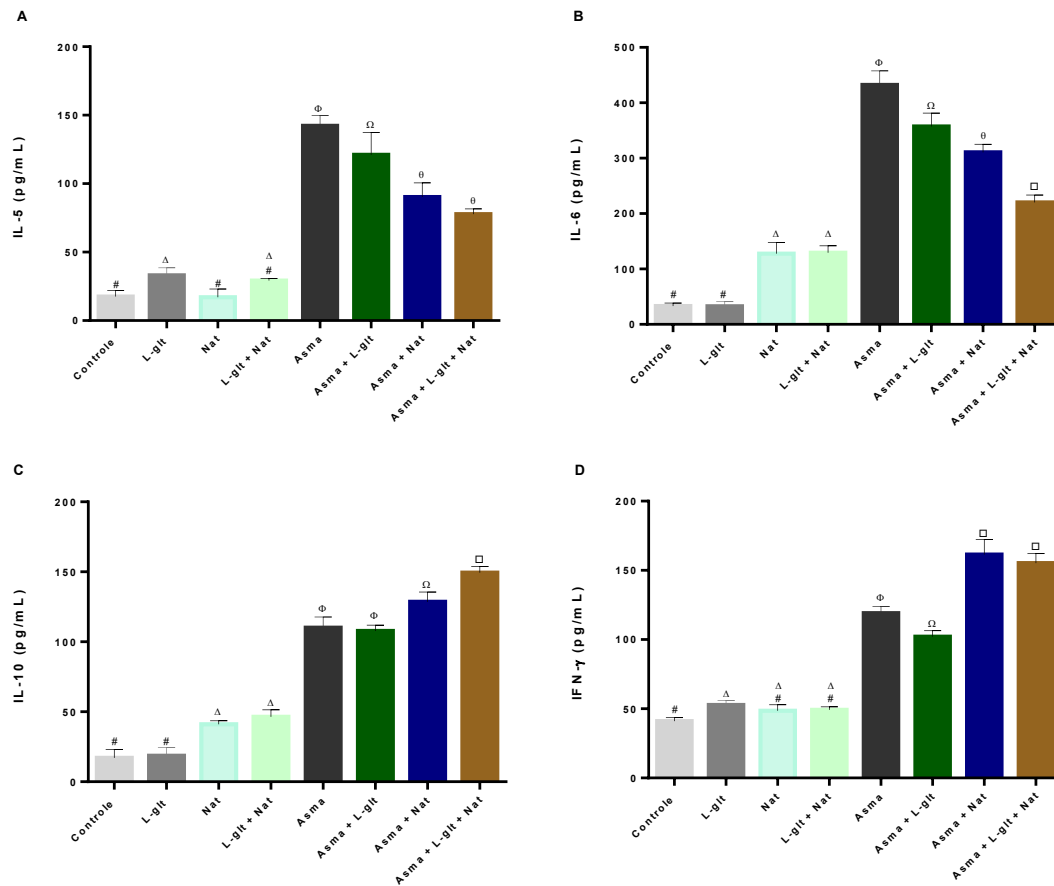


Figura 5 – Níveis de citocinas no homogenato pulmonar. A Figura representa a concentração (pg/mL) das citocinas IL-5 (Fig. 5A), IL-6 (Fig. 5B), IL-10 (Fig. 5C) e IFN- γ (Fig. 5D) detectadas no homogenato pulmonar dos diferentes grupos experimentais. Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão. As diferenças estatisticamente significativas foram determinadas por meio do teste *One-way* ANOVA com o teste de comparações múltiplas de *Tukey*. Símbolos diferentes nas colunas representam significância estatística entre os grupos.

A identificação das citocinas IL-6 e IL-10, de perfil pró-inflamatório e perfil regulatório, respectivamente, mensuradas no homogenato muscular dos camundongos do grupo controle e submetidos à narração estão representadas na figura 6. Para ambas as citocinas, encontrou-se uma concentração significativa na amostra analisada, quando comparado com as amostras do grupo controle, como indica da figura 6A e 6B.

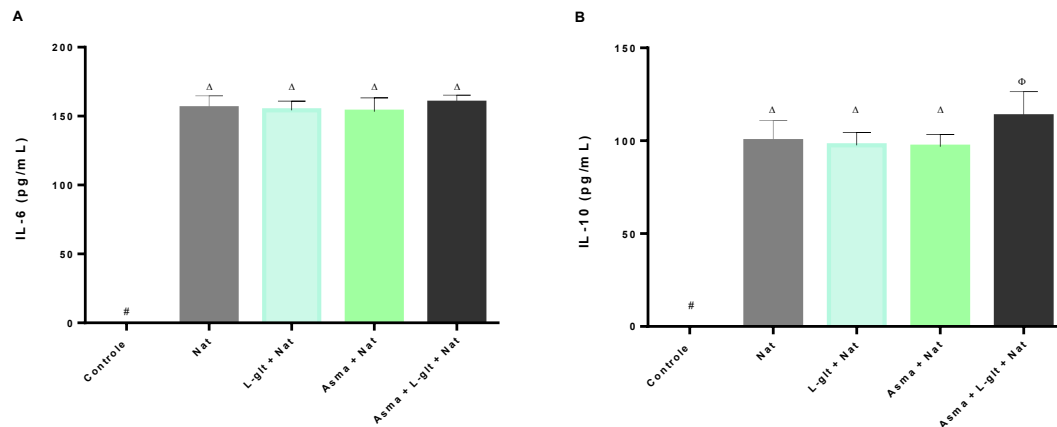


Figura 6 – Níveis de citocinas no homogenato muscular. A Figura representa a concentração (pg/mL) das citocinas IL-6 (Fig. 6A) e IL-10 (Fig. 6B) identificadas no homogenato muscular do grupo controle e dos diferentes grupos experimentais submetidos ao treinamento da natação. Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão. As diferenças estatisticamente significativas foram determinadas por meio do teste *One-way* ANOVA com o teste de comparações múltiplas de *Tukey*. Símbolos diferentes nas colunas representam significância estatística entre os grupos.

6.6 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA PULMONAR DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

A coloração de Hematoxilina e Eosina (H&E) foi empregada para corar as células inflamatórias presentes do parênquima pulmonar dos camundongos alocados nos diferentes modelos experimentais dessa pesquisa, como mostra a figura 7.

Nos cortes histológicos dos animais do grupo Asma identifica-se edema nos septos pulmonares, presença de muco dentro dos bronquíolos e a presença de infiltrados inflamatórios dispersos nos septos pulmonares, e ao redor de vasos e bronquíolos, indicando a presença de inflamação pulmonar crônica.

Em contrapartida, nos cortes dos camundongos dos grupos Asma + L-glt, Asma + Nat e e Asma + L-glt + Nat, não é possível localizar focos inflamatórios em nenhuma localização do pulmão, diminuição do edema e da deposição de muco dentro dos bronquíolos denotando a eficácia dos tratamentos empregados.

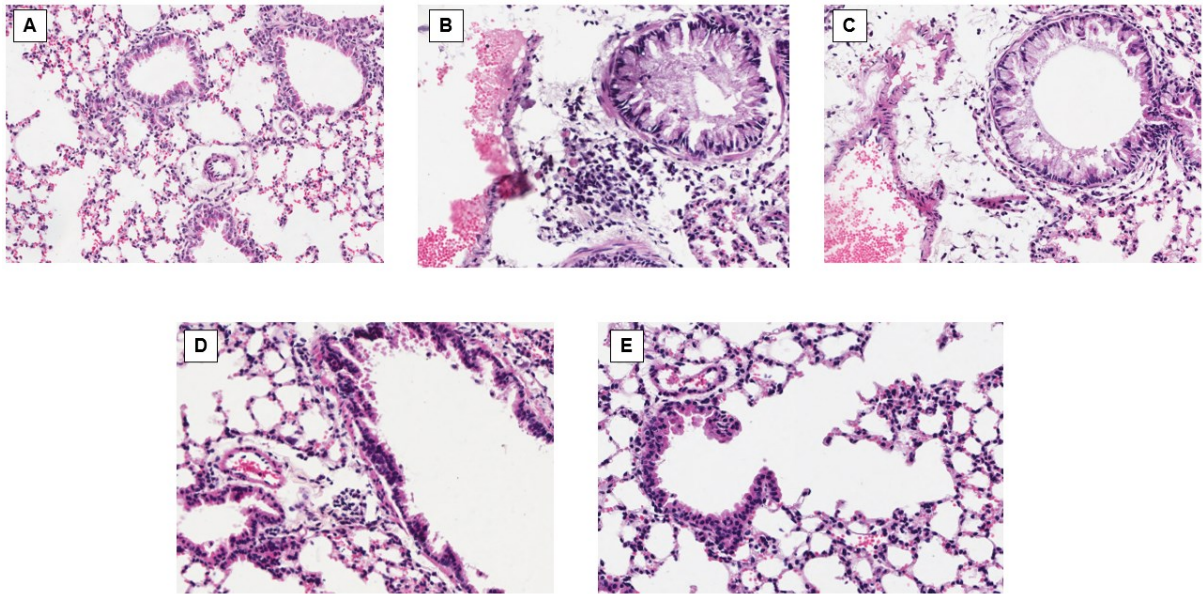


Figura 7 - Seções histopatológicas em modelo de asma crônica experimental submetidos a diferentes modalidades terapêuticas. Seções de tecido pulmonar de camundongo coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) (A-E), com ampliação de 10x. Em (A), a seção representa o pulmão do grupo Controle; (B) mostra as seções pulmonares de camundongos asmáticos; (C) representa as seções pulmonares de camundongos no grupo Asma + L-glt; (D) retrata as seções pulmonares de camundongos no grupo Asma + Nat; e (E) exhibe as seções pulmonares de camundongos no grupo Asma + L-glt + Nat.

7 DISCUSSÃO

Neste estudo, buscou-se avaliar se a natação de moderada intensidade e a suplementação oral com L-glutamina, separadamente ou associadas, contribuiriam para controle da resposta imunológica e fisiológica da asma crônica experimental induzida pela exposição ao alérgeno OVA.

Após realizar um protocolo de natação e suplementação por quatro semanas, os camundongos apresentaram aprimoramento do condicionamento físico, diminuição da secreção dos níveis de lactato plasmático, recuperação dos parâmetros fisiológicos respiratórios basais, diminuição nos níveis de secreção de citocinas de perfil Th2 e aumento nos níveis de secreção de citocinas regulatórias e de perfil Th1, além de evoluírem para restauração a nível histológico pulmonar. Porém, nos grupos estudados, não houve variações significativas na resposta imune humoral dos animais asmáticos submetidos às terapêuticas empregadas.

No que diz respeito à atividade física aeróbica, diversos estudos já evidenciaram os efeitos anti-inflamatórios proporcionados pela prática de natação em

diferentes níveis de intensidade, em modelos experimentais murinos de inflamação pulmonar induzidos por distintos antígenos como lipopolissacarídeos (RAMOS et al., 2010), fumaça de cigarro (TOLEDO et al., 2012), poluição (AVILA et al., 2015), proteína recombinante Blo t 5 (OLIVEIRA, 2018) e ovoalbumina (BRUGGEMANN et al., 2015). Além disso, esse efeito favorável do exercício físico também já foi descrito em modelos murinos que investigavam a atenuação da hiperreatividade das vias aéreas e da inflamação (ARAÚJO et al., 2016; FRANÇA-PINTO et al., 2015; VIEIRA et al., 2012).

Evidências longínquas, como a de Jacques e Silva (1997), já informavam que a prática da natação era a menos propensa a desencadear asma em comparação com outros exercícios físicos, como a corrida e o ciclismo. Isso se deve ao fato de que no ambiente aquático a respiração ocorre em um ar mais quente e úmido, fator que contribui para a redução do broncoespasmo, tornando-a a atividade física mais recomendada por profissionais de saúde (BERNARD et al., 2010; WICHER et al., 2010).

Segundo Bernard (2010), a natação é considerada um exercício saudável e bem tolerado por indivíduos asmáticos em comparação com outras modalidades de atividade física. A proteção proporcionada pela natação pode ser atribuída à elevada umidade do ar inspirado na proximidade da água, o que diminui a perda de água pela respiração e, possivelmente, reduz a osmolaridade do muco nas vias aéreas (JACQUES; SILVA, 1997; BERNARD et al., 2010; WICHER et al., 2010). Além disso, ela reduz o broncoespasmo induzido por exercício (SARMENTO, 2015).

Esses estudos supracitados estão em consonância com as orientações da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o Gerenciamento da Asma (SBPTMA) publicadas posteriormente. Elas enfatizam a relevância de abordagens não medicamentosas no tratamento. Isso se deve ao fato de que aumentar o limiar anaeróbio pode diminuir a susceptibilidade ao broncoespasmo induzido pelo exercício, desde que seja orientado e praticado de maneira adequada (CARVALHO et al., 2012).

Há décadas, é sabido que o exercício físico pode desencadear crises de asma, mas também se reconhece que a prática regular e planejada pode reduzir a frequência dessas crises. Neste cenário, sabe-se que a natação, como parte do tratamento não medicamentoso, tem se mostrado eficaz no manejo da asma em crianças (RAM; ROBINSON; BLACK, 2000; MENDES et al., 2010; MATIAS; OLIVEIRA, 2017).

No protocolo de treinamento instituído nessa pesquisa, após cada semana de treinamento, foi identificado um aumento na capacidade de carga suportada pelos camundongos treinados, indicando uma melhoria no condicionamento físico dos animais. Algumas fontes sugerem que tal situação pode ser inferida desde que haja o aumento da carga suportada pelos animais e aumento do tempo de duração dos testes físicos até a exaustão, em comparação com os testes iniciais (GOBATTO et al., 2009; RAMOS et al., 2010).

O condicionamento físico pode influenciar a produção de lactato de várias maneiras. Em geral, pessoas com bom condicionamento físico têm sistemas cardiovasculares e respiratórios mais eficientes, o que significa que podem fornecer oxigênio aos músculos de forma mais eficaz. Isso pode reduzir a dependência do metabolismo anaeróbico e, conseqüentemente, diminuir a produção de lactato durante o exercício de intensidade moderada. Durante o exercício, os músculos podem produzir lactato como resultado da glicólise anaeróbica, que converte glicose em energia (ABREU et al., 2016).

Em resumo, em situações de exercício de intensidade moderada a alta, o condicionamento físico aprimorado pode induzir a produção de menores quantidades de lactato do que indivíduos com pior condicionamento (GOBATTO et al., 2009; ABREU et al., 2016). Isso justifica o fato de os camundongos dos grupos submetidos à natação, nesse estudo, apresentarem menores quantidades de lactato plasmático quando comparados com os grupos de animais asmáticos e do grupo controle. Além disso, a associação da natação com a suplementação com L-glutamina promoveu nesse grupo uma diminuição significativa desse metabolito circulante, uma vez que a produção de lactato também é influenciada por fatores como genética, tipo de exercício e alimentação (HUANG et al., 2016).

Considerando os parâmetros respiratórios analisados fora observado que a presença de inflamação nas vias aéreas afeta a função pulmonar, impactando na dinâmica dos volumes respiratórios identificados nos camundongos. Foi observado um aumento no volume corrente mobilizado pelos animais em cada ciclo respiratório, juntamente com um aumento na frequência respiratória. O mesmo perfil de alterações respiratórias foi descrito por Oliveira (2018) em um modelo de inflamação das vias aéreas induzido pela proteína recombinante Blo t 5.

Esses resultados indicam que a inflamação pulmonar resulta em um aumento no volume corrente basal, demandando uma maior busca por ar para manter a

funcionalidade respiratória padrão durante a hematose. No entanto, a prática de natação e a suplementação com L-glutamina conseguiu preservar a funcionalidade respiratória, visto que os camundongos dos grupos Asma + L-glt, Asma + Nat e Asma + L-glt + Nat apresentam mobilização de volumes correntes e frequência respiratória semelhantes aos do grupo Controle e menores que do grupo Asma.

Uma alteração importante ocasionada pela natação nos indivíduos asmáticos é a modificação do padrão de respiração (NATALI; REGAZZI; ROSE, 2002). Em decorrência do treinamento a respiração considerada "rápida e superficial" se transforma em uma respiração "lenta e profunda", o que contribui para a diminuição do broncoespasmo. Essa mudança pode ter impactos significativos nas atividades cotidianas desses indivíduos, principalmente durante a prática de exercícios físicos (NATALI; REGAZZI; ROSE, 2002; FAES; BALBÉ, 2020).

De acordo com McArdle, Katch e Katch (2013), a participação em atividades aquáticas como natação e mergulho pode promover o desenvolvimento da capacidade pulmonar. Esses exercícios fortalecem os músculos respiratórios ao desafiar a resistência da água contra o tórax. A aplicação de potência e força durante essas atividades resulta no desenvolvimento de uma significativa capacidade vital forçada no praticante. Isso se refere ao volume máximo de ar que pode ser inspirado nos pulmões com esforço máximo, a partir do ponto máximo de inspiração (PEREIRA, 2002).

Nota-se que o exercício de moderada intensidade não alterou a secreção de anticorpos da classe IgE contra OVA nos animais asmáticos treinados, assim como para a classe de IgG anti-OVA. Além disso, encontrou-se a expressão de significativa de IL-10 e IFN- γ no homogenato pulmonar dos camundongos asmáticos treinados, sugerindo que os efeitos benéficos do exercício associado a suplementação com L-glutamina neste modelo murino de asma são mediados pela melhoria da resposta imune regulatória e resposta imune de perfil Th1.

Os resultados obtidos indicaram uma redução nos níveis de IL-5 e IL-6 nos tecidos pulmonares dos grupos asmáticos submetidos aos diferentes tratamentos. Essas descobertas estão alinhadas com as observações de Vieira et al. (2013), que, ao investigarem um modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica, constataram que camundongos submetidos a um treinamento moderado em esteira aeróbica apresentaram uma contagem reduzida de células positivas para IL-5 nas vias aéreas.

Além disso, Brüggemann et al. (2015) encontraram diminuição de IL-5 e IL-6 e aumento da secreção de IL-10 nos tecidos pulmonares dos camundongos asmáticos que foram submetidos a natação de alta intensidade. Isso reforça os efeitos anti-inflamatórios do exercício quando realizado em modelos experimentais de asma, independente da intensidade do exercício instituída.

A IL-6, conhecida como fator exercício ou miocina, pode desempenhar uma função reguladora do processo inflamatório, sendo reconhecida na literatura como o principal agente que controla a resposta de fase aguda durante o exercício físico. Essa citocina é produzida em concentrações mais elevadas pelo tecido muscular estriado esquelético, pelos leucócitos e pelas células endoteliais, sendo a sua secreção correlacionada com a intensidade, duração e quantidade de massa muscular envolvida na atividade física (PETERSEN e PEDERSEN, 2005; NEVES et al., 2014; OLIVEIRA, 2018).

Sua principal função, diante do seu pleiotropismo, é promover o *switch* de secreção celular para citocinas regulatórias, como a IL-10. Diante disso, é factível que a ação da IL-6 contribua para a atenuação do processo inflamatório encontrado nessa pesquisa (NEVES et al., 2014; OLIVEIRA, 2018).

Também fora identificado neste estudo que a natação e a suplementação em animais sensibilizados reduziram a expressão peribronquial de células inflamatórias, sugerindo que ela pode estar envolvida tanto nos efeitos anti-inflamatórios quanto nos efeitos antifibróticos induzidos pelo exercício, conforme descrito por (DECAESTEKER et al., 2022).

As células inflamatórias desempenham um papel crucial na inflamação pulmonar, pois são responsáveis pela produção de citocinas e quimiocinas que atraem novas células para o tecido, contribuindo para o remodelamento e a obstrução das vias aéreas (MARTIN e FREVERT, 2005; BARRIOS, 2008). A prática de atividade física é capaz de reduzir o recrutamento celular, atenuando assim o processo inflamatório nos pulmões (TERRA et al., 2012; OLIVEIRA, 2018).

Do ponto de vista histopatológico, os dados dessa pesquisa demonstraram a diminuição da deposição de muco no lúmen bronquial dos camundongos tratados com a natação de moderada intensidade e suplementação com L-glutamina oral.

A produção excessiva de muco é um fator significativo que contribui para a obstrução do fluxo de ar tanto em casos leves quanto graves de asma, especialmente durante exacerbações e incidentes fatais de asma (KHALFAOUI et al., 2022). A

expressão do gene mucina-5AC (MUC5AC) e subsequente secreção de muco são influenciados por uma variedade de citocinas, fatores de crescimento e mediadores lipídicos (ARTHUR et al., 2015).

Associado à alta produção de muco no lúmen dos bronquíolos, a polarização para a asma eosinofílica é induzida pela ação da citocina IL-5 (ZHANG et al., 2019). Tratamentos voltados para a asma têm como objetivo reduzir as exacerbações da asma eosinofílica, principalmente atuando na prevenção do recrutamento de eosinófilos durante esses episódios (KHALFAOUI et al., 2022). Para isso, é necessária a diminuição da secreção da citocina IL-5, devido ao seu papel quimiotático e ativador de eosinófilos (NAKAGOME; NAGATA, 2018).

Os dados dessa pesquisa identificaram que a natação e a suplementação com L-glutamina influenciam na diminuição da secreção de IL-5 nos pulmões de camundongos asmáticos. Portanto, é possível inferir que o aumento persistente da massa de músculo liso das vias aéreas, hiperplasia glandular, produção elevada de muco e ativação de mastócitos, características de manutenção da asma grave (KHALFAOUI et al., 2022), sejam diminuídos nos animais que receberam essas modalidades de tratamento.

A broncoconstrição e o acúmulo de muco são as principais causas de obstrução das vias aéreas, levando a sintomas, exacerbações e até mesmo morte na asma (KHALFAOUI et al., 2022). Assim, tanto essa pesquisa desenvolvida, como pesquisas futuras devem se concentrar na inativação dos fatores que sustentam essas características patológicas anormais.

Ko et al. (2007) identificaram que a biodisponibilidade de glutamina em um modelo experimental de asma reduziu o número de células epiteliais que continham muco nas vias aéreas de camundongos e observou-se pouco ou nenhum muco nos lúmens brônquicos. Os autores afirmam que a glutamina inibe a ação da fosfolipase A₂ citosólica dependente de cálcio (cPLA₂) influenciando prevenir a infiltração eosinofílica, a hiperplasia de células calciformes produtoras de muco e a hiper responsividade das vias aéreas (KO et al., 2007). Ao considerar essas descobertas em conjunto com os dados dessa pesquisa, sugere-se uma estreita ligação entre a suplementação com L-glutamina e inibição da atividade da cPLA₂ nos fenótipos asmáticos dependentes de uma resposta de perfil Th2.

Assim, é possível que haja uma redução na quantidade celular de glutamina durante episódios asmáticos, levando a aumentos na fosforilação e na atividade da

cPLA₂. O fornecimento adicional deste aminoácido parece corrigir essas irregularidades.

Tomados em conjunto, os resultados obtidos neste estudo revelam que a prática de natação e a suplementação com L-glutamina demonstraram um notável efeito sinérgico na redução do processo inflamatório alérgico. Este efeito sinérgico resultou em melhorias significativas em diversos parâmetros da função respiratória em camundongos asmáticos. A ativação coordenada de mecanismos celulares regulatórios foi evidenciada, culminando no aumento da produção de IL-10 e IFN- γ . Importante destacar que esses benefícios foram alcançados sem interferência na produção de anticorpos das classes IgE e IgG.

Este estudo reforça a hipótese inicial de um efeito sinérgico entre a suplementação de L-glutamina e a atividade de natação na modulação da resposta imune na asma experimental, abrindo perspectivas promissoras para abordagens terapêuticas integradas no tratamento dessa condição respiratória.

8 CONCLUSÕES

- 1) Camundongos dos grupos submetidos à natação apresentaram menores quantidades de lactato plasmático quando comparados com os grupos de animais asmáticos e do grupo controle.
- 2) A associação da natação com a suplementação com L-glutamina promoveu diminuição significativa desse metabolito circulante.
- 3) A prática de natação e a suplementação com L-glutamina foram capazes de preservar a funcionalidade respiratória.
- 4) A natação nos indivíduos asmáticos foi capaz de transformar o padrão de respiração, passando de "rápida e superficial" para respiração lenta e profunda.
- 5) O exercício de moderada intensidade em animais asmáticos não foi capaz de alterar os níveis de anticorpos IgE anti-OVA bem como de IgG anti-OVA.
- 6) O exercício associado à suplementação com L-glutamina em modelo murino de asma mostrou melhora da resposta imune regulatória (aumento de IL-10) e do perfil Th1 (aumento de IFN- γ).
- 7) A natação de moderada intensidade e a suplementação com L-glutamina influenciaram na diminuição da secreção de IL-5 nos pulmões de camundongos asmáticos.
- 8) A prática de natação aliada à suplementação de L-glutamina revelou um notável efeito sinérgico, resultando na redução do processo inflamatório alérgico e melhorias na função respiratória em camundongos asmáticos. A ativação coordenada de mecanismos regulatórios, valida a eficácia dessa abordagem integrada, destacando seu potencial terapêutico na asma experimental.

REFERÊNCIAS

- ABREU, Phablo et al. Anaerobic threshold employed on exercise training prescription and performance assessment for laboratory rodents: A short review. **Life sciences**, v. 151, p. 1-6, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.02.016>
- AGACHE, Ioana et al. Advances and highlights in asthma in 2021. **Allergy**, v. 76, n. 11, p. 3390-3407, 2021. <https://doi.org/10.1111/all.15054>
- AGACHE, Ioana. Severe asthma phenotypes and endotypes. In: **Seminars in immunology**. Academic Press, 2019. p. 101301. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.101301>
- ALBERCA-CUSTÓDIO, Ricardo Wesley et al. Aerobic exercise reduces asthma phenotype by modulation of the leukotriene pathway. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 237, 2016. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00237>
- ALMEIDA, Pedro William M. et al. Swim training suppresses tumor growth in mice. **Journal of applied physiology**, v. 107, n. 1, p. 261-265, 2009. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00249.2009>
- ARAÚJO, C. C. et al. Regular and moderate aerobic training before allergic asthma induction reduces lung inflammation and remodeling. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 26, n. 11, p. 1360-1372, 2016. <https://doi.org/10.1111/sms.12614>
- ARTHUR, Greer K. et al. KCa3. 1 K⁺ channel expression and function in human bronchial epithelial cells. **PLoS One**, v. 10, n. 12, p. e0145259, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145259>
- ASHER, I. et al. Global Asthma Network survey suggests more national asthma strategies could reduce burden of asthma. **Allergologia et immunopathologia**, v. 45, n. 2, p. 105-114, 2017. <http://dx.doi.org/10.5588/ijtld.14.0246>
- AUN, M. V. et al. Animal models of asthma: utility and limitations. **J. Asthma Allergy**. v. 10, p. 293, 2017. <https://doi.org/10.2147/JAA.S121092>
- 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137273>
- BARTEMES, Kathleen R.; KITA, Hirohito. Dynamic role of epithelium-derived cytokines in asthma. **Clinical immunology**, v. 143, n. 3, p. 222-235, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2012.03.001>
- BASSIT, Reinaldo A. et al. Branched-chain amino acid supplementation and the immune response of long-distance athletes. **Nutrition**, v. 18, n. 5, p. 376-379, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(02\)00753-0](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(02)00753-0)

BATES, J. H. et al. Animal models of asthma. **Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol**. v. 297, n. 3, p. 401-10, 2009. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00027.2009>

BERNARD, Alfred. Asthma and swimming: weighing the benefits and the risks. **Jornal de pediatria**, v. 86, p. 350-351, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0021-75572010000500002>

BOGDANSKE, J. J. et al. **Laboratory mouse procedural techniques: manual and DVD**. CRC Press, 2010. <https://doi.org/10.1201/b17377>

BOROWCZYK, Julia et al. IL-25 (IL-17E) in epithelial immunology and pathophysiology. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 148, n. 1, p. 40-52, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.12.628>

BOULET, Louis-Philippe. Airway remodeling in asthma: mechanisms, clinical relevance, treatment, and prevention. **Canadian Journal of Respiratory, Critical Care, and Sleep Medicine**, v. 1, n. 1, p. 39-42, 2017. <https://doi.org/10.1080/24745332.2017.1295776>

BOULET, Louis-Philippe. Airway remodeling in asthma: update on mechanisms and therapeutic approaches. **Current opinion in pulmonary medicine**, v. 24, n. 1, p. 56-62, 2018. <https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000441>

BRASIL. Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. **Regulamenta o inciso VII do parágrafo 1º do artigo 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências**. Diário Oficial da União de 9 de outubro de 2008, Seção 1, Pág. 8. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm. Acesso em 17 de outubro de 2023.

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. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1395588>

BRUIJNZEEL, Piet LB; UDDIN, Mohib; KOENDERMAN, Leo. Targeting neutrophilic inflammation in severe neutrophilic asthma: can we target the disease-relevant neutrophil phenotype?. **Journal of Leucocyte Biology**, v. 98, n. 4, p. 549-556, 2015. <https://doi.org/10.1189/jlb.3VMR1214-600RR>

BUSH, Andrew. Pathophysiological mechanisms of asthma. **Frontiers in pediatrics**, v. 7, p. 68, 2019. <https://doi.org/10.3389/fped.2019.00068>

CARSON, Kristin V. et al. Physical training for asthma. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 9, 2013. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001116.pub4>

CARVALHO, C. et al. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o Manejo da Asma. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 38, n. supl1, p. 1-46, 2012. Disponível em: https://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/pdfs/Diretrizes_Sociedade_Brasileira_Pneumologia-Tisiologia_Manejo_Aasma-2012.pdf. Acesso em 02 de janeiro de 2024.

CEVHERTAS, Lacin et al. Advances and recent developments in asthma in 2020. **Allergy**, v. 75, n. 12, p. 3124-3146, 2020. <https://doi.org/10.1111/all.14607>

CLIFFORD, Tom et al. T-regulatory cells exhibit a biphasic response to prolonged endurance exercise in humans. **European Journal of Applied Physiology**, v. 117, p. 1727-1737, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00421-017-3667-0>

CURI, Rui et al. A past and present overview of macrophage metabolism and functional outcomes. **Clinical Science**, v. 131, n. 12, p. 1329-1342, 2017. <https://doi.org/10.1042/cs20170220>

CURI, Rui et al. Glutamine-dependent changes in gene expression and protein activity. **Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease**, v. 23, n. 2, p. 77-84, 2005. <https://doi.org/10.1002/cbf.1165>

CURI, Rui et al. Regulatory principles in metabolism—then and now. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 13, p. 1845-1857, 2016. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160103>

CRUZAT, Vinicius et al. Glutamine: metabolism and immune function, supplementation and clinical translation. **Nutrients**, v. 10, n. 11, p. 1564, 2018. <http://dx.doi.org/10.3390/nu10111564>

CRUZAT, Vinicius F. et al. Oral supplementations with free and dipeptide forms of L-glutamine in endotoxemic mice: effects on muscle glutamine-glutathione axis and heat shock proteins. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 25, n. 3, p. 345-352, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.11.009>

CUNNINGHAM, J. B.; MCCRUM-GARDNER, E. Power, effect and sample size using GPower: practical issues for researchers and members of research ethics committees. **Evidence-Based Midwifery**, v. 5, n. 4, p. 132-136, 2007. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/281570233_Power_effect_and_sample_size_using_GPower_Practical_issues_for_researchers_and_members_of_research_ethics_committees. Acesso em 17 de outubro de 2023.

DECAESTEKER, Tatjana et al. Chlorine exposure and intensive exercise induces airway hyperreactivity in a 3-week murine exercise model. **Science of The Total Environment**, v. 843, p. 157046, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157046>

DUTRA, Moisés Santos et al. Revisão sistemática sobre modelos experimentais de asma aguda e crônica induzidos com extrato de açúcar da poeira doméstica. **Clinical & Biomedical Research**, v. 37, n. 2, 2017. <https://doi.org/10.4322/2357-9730.71771>

FAES, Andressa; BALBÉ, Giovani Pereira. Influência da Natação em Crianças e Adolescentes Asmáticos: Um Estudo de Revisão. **BIOMOTRIZ**, v. 14, n. 4, p. 19-28, 2020. <https://doi.org/10.33053/biomotriz.v14i4.261>

FAHY, John V. Type 2 inflammation in asthma—present in most, absent in many. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 1, p. 57-65, 2015. <https://doi.org/10.1038/nri3786>

FEBBRAIO, Mark A.; PEDERSEN, Bente Klarlund. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. **The FASEB journal**, v. 16, n. 11, p. 1335-1347, 2002. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0876rev>

FEHRENBACH, Heinz; WAGNER, Christina; WEGMANN, Michael. Airway remodeling in asthma: what really matters. **Cell and tissue research**, v. 367, p. 551-569, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2566-8>

FRANÇA-PINTO, Andrezza et al. Aerobic training decreases bronchial hyperresponsiveness and systemic inflammation in patients with moderate or severe asthma: a randomised controlled trial. **Thorax**, v. 70, n. 8, p. 732-739, 2015. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2014-206070>

GARBER, Carol Ewing et al. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. **Med. Sci. Sports Exerc.** 1334–1359, 2011. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e318213fefb>

GAUVREAU, Gail M. et al. Thymic stromal lymphopoietin: its role and potential as a therapeutic target in asthma. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 24, n. 8, p. 777-792, 2020. <https://doi.org/10.1080/14728222.2020.1783242>

GLEESON, Michael et al. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. **Nature reviews immunology**, v. 11, n. 9, p. 607-615, 2011. <https://doi.org/10.1038/nri3041>

GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA (GINA). **Global Strategy for Asthma Management and Prevention**, 2023. Disponível em: https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2023/07/GINA-2023-Full-report-23_07_06-WMS.pdf. Acesso em março de 2024.

GOBATTO, Claudio Alexandre et al. Maximal lactate steady state for aerobic evaluation of swimming mice. **Comparative Exercise Physiology**, v. 6, n. 3, p. 99-103, 2009. <https://doi.org/10.1017/S1755254009990109>

GOH, Jorming; GOH, Kian Peng; ABBASI, Asghar. Exercise and adipose tissue macrophages: new frontiers in obesity research?. **Frontiers in endocrinology**, v. 7, p. 65, 2016. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00065>

GROHMANN, Ursula et al. Amino-acid sensing and degrading pathways in immune regulation. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 35, p. 37-45, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2017.05.004>

HABIB, Nazia; PASHA, Muhammad Asghar; TANG, Dale D. Current understanding of asthma pathogenesis and biomarkers. **Cells**, v. 11, n. 17, p. 2764, 2022. <https://doi.org/10.3390/CELLS11172764>

HIZUME-KUNZLER, Deborah Camargo et al. Aerobic exercise decreases lung inflammation by IgE decrement in an OVA mice model. **International Journal of Sports Medicine**, v. 38, n. 06, p. 473-480, 2017. <https://doi.org/10.1055/s-0042-121638>

HOUGH, Kenneth P. et al. Airway remodeling in asthma. **Frontiers in medicine**, v. 7, p. 191, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00191>

HUANG, Wen-Ching et al. Association of physical performance and biochemical profile of mice with intrinsic endurance swimming. **International Journal of Medical Sciences**, v. 13, n. 12, p. 892, 2016. <https://doi.org/10.7150/ijms.16421>

JACQUES, Gisele Pereira; SILVA, Osni Jacó da. Influência da natação como coadjuvante terapêutico no tratamento de crianças asmáticas. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 3, p. 15-21, 1997. <https://doi.org/10.1590/S1517-86921997000100005>

JOHANSSON, Kristina; MCSORLEY, Henry J. Interleukin-33 in the developing lung—Roles in asthma and infection. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 30, n. 5, p. 503-510, 2019. <https://doi.org/10.1111/pai.13040>

KEW, Samantha et al. Dietary glutamine enhances murine T-lymphocyte responsiveness. **The Journal of nutrition**, v. 129, n. 8, p. 1524-1531, 1999. <https://doi.org/10.1093/jn/129.8.1524>

KHALFAOUI, Latifa et al. Airway remodelling rather than cellular infiltration characterizes both type2 cytokine biomarker-high and-low severe asthma. **Allergy**, v. 77, n. 10, p. 2974-2986, 2022. <https://doi.org/10.1111/all.15376>

KIM, Sang-Hyun; KIM, Eun-Kyung; CHOI, Eun-Ju. High-intensity swimming exercise increases dust mite extract and 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene-derived atopic dermatitis in BALB/c mice. **Inflammation**, v. 37, p. 1179-1185, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10753-014-9843-z>

KISTEMAKER, L. E. M.; PRAKASH, Y. S. Airway innervation and plasticity in asthma. **Physiology**, v. 34, n. 4, p. 283-298, 2019. <https://doi.org/10.1152/physiol.00050.2018>

KO, H. M. et al. Glutamine preferentially inhibits T-helper type 2 cell-mediated airway inflammation and late airway hyperresponsiveness through the inhibition of cytosolic phospholipase A2 activity in a murine asthma model. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 38, n. 2, p. 357-364, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2007.02900.x>

KUROWSKI, Marcin et al. Physical exercise, immune response, and susceptibility to infections—Current knowledge and growing research areas. **Allergy**, v. 77, n. 9, p. 2653-2664, 2022. <https://doi.org/10.1111/all.15328>

LAMBRECHT, B. N. et al. Mechanism of action of clinically approved adjuvants. **Curr. Opin. Immunol.** v. 21, n. 1, p. 23-29, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.01.004>

LEE, Boae et al. Anti-oxidant and anti-inflammatory effects of aquatic exercise in allergic airway inflammation in mice. **Frontiers in Physiology**, v. 10, p. 1227, 2019. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01227>

LEE, Chang-Hoon et al. Glutamine suppresses airway neutrophilia by blocking cytosolic phospholipase A2 via an induction of MAPK phosphatase-1. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 11, p. 5139-5146, 2012. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201599>

LEE, C. H. et al. Mechanism of glutamine inhibition of cytosolic phospholipase a2 (cPLA2): Evidence of physical interaction between glutamine-Induced mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and cPLA2. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 180, n. 3, p. 571-580, 2015. <https://doi.org/10.1111/cei.12585>

LIU, Gang et al. Therapeutic targets in lung tissue remodelling and fibrosis. **Pharmacology & therapeutics**, v. 225, p. 107839, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107839>

LLAMAS-VELASCO, Sara et al. Physical activity and long-term mortality risk in older adults: A prospective population based study (NEDICES). **Preventive medicine reports**, v. 4, p. 546-550, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.pmedr.2016.10.002>

MACKENZIE, Breanne et al. Dendritic cells are involved in the effects of exercise in a model of asthma. **Med Sci Sports Exerc**, v. 48, n. 8, p. 1459-67, 2016. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000000927>

MCARDLE, William D.; KATCH, Frank I.; KATCH, Vitor L. **Fisiologia do Exercício: nutrição, energia e desempenho humano**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 12; 32, 2013.

MATIAS, João Lucas Pinto; OLIVEIRA, Braulio Nogueira. Interface entre a natação e o tratamento da asma sob a perspectiva do paciente asmático. **Dados**, v. 9, p. 11, 2017. <http://dx.doi.org/10.17058/cinergis.v18i4.10511>

MENDES, Felipe AR et al. Effects of aerobic training on psychosocial morbidity and symptoms in patients with asthma: a randomized clinical trial. **Chest**, v. 138, n. 2, p. 331-337, 2010. <https://doi.org/10.1378/chest.09-2389>

MORAES-FERREIRA, Renilson et al. Physical training reduces chronic airway inflammation and mediators of remodeling in asthma. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2022, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/5037553>

NAIR, Parameswaran; SURETTE, Michael G.; VIRCHOW, J. Christian. Neutrophilic asthma: misconception or misnomer?. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 9, n. 5, p. 441-443, 2021. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(21\)00023-0](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(21)00023-0)

NAKAGOME, Kazuyuki; NAGATA, Makoto. Involvement and possible role of eosinophils in asthma exacerbation. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 2220, 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02220>

NATALI, Antônio José; REGAZZI, Adair José; ROSE, Eduardo Henrique. Efeito do treinamento em natação sobre a severidade do broncoespasmo induzido por exercício. **Revista Paulista de Educação Física**, v. 16, n. 2, p. 198-210, 2002. <https://doi.org/10.11606/issn.2594-5904.rpef.2002.138742>

NEVES, Pedro Rogério da Silva et al. Efeitos de diferentes intensidades de exercício sobre a concentração sérica de interleucinas. **Revista Brasileira de Educação Física e Esporte**, v. 28, p. 545-552, 2014. <https://doi.org/10.1590/1807-55092014000400545>

NIALS, A. T.; UDDIN, S. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. **Dis Model Mech.** v. 1, n. 4-5, p. 213-220, 2008. <https://doi.org/10.1242/dmm.000323>

NIEMAN, David C.; WENTZ, Laurel M. The compelling link between physical activity and the body's defense system. **Journal of sport and health science**, v. 8, n. 3, p. 201-217, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jshs.2018.09.009>

NOLIN, James D. et al. Function of secreted phospholipase A2 group-X in asthma and allergic disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1864, n. 6, p. 827-837, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.11.009>

OLIVEIRA, Gisele P. et al. Exogenous glutamine in respiratory diseases: myth or reality?. **Nutrients**, v. 8, n. 2, p. 76, 2016. <https://doi.org/10.3390/nu8020076>

OLIVEIRA, V. J. **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**. 2018. 76 p. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018. <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.130>

ÖZDEMİR, Cansu et al. Periostin is temporally expressed as an extracellular matrix component in skeletal muscle regeneration and differentiation. **Gene**, v. 553, n. 2, p. 130-139, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.10.014>

PEREIRA, Carlos Alberto de Castro. **Espirometria**. *Jornal de Pneumologia*. Brasília, n. 28, s. 3, p. S1-S82, out. 2002. Disponível em: https://cdn.publisher.gn1.link/jornaldepneumologia.com.br/pdf/Suple_139_45_11%20Espirometria.pdf. Acesso em 22 de novembro de 2023.

PNIEWSKA, Ewa et al. The step further to understand the role of cytosolic phospholipase A 2 Alpha and group X secretory phospholipase A 2 in allergic inflammation: Pilot study. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/670814>

PIJNENBURG, Mariëlle W.; FLEMING, Louise. Advances in understanding and reducing the burden of severe asthma in children. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 8, n. 10, p. 1032-1044, 2020. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30399-4](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30399-4)

RAM, Felix SF; ROBINSON, Stewart M.; BLACK, Peter N. Effects of physical training in asthma: a systematic review. **British journal of sports medicine**, v. 34, n. 3, p. 162-167, 2000. <https://doi.org/10.1136/bjism.34.3.162>

RAMACHANDRAN, Hadassah Joann et al. A systematic review and meta-analysis on the effectiveness of swimming on lung function and asthma control in children with asthma. **International journal of nursing studies**, v. 120, p. 103953, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijnurstu.2021.103953>

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. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e3181ad1c72>

ROGERI, Patricia S. et al. Crosstalk between skeletal muscle and immune system: which roles do IL-6 and glutamine play?. **Frontiers in physiology**, v. 11, p. 582258, 2020. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.582258>

ROGERI, P. S.; ROSA, LFBP Costa. Plasma glutamine concentration in spinal cord injured patients. **Life sciences**, v. 77, n. 19, p. 2351-2360, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.09.050>

RONSEN, Ola et al. Recovery time affects immunoendocrine responses to a second bout of endurance exercise. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 283, n. 6, p. C1612-C1620, 2002. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00242.2002>

RUFFINO, J. S. et al. Moderate-intensity exercise alters markers of alternative activation in circulating monocytes in females: a putative role for PPAR γ . **European journal of applied physiology**, v. 116, p. 1671-1682, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00421-016-3414-y>

RUSSELL, Richard J.; BRIGHTLING, Christopher. Pathogenesis of asthma: implications for precision medicine. **Clinical Science**, v. 131, n. 14, p. 1723-1735, 2017. <https://doi.org/10.1042/CS20160253>

SANO, K. et al. Ovalbumin (OVA) and Mycobacterium tuberculosis bacilli cooperatively polarize anti-OVA T-helper (Th) cells toward a Th1-dominant phenotype and ameliorate murine tracheal eosinophilia. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** v. 20, n. 6, p. 1260-1267, 1999. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.20.6.3546>

SARMENTO, George Jerre Vieira. **O ABC da Fisioterapia Respiratória**. 2.ed. Barueri, SP: Manole, cap. 25, 2015.

SCHEFFER, Débora da Luz; LATINI, Alexandra. Exercise-induced immune system response: Anti-inflammatory status on peripheral and central organs. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 10, p. 165823, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165823>

SELLMANN, C. et al. Oral glutamine supplementation protects female mice from nonalcoholic steatohepatitis. **J. Nutr.** v. 145, n. 10, p. 2280-2286, 2015. <https://doi.org/10.3945/jn.115.215517>

SHAH, Ali Mujtaba; WANG, Zhisheng; MA, Jian. Glutamine metabolism and its role in immunity, a comprehensive review. **Animals**, v. 10, n. 2, p. 326, 2020. <https://doi.org/10.3390/ani10020326>

SHAW, David M. et al. T-cells and their cytokine production: The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of strenuous exercise. **Cytokine**, v. 104, p. 136-142, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.10.001>

SHIMIZU, S. Routes of administration. **The laboratory mouse**, v. 1, p. 527-543, 2004. <https://doi.org/10.1016/B978-012336425-8/50085-6>

SICA, Antonio et al. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 3, p. 787-795, 2012. <https://doi.org/10.1172/JCI59643>

SILVA, Ronaldo A. et al. Aerobic training reverses airway inflammation and remodelling in an asthma murine model. **European Respiratory Journal**, v. 35, n. 5, p. 994-1002, 2010. <https://doi.org/10.1183/09031936.00049509>

SOARES, Tamires da Cunha et al. Efeitos da suplementação de glutamina em atletas de alto rendimento: uma revisão de literatura. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 13, n. 77, p. 17-26, 2019. Disponível em: <https://www.rbne.com.br/index.php/rbne/article/view/1215>. Acesso em 6 de janeiro de 2024.

SORIANO, Joan B. et al. Prevalence and attributable health burden of chronic respiratory diseases, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 8, n. 6, p. 585-596, 2020. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30105-3](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30105-3)

TERRA, R. et al. Efeito do exercício no sistema imune: resposta, adaptação e sinalização celular. **Rev. Bras. de Medicina do Esporte**, v. 18, p. 208-214, 2012. <https://doi.org/10.1590/S1517-86922012000300015>

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. <https://doi.org/10.1183/09031936.00003411>

TRIGGIANI, Massimo et al. Secretory phospholipases A2 in inflammatory and allergic diseases: not just enzymes. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 116, n. 5, p. 1000-1006, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.08.011>

VALERIANI, Federica et al. Swimming attendance during childhood and development of asthma: Meta-analysis. **Pediatrics international**, v. 59, n. 5, p. 614-621, 2017. <https://doi.org/10.1111/ped.13230>

VARRICCHI, Gilda et al. Biologics and airway remodeling in severe asthma. **Allergy**, v. 77, n. 12, p. 3538-3552, 2022. <https://doi.org/10.1111/all.15473>

VARRICCHI, Gilda et al. Thymic stromal lymphopoietin isoforms, inflammatory disorders, and cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1595, 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01595>

VASCONCELOS, D. A. A. et al. Oral L-glutamine pretreatment attenuates skeletal muscle atrophy induced by 24-h fasting in mice. **J. Nutr. Biochem.** v. 70, p. 202-214, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.05.010>

VEDOVA, MC Della et al. Diet-induced pulmonary inflammation and incipient fibrosis in mice: a possible role of neutrophilic inflammation. **Inflammation**, v. 42, p. 1886-1900, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10753-019-01051-9>

VIEIRA, R. P. et al. Exercise deactivates leukocytes in asthma. **International journal of sports medicine**, p. 629-635, 2013. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1358477>

VIEIRA, Rodolfo de Paula et al. Anti-inflammatory effects of aerobic exercise in mice exposed to air pollution. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 44, n. 7, p. 1227-1234, 2012. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e31824b2877>

VIEIRA, Rodolfo P. et al. Aerobic exercise decreases chronic allergic lung inflammation and airway remodeling in mice. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 176, n. 9, p. 871-877, 2007. <https://doi.org/10.1164/rccm.200610-1567OC>

YANG, Xia et al. Curcumin reduces lung inflammation via Wnt/ β -catenin signaling in mouse model of asthma. **Journal of Asthma**, v. 54, n. 4, p. 335-340, 2017. <https://doi.org/10.1080/02770903.2016.1218018>

YICK, C. Y. et al. Extracellular matrix in airway smooth muscle is associated with dynamics of airway function in asthma. **Allergy**, v. 67, n. 4, p. 552-559, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2011.02773.x>

WALSH, Neil P. et al. Position statement part one: immune function and exercise. **Exerc Immunol Rev**, v. 17, p. 6-63, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21446352/>. Acesso em 17 de outubro de 2023.

WENZEL, Sally E. Severe adult asthmas: integrating clinical features, biology, and therapeutics to improve outcomes. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 203, n. 7, p. 809-821, 2021. <https://doi.org/10.1164/rccm.202009-3631CI>

WICHER, Ivonne Bernardo et al. Effects of swimming on spirometric parameters and bronchial hyperresponsiveness in children and adolescents with moderate persistent atopic asthma. **Jornal de pediatria**, v. 86, p. 384-390, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0021-75572010000500006>

ZHANG, Y. et al. Th2 cytokines orchestrate the secretion of MUC 5 AC and MUC 5B in IL-5-positive chronic rhinosinusitis with nasal polyps. **Allergy**, v. 74, n. 1, p. 131-140, 2019. <https://doi.org/10.1111/all.13489>

ZOUNEMAT KERMANI, Nazanin et al. Type 2-low asthma phenotypes by integration of sputum transcriptomics and serum proteomics. **Allergy**, v. 76, n. 1, p. 380-383, 2021. <https://doi.org/10.1111/all.14573>

ANEXO

APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Universidade Federal de Uberlândia
Comissão de Ética na Utilização de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “**Análise dos efeitos da suplementação com aminoácidos não essenciais associada ao exercício físico sobre biomarcadores fisiológicos e imunológicos na asma experimental**”, protocolo nº **024/20**, sob a responsabilidade de **ERNESTO AKIO TAKETOMI** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião **23 de setembro de 2022**.

(We certify that the project entitled “**Análise dos efeitos da suplementação com aminoácidos não essenciais associada ao exercício físico sobre biomarcadores fisiológicos e imunológicos na asma experimental**”, protocol **024/20**, under the responsibility of **Ernesto Akio Taketomi** - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was **approved** for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of **september 23th, 2022**).

Vigência do Projeto	Início: 22/03/2021 Término: 30/01/2023
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Camundongo isogênico BALB/c
Número de animais	128 animais + 40 animais = 168 animais
Peso / Idade	20 – 25g / 6 a 8 semanas
Sexo	Fêmea
Origem / Local	REBIR – UFU
Local onde serão mantidos os animais:	REBIR - UFU

Alteração realizada: Mudança na data término de 01/08/2022 para 30/01/2023. Solicitação de 40 animais para realização da replicata final dos grupos experimentais.

Uberlândia, 05 de outubro de 2022.


Prof. Dr. Luiz Fernando Moreira Izidoro
 UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Comissão de Ética na Utilização de Animais
 Coordenador da CEUA
 Portaria R Nº 3151/2022